

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITOS DURADOUROS DA SEPARAÇÃO MATERNA
SOBRE PARÂMETROS COGNITIVOS, RESPOSTAS
EMOCIONAIS E ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS EM
RATOS**

Tese de Doutorado

Luisa Amalia Diehl

Porto Alegre, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITOS DURADOUROS DA SEPARAÇÃO MATERNA
SOBRE PARÂMETROS COGNITIVOS, RESPOSTAS
EMOCIONAIS E ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS EM
RATOS**

Luisa Amalia Diehl

Orientadora: Prof. Dra. Carla Dalmaz

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor em
Neurociências

Porto Alegre, 2014

“Amo a ciência, e dói-me pensar em como tantas pessoas sentem pavor do assunto, ou acham que a escolha pela ciência pressupõe o descarte da compaixão, das artes ou do encantamento diante da natureza. A ciência não foi feita para acabar com o mistério, mas sim para reinventá-lo e revigorá-lo.”

(Robert M. Sapolsky)

Aos meus avós,
que tantas saudades deixaram.

AGRADECIMENTOS

À **Carla**, minha super orientadora, pela amizade, paciência, disponibilidade, sabedoria e confiança que em mim depositou, nesses quase 10 anos de convivência. Exemplo de profissional. Serei sempre muito grata;

Aos meus mais antigos colegas de laboratório (ainda laboratório 32), **Patrícia, André, Ana Paula, Léo, Zé e Lenir**, exemplos de pesquisadores. Pessoas especiais na minha vida, que muito me ensinaram e motivaram. Obrigada por terem me ensinado muito do que eu sei hoje, pela ajuda, companheirismo, bom humor e carinho que tornam este trabalho muito mais prazeroso. Que saudade sinto de vocês!

À **Daniela, Cristie, Rachel, Nati, André Benitz, Marina e Carla** (nutri) obrigada por toda ajuda, pelas longas horas de conversa e “auto-ajuda” e pela descontração que trouxeram ao nosso laboratório. A companhia de vocês tornou mais agradável os momentos de trabalho e estudo;

Aos demais colegas de laboratório (hoje laboratório 37). A todos vocês, obrigada pela ajuda, carinho e alegria essenciais no ambiente de trabalho;

Aos laboratórios do professor **Aldo**, da professora **Matilde**, da professora **Ângela Wyse** e do professor **Victor Molina**, obrigada por terem me disponibilizado um espaço do seu laboratório e por terem me recebido com carinho;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade pública e de muita qualidade e ao Departamento de Bioquímica pelo acolhimento;

Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e todo grupo docente e administrativo;

Aos órgãos financiadores de pesquisa que facilitam a viabilização deste projeto, em especial ao CNPq, pela bolsa concedida;

A todos meus amigos, antigos e recentes, familiares, funcionários da UFRGS e do HCPA que, de alguma forma, facilitaram minha vida, fazendo muito esforço para isso ou até mesmo sem saber;

Em especial, agradeço aos meus pais, **Carlos e Isolde**, pela paciência de antes, durante e depois do doutorado, pela compreensão, total apoio e incentivo inesgotáveis. Exemplos de pessoas e trabalhadores. Muito obrigada por serem quem são, inspirando-me e fazendo-me crescer cada dia mais um pouquinho. E não poderia faltar meu irmão, **Felipe**, responsável por eu ter escolhido e conhecido o caminho da pesquisa em Neurociências, de uma inteligência admirável, que me ajudou da sua maneira, me proporcionando boas risadas e me acalmando, quando preciso;

Aos meus sogros, **Hélio e Elda**, compreensíveis com minha ausência, mas sempre me motivando e torcendo com minhas conquistas;

Ao meu maior companheiro e ajudante, o **Thi**, que há 10 anos acompanha toda minha trajetória, sempre me apoiando, incentivando e acreditando em mim. Tuas palavras positivas foram essenciais para que eu no cansaço e na correria do dia-a-dia, não desistisse. Cada conquista minha, tu foste essencial para que elas acontecessem. És meu amor para toda vida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Estresse e Funcionamento do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA).....	3
1.2 Estresse Oxidativo e Sistema Nervoso.....	8
1.3 Estimulação e Separação Materna no Período Neonatal e o Desenvolvimento Neural.....	9
1.4 A Relação Mãe-Filhote.....	12
1.5 Inflamação e Estresse Neonatal.....	13
1.6 Ocitocina.....	15
1.7 Justificativa.....	20
2.OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS.....	25
CAPÍTULO 1/ARTIGO 1 - Luisa Amália Diehl, Natividade de Sá Couto Pereira, Daniela P. Laureano, André N. D. Benitz, Cristie Noschang, Andrea G.K. Ferreira, Emilene B. Scherer, Fernanda R. Machado, Thiago Pereira Henriques, Angela T.S. Wyse, Victor Molina, Carla Dalmaz. Contextual Fear Conditioning in Maternal Separated Rats: The Amygdala as a site for alterations.....	27

CAPÍTULO 2/ARTIGO 2 – Luisa A. Diehl, Thiago Pereira Henriques, Cátia Corrêa Nunes, Aldo Bolten Lucion, Carla Dalmaz. Maternal Separation alters social interaction and oxytocin levels in cerebrospinal fluid in rats.....38

CAPÍTULO 3/OUTROS RESULTADOS.....69

4. DISCUSSÃO GERAL.....84

5. CONCLUSÕES.....95

6. REFERÊNCIAS.....97

7. ANEXOS.....116

 7.1 Ilustrações dos Procedimentos Práticos.....117

 7.1.1 Estresse Neonatal.....117

 7.1.2 Aparato utilizado para a tarefa de Medo Condicionado ao Contexto.....117

 7.1.3 Aparato utilizado para a tarefa de Interação Social.....118

 7.1.4 Esquema representativo do aparato utilizado para verificar o Comportamento Alimentar.....118

 7.1.5 Tarefa utilizada para avaliar memória espacial - Labirinto Aquático de Morris.....119

 7.1.6 Esquema representativo do aparato para a Tarefa de Reconhecimento de Objetos.....119

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH.....	Hormônio Adrenocorticotrópico
ADN.....	Ácido Desoxirribonucléico
ARN.....	Ácido Ribonucléico
BDNF.....	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
CAT.....	Catalase
CRH.....	Hormônio Liberador da Corticotropina
CS.....	<i>Conditioned Stimulus</i>
CSF.....	<i>Cerebrospinal Fluid</i>
DNA.....	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA.....	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EROs.....	Espécies Reativas de Oxigênio
TNF.....	Fator de Necrose Tumoral
GCs.....	<i>Circulating Glucocorticoids</i>
GPx.....	Glutathione Peroxidase, <i>Glutathione Peroxidase</i>
HHA.....	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HPA.....	<i>Hypothalamic-Pituitary-Adrenal</i>
IL-1.....	Interleucina-1
IL-6.....	Interleucina-6
LDH.....	Lactato Desidrogenase
LHRH.....	Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante
LPS.....	Lipopolisacarídeos
MPOA.....	Área Pré-Óptica Medial
MS.....	<i>Maternal Separation</i>
MTT.....	(brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
OT.....	Ocitocina, <i>Oxytocin</i>
PBS.....	Tampão Fosfato-Salino
pH.....	Potencial Hidrogeniônico

PND.....*Postnatal Day*
POG.....*Privação de Oxigênio e Glicose*
PVN.....*Núcleo Paraventricular do Hipotálamo*
PVN.....*Paraventricular Nuclei of Hypothalamus*
RL.....*Radicais Livres*
ROS.....*Reactive Oxygen Species*
SM.....*Separação Materna*
SNC.....*Sistema Nervoso Central*
SOD.....*Superóxido Dismutase, Superoxide Dismutase*
SON.....*Núcleo Supraóptico do Hipotálamo, Supraoptic Nuclei of*

Hypothalamus

SHRP*Stress-Hyporesponsive-Period*
TP.....*Transtorno de Pânico*
US..... *Unconditioned Stimulus*
UTIs.....*Unidades de Tratamento Intensivo*

RESUMO

Muitas evidências indicam que exposições a eventos adversos no início da vida, tais como abuso e negligência, aumentam a vulnerabilidade a psicopatologias na vida adulta. Tem sido relatado que psicopatologias podem levar a não apenas prejuízos cognitivos, emocionais e sociais, mas também a uma variedade de alterações neuroquímicas. Separações maternas periódicas no período neonatal têm sido usadas como um modelo animal de eventos adversos no início da vida, avaliando-se seus efeitos sobre aspectos comportamentais e fisiológicos observados na vida adulta. As primeiras duas semanas de vida representam um período crítico para o desenvolvimento neural em ratos. Sabe-se que períodos prolongados de separação materna (SM) podem modificar parâmetros neurobiológicos e comportamentais. Logo, o objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos duradouros de SM repetida em diferentes parâmetros, incluindo comportamentos de medo, sociais, cognitivos e alimentar, assim como uma série de análises neuroquímicas. Ratos Wistar machos e fêmeas foram sujeitos a SM repetidas (incubadora a 32°C, 3h/dia) nos dias 1 ao 10 de vida. Na primeira parte deste trabalho, os animais foram expostos à tarefa de Medo Condicionado ao Contexto aos 60 dias de idade. Uma semana após, as atividades da Na⁺, K⁺-ATPase e de enzimas antioxidantes foram medidas na amígdala. Na segunda parte deste trabalho, os animais foram expostos ao teste de Interação Social por 15 min aos 70 dias de idade. Foram observadas as frequências e durações dos seguintes comportamentos: cheirar; ataque lateral; ataque frontal; boxing; e tempo gasto sem demonstrar comportamentos sociais. A ocitocina foi medida no líquido. Na terceira parte deste trabalho, ratos adultos foram expostos a tarefas de memória (Reconhecimento de Objetos e ao Labirinto Aquático de Morris). O Comportamento Alimentar também foi analisado. Dano celular, quebras do ADN, citocinas inflamatórias e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) foram medidos no hipocampo. A SM aumentou o Medo Condicionado ao Contexto e a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase na amígdala. Foi encontrado um efeito significativo da SM sobre a catalase apenas em fêmeas, aumentando sua atividade. A SM reduziu os comportamentos sociais (duração de cheirar; frequências de ataques lateral e frontal; frequência e duração de boxing). Houve uma tendência dos animais SM apresentarem redução na ocitocina no líquido. Animais SM apresentaram desempenho prejudicado nos testes de Reconhecimento de Objetos e Labirinto aquático de Morris. Não houve efeito sobre o Comportamento Alimentar. Os seguintes resultados foram encontrados nas avaliações neuroquímicas: SM aumentou as quebras de ADN no hipocampo, apresentou uma tendência a diminuir o TNF- α hipocampal em ratos machos e aumentou significativamente o TNF- α hipocampal em fêmeas. Nossos resultados sugerem um papel do ambiente precoce na programação das respostas de medo, sociais e cognitivas na vida adulta, assim como em suas neuroquímicas subjacentes. Observamos que um evento aversivo no início da vida, tal como a SM, pode levar a prejuízos em parâmetros comportamentais e neuroquímicos. Encontramos uma atividade aumentada na amígdala (indicada pela Na⁺, K⁺-ATPase) causada pela SM, afetando comportamentos relacionados ao medo, com melhor desempenho na tarefa de medo condicionado em adultos, e esse efeito pode ser tarefa-específico (os efeitos sobre a memória espacial e de reconhecimento de objetos são opostos). Ademais, a SM reduziu comportamentos agressivos e sociais. Esse resultado pode ser relacionado à tendência da SM reduzir os níveis de ocitocina no líquido, a qual é um hormônio envolvido em comportamentos afiliativos e sociais. As diferenças de sexo nos comportamentos sociais estão de acordo com estudos anteriores. Os prejuízos de memória em animais SM podem ser relacionados às mudanças neuroquímicas encontradas no hipocampo, tais como índices

aumentados de quebras de ADN. Ademais, nosso trabalho encontrou diferenças de sexo nas atividades neuroquímicas, tais como atividade da CAT na amígdala em fêmeas SM e um efeito contrário entre machos e fêmeas SM nos níveis de TNF- α . Esses achados demonstram que um estresse no início da vida pode levar a efeitos neuroquímicos sexo-específicos.

ABSTRACT

A large body of evidences indicates that exposure to early adverse life events such as childhood neglect and abuse can increase vulnerability to psychopathology in adult life. It has been reported that psychopathologies may lead not only to cognitive, emotional and social impairments, but also to a variety of neurochemical alterations. Periodic neonatal maternal separation (MS) in the rat has been used as a rodent model of the effects of early adverse life events on adult physiology and behavior. The first two weeks of life are a critical period for neural development in rats. The purpose of the present study was to verify the long-term effects of repeated MS in different parameters, including conditioned fear, social, cognitive and feeding behaviors, as well as a series of neurochemical analysis. Female and male Wistar rats were subjected to repeated MS (incubator at 32°C, 3h/day, during postnatal days 1-10). In the first part of this work, the subjects were exposed to a Contextual Fear Conditioning task at 60 days of age, and Na⁺, K⁺-ATPase and antioxidant enzymes activities were evaluated in the amygdala. In the second part of this work, the animals were exposed to 15-min Social Interaction test at 70 days of age in order to analyze social behaviors (frequencies and durations of sniffing; lateral attack; frontal attack; boxing; and time spent in non-social behavior). Oxytocin was measured in cerebral spinal fluid (CSF). In the third part of the present work, adult rats were exposed to Object Recognition and Morris Water Maze memory tasks. Feeding behavior was analyzed as well. Cell damage, mitochondrial viability, DNA breaks, inflammatory cytokines, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were measured in the hippocampus. MS effects were observed, with increased Contextual Fear Conditioning and increased Na⁺, K⁺-ATPase in amygdala, without differences groups on the antioxidant enzymes activities (SOD, GPx, CAT) in male rats. Nevertheless, we found a significant MS effect in females, with an increase of CAT activity. MS decreased social behaviors (sniffing duration; frequencies of lateral and frontal attacks; frequency and duration of boxing). Two way ANOVA indicated a tendency of MS animals towards decreased CSF oxytocin levels. MS animals also showed impairments on performances of object recognition and Morris water maze tasks, and no differences on feeding behavior. The following results were found on neurochemical assessments: MS increased DNA breaks in hippocampus; additionally, a tendency for MS decreasing hippocampal TNF- α in male rats was observed, while MS significantly increased hippocampal TNF- α in females. Our results suggest a role of early rearing environment in programming fear, social and cognitive responses in adulthood, as well as their underlying neurochemistry. We found that an aversive early-life event, such as MS, may lead to impairments in behavioral and neurochemical parameters. We found that MS increased activity in the amygdala (as indicated by the increased activity of Na⁺, K⁺-ATPase), affecting behaviors related to fear in adulthood, and this effect could be task-specific. Moreover, MS decreased aggressive and social behaviors. This result may be related to the marginally reduced CSF oxytocin levels in MS subjects, which is a hormone involved in affiliative and social behaviors. Sex differences on social behaviors are in accordance to previous studies. MS also impaired short- and long-term memories as observed on Object Recognition and Morris Water Maze tasks. These memory impairments on MS animals may be associated to neurochemical changes found in hippocampus, such as increased DNA breaks. Moreover, our work found sex differences on neurochemical activities, such as amygdalar CAT activity in MS females and an opposing effect of hippocampal TNF- α in MS females compared to males. These findings reveal that early stress may lead to sex-specific neurochemical effects.

1. Introdução

Recém-nascidos prematuros ou com baixo peso são mais suscetíveis a situações de estresse. Mesmo com o avanço tecnológico e melhoria do atendimento em UTIs neonatais, esse grupo continua apresentando uma alta morbidade. Por sua vez, uma série de estudos tem demonstrado que intervenções no período neonatal podem levar a alterações nos sistemas nervoso, cardiovascular, respiratório e endócrino–metabólico, além de alterações comportamentais.



Figura 1: Foto que representa um recém-nascido numa unidade de tratamento intensivo neonatal.

Intervenções feitas na infância influenciam na relação da mãe com os filhotes, e a mãe pode assumir determinados comportamentos que afetam o desenvolvimento do sistema nervoso dos seus filhotes. Estudos sobre o estresse neonatal têm mostrado a importância de um ambiente adequado para um desenvolvimento saudável, pois os recém-nascidos são mais vulneráveis nesse período. Assim, experimentos nesta área são de grande importância para futuramente relacionarmos eventos adversos na infância com o aparecimento de algumas patologias.

Experiências negativas no início da vida podem perturbar respostas adaptativas normais durante a vida adulta. A separação materna nessa fase do desenvolvimento tem sido relacionada ao comportamento do tipo ansioso, além de distúrbios

endocrinológicos e neuroquímicos em ratos, afetando especialmente a resposta ao estresse. Nosso trabalho anterior, desenvolvido durante o mestrado, sugeriu que a separação materna (SM) (utilizada como modelo de um evento estressor no início da vida) pode aumentar a ansiedade em modelos de trauma no rato adulto, porém esse resultado foi sexo-específico, tendo sido observado apenas em machos. É possível que outras diferenças sexo-específicas estejam presentes na maneira como animais submetidos à separação materna reagem a um desafio do ambiente na idade adulta. Uma investigação de possíveis efeitos comportamentais e correlatos neuroquímicos é, portanto, necessária. Além disso, evidências têm sugerido que o estresse no período neonatal também possa aumentar o risco de desenvolver doenças inflamatórias. Adicionalmente, tem sido sugerido que a presença de citocinas inflamatórias teria um papel importante na patologia de doenças neurodegenerativas.

1.2 Estresse e Funcionamento do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA)

O cientista e médico húngaro Hans Selye definiu em 1936 o estresse como “Síndrome da Adaptação Geral”, ou seja, a resposta adaptativa de um organismo à ação de agentes nocivos – os chamados agentes estressores. A resposta ao estresse seria dividida em três estágios: um primeiro de alarme, onde o agente estressor seria notado, um segundo de resistência, no qual o organismo estaria combatendo o agente estressor com sucesso, e, por fim, um estado de exaustão, onde o organismo esgotaria sua capacidade de resposta de estresse, daí advindo os seus efeitos deletérios (SELYE, 1936, *APUD* KOPIN, 1995). Hoje em dia, acredita-se que tais efeitos sejam advindos de uma resposta repetida à hiperexposição a agentes estressores e não mais de um esgotamento dessa capacidade apontada por Selye. Um estresse crônico passa a ser

patogênico não devido às falhas nas defesas do organismo, mas em função das próprias defesas se tornarem patogênicas (SAPOLSKY, 1992), e a palavra “estresse” tem sido interpretada como o conjunto de respostas do organismo a um estressor. “Estressor” é definido como um desafio ao indivíduo que potencialmente pode perturbar a homeostase e, assim sendo, requer uma resposta fisiológica. Pode também ser apenas uma interpretação inadequada da situação, percebida erroneamente como ameaça, que resulta numa resposta comportamental e/ou hormonal (McEWEN, 2002; TSIGOS *et al.*, 2002; ELENKOV & CHROUSOS, 2006; JOELS & BARAM, 2009).

Há dois sistemas de resposta ao estresse classicamente descritos: (a) o sistema neurovegetativo, com liberação de adrenalina pela medula adrenal - com ativação da divisão simpática desse sistema, desencadeando reações descritas pelo paradigma de “luta ou fuga”, (b) o Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), com liberação dos glicocorticoides, produzidos no córtex da adrenal sob estímulo hipotalâmico e hipofisário (McEWEN, 2002; TSIGOS *et al.*, 2002; HERMAN *et al.*, 2012; ELENKOV & CHROUSOS, 2006). A ativação aguda desses sistemas promove principalmente aumento da disponibilidade de energia e melhora do fluxo sanguíneo para órgãos-alvo, melhorando a imunidade durante uma emergência e suprimindo anabolismo que não seja essencial, como crescimento, reparo tecidual e reprodução (FONTELLA *et al.*, 2005, SAPOLSKY, 2000) sendo altamente adaptativa (TSIGOS *et al.*, 2002). Contudo, uma longa elevação dos níveis dessas moléculas pode ter consequências deletérias, incluindo risco de hipertensão, desenvolvimento de diabetes mellitus insulina-resistente, amenorréia, impotência, úlceras e supressão imunológica (SAPOLSKY *et al.*, 2000). Além disso, os glicocorticoides podem ter efeitos negativos sobre o sistema nervoso central, levando a dilatação ventricular, prejuízos cognitivos (O'BRIEN, 1997), diminuição da plasticidade sináptica e neurotoxicidade (SAPOLSKY, 2000,

DALLMAN *et al.*, 2004; MILLER *et al.*, 2002), que varia desde atrofia dendrítica até mesmo a perda celular.

Um eixo HHA funcional é essencial para a sobrevivência durante a idade adulta, e flutuações na sua atividade, no desenvolvimento, principalmente na infância, podem significar mal-adaptações na formação de um encéfalo imaturo (GUTMAN & NEMEROFF, 2002).

O eixo HHA tem uma regulação extremamente fina no período pré e pós-natal imediato, possuindo alta plasticidade (FRANCIS *et al.*, 1999). Distúrbios no padrão normal de secreção de glicocorticoides nesse período crítico podem alterar de forma definitiva as respostas do organismo ao estresse (LEVINE *et al.*, 1967).

Qualquer distúrbio, seja ele real ou imaginário, provoca uma resposta ao agente estressor, com a finalidade de manter a homeostase e facilitar a adaptação. Estímulos externos têm grande impacto sobre o sistema límbico, que se relaciona com o hipotálamo. O controle central do sistema de resposta ao estresse inclui os neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Essas células estão sob influência de vários mecanismos intrínsecos e extrínsecos que regulam a resposta do eixo HHA ao estresse (SAPOLSKY *et al.*, 2000; CARRASCO & VAN DE KAR, 2003).

O eixo HHA é um dos principais sistemas de controle da resposta psicológica aos estressores psicológicos e psicossociais nos mamíferos (O'BRIEN, 1997; SAPOLSKY *et al.*, 2000). Sinais neuronais associados ao estressor são traduzidos em uma resposta endócrina no hipotálamo. O PVN do hipotálamo é um centro que recebe e coordena aferências neuroendócrinas, neurovegetativas, cognitivas e emocionais, e é responsável pelo sinal que inicia a secreção de glicocorticoides (HERMAN *et al.*, 2003).

Aferências ao PVN são provenientes principalmente da informação sensorial, promovendo respostas do eixo a ameaças reais à homeostasia, e incluem o núcleo do trato solitário, núcleos da rafe, o órgão subfornicial, o núcleo próprio da estria terminal, o tálamo e regiões hipotalâmicas que circundam o PVN. Aferências indiretas vindas do hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal, septo lateral e tálamo ativam os mesmos neurônios parvocelulares na ausência de desafios fisiológicos francos (HERMAN *et al.*, 2003).

No estado de repouso (basal), o hipotálamo apresenta secreção de hormônio liberador de corticotropina (CRH) e de arginina-vasopressina (AVP) de uma maneira pulsátil, com dois ou três picos por hora (ENGLER *et al.*, 1989). Durante o estresse agudo, a amplitude e a frequência desses pulsos aumentam, resultando na liberação de o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise e de cortisol (corticosterona em ratos) pelo córtex da adrenal (TSIGOS *et al.*, 1994). Uma série de situações pode estimular o hipotálamo, como por exemplo, frio, infecção, hemorragia, choque, vibração, estresse emocional e/ou social, contenção, etc. (MILLER *et al.*, 2002). Citocinas e outros mediadores de inflamação também são liberados nessas ocasiões e potencializam a ação dos vários componentes do eixo HHA.

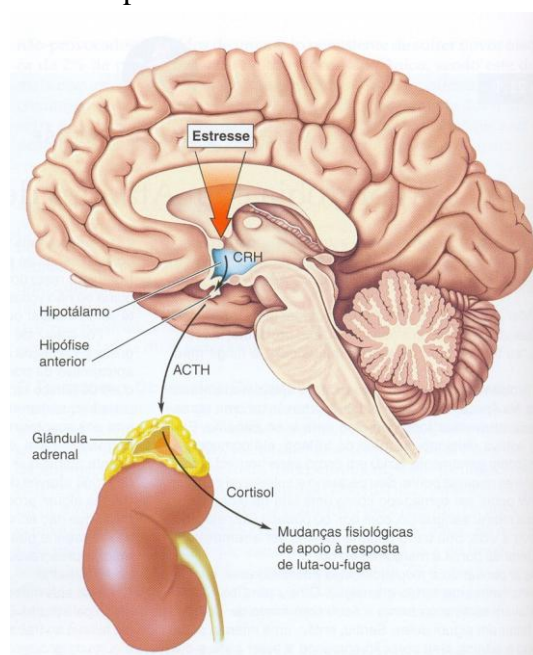


Figura 2: Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA). Estímulos ambientais externos são captados pelo sistema límbico, ativando os sistemas de resposta ao estresse, entre eles o eixo HHA (Figura extraída de: BEAR *et al.*, 2008).

O ACTH aumenta a síntese de glicocorticoides pelo córtex da glândula adrenal. Em situações críticas, os glicocorticoides têm ações de proteção e manutenção da homeostasia: mobilização de estoques energéticos através de gliconeogênese, lipólise e catabolismo protéico, melhora da função cognitiva, inibição da função gonadal, alteração da homeostasia do cálcio (de KLOET, 1998). Os glicocorticoides têm importância na própria regulação neuroendócrina, uma vez que atuam em receptores do sistema límbico (especialmente amígdala e hipocampo), do hipotálamo e da hipófise por retroalimentação negativa, encerrando a ativação (de KLOET, 1998). Esses hormônios também inibem as citocinas, regulando a atividade do eixo HHA. A inibição causada pelos glicocorticoides limita sua própria ação, prevenindo o organismo de seus efeitos catabólicos, antirreprodutivos e imunossupressores (TSIGOS *et al.*, 2002).

Os glicocorticoides são os principais mediadores da resposta ao estresse e influenciam diversos sistemas para fazer com que o organismo reaja ao agente estressor (de KLOET, 1998). Aumentos agudos e por tempo limitado nos níveis de glicocorticoides provocam uma resposta adaptativa. Entretanto, o aumento prolongado nos níveis desses hormônios pode ter efeitos negativos no sistema nervoso, além de outros tecidos, e estão sendo associados à dilatação ventricular, atrofia cerebral, redução na capacidade cognitiva (O'BRIEN, 1997) e possível neurotoxicidade (SAPOLSKY, 2000). Aumentos prolongados nos níveis de glicocorticoides causam danos também ao hipocampo, tendo como consequência a redução da retroalimentação negativa. Esse ciclo vicioso de eventos é referido como a “cascata dos glicocorticoides” (SAPOLSKY *et al.*, 1986).

1.2 Estresse Oxidativo e Sistema Nervoso

Substâncias como o peróxido de hidrogênio e formas químicas chamadas de radicais livres compõem as espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais estão envolvidas em dano tecidual. Os radicais livres (RL) são espécies químicas caracterizadas por serem capazes de ter existência independente e possuírem um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984). Alguns RL são produzidos por reações essenciais aos processos biológicos, como o ânion superóxido, e os radicais hidroxila e peroxila (HALLIWELL & CROSS, 1994). As EROs são altamente reativas e capazes de danificar o ADN, o ARN, as proteínas e os lipídeos (ALLEN, 1993).

Estressores físicos e psicológicos causam liberação de glicocorticoides, os hormônios esteróides liberados pela glândula adrenal. Essas substâncias exercem um papel adaptativo, pois mobilizam energia para os tecidos críticos nas situações de emergência e suprimem o anabolismo que não é essencial. Entretanto, há evidências de que altos níveis de glicocorticoides no cérebro podem causar dano aos neurônios. Esses danos têm sido associados ao aumento da geração de EROs (McINTOSH & SAPOLSKY, 1996).

A exposição ao estresse emocional se mostrou estar acompanhada pela ativação de processos mediados pelos RL (LIU *et al.*, 1994; MANOLI *et al.*, 2000). A lipoperoxidação é um dos principais eventos provocados pelas EROs. Ela induz mudanças na fluidez e no potencial da membrana e na permeabilidade a íons. O sistema nervoso é particularmente sensível aos danos provocados pelos RL, pois é rico em substratos oxidáveis, tem alta tensão de oxigênio e baixa capacidade antioxidante (SANDHIR *et al.*, 1994).

Os danos induzidos pelas EROs são normalmente controlados por sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (HALLIWELL & CROSS, 1994). Essas defesas celulares diminuem as concentrações de RL e exercem reparo nos danos oxidativos às células. Os sistemas antioxidantes incluem enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), que converte radicais superóxido em peróxido de hidrogênio, catalase (CAT), que tem sido apontada como responsável pela destoxificação do peróxido de hidrogênio, e a glutatona peroxidase (GPx), que diminui os níveis de peróxidos, principalmente aqueles derivados da oxidação de fosfolípidos de membrana. A remoção do superóxido e do peróxido de hidrogênio diminui a geração de radicais hidroxila (KEHRER, 2000).

1.3 Estimulação e Separação Materna no Período Neonatal e o Desenvolvimento Neural

Interações genéticas e ambientais regulam os mecanismos neurais envolvidos no desenvolvimento de determinados comportamentos. Experiências sensoriais no início da vida pós-natal podem afetar o desenvolvimento neural e o comportamento de um animal adulto. Estímulos estressantes são algumas das influências ambientais que podem modificar o desenvolvimento neural (GONZÁLES *et al.*, 1990; LEE *et al.*, 2007; AISA *et al.*, 2008).

As duas primeiras semanas de vida de um rato constituem o chamado *período hiporresponsivo ao estresse* (SAPOLSKY *et al.*, 1986). Durante essa fase, a resposta do eixo HHA a estímulos nocivos é reduzida (HALTMEYER *et al.*, 1966; BARTOVA, 1968), ou seja, há uma exacerbação do mecanismo de retroalimentação negativa dos

glicocorticoides na hipófise e diminuição da sensibilidade da adrenal ao hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (YOSHIMURA *et al.*, 2003).



