

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

Francisco Daroda Dutra

**AVALIAÇÃO DA RAZÃO ENTRE OS RECEPTORES
MINERALOCORTICOIDES E GLICOCORTICOIDES, FKBP51 E CITOCINAS
EM ESTRUTURAS CHAVE PARA A RESPOSTA AO ESTRESSE E PARA A
EVOCAÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA REMOTA**

Porto Alegre

2024

Francisco Daroda Dutra

**AVALIAÇÃO DA RAZÃO ENTRE OS RECEPTORES
MINERALOCORTICOIDES E GLICOCORTICOIDES, FKBP51 E CITOCINAS
EM ESTRUTURAS CHAVE PARA A RESPOSTA AO ESTRESSE E PARA A
EVOCAÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA REMOTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientador(a): Prof. Dr. Carla Dalmaç

Porto Alegre

2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, preciso agradecer a Karina por aceitar ser a mulher e parceira de alguém que, viu na carreira de pesquisador uma forma de tentar compreender, explicar e ajudar a enfrentar a desordem pessoal e nesse meio acabou refinando o que hoje é uma missão e ao mesmo tempo linha de pesquisa. Mas, essa é a parte fácil. A difícil, e realizada com maestria, é capacidade de sempre fornecer uma perspectiva otimista, um olhar e comentário atento, ao mesmo tempo em que conduz as demais atividades da própria vida, e principalmente enfrentando e não desistindo frente aos próprios problemas. Agradeço, sobretudo, por poder olhar para o lado e poder me inspirar e orgulhar na formidável parceira que possuo.

Segundamente, agradeço a minha família, por apoiar a carreira que decidi e por estar comigo em momentos não agradáveis que perpassaram esse curto período de mestrado. Principalmente, agradeço a minha mãe, por querer, na medida do possível e, do seu jeito, acreditar que os filhos escolherão o melhor caminho, que eles consideram, certamente essa não é a melhor alternativa para todos, mas, no meu caso, eu não podia ter uma mãe melhor.

Agradeço também a minha orientadora, a prof. Carla, por estar disponível para assimilar meus interesses de pesquisa e se fazer disponível para construirmos juntos um trabalho que faça sentido, mas que também seja relevante. E não poderia deixar de citar, sempre com sua gentil e ao mesmo tempo firme capacidade de conduzir a uma interpretação mais precisa ou a um método mais acurado. E, honrosamente, agradeço ao professor Jorge, que serve de inspiração de novos pesquisadores e, mais do que isso, de professores, dessa forma servindo por diversas vezes de um modelo – e uma fonte inesgotável de conhecimento.

Meus agradecimentos também se estendem aos meus colegas de laboratório, principalmente ao Thiago e suas exímias habilidades, das quais esse trabalho dependeu fortemente, sem as quais não haveria análises bioquímicas (e excelentes treinos!). A Joelma eu sou grato por ter sempre empolgadamente compartilhado um assunto, comentário ou ensinado algo que considerava relevante, além dos incontáveis auxílios sem os quais toda experimentação animal estaria comprometida. A Ariadni, que sempre esteve disponível a ensinar, a realizar e a cumprir com nosso planejamento das análises bioquímicas e que, sem o excepcional auxílio, não seriam realizadas. Assim como aos demais ICs e colegas, os quais fazem e fizeram parte de uma etapa da construção de um cientista, mas mais ainda, do Francisco. Por último, agradeço à CAPES que, através do financiamento da bolsa, oportunizou a condução desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1.INTRODUÇÃO.....	10
1.1. COMO O ESTRESSE MODIFICA, PREPARA E “LIGA” O ORGANISMO PARA UMA MBIENTE CONFRONTÁVEL, E QUANDO ISSO NÃO OCORRE?.....	10
1.2. A EMERGÊNCIA DA PLASTICIDADE: DOS HORMÔNIOS AOS CIRCUITOS E DOS CIRCUITOS AOS HORMÔNIOS.....	12
1.3. A FORMAÇÃO DE MEMÓRIAS FACILITA O ENFRENTAMENTO EM SITUAÇÕES ADVERSAS, POR MECANISMOS AINDA NÃO TOTALMENTE COMPREENDIDOS.....	13
1.4. ESTRESSE E MEMÓRIA: EXPERIÊNCIAS ESTRESSANTES DIFEREM QUALITATIVAMENTE EM COMO SÃO ADQUIRIDAS, CONSOLIDADAS, E EVOCADAS AO LONGO DO TEMPO.....	14
1.5. POSSÍVEIS MECANISMOS MOLECULARES PARA COMO O ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA PODE PREDISPOR A VULNERABILIDADE E INTERFERIR NA MEMÓRIA DE EVENTOS ESTRESSANTES.....	16
1.6. HIPÓTESE.....	17
1.7. RELEVÂNCIA.....	18
1.8. OBJETIVOS.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	19
2.2. ANIMAIS.....	20
2.3. CUIDADOS NA MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	20
2.4. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	20

2.5. DESCARTE DE RESÍDUOS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS.....	21
2.6. ESTRESSE PRECOCE POR SEPARAÇÃO MATERNA.....	21
2.7. EXPERIMENTO COMPORTAMENTAL.....	22
2.7.1. Condicionamento aversivo ao contexto.....	22
2.7.2. Discriminação em um contexto neutro.....	22
2.7.3. Teste remoto da generalização da memória.....	22
2.7.4. Teste remoto de evocação da memória.....	23
2.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	23
2.8.1. Análise do imunoconteúdo de GR, MR e FKBP5.....	23
2.8.2. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA): Interleucina-6, Interleucina 1beta, TNF-alfa.....	24
2.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	25
3. RESULTADOS.....	26
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÃO.....	46
6. PERSPECTIVAS.....	47
7. REFERÊNCIAS.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

SM: Separação Materna.

PrL: Córtex pré-límbico.

FKBP51: Proteína de ligação à FK-506.

GR: Receptor de Glicocorticoides.

MR: Receptor de Mineralocorticoides.

DPN: Dia pós-natal.

HV: Hipocampo Ventral.

HD: Hipocampo Dorsal.

HHA: Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal.

HHG: Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas.

AMPA: ácido-alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxosol-4-propiónico

NMDA: N-Metil D-Aspartato

TNFalfa: Fator de Necrose Tumoral alfa.

IL1beta: Interleucina 1beta.

IL6: Interleucina 6.

CPF: Córtex pré-frontal

CRH: Hormônio Liberador de Corticotropina.

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrópico.

TEPT: Transtorno de Estresse Pós-Traumático.

DG: Dia Gestacional.

CtxA: Contexto A.

Ctx B: Contexto B.

CTRL: Controle.

RESUMO

Indivíduos estressados podem apresentar desfechos adaptativos e maladaptativos, o estresse neonatal por separação materna (SM) é capaz de afetar o desenvolvimento cognitivo e emocional, em que um evento no início da vida pode ter consequências duradouras, modificando estruturas e redes neurais que participam em funções importantes, como a memória e a resposta psicogênica ao estresse. Dentre essas estruturas se destacam o córtex prélimbico (PrL), o hipocampo e a amígdala. A resposta ao estresse utiliza da sinalização de receptores de mineralocorticoides e glicocorticoides para o ajuste neuroendócrino às demandas geradas. Esta sinalização é afetada pelo nível de expressão da FKBP51. Estes receptores têm papel chave na consolidação, evocação de memórias. Neste trabalho se verificou se o estresse por SM é capaz de afetar o congelamento e o fenótipo bioquímico de animais submetidos ao condicionamento aversivo ao contexto, foram testadas a discriminação contextual, generalização e evocação remotas. A SM ocorreu do dia pós-natal 1 até o dia pós-natal 10, com duração de 3 horas/dia. O condicionamento aversivo ao contexto consistia em uma sessão de treino, aproximadamente, no dia pós-natal 70, seguida da exposição a um novo contexto 24 horas depois. O teste de generalização consistia em um teste no contexto da discriminação 28 dias após a aquisição e o teste da memória remota ocorreu 24 horas após o teste da discriminação remota. Se observou que ambos os sexos apresentavam prejuízos na discriminação. No teste de generalização e da memória remota os dados das fêmeas treinadas sugerem o fenômeno da generalização e a reativação. As fêmeas demonstraram maiores TNFalfa e IL1beta no PrL nos grupos SM e treino quando comparadas aos demais. Não foram encontradas diferenças entre os receptores de corticosteroides e da FKBP51 nos grupos. Os dados sugerem que as fêmeas são mais propensas a codificar, consolidar e generalizar uma memória aversiva, assim como podem ter efeitos cumulativos no aumento do TNFalfa e IL1beta no PrL das fêmeas submetidas ao estresse no início da vida e durante a fase adulta.

PALAVRAS-CHAVE

Resposta ao estresse; Receptor de Mineralocorticoide; Receptor de Glicocorticoide; FKBP51; Memória; Diferenças Sexuais.