Figura 3: Respostas afetivas em filhotes de macacos: macacos órfãos desenvolvem um forte e persistente apego a uma mãe substituta e inanimada. (HARLOW H.F., ZIMMERMANN R.R., 1959).

As duas primeiras semanas após o nascimento representam um período crítico para o desenvolvimento neural em ratos. Consequentemente, a estimulação precoce atua sobre o desenvolvimento do sistema nervoso e induz uma variedade de mudanças neuroquímicas e comportamentais no adulto. A estimulação neonatal em ratos consiste tipicamente na “manipulação” dos filhotes por alguns minutos, na maioria dos estudos no período que abrange as primeiras duas semanas de vida (LEVINE, 1967). Essa manipulação em geral é realizada durante poucos minutos por dia no período neonatal. Por outro lado, a separação (ou privação) materna consiste da separação dos filhotes, que neste caso permanecem longe da mãe durante períodos mais prolongados (mais de 30 min; LIU *et al.*, 1997). Em animais, experiências sensoriais neonatais levam a efeitos de longo prazo no comportamento emocional e na reatividade ao estresse, já que influenciam o desenvolvimento do eixo HHA e suas respostas (LEVINE, 1967). Estímulos estressores, como a separação materna, são considerados influências

ambientais que podem modificar o desenvolvimento neural (GONZÁLES *et al.*, 1990). Dentre as intervenções neonatais mais estudadas, a manipulação dos filhotes – uma breve separação da mãe por até 30 minutos – leva a uma diminuição de respostas emocionais na vida adulta, interpretada como um comportamento reduzido de ansiedade e de aumento da atividade exploratória em ambientes desconhecidos (MEERLO *et al.*, 1999; KALINICHEV *et al.*, 2002), enquanto que a separação ou privação materna – durante 3 horas ou mais –, às vezes, tem o efeito contrário, com aumento da ansiedade e da reatividade neuroendócrina frente a um estressor na idade adulta (KALINICHEV *et al.*, 2002; OGAWA *et al.*, 1994).

A manipulação tem como consequência na vida adulta uma série de alterações comportamentais e endócrinas, incluindo uma diminuição do medo a novos ambientes. Além disso, esses animais, na idade adulta, apresentam uma resposta menos acentuada da secreção de glicocorticoides pela adrenal quando expostos a estímulos estressores. Portanto, os ratos estimulados na infância apresentam uma secreção de corticosterona menor frente a novos estímulos estressantes (LEVINE, 1993; MEANEY *et al.*, 1993). Contudo, os níveis basais de corticosterona de animais manipulados e não manipulados não diferem entre si quando adultos, mas as diferenças entre eles parecem ser devidas a uma sensibilidade diferencial do sistema nervoso central ao mecanismo de retroalimentação negativa da adrenal (LEVINE, 1994). Foi encontrada também uma maior concentração de receptores glicocorticoides no hipocampo (MEANEY *et al.*, 1989) e um aumento da inibição mediada pelo hipocampo e diminuição da excitação mediada pela amígdala na resposta neuroendócrina do eixo HHA nos animais que sofreram estresse neonatal (de KLOET *et al.*, 1998).

Em condições naturais, o desenvolvimento neural em um rato tipicamente ocorre em ambiente escuro e tranquilo, em que a maior fonte de estimulação provém da mãe e

dos seus companheiros de ninho (CALDJI *et al.*, 1998). Entretanto, diversos estudos mostram que a manipulação pós-natal ou outra estimulação do animal nesse período alteram o comportamento da mãe com seus filhotes, levando à idéia de que os efeitos dessas intervenções podem ser mediados pelas mudanças na interação mãe-filhote (LEVINE, 1994), afetando o desenvolvimento neural dos últimos. Quando submetidos à separação materna, os filhotes ficam privados de diversos tipos de estímulos, como tátil, olfatório, térmico, nutricional e auditivo, importantes para regular sua fisiologia e seu comportamento, levando aos efeitos comportamentais vistos na idade adulta (MARMENDAL, 2005; KUHN & SCHAMBERG, 1998; HOFER, 1994).

A manipulação neonatal aumenta a expressão de receptores para CRH e α_2 adrenorreceptores na amígdala e no *locus ceruleus*, regiões importantes para a resposta ao medo (CALDJI *et al.*, 1998), assim como para glicocorticoides no hipocampo e no córtex frontal, envolvidos na regulação da atividade do eixo HHA (FRANCIS *et al.*, 1996). Contudo, a separação materna acarreta a redução da concentração de receptores para glicocorticoides no hipotálamo, córtex frontal e hipocampo (LIU *et al.*, 1997).

Os estudos acima nos indicam que a diferenciação dos sistemas de receptores para glicocorticoides em determinadas regiões do sistema nervoso é sensível a uma variedade de sinais ambientais durante o período pós-natal, ou seja, o ambiente na fase neonatal pode determinar a responsividade do eixo HHA ao estresse por toda a vida do animal.

1.4 A Relação Mãe-Filhote

Vários estudos demonstraram que a manipulação ou qualquer outro tipo de estimulação do animal no período neonatal provoca um distúrbio da relação mãe-filho.

As mães de filhotes manipulados lambem mais a sua prole do que mães de filhotes não manipulados. Este comportamento da mãe em relação ao filhote afeta o desenvolvimento do sistema nervoso deste (LEVINE, 1994). Acredita-se que a perturbação dessa relação é que induziria o padrão comportamental e endócrino observado na vida adulta do rato manipulado no período neonatal.

O distúrbio dessa interação mãe-filho promove uma série de respostas comportamentais e fisiológicas que incluem mudanças na temperatura corporal, na locomoção, na frequência cardíaca e na reação emocional (HINDE & SPENCER-BOOTH, 1971). Foi demonstrado que, além de mudanças fisiológicas, há alterações bioquímicas em animais que sofreram privação materna, tais como redução da atividade da ornitina-descarboxilase e dos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) em certas regiões cerebrais (SCHANBERG & KUHN, 1985).



Figura 4: Rata lactante com seus filhotes neonatos.

1.5 Inflamação e Estresse Neonatal

Um grande número de estudos tem implicado o cuidado maternal e o período neonatal como sendo responsável por alterações nos sistemas de ativação de respostas antiinflamatórias. Esses estudos relacionam efeitos do estresse neonatal com alterações nos sistemas imunológico e endócrino e o aparecimento de doenças. Modelos de

estresse neonatal como a separação materna têm sido implicados com as principais alterações quanto à ativação de citocinas inflamatórias (BILBO *et al.*, 2006).

Eventos sobre a atividade do sistema imunitário que ocorrem no período de desenvolvimento neonatal produzem frequentemente efeitos no encéfalo e no comportamento. Essas alterações podem persistir durante toda a vida de um organismo. Por exemplo, estudos mostraram que uma infecção bacteriana em ratos no período neonatal está associada com um prejuízo dramático da memória quando avaliada na idade adulta (BARNETT & BURN, 1967). Entretanto, esse prejuízo é observado somente se um desafio imune periférico (lipopolisacarídeos [LPS]) é administrado 24 horas antes ou imediatamente depois da tarefa de aprendizado. Importante, o mesmo desafio dos LPS não tem nenhuma influência na memória nos controles (BILBO *et al.*, 2006). Assim, a infecção neonatal parece agir como um fator de vulnerabilidade, alterando a resposta do rato adulto ao LPS, que influencia então a memória (BARNETT & BURN, 1967).

Os LPS são potentes indutores de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo (por exemplo, a interleucina [IL-1]), e a expressão prolongada ou exagerada de citocinas pró-inflamatórias em resposta aos LPS pode danificar processos sinápticos e consequentemente memórias dependentes do hipocampo (BILBO *et al.*, 2006). Além disso, ratos que no período neonatal foram infectados com LPS apresentaram respostas exageradas de IL-1 no encéfalo, comparados com os ratos controles. Impedindo-se a expressão de IL-1 no encéfalo antes do aprendizado, impede-se o prejuízo da memória induzido pelos LPS em ratos infectados no período neonatal (BILBO *et al.*, 2006).

Os estudos mostraram a ativação central do eixo HHA como um mecanismo regulatório importante para a resposta inflamatória a um desafio infeccioso. Numa infecção ou ferimento, citocinas inflamatórias (interleucina-1, IL-1, interleucina-6, IL-6)

e o fator de necrose tumoral (TNF) são secretados das células do sistema imunitário ativadas. Estas citocinas têm diversas atividades, incluindo ativação endógena de pirógenos, ativação dos macrófagos, e co-estimulação de linfócitos T (BILBO *et al.*, 2006).

Citocinas pró-inflamatórias são também reguladas pela ativação central do eixo HHA com o aumento dos níveis de glicocorticoides. Esses hormônios, por sua vez, agem regulando a atividade dessas citocinas inflamatórias por um sistema de retroalimentação negativa, suprimindo a liberação delas. Assim, os hormônios glicocorticoides servem como um mecanismo regulatório sobre a ativação da resposta à infecção (AVITSUR *et al.*, 2006).

1.6 Ocitocina

Uma forte ligação da prole jovem com o provedor é crítica para a sobrevivência em espécies cujos filhotes nascem muito imaturos e dependentes, incluindo os humanos (MORICEAU & SULLIVAN, 2005). A mãe apresenta um conjunto de mudanças fisiológicas, muitas dessas estimuladas pelos próprios filhotes – tais como o estímulo de sucção, por exemplo – de modo a cuidar de sua prole e garantir sua sobrevivência (GIOVENARDI *et al.*, 2000; MIRANDA-PAIVA *et al.*, 2003; WALKER *et al.*, 2004). O cuidado materno-filial pode ser estudado ao examinar os componentes do cuidado materno, os quais incluem a construção de ninho, lambar e afagar os filhotes e cobri-los com o corpo. A relação mãe-filhote é tipicamente tida como simbiótica. Em roedores, o comportamento de amamentação que ocorre entre a mãe e seus filhotes recém-nascidos envolve a participação de ambos os membros. Quando separados de suas mães, os filhotes sinalizam para a mãe recolhê-los através de dicas olfativas, visuais e auditivas.

Após a mãe recolher seus filhotes para o ninho, ela então os cobre com o corpo e os lambe (WILKIS *et al.*, 1997). O comportamento de lambida tipicamente envolve lambe a região anogenital do filhote, o qual é benéfico para ambos a mãe e o filhote (MOORE & MORELLI, 1979; MOORE & CHADWICK-DIAS, 1986). Os filhotes são participantes ativos na interação da lambida, mas os machos são lambidos mais do que as fêmeas, talvez porque eles respondem mais rapidamente à estimulação materna do que as fêmeas, ou porque eles têm um odor diferente das fêmeas (MOORE & MORELLI, 1979; MOORE & CHADWICK-DIAS, 1986).

As interações filhote-mãe requerem circuitos de aproximação social e de motivação intactos. Os sistemas ocitocinérgico e opióide estão envolvidos na motivação do filhote de camundongo em procurar contato social com sua mãe, talvez também agindo através de circuitos de recompensa no encéfalo (YOUNG *et al.*, 1997; MOLES *et al.*, 2004). Quanto a estudos com ratos, foi sugerido que principalmente até o 10º dia pós-parto, os filhotes apresentam uma circuitaria neural peculiar adaptada a desenvolver um forte apego pela mãe, não importando a qualidade de cuidado materno recebido (MORICEAU & SULLIVAN, 2005). Filhotes de ratos que foram lambidos e afagados frequentemente por suas mães apresentam liberação de ocitocina (OT) (MOGI *et al.*, 2011; KOJIMA *et al.*, 2012). Há evidência de que a OT endógena durante o período neonatal tenha efeitos organizadores na expressão do comportamento adulto (PEDERSEN & BOCCIA, 2002).

A OT é produzida principalmente pelo trato hipotálamo-neuro-hipófise. Neurônios magnocelulares dos núcleos supraóptico (SON) e paraventricular (PVN) enviam seus axônios carregando o peptídeo através da camada interna da eminência média para o lobo posterior ou neural da glândula hipófise para liberá-la na circulação. Além disso, a OT liberada da neuro-hipófise pode alcançar a adeno-hipófise via os

plexos capilares compartilhados (JEZOVÁ *et al.*, 1995; CONSIGLIO, 2006). Além de sua presença no hipotálamo, a OT é encontrada em várias outras regiões encefálicas (por exemplo, no sistema límbico e no tronco encefálico), sugerindo que OT possui um papel na neurotransmissão (PEDERSEN & BOCCIA, 2002). Nos animais, o sistema ocitocinérgico central é considerado por apresentar um papel em vários tipos de comportamentos (social, sexual, materno e afiliativo) (YOUNG *et al.*, 1997; INSEL & YOUNG, 2000).

A OT facilita a iniciação do cuidado materno em ratos e ovelhas (INSEL & YOUNG, 2000). A OT originada do SON ou do PVN pode agir nos receptores de OT por todo o encéfalo para promover responsividade materna. A estimulação feita pelos filhotes não só influencia o comportamento materno, mas também a responsividade da mãe ao estresse (WALKER *et al.*, 2004). Além disso, a qualidade do cuidado materno que uma mãe demonstra é transmitida para sua prole neonata, assim como sua neuroendocrinologia subjacente - a qual envolve, por exemplo, os sistemas envolvendo o estrogênio e a OT (PEDERSEN & BOCCIA, 2002; CHAMPAGNE & MEANEY, 2001, 2007; CHAMPAGNE, 2008). Logo, se ratas lactantes apresentam maiores níveis de cuidado materno, suas filhas também assim serão quando tiverem seus próprios filhotes. Diferentes níveis de cuidado materno modulam diferencialmente a expressão de receptores de estrogênio α na área pré-óptica medial (MPOA) da prole por um mecanismo epigenético via metilação do promotor desses receptores. Dessa forma, os receptores de estrogênio α acabam controlando a expressão dos receptores de OT na MPOA, o que, por sua vez, regula vários aspectos do cuidado materno (CHAMPAGNE & MEANEY 2007; CHAMPAGNE, 2008).

Vários estudos demonstraram que a ocitocina OT está implicada na mediação neuro-hormonal de certos comportamentos (VAN LEENGOED *et al.*, 1987;

CONSIGLIO & LUCION, 1996; PEDERSEN, 1997; NELSON & PANKSEPP, 1998). Enquanto os neurônios magnocelulares no PVN estão relacionados com o reflexo de liberação de leite durante a lactação, os neurônios parvocelulares podem exercer efeitos modulatórios nos comportamentos maternos, incluindo a agressividade (GIOVENARDI *et al.*, 1998). Ela também modula relações (apego), comportamento sexual, reconhecimento social, memória, ansiedade, estresse e a imunidade. Em mamíferos machos, a OT é produzida em quantidades similares às produzidas nas fêmeas e possui funções sobre o sistema reprodutivo masculino (IVELL *et al.*, 1997; KENDRICK, 2000; GIMPL & FAHRENHOLZ, 2001).

A OT pode ser liberada por estímulos sensoriais percebidos como positivos, incluindo toque, odores ou outros estímulos. A consequência de interações sociais positivas, tais como atividade simpatoadrenal reduzida e atividade vagal parassimpática aumentada podem ser mediadas pela OT. É observado, por exemplo, em resposta à amamentação, que a fêmea se torna mais calma e mais propensa a interações sociais. O efeito antiestresse da OT demonstra-se mais pronunciado após várias exposições. Portanto, indivíduos vivendo relações sociais estáveis ou inseridos dentro de grupos de suporte social seriam mais propensos a serem expostos a liberações repetidas de OT (UVNÄS-MOBERG, 1996).

A OT é um ansiolítico e atenua a resposta do estresse a uma provocação psicogênica em camundongos fêmeas (AMICO *et al.*, 2004). Consistente com um efeito antiestresse, macacos fêmeas exibiram diminuição na concentração de ACTH após administração intranasal de OT (PARKER *et al.*, 2005).

A OT afeta a excitabilidade da membrana em neurônios localizados no sistema límbico, hipotálamo, medula espinhal e no tronco cerebral, abrindo canais catiônicos não específicos ou fechando canais de K^+ . As ações hipocâmpais da OT parecem ser

espécie-dependentes: não foram encontrados receptores de OT no hipocampo de porquinhos-da-Índia, enquanto que o foram em uma subpopulação de neurônios em CA1 de ratos (RAGGENBASS, 2001).

Enquanto evidências fisiológicas apóiam a correlação entre OT endógena e o bem-estar, OT exógena está relacionada à diminuição de sintomas do tipo depressivos medidos pelo teste do nado forçado e diminuição da ansiedade observada no labirinto em cruz elevado (CONSIGLIO, 2006). Um número aumentado de neurônios que expressam OT foi detectado no PVN do hipotálamo de pacientes com depressão ou que sofrem de transtorno afetivo bipolar (PURBA *et al.*, 1996; RAADSHEER *et al.*, 1995).

Recentemente, foi demonstrado que os neuropeptídeos, incluindo a OT, possuem propriedades antioxidantes. Observou-se que a oxidação desse peptídeo poderia ajudar a preservar o hipotálamo, apesar de ser ao custo da integridade deste produto e das ações comportamentais positivas, já mencionadas, que ele exerce. Outros neuropeptídeos que também podem ser relacionados com a depressão são o hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH, relacionado com a reprodução), a melatonina (relacionada com o tempo de sono) a AVP (relacionada com o ritmo circadiano). Todas essas funções fisiológicas estão prejudicadas durante a depressão (MOOSMANN & BEHL, 2002).

A OT também pode ser considerada um hormônio típico do estresse, pois pode estar envolvida no controle neuroendócrino das respostas ao estresse e é possível que a OT atue como uma segunda linha de proteção contra as EROs, quando outros antioxidantes (GPx, CAT e SOD) não são suficientes como proteção para uma situação com alto estresse oxidativo como observado na depressão (MOOSMANN & BEHL, 2002).

1.7 Justificativa

Estudos de seguimento a longo prazo com crianças que sofreram estresse neonatal demonstram que intervenções adversas em períodos precoces do desenvolvimento podem levar a alterações persistentes em sistemas diversos como o nervoso (McQuillen *et al.*, 2004), cardiovascular (Singhal *et al.*, 2004), respiratório (Dezateux *et al.*, 2004) e endócrino – metabólico (Soto *et al.*, 2003). A importância desses efeitos na análise da saúde pública é de fundamental relevância epidemiológica. Entretanto, pelo tempo e pelas dificuldades inatas à realização desse tipo de seguimento em humanos, poucos centros têm conseguido produzir resultados aplicáveis e de qualidade.

Neste contexto, os modelos experimentais em animais surgem como uma alternativa para conhecer o funcionamento dos sistemas, sua morfologia e alterações frente a uso de fármacos. Situações traumáticas na infância, tais como negligência, violência e abusos geram muito sofrimento para o indivíduo que vivenciou e trazem problemas de ordem física e emocional, problemas esses que merecem atenção e tratamento. As bases biológicas envolvidas nesses contextos não são bem conhecidas, e por isso é importante o desenvolvimento de estudos nesta área, para que futuramente possamos propiciar tratamentos mais adequados e que se reflitam numa melhor qualidade de vida para essas pessoas.

A partir dessas informações, hipotetizamos que a separação materna poderia levar a prejuízos cognitivos os quais poderiam depender do tipo de memória a ser avaliada. Também questionamos se animais separados no período neonatal, por apresentarem aumento do comportamento do tipo ansioso, poderiam também apresentar

alterações no comportamento social e que essas alterações estariam relacionadas a uma maior susceptibilidade do sistema nervoso central a insultos.

Pensando nisso, o estudo em modelos animais de experimentação pode ser extremamente útil para a compreensão das alterações observadas nesses pacientes elucidando a importância de um ambiente adequado durante períodos vulneráveis para a promoção do desenvolvimento saudável. Outro aspecto muito relevante que este trabalho proporciona é a possibilidade de pensarmos em abordagens de tratamento psicossocial e sistemas de proteção para as crianças, para que elas tenham a oportunidade de se desenvolver num ambiente saudável.

2. Objetivos

Tendo em vista o exposto acima, os objetivos do presente trabalho são:

2.1 Objetivo Geral:

Verificar se a separação materna no período neonatal leva a alterações comportamentais e neuroquímicas na idade adulta relacionadas a comportamentos que avaliam memória, comportamento social e que estruturas podem estar envolvidas modulando possíveis alterações. Observar se há diferenças sexo-específicas, visto que a qualidade do cuidado materno é diferenciada entre machos e fêmeas e que isto se reflete em alterações observadas na idade adulta..

2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1 Analisar o efeito da separação materna no período neonatal sobre uma memória de medo condicionado ao contexto na idade adulta.

2.2.2 Analisar o efeito da separação materna no período neonatal sobre a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase e sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo na amígdala de ratos machos e fêmeas.

2.2.3 Analisar o efeito da separação materna no período neonatal sobre a capacidade de interação social na idade adulta.

2.2.4 Analisar o efeito da separação materna no período neonatal sobre os níveis do hormônio ocitocina no líquido de ratos machos e fêmeas na idade adulta.

2.2.5 Analisar o efeito da separação materna no período neonatal sobre a Memória Espacial e de Reconhecimento de Objetos, na idade adulta.

2.2.6 Analisar o efeito da separação materna no período neonatal sobre o Comportamento Alimentar, na idade adulta.

2.2.7 Analisar a susceptibilidade de animais submetidos à separação materna no período neonatal sobre os danos causados por isquemia *in vitro* em fatias de hipocampo de ratos machos.

2.2.8 Analisar o efeito da separação materna no período neonatal sobre índice de quebras do ADN central, (no hipocampo) e periférico (sangue), bem como os níveis de citocinas inflamatórias (interleucinas, TNF- α) e de BDNF no hipocampo de ratos machos e fêmeas.

3. Materiais, Métodos e Resultados

Os materiais, métodos e os resultados desta tese estão apresentados a seguir, da seguinte forma:

Capítulo 1: Artigo Publicado: Luisa Amalia Diehl, Natividade de Sá Couto Pereira, Daniela P. Laureano, André N. D. Benitz, Cristie Noschang, Andrea G.K. Ferreira, Emilene B. Scherer, Fernanda R. Machado, Thiago Pereira Henriques, Angela T.S. Wyse, Victor Molina, Carla Dalmaz. Contextual Fear Conditioning in Maternal Separated Rats: The Amygdala as a site for alterations.

Capítulo 2: Artigo a ser submetido: Luisa A. Diehl, Thiago Pereira Henriques, Cátia Corrêa Nunes, Aldo Bolten Lucion, Carla Dalmaz. Maternal Separation alters social interaction and oxytocin levels in cerebrospinal fluid in rats.

Capítulo 3: Outros Resultados

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1

PUBLICADO NA REVISTA NEUROCHEMICAL RESEARCH

Contextual Fear Conditioning in Maternal Separated Rats: The Amygdala as a Site for Alterations

Luisa A. Diehl · Natividade de Sá Couto Pereira · Daniela P. Laureano · André N. D. Benitz · Cristie Noschang · Andrea G. K. Ferreira · Emilene B. Scherer · Fernanda R. Machado · Thiago Pereira Henriques · Angela T. S. Wyse · Victor Molina · Carla Dalmaz

Received: 13 March 2013 / Revised: 23 November 2013 / Accepted: 13 December 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract The first 2 weeks of life are a critical period for neural development in rats. Repeated long-term separation from the dam is considered to be one of the most potent stressors to which rat pups can be exposed, and permanently modifies neurobiological and behavioral parameters. Prolonged periods of maternal separation (MS) usually increase stress reactivity during adulthood, and enhance anxiety-like behavior. The aim of this study was to verify the effects of maternal separation during the neonatal period on memory as well as on biochemical parameters (Na^+ , K^+ -ATPase and antioxidant enzymes activities) in the amygdala of adult rats. Females and male Wistar rats

were subjected to repeated maternal separation (incubator at 32 °C, 3 h/day) during postnatal days 1–10. At 60 days of age, the subjects were exposed to a Contextual fear conditioning task. One week after the behavioral task, animals were sacrificed and the amygdala was dissected for evaluation of Na^+ , K^+ -ATPase and antioxidant enzymes activities. Student-t test showed significant MS effect, causing an increase of freezing time in the three exposures to the aversive context in both sexes. Considering biochemical parameters Student-t test showed significant MS effect causing an increase of Na^+ , K^+ -ATPase activity in both sexes. On the other hand, no differences were found among the groups on the antioxidant enzymes activities [superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT)] in male rats, but in females, we found a significant MS effect, causing an increase of CAT activity and no differences were found among the groups on SOD and GPx activities. Our results suggest a role of early rearing environment in programming fear learning and memory in adulthood. An early stress experience such as maternal separation may increase activity in the amygdala (as pointed by the increased activity of Na^+ , K^+ -ATPase), affecting behaviors related to fear in adulthood, and this effect could be task-specific.

L. A. Diehl (✉) · N. S. C. Pereira · D. P. Laureano · A. N. D. Benitz · C. Noschang · A. G. K. Ferreira · E. B. Scherer · F. R. Machado · A. T. S. Wyse · C. Dalmaz
Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2600, Anexo, Lab. 37, 90035-003
Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: diehl.luisa@gmail.com

L. A. Diehl · D. P. Laureano · C. Dalmaz
Programa de Pós-Graduação em Neurociências, ICBS,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

N. S. C. Pereira · C. Noschang · A. G. K. Ferreira · E. B. Scherer · F. R. Machado · A. T. S. Wyse · C. Dalmaz
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, ICBS,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

T. P. Henriques
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

V. Molina
Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

Keywords Contextual fear conditioning · Anxiety · Amygdala · Na^+ · K^+ -ATPase · Oxidative stress

Introduction

There is a growing body of data demonstrating that exposure to traumatic events during childhood can increase later risk for a variety of neuropsychiatric conditions [1–5]. Maternal separation (MS) is a valid model used in research

to mimic early life trauma during childhood in humans [6–9]. Applied to rats, it involves pups separation from their mother for a period of time each day during the first 2 weeks of life, a period when pups are susceptible to environmental events, such as stress and maternal care. Mother–pup interactions, such as licking, grooming and arched-back nursing, suppress basal and stress-induced levels of circulating glucocorticoids (GCs) [10–12]. In this sense, maternal separation has been found to permanently modify characteristics of the stress response system in rat pups, leading to elevated and prolonged stress-induced secretion of corticosterone (the rat equivalent of human cortisol) and adrenocorticotrophic hormone [9, 13]. Extended disruptions in this neuroendocrine homeostasis regulated by the dam during the critical period result in persistent behavioral and neurobiological changes [14]. Separated rats have decreased struggle time in the forced swim task, a task used as a measure of depressive-like behaviors [15]. Regarding anxiety-like behavior, separated animals showed increased startle responses, decreased time in the open arms of an elevated plus maze, as well as increased freezing behavior, hyperactivity and thigmotaxis in an open field [16, 17].

Fear conditioning has proven to be an important model for studying the neural mechanisms and circuitry of emotional learning and memory until nowadays [18–21]. Contextual fear conditioning does not use an explicit or discrete stimulus, but rather uses the entire experimental environment (the context) as the conditioned stimulus (CS) for an aversive association with footshock, the unconditioned stimulus (US) [22]. In addition to reliance on the amygdala, contextual fear conditioning also requires the hippocampal formation, which has been suggested to be critical for the formation of an integrated representation of the context from multiple discrete stimuli [22, 23]. Thus, contextual fear conditioning appears to require at least two separate processes: the formation of a neural (cognitive) representation of the context and the formation of an aversive association between the context and shock [24].

However, a later prolonged exposition to the CS without the US leads to memory extinction. Extinction is a new learning (CS—NO US) that suppress the original one without affecting it permanently. Such processes require the activity of hippocampus, pre-frontal cortex and amygdala [25].

It has been reported that Na^+ , K^+ -ATPase might play a relevant role in the mechanisms for learning [26] as well as for memory consolidation of step-down inhibitory avoidance [27]. Na^+ , K^+ -ATPase is responsible for the generation and maintenance of the membrane potential necessary for neuronal excitability, and thus, disturbances in its activity could have critical consequences for central nervous system functioning [28]. Na^+ , K^+ -ATPase has

been related to various aspects of neuronal functions such as innervation density [29], activity-dependant energy metabolism [30] and neurotransmitter release [31]. Concerning neonatal interventions, it was showed that neonatal handling induces a series of persistent alterations in adulthood, including shorter immobility time in the forced swimming test and a specific pattern of Na^+ , K^+ -ATPase activity in different brain regions (lower in the hippocampus and higher in the amygdala) [32]. Nevertheless, there is scarce literature regarding the effect of maternal separation on Na^+ , K^+ -ATPase activity.

Evidences indicate that oxidative stress and reactive oxygen species might be involved in the inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase and memory modulation mechanisms [33, 34]. Oxidative stress happens when there is an imbalance between antioxidant defenses and oxidative species, in which case the antioxidant defenses, such as the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), are not able to neutralize the reactive species efficiently [35], leading to lipid, protein, DNA damage [36], and resulting in several dysfunctions in the cell metabolism, including alterations in protein structure. One enzyme that is known to be affected is the Na^+ , K^+ -ATPase [37, 38]. Interventions during the neonatal period, such as maternal separation, may have long-term effects on some neurochemical parameters such as DNA breaks and nitric oxide production [39, 40], which may be related to oxidative stress.

The aim of this study was to verify the effects of maternal separation during the neonatal period on memory as well as on biochemical parameters (Na^+ , K^+ -ATPase and antioxidant enzymes activities) in the amygdala of adult rats. We think that maternal separation may lead to memory impairments in this task involving fear conditioning; since the amygdala is known to be involved in this type of memory task [41], we chose this structure to evaluate Na^+ , K^+ -ATPase and antioxidant enzymes activities, which might be related to alterations in behavior.

Materials and Methods

Subjects

Pregnant Wistar rats bred at our own animal facility were randomly selected. They were housed alone from around day 18 of gestation in home cages made of Plexiglas (65 × 25 × 15 cm) with the floor covered with sawdust and were maintained in a controlled environment: lights on between 0700 and 1900 hours, temperature of 22 ± 2 °C, cage cleaning twice a week, food and water provided ad libitum. All litters were culled to eight pups within 24 h from birth and were maintained intact unless for maternal

separation procedures, which were carried out between 1000 and 1400 hours. Weaning occurred on postnatal day 21. The animals were housed four to five per cage, and separated by sex. Rats had free access to food (standard lab rat chow) and water, except during the period when the behavioral task was applied. Maternal separation procedures and behavioral tasks were performed between 1300 and 1600 hours, after animals had reached adult life. A maximum of two male or female pups were used per litter per behavioral experiment and a maximum of one male or female rat was used per biochemical experiment.

All animal treatments were approved by the Ethical Committee of our University (Federal University of Rio Grande do Sul) and followed the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS).

Maternal Separation

Control group—Pups were left undisturbed with the dam until weaning. These animals were not touched, not even for cage cleaning. Dirty sawdust was carefully removed from one side of the cage without disturbing the mother and the nest, and replaced by clean sawdust at that side by the main researcher.

Maternal separation group—Pups were removed from their home cage and placed into a clean cage filled with clean paper towel, inside an incubator at 32 °C next to the dam's cage. After 3 h, pups were returned to their dams. This procedure was carried out during the first 10 days of life, and after that pups were left undisturbed until weaning. Behavioral tasks began at post-natal day 60.

Contextual Fear Conditioning Task

The fear conditioning task consisted of exposing the animal to a chamber with an illuminated Plexiglas box (200 mm × 75 mm), having as a floor a grid of parallel 0.1-cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart. The experimental procedures are described as it follows [42]: In the training session (day 1), rats were placed in the chamber for 3 min for habituation, then received three 1 s footshocks of 0.5 mA, 1 s-spaced during 5 s. One min afterwards they were placed back into their home cages. In the extinction session (day 2) animals were reexposed to the same context during 20 min to evaluate memory expression and to induce its extinction. In the test sessions (day 3 and 11) animals were placed again in the same apparatus during 5 min to evaluate memory extinction. Memory was measured through the expression of fear behavior (freezing), which was manually scored by a single experimenter. A subset of animals was additionally scored by a different observer as a control of the evaluation.

Freezing behavior is defined as the cessation of all movement with the exception of respiration-related movement and non-awake or rest body posture [43]. Freezing behavior was used as a behavioral measure of defensive response to the CS.

Biochemical Measures

Preparation of the Samples

One week after the behavioral task, animals were sacrificed between 1300 and 1500 hour and the whole amygdala was dissected and frozen at −70 °C, until evaluation of Na⁺, K⁺-ATPase and antioxidant enzymes activities. All animals were sacrificed within this interval of time in a random order considering groups. Amygdala was dissected based on our previous studies [32].

Na⁺, K⁺-ATPase Activity Evaluation

For determination of Na⁺, K⁺-ATPase activity, the tissue was homogenized in 10 vol. 0.32 M sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 1.0 mM EDTA, pH 7.4. After homogenization, activity of Na⁺, K⁺-ATPase was determined. The reaction mixture for the Na⁺, K⁺-ATPase assay contained 5.0 mM MgCl₂, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl, and 40.0 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, in a total volume of 200 μL. The reaction was started by the addition of ATP (disodium salt, vanadium free) to a final concentration of 3.0 mM. The control was assayed under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na⁺, K⁺-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays [44]. Inorganic phosphate (Pi) released was measured by the method of Chan et al. [45]. Enzyme specific activity was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein. All assays were performed in duplicate and the mean was used for statistical analysis. In this experiment, protein was measured by the method of Bradford [46], with bovine serum albumin used as standard.

Antioxidant Enzymes Activities

For antioxidant enzymes activities, the amygdala was stored at −70 °C until analysis, when the structures were homogenized in 10 vol (w:v) ice-cold 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), containing 1 mM EDTA for determination of SOD and GPx activities. To determinate CAT activity, samples were homogenized in 10 vol (w:v) ice-cold potassium phosphate buffer 10 mM (pH 7.0). The homogenate was centrifuged at 960g for 10 min at 4 °C and the supernatant was used. The total protein concentration was determined using the

method described by [47], using bovine serum albumin as the standard.

Superoxide Dismutase Activity SOD activity was determined using a RANSOD kit (Randox Labs., USA) which is based on the procedure described by [48].

Catalase Activity Catalase is an enzyme able to degrade hydrogen peroxide (H_2O_2), and its activity assessment is based upon establishing the rate of H_2O_2 degradation spectrophotometrically at 240 nm at 25 °C [49]. CAT activity was calculated in terms of micromoles of H_2O_2 consumed per minute per milligram of protein, using a molar extinction coefficient of $43.6 M^{-1} cm^{-1}$.

Glutathione Peroxidase Activity GPx activity was determined according to [50], with modifications [39]. The reaction was carried out at 37 °C in 200 μ L of solution containing 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.7), 1.1 mM EDTA, 0.44 mM sodium azide, 0.5 mM NADPH, 2 mM glutathione and 0.4 U glutathione reductase. The activity of GPx was measured taking tert-butylhydroperoxide as the substrate at 340 nm. The contribution of spontaneous NADPH oxidation was always subtracted from the overall reaction ratio. GPx activity was expressed as nmol NADPH oxidized per minute per mg protein.

Statistical Analysis

Data were expressed as mean + SE of the mean, and were analyzed by Student-t test or repeated measures ANOVA. The significance level was accepted as different when the P value was equal or less than 0.05. Sample size varies in each experiment and it is showed individually in the Results section.

Results

At 60 days of life the rats were submitted to the context fear conditioning task. During the first exposure to the apparatus, baseline freezing was scored before delivery of the shock. Freezing time was very low during this exposure [mean \pm SEM (in seconds) for maternal separated males: 3.4 ± 1.9 ; control males: 1.3 ± 1.0 ; maternal separated females: 0.4 ± 0.3 ; control females: 0.1 ± 0.09], and a two-way ANOVA showed no effects of maternal separation or sex ($P = 0.296$ for maternal separation and $P = 0.072$ for sex), and no interaction ($P = 0.404$). In the test sessions, Repeated Measures ANOVA showed significant time effect, since freezing was reduced in the different test sessions ($P < 0.0001$), and significant MS effect, causing an increase of freezing time in the three exposures

to the aversive context in both sexes. Male and female rats were placed in the same apparatus and the freezing time was measured during 20 min. Repeated measures ANOVA was run to verify possible differences when comparing the time spent in freezing during the days, and significant effects were observed for maternal separation. ($P < 0.0001$, $N = 7-8$ animals per group) (Fig. 1). No effect of sex or interaction between sex and MS was observed.

Considering biochemical parameters Student-t test showed significant MS effect causing an increase of Na^+ , K^+ -ATPase activity in both sexes [males, $t(5) = 0.340$; $P < 0.05$; females, $t(5) = 0.516$; $P < 0.05$] (Fig. 2—a for males and b for females). On the other hand, no differences were found among the groups on the antioxidant enzymes activities (SOD, GPx, CAT) in male rats (Fig. 3a, b and c) [Student-t test; SOD, $t(5) = 0.1475$; $P > 0.05$; GPx, $t(5) = 0.5971$; $P > 0.05$; CAT, $t(5) = 9.3718$; $P > 0.05$]. In females, we found a significant MS effect, causing an increase of CAT activity [$t(5) = 0.1888$; $P < 0.05$], and no differences were found among the groups on SOD and GPx activities [Student-t test; SOD, $t(5) = 0.5394$; $P > 0.05$; GPx, $t(5) = 0.00002$; $P > 0.05$], (Fig. 4a, b and c).

Discussion

In the present study, Wistar rats were separated from the dams 3 h/day during the first 10 days of life. In the contextual fear conditioning task it was found a significant effect of maternal separation causing an increase of freezing time in the three exposures to the aversive context in both sexes. Similarly, we have found increased Na^+ , K^+ -ATPase activity in the amygdala of both male and female animals. The amygdala is involved in the CS-US pairing as in fear expression. Our results suggest a higher activity of the amygdala, which is directly related to the behavior observed on fear conditioning [41].

Maternal separation in the rat is thought to model certain behavioral disturbances observed in anxiety disorders associated with early adversity [3]. Many studies have examined the long-term neuro endocrinological and behavioral consequences of early life stress in rats. It has been proposed that pups experiencing repeated MS display as adults increased stress responsivity, increased anxiety, helplessness and anhedonia, deficits of sensorimotor gating and increased propensity for the intake of addictive drugs [51–55]. Studies using paradigms to assess innate fear (e.g. open field and elevated plus maze) have shown that rats subjected to repeated MS during the early post-natal period show enhanced anxiety-like behavior in adulthood [56–58].

Fear conditioning and its extinction have long been used to model the symptoms and treatment of fear-related anxiety disorders [59, 60]. In this sense, a better understanding

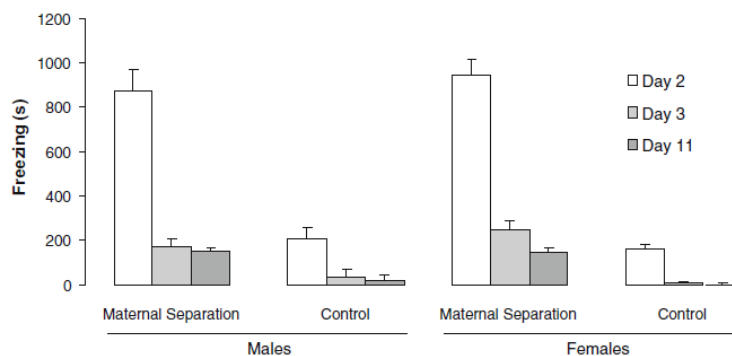
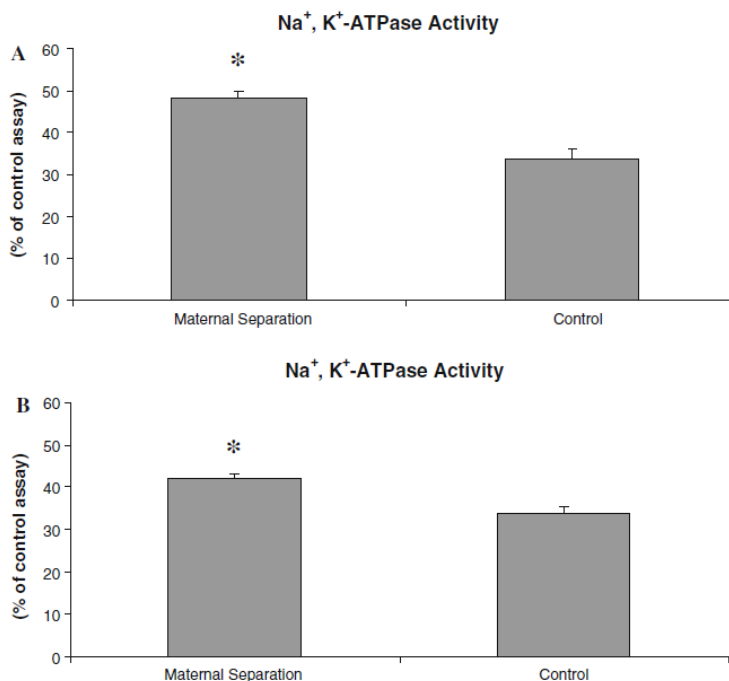


Fig. 1 Performance in context fear conditioning task of males and females, maternal separation and control groups. Data are shown as mean + SEM of the time (in seconds) spent in freezing. Males and females were placed in the same apparatus and the freezing time was

measured during 20 min on days 2, 3 and 11. Repeated measures ANOVA showed significant time effect, since freezing was reduced in the different test sessions ($P < 0.0001$) and significant effect of MS ($P < 0.0001$, $N = 7-8$ animals per group)

Fig. 2 Antioxidant enzymes activities. Student-t test showed an increase of Na^+ , K^+ -ATPase activity in maternal separation group compared to control in the amygdala of both male and female rats. Data are expressed as mean + SEM; $N = 4-5$ animals per group. *Different from the control group a ($P < 0.05$), b ($P < 0.05$)

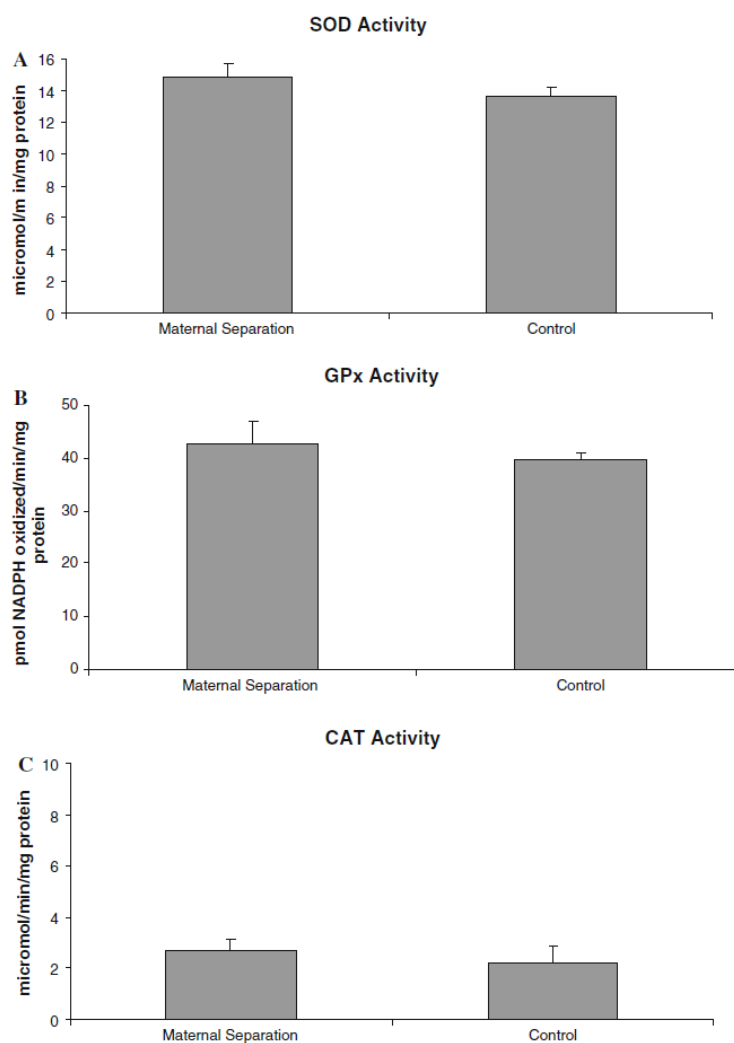


of the effects of MS on fear learning may generate useful insights into the role of early adversity in mediating the enhanced vulnerability to develop certain forms of anxiety later in life [3]. Maternal separation increases anxiety in the elevated plus maze in some cases [8, 17], and other studies show that contextual fear conditioning, assessed by increased freezing behavior, is impaired in adult rats with

handling experience [61], but is enhanced in juvenile rats handled when pups [62]. One study has found that maternal separation induced facilitation of learning and memory on conditioned stimulus context [63].

The differences in freezing behavior between the separated and control rats could be argued to be due to other factors, independent of conditioning. Experiments using

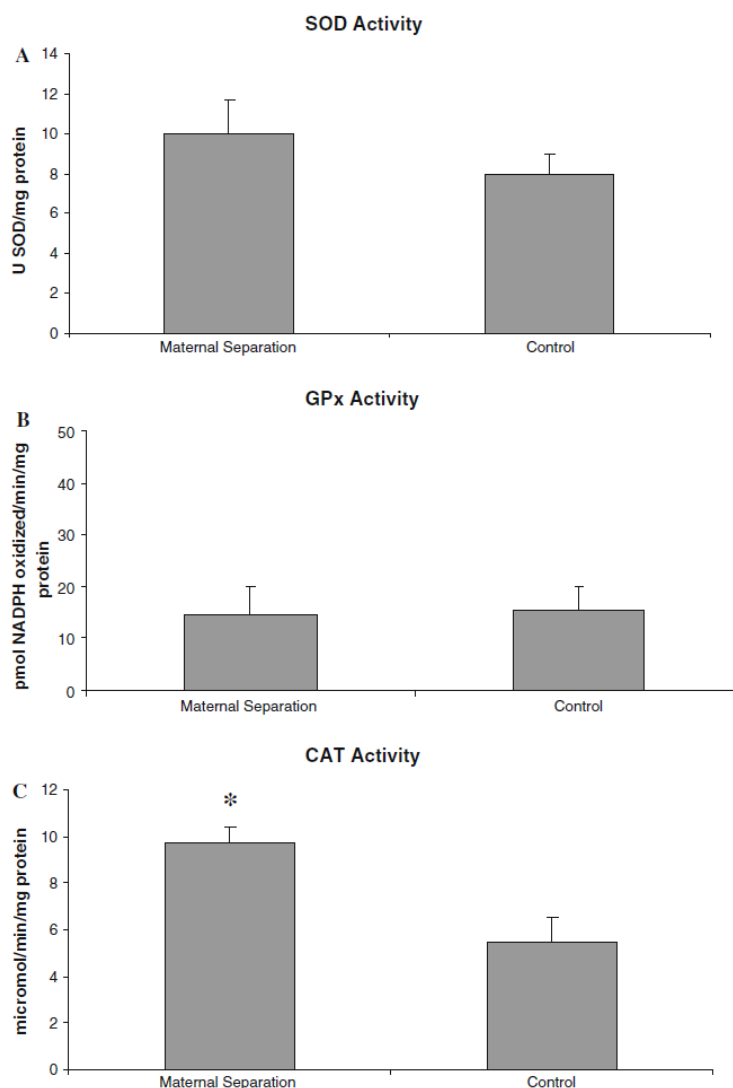
Fig. 3 Effects of maternal separation on antioxidant enzymes activities, **a** SOD, **b** GPx and **c** CAT, in the amygdala of male rats. Data are expressed as mean + SEM; $N = 5/\text{group}$. Student-t test showed no differences between the groups ($P > 0.05$)



animals submitted to the same maternal separation paradigm as used in the present study and performed by other colleagues (Pereira, N., personal communication) have observed that maternal separated animals, when subjected to a new environment for the first time, did not present increased freezing behavior (when no shock is applied, freezing behavior, is very low or not observed at all). Therefore, the difference between the groups in freezing actually requires conditioning. Enhanced hypothalamic–pituitary–adrenal axis reactivity to stressors could also account for the different effects of maternal separation on acquiring fear learning and expressing fear memory. Stress-induced corticosterone release is potentiated by

maternal separation [57, 59] and the consolidation of fear memory is augmented by glucocorticoids acting in the amygdala [64]. Since maternal separated rats are more prone to express anxiety, we suggest that these rats may have enhanced response to a stressful stimulus such as the footshock given in the contextual fear conditioning task, so causing facilitation of learning. On the other hand, the analysis of freezing behavior during the subsequent sections indicates no significant interaction between time and maternal separation, and all groups showed reduced freezing, indicating a possible extinction of that memory in these animals. Therefore, we could attribute the increased freezing in every test session in these animals, even 1 week

Fig. 4 Effects of maternal separation on antioxidant enzymes activities, **a** SOD, **b** GPx and **c** CAT, in the amygdala of female rats. Data are expressed as mean \pm SEM; $N = 5/\text{group}$. Student-t test showed no differences between groups in SOD and GPx activities, ($P > 0.05$), but showed an effect of maternal separation causing an increase of CAT activity. *Different from the control group ($P < 0.05$)



after the behavioral task, to higher reactivity to aversive stimuli. It is known that the amygdala is an important structure involved in fear responses [64]. The effects found in the present work could be associated with increased amygdala activity caused by maternal separation.

It has been observed in previous works that handling and maternal separation do lead to opposite effects [63, 65], such as on anxiety and stress responses. Previous works have also reported that neonatal handling may impair fear conditioning in adult rat [66, 67], which could reflect altered emotional reactivity to aversive stimuli, not learning

deficits. Other study [68] reported that both the rate of extinction and extinction recall were attenuated by handling in cue-induced fear expression. The impairment of extinction recall was also reported in a different study [69].

Some results have been reported sex-specific effects concerning maternal separation: MS for 24 h tends to decrease contextual fear in male rats with no effect in female rats [67]. One study [66] shows an enhanced sex-specific effect of 1 h of neonatal isolation on context-induced fear with no effect on cue-induced fear. Adult male rats with neonatal isolation experience show impaired

context-induced ultrasonic vocalizations whereas adult female rats tend to show an enhanced response to the context [67]. These differences in results may reflect developmental and sex differences. The tendency for enhanced context-induced fear in female rats may reflect the tendency for neonatal isolation to enhance footshock sensitivity in rats of this sex [67].

The different results found in these works reflect the different methodologies used in laboratories. In some studies, pups remained in a huddle during the separations from the dam [7] and in other studies pups were separated or isolated from each other during the separations from the dam [66]. Number of separations, as well as duration of the separations, also varied across studies, for example, from one separation on either postnatal day 4, 9, or 18 [7] to every day from postnatal day 1 through weaning [61]. In this study, we separated pups from their mothers 3 h per day, from post-natal day 1 to 10. Among these studies there were also differences in response measures (freezing behavior, corticosterone levels) assessed and strain of rats differed across studies. We employed Wistar rats, whereas [67] employed Sprague–Dawley rats and [62] used Long–Evans juvenile rats and many studies show impairments in fear conditioning with different length of separation: brief (handling) [63], moderate (1 h neonatal isolation) [66], or prolonged (3 h or more) [63] in adult rats.

It has been reported that Na^+ , K^+ -ATPase might play a relevant role in the mechanisms of learning [26]. In addition, previous studies showed that animals with an increased Na^+ , K^+ -ATPase activity [70, 71], mainly in the amygdala [70], exhibit increased fear, agreeing with our results. It should be pointed out, however, that we used the whole amygdala, and therefore alterations in individual nuclei may be different from this general alteration on Na^+ , K^+ -ATPase activity.

Besides, evidences indicate that oxidative stress and reactive oxygen species might be involved in Na^+ , K^+ -ATPase activity and memory modulation mechanisms [33, 34]. On the other hand, reactive oxygen species (ROS) are believed to be involved in tissue damage [72, 73]. ROS can directly damage cellular proteins, DNA, lipids, and thereby affect cellular functions [36]. The brain is especially vulnerable to free radical-induced damage because of its high oxygen consumption and abundant lipid content [35, 74]. Furthermore, oxidative injury has been associated with the etiopathology of several central nervous system disorders [74, 75]. In order to neutralize the effects of reactive species, the cell uses antioxidant enzymes such as SOD, CAT and GPx [35]. SOD is the enzyme responsible for converting superoxide radicals into hydrogen peroxide. The ROS scavenging activity of SOD is effective only when it is followed by the actions of CAT and GPX, because the dismutase activity of SOD generates hydrogen peroxide,

which requires to be further scavenged by CAT and GPx [76]. The hydrogen peroxide can interact with superoxide anion leading to the formation of the highly reactive hydroxyl radical [77], and this can also happen when hydrogen peroxide is in the presence of iron [76, 77]. However, in this study, maternally separated female rats showed an increased CAT activity in amygdala, which may be pointed as a beneficial effect for this region as this enzyme degrades hydrogen peroxide that is highly detrimental [76]. The presence of gonadal hormones during development may affect oxidative stress, since estradiol has been reported to have neuroprotective properties [78, 79]. Estrogens are neuroprotective hormones acting via estrogen receptor-dependent pathways, which binds to specific sites in the nuclear DNA, in addition, one striking activity of the estradiol molecule is its intrinsic antioxidant activity, which makes it a potential chemical shield for neurons [79].

Therefore, although other studies have pointed to increased oxidative stress in adult animals that were subjected to some neonatal interventions [80], in the present study this was not the case, and no oxidative stress was observed in the amygdala. However, it is possible that other structures may be affected. No differences between sexes were found on behavioral parameters, but in one of the neurochemical parameters—i.e., on CAT activity, which was increased in MS females. Nevertheless, the findings on oxidative stress does not appear to explain the behavioral data. Not all individuals exposed to severe traumatic experiences develop anxiety disorders, and risk factors may include individual neurobiology as well as past experiences. Our results suggest a role of early rearing environment in programming fear learning and memory in adulthood. An early stress experience such as maternal separation may increase activity in the amygdala (as pointed by the increased activity of Na^+ , K^+ -ATPase), affecting behaviors related to fear in adulthood, and this effect could be task-specific. This experimental paradigm is, therefore, an important model to study the pathophysiology of the anxiety disorders and to contribute to the enlightenment of future therapeutic approaches. Therefore, alterations in the activity of Na^+ , K^+ -ATPase and oxidative stress could well be involved in the vulnerability/resilience to anxiety disorders induced by early life experience as we propose in this study.

Acknowledgments Financial support: National Research Council of Brazil (CNPq), and PRONEX (FAPERGS/CNPq 10/0018.3).

References

1. de Wilde EJ, Kienhorst IC, Diekstra RF, Wolters WH (1992) The relationship between adolescent suicidal behavior and life events in childhood and adolescence. *Am J Psychiatry* 149(1):45–51

2. Dube SR, Anda RF, Felitti VJ, Croft JB, Edwards VJ, Giles WH (2001) Growing up with parental alcohol abuse: exposure to childhood abuse, neglect, and household dysfunction. *Child Abuse Negl* 25(12):1627–1640
3. Heim C, Nemeroff CB (2001) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49:1023–1039
4. Johnson JG, Cohen P, Gould MS, Kasen S, Brown J, Brook JS (2002) Childhood adversities, interpersonal difficulties, and risk for suicide attempts during late adolescence and early adulthood. *Arch Gen Psychiatry* 59(8):741–749
5. Kendler KS, Kessler RC, Walters EE, MacLean C, Neale MC, Heath AC, Eaves LJ (1995) Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am J Psychiatry* 152(6):833–842
6. Plotsky PM, Meaney MJ (1993) 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* 18(3):195–200
7. Lehmann J et al (1999) The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 64(4):705–715
8. Wigger A, Neumann ID (1999) Periodic maternal deprivation induces gender dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* 66(2):293–302
9. Lippmann M et al (2007) Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci* 25(10):3091–3098
10. van Oers HJ, de Kloet ER, Whelan T, Levine S (1998) Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J Neurosci* 18:10171–10179
11. van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S (1999) Persistent effects of maternal deprivation on HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone. *J Neuroendocrinol* 11:581–588
12. de Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst FM, Schmidt MV (2005) Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev* 29:271–281
13. Ladd CO et al (2004) Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol Psychiatry* 55(4):367–375
14. Hensleigh E, Smedley L, Pritchard LM (2010) Sex, but not repeated maternal separation during the first postnatal week, influences novel object exploration and amphetamine sensitivity. *Dev Psychobiol* 53(2):132–140
15. Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ (2007) Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32(3):256–266
16. Caldji C, Francis D, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ (2000) The effects of early rearing environment on the development of GABA_A and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology* 22(3):219–229
17. Kalimichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG (2002) Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73(1):131–140
18. Davis M (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 15:353–375
19. LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155–184
20. Maren S (2001) Neurobiology of pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24:897–931
21. Maren S (2005) Building and burying fear memories in the brain. *Neuroscientist* 11:89–99
22. Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274–285
23. Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675–677
24. Cenquizca LA, Swanson LW (2007) Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 56:1–26
25. Fiorenza NG, Rosa J, Izquierdo I, Myskiw JC (2012) Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behav Brain Res* 232(1):210–216
26. Brunelli M, Garcia-Gil M, Mozzachiodi R, Scuri R, Zaccardi ML (1997) Neurobiological principles of learning and memory. *Arch Ital Biol* 135:15–36
27. Wyse ATS, Bavaresco CS, Reis EA et al (2004) Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. *Physiol Behav* 80:475–479
28. Ericinska M, Silver IA (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Neurobiology* 43:37–71
29. Swann AC, Grant SJ, Maas JW (1982) Brain (Na⁺, K⁺)-ATPase and noradrenergic activity: effects of hyperinnervation and denervation on high-affinity ouabain binding. *J Neurochem* 38:836–839
30. Mata M, Fink DJ, Gainer H et al (1980) Activity-dependent energy metabolism rat posterior pituitary primarily reflects sodium pump activity. *J Neurochem* 34:213–215
31. Brosemer RW (1985) Effects of inhibitors of Na⁺, K⁺-ATPase on the membrane potentials and neurotransmitter efflux in rat brain slices. *Brain Res* 334:125–137
32. Silveira PP, Portella AK et al (2011) Association between Na⁺, K⁺-ATPase activity and the vulnerability/resilience to mood disorders induced by early life experience. *Neurochem Res* 36(11):2075–2082
33. Wang XQ, Xiao AY, Sheline C et al (2003) Apoptotic insults impair Na⁺, K⁺-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J Cell Sci* 116:2099–2110
34. Silva RH, Abilio VC, Takatsu AL et al (2004) Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology* 46:895–903
35. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free radicals in biology and medicine, 4a edn. Oxford University Press, Oxford
36. Cochrane CG (1991) Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med* 12:137–147
37. Streck EL, Zugno AI et al (2001) Inhibition of rat brain Na⁺, K⁺-ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. *Neurochem Res* 26:1195–1200
38. Petrushanko I, Bogdanov N et al (2006) Na⁺, K⁺-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R916–R925
39. Noschang CG, Krolow R, Fontella FU, Arcego DM, Diehl LA, Weis SN, Arteni NS, Dalmaz C (2010) Neonatal handling impairs spatial memory and leads to altered nitric oxide production and DNA breaks in a sex specific manner. *Neurochem Res* 35:1083–1091
40. Diehl LA, Alvares LO, Noschang C, Engelke D, Andrezza AC, Gonçalves CA, Quillfeldt JA, Dalmaz C (2012) Long-lasting effects of maternal separation on an animal model of post-traumatic stress disorder: effects on memory and hippocampal oxidative stress. *Neurochem Res* 37:700–707
41. Maddox SA, Watts CS, Schafe GE (2013) p300/CBP histone acetyltransferase activity is required for newly acquired and