ABSTRACT

Stressed individuals can present adaptive and maladaptive outcomes, neonatal stress due to maternal separation (SM) can affect cognitive and emotional development, in which an event early in life can have lasting consequences, modifying structures and neural networks that participate in functions such as memory and the psychogenic response to stress. Among these structures, the Prelimbic Cortex (PrL), Hippocampus and Amygdala stand out. The stress response uses the signaling of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors for the neuroendocrine adjustment to the generated demands. This signaling is affected by the expression level of FKBP51. These receptors play a key role in consolidating and recalling memories. In this work, it was verified whether SM stress can affect freezing and the biochemical phenotype of animals submitted to context aversive conditioning. Contextual discrimination, generalization and remote evocation were tested. MS occurred from postnatal day 1 to postnatal day 10, lasting 3h/day. Context-aversive conditioning consisted of a training session on approximately postnatal day 70, followed by exposure to a new context 24 horas later. The generalization test consisted of a test in the context of discrimination 28 days after acquisition and the remote memory test occurred 24 horas after the remote discrimination test. It was observed that both sexes presented impairments in discrimination. In the generalization and remote memory test, data from trained females suggest the phenomenon of generalization and reactivation, respectively. Females showed higher TNFalpha and IL1beta in PrL in the SM and training groups when compared to the other groups. No differences were found between corticosteroid and FKBP51 receptors between groups. The data suggest that females are more likely to encode, consolidate and generalize an aversive memory, as well as having cumulative effects on the increase of TNFalpha and IL1beta in the PrL of females subjected to stress in early life and during adulthood.

KEY WORDS Stress response; Mineralocorticoid Receptor; Glucocorticoid Receptor; FKBP51; Memory; Sexual Differences.

1. INTRODUÇÃO

1.1. COMO O ESTRESSE MODIFICA, PREPARA E LIGA O ORGANISMO PARA UM AMBIENTE CONFRONTÁVEL, E QUANDO ISSO NÃO OCORRE?

A definição de estresse tem sido alvo de constantes atualizações, desde o seu primeiro uso no contexto das biociências. Neste sentido, defini-lo como um fenômeno de ameaça à homeostasia de um organismo ainda contempla o fenômeno, como um todo (LU et al., 2021). Entretanto, ao longo do tempo, se tem diferentes desfechos possíveis para o organismo estressado, com variações em como um organismo pode enfrentar, tolerar, se adaptar ou padecer frente a um estressor (AGORASTOS E CHROUSOS, 2021).

O estresse pode ocorrer ao longo de todo *continuum* da vida de um indivíduo e, pode ser considerado em três principais categorias ou fases de ocorrência: 1) período pré-natal; 2.1) pós-natal precoce; 2.2) infância e adolescência e 3) durante a fase adulta, em que os estressores crônicos e psicológicos são os mais comuns (RIBONI E BELZUNG, 2017; AGORASTOS E CHROUSOS, 2021).

O estresse no período pré-natal tem sido implicado em diversos desfechos negativos para o organismo estressado, desde a uma maior predisposição a transtornos neurológicos, neuropsiquiátricos, comportamentais e metabólicos, o que se postula decorrer da sensibilidade do feto ao ambiente uterino e, por conseguinte, pela fisiologia da mãe (WELLBERG E SECKLE, 2008).

No caso do estresse na vida adulta, os estressores podem ser devidos a eventos traumáticos, geralmente agudos, mas que podem se tornar crônicos e persistentes, e se somarem a outros estressores, geralmente crônicos. Em modelos animais o estresse crônico na vida adulta reduz a neurogênese no hipocampo ventral (HV), além disso, em humanos ele é capaz de aumentar a reatividade da amígdala tanto em condições neutras quanto em resposta a uma ameaça real ou percebida (KIM E KIM, 2019).

Outra característica dos estressores crônicos na vida adulta é a correlação negativa entre a atividade do córtex pré-frontal (CPF) e a amígdala. Associado a isso, os níveis de

glicocorticoides geralmente encontram-se aumentados, predispondo o indivíduo à plasticidade desadaptativa devido ao estresse (KIM E KIM, 2019; SCHOENFELD et al., 2017).

Já o estresse pós-natal precoce, assim como o estresse pré-natal, é capaz de causar a duradoura programação do indivíduo quando comparado aos estressores na vida adulta (BOLTON et al., 2017). Mesmo que ambos sejam capazes de afetar a neuroplasticidade, a magnitude da plasticidade é maior, conforme a estrutura encefálica, no indivíduo que ainda não está maduro (BOLTON et al., 2017). Em humanos, no período pós-natal até o início da fase adulta ocorre a maturação de estruturas relevantes para as funções cognitivas e executivas, em que, no período da infância ainda há a do CPF, a qual geralmente difere de indivíduos que não foram submetidos ao estresse, todavia, no que se refere aos efeitos prejudiciais do estresse, não são todos estudos que apontam nessa direção, em que alguns demonstram o fenômeno da resiliência em alguns desfechos (BOLTON et al., 2017), diferentemente, na fase adulta inicial se sugere que já tenha ocorrido a maturação do CPF (WREN E THOMAS et al., 2016; OLDHAM E FORNITO, 2019). Juntamente, outros estudos apontam para efeitos negativos do estresse na adolescência, sobretudo sobre a proliferação e quantidade de neurônios no hipocampo, assim como em suas propriedades eletrofisiológicas e morfologia, da mesma forma, uma maior parte dos estudos demonstram efeitos prejudiciais em adolescentes submetidos ao estresse (BORSINI et al., 2023).

Tais estruturas neuro-anatômicas se conectam umas com as outras, produzindo modificações morfológicas e funcionais em redes e não restritas a uma única estrutura, após o estresse precoce. Tal efeito pode influenciar em funções cognitivas essenciais, como memória, atenção, motivação, detecção de ameaça, bem como na flexibilidade cognitiva (ARNETT et al., 2015; COHEN et al., 2006; GEE et al., 2013).

Em consonância, a intensidade dos níveis de glicocorticoides no período neonatal é associada a alterações tanto em domínios cognitivos e executivos, além de modificações nas estruturas encefálicas, todavia, é algo que parece depender do período em que o estressor é imposto, bem como as suas características (SMITH et al., 1997). Entretanto, as modificações fenotípicas observadas em organismos que passam pelo estresse neonatal podem ser um desfecho da programação daquele organismo, de modo comportamental, afetivo, cognitivo e social para enfrentar as adversidades (DAUN et al., 2020; SANDI E HALLER et al., 2015).

1.2.A EMERGÊNCIA DA PLASTICIDADE: DOS HORMÔNIOS AOS CIRCUITOS E DOS CIRCUITOS AOS HORMÔNIOS

A formação dos circuitos neurais é influenciada tanto pela experiência estressante, favorecendo a aquisição de uma memória associada ao(s) evento(s) estressante(s) (OZAWA et al., 2016), quanto pela ação dos hormônios associados ao estresse, como os glicocorticoides (DE QUERVAIN et al., 2017). Estes, a depender do local em que atuam e o tipo de receptor em que se vinculam podem, diferentemente, induzir tanto a plasticidade, ou dificultar este processo (DE KLOET et al., 2010).

O estresse mobiliza a ativação do eixo neuroendócrino Hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Entretanto, outros hormônios também são capazes de afetar a plasticidade, tanto no sistema nervoso central, como de todo o organismo, como, por exemplo a atividade do eixo Hipotálamohipófise-gonadal (HHG) (PONZI et al., 2020). Nele, a sinalização hormonal é um dos mecanismos para a determinação das características individuais. Tanto a intensidade da sinalização, o organismo e o período em que ocorrem são fatores que favorecem a variabilidade no fenótipo (PONZI et al., 2020).

A partir dessa perspectiva, de Kloet et al. (1998) propôs que alterações nas vias de sinalização dos receptores para glicocorticoides estavam implicadas na suscetibilidade ou resiliência para o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos. Nesse aspecto, o balanço entre a quantidade de MR e de GR poderiam influenciar no tipo de transtorno e na probabilidade de desfechos negativos ao longo da vida (DE KLOET et al., 1998).

Os mesmos autores, postulam que o conteúdo de receptores é influenciado por dois fatores principais: i) o genótipo do indivíduo, ii) os eventos e ambiente do início da vida, e no período de maior plasticidade do organismo (DE KLOET et al., 2018). No entanto, tanto a expressão quanto a densidade dos receptores também podem ser afetados por eventos durante a idade adulta (KANATSOU et al., 2018).

Em conjunto, o efeito de eventos adversos iniciais sobre os receptores também é influenciado pelo sexo, em que fêmeas demonstram uma redução na expressão do MR após o estresse neonatal, por sua vez, os machos apresentam um aumento (BONAPERSONA et al., 2016). Entretanto, outros autores também demonstram desfechos diferentes, em que a administração de betametasona, um corticosteroide sintético, no período pré-natal é capaz de afetar os níveis de expressão de GR e MR, sobretudo o MR em machos (OWEN et al., 2003).

Além disso, conforme de Kloet et al. (2016), indivíduos deprimidos, ao receberem tratamento farmacológico com agonistas do MR apresentam melhoras nos sintomas depressivos, demonstrando que essa via de sinalização pode ser eficaz neste transtorno.

Dessa forma, o balanço – ou a razão – entre MR:GR mesmo não parece, sozinho explicar os fatores que predispõe a vulnerabilidade e resiliência. Todavia, conforme são adicionados outros mecanismos regulatórios, como os hormônios sexuais, fatores de transcrição, citocinas, mediadores inflamatórios e genes envolvidos, possivelmente, quando somados parecem fornecer um escopo acerca das modificações que configuram a individualidade das respostas ao estresse e as posteriores consequências de eventos estressantes (HARRIS et al., 2013; DE KLOET et al., 2016; DE KLOET et al., 2018).