- reactivated fear memories in the lateral amygdala. *Learn Mem* 20(2):109–119
42. de Oliveira Alvares L, Pasqualini Genro B, Diehl F, Molina VA, Quillfeldt JA (2008) Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience* 154(4):1648–1655
 43. McAllister WR, McAllister DE (1971) Behavioral measurement of conditioned fear in *Aversive Conditioning and Learning*, FR Brush (ed) Academic Press, New York, NY, p 105–179
 44. Wyse ATS, Streck EL, Worm P et al (2000) Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺, K⁺ ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res* 25:969–973
 45. Chan KM, Delfer D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380
 46. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-die-binding. *Anal Biochem* 72:248–254
 47. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
 48. Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Dumon MF et al (1995) Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clin Biochem* 28:163–169
 49. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
 50. Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 77:325–333
 51. Biagini G, Pich EM, Carani C, Marrama P, Agnati LF (1998) Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *Int J Dev Neurosci* 16:187–197
 52. Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ, Gratton A (2004) Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci* 19:1863–1874
 53. Moffett MC, Vicentic A, Kozel M, Plotsky P, Francis DD, Kuhar MJ (2007) Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *Biochem Pharmacol* 73:321–330
 54. Plotsky PM, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ (2005) Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology* 30:2192–2204
 55. Zhang TY, Chretien P, Meaney MJ, Gratton A (2005) Influence of naturally occurring variations in maternal care on prepulse inhibition of acoustic startle and the medial prefrontal cortical dopamine response to stress in adult rats. *J Neurosci* 25:1493–1502
 56. Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ (2002) Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J Neurosci* 22:7840–7843
 57. Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK (2002) Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long-Evans rats. *Brain Res* 950:52–63
 58. Huot RL, Thirivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM (2001) Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology* 158:366–373
 59. Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743–760
 60. Quirk GJ, Mueller D (2008) Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33:56–72
 61. Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bohus B, Koolhaas JM (1999) The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocrinol* 11:925–933
 62. Beane ML, Cole MA, Spencer RL, Rudy JW (2002) Neonatal handling enhances contextual fear conditioning and alters corticosterone stress responses in young rats. *Horm Behav* 41:33–40
 63. Pryce CR, Bettschend D, Nanz-Bahr NI, Feldon J (2003) Comparison of the effects of early handling and early deprivation on conditioned stimulus, context, and spatial learning and memory in adult rats. *Behav Neurosci* 117:883–893
 64. Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM (2009) The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu Rev Neurosci* 32:289–313
 65. Meaney MJ, Tannenbaum B, Francis D, Bhatnagar S, Shanks N, Viau V et al (1994) Early environmental programming of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Semin Neurosci* 6:247–259
 66. Kosten TA, Lee HJ, Kim JJ, Misserendino MJD, Bombace JC, Lee HJ, Kim JJ (2005) Sex-selective effects of neonatal isolation on fear conditioning and foot shock sensitivity. *Behav Brain Res* 157:235–244
 67. Kosten TA, Lee HJ, Kim JJ (2006) Early life stress impairs fear conditioning in adult male and female rats. *Brain Res* 1087:142–150
 68. Stevenson CW, Spicer CH, Mason R, Marsden CA (2009) Early life programming of fear conditioning and extinction in adult male rats. *Behav Brain Res* 205:505–510
 69. Wilber AA, Southwood CJ, Wellman CL (2009) Brief neonatal maternal separation alters extinction of conditioned fear and corticolimbic glucocorticoid and NMDA receptor expression in adult rats. *Dev Neurobiol* 69:73–87
 70. Ikeda K, Onaka T, Yamakado M et al (2003) Degeneration of the amygdala/piriform cortex and enhanced fear/anxiety behaviors in sodium pump alpha2 subunit (Atp1a2)-deficient mice. *J Neurosci* 23:4667–4676
 71. Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL et al (2007) Deficiency in Na⁺, K⁺ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci* 27:616–626
 72. Wang P, Zeng T, Zhang CL et al (2009) Lipid peroxidation was involved in the memory impairment of carbon monoxide-induced delayed neuron damage. *Neurochem Res* 34:1293–1298
 73. Choi IY, Yan H, Park YK et al (2009) Sauchinone reduces oxygen-glucose deprivation-evoked neuronal cell death via suppression of intracellular radical production. *Arch Pharm Res* 32:1599–1606
 74. Metodiewa D, Koska C (2000) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview. *Neurotox Res* 1:197–233
 75. Olanow CW (1992) An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 32(Suppl):S2–S9
 76. Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685–716
 77. Haber F, Weiss J (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond* 147:332–351
 78. Prediger ME, Gamaro GD, Crema LM, Fontella FU, Dalmaz C (2004) Estradiol protects against oxidative stress induced by chronic variate stress. *Neurochem Res* 29:1923–1930
 79. Behl C, Moosmann B, Manthey D, Heck S (2000) The female sex hormone oestrogen as neuroprotectant: activities at various levels. *Novartis Found Symp* 230:221–238
 80. Bouffleur N, Antoniazzi CT, Pase CS et al (2013) Neonatal handling prevents anxiety-like symptoms in rats exposed to chronic mild stress: behavioral and oxidative parameters. *Stress* 16(3):321–330

CAPÍTULO 2

ARTIGO 2

Maternal Separation alters social interaction and oxytocin levels in cerebrospinal fluid
in rats

Luisa Amalia Diehl^{1,2}, Thiago Pereira Henriques³, Cátia Corrêa Nunes², Aldo Bolten
Lucion^{2,3}, Carla Dalmaz^{1,2}.

¹Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²Programa de Pós-Graduação em Neurociências, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Correspondence should be addressed to:

Luisa Amalia Diehl

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600, Anexo, Lab. 37.

90035-003 - Porto Alegre, RS, Brazil. Phone/FAX: 00 55 51 3308 5539

e-mail: diehl.luisa@gmail.com

Abstract

The neonatal stage from approximately 3 to 14 days of life has been described as a stress hyporesponsive period that is critical for the maturation of the HPA axis in the rat. Repeated long-term separation from the dam is considered to be one of the most potent stressors to which rat pups can be exposed, and permanently modifies neurobiological and behavioral parameters. The aim of this study was to analyze the effects of maternal separation (MS) on social behaviors of male and female rats in adulthood and levels of oxytocin (OT) in cerebrospinal fluid (CSF), which is a hormone with key roles on social behaviors. Females and male Wistar rats were subjected to repeated MS (incubator at 32°C, 3h/day) during postnatal days 1-10. At 70 days of age, the subjects were exposed to a Social Interaction test. CSF was collected from an additional group of animals for OT assessment. Two way ANOVA showed that MS decreased the following social behaviors: sniffing duration; frequencies of lateral and frontal attacks; frequency and duration of boxing. MS increased time when animals did not display social behavior. It was also found that females showed decreased frequencies on: lateral and frontal attacks; boxing; and mount. Two way ANOVA indicated a tendency of MS animals towards decreased OT CSF levels. Our results suggest a role of early rearing environment in programming aggressive and social aggressive behaviors. We found that an early stress experience such as MS may reduce social and aggressive behaviors and it could be related to decreased central levels of OT. We suggest that MS is a valid animal model to study the influences of early life stress on behavioral and neuroendocrine parameters which could be impaired in a variety of psychiatric disorders affecting social behaviors.

Key words: Maternal Separation; neonatal stress; long-term effects; social and aggressive behaviors; cerebral spinal fluid oxytocin.

1. Introduction

Early traumatic experiences produce long-term neural changes that are implicated in the etiology of psychiatric disorders (Sanchez *et al.*, 2001; Teicher *et al.*, 2002). Child abuse or neglect are severe risk factors for the development of inappropriate and abnormal social and emotional behaviors including excessive aggression, increased anxiety, and depression (Barnow *et al.*, 2001; Heim and Nemeroff, 2001), and children with histories of severe neglect have been reported to show attachment disorders and altered social behavior (O'Connor and Rutter, 2000; Zeanah *et al.*, 2002). Social behavior subsequent to early stress has been studied less frequently than psychopathology. Animal models of child neglect have been developed to mimic the experience of isolation stress in children and can be used to study the molecular mechanisms of its long-term consequences on social behavior. The prolonged periods of separation from the mother are often accompanied by nutritional loss, body temperature loss, and reduced maternal stimulation during the periods when pups are not with their mothers (Gonzalez, Ladd, Huot, Owens, & Plotsky, 1999). Early separation from the dam has been demonstrated to affect a myriad of physiological systems in the neonate, including alterations in heart rate, circadian rhythms, and levels of circulating hormones (Kuhn *et al.*, 1990; Stanton and Levine, 1990).

Long separations can result in long-lasting changes in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (Liu *et al.*, 1997), dopamine (Hall *et al.*, 1999), altered behavioral responses to pharmacological and environmental challenges (Kehoe, Shoemaker, Triano, Callahan, & Rappolt, 1998) and heightened fearfulness on tests of emotion (Caldji, Francis, Sharma, Plotsky, & Meaney, 2000). In the rat, these separations are typically carried out during the stress-hyporesponsive-period (SHRP), a period between

postnatal day (PND) 4–14, that is critical for the maturation of the HPA axis in the rat, in which the presence of the dam suppresses pups' basal and stress-induced circulating corticosterone, the main rat glucocorticoid hormone (Walker *et al.*, 2001). This period is characterized by a low responsiveness of the adrenocortical system to stressors and it appears to be caused by a reduced sensitivity of the adrenals to adrenocorticotropin (ACTH) (Rosenfeld *et al.*, 1992), as well as an amplified negative feedback action of corticosterone (Walker *et al.*, 1986). During this period, maternal behavior and proximity are the most important regulatory factors in determining the infant's adrenocortical activity and may suppress HPA axis activity (Kuhn *et al.*, 1990; Levine *et al.*, 1994; Stanton *et al.*, 1990). During the SHRP, low levels of corticosterone mediate a delicate balance between rapid cell death, birth, migration and proliferation in the dentate gyrus region of the hippocampus (Gould, 1994). The hippocampal formation has been the focus of much attention as a site which may be involved in the effects of early-life trauma on pathology; it shows structural and functional changes in patients suffering from a number of stress-related pathologies (Sheline *et al.*, 1999; Bremner, 2006).

One focus of modern psychiatric research for future therapies has been on neuropeptide systems, with oxytocin (OT) featuring prominently in such endeavors (Landgraf and Neumann, 2004; de Kloet *et al.*, 2005; Insel, 2010; Slattery and Neumann, 2010; Meyer-Lindenberg *et al.*, 2011). The synthesis and release of OT within the brain are driven by anxiogenic, stressful, and notably social (both positive and negative) stimuli (Landgraf and Neumann, 2004; Neumann, 2008). In turn, once released, this neuropeptide is a key regulator of anxiety-related behavior, passive versus active stress-coping in relation to depressive-like behavior, and multiple aspects of social behavior (Landgraf and Neumann, 2004; de Kloet *et al.*, 2005; Insel, 2010;

Slattery and Neumann, 2010; Neumann, 2009). Oxytocin is highly evolutionarily conserved, and molecularly similar neuropeptides are known, in part, for their prominent role in mammalian social behavior and social cognition (Donaldson and Young, 2008).

OT neurons are activated by stressful stimuli, food intake and social attachment. OT is primarily synthesized in the paraventricular (PVN) or supraoptic nucleus (SON) of the hypothalamus and released from the neurohypophysis into the general circulation, and it plays essential roles in parturition and lactation. In addition, parvocellular OT neurons project to various brain areas, including the nucleus of the solitary tract, dorsal motor nucleus of the vagus, the area postrema, ventromedial hypothalamus, medial preoptic areas, ventral tegmental area, nucleus accumbens and bed nucleus of the stria terminalis (Onaka *et al.*, 2012). OT has been implicated in the control of stress responses, analgesia, energy metabolism and social behaviors, including the recognition of conspecifics, mother–infant attachment, sexual behavior, pair-bonding and inter-male social behavior (Onaka *et al.*, 2012). In addition, a growing body of research has investigated the possible involvement of OT in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders that affect social functioning, such as autism, schizophrenia and depression (for a review, see Cochran *et al.*, 2013).

The purpose of this study was to analyze the effects of maternal separation (MS) on social behaviors of male and female rats in adulthood, as manifest by the results of social interaction test. Considering the role of OT in social behaviors and that the effects of MS have been detected several weeks after intervention, we assume that the MS procedure may induce stable morphological changes in this neuropeptidergic system. The OT levels on cerebrospinal fluid (CSF) in rats were then measured.

2. Material and Methods

2.1. Subjects:

Pregnant Wistar rats bred at our own animal facility were randomly selected. They were housed alone from around day 18 of gestation in home cages made of Plexiglas (65 x 25 x 15 cm) with the floor covered with sawdust and were maintained in a controlled environment: lights on between 07:00h and 19:00h, temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, cage cleaning twice a week, food and water provided *ad libitum*. All litters were culled to eight pups within 24h from birth and were maintained intact unless for MS procedures, which were carried out between 10:00h and 14:00h. Weaning occurred on postnatal day 21. The animals were housed four to five per cage, and separated by sex. Rats had free access to food (standard lab rat chow) and water, except during the period when the behavioral task was applied. MS procedures and behavioral tasks were performed between 13:00h and 16:00h, after animals had reached adult life. A maximum of two male or female pups were used per litter per behavioral experiment and a maximum of one male or female rat per litter was used per biochemical experiment.

All animal treatments were approved by the Ethical Committee of our University (Federal University of Rio Grande do Sul) and followed the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS).

2.2. Maternal Separation:

Control group (C) – Pups were left undisturbed with the dam until weaning. These animals were not touched, not even for cage cleaning. Dirty sawdust was

carefully removed from one side of the cage without disturbing the mother and the nest, and replaced by clean sawdust at that side by the main researcher.

Maternal separation group – Pups were removed from their home cage and placed into a clean cage filled with clean paper towel, inside an incubator at 32°C next to the dam's cage. After 3 hours, pups were returned to their dams. This procedure was carried out during the first ten days of life, and after that pups were left undisturbed until weaning. Behavioral tasks began at post-natal day 60.

2.3. Social Interaction:

This test was based on previous studies (Patin *et al.*, 2005; Todeschin *et al.*, 2009). The test apparatus consisted of 3 clear Plexiglas boxes (all 34 cm × 40 cm × 24 cm). Two of the boxes (A and B) were each connected to a third (neutral, N) by a corridor and a door, but not to each other. With the connecting doors closed, two adult rats from different litters, but with similar body weights, were placed into boxes A and B at the same time, one in each box. Each pair consisted of two rats of the same sex and from the same experimental group (MS or C). Therefore, 4 groups were observed: MS males, C males, MS females and C females. Each rat remained confined to its own box, with no access to the N box, for 24 h. Food and water were available *ad libitum* in boxes A and B.

The observational part of the test was performed at the start of the dark phase of the light–dark cycle. First, the doors to compartments A and B were opened at the same time, allowing both rats the possibility of exploring all three compartments, A, B and N. The test lasted 15 min, in which the frequencies and durations (in seconds) of the following variables were recorded, irrespective of which compartment they occurred in: social investigation (sniffing the other rat); mounts; offensive attack (lateral attack);

defensive attack (frontal attack); boxing; as well as non-social behavior (when rats were in the same compartment, but not interacting with each other).

2.4. Biochemical Measures:

2.4.1. Preparation of the Samples

CSF collection was carried out in an additional group of MS and C animals that were not exposed to behavioral tasks. Rats were transported to another room and anesthetized with 120 mg/kg ketamine HCl (Dopalen: Agribands, Campinas, SP, Brazil) and 16 mg/kg xylazine (Anasedan: Agribands, Campinas, SP, Brazil). CSF samples were obtained by magna cistern puncture and stored at -70°C for oxytocin measurement.

2.4.2. Oxytocin Determination

For OT determination, CSF was extracted for the hormone evaluation with an ELISA kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA).

2.5. Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean, and were analyzed by a two way ANOVA, using maternal separation and sex as factors. The significance level was accepted as different when the *P* value was equal or less than 0.05. Sample size varies in each experiment and is showed individually in the Results section.

3. Results

Effects of maternal separation, sex or interaction between maternal separation and sex on the social interaction and CSF OT were expressed as mean \pm standard error of the mean, and were analyzed by two way ANOVA, using maternal separation and sex as factors.

It was found that MS decreased the following parameters: duration of sniffing the partner (Figure 1A), [F (1, 34) = 4.479; P<0.05]; frequency of frontal attack (Figure 1C), [F (1, 34) = 6.288; P<0.05]; frequency of lateral attack (Figure 1E), [F (1, 34) = 22.86; P<0.001] ; and frequency (Figure 1F), [F (1, 34) = 4.223; P<0.05] and duration in seconds of boxing (Figure 1G), [F (1, 34) = 4.046; P=0.05]. However, MS increased duration in seconds of not displaying social behavior (Figure 1B), [F (1, 34) = 10.40; P<0.05]. No effects of MS were found in mount frequency [F (1, 34) = 2.660; P>0.05], but there was an effect of sex in this parameter [F (1, 34) = 8.843; P<0.05], (Figure 1H). Frequency of frontal attack showed effects of sex [F (1, 34) = 8.729; P<0.05] and statistical interaction between MS and sex were observed [F (1, 34) = 6.288; P<0.05], (Figure 1C). A sex effect in lateral attack [F (1, 34) = 5.949; P<0.05] was found, (Figure 1E). In the frequency of boxing, a sex effect was also observed [F (1, 34) = 9.011; P<0.05], (Figure 1F), as well as statistical interaction between MS and sex in duration of boxing [F (1, 34) = 4.118; P=0.05], (Figure 1G).

Regarding OT levels in CSF, a tendency towards reduction of OT levels was found in MS male and female rats [F (1, 28) = 3.67; P = 0.06], (Figure 2).

4. Discussion

In the present study, we found that MS caused alterations on parameters related to social interaction. MS rats showed decreased social and aggressive behaviors compared the control animals. It was also found that MS marginally decreased OT CSF levels, which could be related to the reduction observed in social behaviors.

There is growing evidence that childhood exposure to traumas in early life, such as abuse and negligence, can increase the vulnerability to develop psychopathologies related to emotional and social disturbances later in life (Agid *et al.*, 1999; Heim and Nemeroff, 2001). This suggests that the early life period is a sensitive age in which stressful events can adversely affect brain development and subsequent behavioral phenotypes. Moreover, it is known that social interactions have profound effects on health. The absence of positive social interactions is associated with both physical and mental illness (House *et al.*, 1988). Studies have shown that people with a higher quality of social relationships present a lower risk of death (Seeman, 1996), while social isolation has been shown to be a major risk factor for mortality (House *et al.*, 1988). However, the biological mechanisms underlying the effects of social attachment have not been fully understood yet. It has been reported that early adversity in humans is associated with an increased risk of developing social impairing psychiatric disorders in adulthood, such as schizophrenia, social anxiety disorder and social phobia (Dube *et al.*, 2001; van Oers *et al.*, 1999; de Kloet *et al.*, 2005; Read *et al.*, 2005). Taking these relevant information in consideration, we have investigated such topics using an animal model.

Maternal separation (MS) is an animal model that mimics the stress of adverse early-life experiences by separating pups from their dams daily for several hours during

their first 2 weeks of life. This forced absence of the mother in MS rats produces long-lasting alterations in neuroendocrine, cognitive, and behavioral functions that persist until adulthood (Heim *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002; Kendler *et al.*, 1995). Studies using paradigms to assess innate fear (e.g. open field and elevated plus maze) have shown that rats subjected to repeated MS during the early post-natal period show enhanced anxiety-like behavior in adulthood (Francis *et al.*, 2002; Huot *et al.*, 2001; Huot *et al.*, 2002).

The present study found that adult animals submitted to neonatal MS showed altered responses on a social interaction task. As observed in MS rats, the decreased duration of sniffing the partner, as well as increased duration of not displaying social behaviors when the pair was in the same compartment, indicate that MS impaired positive social behaviors. This finding can be compared to a previous work with brief separations of pups from the mother, the neonatal handling, in which it was also observed decrease of positive social interaction in adulthood (Todeschin *et al.*, 2009). Moreover, we also found that MS animals showed reduction of aggressive behaviors as observed on decreased frequencies of lateral attack, frontal attack and boxing. In contrast, Todeschin *et al* (2009) have reported that neonatal handling increased aggressive behavior. Sex differences on social interaction are according to previous reports (Todeschin *et al.*, 2009). The fluctuating levels of endogenous estrogen may be a confounding factor in MS effects on emotionality and anxiety related behaviors. It is known that estrogen modulates emotionality and anxiety levels in non-social and social contexts in female rats and mice (van Oers *et al.*, 1998). Previous studies reported that exposure to a deprived early-life social environment has been associated with increases in aggression (Veenema, 2009). The different results found in these works may reflect the different methodologies used in laboratories. In some studies, pups remained in a

huddle during the separations from the dam (Wigger *et al.*, 1999) and in other studies pups were separated or isolated from each other during the separations from the dam (Kosten *et al.*, 2005). Number of separations, as well as duration of the separations, also varied across studies, for example, from one separation on either postnatal day 4, 9, or 18 (Lehmann *et al.*, 1999) to every day from postnatal day 1 through weaning (Meerlo *et al.*, 1999).

Interestingly, our study found a tendency of MS towards reducing OT CSF levels and we suggest that this result may be related to the impaired performance on social interaction test. Early social deprivation have been found to induce changes in OT synthesis and OTR binding. MS of male mice increased (Tsuda *et al.*, 2011) or had no effect (Veenema *et al.*, 2007) on OT-immunoreactivity in the PVN, while neonatal handling of male rats decreased the number of OT-immunoreactive cells in the PVN (Todeschin *et al.*, 2009). Furthermore, lactating adult female mice exposed to maternal separation showed decreased OT-immunoreactivity in the PVN (Veenema *et al.*, 2007), while adult female prairie voles reared by single-mothers showed an increase in OT mRNA expression in the PVN compared with those reared by both parents (Ahern and Young, 2009). Nevertheless, it is highly interesting that deprived (MS) and enriched (handling) early social experiences can both result in a decrease in PVN–OT in female rats. The effects of MS on PVN–OT in female rats seem to be in line with two human studies; women exposed to child abuse showed a decrease in OT in CSF (Heim *et al.*, 2009) and children exposed to parental neglect had decreased levels of OT in urine (Fries *et al.*, 2005). It is not known yet whether CSF and urine levels of OT reflect OT synthesis and release levels within the brain. Even so, OT can mediate peripheral effects (e.g. via hypothalamic–pituitary–adrenal axis and autonomic systems) that can feedback on the brain to mediate changes in behavior. Together, this suggests that the early social

environment has the potential to substantially shape OT system, which, in turn, will alter the expression and regulation of social behavior throughout life. This may indicate that some effects of MS appear only later in life and may correspond to ongoing effects of MS during maturation of the brain. Studying effects of early social environment on neural systems and social behavior across development (instead of in adulthood only) will be important to track developmental alterations in brain and behavior. For example, maternal separation-induced changes in adult intermale aggression were preceded by changes in juvenile play-fighting (Veenema and Neumann, 2009). On the other hand, MS impairs social recognition in adult, but not juvenile, rats (Lukas *et al.*, 2011). These opposing effects of MS on specific types of social behavior may underlie stable vs. developmental alterations in OT and VP systems. Knowledge about early life social environment-induced alterations in OT system across development may ultimately provide information that is useful for understanding how deprived and adverse early-life social environment can cause social dysfunction in humans.

In conclusion, MS decreased social and aggressive behaviors, as well as marginally decreasing CSF OT levels. Hence, MS is a useful animal model to study the effects of early-life adverse events on development of psychopathologies, such as those involving altered mood, anxiety, stress responses and social behavior. The behavioral and neuroendocrine similarities found between human patients and this animal model suggest that MS may be helpful to unveil the pathophysiology of neuropsychiatric disorders, as well as providing new insights for treatments.

5. Acknowledgements

Financial support: National Research Council of Brazil (CNPq), and PRONEX (FAPERGS/CNPq 10/0018.3).

6. References

Agid, O., Shapira, B., Zislin, J., Ritsner, M., Hanin, B., et al. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 1999. 4: 163–172.

Ahern, T.H., Young, L.J. The impact of early life family structure on adult social attachment, alloparental behavior, and the neuropeptide systems regulating affiliative behaviors in the monogamous prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Front Behav Neurosci*. 2009. 3, 17.

Barnow, S., Lucht, M., Freyberger, H.J. Influence of punishment, emotional rejection, child abuse, and broken home on aggression in adolescence: an examination of aggressive adolescents in Germany. *Psychopathology*. 2001. 34, 167—173.

Bremner, J.D. Traumatic stress: effects on the brain. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006. 8, 445–461.

Caldji, C., Francis, D., Sharma, S., Plotsky, P.M. & Meaney, M.J. The effects of early environment on the development of GABA_A and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 2000. 22, 219–229.

Cochran, D.M., Fallon, D., Hill, M., Frazier, J.A. The role of oxytocin in psychiatric disorders: a review of biological and therapeutic research findings. *Harv Rev Psychiatry*. 2013. 21(2), 219-247.

de Kloet, E.R. et al. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci*. 2005. 6, 463–475.

de Kloet, E.R., Sibug, R.M., Helmerhorst, F.M., Schmidt, M.V. Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005. 29:271–281.

Donaldson, Z.R., Young, L.J. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science*. 2008. 322, 900–904.

Dube, S.R., Anda, R.F., Felitti, V.J., Croft, J.B., Edwards, V.J., Giles, W.H. Growing up with parental alcohol abuse: exposure to childhood abuse, neglect, and household dysfunction. *Child Abuse Negl*. 2001. 25(12):1627-1640.

Francis, D.D., Diorio, J., Plotsky, P.M., Meaney, M.J. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J Neurosci*. 2002. 22:7840–7843.

Fries, A. B.W., Ziegler, T. E., Kurian, J. R., Jacoris, S., Pollak, S. D. Early experience in humans is associated with changes in neuropeptides critical for regulating social behavior. *PNAS*. 2005. 102, 17237-17240.

Gonzalez, Ladd, Huot, Owents, & Plotsky. Prevention of HPA axis changes in response to neonatal maternal separation by providing dams with foster pups during the absence of her litter. Society for Neuroscience Abstracts. 1999.

Gould, E. The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. Ann NY Acad Sci. 1994. 743, 73–92.

Hall, F.S., Wilkinson, T.H., Humby, T. & Robbins, T.W. Maternal deprivation of neonatal rats produces enduring changes in dopamine function. Synapse. 1999. 32, 37–43.

Heim, C., Nemeroff, C.B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. Biol Psychiatry. 2001. 49:1023–1039.

Heim, C., Young, L.J., Newport, D.J., Mletzko, T., Miller, A.H., Nemeroff, C.B. Lower CSF oxytocin concentrations in women with a history of childhood abuse. Mol. Psychiatry. 2009. 14, 954–958.

House, J.S., Landis, K.R., Umberson, D. Social relationships and health. Science. 1988. 241, 540–545.

Huot, R.L., Plotsky, P.M., Lenox, R.H., McNamara, R.K. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long-Evans rats. *Brain Res.* 2002. 950:52–63.

Huot, R.L., Thirivikraman, K.V., Meaney, M.J., Plotsky, P.M. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology.* 2001. 158:366–373.

Insel, T.R. The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. *Neuron.* 2010. 65, 768–779.

Johnson, J.G., Cohen, P., Gould, M.S., Kasen, S., Brown, J., Brook, J.S. Childhood adversities, interpersonal difficulties, and risk for suicide attempts during late adolescence and early adulthood. *Arch Gen Psychiatry.* 2002. 59(8):741-749.

Kehoe, P., Shoemaker, W.J., Triano, L., Callahan, M. & Rappolt, G. Adult rats stressed as neonates show exaggerated behavioral responses to both pharmacological and environmental challenges. *Behavioral Neuroscience.* 1998. 112(1), 116-125.

Kendler, K.S., Kessler, R.C., Walters, E.E., MacLean, C., Neale, M.C., Heath, A.C., Eaves, L.J. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am J Psychiatry.* 1995. 152(6):833-842.

Kosten, T.A., Lee, H.J., Kim, J.J., Misserendino, M.J.D., Bombace, J.C., Lee, H.J., Kim, J.J. Sex-selective effects of neonatal isolation on fear conditioning and foot shock sensitivity. *Behav Brain Res.* 2005. 157:235–244.

Kuhn, C.M., Pauk, J., Schanberg, S.M. Endocrine responses to mother–infant separation in developing rats. *Dev Psychobiol.* 1990. 23:395–410.

Landgraf, R. and Neumann, I.D. Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front. Neuroendocrinol.* 2004. 25, 150–176.

Lehmann, J., et al. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999. 64(4):705-715.

Levine, S. The ontogeny of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis: The influence of maternal factors. *Ann NY Acad Sci.* 1994. 746:275–289.

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

Long-Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology.* 2001. 158:366–373.

Lukas, M., Bredewold, R., Landgraf, R., Neumann, I.D., Veenema, A.H. Early life stress impairs social recognition due to a blunted response of vasopressin release within the septum of adult male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2011. 36, 843–853.

Meerlo, P., Horvath, K.M., Nagy, G.M., Bohus, B., Koolhaas, J.M. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocrinol*. 1999. 11:925–933.

Meyer-Lindenberg, A. et al. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nat Rev Neurosci*. 2011. 12, 524–538.

Neumann, I.D. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol*. 2008. 20, 858–865.

Neumann, I.D. The advantage of social living: brain neuropeptides mediate the beneficial consequences of sex and motherhood. *Front Neuroendocrinol*. 2009. 30, 483–496.

O'Connor, T.G. and Rutter, M. Attachment disorder behavior following early severe deprivation: extension and longitudinal follow-up. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000. 39, 703–712.

Onaka, T., Takayanagi, Y. and Yoshida, M. Roles of Oxytocin Neurones in the Control of Stress, Energy Metabolism, and Social Behaviour *Journal of Neuroendocrinology*. 2012. 24, 587–598.

Patin, V., Lordi, B., Vincent, A., Caston, J. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Dev Brain Res*. 2005. 160, 265–274.

Read, J., van Os, J., Morrison, A.P., Ross, C.A. Childhood trauma, psychosis and schizophrenia: a literature review with theoretical and clinical implications. *Acta Psychiatr Scand*. 2005. 112, 330–350.

Rosenfeld, P., Wetmore, J.B., Levine, S. Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats. *Physiol Behav*. 1992. 52:787–791.

Sanchez, M.M., Ladd, C.O. and Plotsky, P.M. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Dev Psychobiol*. 2001. 13, 419–449.

Seeman, T.E. Social ties and health: the benefits of social integration. *Ann Epidemiol*. 1996. 6, 442–451.

Sheline, Y.I., Sanghavi, M., Mintun, M.A., Gado, M.H. Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci*. 1999. 19, 5034–5043.

Slattery, D.A. and Neumann, I.D. Oxytocin and major depressive disorder: experimental and clinical evidence for links to a etiology and possible treatment. *Pharmaceuticals*. 2010. 3, 702–724.

Stanton, M.E. and Levine, S.K. Inhibition of infant glucocorticoid stress response: specific role of maternal cues. *Dev Psychobiol*. 1990. 23, 411–426.

Teicher, M.H., Andersen, S.L., Polcari, A., Anderson, C.M. and Navalta, C.P. Developmental neurobiology of childhood stress and trauma. *Psychiatr Clin North Am*. 2002. 25, 397–426.

Todeschin, A.S., Winkelmann-Duarte, E.C., Jacob, M.H.V., Aranda, B.C.C., Jacobs, S., Fernandes, M.C., Ribeiro, M.F.M., Sanvitto, G.L., Lucion, A.B. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Horm Behav*. 2009. 56, 93-100.

Tsuda, M.C., Yamaguchi, N., Ogawa, S. Early life stress disrupts peripubertal development of aggression in male mice. *Neuroreport*. 2011. 22, 259–263.

van Oers, H.J., de Kloet, E.R., Levine, S. Persistent effects of maternal deprivation on HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone. *J Neuroendocrinol*. 1999. 11:581–588.

van Oers, H.J., de Kloet, E.R., Whelan, T., Levine, S. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J Neurosci.* 1998. 18:10171–10179.

Veenema, A.H., Bredewold, R., Neumann, I.D. Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology.* 2007. 437–450.

Veenema, A.H., Neumann, I.D. Maternal separation enhances offensive playfighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2009. 34, 463–467.

Veenema, A.H. Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: what can we learn from animal models? *Front. Neuroendocrinol.* 2009. 30, 497–518.

Walker, C.D., Sapolsky, R.M., Meaney, M.J., Vale, W.W., Rivier, C.L. Increased pituitary sensitivity to glucocorticoid feedback during the stress nonresponsive period in the neonatal rat. *Endocrinology.* 1986. 119:1816–1821.

Walker, C.D., Anand, K.J.S., Plotsky, P.M. Development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and the stress response. In: McEwen, B.S. (Ed.), *Coping with the Environment: Neural and Endocrine Mechanisms.* 2001. Oxford University Press, New York, pp. 237–270.

Zeanah, C.H., Smyke, A.T and Dumitrescu, A. Attachment disturbances in young children. II. Indiscriminate behavior and institutional care. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2002. 41, 983–989.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effects of maternal separation on the social interaction test in male and female adult rats: total duration of sniffing the partner (**A**); duration of no social behavior (**B**); frequency and duration of frontal attack (**C and D**); frequency of lateral attack (**E**); frequency and duration of boxing (**F and G**); and frequency of mount (**H**). Data are shown as Mean \pm SEM. Two way ANOVA tests were performed, using maternal separation and sex as factors. Number of animals: C males=9; MS males=5; C females=10; MS females=10.

(**A**) Two way ANOVA showed significant effect of maternal separation in time of the total duration of sniffing the partner, ($P<0.05$).

(**B**) Two way ANOVA showed significant effect of maternal separation in time of the total duration of no social behavior, ($P<0.05$).

(**C**) Two way ANOVA showed significant effects of maternal separation ($P<0.05$) and sex ($P<0.05$), as well as statistical interaction between maternal separation and sex in frequency of frontal attack, ($P<0.05$).

(**D**) An effect of sex was found in total duration of frontal attack ($P<0.05$).

(**E**) Two way ANOVA showed significant effects of maternal separation ($P<0.001$) and sex ($P<0.001$) in the frequency of lateral attack.

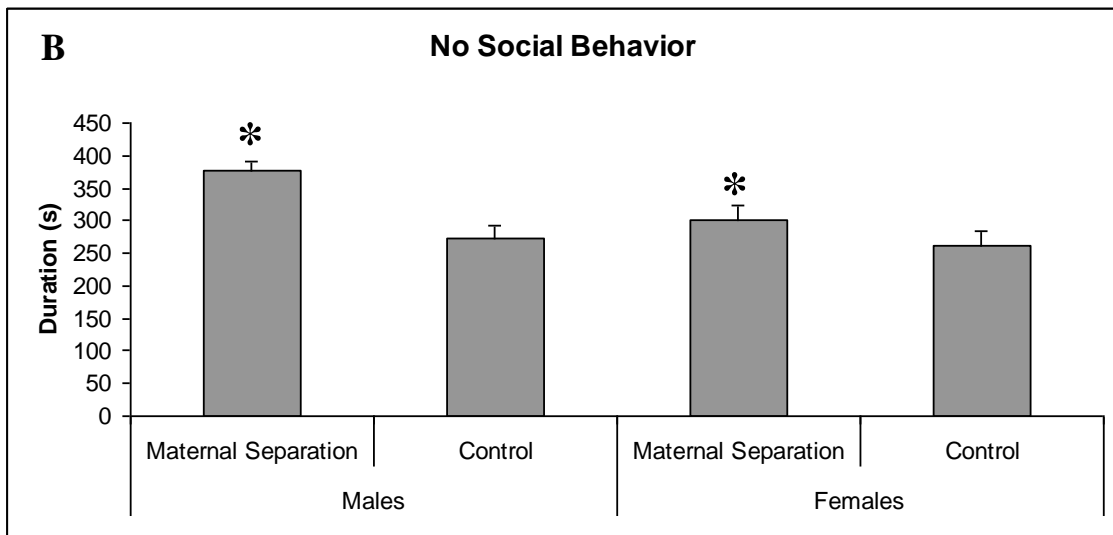
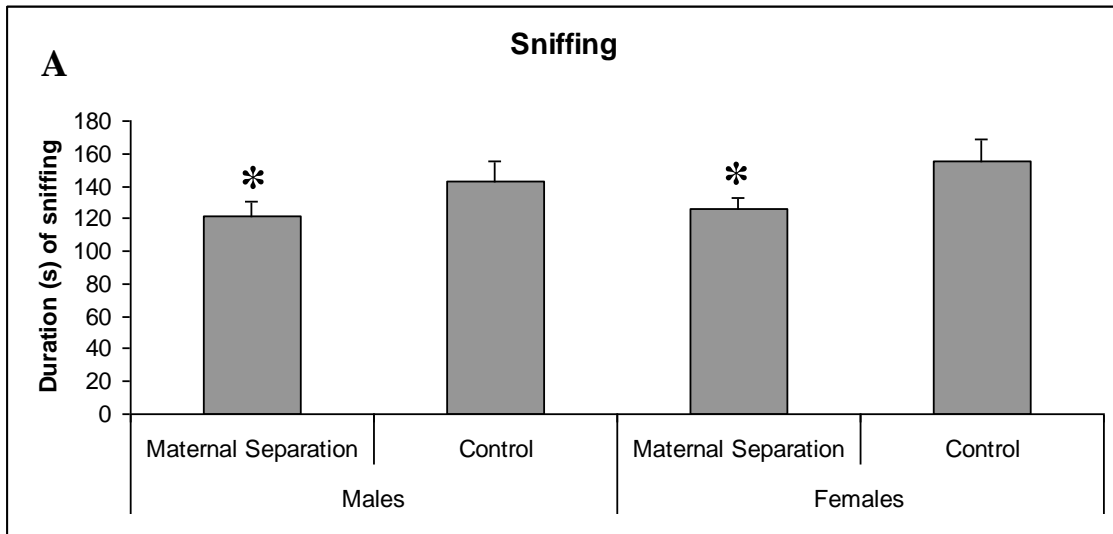
(**F**) Two way ANOVA showed a significant effect of maternal separation and sex in the frequency of boxing ($P<0.05$).

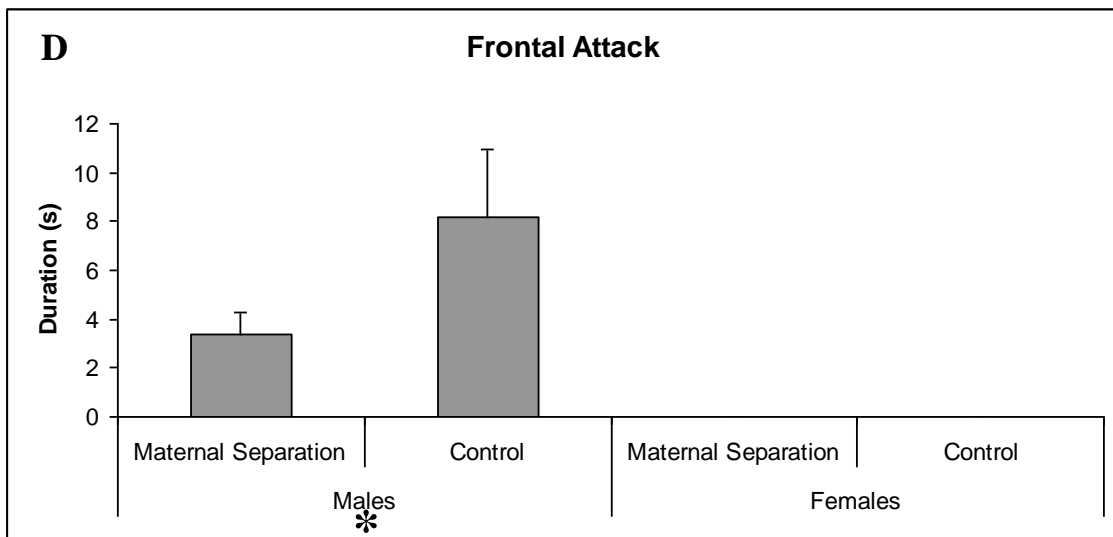
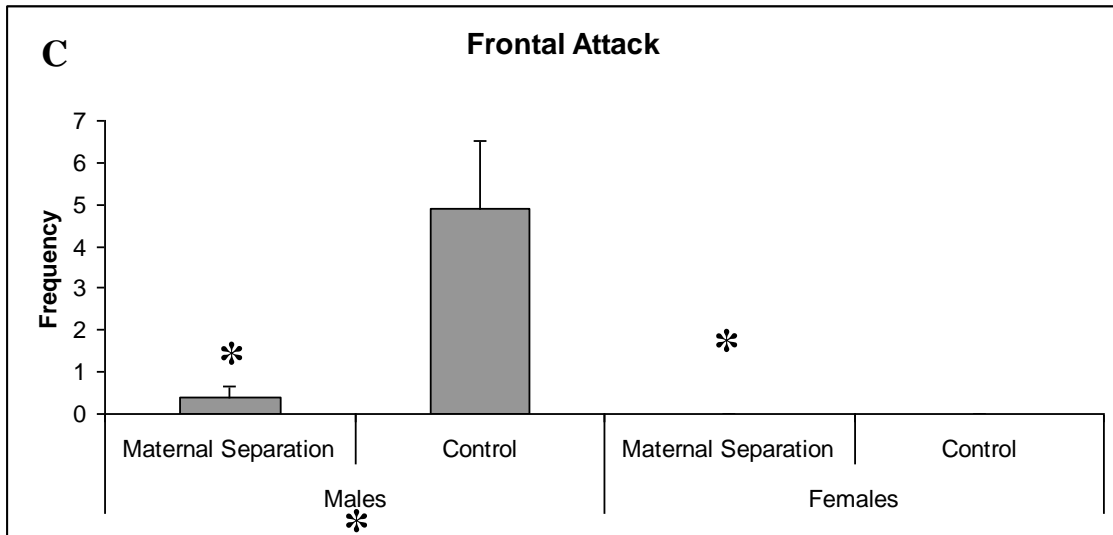
(G) Maternal separation ($P < 0.05$) and sex ($P < 0.05$) effects were found, as well as a statistical interaction between maternal separation and sex in total duration of boxing ($P < 0.05$).

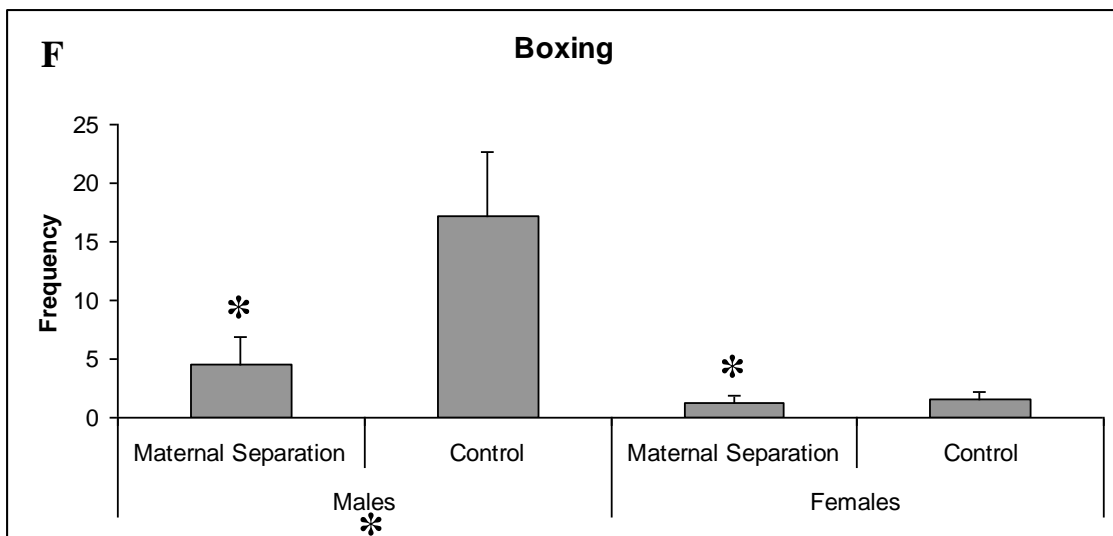
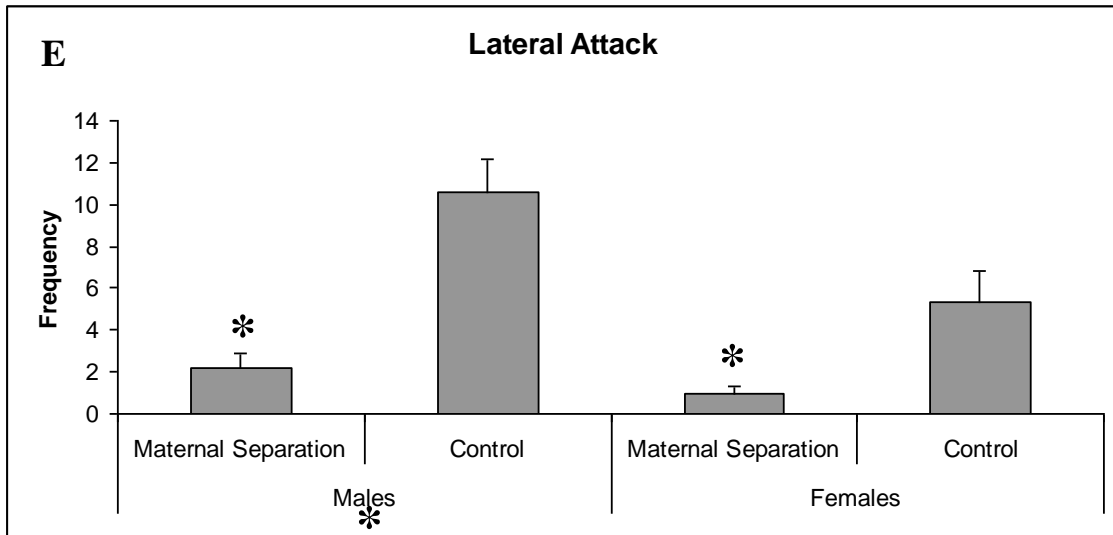
(H) Two way ANOVA showed an effect of sex ($P < 0.05$) in the frequency of mount.

Figure2. Effects of maternal separation on oxytocin levels in cerebrospinal fluid of adult male and female rats. Two way ANOVA (using maternal separation and sex as factors) showed a tendency towards a maternal separation effect. Number of animals: C males=7; MS males=7; C females=7; MS females=7.

Figure 1







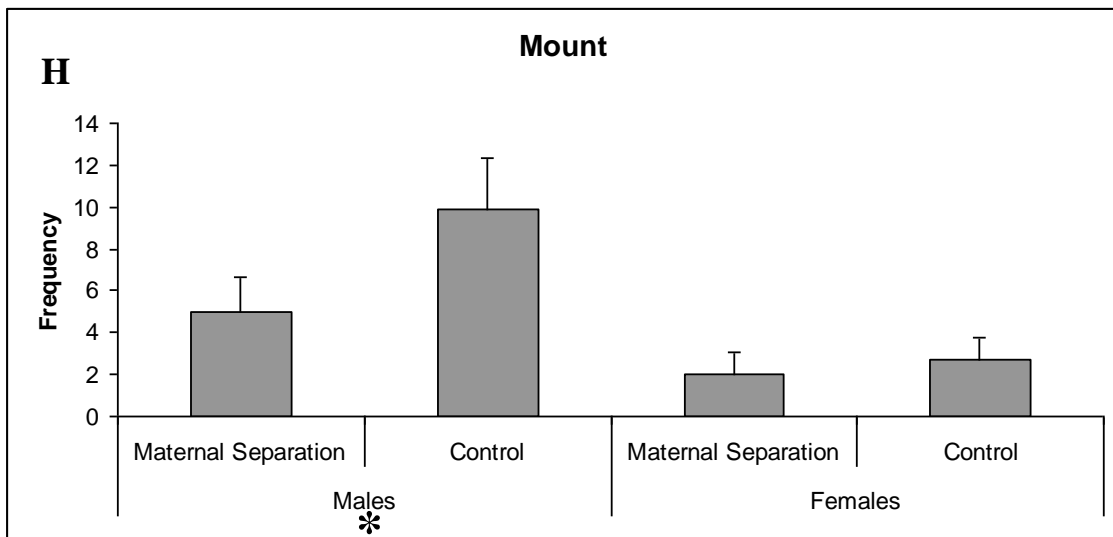
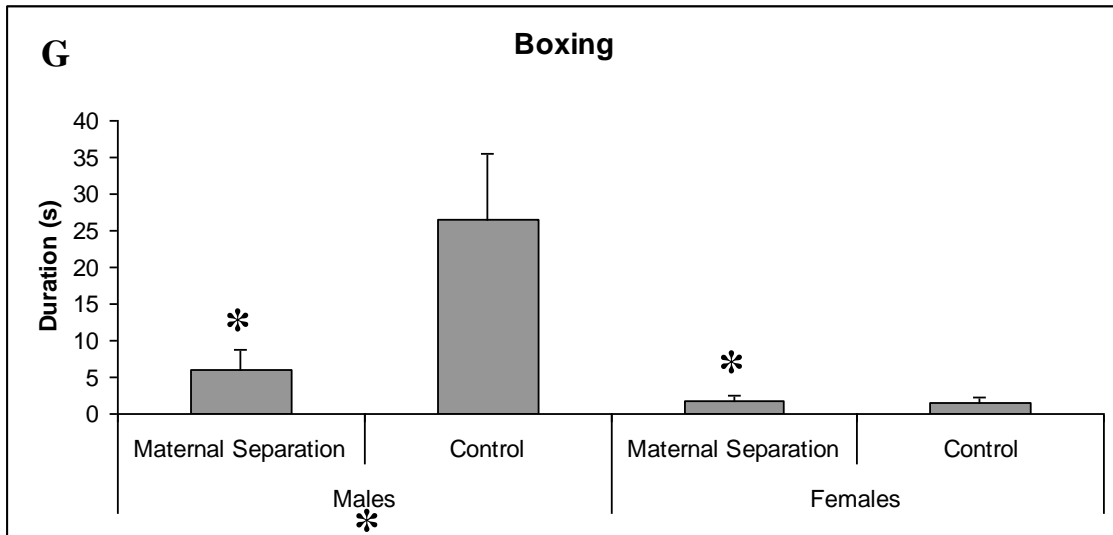
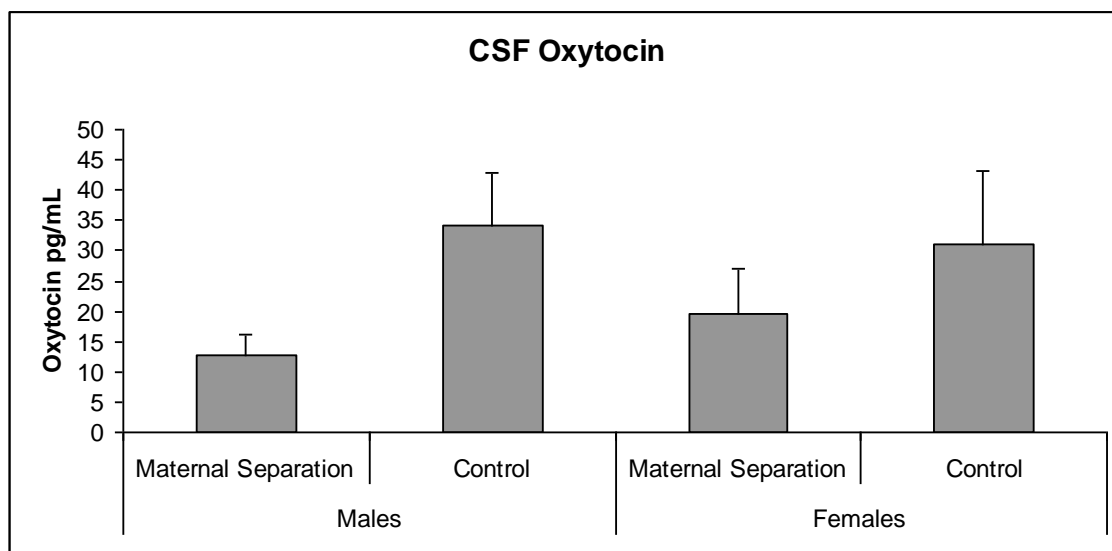


Figure 2



CAPÍTULO 3
OUTROS RESULTADOS

1. Materiais e Métodos:

1.1 Animais Experimentais:

Ratas fêmeas prenhes foram selecionadas ao acaso, sendo provenientes do biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Elas permaneceram em caixas-moradia, confeccionadas em “plexiglas”, medindo 41x34x16cm, com assoalho recoberto de serragem, até o desmame dos filhotes. Cada caixa conteve apenas uma ninhada que foi padronizada em oito filhotes. Os animais foram submetidos a um ciclo normal claro/escuro de 12 horas, com ração padronizada e água “*ad libitum*”.

1.2 Estresse neonatal:

As ninhadas acima foram divididas em dois grupos:

- a) **Não Separadas no Período Neonatal:** permaneceram sem qualquer tipo de manipulação até o desmame, sem nem mesmo a limpeza de caixas promovida pela equipe do ratário.
- b) **Separadas no Período Neonatal:** os filhotes sofreram separação de suas mães por 3 horas por dia dos dias 1 a 10 de vida. A mãe foi gentilmente afastada da ninhada, e em seguida todos os filhotes foram retirados do ninho ao mesmo tempo, sendo imediatamente colocados em uma incubadora com temperatura de 32° C \pm 1° C. A mãe permanecia na caixa moradia e na mesma sala da incubadora. (KALINICHEV *et al.*, 2002).

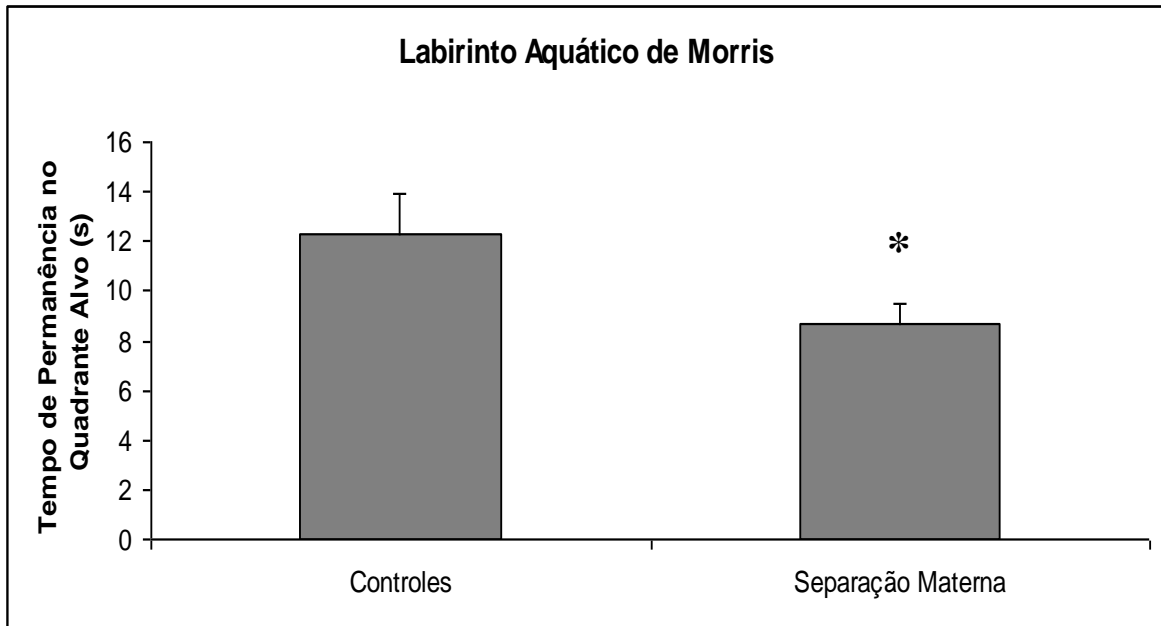
O dia do nascimento foi considerado dia zero. Aos vinte e um dias de vida, os animais foram desmamados e mantidos em grupos de 4 ou 5 por caixa, sendo separados entre machos e fêmeas. Os testes comportamentais iniciaram aos 60 dias de vida, quando já adultos.

1.3 Labirinto Aquático de Morris:

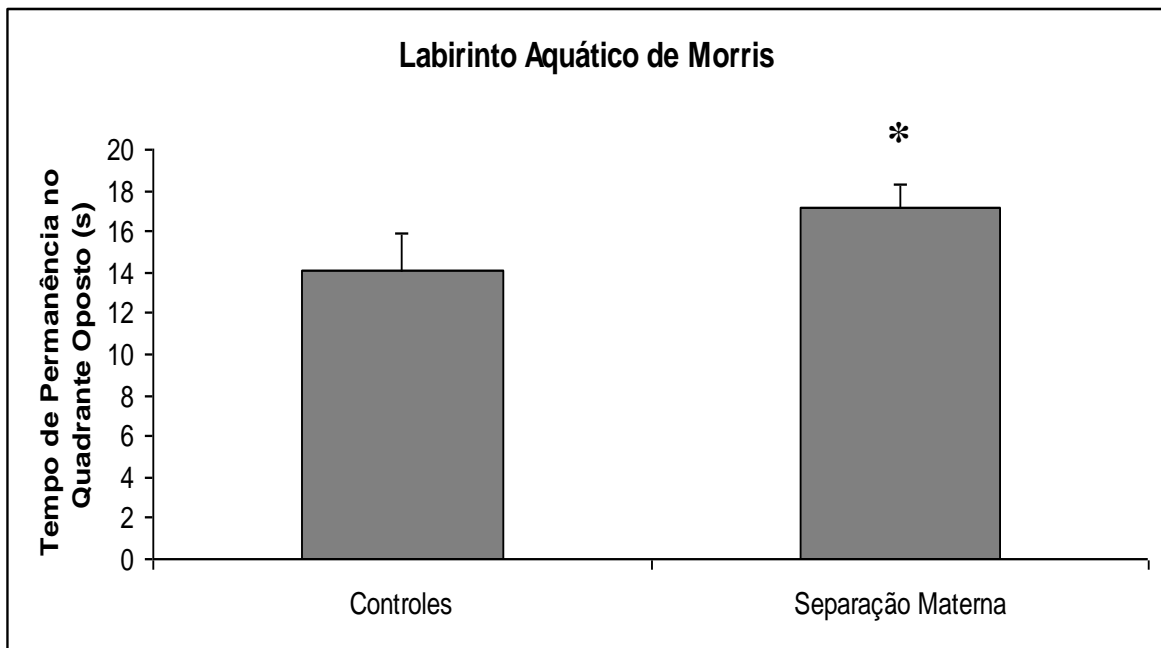
O Labirinto Aquático de Morris consiste em um tanque parcialmente cheio de água (24°C) dividido em quatro quadrantes, cujas linhas de divisão são atribuídas aos diferentes pontos cardeais (N, O, S e L). Uma plataforma submersa (10 cm de diâmetro) foi colocada no meio de um dos quadrantes, a qual o animal deve encontrar por meio de dicas visuais presentes nas paredes da sala de experimento. Os animais foram submetidos à tarefa por seis dias consecutivos, sendo que nos cinco primeiros dias a plataforma ficou sempre no mesmo lugar e os animais foram largados dos quatro pontos cardeais. Eles tinham um teto de 60 segundos para achar a plataforma e se isso não acontecia eles eram gentilmente conduzidos até ela e permaneciam 10 segundos sobre ela. No sexto dia (teste) a plataforma era retirada e o animal era somente largado de um dos pontos cardeais e o tempo que ele permanecia no quadrante alvo (o da plataforma) e no quadrante oposto era medido (VASCONCELLOS *et al.*, 2003).