1.3. AS ETAPAS DA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA E SUA RELAÇÃO COM O ENFRENTAMENTO DE SITUAÇÕES ADVERSAS

A memória se refere a um construto cognitivo, mas também é uma função essencial conservada por todo o escopo filogenético precedente aos humanos, que diz respeito a capacidade de utilizar informações acerca de eventos passados para otimizar a própria sobrevivência (e da espécie) em eventos futuros semelhantes. Inclusive, a memória tem sido alvo de estudos filosóficos e psicológicos há séculos, mas com um aumento considerável no estudo da neurobiologia da memória (MCGAUGH, 2015). Principalmente com a prova de conceito do fenômeno da consolidação (MCGAUGH, 2015).

A memória se postula diferir em seus mecanismos e tipos (IZQUIERDO et al., 1998). Anteriormente, se tinha a hipótese de que a memória de longa duração perfazia um processo temporal para que pudesse, após a sua aquisição e consolidação, ser novamente evocada (DUDAI et al., 2015), enquanto a curta duração da memória seria uma etapa precedente a de longa duração. O processo da formação de memórias de longa duração envolve a síntese de proteínas, diferentemente de memórias de curta duração (IZQUIERDO et al., 1998; DUDAI et al., 2015). Entretanto, a memória per se, dificilmente se torna uma experiência incapaz de ser modificada, mesmo após consolidada (MCKENZIE E EICHENBAUM, 2011). O estudo desse fenômeno, a reconsolidação, foi um dos processos que impulsionaram a percepção da natureza lábil da memória (LEE et al., 2017).

Por outro lado, uma parcela considerável das memórias parece ser transiente, ou seja, fadadas ao enfraquecimento ou modificação e ao esquecimento. Em contrapartida, algumas, especialmente memórias com intensa valência emocional associada apresentam uma maior persistência (RICHARDS E FRANKLAND, 2017). Além disso, também parecem envolver diferentes estruturas de acordo com o momento após a sua aquisição em que são evocadas (MCKENZIE E EICHENBAUM, 2011), corroborando às diversas teorias dos sistemas de memória, como a teoria da consolidação sistêmica (DUDAI et al., 2015), sobretudo pelo envolvimento das estruturas neuro-anatômicas e pela fidedignidade da precisão da memória em relação à experiência durante a aquisição (DUDAI et al., 2015; MCKENZIE E EICHENBAUM, 2011).

Em contraste, a compreensão de como a consolidação sistêmica da memória ocorre ainda não é algo muito bem compreendido, diferentemente do fenômeno da consolidação sináptica (ASOK et al., 2019). Esse fenômeno envolve a formação de uma via de comunicação entre neurônios após a experiência, envolvendo a ativação de receptores para glutamato, ácidoalfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxosol-4-propiónico (AMPA) inicialmente e N-Metil DAspartado (NMDA), posteriormente, impulsionando modificações no aumento da densidade de receptores de glutamato na membrana celular pós sináptica, promovendo a ativação de diversas enzimas, a síntese proteica e a formação e aumento de tamanho dos espinhos dendríticos (ASOK et al., 2019).

De todo modo, estes processos são dinâmicos, em que, para memórias recentes, se sugere a maior participação de modificações na amígdala (para memórias com valência emocional) e hipocampo. Posteriormente, durante a evocação remota, ocorre a maior necessidade do envolvimento do CPF (PRESTON E EICHENBAUM, 2013). Essa dinâmica corrobora para que existam sistemas de memória transitórios, paralelos e complementares para os tipos de memória e a dinâmica dos seus processos.

1.4. ESTRESSE E MEMÓRIA: EXPERIÊNCIAS ESTRESSANTES DIFEREM QUALITATIVAMENTE EM COMO SÃO ADQUIRIDAS, CONSOLIDADAS, E EVOCADAS AO LONGO DO TEMPO

Existem diversos mecanismos pelos quais memórias de eventos estressantes são mais intensas, em que muitas das sinalizações são processos também dependentes do tempo. Na

ordem de milissegundos a minutos há majoritariamente a influência dos neurotransmissores e do aumento de monoaminas, passando pelo aumento de neuropeptídeos e, posteriormente, após a ativação do eixo HHA, a liberação de corticosteroides (SCHWABE et al., 2022).

Os corticosteroides inicialmente induzem a ativação de MR, os quais possuem maior afinidade e estão, mais predominantemente, ocupados pelos hormônios (DE KLOET et al., 2010). Os mecanismos postulados para a resposta inicial ao estresse são de que o MR atua por mecanismos não genômicos reduzindo o limiar de disparo dos neurônios (SCHWABE et al., 2022). Posteriormente, conforme o gradiente de concentração dos corticosteroides aumenta, ocorrem ações não genômicas a partir do GR associado à membrana dos neurônios, o que favorece a incorporação de mais receptores AMPA na membrana e os mecanismos de potenciação de longa duração, que facilitam o fenômeno da consolidação sináptica (KRUGERS et al., 2010). Após os níveis de corticosteroides atingirem o seu pico de concentração, se tem a ocupação de receptores nucleares e a partir dos efeitos genômicos ocorre a influência direta dos corticosteroides sobre a consolidação da memória (SCHWABE et al., 2022). A razão entre os receptores e a sua sinalização influenciam tanto na persistência da resposta ao estresse, na retroalimentação negativa do eixo HHA e na regulação gênica, via controle transcricional, da síntese proteica após um evento estressante (SCHWABE et al., 2022). Além disso, alguns estudos demonstram que a administração de antagonista de GR após um evento traumático reduz a probabilidade da memória daquele evento se tornar maladaptativa (DE QUERVAIN et al., 2017).

Entretanto, a ação dos corticosteroides difere conforme o local em que atuam e em quais receptores. O uso de agonistas de GR no hipocampo, núcleo paraventricular hipotalâmico e na hipófise é capaz de favorecer a retroalimentação negativa do eixo HHA, uma vez que suprime a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH, do inglês, *Corticotropin releasing hormone*), bem como do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (LUPIEN et al., 2009). Ao mesmo tempo, a sinalização do receptor na amígdala é capaz de intensificar a consolidação de memórias aversivas, enquanto o uso de bloqueadores impede a formação de memória de longa duração (RODRIGUES et al., 2009). Todavia, a compreensão da funcionalidade desses receptores durante e após as etapas iniciais da formação da memória ainda não é completa.

Outro fator implicado nas diferenças das memórias entre indivíduos é o ambiente hormonal durante a aquisição e após o evento traumático (MADDOX et al., 2018). Os hormônios gonadais parecem ter um papel na determinação de se eventos traumáticos podem

se tornar memórias adaptativas ou maladaptativas (MADDOX et al., 2018). Tais alterações são mais proeminentes em fêmeas, as quais se sugere possuírem maior vulnerabilidade ao trauma e suas complicações, sobretudo pelas variações hormonais cíclicas durante a fase reprodutiva, ou, ainda não descartado, um papel dos cromossomos sexuais (YAGI E GALEA, 2019).

Em favor de efeitos hormonais sobre os desfechos na memória após eventos estressantes, dados em humanos e roedores demonstram que, além da maior vulnerabilidade, as fêmeas generalizam mais memórias aversivas (ASOK et al., 2020), que compreende a menor capacidade de distinguir entre contextos ameaçadores de não ameaçadores, geralmente apresentando algum comportamento com função no contexto ameaçador, resposta neuroendócrina e autonômica ao estresse, mesmo na ausência da ameaça (LIBERZON E ABELSON, 2016) em que tal característica é preditiva de indivíduos vulneráveis aos transtornos neuropsiquiátricos associados ao estresse, como o transtorno de estresse pós traumático (TEPT) (LIBERZON E ABELSON, 2016). Alternativamente, Couto-Pereira et al. (2019) demonstram que a separação materna aumenta a resistência à reconsolidação de uma memória contextual aversiva, bem como determina um maior congelamento em um contexto novo e diferente, sugerindo a generalização também em machos (COUTO-PEREIRA et al., 2019).

Além das alterações cognitivas, comportamentais e fisiológicas, os indivíduos vulneráveis ao TEPT também apresentam modificações no hipocampo, como uma maior densidade e distribuição de GR na estrutura, bem como uma redução no tamanho da estrutura (LIBERSON E ABELSON, 2016; RESSLER et al., 2022). Adicionalmente, a reatividade da amígdala e uma alterada sinalização do CPF influencia na vulnerabilidade para o TEPT e nos seus subtipos (RESSLER et al., 2022). Sobretudo, o subtipo mais comum é associado a uma ativação predominante da amígdala basolateral e conectividade com o CPF e o hipocampo Ventral (HV) (BIAN et al., 2019).

1.5. POSSÍVEIS MECANISMOS MOLECULARES PARA COMO O ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA PODE PREDISPOR À VULNERABILIDADE E INTERFERIR NA MEMÓRIA DE EVENTOS ESTRESSANTES

O estresse neonatal também afeta o desenvolvimento do hipocampo, em que processos de poda sináptica são comprometidos (ANDERSEN E TEICHER, 2004). Além disso, regiões

como o CPF ventromedial (em humanos, homólogo ao Córtex infralímbico em roedores) e a amígdala basolateral demonstram aumentar a sua conectividade (CHEN E BARAM, 2016). Juntamente, animais estressados no início da vida por separação maternal (SM) mostram prejuízo no feedback negativo do eixo HPA e níveis centrais e periféricos aumentados dos seus hormônios (AISA et al., 2007).