1.3.1 Resultados do Labirinto Aquático de Morris (somente em ratos machos):

Ratos separados das mães no período neonatal apresentaram prejuízo na memória do tipo espacial, permanecendo menos tempo no quadrante alvo (local onde estava localizada a plataforma nos dias de treino) e mais tempo no quadrante oposto. A estatística utilizada foi o Teste-*t* de Student.



Separação Materna – [Teste – t de Student, $t(32) = 4,26$; $P < 0,05$].



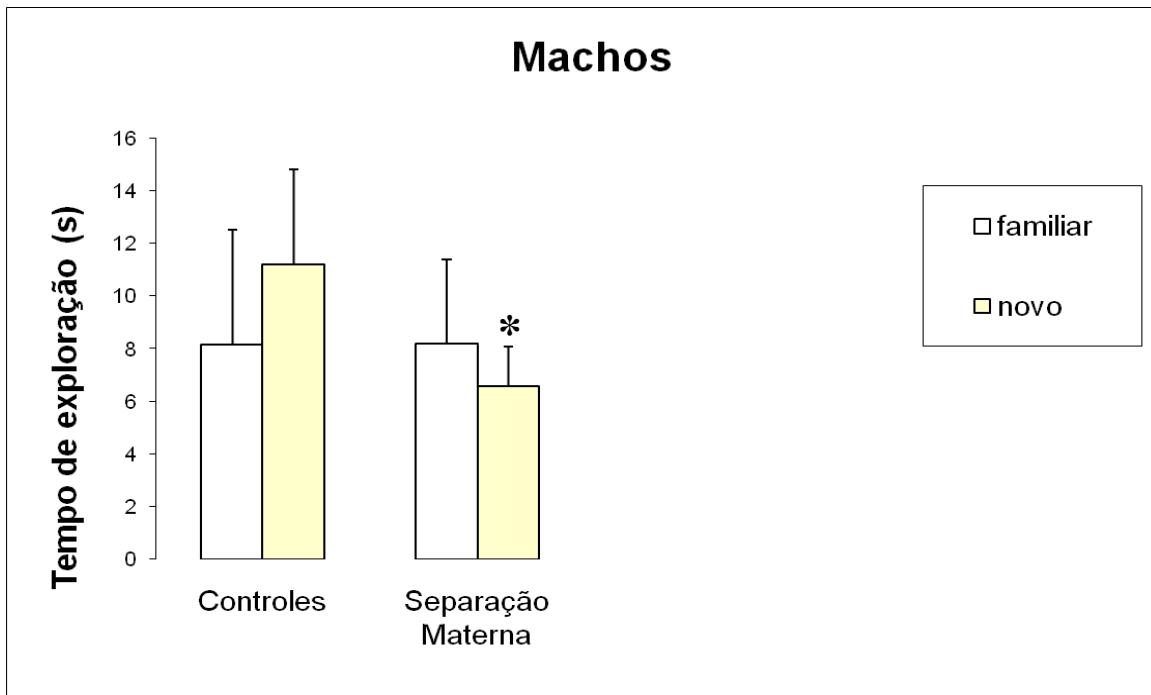
Separação Materna – [Teste – t de Student, $t(32) = 2,23$; $P < 0,05$].

1.4 Reconhecimento de Objetos:

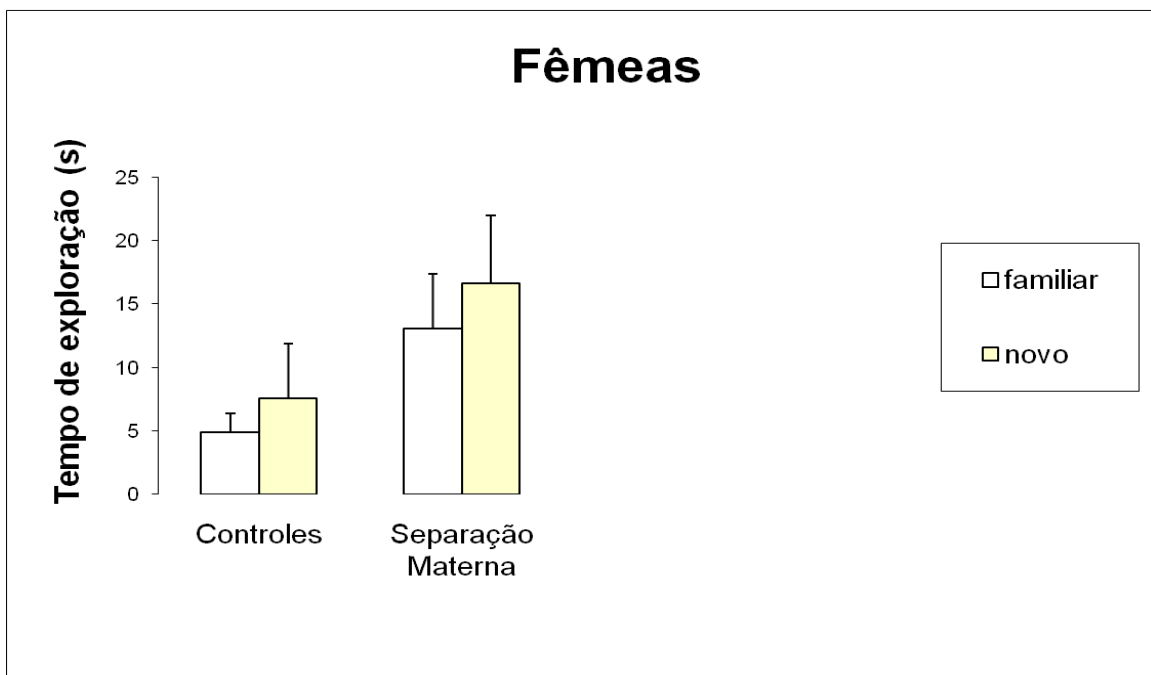
Esta tarefa foi realizada em um aparato retangular de vidro medindo 60x30x50cm, onde eram colocados dois objetos, um em cada lado do aparato. O rato foi colocado no meio da caixa, de frente para o norte, ou seja, de costas para os objetos. Foi anotado o tempo de exploração do animal em cada objeto (t_1 e t_2), durante 5 minutos. Somente era considerada exploração do animal quando este estava voltado para o objeto e a 2 cm, pelo menos, do objeto. Após um intervalo de 5 minutos, o animal era retirado da caixa e os objetos eram trocados, sendo um deles distinto e o outro igual ao objeto anteriormente investigado. O animal foi recolocado na caixa após um intervalo de 5 minutos e eram anotados novamente os tempos de exploração para cada objeto (t_1' e t_2) durante mais 5 minutos. Os objetos e o aparato foram limpos entre um teste e outro. Foram comparados os tempos de exploração do objeto familiar e do objeto novo. Foi tomado como índice de memória para a tarefa um aumento no tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto familiar (LIMA *et al.*, 2005).

1.4.1 Resultados do Reconhecimento de Objetos (ratos machos e fêmeas):

Na tarefa de Reconhecimento de Objetos, ratos machos separados das mães no período neonatal apresentaram um prejuízo na memória de curta duração (permaneceram explorando menos tempo o novo objeto). Não foi observado efeito da separação materna nas fêmeas entre os tempos de exploração dos objetos (familiar e novo). A estatística utilizada foi o Teste-*t* de Student.



Separação Materna – [Teste – *t* de Student, $t(28) = 0,20$; $P < 0,05$].



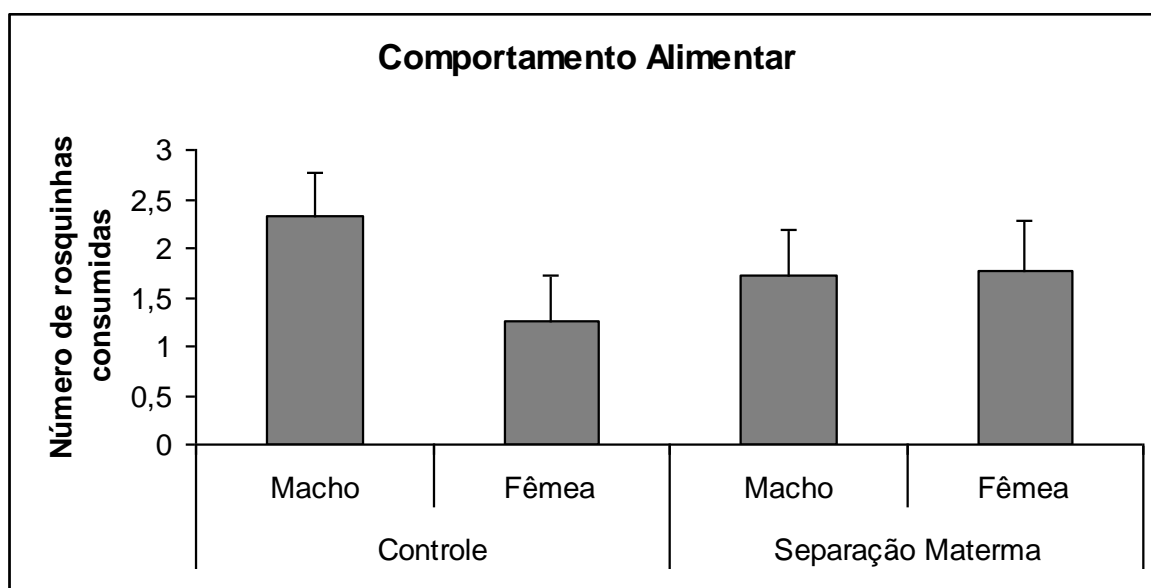
Nas fêmeas não houve diferença significativa entre os tempos de exploração dos objetos (familiar e novo).

1.5 Comportamento Alimentar:

Essa tarefa compreendeu 5 dias de habituação e 1 dia de teste (o 6º dia). Um dia antes do primeiro dia de habituação, os animais são deixados em jejum e após o 1º dia de habituação os animais são deixados em restrição alimentar, recebendo em média 80% da quantidade de alimento anteriormente consumida diariamente. O aparato consiste numa caixa de madeira retangular de 40 X 15 X 20 cm e vidro na parte superior.

Nos dias da habituação foram colocados 10 *pellets* de *Froot Loops* em pequenos pratos numa das extremidades do aparato, e os animais tiveram 3 minutos para consumir o alimento doce. Passados os 3 minutos, a quantidade de alimento consumido foi anotada. Após o 5º dia de habituação (último dia antes do teste) os animais foram deixados com ração padrão à vontade. No dia do teste, os animais foram colocados no mesmo aparato, com 10 *pellets* de *Froot Loops* e tiveram 3 minutos para consumir o alimento que foi quantificado no final desse tempo (SILVEIRA *et al.*, 2008).

1.5.1 Resultados do Comportamento Alimentar:



Sem diferença entre os grupos. A estatística utilizada foi ANOVA de duas vias e não se observou efeito da separação materna, sexo ou interação entre esses fatores. Separação Materna – [F(1,72) = 0,83 P > 0,05]; Sexo – [F(1,72) = 1,69 P > 0,05]; Interação Separação Materna e Sexo – [F(1,72) = 0,86 P > 0,05].

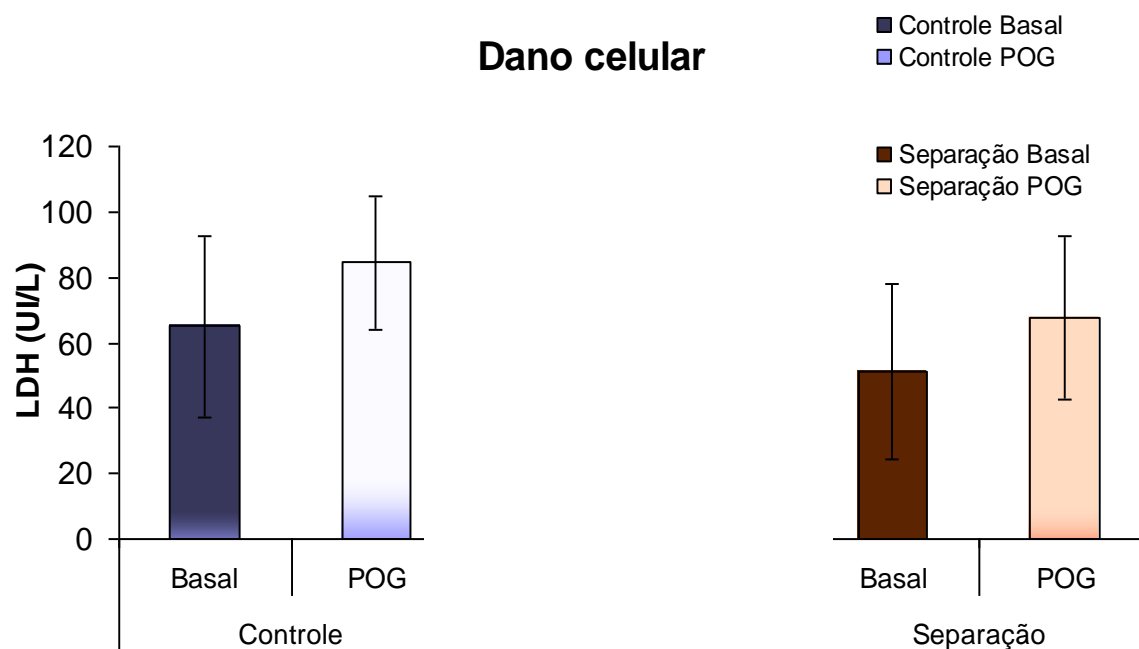
1.6 Obtenção das Amostras Biológicas:

Uma semana após o término dos testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação. Para tal, cada animal foi levado individualmente para uma sala do laboratório onde foi sacrificado de forma rápida, por um pesquisador com experiência. O sangue do tronco foi coletado para análise do índice de quebras do ADN periférico e o cérebro foi rapidamente coletado, o hipocampo dissecado e utilizado para medida de sua susceptibilidade à privação de oxigênio e glicose *in vitro* e do índice de quebras do ADN. Outras amostras de hipocampo foram congeladas a -70°C e utilizadas para avaliação de citocinas inflamatórias e níveis de BDNF.

1.7 Privação de Oxigênio e Glicose *In Vitro*:

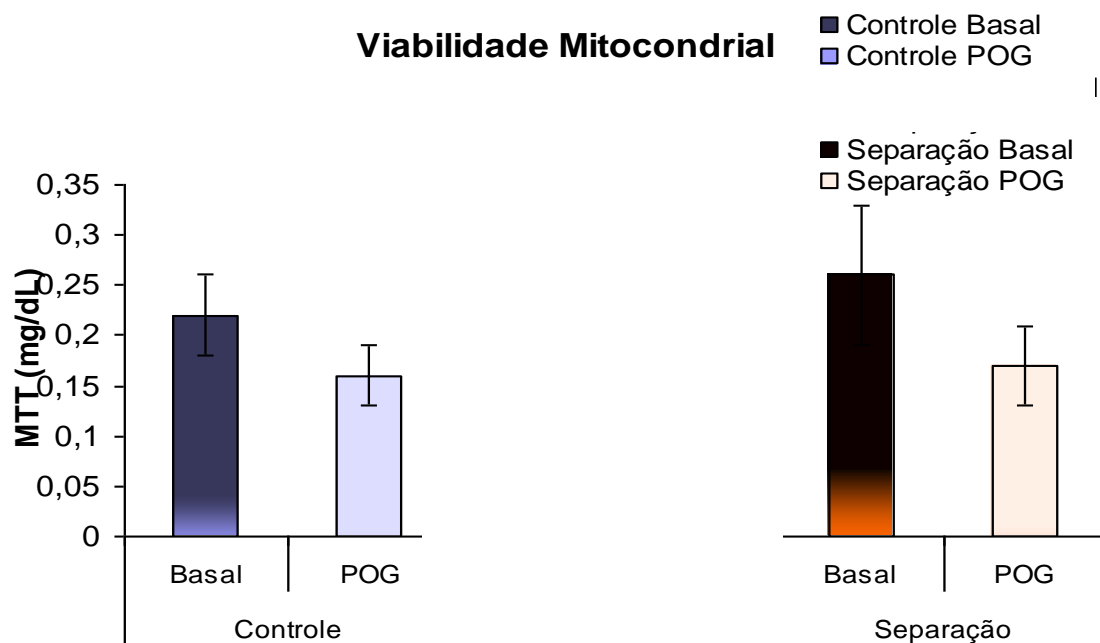
Os ratos adultos, após avaliação comportamental, foram decapitados e seu hipocampo foi rapidamente dissecado sobre uma placa de Petry colocada sobre o gelo e fatiado em secção transversa utilizando um fatiador de tecido McIlwain. Cada fatia foi colocada em um poço de uma placa de cultura (as placas eram pareadas: controle e POG) e pré-incubadas conforme descrito por Cárdenas (2000) e colaboradores. A exposição à privação de oxigênio e glicose foi baseada no método descrito por Strasser e Fischer (1995). Em um segundo experimento, a mesma metodologia foi utilizada, mas no período de reperfusão, as fatias de hipocampo foram expostas a um meio de incubação controle contendo lactato 10 mM no lugar da glicose.

1.7.1 Resultados da Privação de Oxigênio e Glicose *In Vitro* (hipocampo de ratos machos):



Dano Celular (LDH):

Nos ratos estressados no período neonatal que sofreram privação de oxigênio e glicose em fatias do hipocampo. Não houve diferença entre os grupos separação materna e controles em relação ao dano celular medido através da lactato desidrogenase (LDH).



Viabilidade Mitocondrial:

Incorporação de MTT em ratos estressados no período neonatal que sofreram privação de oxigênio e glicose em fatias do hipocampo. Não houve diferença entre os grupos separação materna e controles quanto à viabilidade mitocondrial pela incorporação de MTT.

1.8 Ensaio Cometa:

O ensaio Cometa é uma técnica simples e rápida para verificarmos de modo quantitativo quebras simples e duplas ao ADN. Tanto o sangue quanto o hipocampo foram adicionados em tampão fosfato-salino (PBS) gelado, dissociando-os lentamente. Uma alíquota foi retirada e misturada com agarose de baixo ponto de fusão e colocada numa lâmina em uma solução de lise em pH alcalino *overnight*. Após as lâminas foram coradas com *Syber Safe*. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência no comprimento de luz verde. A leitura do índice de quebras do ADN central (no

hipocampo) e periférico apareceram na forma de uma cauda que pode ter intensidades diferentes variando de 1 a 4 (QUINCOZES-SANTOS *et al.*, 2007).

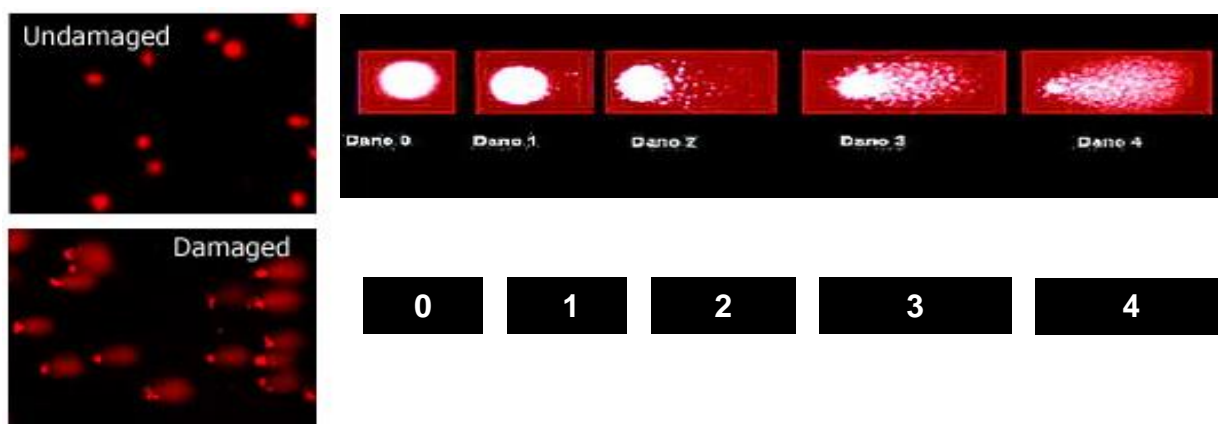
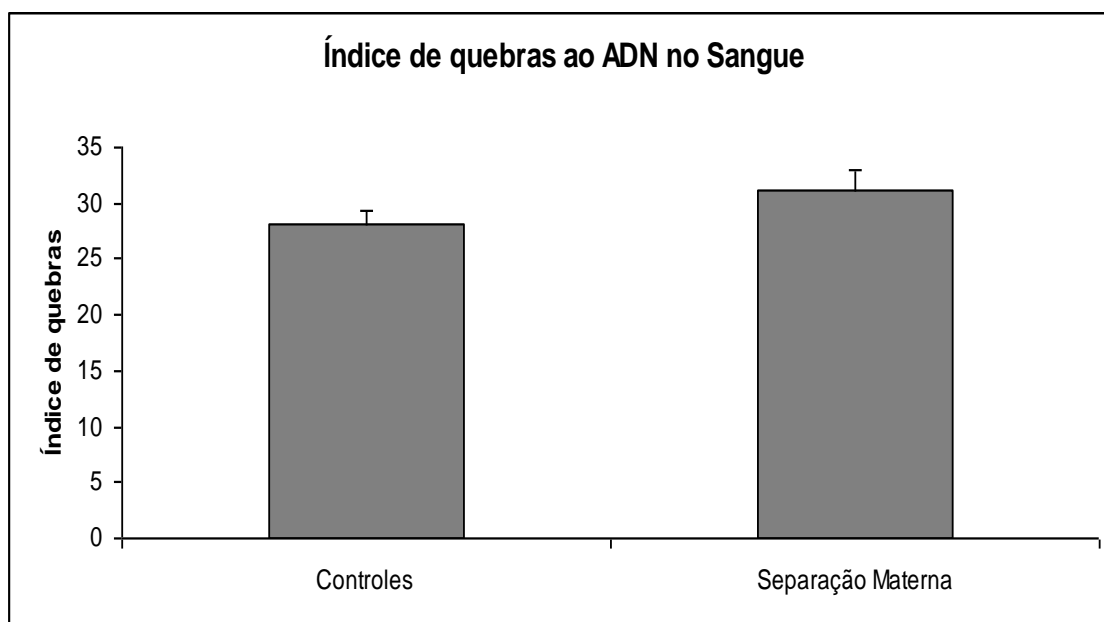
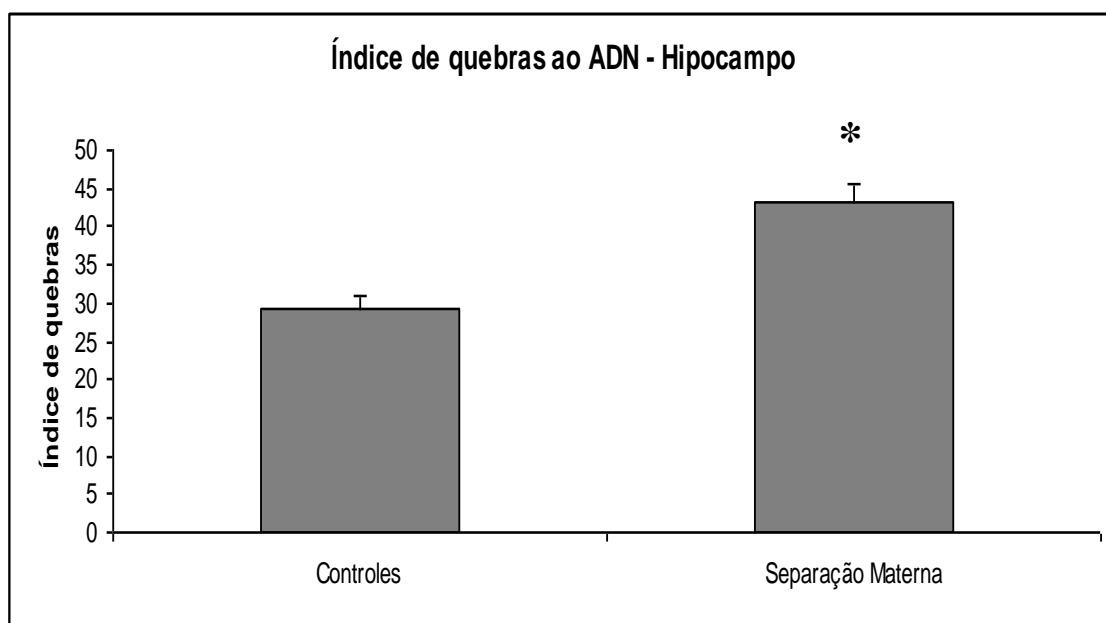


Figura 5: A leitura do índice de quebras do ADN aparecem na forma de uma cauda que pode ter intensidades diferentes variando de 1 a 4.

1.8.1 Ensaio Cometa (sangue e hipocampo de ratos machos): A análise estatística utilizada foi o Teste $-t$ de Student.



Na análise do índice de quebras ao ADN no sangue, não houve diferença entre os grupos [Teste $-t$ de Student, $t(14) = 0,89$; $P > 0,05$].



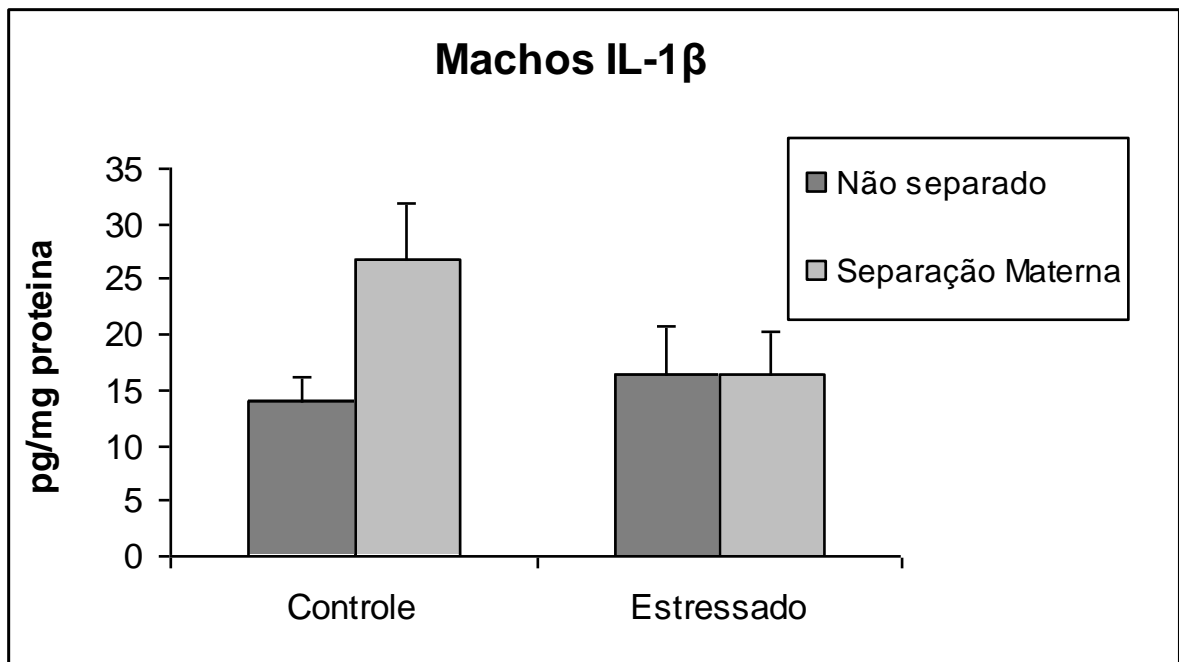
Efeito da separação aumentando o índice de quebras ao ADN no hipocampo [Teste – *t* de Student, $t(14) = 0,10$; $P < 0,001$].

1.9 Dosagem das citocinas inflamatória IL-1, IL-6, TNF- α e BDNF:

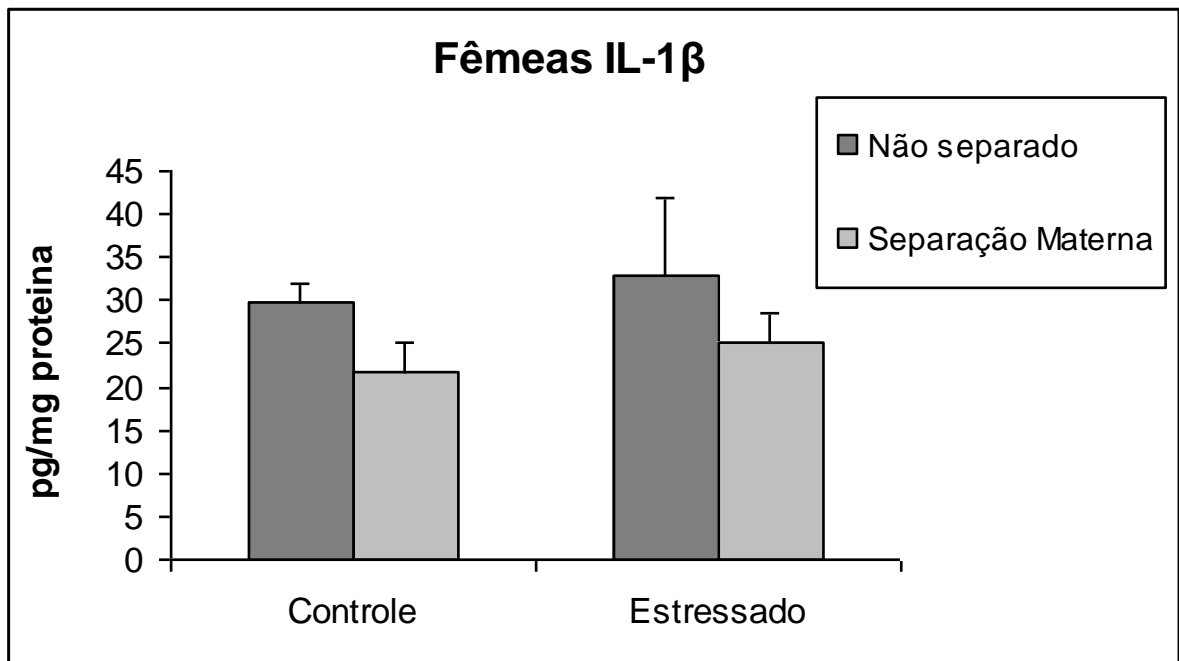
Foram medidas usando *Kits* comerciais por ELISA. Para essas dosagens, os animais foram 8h antes do sacrifício submetidos a um estresse agudo por choque nas patas (3 choques de 0,5mA).

1.9.1 Dosagem das citocinas inflamatória (hipocampo de ratos machos e fêmeas):

1.9.1.1 Interleucina IL-1: Apesar de não haver efeito da Separação Materna, houve efeito do Sexo e interação Estresse X Sexo, diminuindo os níveis de interleucina (IL-1) nos machos. Sexo - [F (1,20) = 7,673; $P < 0,05$]; Estresse X Sexo - Estresse - [F (1,20) = 4,872; $P < 0,05$].

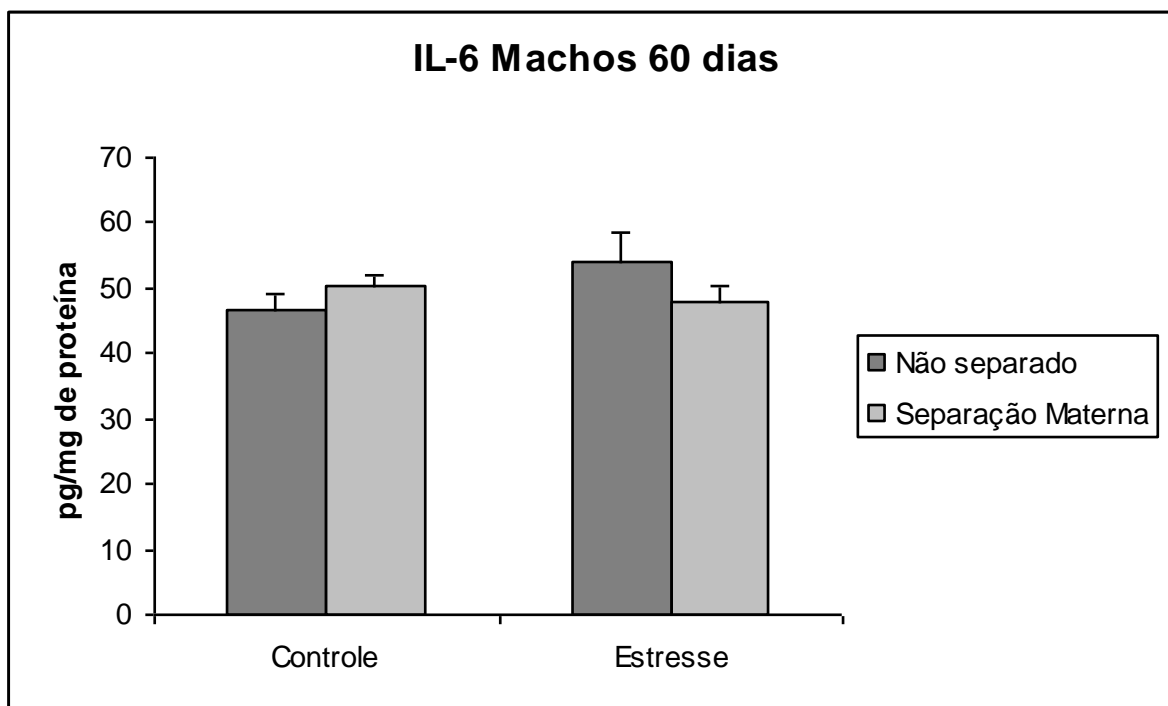


Sem efeito da separação materna. A estatística utilizada foi ANOVA de duas vias.

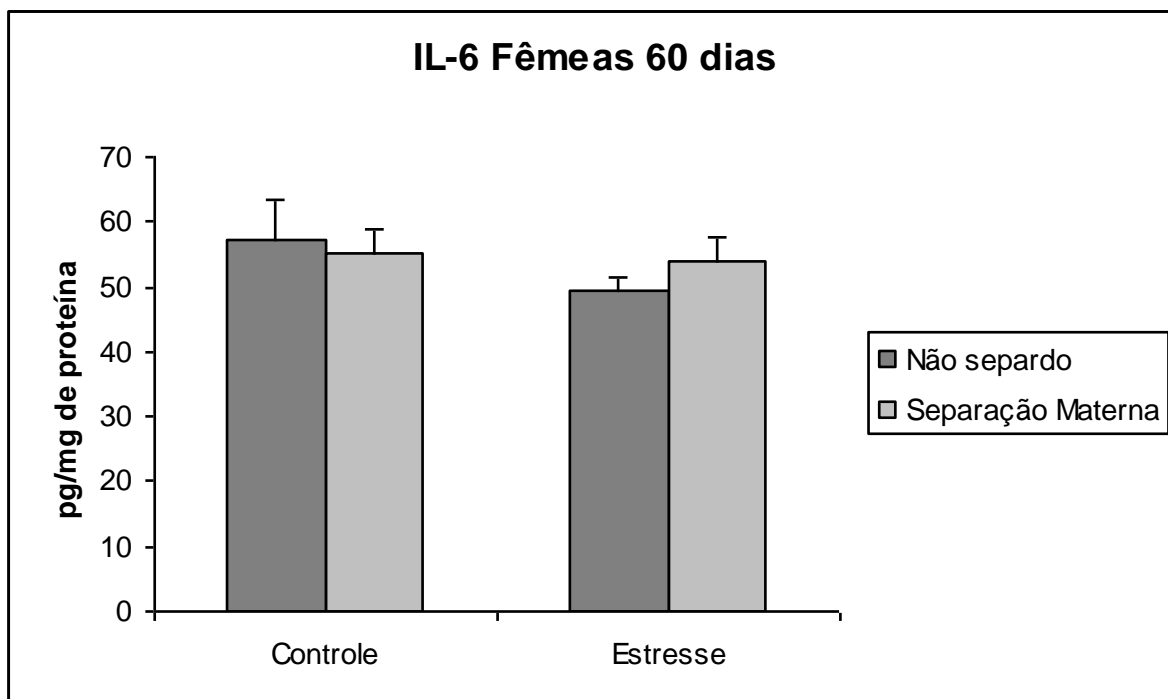


Sem efeito da separação materna. A estatística utilizada foi ANOVA de duas vias.

1.9.1.2 Interleucina IL-6

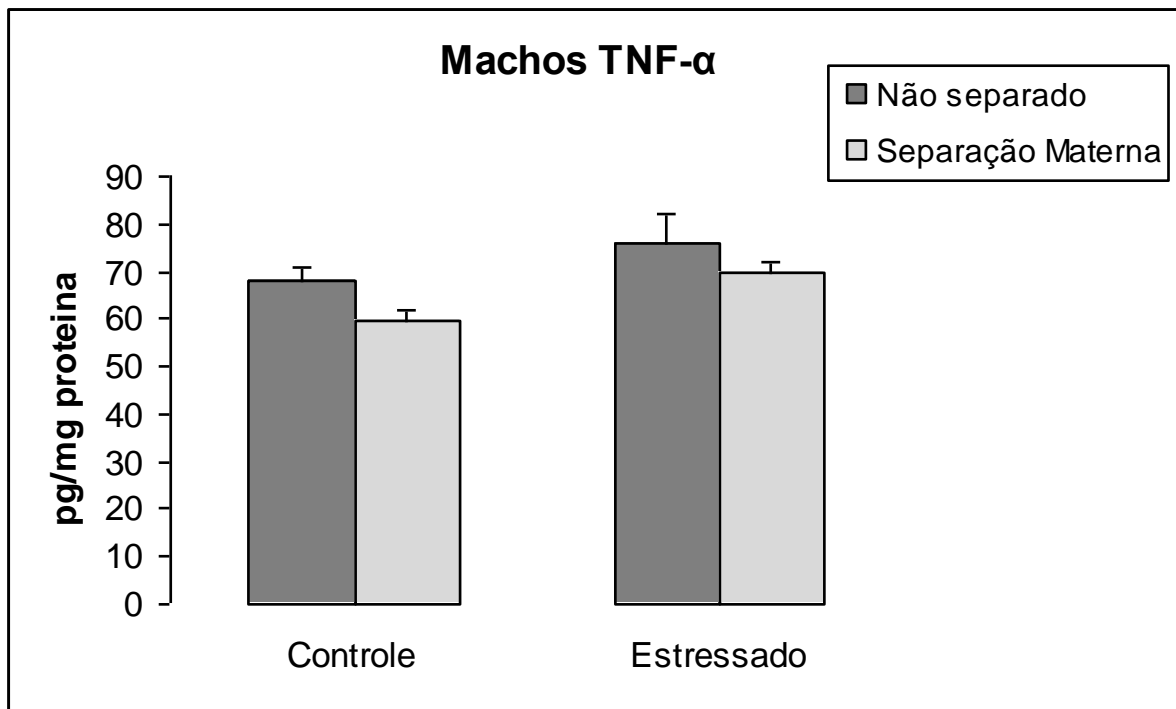


Sem diferença significativa entre os grupos. A estatística utilizada foi ANOVA de duas vias.

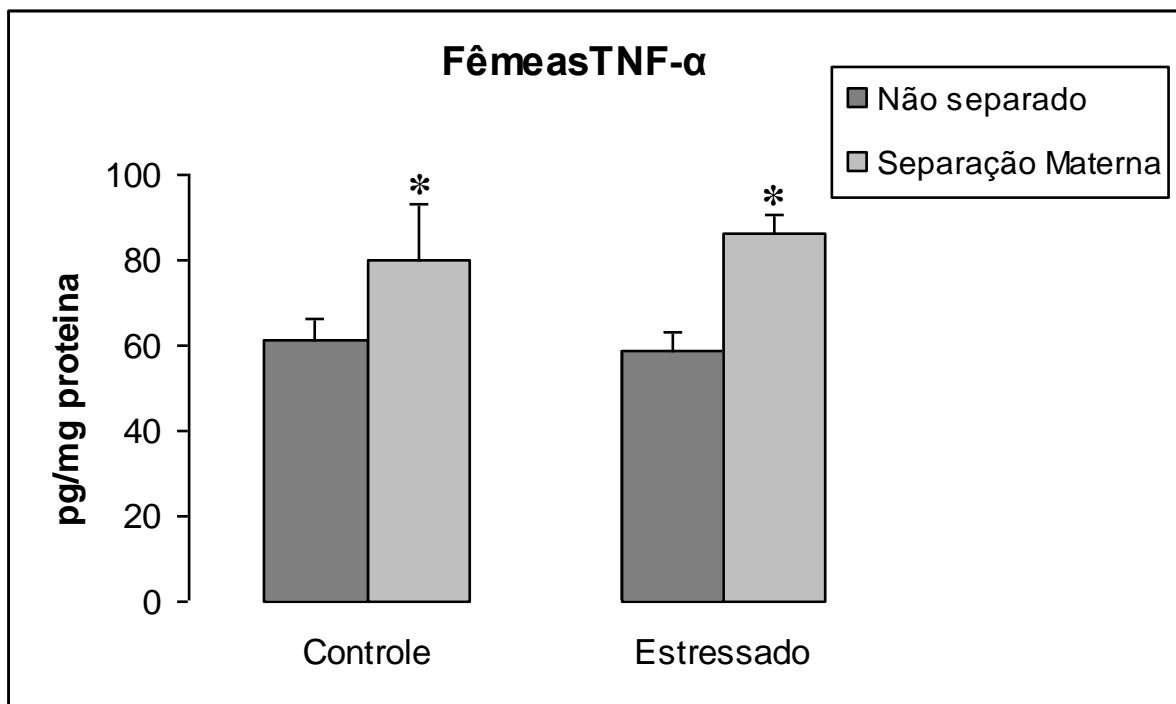


Sem diferença significativa entre os grupos. A estatística utilizada foi ANOVA de duas vias.

1.9.1.3 TNF- α

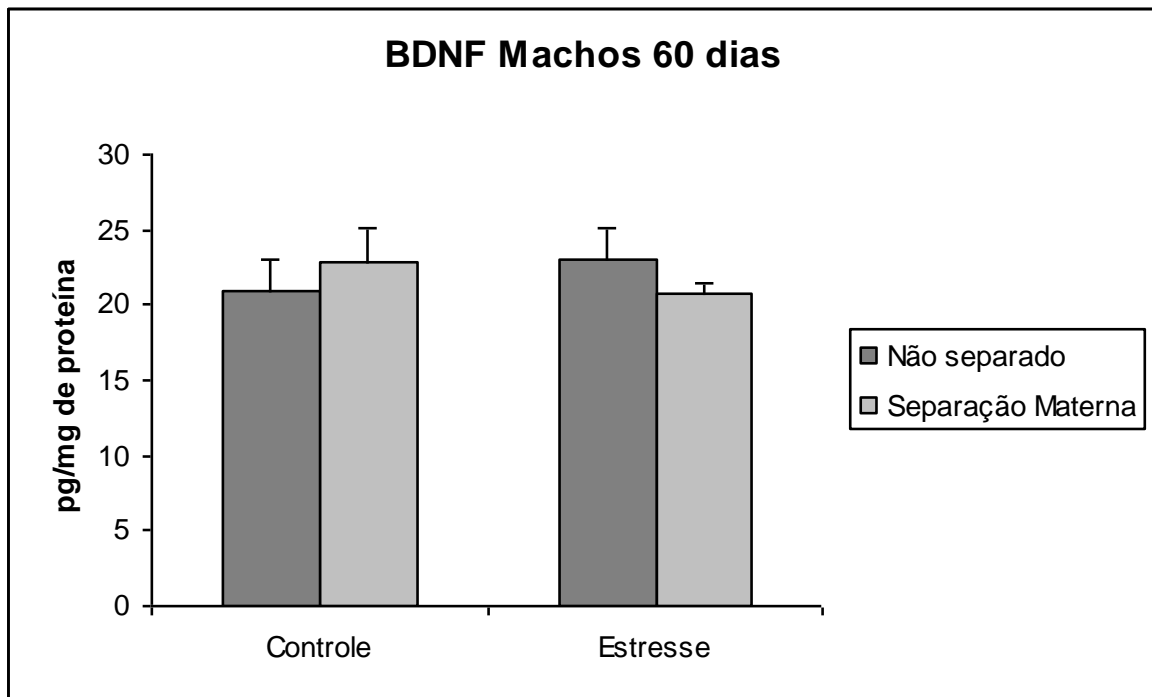


Efeito marginal da separação materna e efeito do estresse agudo por choque nas patas. Separação Materna - [F (1,20) = 4,00; P = 0,06]; Estresse - [F (1,20) = 6,55; P < 0,05].

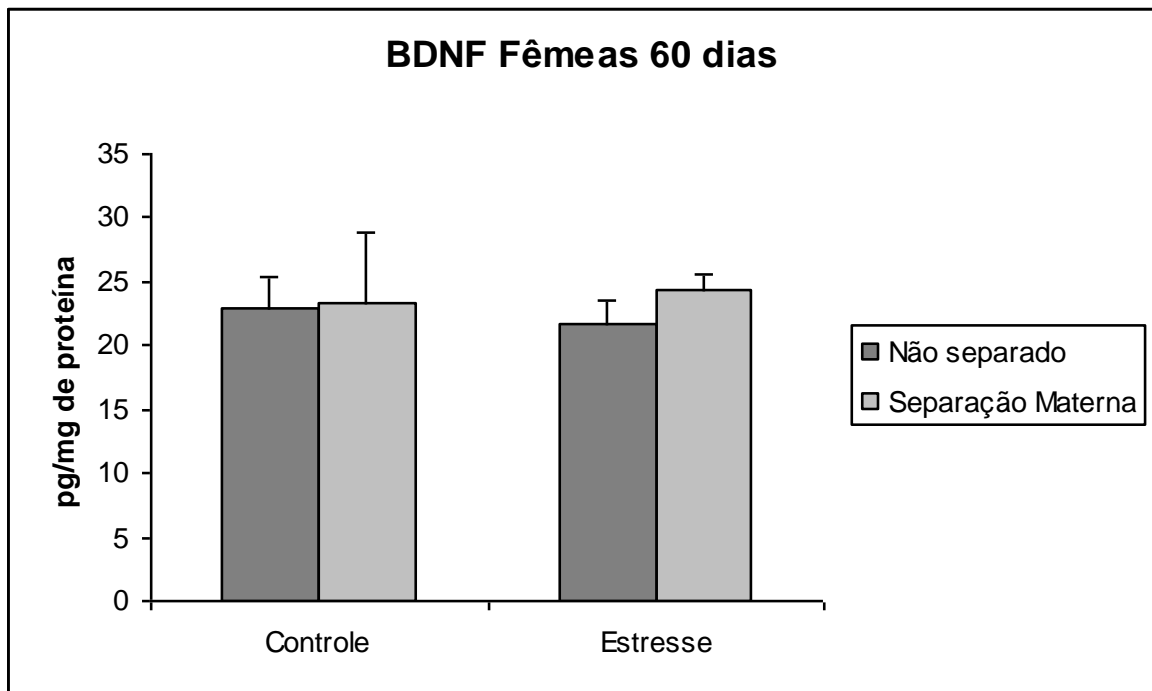


Efeito da separação materna. Separação Materna - [F (1,20) = 9,02; P < 0,05].

1.9.1.4 BDNF



Sem diferença significativa entre os grupos. A estatística utilizada foi ANOVA de duas vias.



Sem diferença significativa entre os grupos. A estatística utilizada foi ANOVA de duas vias.

4. Discussão Geral

Interações genéticas e ambientais regulam os mecanismos neurais envolvidos no desenvolvimento de determinados comportamentos. Experiências sensoriais no início da vida pós-natal podem afetar o desenvolvimento neural e o comportamento de um animal adulto. Estímulos estressantes são algumas das influências ambientais que podem modificar o desenvolvimento neural (GONZÁLEZ *et al.*, 1990).

Recém-nascidos prematuros ou com baixo peso são mais vulneráveis a situações de estresse e mesmo com a implementação de melhorias no atendimento em unidades de tratamento intensivo para neonatos, este grupo continua apresentando um alto índice de mortalidade (14,2 bebês com menos de 28 dias vão a óbito a cada 1000 nascimentos no Brasil - RIPSA, 2007).

Muitos estudos já mostraram que intervenções no período neonatal causam alterações nos sistemas nervoso, cardiovascular, respiratório e endócrino-metabólico, além de alterações comportamentais que podem ser observadas na vida adulta (LEVINE, 1994). E diante disso, a estimulação neonatal é um dos modelos experimentais usados em animais que nos permite avaliar os efeitos que essas manipulações podem acarretar nos sistemas neurais dos filhotes. Sabe-se que intervenções feitas no período neonatal influenciam na relação da mãe com os filhotes. A mãe assume comportamentos (como aumento ou diminuição dos cuidados, principalmente o comportamento de lambar seus filhotes) que afetam o desenvolvimento do sistema nervoso dos seus filhotes (LEVINE, 1994). Assim, experimentos nesta área são de grande importância para futuramente relacionarmos eventos adversos na infância com o aparecimento de algumas patologias.

O eixo HHA tem uma regulação extremamente fina no período pré e pós-natal imediato, possuindo alta plasticidade. Distúrbios no padrão normal de secreção de glicocorticoides nesse período crítico podem alterar de forma definitiva as respostas do

organismo ao estresse (LEVINE *et al.*, 1967). As duas primeiras semanas de vida de um rato constituem o chamado Período Hiporresponsivo ao Estresse (SAPOLSKY *et al.*, 1986). Durante essa fase, a resposta do eixo HHA a estímulos nocivos é reduzida, ou seja, há uma exacerbação do mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticoides na hipófise e diminuição da sensibilidade da adrenal ao hormônio adrenocorticotrópico (YOSHIMURA *et al.*, 2003) e embora “hiporresponsivos”, esses animais respondem agudamente ao estresse de separação da mãe mesmo se não expostos a nenhum estressor adicional. A Separação Materna (SM) foi o modelo experimental utilizado neste estudo e ela consiste em separar os filhotes, durante períodos mais prolongados (mais de 30 min.) (LIU *et al.*, 1997). No nosso trabalho, os animais foram separados de suas mães 3h/dia dos dias 1 ao 10 de vida. A separação por períodos mais longos, como a utilizada no presente trabalho, leva a uma resposta exagerada ao estresse (LEVINE, 2005).

O distúrbio dessa interação mãe-filhote promove uma série de respostas comportamentais e fisiológicas que incluem mudanças na temperatura corporal, na locomoção, na frequência cardíaca e na reação emocional (HINDE *et al.*, 1971). Foi demonstrado que, além de mudanças fisiológicas, há alterações bioquímicas em animais que sofreram separação materna, tais como redução da atividade da ornitina descarboxilase e dos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) em certas regiões cerebrais (SHAMBERG *et al.*, 1985). Separações maternas mais prolongadas (por cerca de 180 minutos, como a realizada neste trabalho) produzem uma diminuição da concentração dos receptores de glicocorticoides no hipotálamo, córtex frontal e hipocampo (LIU *et al.*, 1997). Os estudos acima nos indicam que a diferenciação dos sistemas de receptores para glicocorticoides em determinadas regiões do sistema nervoso é sensível a uma variedade de sinais ambientais durante o período

pós-natal, ou seja, o ambiente na fase neonatal pode determinar a responsividade do eixo HHA ao estresse por toda a vida do animal.

A etiologia dos transtornos de ansiedade e alterações em comportamentos sociais é complexa e multifatorial, envolvendo fatores biológicos, psicológicos (disfunções cognitivas e eventos condicionadores) e sócio-ambientais que interagem permanentemente entre si. A presença de transtorno de ansiedade na infância está associada com história familiar de transtornos psiquiátricos. Estudos com gêmeos apontam para o risco inato de desenvolvimento de ansiedade patológica (MIDDELDORP *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c), demonstrando o papel importante desse fator. Esses estudos também sugerem alta correlação para fatores de risco genético envolvendo ansiedade e depressão (HUDSON *et al.*, 2002).

Outro fator de risco ambiental bem documentado para o desenvolvimento de psicopatologia é a presença de trauma. O significado do trauma e suas repercussões psíquicas e psicopatológicas na vida de um indivíduo vêm sendo estudado e caracterizado ao longo dos anos. Manfro e cols (1996) examinaram a frequência de eventos vitais estressores em 223 pacientes no ano anterior ao desenvolvimento do transtorno do pânico (TP). O estudo descreve que 80% dos pacientes com TP apresentaram eventos estressores e estes pacientes com eventos precipitantes também referem mais ansiedade na infância e comorbidade com depressão na vida adulta em comparação com os pacientes sem evento estressor, sugerindo uma incapacidade de lidar com conflitos desde a infância e maior morbidade na vida adulta. Dentre os possíveis maus tratos, o abuso e negligência emocionais apresentaram uma maior susceptibilidade ao aparecimento de sintomas de ansiedade, depressivos e somáticos observados nas mulheres (MANFRO *et al.*, 1996).

Em nosso trabalho anterior (DIEHL *et al.*, 2007) a separação materna causou um aumento nas respostas ao estresse, como o aumento na liberação de glicocorticoides. Outros resultados interessantes que encontramos é que animais separados no período neonatal apresentavam aumento do comportamento do tipo ansioso e que essa alteração era sexo-específica, ratos machos demonstravam-se mais ansiosos na tarefa do campo aberto. Seriam essas alterações advindas de um aumento do dano hipocampal?

A partir desse questionamento, hipotetizamos que a separação materna poderia levar a prejuízos cognitivos os quais poderiam depender do tipo de memória a ser avaliada. Também questionamos se animais separados no período neonatal, por apresentarem aumento do comportamento do tipo ansioso, poderiam também apresentar alterações no comportamento social e que essas alterações estariam relacionadas a uma maior susceptibilidade do sistema nervoso central a insultos. Para averiguar essas possibilidades, realizamos no presente trabalho diversos experimentos e dosagens, como: privação de oxigênio e glicose (POG) no hipocampo, medidas de estresse oxidativo na amígdala (como atividades das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase), quebras do ADN no hipocampo e sangue, através da técnica de ensaio cometa, análise de citocinas inflamatórias no hipocampo (IL-6, IL-1 β , TNF- α), análise de BDNF no hipocampo e níveis do hormônio ocitocina no líquido.

No capítulo 1 deste trabalho, comparamos machos e fêmeas, separados das mães no período neonatal sobre a memória de medo condicionado ao contexto na idade adulta, analisamos o efeito da separação materna sobre a atividade da enzima Na⁺,K⁺,ATPase na amígdala e sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo [determinação da atividade das enzimas Glutathione Peroxidase (GPx – medida pela oxidação do NADPH), Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT – pela degradação do peróxido de hidrogênio)] na amígdala.

O medo condicionado ao contexto é uma tarefa que envolve dois processos: representação neural (cognitiva), do espaço (contexto) e da associação entre o estímulo aversivo (choque) com o contexto e nesses processos está a participação hipocampal e da amígdala (CENQUIZCA & SWANSON, 2007; LeDOUX, 2000; MAREN, 2001). A enzima Na^+ , K^+ -ATPase é responsável por manter o potencial de membrana necessário para a excitabilidade neural e tem um importante papel em mecanismos de aprendizado, observado em processos de consolidação da memória na tarefa de Esquiva Inibitória, por exemplo (ERICINSKA & SILVER, 1994; SWANN *et al.*, 1982). Quanto ao estresse oxidativo, evidências indicam que ele e espécies reativas ao oxigênio estão envolvidos na inibição dessa enzima bem como nos mecanismos de modulação da memória (WANG *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004).

Nossos resultados sugerem a importância de um ambiente adequado nas fases iniciais da vida sobre mecanismos de programação do medo. Uma vez que os nossos resultados mostraram que os ratos separados da mãe no período neonatal são mais propensos a expressar ansiedade, sugerimos que estes animais possam ter uma resposta aumentada a um estímulo estressante (como o choque nas patas aplicado na tarefa de medo condicionado ao contexto), causando uma facilitação do aprendizado. Por outro lado, a análise da memória de medo condicionado ao contexto na idade adulta durante a exposição às sessões subsequentes não indica interação significativa entre o tempo e a separação materna, e todos os grupos mostraram congelamento reduzido, indicando uma possível extinção da memória nestes animais.

Portanto, podemos atribuir o aumento do congelamento em cada sessão de teste nestes animais (mesmo uma semana após a tarefa comportamental) a uma maior reatividade a estímulos aversivos (RODRIGUES *et al.*, 2009). Sabe-se que a amígdala é uma importante estrutura envolvida nas respostas de medo. Os efeitos encontrados no

presente trabalho podem estar associados com o aumento da atividade da amígdala causada pela separação materna (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Neste estudo, não foram observadas maiores alterações quanto ao estresse oxidativo na amígdala. No entanto, é possível que outras estruturas possam estar envolvidas e as conclusões sobre o estresse oxidativo não parecem explicar os dados comportamentais.

Uma experiência estressante nas fases iniciais da vida, tais como a separação materna, pode aumentar a atividade na amígdala (como apontado pelo aumento da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase), afetando comportamentos relacionados ao medo na idade adulta, e esse efeito pode ser específico para uma determinada tarefa. Este paradigma experimental é, portanto, um importante modelo para o estudo da fisiopatologia dos transtornos de ansiedade e para contribuir para o esclarecimento de futuras abordagens terapêuticas. Portanto, alterações na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase e no estresse oxidativo poderiam estar envolvidos na vulnerabilidade/resiliência a transtornos de ansiedade induzidos por experiências estressantes em fases iniciais da vida como propomos neste estudo.

A ocitocina, um hormônio neuro-hipofisário tem funções importantes no SNC, principalmente em modular comportamentos, como sexual, social, afetivos e memória social.

Em ratos, durante o período neonatal até aproximadamente o 14º dia de vida, os níveis de glicocorticoides permanecem baixos e o filhote apresenta o HHA imaturo, incapaz de responder adequadamente aos estímulos estressantes, então a mãe participa na regulação dos sistemas fisiológicos da prole.

Desta forma, alterações no comportamento maternal podem induzir modificações epigenéticas nos filhotes. A estimulação tátil oriunda da mãe durante a

primeira semana de vida parece ter uma importante função em estabelecer fenótipos estáveis no comportamento da ninhada (KAFFMAN & MEANEY, 2007).