A persistência da ativação do eixo HPA, assim como sua hipofunção, são prejudiciais para o adequado desenvolvimento emocional, cognitivo e metabólico (RUSSEL E LIGHTMAN, 2019). Um dos mecanismos propostos e associados aos prejuízos na realimentação negativa do eixo HPA é o aumento da proteína de ligação à FK506 (fk506 binding protein – a FKBP51) a qual prejudica a translocação do complexo hormônio glicocorticoidereceptor (GR-GC) interferindo na expressão gênica (MATOSIN et al., 2018), prejudicando na retrolimentação negativa do eixo HHA e predispondo à vulnerabilidade pelo organismo estressado (MATOSIN et al., 2018). As alterações na FKBP51, como também a hipótese do balanço entre os receptores MR:GR são mecanismos pelos quais os indivíduos podem diferir no desenvolvimento de um fenótipo mais vulnerável ou resiliente (MATOSIN et al., 2018; KLENGEL et al., 2013; DE KLOET et al., 2018). Além disso, eventos estressantes são associados ao aumento de monócitos e citocinas pró inflamatórias circulantes, sugerindo um mecanismo para a sensibilização do organismo a efeito prejudiciais do estresse de forma cumulativa (BLITZ et al., 2022). Juntamente, o aumento da FKBP51 é associado ao aumento da sinalização da via do fator nuclear kappa B (NF-KB) a partir do aumento dos glicocorticoides, em que, diferentemente da periferia, no Sistema Nervoso Central (SNC) os glicocorticoides se tornariam pró-inflamatórios (BOLSHAKOV et al., 2020).

1.6. HIPÓTESE

A nossa hipótese foi de que o estresse no início da vida, como é o caso da SM, a partir de alterações no balanço entre os receptores MR:GR, e no aumento da expressão da FKBP51 associada a tais receptores (HARTMANN et al., 2021), possa corroborar para efeitos cognitivos prejudiciais vistos em indivíduos submetidos a vários insultos. Juntamente, eram esperadas alterações comportamentais nos animais que passaram pelos eventos estressantes, sobretudo na discriminação de contextos neutros e maior intensidade nas respostas frente a contextos potencialmente estressantes, demonstrando que a SM e o treino em um contexto aversivo intensificavam tais respostas.

1.7. RELEVÂNCIA

Esperávamos que esse estudo trouxesse maior compreensão sobre como eventos estressantes no início da vida, como condições de trauma infantil, são capazes de se manterem latentes para condições desafiadoras posteriormente na vida. Uma vez que eventos traumáticos durante a infância aumentam a probabilidade de se desenvolver um transtorno psiquiátrico posteriormente (COPELAND et al., 2018).

Esse foi o primeiro estudo, a saber, que testou o estresse cumulativo (por separação materna e condicionamento de medo contextual), proteínas-chave para a resposta ao estresse (DE KLOET et al., 2018; HARTMANN et al., 2021) e a memória remota para os animais que passaram por eventos no início da vida. Neste trabalho, buscamos sobretudo correlações das medidas bioquímicas com o fenótipo comportamental.

1.8. OBJETIVO GERAL

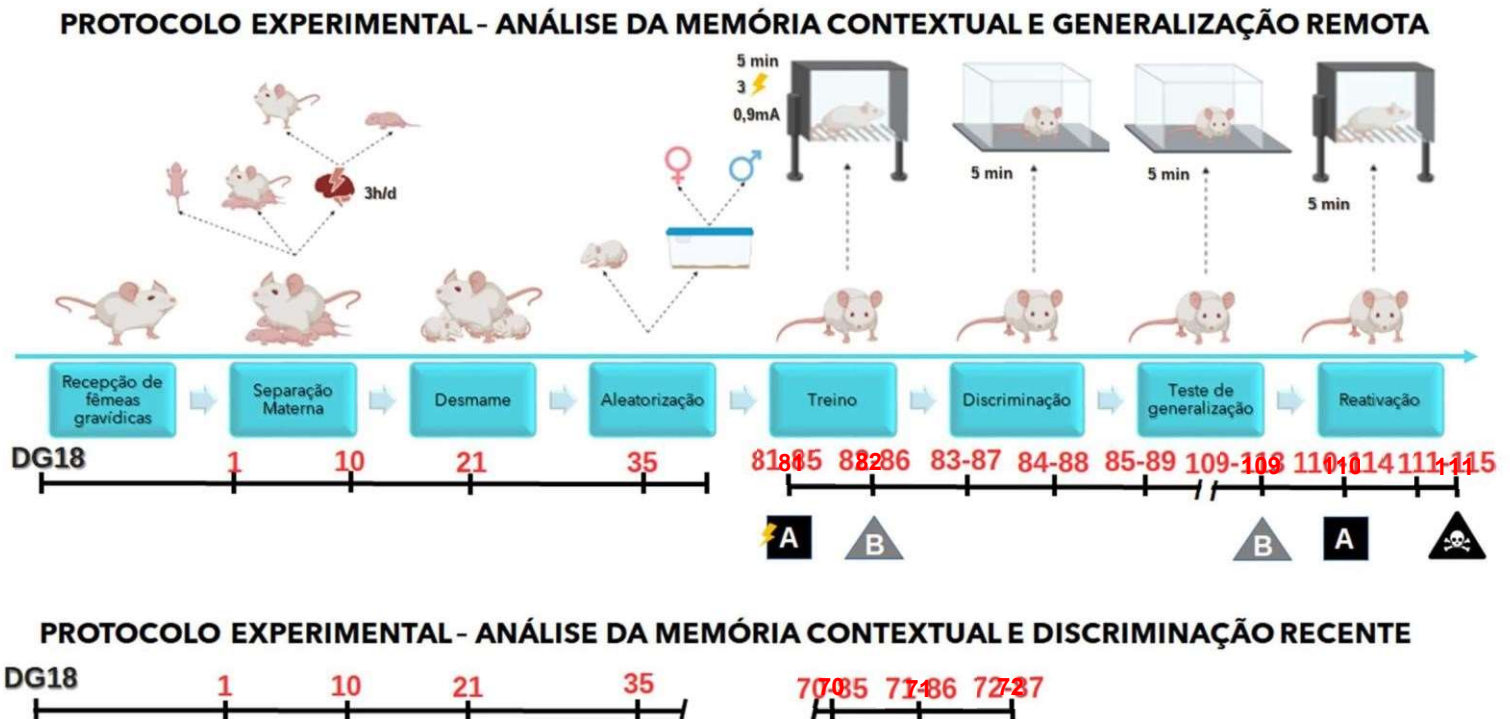
- Avaliar se a exposição a estressores ao longo da vida modula a razão GR:MR e os níveis da FKBP51 em distintas estruturas encefálicas em ratos e ratas Wistar. Adicionalmente, verificaremos se os eventos estressantes interferem na discriminação e generalização de uma memória aversiva contextual remota.

Objetivos específicos

- Verificar se ocorre a generalização do medo contextual remoto nos diferentes grupos e buscar relações entre o desempenho comportamental e as medidas bioquímicas;
- Verificar se os animais diferem na discriminação recente de um contexto novo para o contexto do treino, entre os grupos que passaram ou não pela separação materna;
- Analisar as diferenças nos níveis de MR, GR e FKBP51 entre os animais intactos e SM após o paradigma de medo condicionado ao contexto em hubs específicos, particularmente no PrL;
- Avaliar os níveis de IL-6, IL1beta e TNFalfa no PrL e após os testes da memória remota;
- Avaliar a razão entre os receptores MR e GR nos animais submetidos ao medo condicionado ao contexto;

2. MATERIAL E MÉTODOS

O desenho experimental está delineado na figura 01, abaixo.



Legenda: Da esquerda para a direita, as fêmeas prenhes foram recebidas no dia gestacional 18 (DG18) e aclimatadas na sala em que ficariam as ninhadas. A SM ocorreu do dia pós-natal 1 (DPN1) até o DPN10. O desmame dos animais foi realizado no DPN21 e à randomização foi realizada entre os dias 21-35, variando entre as levas. A partir do DPN70 (entre o DPN70-86) os animais foram submetidos uma única vez ao condicionamento aversivo ao contexto (Ctx A) e 24 horas depois a um novo contexto (Ctx B). 24 horas depois alguns animais foram submetidos à eutanásia. Uma outra parte dos animais foi usada para testar a memória remota dos animais, em que 28 dias após o treino (DPN109 para aqueles treinados no DPN81) foi feito o teste de generalização (Ctx B) e, 24 horas depois o teste da memória original (Ctx A). Após 24 horas o grupo memória remota foi submetido à eutanásia.

2.1. ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Guide for the care and Use of

Laboratory Animals, 8th edition (National Academy of Sciences, EUA, 2011) e a Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais, nº 11.794, de outubro de 2008, após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS; projeto#41765). Os procedimentos aqui descritos consideraram o princípio dos 3Rs, descrito pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (DBCA/2013).

Conforme o Formulário unificado para solicitação de autorização para uso de animais em experimentação, disponibilizado pela CEUA-UFRGS, o grau de invasividade (GI) destes procedimentos é definido como: GI3 para a separação materna e para tarefa de medo condicionado (exposição breve a estímulo nocivo – choque elétrico moderado) e sem recuperação (eutanásia precedida por anestesia).

2.2. ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar prenhas, primíparas, solicitadas ao Biotério de Criação do Departamento de Bioquímica desta Universidade. Os animais permaneceram em salas específicas do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, alojados em caixas-moradia individuais a partir do dia gestacional 18. Após o parto, as ninhadas foram submetidas às intervenções neonatais descritas no item “intervenções neonatais”, abaixo.

2.3. CUIDADOS NA MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Todos os animais foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica desta Universidade, em caixas-moradia de dimensões 41 x 34 x 16 cm (mas ver observação abaixo), confeccionadas em Plexiglas com assoalho recoberto de maravalha autoclavada, que foram mantidas em salas com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), sob ciclo claro/escuro de 12 horas (luz das 7h às 19h), com acesso a ração padrão para roedores e água ad libitum. O Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica possui Médico Veterinário responsável pelo biotério.

2.4. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Sempre que possível, os animais foram anestesiados. A anestesia profunda consistia no uso de isoflurano (4% diluídos em 70% de NO² e 30% O², através de um vaporizador calibrado), até a perda total da postura e reflexos, seguindo-se imediatamente a morte por decapitação com guilhotina, em que o processo foi realizado por um pesquisador treinado.

2.5. DESCARTE DE RESÍDUOS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS

As carcaças dos animais de experimentação e os resíduos de experimentos contendo material biológico foram devidamente acondicionados e posteriormente recolhidos por uma empresa específica para esses fins, designada pela Universidade. Os resíduos químicos foram catalogados e enviados para o departamento de Química para inativação na Central de Gerenciamento e Tratamento de Rejeitos Químicos (CGTRQ) desta Universidade.

2.6. INTERVENÇÕES NEONATAIS: SEPARAÇÃO MATERNA

O dia do nascimento da ninhada foi considerado o dia pós-natal (DPN) 0 (zero). No DPN1, foram padronizadas as ninhadas em 8 filhotes e alocadas aleatoriamente a uma das intervenções neonatais: intacto (controle, NH) ou separação materna (MS).

Os animais NH não passaram por nenhuma intervenção até o desmame. Do DPN 1 ao DPN 10, as ninhadas MS foram retiradas do ninho e colocadas em uma incubadora com temperatura 32°C, durante 3 horas, uma vez ao dia, entre as 11:00 e as 16:00 h (ciclo claro). Cada ninhada possuiu o seu próprio recipiente dentro da incubadora e foi manipulada sempre com a mesma luva (luvas trocadas entre ninhadas diferentes). Após as 3 horas na incubadora, a ninhada foi devolvida ao ninho. A mãe permaneceu na caixa moradia na mesma sala da incubadora, de forma a poder ouvir as vocalizações dos seus filhotes. Os cuidados com as caixas moradias foram mantidos conforme os cuidados padrão do biotério.

O desmame foi efetuado no DPN 21. Após o desmame, as genitoras foram anestesiadas com cetamina 100mg/kg: xilazina 10mg/kg i.p (os volumes injetados foram 1mL solução de cetamina/kg peso corporal e 0,5 mL solução de xilazina/kg peso corporal) e mortas por decapitação por guilhotina.

Os filhotes foram alojados em caixas moradia separados de acordo com o sexo e seus respectivos grupos experimentais (intacto ou SM) entre os dias pós-natais 21-35, em no máximo quatro animais por caixa e deixados sem intervenção até DPN70.

2.7. EXPERIMENTO COMPORTAMENTAL

2.7.1. Medo Condicionado Ao Contexto

Neste experimento, foi utilizado o modelo de medo condicionado ao contexto. Aproximadamente no DPN70, os animais foram colocados em aparato de medo condicionado ao contexto (contexto A), que consiste em uma caixa de madeira e laterais de metal nas dimensões 28 x 26 x 23 cm, com barras metálicas na base, por onde é conduzida a corrente elétrica. Os animais permaneceram na caixa durante 3 minutos, para ambientação. Ao término deste período, os animais receberam 3 choques de 0,9 mA, com duração de 2 segundos e 30 segundos de intervalo entre eles; 1 min após o término dos choques, os animais foram devolvidos à caixa moradia (sessão de aquisição).

A corrente de 0,9 mA foi escolhida com base em observações prévias de nosso grupo de pesquisa, que encontraram resposta semelhante de animais NH e MS nesta intensidade próxima (0,8mA) (Couto-Pereira et al., 2016).

2.7.2. Discriminação Em Um Contexto Neutro

Vinte e quatro horas após a sessão de aquisição, os animais foram expostos a um novo ambiente (distinto, em dimensões e textura, ao aparato de medo condicionado – contexto B) durante 5 minutos, com a finalidade de testar a aquisição/generalização da memória de medo. Após 24 horas da sessão no novo ambiente, os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação e o encéfalo rapidamente retirado e dissecado sobre gelo, sendo dissecadas as estruturas de interesse para este trabalho: hipocampo dorsal e ventral, córtex pré-límbico e amígdala. Os tecidos permaneceram armazenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise.

2.7.3. Teste Remoto de Generalização da Memória

Para os animais testados remotamente ao treino: vinte oito dias após a sessão de aquisição os animais foram novamente levados para a sala em que ocorreu o treino e o teste de discriminação com a finalidade de testar a generalização da memória. Para isso, foram

novamente posicionados no contexto B. Durante 5 minutos o seu comportamento foi avaliado para a classe do comportamento de interesse.

2.7.4. Teste Remoto de Evocação Da Memória

Vinte quatro horas após o teste da generalização os animais foram novamente testados para o contexto A, durante 5 minutos, dessa forma permitindo a análise da memória remota, 24 horas depois o mesmo protocolo usado para a eutanásia e remoção dos encéfalos dos animais testados para a memória recente foi implementado.

Todas as sessões foram filmadas para, se necessário, posterior comparação de comportamentos exploratórios e posturas de medo dos animais. O tempo de congelamento dos animais (freezing) dentro do aparato foi usado como medida comportamental correlata à evocação da memória de medo ou manifestação de medo animal (Blanchard e Blanchard, 1969). As fêmeas tiveram sua fase do ciclo estral determinada durante todo período em que foram submetidas aos testes comportamentais, através da técnica descrita por (Marcondes et al., 2002).

2.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

2.8.1. Análise Do Imunoconteúdo de GR, MR e FKBP5

Imunoconteúdo Basal

Animais NH e MS que não passaram por nenhuma outra intervenção foram submetidos a eutanásia no PN60 e o encéfalo foi rapidamente retirado e dissecado sobre gelo, sendo dissecadas as estruturas de interesse para este trabalho, da mesma forma descrita acima.

Preparo Das Amostras

As amostras (para determinação basal e 24 horas pós-recuperação) foram homogeneizadas em tampão de lise (10 mM de Hepes, 10 mM de KCl, 0,6 mM de EDTA, 1% de NP 40, 0,25% de desoxicolato de sódio e inibidor de protease (Roche), pH 7,9), seguido de centrifugação a 3.000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas citosólicas foi coletado e armazenado a -20°C. O conteúdo total de proteínas foi determinado pelo método do ácido bicinonínico (BCA) (Thermo-Fischer/ Pierce BCA Protein Assay Kit #23225).

Western Blot

As amostras foram reduzidas e desnaturadas usando -mercaptoetanol 5% e dodecilsulfato de lítio (LDS), seguido de aquecimento a 95°C, por 5 minutos e resfriamento imediato a -20°C. A eletroforese foi realizada utilizando o sistema XCell SureLock (Invitrogen, Thermo Scientific), com o uso de gel de acrilamida gradiente 4-12% (Life Technologies, Thermo Scientific), no qual foram carregados 30-40 µg de proteínas totais. Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, seguido de bloqueio de 1 h em solução bloqueadora de leite em pó 5% em Tampão Tris-Salino contendo 0.1% Tween-20. As membranas serão incubadas com anticorpos primários anti-GR, anti-MR ou antiFKBP51, overnight a 4°C. Subsequentemente, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase, anti-rabbit (#NA934V, 1: 10000, GE Healthcare) ou anti-mouse (#402335, 1: 10000, Calbiochem). A imunorreatividade das bandas foi revelada por um kit amplificador de quimioluminescência (ECL; #RPN2109, GE Life Sciences) e detectada no sistema de aquisição ChemiDoc MP Imaging System. As densidades ópticas foram quantificadas através do software Image Lab (Bio-Rad).

2.8.2. Enzima Imuno-ensaio (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay; ELISA)

Preparo da placa

Tampão fosfato salino (PBS) contendo anticorpos de captura para a concentração de trabalho foi pipetado (100uL por poço). Após isso, a placa foi tampada e deixada em incubação overnight em temperatura ambiente. No dia seguinte foi aspirado e lavado com 400uL por poço com tampão de lavagem (conforme indicado pelo fabricante). Após isso, foi realizado o descarte, e a placa foi moderadamente batida em papel toalha, em que, este procedimento foi repetido três vezes. Após isso a placa foi novamente bloqueada com a adição de 300uL de Reagente diluente por poço, e foi realizado a incubação em temperatura ambiente por, no mínimo, uma hora. Por último, a etapa da aspiração e lavagem com tampão de lavagem foi repetida.

Procedimento de ensaio

Foi adicionado 100uL de amostra ou padrão diluídos em Reagente diluente, por poço. A placa foi tampada em uma etapa de 2h de incubação em temperatura ambiente. Após essa etapa, novamente a aspiração e lavagem com tampão de lavagem foi realizada, igualmente ao preparo da placa. Foi adicionado 100uL da diluição de trabalho de anticorpo secundário com Estreptavidina-HRP a cada poço. Após isso, foi feito uma incubação de 20 minutos em

temperatura ambiente, evitando contato direto com a luz pela placa. Novamente, foi realizada a lavagem.

Posteriormente, foi adicionado 100uL de Solução de Substrato a cada poço. E uma incubação de 20 minutos em temperatura ambiente, evitando a incidência direta da luz, foi realizada. Por último, uma Solução de Parada (50uL) foi adicionada em cada poço e a placa foi suavemente batida a fim de garantir a mistura. E então, foi determinada densidade óptica usando um leitor de microplacas ajustado para 450 nm.

2.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software SPSS versão 29. Para todas as análises foi empregado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, em que, dados não normais prosseguiram para o uso de testes não paramétricos. Quando aplicável, o teste de Kruskal-Wallis foi empregado. Dessa forma, os dados foram expressos em medianas e intervalos interquartílicos (IQR), junto aos seus valores mínimos e máximos nos gráficos.

Para a significância estatística valores de $p < 0,05$ (*) foram considerados estatisticamente significativos, enquanto valores de $p < 0,001$ (**) foram considerados altamente significativos, em que representam uma grande diferença na distribuição dos dados entre os grupos. Para todas as análises, quando os dados foram elegíveis para testes não paramétricos e havendo diferenças entre os grupos, o teste post hoc de Dunn foi empregado.

Os testes de correlações foram empregados conforme a aplicabilidade para a distribuição dos dados, em que, quando elegível, os dados não paramétricos foram correlacionados pelo teste de Spearman. Valores de $r = -1$ foram considerados como correlação negativa perfeita, do contrário, $r = 1$ foi considerado para correlações positivas perfeitas. Valores entre os intervalos de $(-0,7$ e $(-0,99$ foram considerados para correlações fortes, $(-0,4$ e $(0,69$ foram considerados para correlações moderadas e valores inferiores a $(-0,39$ foram considerados como correlações fracas.

4. DISCUSSÃO

Este trabalho foi pensado sobre a perspectiva de que o estresse no início da vida é capaz de alterar como o organismo que passou pela adversidade inicialmente na vida enfrenta adversidades posteriormente, na fase adulta. Estudos anteriores também apontam tal ocorrência (ANDERSEN E TEICHER, 2007; CHEN E BARAM, 2016). Entretanto, o nosso trabalho é o primeiro a explorar a relação da separação materna com a discriminação ou evocação remotas da memória. Além disso, este é o primeiro trabalho a demonstrar a dependência do sexo para a correlação positiva entre o GR e a FKBP51.

Nos dados comportamentais foram observadas diferenças no congelamento entre os grupos na discriminação entre machos (Gráfico 04). Bem como na discriminação, generalização e recuperação remota no grupo de fêmeas (Gráfico 01). As diferenças se encontravam entre os grupos submetidos ao treino em relação àqueles não treinados, corroborando, para o papel do condicionamento aversivo sobre os fenômenos da discriminação e, posteriormente, generalização e recuperação da memória. Além disso, se pode observar que os machos submetidos à SM demonstraram maior congelamento, independentemente do treino, sobretudo por não diferir estatisticamente dos animais treinados (Gráfico 04).

Em conjunto, a estrutura encefálica com maior participação na modulação da intensidade de memórias aversivas, conforme se postula, é a ativação dos microcircuitos da amígdala, com a ativação da amígdala central e a ativação da substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (vIPAG, abreviada) (OZAWA et al., 2016). A ativação dos circuitos defensivos são os principais contribuintes para a manifestação do comportamento de congelamento (TOVOTE et al., 2016; ROELOFS E DAYAN, 2022). Adicionalmente, no caso da codificação do contexto em que o estímulo aversivo ocorreu, se sugere o envolvimento do hipocampo e, quando envolvem múltiplos estímulos, o PFC (MOBBS et al., 2020).

Dessa forma, a revisão de Murphy e Gould (2020) descreve como o estresse no início da vida reduz a complexidade de neurônios piramidais, os espinhos dendríticos, a densidade de neurônios inibitórios no PFC e no HV ao passo que os aumenta na amígdala. As modificações na sincronização entre o PFC-amígdala poderiam estar por trás de uma maior manifestação do comportamento de congelamento e no prejuízo da desambiguação entre a experiência durante o treino para o teste de discriminação (LIKHTIK E PAZ, 2015; COUTO-PEREIRA et al., 2019).

Assim, embora não tenha sido possível, estatisticamente, observar um aumento no congelamento nos animais SM fêmeas, é possível observar uma maior densidade da distribuição dos dados na direção de um maior congelamento (Figura 02) e, no caso dos machos, uma indiferença entre os grupos separados, treinados e separados não treinados.

Interessantemente, as fêmeas demonstraram ser mais propensas a generalização (Gráfico 02), o que é suportado por outros estudos (ASOK et al., 2019). Além disso, os machos, entre os grupos que passaram pelo contexto B remoto submetidos à separação demonstraram um maior congelamento quando comparados aos animais intactos não treinados (Gráfico 05). Já a indiferença entre os grupos separados e intactos sugere modificações devido à SM que suportem tal congelamento nos machos SM. Inclusive, o estudo de Elliot e Richardson (2019) sugere que a separação materna acelere o fenômeno da generalização nos machos, todavia, os mesmos autores sugerem que a generalização ocorre 24 horas após o treino. No presente trabalho, nesse período, ainda foi observado como discriminação.

Entretanto, não se pode descartar um aumento na locomoção ou comportamentos do tipo ansiedade nos machos, o que poderia afetar os dados de congelamento. Sobretudo, devido ao processamento do contexto ameaçador possivelmente não ocorrer da mesma forma para ambos os sexos (ASOK et al., 2019).

Corroborando ao processamento, consolidação e generalização da experiência do contexto A, foi observado que as fêmeas preservavam mais a memória original na recuperação remota (Gráfico 03). Diferentemente, os machos não diferiam entre os grupos e não é possível descartar diferenças na codificação e consolidação, embora o maior congelamento dos animais que não passaram por quaisquer estímulos aversivos no contexto A sugira que estes animais apresentem comportamentos defensivos mesmo na ausência do treino (Gráfico 04, Gráfico 05 e Gráfico 06).

Conforme a análise de citocinas se observou um aumento do TNF α e da IL1 β no grupo das fêmeas separadas, treinadas quando comparado aos grupos separadas, sem treino e intactas, treinadas (Gráfico 08 e Gráfico 09), apoiando a hipótese do estresse cumulativo (NEDERHOF E SCHMIDT, 2012). Diferentemente, nos machos ocorreu uma redução das citocinas no grupo separados, treinados estatisticamente significativo quando comparado aos intactos, não treinados. Entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos na IL6, bem como não se observou mudanças no TNF α nos machos.

Diversos estudos apontam para um papel do estresse em levar a um aumento das citocinas no encéfalo, em que, se sugere um efeito dependente das catecolaminas, via receptores beta-adrenérgicos e dos glicocorticoides em aumentar a concentração das citocinas localmente (JOHNSON et al., 2019). Além das catecolaminas, o outro mecanismo sugerido é a indução de receptores de corticosteroides microgliais, as quais liberam moléculas quimioatrantes e, a depender da intensidade, mas, especialmente, da duração do estresse recrutam monócitos periféricos (JOHNSON et al., 2019; BLITZ et al., 2022).

Tal fenômeno, se postula ser uma das explicações para os efeitos diferenciais para como os glicocorticoides são pró-inflamatórios no centralmente e, em contrapartida, possuem efeito anti-inflamatório, majoritariamente, na periferia (BOLSHAKOV et al., 2020).

Além disso, os efeitos do estresse não são iguais para ambos os sexos, em que no grupo das fêmeas se observa, como comentado acima, um aumento na IL1beta e no TNFalfa (Gráfico 08 e Gráfico 09), o que não é observado nos grupos dos machos. Todavia, a determinação de um perfil de citocinas patológico, em contraste a alterações normais, ainda não é possível, devido a diversos estudos apontarem que fêmeas, sob condições basais, apresentam um estado microglial mais ativado e maiores níveis de citocinas (RAINVILLE E HODES, 2019). Já os machos expostos ao estresse por derrota social apresentam um aumento na micróglia fagocítica (RAINVILLE E HODES, 2019).

Dessa forma, o momento das citocinas, 30 dias após o estresse pode não capturar adequadamente a resposta imunitária para o evento estressante, independentemente do sexo, mesmo que nossos dados apontem para o estresse cumulativo no sexo feminino. Todavia, o aumento do TNFalfa e da IL1beta no PFC tem sido associado a transtornos neuropsiquiátricos (RAINVILLE E HODES, 2019). Além disso, se sugere que as fêmeas são alternativamente afetadas de acordo com o período do ciclo (BOLLIGER et al., 2016).

Ainda foram analisadas as citocinas no HV e foi observado nas fêmeas um aumento da IL6 no grupo intactas, treinadas quando comparado ao grupo separadas, sem choque (Gráfico 13), bem como no TNFalfa, entre o grupo intactas, sem treino e separadas, treinadas (Gráfico 15).

Interessantemente, as concentrações de citocinas sem muitas modificações podem representar a preservação da estrutura para as funções associadas à memória, em que tais moléculas participam da plasticidade sináptica e modulam a neurotransmissão

(BOURGOGNON E CAVANAGH, 2020). Esses fenômenos podem ser prejudicado em outros modelos usados para induzir o aumento das citocinas no SNC, como com modelos de infecção ou injeção de lipopolissacarídeo, os quais induzem um aumento relevante de IL6, IL1beta e TNFalfa em todo SNC, o que se relaciona a diversas patologias com prejuízo na memória associados (BOURGOGNON E CAVANAGH, 2020).

Por último, não foram encontradas diferença nas análises envolvendo o MR, GR e FKBP51, diferentemente da nossa hipótese alternativa, em que haveria um aumento na FKBP51 e alterações entre os receptores conforme os diferentes grupos experimentais. Todavia, mesmo que o aumento na expressão e atividade da FKBP51 esteja associada a transtornos neuropsiquiátricos e ao envelhecimento, nosso modelo foi incapaz de gerar esse aumento e afetar a razão dos receptores MR e GR. Adicionalmente, o estudo de Criado-Marrero (2020) demonstrou que o estresse no início da vida foi capaz de prevenir o aumento na expressão da FKBP51 durante a fase adulta.

Dessa forma, outros estudos apontam para um papel da FKBP51 na suscetibilidade a transtornos neuropsiquiátricos com um agravamento em genótipos predispostos para a maior expressão dessa proteína, que é aumentada após o estresse precoce (MATOSIN et al., 2018).

Enfim, foi encontrada uma correlação forte (Gráfico 27) entre GR-FKBP51 nos machos, o que, em outros trabalhos como o de Hartmann et al. (2021) é demonstrado experimentalmente, inclusive o mesmo trabalho demonstra que a maior ativação e translocação tanto do GR como do MR promovem o aumento da expressão de FKBP51 no hipocampo de camundongos machos. Observamos ainda uma correlação moderada entre MR-FKBP51 (Gráfico 27). Entretanto os autores do trabalho citado acima não utilizaram fêmeas, o que em nossa análise e inferência possivelmente tenha seu aumento diferentemente modulado conforme o sexo, sobretudo pela interferência das variações hormonais. Isso vai ao encontro das fracas correlações encontradas para as fêmeas.

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho os dados sugerem que as fêmeas treinadas possuem prejuízos na discriminação 24 horas após o treino, além de generalizarem a memória de medo para um contexto novo, independentemente da SM, bem como sugerem uma persistência da memória, quando testadas remotamente no contexto A. Da mesma forma, os machos também apresentam prejuízos na discriminação, quando submetidos ao treino. Importante observar que, por outro lado, os machos separados não treinados que apresentam um congelamento elevado, o que pode sugerir um estado de medo basal mais elevado. As fêmeas separadas e treinadas demonstram maiores níveis de TNF α e IL1 β , quando comparadas às intactas treinadas e separadas não treinadas, sugerindo um efeito cumulativo do estresse, o que não ocorre com os machos. Os diferentes grupos, independentemente do sexo, não demonstram alterações no conteúdo de MR, GR e FKBP51 devido a separação materna e / ou ao estresse no início da fase adulta.

6. PERSPECTIVAS

Consideramos aumentar o número de amostras para as análises por Western blot para o PrL; bem como analisar o imuno conteúdo de MR, GR e FKBP51 no HV, Hipocampo dorsal e Amígdala. Além disso, para estudos futuros sugerimos que diferentes protocolos de estresse sejam utilizados a fim de compreender como eles diferencialmente interferem nas mudanças moleculares. Além disso, para as análises de citocinas, em resposta a um evento estressante agudo, como no caso do condicionamento, sugerimos utilizar amostras de encéfalos coletados em períodos mais curtos após o estresse.

7. REFERÊNCIAS

- AGORASTOS A., CHROUSOS G. The neuroendocrinology of stress: the stress-related continuum of chronic disease development. *Molecular Psychiatry*. 2021.
- AISA B., TORDERA R. LASHERA B., et al. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2007.
- ANDERSEN S., TEICHER M. Delayed Effects of Early Stress on Hippocampal Development. *Neuropsychopharmacology*. 2004.
- ARNETT, M., PAN, M., DOAK, W. ET AL. The role of glucocorticoid receptor-dependent activity in the amygdala central nucleus and reversibility of early-life stress programmed behavior. *Transl Psychiatry*. 2015.
- ASOK, A., HIJAZI, J., HARVEY., S. et al. Sex Differences in Remote Contextual Fear Generalization in Mice. *Front in Behavioral Sciences*. 2019.
- ASOK, A., LEORY, F., RAYMAN, J., KANDEL, E. Molecular Mechanisms of the Memory Trace. *Trends in Neuroscience*. 2019.
- ASOK A., KANDEL ER., RAYMAN JB. The Neurobiology of Fear Generalization. *Front. Behav. Neurosci*. 2019.
- BABICOLA L., VENTURA R., D'ADDARIO SL., et al. Long term effects of early life stress on HPA circuit in rodent models. *Molecular and Celular Endocrinology*. 2021.
- BALE TL., AKIL H., CARLEZON WA., MOGHADDAM B., NESTLER EJ., et al. The critical importance of basic animal research for neuropsychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2019.
- BIAN X., QIN C., CAI C., et al. Anterior Cingulate Cortex to Ventral Hippocampus Circuit Mediates Contextual Fear Generalization. *The Journal of Neuroscience*. 2019.
- BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C., 1969. Crouching as an index of fear. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 67, 370–375. 1969.
- BLITZ, R., SAWICKI, C., SHERIDAN, J., GODBOUT, J. The neuroimmunology of social-stress-induced sensitization. *Nature Immunology*. 2022.
- BOLLINGER, J., BURNS, C., WELLMAN, C. Differential effects of stress on microglial cell activation in male and female medial prefrontal cortex. *Brain, Behavior and Immunity*. 2016.

BOLTON JL, MOLET, J, IVY A, BARAM TZ. New insights into early-life stress and behavioral outcomes. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2017.

BONAPERSONA V, DAMSTEEGT R, ADAMS ML, VAN WEERT LTCM, MEIJER OC, JOËLS M AND SARABDJITSINGH RA. Sex-Dependent Modulation of Acute Stress Reactivity After Early Life Stress in Mice: Relevance of Mineralocorticoid Receptor Expression. *Front. Behav. Neurosci.* 2019.

BOLSHAKOV, A., TRET'YAKOVA, L., KVICHANSKY, A. Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of Hippocampal Neuroinflammation. *Biochemistry (Moscow)*. 2021.

BORSINI A, GIACOBBE J, MANDAL G, BOLDRINI. Acute and long-term effects of adolescence stress exposure on rodent adult hippocampal neurogenesis, cognition, and behaviour. *Molecular Psychiatry*. 2023.

BOURGOGNON, J., CAVANAGH, J. The role of cytokines in modulating learning and memory and brain plasticity. *Brain and Neuroscience Advances*. 2020.

BOWERS, M., YEHUDA, R. Intergenerational Transmission of Stress in Humans. *Neuropsychopharmacol.* 2016.

CAO M., HUANG H., HE Y. Developmental Connectomics from Infancy through Early Childhood. *Trends in Neuroscience*. 2016.

CHEN Y., BARAM TZ. Toward Understanding How Early-Life Stress Reprograms Cognitive and Emotional Brain Networks. *Neuropsychopharmacology Rev.* 2016.

COHEN RA., GRIEVE S., HOTH KF., et al. Early Life Stress and Morphometry of the Adult Anterior Cingulate Cortex and Caudate Nuclei. *Biol Psychiatry*. 2006.

COPELAND W., SHANAHAN L., HINESLEY J., CHAN RF., ABERG KA., FAIRBANK JA., et al. Association of Childhood Trauma Exposure with Adult Psychiatric Disorders and Functional Outcomes. *Jama Network*. 2018.

COUTO-PEREIRA NS, LAMPERT C, VIEIRA AS, LAZZARETTI C, KINCHESKI GC, ESPEJO PJ, MOLINA VA, QUILLFELDT JA AND DALMAZ C. Resilience and Vulnerability to Trauma: Early Life Interventions Modulate Aversive Memory Reconsolidation in the Dorsal Hippocampus. *Front. Mol. Neurosci.* 2019.

COUTO-PEREIRA, N. DE S., FERREIRA, C.F., LAMPERT, C., ARCEGO, D.M., TONIAZZO, A.P., BERNARDI, J.R., DA SILVA, D.C., VON POSER TOIGO, E., DIEHL, L.A., KROLOW, R., SILVEIRA, P.P., DALMAZ, C. Neonatal interventions

differently affect maternal care quality and have sexually dimorphic developmental effects on corticosterone secretion. *Int. J. Dev. Neurosci.* 55, 72–81. 2016.

CRIADO-MARRERO, M., SMITH, T., GOULD, L., et al. FKBP5 and early life stress affect the hippocampus by an age-dependent mechanism. *Brain, Behavior, Immunity - Health.* 2020.

DASKALAKIS NP., BAGOTRS., PARKER KJ., VINKERS CH., KLOET ED. The three-hit concept of vulnerability and resilience: Toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology.* 2013.

DAUN KA, FUCHIGAMI T, KOYAMA N, MARUTA N, IKENAKA K AND HITOSHI S. Early Maternal and Social Deprivation Expands Neural Stem Cell Population Size and Reduces Hippocampus/Amygdala-Dependent Fear Memory. *Front. Neurosci.* 2020.

DE KLOET ER, VREUGDENHIL E, OITZL EMS, JOËLS M. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. *Endocrine Reviews.* 1998.

DE KLOET, E. R., OTTE, C., KUMSTA, R., et al. Stress and Depression: a Crucial Role of the Mineralocorticoid Receptor. *Journal of Neuroendocrinology.* 2016. DE KLOET, MEIJER, OC., NICOLA AF., et al. Importance of the brain corticosteroid receptor balance in metaplasticity, cognitive performance and neuroinflammation. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2018.

DE QUERVAIN, D., SCHWABE, L., ROOZENDAAL, B. Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. *Nature Rev Neuroscience.* 2016.

DUDAI, Y., KARNI, A., BORN, J. The Consolidation and Transformation of Memory. 2015.

ELLIOT, N., RICHARDSON, R. The Effects of Early Life Stress on Context Fear Generalization in Adult Rats. *Behavioral Neuroscience.* 2019.

FAUL, F., et al. G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior research methods*, v. 39, n. 2, p. 175191, 2007.

GAWEL, K., GIBULA, E., MARSZALEK-GRABSKA, M. et al. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 392, 1–18. 2019.

GEE DG., GABARD-DURNANLJ., FLANNERYJ., et al. Early developmental emergence of human amygdala–prefrontal connectivity after maternal deprivation. *Proc Nat Am Ac of Science*. 2013.

HARRIS AP., HOLMES MC., DE KLOET ER., et al. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptorbalance in control of HPA axis and behaviour. *Psychoneuroendocrinology*. 2013.

HARTMANN J., BAJAJ T., KLENGEL C. et al. Receptores mineralocorticoides amortecem a sensibilidade do receptor glicocorticoide ao estresse através da regulação do FKBP5. *Cell*. 2021.

HOMBERG, J.R., JAGIELLOWICZ, J. A neural model of vulnerability and resilience to stress-related disorders linked to differential susceptibility. *Mol Psychiatry*. 2021.

IZQUIERDO, I., BARROS, D., MELLO E SOUZA, T., et al. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 1998.

JARIC I, ROCKS D, CHAM H, HERCHEK A AND KUNDAKOVIC M. Sex and Estrous Cycle Effects on Anxiety- and Depression-Related Phenotypes in a TwoHit Developmental Stress Model. *Front. Mol. Neurosci*. 2019.

JOHNSON, J., BARNARD, D., KULP, A. Neuroendocrine Regulation of Brain Cytokines After Psychological Stress. *Journal of the Endocrine Society*. 2019.

KANATSOU S., JOELS M., KRUGERS H. Brain Mineralocorticoid Receptors and Resilience to Stress. *Vitamins and Hormones*. 2018.

KRUGERS, H., CASPER, C., HOOGENRAAD, et al. Stress hormones and AMPA receptor trafficking in synaptic plasticity and memory. *Nature Neuroscience*. 2011.

KLENGEL, T., MEHTA, D., ANACKER, C. ET AL. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene–childhood trauma interactions. *Nat Neurosci*. 2013. KIM EJ AND KIM JJ. Amygdala, Medial Prefrontal Cortex and Glucocorticoid Interactions Produce Stress-Like Effects on Memory. *Front. Behav. Neurosci*. 2019. KREDLOW A., FENSTER M., LAURENT R.J., et al. Prefrontal cortex, amygdala, and threat processing: implications for PTSD. *Neuropsychopharmacol*. 2021. LEE, J., NADER, K., SCHILLER, D. An Update on Memory Reconsolidation Updating. *Trends in Neuroscience*. 2017.

LI H., SU P., LAITKY., et al. The glucocorticoid receptor–FKBP51 complex contributes to fear conditioning and posttraumatic stress disorder. *The Journal of Clinical Investigation*. 2020.

LIBERZON, I., ABELSON, J. Context Processing and the Neurobiology of PostTraumatic Stress Disorder. *Neuron*. 2016.

LIKHTIK, E. PAZ, R. Amygdala–prefrontal interactions in (mal)adaptive learning. *Trends in Neuroscience*. 2015.

LU S, WEI F, LI G. The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. *Cell Stress*. 2021.

LUPIEN, S., MCEWEN, B., GUNNAR, M., HEIM, C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Rev Neuroscience*. 2009.

MACKENZIE, S., EICHENBAUM, H. Consolidation and Reconsolidation: Two Lives of Memories? *Neuron*. 2011.

MADDOX, S., HARTMANN, J., ROSS, R., RESSLER, K. Deconstructing the Gestalt: Mechanisms of Fear, Threat, and Trauma Memory Encoding. *Neuron*. 2018.

MAREN, S., PHAN, K. & LIBERZON, I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci*. 2013.

MATOSIN N., HALLDORSDDOTTIR T., BINDER E. Understanding the Molecular Mechanisms Underpinning Gene by Environment Interactions in Psychiatric Disorders: The FKBP5 Model. *Biol Psychiatry*. 2018.

MCEWEN B. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*. 2000.

MCGAUGH, J. Consolidating Memories. *Ann Rev Psychology*. 2015.

MOBBS, D., HEADLEY, D., DING, W., DAYAN, P. Space, Time, and Fear: Survival Computations along Defensive Circuits. *Trends in Neuroscience*. 2020.

MUEHLHAN, M., MILLER, R., STREHLE, J. ET AL. FKBP5 methylation predicts functional network architecture of the rostral anterior cingulate cortex. *Brain Struct Funct*. 2020.

MURTHY, S., GOULD, E. How Early Life Adversity Influences Defensive Circuitry. *Trends in Neuroscience*. 2020.

NEDERHOF, E., SCHMIDT, M. Mismatch or cumulative stress: Toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiology and Behavior*. 2012.

OLDHAM S., FORNITO A. The development of brain network hub. *Developmental Cognitive Neuroscience*. 2019.

OWEN D, MATTHEWS SG. Glucocorticoids and Sex-Dependent Development of Brain Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors. *Endocrinology*. 2003.

OZAWA,

T., YCU, E., KUMAR, A., et al. A feedback neural circuit for calibrating aversive memory strength, *Nature Neuroscience*. 2016.

PONZI D., FLINN MV., MUEHLENBEIN MP., NEPOMNASCHY PB. Hormones and human developmental plasticity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2020.

PRESTON, A., EICHENBAUM, H. Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory. *Current Biology*. 2013.

RAINVILLE, J., HODES, G. Inflaming sex differences in mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2018.

RESSLER, K., BARRETA, S., BOLSHAKOV, V. et al. post-traumatic stress disorder: clinical and translational neuroscience from cells to circuits. *Nature Rev Neurology*. 2022.

RIBONI VF, BELZUNG C. Stress and psychiatric disorders: from categorical to dimensionais approaches. *Current Opinion in Behavioral Sciences*. 2017.

REN L., MEYER M., GRAYSON V., et al. Stress-induced generalization of negative memories is mediated by an extended hippocampal circuit. *Am Col of Neuropsychopharmacology*. 2021.

RESER JE. Chronic Stress, Cortical Plasticity and neuroecology. *Behavioral Proceess*. 2016.

RICHARDS, B., FRANKLAND, P. The Persistence and Transience of Memory. *Neuron*. 2017.

RODRIGUES, R., LEDOUX, J., SAPOLSKY, R. The Influence of Stress Hormones on Fear Circuitry. *Ann Rev Neuroscience*. 2009.

ROELOFS, K. DAYAN, P. Freezing revisited: coordinated autonomic and central optimization of threat coping. *Nature Rev Neuroscience*. 2022.

SANDI, C., HALLER, J. Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2015.

SCHWABE, L., HERMANS, E., JOELS, M., et al. Mechanisms of memory under stress. *Neuron*. 2022.

SCHOENFELD TJ., MCAUSLAND HC., MORRIS HD et al. Stress and Loss of Adult Neurogenesis Differentially Reduce Hippocampal Volume. *Biological Psychiatry*. 2017.

SPENCER K. Developmental stress and social phenotypes: integrating neuroendocrine, behavioural and evolutionary perspectives. *Phil. Trans.* 2017. TAVOTE, P., ESPOSITO, M., BOTTA, P., et al. Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature.* 2016.

WELBERG LAM., SECKL J. Prenatal Stress, Glucocorticoids, and the programming of the Brain. *Journal of Neuroendocrinology.* 2001.

WREN THOMAS A., CAPAROLE N., WU C. et al. Early maternal separation impacts cognitive flexibility at the age of first independence in mice. *Developmental Cognitive Neuroscience.* 2016.

YAGI S., GALEA LAM. Sex Differences in hippocampal cognition and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology.* 2019.