Os comportamentos de cheirar o corpo e a região anogenital bem como perseguir o novo indivíduo são considerados comportamentos de investigação social (BIELSKY & YOUNG, 2004). Os mecanismos neurotransmissores envolvidos na memória social incluem a ocitocina. Este neuropeptídeo quando liberado em determinadas regiões do SNC é crucial para que haja o reconhecimento social e comportamento sexual.

Considerando o desenvolvimento dos roedores, eventos estressantes que acontecem nas fases iniciais da vida podem afetar sistemas neurais e comportamentos. As principais consequências nas variações do ambiente perinatal podem ser observadas na migração neuronal e nos níveis ou liberação de neuropeptídeos, induzindo desequilíbrios nas relações sociais.

Assim sendo, no 2º capítulo desse trabalho avaliamos o efeito da separação materna no período neonatal na tarefa de interação social na idade adulta em ratos machos e fêmeas e o efeito da separação materna no período neonatal sobre os níveis do hormônio ocitocina no líquido também em ratos adultos machos e fêmeas. No nosso trabalho encontramos alterações na tarefa de interação social mostrando um efeito da separação materna sobre diversos comportamentos. Os ratos separados da mãe no período neonatal apresentam diminuição no comportamento de cheirar o parceiro, bem como em comportamentos agressivos ofensivos e defensivos (ataque lateral e ataque frontal, respectivamente) e comportamento de boxear o parceiro. Ademais, apresentam também maior tempo total de ausência de comportamento social em relação aos animais controles. Quanto ao efeito do sexo, os animais machos em todos os comportamentos, tanto os separados da mãe no período neonatal quanto os controles apresentam mais

comportamentos sociais, em especial comportamentos do tipo agressivo, do que as fêmeas. Adicionalmente, encontramos que a separação materna também levou a uma tendência na diminuição da ocitocina no líquido. Uma vez que este hormônio apresenta papéis-chaves em comportamentos sociais e afiliativos, sugerimos que esse resultado da ocitocina possa ser relacionado ao prejuízo no desempenho dos animais separados no teste de interação social.

Conclui-se assim, que, a separação materna no período neonatal possa interferir negativamente no estabelecimento de relações sociais na vida adulta, podendo ter como causa uma alteração no sistema ocitocinérgico central destes animais.

Quanto aos outros resultados apresentados no terceiro capítulo deste trabalho, discutem-se os efeitos prejudiciais da separação materna sobre parâmetros cognitivos, assim como possíveis influências neuroquímicas no hipocampo, uma estrutura chave envolvida nos processos de aprendizado e memória, especialmente em tarefas espaciais.

Quanto às tarefas comportamentais, foram observadas alterações na memória do tipo espacial (no labirinto aquático de Morris) e memória de curta duração (na tarefa de Reconhecimento de Objetos). Os animais submetidos à separação materna no período neonatal, especialmente os ratos machos, apresentaram prejuízo nestas tarefas. Diferentemente, as fêmeas separadas não apresentaram prejuízo na tarefa de Reconhecimento de Objetos. De forma semelhante ao relatado em nosso trabalho anterior (DIEHL *et al.*, 2007), também encontramos no presente estudo prejuízos sexo-específicos da separação materna, sendo que os machos separados novamente apresentaram os maiores comprometimentos comportamentais. Tais resultados diferem daqueles apresentados na tarefa de medo condicionado ao contexto (que é uma tarefa que envolve conteúdo emocional), em que os animais separados da mãe no período neonatal apresentaram melhor desempenho da memória, o que pode ser explicado por

serem animais que apresentam aumento do comportamento de medo e do tipo ansioso. Assim, os efeitos da separação materna sobre a memória dependem do tipo de tarefa considerada, sendo que o desempenho em relação a memórias emocionais do tipo aversivas é melhor que o desempenho envolvendo reconhecimento de objetos ou memória espacial.

Nesse trabalho, os ratos separados da mãe no período neonatal exibiram alto índice de quebras de ADN no hipocampo os quais podem surgir de processos de reparo ao ADN, cujas quebras não indicam efeitos de lesões permanentes. Ademais, sugerimos que o desempenho prejudicado nas tarefas de memória em ratos separados pode estar relacionado às alterações no hipocampo causadas pela separação materna. No entanto, não foram observadas alterações em fatias de hipocampo submetidas à privação de oxigênio e glicose quanto ao dano celular e à viabilidade mitocondrial. A separação materna não exerceu qualquer efeito sobre este parâmetro.

Estudos têm implicado o cuidado maternal e o período neonatal como sendo responsáveis por alterações nos sistemas de ativação de respostas antiinflamatórias. Modelos de estresse neonatal como a separação materna tem sido relacionada com as principais alterações quanto à ativação de citocinas inflamatórias (BILBO *et al.*, 2006).

Numa infecção ou ferimento, citocinas inflamatórias (IL-1 e a IL-6) e o (TNF- α) são secretados das células imunes ativadas e essas citocinas têm a ação de ativação endógena de pirógenos, ativação dos macrófagos, e co-estimulação de linfócitos T (BILBO *et al.*, 2006). Essas citocinas podem ser reguladas pela ativação central do eixo HHA e conseqüentemente pelos níveis de glicocorticoides que regularão a atividade dessas citocinas por um sistema de retroalimentação negativa, suprimindo a liberação delas. Pensando nesses achados resolvemos dosar citocinas inflamatórias e níveis de BDNF no hipocampo. Porém, não foram encontradas diferenças significativas da

separação materna sobre esses parâmetros. Somente houve efeito da separação materna sobre o aumento nos níveis de TNF- α em fêmeas e um efeito marginalmente significativo de diminuição dessa citocina em machos. De acordo com estudos sobre os papéis do TNF- α no encéfalo, são relatadas funções paradoxais: essa citocina pode ter efeitos tanto protetores quanto tóxicos nos neurônios (PERRY *et al.*, 2002). Quanto aos efeitos protetores, foi demonstrado que o TNF- α pode atuar estimulando neurogênese hipocampal (McCOY & TANSEY, 2008) e promovendo respostas antiapoptóticas e regenerativas em neurônios via receptor TNFR2 (FISCHER *et al.*, 2011). Logo, sugerimos que os possíveis efeitos neuroprotetores do TNF- α no hipocampo estejam comprometidos nos machos separados devido aos níveis marginalmente reduzidos dessa citocina, o que pode ser relacionado aos resultados de quebra aumentada no ADN no hipocampo e nos prejuízos de memória. Portanto, os níveis elevados de TNF- α no hipocampo das fêmeas separadas provavelmente tenham exercido efeitos neuroprotetores, o que pode ser relacionado à falta de prejuízo na tarefa de Reconhecimento de Objetos comparadas aos machos. Ademais, comparando ao nosso estudo anterior (DIEHL *et al.*, 2007), novamente encontramos efeitos neuroquímicos sexo-específicos provocados pela separação materna.

A partir dos resultados discutidos neste trabalho, podemos pensar que, em busca do entendimento destas questões relativas ao trauma nos transtornos mentais, pode-se inferir que as vivências nas fases iniciais da vida podem ser pelo menos em parte, responsáveis por alterações comportamentais e neuroquímicas observadas na idade adulta. Estressores psicossociais e experiências adversas precoces, assim como a própria psicopatologia parental, contribuem de forma importante para o início e a manutenção de uma grande variedade de transtornos psiquiátricos, incluindo depressão e ansiedade.

5. Conclusões

Modelos animais são importantes para a compreensão da fisiopatologia de doenças e para o desenvolvimento de terapias farmacológicas;

Animais separados da mãe no período neonatal apresentam melhor desempenho em memórias emocionais aversivas, e pior desempenho e memórias de reconhecimento de objetos e memórias espaciais, talvez em função de apresentarem maior ansiedade, sendo possível que estes animais tenham uma resposta aumentada a um estímulo estressante, como o choque nas patas aplicado na tarefa de medo condicionado ao contexto, causando uma facilitação do aprendizado;

A separação materna pode aumentar a atividade na amígdala (como apontado pelo aumento da atividade da Na^+, K^+ -ATPase), afetando comportamentos relacionados ao medo na idade adulta, e esse efeito pode ser específico para uma determinada tarefa.

Não houve efeito da separação materna sobre o estresse oxidativo na amígdala;

A separação materna no período neonatal pode interferir negativamente no estabelecimento de relações sociais na vida adulta, e o sistema ocitocinérgico central pode estar envolvido.

Apesar das limitações inerentes a este tipo de estudo, há razoáveis evidências com relação à hipótese de que intervenções realizadas num período crítico do desenvolvimento, como no período neonatal, podem contribuir para o surgimento de psicopatologias na idade adulta.

Desse modo,

- ◆ A separação materna em um período crítico do desenvolvimento pode funcionar como um fator responsável por alterações cognitivas, respostas emocionais e alterações neuroquímicas observadas na idade adulta;
- ◆ Observamos diferenças dependentes do sexo nesses efeitos.

- ◆ Nossos resultados podem ser utilizados como uma ferramenta para mostrar como um ambiente saudável é fundamental para que haja um desenvolvimento saudável e para mostrar como são necessárias melhores políticas de saúde mental para as crianças, no sentido de pensarmos em prevenção e promoção da saúde.

6. Referências

AISA, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., Ramirez, M.J. Effects of maternal separation on hypothalamic–pituitary–adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience*. 2008. 154:1218–1226.

ALLEN, R.G. Free radicals and differentiation: the interrelationship of development and aging. In: Yu. B.P., Ed. *Free radicals in aging*, Boca Raton. 1993. p: 12-23.

AMICO, J.A., Mantella, R.C., Vollmer, R.R., Li, X. Anxiety and stress responses in female oxytocin-deficient mice. *J. Neuroendocrinol.* 2004. v. 16, p. 319-324.

AVITSUR, R., Hunzeker, J., Sheridan, J.F. Role of early stress in the individual differences in host response to viral infection. *Brain Behav Immun.* 2006. 20(4):339-48.

BARTOVA, A. Functioning of the hypothalamo-pituitary-adrenal system during postnatal development in rats. *Gen Comp Endocrinol.* 1968. 10, 2, p. 235-239.

BARNETT, S.A., Burn, J. Early stimulation and maternal behaviour. *Nature*. 1967. 14;213(5072):150-2.

BIELSKY, I.F., Young, L.J. Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides*. 2004. 25(9):1565-74.

BILBO, S.D., Rudy, J.W., Watkins, L.R., Maier, S.F. A behavioural characterization of neonatal infection-facilitated memory impairment in adult rats. *Behav. Brain Res.* 2006. 169 39–47.

CALDJI, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 28;95(9):5335-40.

CÁRDENAS, A., Moro, M.A., Hurtado, O., et al. *J Neurochem* 2000. 74:2041.

CARRASCO, A.C., Van De Kar, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharm.* 2003. 463: 235-272.

CENQUIZCA, L.A., Swanson, L.W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev.* 2007. 56(1):1-26.

CHAMPAGNE, F.A., Meaney, M.J. Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. *Prog Brain Res.* 2001. 133:287-302.

CHAMPAGNE, F.A., Meaney, M.J. Transgenerational effects of social environment on variations in maternal care and behavioral response to novelty. *Behav Neurosci.* 2007. 121(6):1353-63.

CHAMPAGNE, F.A. Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Front Neuroendocrinol.* 2008. 29(3):386-97.

CONSIGLIO, A.R., Lucion, A.B. Lesion of hypothalamic paraventricular nucleus and maternal aggressive behavior. *Physiol. Behav.* 1996. v. 59, p. 591-596.

CONSIGLIO, A.R. Depression under the perspective of oxytocin. *CNS Agents in Medical Chemistry.* 2006. v. 6, p. 293-310.

DALLMAN, M.F., Akana, S.F., Scribner, K.S., Pecoraro, N., La Fleur, S.E., Houshyar, H., Gomez, F. Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2004. 1018, p.141-150.

de KLOET, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joels, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev.* 1998. 19, 3,p. 269-301.

DEZATEUX, C., Lum, S., Hoo, A.F., Hawdon, J., Costeloe, K., Stocks, J. Low birth weight for gestation and airway function in infancy: exploring the fetal origins hypothesis. *Thorax.* 2004. 59(1):60-6.

DIEHL, L.A., Silveira, P.P., Leite, M.C. et al. Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. *Brain Res.* 2007. 1144:107–116.

ELENKOV, I. J., Chrousos, G. P. Stress System – Organization, Physiology and Immunoregulation. *Neuroimmunomodulation.* 2006. 13: 257-267.

ENGLER, O., Pham, T., Fullenon, M.J., Ooi, G., Funder, J.W., Clarke, I.J. Studies of the secretion of corticotropin releasing factor and arginin vasopressin into hypophyseal portal circulation of the concius sheep. *Neuroendocrinol.* 1989. 49, p. 367-381.

ERICINSKA, M., Silver, I.A. Ions and energy in mammalian brain. *Neurobiology.* 1994. 43:37–71.

FISCHER, R., Maier, O., Siegemund, M., Wajant, H., Scheurich, P., Pfizenmaier, K.. A TNF Receptor 2 Selective Agonist Rescues Human Neurons from Oxidative Stress-Induced Cell Death. *PLoS ONE.* 2011. 6(11): e27621.

FONTELLA, F.U., Siqueira, I.R., Vasconcellos, A.P.S., Tabajara, A.S., Netto, C.A., Dalmaz, C. Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. *Neurochem Res.* 2005. 30, 1, p. 105–111.

FRANCIS, D., Diorio, J., LaPlante, P., Weaver, S., Seckl, J.R., Meaney, M.J. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. Moms, pups, stress, and glucocorticoid receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1996. 20, 794, p. 136-152.

FRANCIS, D.D., Meaney, M.J. Maternal care and the development of stress responses. *Cur Op Neurobiol.* 1999. 9, (1), p. 128-134.

GIMPL, G., Fahrenholz, F. Different signaling molecules responsible for IL-1 β -induced oxytocinergic and vasopressinergic neuron activation in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Physiol. Rev.* 2005. v. 81, n. 2, p. 629-683.

GIOVENARDI, M., Padoin, M.J., Cadore, L.P., Lucion, A.B. Hypothalamic Paraventricular Nucleus Modulates Maternal Aggression in Rats: Effects of Ibotenic Acid Lesion and Oxytocin Antisense - From behavior to gene expression. *Physiol. Behav.* 1998. v. 63, n. 3, p. 351-359.

GIOVENARDI, M., Consiglio, A. R., Barros, H. M. T., Lucion, A. B. Pup age and aggressive behavior in lactating rats. *Braz. J. Méd. Res.* 2000. 33: 1083-1088.

GONZÁLEZ, A.S., Rodriguez Echandia, E.L., Cabrera, R., Foscolo, M.R., Fracchia, L.N. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. *Physiology & Behavior.* 1990. 47, 4, p. 735-741.

GUTMAN, D.A. & Nemeroff, C.B. Neurobiology of early life stress: rodent studies. *Semin Clin Neuropsychiatry.* 2002, 7, p. 89–95.

HALLIWELL, B., Gutteridge J.M. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet.* 1984. 23; 1(8391):1396-7.

HALLIWELL, B., Cross, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994.102 Suppl 10:5-12.

HALTMEYER, G.C., Denenberg, V.H., Thatcher, J., Zarrow, M.X. Response of the adrenal cortex of the neonatal rat after subjection to stress. *Nature*. 1966. 17, 212, p. 1371-1373.

HARLOW, H.F., Zimmermann, R.R. *Science*. 1959. 130 (3373):421-32.

HERMAN J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., Cullinan, W.E. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. 2003. 24, (3), p. 151-180.

HERMAN, J. P., McKivern, J. M., Solomon, M. B., Carvalho-Neto, E., Myers, B. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz J Med Bio Res*. 2012. 45: 292-298.

HINDE, R.A., Spencer-Booth, Y. Effects of brief separation from mother on rhesus monkeys. *Science*. 1971. 9, 992, p. 111-118.

HOFER, M.A., Brunelli, S.A., Shair, H.N. Potentiation of isolation-induced vocalization by brief exposure of rat pups to maternal cues. *Dev Psychobiol*. 1994. 27(8):503-17.

HUDSON, J.L., Rapee, R.M. Parent-child interactions in clinically anxious children and their siblings. *J Clin Child Adolesc Psychol*. 2002. 31(4):548-555.

INSEL, T. R., Young, L. J. Neuropeptides and the evolution of social behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. 10: 784-789.

IVELL, R., Balvers, M., Bathgate, R., Einspanier, A. Oxytocin and male reproductive function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997. v. 424, p. 253-264.

JEZOVÁ, D., Skultétyová, I, Tokarev, D.I., Bakos, P., Vígás, M. Vasopresin and Oxytocin in Stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1995. 771: 192-293.

JOELS, M., Baram, T. Z. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci.* 2009. 10: 459-466.

KAFFMAN, A., Meaney, M.J. 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

KALINICHEV, M., Easterling, K.W., Plotsky, P.M., Holtzman, S. 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), p. 131-140.

KEHRER, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 2000. 14; 149(1):43-50.

KOJIMA, S., Stewart, R.A., Demas, G.E., Alberts, J.R. Maternal Contact Differentially Modulates Central and Peripheral Oxytocin in Rat Pups During a Brief Regime of Mother-Pup Interaction that induces a Filial Huddling Preference. *J Neuroendocrinol.* 2012. 24(5):831-40.

KOPIN, I.J. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. *Ann. New York Acad. Sciences.* 1995. 771, p. 19-30.

KUHN, C.M., Schanberg, S.M. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *Int J Dev Neurosci.* 1998. 16(3-4):261-70.

LeDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 2000. 23:155-84.

LEE, J.H., Kim, H.J., Kim, J.G., Ryu, V., Kim, B.T., Kang, D.W., Jahng, J.W. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res.* 2007. 58:32–39.

LEVINE, S., Haltmeyer G.C., Karas, G.C., Denenberg, V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav.* 1967. 2, p. 55-59.

LEVINE, S. The psychoendocrinology of stress. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1993. 29, 697, p. 61-69.

LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994. 30, 746, p. 275-288.

LEVINE, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2005. 30, (10), p. 939-946.

LIMA, M. N., Laranja, D. C., Caldana, F., Bromberg, E., Roesler, R., Schroder, N. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp Gerontol*. 2005. 40, (6), p. 505-511.

LIU, J., Wang, X., Mori, A. Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: effect of treatment with reduced glutathione. *Int J Biochem*. 1994. 26(4):511-7.

LIU, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 1997. 12, 5332, p.1659-1662.

MANFRO, G.G., Otto, M.W., McArdle, E.T., Worthington, J.J., Rosenbaum, J.F., Pollack, M.H. 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):135-139.

MANOLI LP, Gamaro GD, Silveira PP, Dalmaz C. Effect of chronic variate stress on thiobarbituric-acid reactive species and on total radical-trapping potential in distinct regions of rat brain. *Neurochem Res.* 2000. 25(7):915-21.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annual Review of Neuroscience.* 2001. 24:897–931.

MARMENDAL, M. Maternal separation in the rat: long-term effects of early life events on emotionality, drug response and neurobiology. 2005. Department of Psychology, Göteborg University, Sweden.

McCOY, M.K. and Tansey, M.G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of Neuroinflammation.* 2008. 5:45.

McEWEN, B.S. Sex, stress and the hippocampus allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging.* 2002. 23, p. 921-939.

McINTOSH, L.J., Sapolsky, R.M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. *Exp Neurol.* 1996. Oct; 141(2):201-6.

McQUILLEN, P.S., Ferriero, D.M. Selective vulnerability in the developing central nervous system. *Pediatr Neurol.* 2004. 30(4):227-35.

MEANEY, M.J., Aitken, D.H., Viau, V., Sharma, S., Sarrieau, A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology*. 1989. 50, 5, p. 597-604.

MEANEY, M.J., Bhatnagar, S., Larocque, S., McCormick, C., Shanks, N., Sharma, S., Smythe, J., Viau, V., Plotsky, P.M. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993. 29, 697, p. 70-85.

MIDDELDORP, C.M., Birley, A.J., Cath, D.C., et al. Familial clustering of major depression and anxiety disorders in Australian and Dutch twins and siblings. *Twin Res Hum Genet*. 2005 (a). 8(6):609-615.

MIDDELDORP, C.M., Cath, D.C., Van Dyck, R., Boomsma, D.I. The co-morbidity of anxiety and depression in the perspective of genetic epidemiology. A review of twin and family studies. *Psychol Med*. 2005 (b). 35(5):611-624.

MIDDELDORP, C.M., Cath, D.C., Vink, J.M., Boomsma, D.I. Twin and genetic effects on life events. *Twin Res Hum Genet*. 2005 (c). 8(3):224-231.

MILLER, D.B., O'Callaghan J.P. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism*. 2002. 51, (6), p. 5-10.

MIRANDA-PAIVA, C. M., Ribeiro-Barbosa, E. R., Canteras, N. S., Felício, L. F. A role for the periaqueductal grey in opioidergic inhibition of maternal behaviour. *Eur. J. Neurosc.* 2003. 18: 667-674.

MOGI, K., Nagasawa, M., Kikusui, T. Developmental consequences and biological significance of mother-infant bonding. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011. 35(5):1232-41.

MOLES, A., Kieffer, B. L., D'Amato, F. R. Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science.* 2004. 304: 1983-1986.

MOORE, C. L., Morelli, G. Mother Rats Interact Differently with Male and Female Offspring. *J. Comp. Physiol. Psychobiol.* 1979. 93: 677-684.

MOORE, C. L., Chadwick-Dias, A. M. Behavioral responses of infant rats to maternal licking: Variations with age and sex. *Dev. Psychobiol.* 1986. 19: 427-438.

MOOSMANN, B., Behl, C. Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: structure activity relationship. *Mol. Pharmacol.* 2002. v. 61, p. 260-268.

MORICEAU, S., Sullivan, R. M. Neurobiology of Infant Attachment. *Dev Psychobiol.* 2005. 47: 230-242.

NELSON, E.E., Panksepp, J. Brain substrates of infant-mother attachment: contributions of opioids, oxytocin, and norepinephrine. *Neurosci. Biobehav.* 1998. v. 22, n.3, p. 437-452.

O'BRIEN, J.T. The 'glucocorticoid cascade' hypothesis in man. *Br J Psychiatry.* 1997. 170, p. 199-201.

OGAWA, T., Mikuni, M., Kuroda, Y., Muneoka, K., Mori, K.J., Takahashi, K. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1994. 49, 961-967.

PARKER, K.J., Buckmaster, C.L., Schatzberg, A.F., Lyons, D.M. Intranasal oxytocin administration attenuates the ACTH stress response in monkeys *Psychoneuroendocrinology.* 2005. v. 30, n. 9, p. 924-929.

PEDERSEN, C.A. Oxytocin control of maternal behavior: regulation by sex steroids and offspring stimuli. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997. v. 807, p. 126-145.

PEDERSEN, A., Boccia, M.L. Oxytocin Links Mothering Received, Mothering Bestowed and Adult Stress Responses. *Stress.* 2002. v.5, 4, pp. 259-267.

PERRY, S.W., Dewhurst, S., Bellizzi, M.J. and Gelbard, H.A. Tumor necrosis factor-alpha in normal and diseased brain: Conflicting effects via intraneuronal receptor crosstalk? *Journal of NeuroVirology*. 2002. 8: 611–624.

PURBA, J.S., Hoogendijk, W.J., Hofman, M.A., Swaab, D.F. Increased number of vasopressin and oxytocin expressing neurons in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus in depression. *Arch. Gen. Psychiatry*. 1996. v. 53, p. 137-143.

QUINCOZES-SANTOS, A., Andreazza, A.C., Nardin, P., Funchal, C., Gonçalves, C.A., Gottfried, C. Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *Neurotoxicology*. 2007. 31.

RAADSHEER, F.C., Hoogendijk, W.J., Stam, F.C., Tilders, F.J., Swaab, D.F. Increased number of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Clinical Neuroendocrinology*. 1994. v. 60, p. 436–444.

RAGGENBASS, M. Vasopressin- and oxytocin-induced activity in the central nervous system: electrophysiological studies using in-vitro systems *Progr. Neurobiol*. 2001. v. 64, p. 307-326.

RIPSA - Rede Interagencial de Informações para a Saúde. IDB-2007. Brasília: RIPSA 2008a. Disponível em <http://www.datasus.gov.br/idb>.

RODRIGUES, S.M., LeDoux, J.E., Sapolsky, R.M. The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu Rev Neurosci.* 2009. 32:289-313.

SANDHIR, R., Julka, D., Gill, K.D. Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol Toxicol.* 1994. 74(2):66-71.

SAPOLSKY, R.M., Meaney, M.J. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Research Reviews.* 1986. 396, 1, p. 64-76.

SAPOLSKY, R.M. The stress-response and the emergence of stress-related disease. IN: *Stress, the aging brain and the mechanisms of neuron death.* 1992. p. 3–9.

SAPOLSKY, R.M., Romero, L., Munck, A. How do glucocorticoids influence the stress-response? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000, 21, p. 55–73.

SELYE, H. A Syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature.* 1936. 138:32.

SHAMBERG, S.M., Kuhn, C.M. The Biochemical effects of tactile deprivation in neonatal rats. *Perspectives on Behavioral Medicine.* 1985. 2, p. 133-148.

SILVA, R.H., Abilio, V.C., Takatsu, A.L., et al. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology*. 2004. 46:895–903.

SILVEIRA, P.P., Portella, A.K., Crema, L., Correa, M., Nieto, F.B., Diehl, L., Lucion A.B., Dalmaz, C. Both infantile stimulation and exposure to sweet food lead to an increased sweet food ingestion in adult life. *Physiol Behav*. 2008. 18;93(4-5):877-82.

SINGHAL, A., Cole, T.J., Fewtrell, M., Deanfield, J., Lucas, A. Is slower early growth beneficial for long-term cardiovascular health? *Circulation*. 2004. 9;109(9):1108-13.

SOTO, N., Bazaes, R.A., Pena, V., Salazar, T., Avila, A., Iniguez, G., Ong, K.K., Dunger, D.B., Mericq, M.V. Insulin sensitivity and secretion are related to catch-up growth in small-for-gestational-age infants at age 1 year: results from a prospective cohort. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003. 88(8):3645-50.

STRASSER, U., Fischer, G. Quantitative measurement of neural degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. 1995. 57:177.

SWANN, A.C., Grant, S.J., Maas, J.W. Brain (Na⁺, K⁺)-ATPase and noradrenergic activity: effects of hyperinnervation and denervation on high-affinity ouabain binding. *J Neurochem*. 1982. 38:836–839.

TSIGOS, C., Chrousos, G.P. Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1994. 23, p. 451-466.

TSIGOS, C., Chrousos, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002. 53, p. 865-871.

UVNÄS-MOBERG, K. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psychoneuroendocrinology.* 1998. v. 23, n. 8, p. 819-835.

VAN LEENGOED, E., Kerker, E., Swanson, H. H. Inhibition of postpartum maternal behavior in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. *Journal of Endocrinology.* 1987. v. 112, p. 275-282.

VASCONCELLOS, A.P., Tabajara, A.S., Ferrari, C., Rocha, E., Dalmaz, C. Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. *Physiol Behav.* 2003. 79(2):143-9.

WALKER, C. D., Deschamps, S., Proulx, K., Tu, M., Salzman, C., Woodside, B., Lupien, S., Gallo-Payet, N., Richard, D. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *Rev Psychiatr Neurosci.* 2004. 29: 364-382.

WANG, X.Q., Xiao, A.Y., Sheline, C., et al. Apoptotic insults impair Na⁺, K⁺-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J Cell Sci.* 2003. 116:2099–2110.

WILKIS, A. S., Logan, M., Kehoe, P. Postnatal Pup Brain Dopamine Depletion Inhibits Maternal Behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997. 58: 867-873.

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, p. 439-445.

YOUNG, L.J., Winslow, J.T., Wang, Z., Gingrich, B., Guo, Q., Matzuk, M.M., Insel, T.R. Gene targeting approaches to neuroendocrinology: oxytocin, maternal behavior, and affiliation. *Horm Behav.* 1997. 31(3):221-31.

7. ANEXOS

7.1 Ilustrações dos Procedimentos Empregados/Utilizados

7.1.1 Estresse Neonatal:



Rata lactante com os filhotes

Ninhada

Ninhadas numa incubadora a 32°C

7.1.2 Aparato utilizado para a tarefa de Medo Condicionado ao Contexto:



Dia 1: Sessão de treino: apresentação de três choques nas patas.

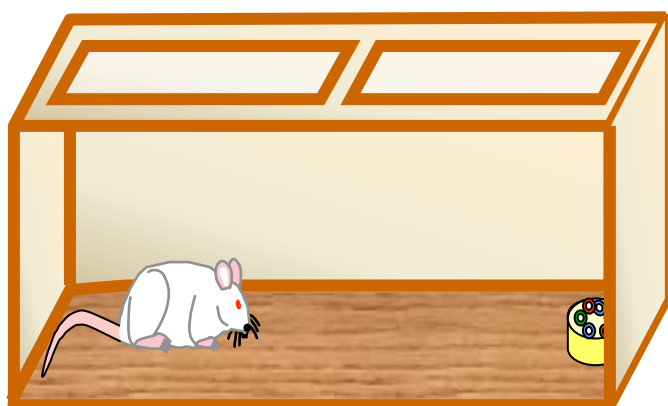
Dia 2: Sessão de Extinção.

Dias 3 e 11: Sessões de teste.

7.1.3 Aparato utilizado para a tarefa de Interação Social:



7.1.4 Esquema representativo do aparato utilizado para verificar o Comportamento Alimentar:



Corredor do Comportamento Alimentar

7.1.5 Tarefa utilizada para avaliar memória espacial - Labirinto Aquático de Morris:



7.1.6 Esquema representativo do aparato para a Tarefa de Reconhecimento de Objetos:

