

**Enriquecimento ambiental como estratégia  
não farmacológica para prevenção dos  
efeitos de longo prazo da separação  
maternal**

**Laisa Barroso Ribeiro**

**Dissertação de Mestrado em Bioquímica e  
Farmacologia**

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Agosto de 2015

# **Enriquecimento ambiental como estratégia não farmacológica para prevenção dos efeitos de longo prazo da separação maternal**

**Laisa Barroso Ribeiro**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovada em \_\_\_\_/08/2015 por:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Santana de Vasconcelos Bittencourt – Orientadora  
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES

---

Prof. Dr. Athelson Stefanon Bittencourt – Co-orientador,UFES  
Departamento de Morfologia – UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lívia Carla de Melo Rodrigues  
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Gomes Wanderley Pires  
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

Vitória, Agosto de 2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

---

Ribeiro, Laisa Barroso, 1988

Estratégias não farmacológicas para prevenção dos efeitos de longo prazo da separação maternal. [Vitória] 2015

Nº de páginas introdutórias em algarismos romanos. XCIV p., 29,7 cm, (UFES, M.Sc., Bioquímica e Farmacologia, 2015)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGBF.

---

1. Separação maternal 2. Enriquecimento ambiental 3. Transtornos psiquiátricos

## **DEDICATÓRIA**

**A toda minha família, principalmente ao meu pai Djalma, que me proporcionou o melhor, o acesso ao estudo de qualidade; a minha mãe Leila por ser meu alicerce, força e sabedoria; a minha irmã Simone, minha admiração e exemplo; aos meus amigos-alunos de Iniciação Científica, por todo o empenho, Martielo, Randriely, Lara, Jéssica, Thiago, Rafaella e a minha orientadora Ana Paula.**

**Muito obrigada.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde, sabedoria e força. Por ter me iluminado, me guiado e ter me permitido chegar até aqui.

Agradeço a minha família, meu seio, meu lar. Ao meu pai por ter me ofertado o essencial, o melhor, os estudos e por meio disso ter me possibilitado chegar até aqui. A minha mãe, minha base, carinho, conforto, amor e paz. A minha irmã Simone meu exemplo, admiração, sustento e amor. Aos meus sobrinhos Pedro, Beatriz e Davi – minhas paixões.

Preciso imensamente agradecer aos alunos de Iniciação Científica que compõe o nosso Laboratório de Neuroendocrinologia e Estresse Perinatal, os quais se tornaram minha família na UFES, sendo essenciais: Martielo Januário, Randriely Mercher, Lara Lima, Jéssica Duarte e Thiago Ouverney.

Especificamente agradeço ao Martielo por ter me ensinado os primeiros passos na pesquisa científica e o cuidado com os animais; pela sua paciência, presença e conhecimento.

Randriely pela delicadeza, companheirismo e por tantos fins de semana comigo na UFES realizando testes comportamentais.

Lara pela amizade e por ter estado presente tantas vezes na execução do exercício físico.

Jéssica pela doçura, simpatia e disponibilidade em ajudar.

Thiago pelos experimentos, sacrifícios, cumplicidade e alegria.

Agradeço a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Bittencourt, pela oportunidade, confiança e criticidade, me ensinando a crescer e desenvolver a pesquisa científica com qualidade.

Ao Prof. Dr. Athelson S. Bittencout pelo apoio técnico.

A todos os funcionários do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da UFES (João, Rodolfo, Jailson e Amarildo) pela companhia, auxílio e apoio, durante a execução e trato com os animais.

Ao pós-doutor do PPGBF Felipe Andrich, pela gentileza, ajuda e conhecimento transmitido nas análises bioquímicas.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM), aos funcionários Klesia, Lara, Natércia, Evaldo e Prof. Dr. Alexandre Martins, que me receberam, disponibilizaram recursos físicos e humanos, e me nortearam na execução das dosagens bioquímicas.

Agradeço aos demais alunos do PPGBF por auxílios; a Rafaella V. R. Barbosa, pela amizade, companheirismo e contribuição neste trabalho.

Às minhas amigas queridas Giselle, Letícia, Grazi, Isabela, Priscila, Núbia, Daniela, por tantos momentos de alegria.

Agradeço ainda aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da UFES pelo acolhimento, aos professores da banca pela avaliação, à Universidade Federal do Espírito Santo pelo conhecimento e a CAPES pelo sustento.

A todos vocês o meu muito obrigada!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,  
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Importância da relação maternal perinatal .....	1
1.2. Eventos adversos no período perinatal e resposta ao estresse .....	3
1.3. Separação Maternal .....	4
1.4. Desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na idade adulta.....	5
1.5. Enriquecimento Ambiental como alternativa não farmacológica para a prevenção de transtornos psiquiátricos.....	9
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1. Objetivo geral .....	12
2.2. Objetivos específicos .....	12
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
3.1. Animais experimentais .....	13
3.2. Delineamento Experimental .....	14
3.3. Protocolo de Separação Maternal .....	14
3.4. Protocolo de Enriquecimento Ambiental .....	15
3.5. Testes Comportamentais .....	17
3.5.1. Teste do Nado Forçado.....	17
3.5.2. Avaliação da Preferência pela Sacarose.....	18
3.5.3. Labirinto em Cruz Elevado .....	20

3.5.4. Teste de Odor de Predador .....	21
3.5.5. Avaliação da Preferência pelo etanol .....	23
3.5.6. Teste de Reconhecimento de Objetos .....	24
3.6. Estresse agudo por imobilização .....	26
3.7. Eutanásia e obtenção das amostras.....	27
3.8. Dosagem de corticosterona plasmática por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	28
3.9. Análise do conteúdo de dopamina e seus metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	28
3.10. Análise Estatística.....	30
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. Comparação dos protocolos de separação maternal por 14 dias e 21 dias .....	31
4.2. Teste do Nado Forçado .....	33
4.3. Avaliação da preferência por sacarose.....	34
4.4. Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	34
4.5. Teste de Odor de Predador .....	36
4.6. Avaliação da preferência por etanol.....	39
4.7. Teste de Reconhecimento de Objetos.....	40
4.8. Níveis plasmáticos de corticosterona.....	41
4.9. Concentração de Dopamina e seus metabólitos em estruturas encefálicas.....	42
4.9.1. Análise do conteúdo dopaminérgico no córtex pré-frontal.....	42

4.9.2. Análise do conteúdo dopaminérgico no núcleo accumbens.....	44
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
5.1. Comparação entre os protocolos de Separação Maternal por 14 e 21 dias .....	47
5.2. Avaliação da Resposta do eixo HHA ao estresse.....	48
5.3. Testes comportamentais para aferição de depressão .....	49
5.4. Testes comportamentais para aferição de ansiedade .....	50
5.5. Sistema mesocorticolímbico e abuso de álcool .....	53
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>60</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>76</b>
9.1. Certificado do CEUA de aprovação do presente estudo.....	76
9.2. Ganho ponderal ao longo do período de Enriquecimento Ambiental.....	76

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental dos protocolos de Separação Maternal e Enriquecimento Ambiental

Figura 2. Caixa com Enriquecimento Ambiental

Figura 3. Caixa padrão

Figura 4. Teste do Nado Forçado

Figura 5. Avaliação da preferência pela sacarose

Figuras 6a e 6b. Labirinto em Cruz Elevado

Figuras 7a e 7b. Teste de Odor de Predador

Figura 8a. Primeira sessão de exposição do dia 2 do Teste de Reconhecimento de Objetos

Figura 8b. Segunda sessão de exposição do dia 2, para avaliar a memória de curta duração do Teste de Reconhecimento de Objetos

Figura 8c. Dia 3, avaliação da memória de longa duração no Teste de Reconhecimento de Objetos

Figura 9. Tempo de imobilidade e tempo de nado ativo, expressos em segundos, durante o período de 5 minutos no teste do Nado Forçado

Figura 10. Tempo de permanência nos braços abertos e fechados do Labirinto em Cruz Elevado, durante um período de 5 minutos.

Figura 11. Tempo de imobilidade e tempo de nado ativo, expressos em segundos, durante o período de 5 minutos no teste do Nado Forçado.

Figura 12. Porcentagem média de solução de sacarose consumida no total de líquido ingerido nos períodos de 24hs.

Figura 13. Tempo de permanência nos braços abertos e fechados do Labirinto em cruz elevado, durante um período de 5 minutos.

Figura 14. Número de entradas nos braços abertos e fechados do Labirinto em Cruz Elevado, durante um período de 5 minutos.

Figura 15. Tempo no compartimento escondido, em segundos, durante o período de 5 minutos, no teste de odor de predador.

Figura 16. Tempo de exploração do odor do predador, em segundos, durante o período de 5 minutos, no teste de odor de predador.

Figura 17. Porcentagem média de solução de etanol consumida no total de líquido ingerido nos períodos de 24hs.

Figura 18. Tempo relativo de exploração do objeto novo na memória de curta duração do teste de reconhecimento de objetos, durante um período de 10 minutos.

Figura 19. Tempo relativo de exploração do objeto novo na memória de longa duração do teste de reconhecimento de objetos, durante um período de 10 minutos.

Figura 20. Níveis de corticosterona plasmática em animais controle e submetidos ao estresse agudo (imobilização por 30 minutos).

Figura 21. Dosagem de Dopamina no córtex pré-frontal.

Figura 22. Dosagem de Dopac e HVA no córtex pré-frontal.

Figura 23. Razão DOPAC/Dopamina no córtex pré-frontal.

Figura 24. Dosagem de neurotransmissor no accumbens.

Figura 25. Razão DOPAC/Dopamina no accumbens.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH Hormônio adrenocorticotrófico

ANOVA Análise de variância

ATV Área tegmentar ventral

BDNF Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CEUA Comitê de Ética no uso de animais

CnAmy Núcleo central da amígdala

COMT Catecol-Ometiltransferase

CPF Córtex pré-frontal

CPFm Córtex pré-frontal medial

CRH Hormônio Regulador de Corticotrofina

DA Dopamina

DAT Transportador de dopamina

DNA Ácido desoxirribonucléico

DOPAC Ácido 3,4- diidroxifenilacético

EA Enriquecimento ambiental

EBA Entrada nos braços abertos

EBF Entrada nos braços fechados

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EP Erro padrão

EPM Erro padrão das médias

HHA Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HVA Ácido homovanílico

LCE Labirinto em cruz elevado

MAO Monoaminoxidase

MCD Memória de curta duração

MLD Memória de longa duração

NAcc Núcleo accumbens

NEA Não-enriquecidos

NGF Fator de crescimento nervoso

NS Não-separados (animais não submetidos ao protocolo de separação maternal)

PCT Peso corporal total

PVNH Núcleos paraventriculares do hipotálamo

RNA<sub>m</sub> Ácido ribonucleico mensageiro

S Separados (animais submetidos ao protocolo de separação maternal)

SINAN Sistema Nacional de Agravos de Notificação

SM Separação Maternal

SNC Sistema Nervoso Central

TBA Tempo nos braços abertos

TBF Tempo nos braços fechados

TOP Teste de Odor de Predador

TRO Teste de Reconhecimento de Objetos

UFES Universidade Federal do Espírito Santo

UNESCO Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura

## RESUMO

A relação maternal perinatal tem fundamental importância no desenvolvimento de circuitos neurais saudáveis que permanecerão como herança mental ao longo da vida. Logo, eventos adversos nesse período tem potencial para desencadear psicopatologias na idade adulta, aumentando a vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos e abuso de substâncias. Neste trabalho foi realizada a Separação Maternal (SM) em ratos *Wistar* machos, no intuito de mimetizar um evento estressor sustentado na infância de humanos. Em seguida, os animais foram submetidos ao protocolo de Enriquecimento Ambiental, uma estratégia não farmacológica empregada num período de plasticidade cerebral, como estratégia potencial para reverter os efeitos prejudiciais da SM. Na idade adulta, procederam-se os testes comportamentais, para aferição de depressão, ansiedade e abuso de álcool, e bioquímicos, como a dosagem de corticosterona plasmática, indicativo da reatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) ao estresse agudo, e dosagem de dopamina e seus metabólitos em estruturas envolvidas em processo de gratificação cerebral – via mesocorticolímbica (núcleo accumbens e córtex pré-frontal). A análise estatística foi realizada por meio do teste *t* de *Student*, análise de variância de uma via, duas vias, três vias ou medidas repetidas. Observamos que um protocolo de SM mais extenso tem maior impacto no desenvolvimento de comportamento depressivo na idade adulta. Não observamos hiperresponsividade do eixo HHA em animais separados em resposta a estresse agudo. O EA aumentou a preferência pelo consumo de sacarose e SM e EA concomitantemente aumentaram os comportamentos ativos no Teste do Nado Forçado, sugerindo potencial antidepressivo do EA. O EA parece ter potencial ansiolítico, ao reduzir a ansiedade aprendida aversiva no Teste de Odor de Predador, sem efeito significativo da SM nesses comportamentos. A SM aumenta a preferência pelo consumo de etanol e o EA foi capaz de prevenir esse efeito. No córtex pré-frontal a SM aumentou a quantidade de dopamina e o EA aumentou o *turnover* dopaminérgico, sugerindo recuperação até certo ponto da atividade dopaminérgica cortical. No núcleo accumbens, SM e EA concomitantemente reduziram os níveis de DOPAC, sem alteração no *turnover* dopaminérgico. SM e EA parecem não interferir nas memórias de curta e longa duração. Dessa forma, observamos por meio de

alterações comportamentais e bioquímicas que eventos adversos perinatais aumentam a vulnerabilidade ao desenvolvimento de abuso de álcool e outros transtornos psiquiátricos na idade adulta; e o EA, empregado na fase de plasticidade neural, tem potencial para exercer efeito compensatório sobre os déficits gerados.

Palavras chave: Separação maternal, Transtornos psiquiátricos, Enriquecimento ambiental.

## ABSTRACT

The perinatal maternal relationship has a fundamental importance in the development of healthy neural circuits that remain as mental bequest throughout life. In this sense, adverse events in this period have the potential to induce psychopathology in adulthood, increasing vulnerability to psychiatric disorders and substance abuse. In this study, the Maternal Separation (MS) was performed in male *Wistar* rats, with the intention to mimic a sustained stress in human childhood. After that, the animals were submitted to the Environmental Enrichment protocol, a non-pharmacological strategy employed during a strong brain plasticity period, in order to prevent the harmful effects of MS. In adulthood, we proceeded to the behavioral tests for evaluate depression, anxiety and alcohol abuse, as well as biochemical tests as the analysis of plasmatic corticosterone, indicative of the reactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis to acute stress, and analysis dopamine and metabolites in structures involved in brain reward process – the mesocorticolimbic way (nucleus accumbens and prefrontal cortex). Statistical analysis was performed using the *Student t* test and one-way, two-way, three-way or repeated measures analysis of variance (ANOVA). We found that a more extensive SM protocol have greater impact on the development of depressive behavior in adulthood. We did not observe hyperresponsiveness of the HPA axis in separated animals in response to acute stress. EA increased the preference for sucrose consumption and SM and EA concurrently increased the active behaviors in the forced swimming test, suggesting antidepressant potential of the EA. EA appears to have anxiolytic potential to reduce learned anxiety in response to an aversive odor in the Predator Odor Test, and we observed no significant effect of SM in these behaviors. MS increases the preference for ethanol consumption, and EA was able to prevent this effect. In the prefrontal cortex, SM increased the amount of dopamine and EA increased dopaminergic *turnover*, suggesting a limited recovery of dopaminergic cortical activity. In the nucleus accumbens, SM and EA concurrently reduced DOPAC levels, without altering the dopaminergic *turnover*. SM and EA appear do not interfere with short and long-term memories. Thus, we observed through behavioral and biochemical changes that adverse events perinatal increase vulnerability to developing alcohol abuse and other psychiatric disorders in

adulthood; the EA, employee in neural plasticity phase, has the potential to exert effect compensatory on generated deficits.

Keywords: Maternal Separation, Psychiatric Disorders, Environmental Enrichment.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Importância da relação maternal perinatal

Ao nascimento o cérebro é um dos muitos órgãos imaturos no bebê. Seu desenvolvimento requer um minucioso processo de proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação celular, e sofrerá influência de fatores genéticos e ambientais para formar uma rede neuronal funcional (Dubois *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2011).

Os recém-nascidos são dependentes da mãe fisiologicamente e psicologicamente. Fisiologicamente, para a nutrição, termorregulação, estimulação da micção e desenvolvimento do input sensorial tátil, que se dá através do contato pele a pele (Alberts, 2007). E psicologicamente devido ao contato íntimo, transmitindo proteção, zelo e segurança, que vão contribuir para o desenvolvimento de circuitos neurais saudáveis e relações sociais de afeto e bem estar, que permanecerão como herança mental por toda a vida (Cirulli *et al.*, 2003; Meaney, 2001).

O cuidado e o envolvimento da cria estimulam a memória, o aprendizado espacial e o desenvolvimento hipocampal (Liu *et al.*, 2000); reduzem a resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) ao estresse (Liu *et al.*, 1997; Koe *et al.*, 2014); previnem hipotermia; estimulam a lactação (Winberg, 2005); melhoram a taxa cardíaca e respiratória, a saturação de oxigênio, o sono, o desenvolvimento neurocomportamental e aliviam a dor (Conde-Agudelo, 2011; Rodgers, 2013; Winberg, 2005).

Até meados da década de 1970, o procedimento adotado comumente nas maternidades do mundo era a separação mãe-bebê pós-natal imediata, para que eles fossem lavados, pesados, vestidos e transferidos ao “quartinho do recém-nascido”, só se reaproximando da mãe momentos depois para a amamentação (Rodgers, 2013). Porém, isso se configurava numa separação severa, posto que se iniciava mesmo antes de qualquer aproximação corporal.

Em 1978 foi proposto o Método Canguru ou “Kangaroo mother care”, pelo Dr. Edgar Rey Sanabria, na Universidade de Bogotá, Colômbia, que consistiu no contato pele a pele mãe-bebê imediatamente após o nascimento por pelo menos uma hora. Esse método alcançou significativa redução da mortalidade infantil, sobretudo em recém-nascidos prematuros (Charpak *et al.*, 2005; Conde-Agudelo, 2011) e consequente ampla aceitação.

Traçando um paralelo, na sociedade atual muitas crianças crescem sem desenvolver vínculo afetivo com seus pais e cuidadores, por vezes sofrem negligência ou maus tratos infantis, somado a estimulação ambiental deficitária, principalmente quando em baixas condições socioeconômicas.

Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) revelam que no ano de 2014 foram registrados 22.406 casos de violência por abandono e negligência a menores de 10 anos de idade, sendo que aproximadamente 38% deles são referentes a crianças com até quatro anos; e só no Estado do Espírito Santo, neste mesmo ano, ocorreram mais de 200 casos de negligência. As crianças também são vítimas de outros tipos de violência, como psico/moral, tortura, sexual, trabalho infantil, ameaça, agressão, dentre outras (BRASIL, 2014).

Corroborando, Bordini e Paula (2007), com o objetivo de evidenciar a relação entre maus tratos infantis e o desenvolvimento de psicopatologias na vida adulta, fizeram uma análise de nove estudos epidemiológicos brasileiros da infância e da adolescência, publicados a partir de 1980. Eles observaram altas taxas de prevalência de transtornos psiquiátricos entre famílias de baixa renda (aproximadamente 23%), além de estarem associados às características familiares (como mãe solteira, ausência paterna e brigas frequentes entre os pais), com atrasos no desenvolvimento mental e motor de menores de três anos de idade.

Também foi descrito na clínica que a exposição a vários traumas na infância, mais do que a exposição a um único trauma, aumenta o risco de psicoses na idade adulta (Galletly *et al.*, 2011).

Assim, é notória a relação entre cuidado perinatais, estimulação ambiental e desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na idade adulta.

## 1.2. Eventos adversos no período perinatal e resposta ao estresse

Eventos traumáticos na infância (como negligência, abandono, perda dos genitores/cuidadores, cuidado parental inadequado, divórcio, educação sem afeto e abuso físico, emocional ou sexual) têm potencial para causar alterações neuroendócrinas e resposta de medo exacerbada (Heim & Nemeroff, 2001; Kalinichev *et al.*, 2002).

Em 1936, o cientista Hans Selye definiu a resposta ao estresse como “uma resposta adaptativa do organismo à ação de agentes agressores”. A resposta ao estresse seria dividida em três estágios: o primeiro é um alarme, no qual o agente agressor é notado; o segundo é a resistência, no qual o organismo combate o agente agressor com sucesso, e o terceiro e último estágio é de exaustão, no qual o organismo esgota sua capacidade de resposta de estresse, acarretando os seus efeitos deletérios (Selye, 1936, *apud* Kopin, 1995). Logo, o estressor potencialmente pode perturbar a homeostase, e requer uma resposta fisiológica para promover adaptação (McEwen, 2002).

As respostas ao estresse são essenciais para a sobrevivência, desencadeando, de forma geral, aumento da disponibilidade de energia, melhora do fluxo sanguíneo para órgãos-alvo e da função cognitiva (Chrousos & Gold, 1992). O mecanismo envolve dois sistemas classicamente descritos: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e sistema nervoso autônomo (McEwen, 2002).

Em resposta ao estresse agudo ocorre ativação da amígdala, estrutura relacionada a medo, ansiedade e situações de alerta e dos núcleos paraventriculares do hipotálamo (PVNh). Por sua vez, o hipotálamo secreta o hormônio regulador de corticotrofina (CRH, do inglês *corticotropin-releasing hormone*) que estimula a adenohipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *adrenocorticotropic hormone*), que atua sobre o córtex das glândulas adrenais estimulando a liberação e, conseqüentemente, aumentando os níveis de glicocorticoides circulantes – ativação do eixo HHA. Paralelamente, a amígdala por meio de projeções para o locus coeruleus, área tegmentar ventral, e outras estruturas, estimula a liberação e conseqüente aumento da disponibilidade de

catecolaminas, para potencializar uma reação de defesa (Chrousos & Gold, 1992; Francis *et al.*, 1999; Kopin, 1995; Spiga *et al.*, 2014).

Os altos níveis de glicocorticoides circulantes se ligam a receptores de glicocorticoides presentes no hipocampo e córtex pré-frontal, exercendo um *feedback* negativo sobre o hipotálamo e regulando assim a atividade do eixo HHA.

Porém, o estresse sustentado parece ser danoso ao organismo ao comprometer o equilíbrio neuro-hormonal (Dallman *et al.*, 2004), por meio de sensibilização persistente do eixo HHA e de circuitos do sistema nervoso central (SNC); estimular concentrações elevadas e sustentadas de glicocorticoides e neurotransmissores, e ainda desencadear outros prejuízos clínicos (Brake *et al.*, 2004; McEwen, 1998, 2002).

Liu e colaboradores (1997) descreveram animais com cuidados maternos nos 10 dias pós-natal, evidenciando redução dos níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona em resposta a estresse agudo, e aumento da expressão de receptores de glicocorticóides no hipocampo, com melhora da sensibilidade ao *feedback* negativo.

Dessa forma, uma resposta adequada do eixo HHA ao estresse parece reduzir o risco de doenças, ao passo que uma resposta exagerada aumentaria o risco de transtornos psiquiátricos e envelhecimento cerebral (Francis *et al.*, 1999).

### **1.3. Separação Maternal**

Para mimetizar um evento adverso na infância de humanos é realizada a Separação Maternal (SM) em ratos, que consiste na perturbação da interação mãe-filhote, causando estresse sustentado. São descritos alguns modelos na literatura, dentre eles a SM por 180 min/dia, 21 dias pós-natal, período que correspondente à infância do animal.

A exposição a estresse sustentado no período perinatal tem importante impacto, pois nesse período o eixo HHA possui alta plasticidade e regulação extremamente fina (Francis *et al.*, 1999; Marco *et al.*, 2011); somado ao SNC estar

em fase de formação e desenvolvimento (Dubois *et al.*, 2014), podendo desencadear prejuízos neurais.

Os fatores ambientais, como exposição ao estresse e a drogas, têm influência no surgimento desses transtornos, principalmente durante a janela de idade com maior propensão a vulnerabilidade (Marco *et al.*, 2011). Eles induzem modificações epigenéticas em áreas específicas do encéfalo, alterações na função neural e no comportamento (Pena *et al.*, 2014; Reul, 2014).

A SM produz alterações neuroendócrinas em longo prazo descritas em indivíduos adultos, tais como: aumento dos níveis plasmáticos de ACTH e de corticosterona em resposta ao estresse, aumento da expressão do gene de CRH nos PVNh e núcleo central da amígdala (Plotsky & Meaney, 1993; Liu *et al.*, 2000), redução da densidade de receptores de glicocorticóides no hipocampo e no córtex pré-frontal (Macri & Wurbel, 2007; Dallman *et al.*, 1994), com consequente redução da sensibilidade ao *feedback* negativo do eixo HHA (Ladd *et al.*, 2000), alteração dos sistemas monoaminérgicos (Holmes *et al.*, 2005), dentre outros.

Em meio a isso, a disfunção contínua do sistema do estresse tem impacto em várias enfermidades, destacando-se as psiquiátricas (Chrousos & Gold, 1992; Sanchez *et al.*, 2001).

A SM possui alta validade preditiva, pois foi descrita desencadeando comportamentos de depressão, ansiedade, aumento do consumo de etanol e prejuízo cognitivo na idade adulta, revertidos pela administração de antidepressivos (Kalinichev *et al.*, 2002, Ladd *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2001; Khoury *et al.*, 2006; Huot *et al.*, 2001).

#### **1.4. Desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na idade adulta**

O estresse prolongado pode afetar o organismo de diversas formas, com grande potencial influenciador no desenvolvimento de transtornos mentais.

Os transtornos psiquiátricos são um complexo multifatorial de doenças que envolvem alterações crônicas estruturais e funcionais em circuitos neurais (Jingwen

*et al.*, 2013). Os mais comuns e potencialmente incapacitantes são: depressão, ansiedade, abuso de substâncias e esquizofrenia (Heim & Nemeroff, 2001).

Levantamentos epidemiológicos realizados pelo Ministério da Saúde (2008) apontam para uma prevalência anual dos transtornos mentais em torno de 20% da população brasileira; 3% da população geral sofre com transtornos mentais severos e persistentes; 6% apresenta transtornos psiquiátricos graves decorrentes do uso de álcool e outras drogas; 12% necessita de algum atendimento em saúde mental, seja ele contínuo ou eventual e 2,3% do orçamento anual do Sistema Único de Saúde é destinado à Saúde Mental.

Dentre os sistemas neurotransmissores envolvidos na patofisiologia dos transtornos psiquiátricos estão o dopaminérgico, serotoninérgico, noradrenérgico, glutamatérgico, dentre outros (Braun *et al.*, 2000; Matthews *et al.*, 2001; Brake *et al.*, 2004). Nesse contexto, o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico tem grande importância funcional, podendo ser ativado por diferentes tipos de estressores e drogas de abuso.

Corpos de neurônios dopaminérgicos localizados na área tegmentar ventral do mesencéfalo (ATV), emitem projeções amplamente divergentes que inervam muitas áreas do prosencéfalo, como o córtex pré-frontal medial (CPFm) - via mesocortical - e o núcleo accumbens (NAcc) - via mesolímbica. Dessa forma, está envolvido na regulação de funções motoras, emocionais, cognitivas e no sistema de recompensa (Tzschentke, 2001; Arnsten, 2009; Meaney *et al.*, 2002; Jahng *et al.*, 2010).

Em condições de estresse agudo, durante o estado de alerta, os neurônios dopaminérgicos da ATV são ativados por meio de projeções glutamatérgicas vindas da amígdala, e aumentam a síntese, liberação e consequente atividade dopaminérgica no CPF, visando otimizar as respostas adaptativas.

O CPF é a parte anterior do lobo frontal e está relacionado com funções nas quais a dopamina tem um papel relevante, sendo elas: funções cognitivas superiores, executivas, memória de trabalho, atenção, comportamento social e humor; organizadas num ciclo de percepção-ação, que culminam com uma expressão comportamental (Fuster, 2004).

Possui densa inervação dopaminérgica, sendo extensamente conectado a regiões corticais e subcorticais, exercendo uma fina regulação sobre o estriado, amígdala e hipotálamo, por exemplo: na mediação da recompensa, em estados de humor, estresse, alerta, atenção seletiva, memória, inibição de ações inapropriadas, etc (Yang & Raine, 2009; Fuster, 2004). Ainda as catecolaminas podem regular o próprio *input*, sendo que níveis ótimos melhoram a regulação do CPF.

Entretanto o CPF também é uma estrutura muito sensível aos efeitos prejudiciais do estresse e diversas condições psiquiátricas têm sido associadas a sua disfunção (Tzschentke, 2001; Heidbreder & Groenewegen, 2003).

Em condições de estresse prolongado, ocorre ativação exacerbada da amígdala, liberação de altos níveis de noradrenalina e dopamina no cérebro, estimulação excessiva de receptores dopaminérgicos, hiperativação e comprometimento do *feedback* negativo do eixo HHA, indução de alterações epigenéticas e perda da função reguladora do CPF (Arnsten, 2009; Chrousos & Gold, 1992; Dallman *et al.*, 2004; Francis *et al.*, 1999; Darnaudéry & Maccari, 2008).

A exposição a insultos ambientais induz alterações estáveis na expressão de genes (Pena *et al.*, 2014) e eventos adversos durante a infância causam redução da expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), aumento da metilação do DNA e retração dendrítica permanente no CPF de animais adultos (Roth *et al.*, 2009; Pascual & Zamora-León, 2007). Ainda, danos ao CPF cedo na vida induzem: prejuízo cognitivo, déficit de atenção, de funções executivas, planejamento e dependência por substâncias (Eslinger *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 1996).

A dopamina (DA) é um neurotransmissor da família das catecolaminas, sintetizado no citoplasma do neurônio pré-sináptico a partir do aminoácido tirosina, sob ação da enzima tirosina hidroxilase. A DA fica armazenada em vesículas no citoplasma neuronal e sob disparo espontâneo dos neurônios ou em resposta a estímulos relevantes é liberada nas sinapses neuronais, podendo interagir com receptores dopaminérgicos pós-sinápticos metabotrópicos (acoplados a proteína G) produzindo uma resposta, com auto-receptores pré-sinápticos com função moduladora, pode sofrer metabolização no espaço sináptico ou recaptação pelo

transportador de DA para o citoplasma do neurônio pré-sináptico (Cooper *et al.*, 2003).

A DA pode ser rearmazenada nas vesículas e ser reutilizada; ou sofrer metabolização, caracterizando o término de sua ação. A metabolização pode ser intraneuronal pela ação da enzima monoaminaoxidase (MAO), originando ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) ou no espaço extraneuronal, pela ação sequencial das enzimas catecol-Ometiltransferase (COMT) e MAO, originando ácido homovanílico (HVA).

Para modular a função dopaminérgica, ainda existem auto-receptores dopaminérgicos nos dendritos, corpo celular e terminais nervosos, sendo que a estimulação de auto-receptores somatodendríticos diminui a taxa de disparo desses neurônios e a estimulação de auto-receptores dos terminais nervosos inibem a síntese e liberação de DA nas sinapses (Cooper *et al.*, 2003).

As vias dopaminérgicas ascendentes que abordaremos neste trabalho surgem e tem os corpos dos neurônios dopaminérgicos na ATV e se projetam para o córtex pré-frontal (via mesocortical) e para estruturas límbicas como o núcleo accumbens, amígdala e hipocampo (via mesolímbica).

O núcleo accumbens, localizado no núcleo caudado, estriado, é uma área de convergência de estímulos procedentes da amígdala, hipocampo, área tegmentar ventral e córtex pré-frontal, e medeia propriedades prazerosas de motivação, recompensa, impulsividade e emoção (Nicola, 2007). Principalmente nessa estrutura, mas também em outras regiões do sistema límbico, foram descritas alterações moleculares, estruturais e funcionais no circuito de gratificação cerebral, implicando na regulação das respostas ao estresse e a recompensa (Cisler *et al.*, 2013; Robison & Nestler, 2011).

Evidências mostram que os efeitos do estresse sustentado mimetizam e podem ter uma sensibilização cruzada com outros estimulantes, visto que repetidas exposições ao estresse aumentam as respostas comportamentais não somente ao estresse subsequente, mas também ao abuso de drogas (Robinson & Becker, 1986; Sorg & Kalivas, 1991). O desenvolvimento dessa sensibilização parece estar

envolvido com ativação do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico e aumento da liberação de dopamina no NAcc (Rougé-Pont *et al.*, 1995; Kalivas & Stewart, 1991).

Corroborando, na clínica eventos estressores cedo na vida foram relacionados com aumento do risco de dependência ao etanol (Kendler *et al.*, 2000).

Apesar de existirem muitas pesquisas na área, ainda não estão completamente claros os mecanismos pelos quais os eventos adversos na infância influenciam a vulnerabilidade ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na idade adulta.

Atualmente, a clínica psiquiátrica é avaliada comportamentalmente e o tratamento, iniciado após o início do transtorno, abrange acompanhamento terapêutico multiprofissional e farmacológico, com utilização de medicamentos antidepressivos, antipsicóticos, estabilizadores de humor, ansiolíticos, dentre outros.

Dessa forma, compreender e tentar modular os fenômenos envolvidos nas respostas às adversidades no período perinatal é uma interessante ferramenta para a saúde pública, na perspectiva de prevenir o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos.

### **1.5. Enriquecimento Ambiental como alternativa não farmacológica para a prevenção de transtornos psiquiátricos**

Estratégias não farmacológicas, como o Enriquecimento Ambiental (EA), têm sido utilizadas na tentativa de intervir em alterações prejudiciais geradas por eventos adversos perinatais e prevenir a ocorrência de transtornos psiquiátricos na idade adulta.

O Enriquecimento Ambiental é um procedimento não invasivo, acessível e de baixo custo, que tem potencial para prevenir efeitos deletérios do estresse, quando aplicado na fase de plasticidade cerebral.

O EA pode ser definido como “uma combinação de um complexo inanimado e estimulação social” (Rosenzweig *et al.*, 1978). Ele consiste na alocação de animais em caixas de dimensões maiores, em grupos para promover interação social,

expostos a objetos atrativos (tais como brinquedos, túneis e roda de atividade; com cores, texturas e tamanhos diferentes) para promover experiência motora e sensória, sendo esses trocados regularmente, para estimular a curiosidade, atenção e exploração voluntária do animal. Esse ambiente enriquecido é comparado com um ambiente padrão (controle), no qual os animais são alocados em caixas de dimensões padrão e sem nenhum tipo de atrativo, somente água e comida.

Corroborando, Francis e colaboradores (2002) observaram que o protocolo de EA em ratos foi capaz de reverter os efeitos prejudiciais da SM sobre a função do eixo HHA, tornando sua responsividade similar à observada em animais não separados.

Já está bem descrito que o ambiente exerce profundos efeitos nos processos de plasticidade cerebral, e que esta se encontra com potencial mais elevado no cérebro juvenil, que está em fase de maturação, a partir daí sofrendo redução, ao ser alcançada a maturidade cerebral (Sale *et al.*, 2014).

A plasticidade cerebral é a capacidade dos neurônios e dos circuitos neurais sofrerem alterações moleculares, estruturais e funcionais em resposta a experiência. A plasticidade cerebral molecular envolve, por exemplo, alteração na expressão de proteínas; a plasticidade estrutural alteração na eficácia ou eliminação de contatos sinápticos existentes, formação de novos contatos sinápticos, alterações na arborização axonal e dendrítica; e a plasticidade funcional, alteração em funções cognitivas e comportamentais (Baroncelli *et al.*, 2011; Sale *et al.*, 2014).

Um dos principais efeitos do EA é estimular a expressão cerebral de fatores neurotróficos, por serem sensíveis a estímulos ambientais. Por exemplo, foram descritos aumento dos níveis de RNAm de proteína de BDNF, NGF, *c-fos* e outras neurotrofinas em várias regiões cerebrais (Ickes *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2002).

A exposição ao ambiente enriquecido induz notáveis respostas plásticas na morfologia cerebral e neuroquímica; com aumento de arborização e do comprimento de espinhas dendríticas, aumento do tamanho e número de sinapses por neurônio, aumento da gliogênese e vascularização cerebral, aumento da espessura, do peso e do volume do córtex e do hipocampo (Rosenzweig & Bennett, 1996; Diamond, 2001; Sale *et al.*, 2014).

Por outro lado, a exposição a condições de isolamento social em ratos, que se constitui um evento adverso, evidenciou redução da sobrevivência e da diferenciação neuronal em regiões do hipocampo e redução do volume cerebral e do córtex pré-frontal (Lu *et al.*, 2003; Day-Wilson *et al.*, 2006; Schubert *et al.*, 2009).

O EA também atenua alterações neuromorfológicas provocadas por isquemia cerebral (Pereira *et al.*, 2007), previne adição a drogas (Solinas *et al.*, 2010), compensa danos neurais induzidos por patologias (Laviola *et al.*, 2008) e melhora a performance em testes envolvendo funções cognitivas superiores, como aprendizado espacial e memória (Arai *et al.*, 2011).

Dessa forma, este trabalho investigou os efeitos do enriquecimento ambiental sobre os comportamentos gerados pela separação materna, visando estabelecer uma ferramenta não farmacológica para prevenir os transtornos psiquiátricos decorrentes da exposição a eventos adversos na infância.

Adicionalmente, considerando as observações de que a separação materna induz aumento na auto administração de substâncias de abuso e nas respostas comportamentais a estímulos reforçadores (Matthews & Robbins, 2003; Der-Avakian & Markou, 2010) e dado o envolvimento de vias dopaminérgicas nos processos de adição a drogas (Berridge & Robinson, 1998; Robinson & Berridge, 2000), foi avaliado, nesses mesmos animais, o conteúdo total de dopamina e seus metabólitos no núcleo accumbens e córtex pré-frontal.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar os possíveis efeitos preventivos do enriquecimento ambiental sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela separação maternal.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o desenvolvimento de comportamento depressivo, através do Teste do Nado Forçado e Teste de Preferência por sacarose, em animais submetidos à separação maternal, e verificar o efeito do enriquecimento ambiental sobre esses parâmetros;
- Verificar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre o comportamento de animais submetidos à separação maternal nas primeiras semanas após o nascimento em testes de ansiedade, quais sejam: Labirinto em Cruz Elevado e Teste de Odor de Predador;
- Verificar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre a preferência pelo consumo de etanol em animais submetidos à separação maternal perinatal;
- Avaliar se há interferência da separação maternal e do enriquecimento ambiental na memória de curta e de longa duração dos animais através do Teste de Reconhecimento de Objetos;
- Avaliar o efeito de um estressor agudo sobre os níveis de corticosterona plasmática em animais submetidos à separação maternal e ao enriquecimento ambiental;
- Avaliar, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, os níveis de dopamina e seus metabólitos em homogeneizado de estruturas encefálicas envolvidas em processos aditivos (NAcc e CPF).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais experimentais

Neste estudo, todos os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, agrupado de 3 a 4 ratos/caixa, contendo maravalha como assoalho e fechamento com tampa de metal, sendo sua higienização feita em média três vezes por semana. Eles foram mantidos em temperatura ambiente de  $22 \pm 1$  °C, exaustão externa de ar, acesso a água e ração padrão *ad libitum* e ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 6:00hrs às 18:00hrs), e todas as tarefas comportamentais foram realizadas no período claro.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA nº 057/2011); e foram utilizados cerca de 130 animais para a realização de todos os experimentos, sendo que o número da amostra foi o mínimo suficiente para a obtenção de análises estatísticas fidedignas, no intuito de evitar o uso desnecessário de animais.

Para o cruzamento foram utilizadas cerca de 35 ratos da linhagem *Wistar*, fêmeas, nulíparas, pesando cerca de 250g, e 12 ratos *Wistar* machos, pesando entre 250 a 300g, fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da UFES, os quais foram alocados em caixas de polietileno, com dimensões de 43cmx34cmx17cm, na proporção de 3 fêmeas para cada macho.

Periodicamente as fêmeas eram gentilmente manipuladas para confirmação da gestação e, após cerca de 10 a 15 dias do início do cruzamento, as gestantes eram transferidas e alojadas individualmente em caixas menores (dimensões 30cmx20cmx12cm), nas quais permaneceram até o nascimento dos filhotes e durante toda a fase de amamentação.

Para se determinar e registrar a data de nascimento dos filhotes, as ratas gestantes foram observadas diariamente. No primeiro dia pós-parto (dia 1), foi realizada a sexagem para a padronização das ninhadas, quando as filhotes fêmeas foram eutanasiadas por decapitação e, assim, somente os machos permaneceram com suas mães até o desmame. As ninhadas foram reduzidas ao número de oito

filhotes por rata; para isso, algumas vezes foi necessário misturar as proles de diferentes ratas que apresentaram datas de nascimento próximas, com diferença máxima de 24 horas.

### **3.2. Delineamento Experimental**

As ninhadas foram organizadas em dois grupos: ninhadas controle, não submetidas à SM, que permaneceram nas caixas moradia, juntamente com suas mães, sofrendo o mínimo de manipulação necessária para a higienização das caixas durante o período de amamentação; e ninhadas submetidas ao protocolo de SM, descrito a frente.

### **3.3. Protocolo de Separação Maternal**

A SM foi realizada por 21 dias seguidos, por 3 horas diárias, no turno matutino, dos dias 2 a 22 pós-natal, visto que esse é o período correspondente à infância em ratos – período no qual ocorre a formação e maturação de circuitos neurais e neuroendócrinos por meio da migração, divisão, diferenciação, crescimento e morte de neurônios (Bohn, 1980; Plotsky & Meaney, 1993). Por sua vez, as ninhadas controle permaneceram em contato ininterrupto com suas mães durante todo esse período.

Durante a SM, as mães eram gentilmente removidas das ninhadas para uma segunda caixa, e em seguida todos os filhotes eram retirados da caixa ninho, sendo transferidos e mantidos juntos, em uma terceira caixa, todas de mesmas dimensões (30cmx20cmx12cm), porém esta última contendo maravalha e algodão como assoalhos, visando à mimetização e manutenção da temperatura corporal materna, em torno de  $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Vale citar que a caixa com a mãe foi alocada, durante todo o período de SM, em uma sala distinta da presença dos filhotes, para evitar qualquer tipo de olfação e sonorização entre eles.

Aos 23 dias de idade, as ninhadas foram submetidas ao desmame, randomizadas, de acordo com o peso e a herança genética, alocando de três a quatro ratos/caixa e, organizando-os assim, em quatro grupos experimentais para a

submissão ao protocolo de EA, conforme descritos a seguir. As mães foram eutanasiadas.

Após execução do protocolo de SM, os animais não submetidos à SM (não-separados = NS) e submetidos à SM (separados = S), foram ainda subdivididos e, em seguida, submetidos ou não ao protocolo de Enriquecimento Ambiental, conforme evidencia o desenho experimental abaixo (figura 1).

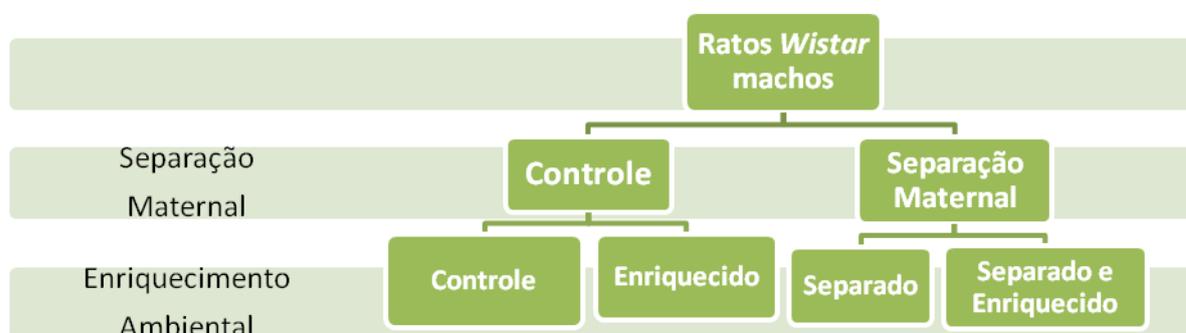


Figura 1. Desenho experimental dos protocolos de Separação Maternal e Enriquecimento Ambiental

### 3.4. Protocolo de Enriquecimento Ambiental

O EA foi iniciado imediatamente após a randomização, aos 23 dias de idade, e mantido por um período de 10 semanas.

Este protocolo foi adaptado a partir dos descritos por Widman & Rosellini (1990) e Konkle *et al.* (2010), e consistiu na exposição a um ambiente enriquecido, composto por uma caixa moradia de polipropileno de maior dimensão que a usual (64cmx44cmx18cm), contendo roda de atividade e objetos de diferentes formas, texturas, cores e tamanhos (figura 2), sendo que os objetos eram trocados e

registrados em ata semanalmente, para o ambiente sempre apresentar algum atrativo novo.

Paralelamente, os animais não submetidos ao ambiente enriquecido foram acondicionados em caixas de polipropileno de tamanho padrão (43 cm x 34 cm x 17 cm) e sem nenhum tipo de incremento ambiental (figura 3).



Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 2. Caixa com Enriquecimento Ambiental (dimensões 64cmx44cmx18cm)**



Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 3. Caixa padrão (dimensões 43cmx34cmx17cm)**

### **3.5. Testes Comportamentais**

Após as 10 semanas de EA, os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais. Foram eles:

- 3.5.1. Nado Forçado;
- 3.5.2. Avaliação da Preferência pela Sacarose;
- 3.5.3. Avaliação da Preferência pelo Etanol;
- 3.5.4. Labirinto em Cruz Elevado;
- 3.5.5. Teste de Odor de Predador;
- 3.5.6. Teste de reconhecimento de objetos.

Para identificação, os ratos foram marcados com caneta de tinta na base do rabo.

#### **3.5.1. Teste do Nado Forçado**

Este teste foi descrito por Porsolt e colaboradores (1977a, 1977b, 1978), para a verificação da depressão em animais, e parte da premissa que animais deprimidos apresentam menos comportamentos ativos durante a submissão ao nado forçado (Castagné *et al.*, 2011).

Neste experimento, os animais foram submetidos ao nado forçado em duas seções, com intervalo de 24 horas entre elas. Eles foram colocados individualmente para nadar em um cilindro azul de polipropileno (50cm de altura e 20cm de diâmetro, preenchido com água até 30cm), de forma que não conseguissem apoiar as patas no fundo e nem tentar escapar do mesmo, conforme mostra a figura 4. A água era renovada sempre que necessário.



Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 4.** Teste do Nado Forçado

No primeiro dia (treino) os animais foram expostos por um período de 15 minutos, somente para habituação ao nado e ao aparato. Após 24 horas, os animais foram novamente submetidos ao nado forçado (teste), por um período de 5 minutos, que foi vídeo monitorado.

Os parâmetros avaliados na 2ª seção (teste) foram: tempo total de imobilidade (seg) e, de forma complementar, o tempo total de nado ativo (seg).

O tempo de imobilidade foi considerado quando o animal boiava e parava de mexer as patas dianteiras, sem intenção de nadar.

### **3.5.2. Avaliação da Preferência pela Sacarose**

Este experimento visou avaliar se o EA seria capaz de alterar o padrão de consumo de sacarose induzido pela separação maternal, visto que a medida da preferência por sacarose pode ser associada à anedonia (Veena *et al.*, 2009; Bessa *et al.*, 2009), que é uma característica da depressão, e que a SM é postulada também como um modelo de depressão.

Neste teste foi avaliado o consumo total de uma solução de sacarose 2,5% ou de água durante três períodos de 24hs, intercalados entre si por períodos de 72 horas.

Para tanto, duas garrafas idênticas com capacidade aproximada de 300mL, foram previamente identificadas, preenchidas com exatos 200mL (volume inicial) de solução de sacarose 2,5% ou de água e pesadas (peso inicial).

Os animais foram alojados isoladamente, em caixas de polipropileno (30cmx20cmx12cm), contendo maravalha como assoalho, ração padrão e livre acesso a duas garrafas, uma contendo solução de sacarose 2,5% e a outra contendo água, para avaliar a preferência dos mesmos (figura 5).



**Fonte:** Arquivo pessoal

**Figura 5.** Avaliação da preferência pela sacarose

Transcorridas exatas 24 horas, as garrafas eram retiradas do consumo dos animais, pesadas (peso final) e era aferido o volume (volume final).

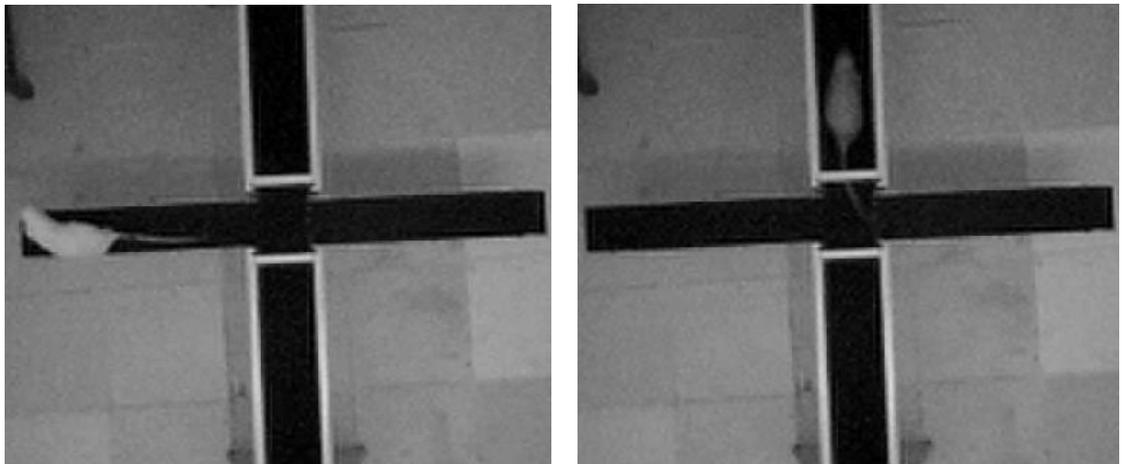
Para medida do consumo, foi calculada a diferença dos valores de peso e volume iniciais e finais, em cada uma das três seções e foi realizada a média aritmética delas.

Vale destacar que, de uma seção para a outra, a ordem das garrafas era invertida, para evitar vício de posição.

### 3.5.3. Labirinto em Cruz Elevado

Esse é um teste comportamental clássico, utilizado para avaliar o grau de ansiedade do animal e a atividade locomotora (Carobrez & Bertoglio, 2005; Hogg, 1996).

O aparato utilizado é de madeira, elevado cerca de 60 centímetros do chão, com dois braços abertos (50cmx10cm) perpendiculares a dois braços fechados (50cmx10cmx40cm) unidos por uma arena central (10cmx10cm), sendo que o animal tinha livre acesso aos quatro braços, conforme mostra as figuras (6a e 6b) e em ambiente com isolamento acústico e baixa luminosidade (30 lux).



Fonte: Arquivo pessoal

Figuras 6a e 6b. Labirinto em Cruz Elevado

O animal era colocado na arena central, com a cabeça direcionada para um dos braços fechados, e seu comportamento foi vídeo monitorado por 5 minutos. Após a exposição de cada rato, o aparato era higienizado. Um observador treinado analisou os seguintes parâmetros:

- Número de entradas nos braços abertos (EBA): uma entrada foi considerada quando o animal colocava as quatro patas no interior de um dos braços abertos;

- Tempo total de permanência nos braços abertos (TBA): esse tempo era iniciado quando o roedor colocava as quatro patas em um dos braços abertos e interrompido quando ele retirava as quatro patas do mesmo;
- Número de entradas nos braços fechados (EBF): uma entrada foi considerada quando o animal colocava as quatro patas no interior de um dos braços fechados;
- Tempo total de permanência nos braços fechados (TBF): esse tempo era iniciado quando o roedor colocava as quatro patas em um dos braços fechados e interrompido quando ele retirava as quatro patas do mesmo;
- Número de avaliações de risco: comportamento em que o animal estende a cabeça e o corpo em direção a um dos braços abertos, no intuito de explorá-lo, permanecendo com pelo menos as patas traseiras no centro do LCE e em seguida retorna com seu corpo totalmente para o centro.

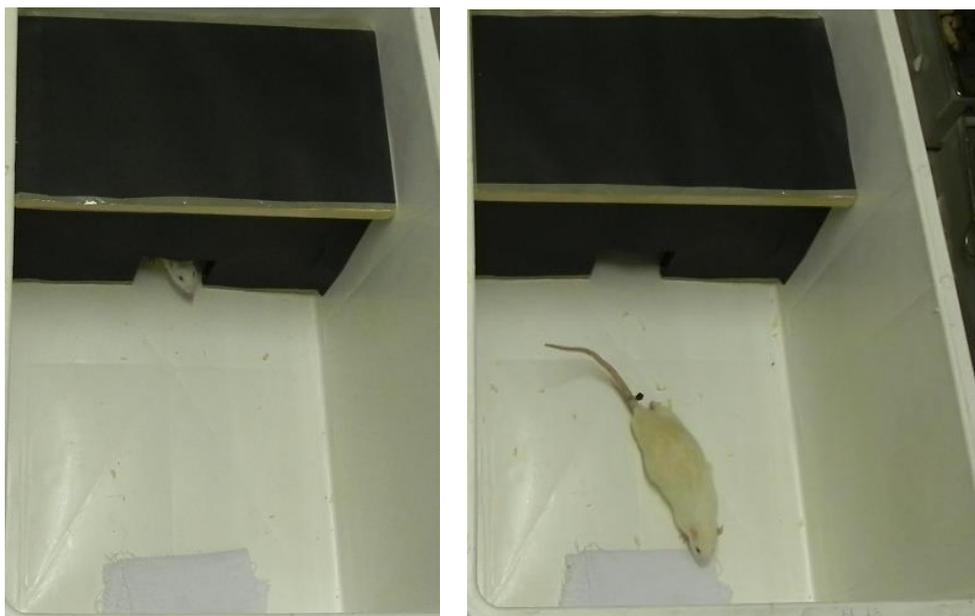
A premissa básica deste teste comportamental é a de que a ansiedade diminua a exploração dos braços abertos e aumente o tempo de permanência dos animais nos braços fechados do aparato, ideia essa que apresenta validação em diversos estudos farmacológicos (Pellow *et al.*, 1985).

#### **3.5.4. Teste de Odor de Predador**

Este experimento foi adaptado a partir do protocolo estabelecido por Dielenberg *et al.* (1999) e Dielenberg & McGregor (2001), e teve como objetivo analisar o comportamento defensivo/aversivo dos animais, ao partir do princípio de que odores derivados do predador (gato) são estímulos altamente efetivos para evocar comportamentos inatos de defesa em roedores, associado com condicionamento de medo contextual, aprendizado aversivo e memória (Blanchard *et al.*, 2003).

Para isso foi utilizado um aparato retangular (83cm x 52cm x 45cm) dividido em dois compartimentos, conforme mostra as figuras 7a e 7b, ambos com 50 cm de

altura: um compartimento aberto (54cmx45cm) onde ficou localizado um pano (40cmx25cm) com ou sem o odor do predador (dependendo da fase do experimento), e um compartimento fechado (29cmx28cm), denominado caixa esconderijo. Conectando os dois compartimentos da câmara havia uma abertura (5cmx5cm) que permitia o trânsito do rato entre os compartimentos, mas que não permitiria a entrada de um predador, como, por exemplo, um gato.



**Fonte:** Arquivo pessoal

**Figuras 7a e 7b.** Teste de Odor de Predador

O experimento foi realizado em três seções, 5 minutos cada seção, com intervalos de 24 horas entre elas, nas quais os animais eram colocados individualmente no aparato, com a cabeça voltada para a fonte de odor, e os comportamentos foram filmados, para posterior avaliação.

No 1º dia (habituação) o animal foi colocado inicialmente no compartimento aberto (próximo ao centro do aparato), que possuía um pano neutro, e dispôs de 5 minutos para explorar todo o aparato.

No 2º dia (condicionamento) foram realizados os mesmos procedimentos, porém o pano continha o odor de predador. O odor foi obtido de um gato adulto,

fêmea, conferido por areia com resíduos de urina do felino, cerca de 3 horas antes do experimento.

No 3º dia (teste) foram realizados os mesmos procedimentos e o pano novamente não tinha o odor do predador (pano neutro). O objetivo foi avaliar a retenção do medo, da ansiedade contextual, aprendizado emocional e memória.

Os parâmetros analisados foram:

- tempo total de permanência no compartimento fechado (iniciava-se essa marcação quando o rato colocava as quatro patas nesse local e interrompia-se quando ele retirava as quatro patas);
- tempo total de permanência investigando o pano (contendo ou não o odor de gato): foi considerado o tempo em que o animal interagia com o pano, por meio do olfato, tato ou visão próxima.

### **3.5.5. Avaliação da Preferência pelo etanol**

Este teste permitiu a livre escolha do animal pelo consumo de etanol ou água, conforme descrito por Huot *et al.* (2001). De forma similar ao descrito para o teste de consumo de sacarose, neste foi avaliado o consumo total de uma solução de 8% de etanol em sacarose 2,5% ou de solução de sacarose 2,5%, durante três períodos de 24hs, intercalados entre si por períodos de 72 horas. Vale salientar que a sacarose foi adicionada para melhorar a palatabilidade da solução etanólica.

Para tanto, duas garrafas idênticas com capacidade aproximada de 300mL, foram previamente identificadas, preenchidas com exatos 200mL (volume inicial) de solução de 8% de etanol em sacarose 2,5% ou de solução de sacarose 2,5% e pesadas (peso inicial). Os animais foram alojados isoladamente, em caixas de polipropileno (30cmx20cmx12cm), contendo maravalha como assoalho, ração padrão e livre acesso às duas garrafas para avaliação da preferência dos mesmos.

Transcorridas exatas 24 horas, as garrafas eram retiradas do consumo dos animais, pesadas (peso final) e era aferido o volume (volume final).

Para medida do consumo, foi calculada a diferença dos valores de peso e volume iniciais e finais, em cada uma das três seções e foi realizada a média aritmética delas.

De uma seção para a outra a ordem das garrafas era invertida, para evitar vício de posição.

### **3.5.6. Teste de Reconhecimento de Objetos**

Este teste foi adaptado a partir do descrito por Ennaceur & Delacour (1988) e parte do princípio de que os roedores são animais exploradores, apresentando uma curiosidade inata à novidade e, dessa forma, sua atenção é voltada primeiramente a um objeto novo ao invés de um objeto familiar. Esse comportamento, associado à memória de curta e de longa duração, são observados e avaliados no Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO).

O TRO foi realizado em 3 dias consecutivos e em 4 seções, das quais duas ocorreram no segundo dia. Cada seção teve 10 minutos de duração, sendo todas videomonitoradas para posterior avaliação por um observador treinado.

O aparato consistiu numa caixa/arena retangular de polipropileno (dimensões 86,5cmx55cmx47,5cm), que continha maravalha como assoalho e fornecia orientação espacial ao animal, por meio de dois símbolos grandes e diferentes (“bolas” e “listras”), de cor preta, que foram impressos em folha de papel A4 e afixados nas laterais de menor comprimento da caixa.

Em todas as seções, os símbolos mantiveram-se afixados nos mesmos pontos cardeais e o animal iniciava sendo posicionado com sua cabeça em direção ao símbolo “listras”. O aparato era limpo entre os testes.

No 1º dia, foi realizada a habituação do animal ao ambiente, que consistiu na exposição a caixa contendo apenas maravalha e as pistas espaciais, para a livre exploração.

No 2º dia foram realizadas duas sessões de exposição, com intervalo de 90 minutos entre elas, para avaliar a memória de curta duração (MCD). Para isso, na primeira exposição desse dia, foram colocados dois objetos idênticos (garrafas de 500 mL transparentes, preenchidas com água) posicionadas de forma paralela, uma em cada extremo da caixa, (figura 8a).

Após 90 minutos, o animal foi reexposto, ao mesmo contexto, porém o objeto que estava posicionado próximo ao símbolo “bolas” foi trocado por um objeto novo, de dimensão semelhante, porém com forma, textura e cor diferentes (uma garrafa de água de 500 mL, azul escura, conforme a figura 8b).



Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 8a. Primeira sessão de exposição do dia 2 do Teste de Reconhecimento de Objetos**



Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 8b. Segunda sessão de exposição do dia 2, para avaliar a memória de curta duração do TRO**

Após 24 horas, no 3º dia, objetivou-se avaliar a memória de longa duração (MLD) dos animais. Para isso, manteve-se o objeto familiar na mesma posição, porém foi inserido um terceiro objeto novo, desconhecido ao animal, na posição próxima ao símbolo de orientação espacial “bolas”, com dimensão semelhante aos demais, porém com forma, textura e cor diferentes dos anteriores (uma garrafa de bebida de 600 mL, de cor laranja com tampa preta), figura 8c.



**Fonte:** Arquivo pessoal

**Figura 8c. Dia 3, avaliação da memória de longa duração no Teste de Reconhecimento de Objetos**

Nas 2ª, 3ª e 4ª seções, os parâmetros avaliados foram:

- Tempo total de exploração do objeto familiar (em segundos);
- Tempo total de exploração do objeto novo (em segundos);
- Tempo relativo de exploração do objeto novo (em segundos).

Sendo que a exploração foi considerada quando o rato cheirava ou tocava o objeto com o nariz ou com as patas dianteiras; ao passo que andar ou ficar parado próximo dos objetos não foi considerado exploração.

### **3.6. Estresse agudo por imobilização**

Sabe-se que o eixo HHA está ativado durante a resposta ao estresse, culminando na liberação de glicocorticoides pelas suprarrenais na circulação

sanguínea, como a corticosterona em ratos e o cortisol em humanos (Spiga *et al.*, 2014). Em função disso, com o intuito de avaliar o funcionamento e a ativação do eixo HHA, uma amostra de animais de cada grupo foi submetida ao estresse agudo por imobilização, imediatamente antes da eutanásia, para posterior coleta e avaliação dos níveis de corticosterona plasmática.

Para tanto, os animais foram submetidos a um período de 30 minutos de imobilização, realizada em garrafas plásticas de diâmetro ajustável que não permitiam a movimentação dos animais. Após esse período, os animais foram retirados da imobilização e procedeu-se a imediata decapitação e coleta do sangue do tronco, em eppendorfs pré-identificados e contendo EDTA.

### **3.7. Eutanásia e obtenção das amostras**

Cada animal foi individualmente levado para uma sala, separado dos demais, e eutanasiado por decapitação, por meio de guilhotina. Foram coletados 5mL de sangue do tronco em tubos falcon contendo previamente 500 $\mu$ L de solução de EDTA 1%. O sangue foi homogeneizado transferido para três eppendorfs, envoltos por papel alumínio para proteger da luz, os quais foram centrifugados, em 4°C, por 10 minutos, a 2.000 rpm. Após, o sobrenadante (plasma) foi transferido para outro eppendorf e congelado em freezer a -10°C, para posterior avaliação dos níveis de corticosterona plasmática.

Concomitantemente, o crânio dos animais foi imediatamente aberto e as estruturas encefálicas (núcleo accumbens e córtex pré-frontal) dissecadas, armazenadas em eppendorfs previamente identificados e envoltos em papel alumínio, e congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises bioquímicas.

### **3.8. Dosagem de corticosterona plasmática por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Foi realizado o processamento das amostras plasmáticas, preparo da fase móvel e dosagem de corticosterona por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Prominence® UFLC, coluna Shimadzu Shim-pack 4.6mm x 15cm, de acordo com o descrito por J. Velázquez-Moctezuma *et al.* (2002) e Woodward & Emery (1987). Nesses passos, todos os reagentes utilizados eram grau HPLC, água grau HPLC (mili-Q) e as vidrarias eram exclusivas para esse fim, sendo higienizadas apenas com água destilada.

Para o processamento das amostras, foi adicionado 1mL de plasma a 5mL de uma mistura de diclorometano (Vetec) e éter etílico (Alphatec), 60:40v/v, e levado ao vórtex por 30 seg. Centrifugou-se imediatamente à 4°C, por 5 minutos, 600 xg, e foi adicionado 4 mL do sobrenadante a 1 mL de água grau HPLC e novamente levado ao vórtex por 30 seg. Centrifugou-se à 4°C, por 5 minutos, 600 xg e o sobrenadante (3 mL) foi evaporado a temperatura ambiente sob vácuo. O resíduo restante foi dissolvido em 100 µL de uma mistura metanol (Sigma-Aldrich)-água grau HPLC (55:45, v/v).

A fase móvel constituiu uma mistura de acetonitrila (Merck) em água mili-Q, na proporção de 65:35, v/v; a qual foi submetida a filtração a vácuo com membrana de 0,22µm de porosidade (filtro PVDF – Aprolab).

### **3.9. Análise do conteúdo de dopamina e seus metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Foi realizado o processamento das amostras encefálicas, preparo das fases móveis e dosagem de dopamina e seus metabólitos, DOPAC e HVA, por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) - Prominence® UFLC da Shimadzu, coluna analítica de fase reversa ZORBAX Eclipse XDB® C18 Agilent, de acordo com o descrito por Zapata *et al.*, (2009).

Todos os reagentes utilizados eram grau HPLC, água grau HPLC (mili-Q) e as vidrarias eram exclusivas para esse fim, sendo higienizadas apenas com água destilada.

Para o processamento das amostras encefálicas (núcleo accumbens e córtex pré-frontal), adicionou-se 100µL da solução refrigerada de extração (0,1mM EDTANa<sub>2</sub> - Cromato e 0,1M HClO<sub>4</sub> - Impex), em cada amostra e foi utilizado homogeneizador manual. Após isso, foram adicionados mais 400µL, totalizando 500 µL, e procedeu-se a centrifugação à 4°C, por 10 minutos, 10.000 xg. Filtrou-se o sobrenadante com filtro de seringa de porosidade de 0,22µm, e o filtrado obtido foi dividido em 2 eppendorfs (um para DA e outro para DOPAC/HVA), sendo novamente reservados em -80°C. O pellet restante também foi armazenado a -80°C, para quantificação posterior de proteínas totais no tecido.

A fase móvel para dosagem de DA foi preparada com as seguintes concentrações finais: 0,15 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Vetec), 1 mM EDTANa<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Labsynth), 2,28 mM ácido octanossulfônico (Sigma-Aldrich) e metanol 13% (Panreac). O pH foi ajustado para 5,0 com solução 5M de NaOH (Vetec).

Por sua vez, a fase móvel para dosagem de DOPAC/HVA continha 0,02 M acetato de Na (Vetec), 0,0125 M de ácido cítrico (Vetec), 0,033% p/v de ácido octanossulfônico (Sigma-Aldrich), 0,1 mM EDTANa<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Labsynth) e metanol 16% (Panreac). O pH foi ajustado para 3,92 com solução de ácido cítrico (Vetec). As fases móveis foram filtradas a vácuo com membrana de 0,22µm de porosidade (filtro PVDF – Aprolab).

A DA e seus metabólitos HVA/DOPAC foram avaliados no filtrado resultante do processamento das amostras utilizando cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a um detector eletroquímico, com sensibilidade de 100 µA e potencial de oxidação de 0,85V, no Laboratório de Análises Biomoleculares da UFES (LABIOM). Foram injetados 20µL de cada amostra, em triplicata, e os dados foram adquiridos por software e comparados a 20µL de uma solução de calibração padrão, contendo 250ng/mL (de cada) de DA, DOPAC e HVA (Sigma-Aldrich).

A quantificação de proteínas totais nos tecidos foi realizada pelo método de Bradford (1976) *apud* Zaia *et al.* (1998), com uso do corante de “Coomassie brilliant

blue” BG-250 e avaliação no espectrofotômetro Evolution® 300 da Thermo Scientific (duplo feixe e detector fotodiodos de silício).

Esse método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (Compton & Jones, 1985).

Para construção da curva de calibração foram produzidos cinco padrões de concentrações crescentes, utilizando solução 1mg/mL de Soro Albumina Bovina liofilizada (Sigma-Aldrich), reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) e água destilada, que foram comparados a um branco.

Os precipitados restantes foram tratados com 100 $\mu$ L de solução 0,5M NaOH (Vetec), submetidos ao vórtex e armazenados por 2 dias em geladeira para liberação das proteínas. Foram levados novamente ao vórtex e em seguida a centrifugação à 4°C, por 10 minutos, 10.000 xg. Utilizou-se o sobrenadante para fazer diluição 1:5 no accumbens e 1:20 no córtex pré-frontal com solução 0,5M NaOH. Dessa solução foram retirados 2 $\mu$ L em duplicata, adicionados água destilada e reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) para dosagem no espectrofotômetro.

Finalmente as concentrações de DA, DOPAC e HVA nas estruturas foram obtidas por ng/g de proteína.

### **3.10. Análise Estatística**

Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. As comparações entre dois grupos foram feitas por teste *t* de *Student* para amostras independentes. Já a análise estatística dos experimentos em que múltiplos grupos foram comparados foi feita por Análise de Variância (ANOVA) de uma via (seguida pelo teste de Duncan quando indicado), ANOVA de duas vias (fatores Separação Maternal e Enriquecimento Ambiental), ANOVA de três vias (fatores Separação Maternal, Enriquecimento Ambiental e Imobilização) ou, ainda, por ANOVA de medidas

repetidas, avaliando os fatores Separação Maternal, Enriquecimento Ambiental e Tempo, conforme o experimento.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Comparação dos protocolos de separação maternal por 14 dias e 21 dias

A literatura mostra divergências em relação à duração do protocolo de SM, visto que em alguns trabalhos ele é realizado por 21 dias, como Aguggia *et al.* (2013) e Li *et al.* (2013); e em outros trabalhos por 14 dias, como Kalinichev *et al.* (2002) e Jahng *et al.* (2010).

Para comparar o efeito desses protocolos como indutores de psicopatologias na vida adulta, foram formados dois grupos (SM por 21 dias e SM por 14 dias), e esses foram submetidos a testes para aferição de depressão (Nado forçado) e ansiedade (Labirinto em cruz elevado).

No Teste do Nado Forçado (figura 9), o Teste *t* de *Student* evidencia que há diferença significativa entre os grupos, sendo que os separados por 21 dias apresentaram aumento significativo no tempo de imobilidade e diminuição no tempo de nado ativo ( $t=3,159$ ;  $P = 0,005$ ), quando comparados com os separados por 14 dias, sugerindo que a execução de um protocolo de SM mais extenso tenha maior impacto no desenvolvimento de um comportamento depressivo.

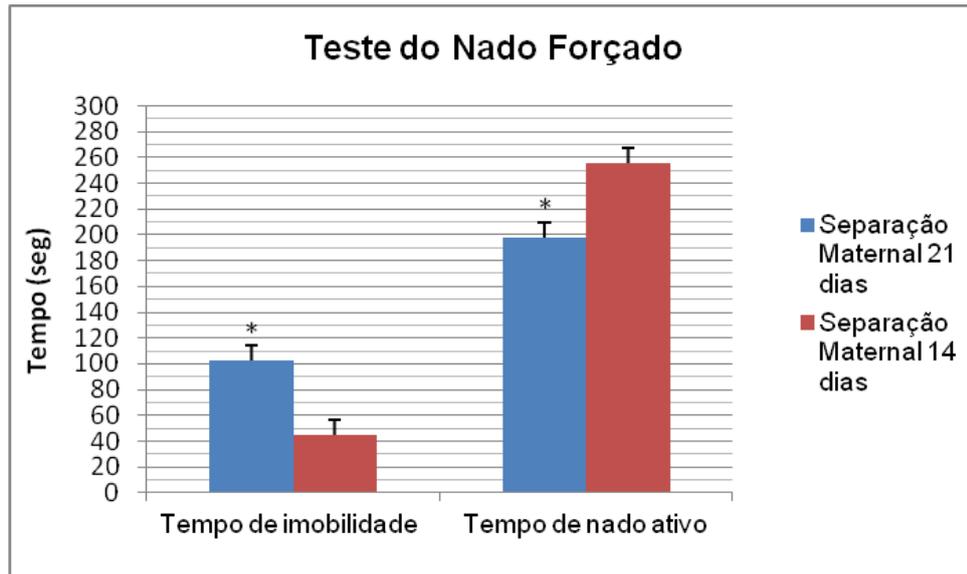


Figura 9. Tempo de imobilidade e tempo de nado ativo, expressos em segundos, durante o período de 5 minutos no teste do Nado Forçado. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, N=7-13/grupo. \*: Diferença significativa entre separação por 14 e por 21 dias ( $p=0,005$ ).

No Labirinto em Cruz Elevado (figura 10) não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros tempo de permanência nos braços abertos ( $t=0,498$ ;  $P=0,624$ ) e tempo de permanência nos braços fechados ( $t=0,476$ ;  $P=0,639$ ). Isso sugere que a duração do protocolo de SM não interfere significativamente na ansiedade dos animais.

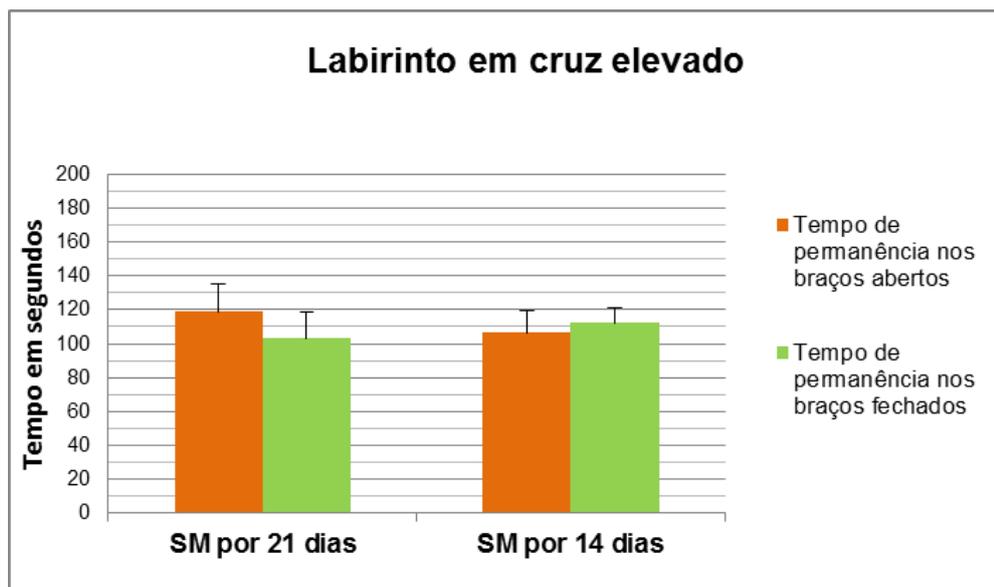


Figura 10. Tempo de permanência nos braços abertos e fechados do Labirinto em Cruz Elevado, durante um período de 5 minutos. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, N=7-13/grupo.

## 4.2. Teste do Nado Forçado

Como resultado observou-se (figura 11) efeito significativo da separação [ANOVA de duas vias, tempo de imobilidade:  $F(1,44) = 12,85$ ,  $P < 0,001$ ; tempo de nado ativo:  $F(1,44) = 14,32$ ,  $P < 0,001$ ], do enriquecimento [ANOVA de duas vias, tempo de imobilidade:  $F(1,44) = 12,51$ ,  $P < 0,005$ ; tempo de nado ativo:  $F(1,44) = 10,49$ ,  $P < 0,005$ ] e uma interação significativa entre os fatores SM e EA no tempo de imobilidade [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 4,74$ ,  $P < 0,05$ ], com tendência a interação no tempo de nado ativo [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 3,13$ ,  $P = 0,084$ ].

Na ANOVA de uma via, seguida pelo *post hoc* de Duncan, o grupo Separado & Enriquecido é significativamente diferente dos demais [ANOVA de uma via, tempo de imobilidade:  $F(3,40) = 10,51$ ,  $P = 0,05$ ; tempo de nado ativo:  $F(3,40) = 9,75$ ,  $P = 0,05$ ], com redução no tempo de imobilidade e aumento no tempo de nado ativo, sugerindo uma menor tendência a um comportamento depressivo.

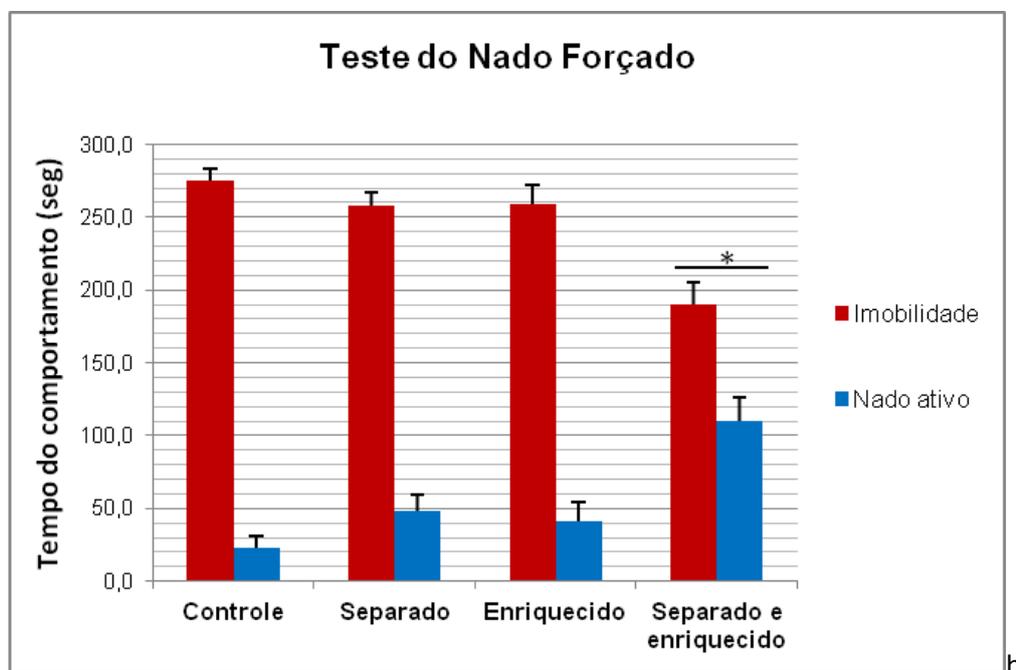


Figura 11. Tempo de imobilidade e tempo de nado ativo, expressos em segundos, durante o período de 5 minutos no teste do Nado Forçado. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, N=11-13/grupo. \*: Interação entre a Separação Maternal e o Enriquecimento Ambiental.

### 4.3. Avaliação da preferência por sacarose

A figura 12 mostra que o consumo de sacarose não sofreu nenhum efeito da SM [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 2,302$ ;  $P = 0,137$ ], mas foi aumentado pelo EA [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 24,36$ ;  $P < 0,001$ ], sugerindo que animais submetidos a esse protocolo estejam menos propensos a anedonia.

Vale citar que não houve interação significativa entre os fatores SM e EA [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 1,08$ ;  $P > 0,05$ ].

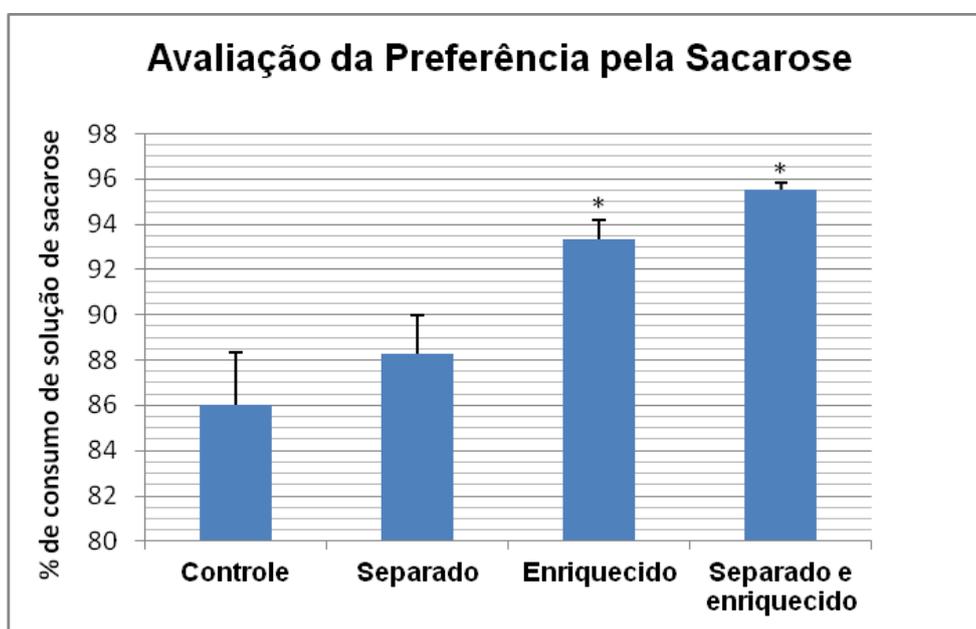


Figura 12. Porcentagem média de solução de sacarose consumida no total de líquido ingerido nos períodos de 24hs. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, N=11-13/grupo. \*: Efeito significativo do Enriquecimento Ambiental.

### 4.4. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Ao analisar o parâmetro tempo total de permanência nos braços do LCE (figura 13), foi observado um efeito significativo do EA, reduzindo o tempo nos braços abertos (TBA) [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 18,777$ ;  $P < 0,001$ ] e aumentando o tempo de permanência nos braços fechados (TBF) [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 7,681$ ;  $P = 0,008$ ].

Não houve efeito significativo da SM [ANOVA de duas vias, TBA:  $F(1,44) = 0,207$ ;  $P > 0,05$ ; TBF:  $F(1,44) = 0,079$ ;  $P > 0,05$ ] ou interação entre as duas variáveis [ANOVA de duas vias, TBA:  $F(1,44) = 0,679$ ;  $P > 0,05$ , TBF:  $F(1,44) = 0,078$ ;  $P > 0,05$ ]. (figura 14).

Ainda, a ANOVA de uma via, seguida pelo *post hoc* de Duncan, mostrou que os TBAs nos grupos Enriquecido e Separado & Enriquecido são estatisticamente diferentes dos grupos Controle e Separado [ANOVA de uma via,  $F(3,40) = 4,488$ ;  $P = 0,008$ ].

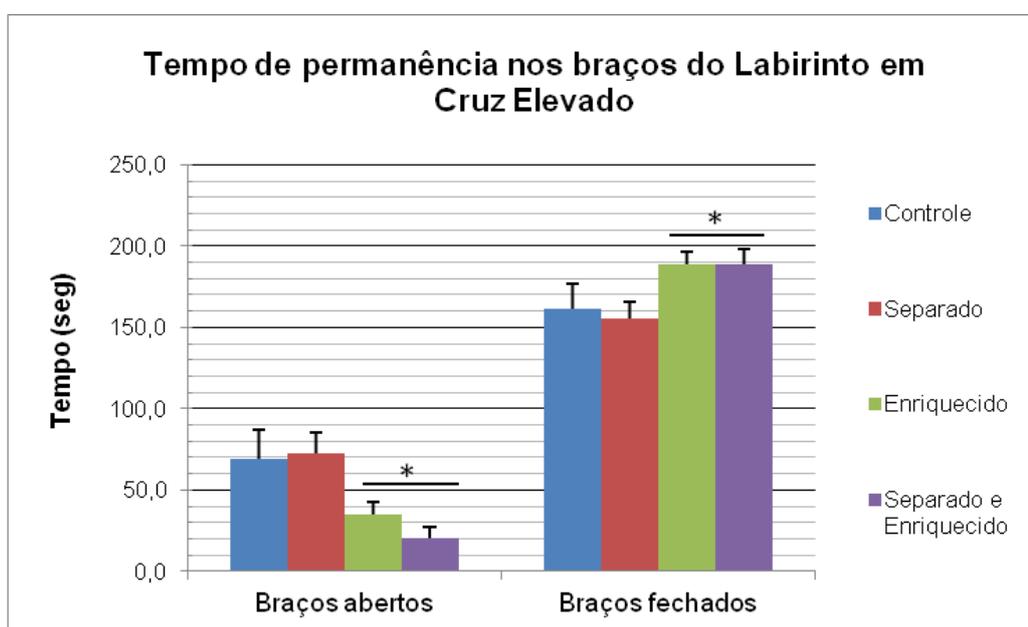


Figura 13. Tempo de permanência nos braços abertos e fechados do Labirinto em cruz elevado, durante um período de 5 minutos. Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $N=11-12$ /grupo. \*: Efeito significativo do Enriquecimento Ambiental (TBA:  $P < 0,001$ ; TBF:  $P = 0,008$ ).

Em relação ao número de entradas nos braços abertos (EBA) (figura 14), o EA reduziu significativamente as EBA [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 8,543$ ;  $P = 0,006$ ], sem efeito significativo para a SM [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 1,611$ ;  $P = 0,211$ ] ou interação significativa entre os fatores [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 0,723$ ;  $P = 0,4$ ].

Não foi observado efeito significativo no número de entradas nos braços fechados [ANOVA de duas vias, SM:  $F(1,44) = 1,783$ ;  $P = 0,189$ ; EA:  $F(1,44) = 0,376$ ;  $P = 0,543$ ; interação SM e EA:  $F(1,44) = 0,001$ ;  $P = 0,971$ ].

Ainda, a ANOVA de uma via, seguida pelo *post hoc* de Duncan, no EBA, mostrou que o grupo Separado & Enriquecido é estatisticamente diferente dos grupos Controle e Separado [ANOVA de uma via,  $F(3,40) = 3,555$ ,  $P = 0,022$ ].

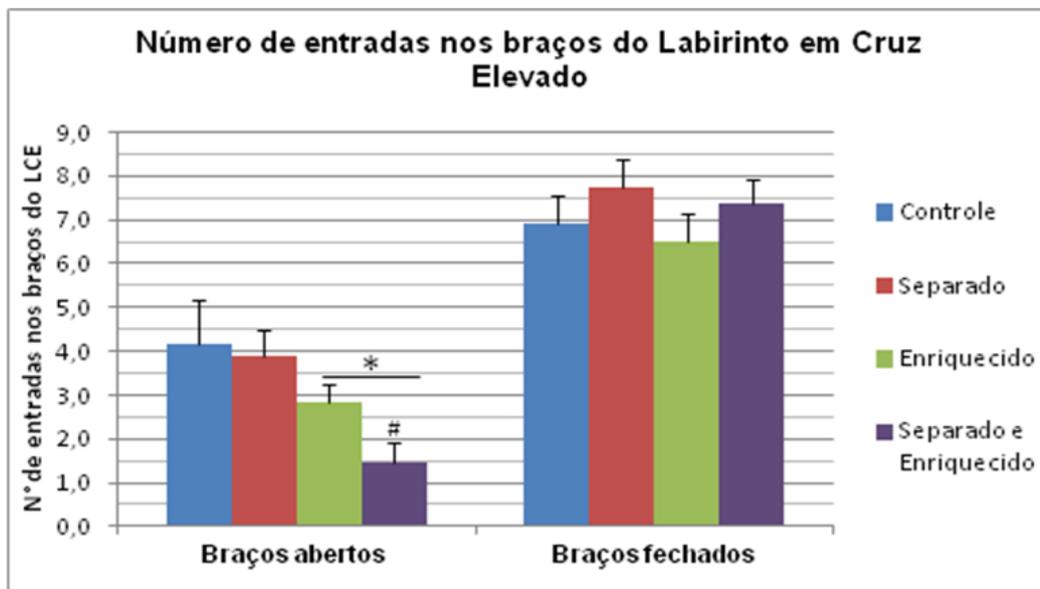


Figura 14. Número de entradas nos braços abertos e fechados do Labirinto em Cruz Elevado, durante um período de 5 minutos. Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $N=11-12$ /grupo. \*: Efeito significativo do Enriquecimento Ambiental ( $P = 0,006$ ). #: diferente dos grupos Controle e Separado nesse mesmo parâmetro ( $P = 0,022$ ).

Por fim, não houve efeito significativo no número de avaliações de risco [ANOVA de duas vias, SM:  $F(1,44) = 1,892$ ;  $P = 0,176$ ; EA:  $F(1,44) = 0,037$ ;  $P = 0,849$ ; interação SM e EA:  $F(1,44) = 0,614$ ;  $P = 0,438$ ].

#### 4.5. Teste de Odor de Predador

Ao avaliar o parâmetro tempo no compartimento escondido (TCE) no Teste de Odor de Predador (figura 15), dentro dos grupos houve efeito significativo da sessão [ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,44) = 25,747$ ;  $P < 0,001$ ] e interação da sessão & enriquecimento [ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,44) = 11,095$ ;  $P < 0,001$ ]. Na comparação entre os grupos houve efeito significativo da SM [ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,44) = 14,121$ ;  $P = 0,001$ ], EA [ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,44) =$

16,8;  $P < 0,001$ ] e interação significativa entre separação & enriquecimento ambiental [ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,44) = 5,534$ ;  $P < 0,05$ ].

No TCE, a ANOVA de uma via, seguida pelo *post hoc* de Duncan, mostra que o comportamento do grupo Controle no dia 1 é estatisticamente diferente dos demais dias do mesmo grupo [ANOVA de uma via,  $F(2,30) = 11,033$ ;  $P < 0,001$ ]; no grupo Enriquecido, o dia 2 é estatisticamente diferente dos demais dias [ANOVA de uma via,  $F(2,33) = 4,699$ ;  $P = 0,016$ ]; no grupo Separado não há diferença significativa entre os dias [ANOVA de uma via,  $F(2,30) = 2,652$ ;  $P = 0,087$ ]; e no grupo Separado & Enriquecido, o dia 2 é significativamente diferente dos demais dias [ANOVA de uma via,  $F(2,30) = 10,639$ ;  $P < 0,001$ ].

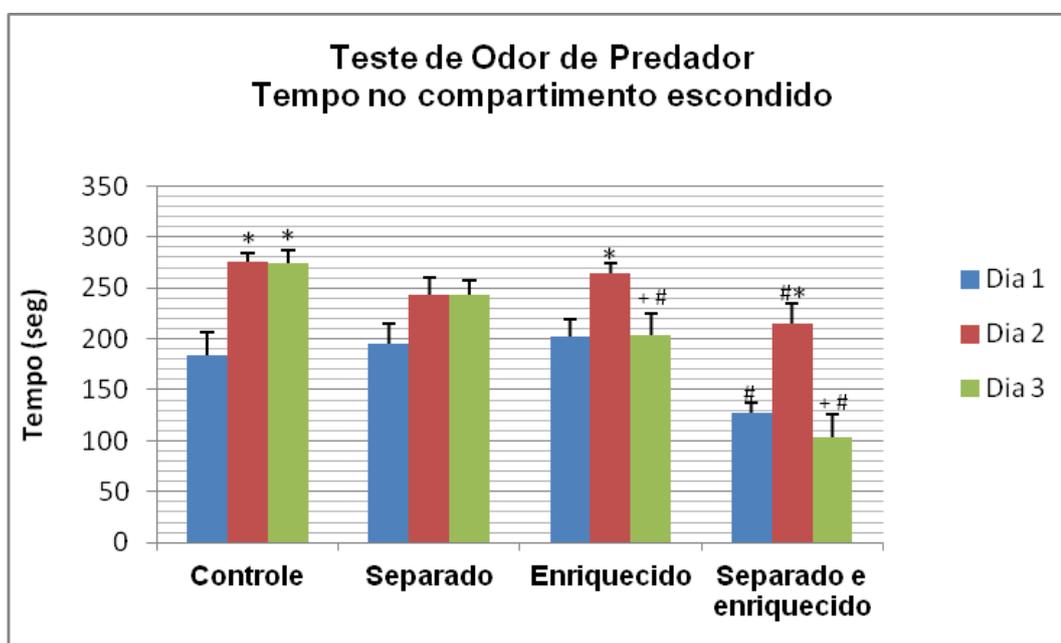


Figura 15. Tempo no compartimento escondido, em segundos, durante o período de 5 minutos, no teste de odor de predador. Dados expressos como média + EPM,  $N=11-13$ /grupo.

\*Diferente do dia 01 do mesmo grupo ( $P < 0,001$ )

+Diferente do dia 02 do mesmo grupo ( $P < 0,001$ )

#Diferente do grupo controle no dia equivalente (teste de Duncan,  $P < 0,001$ )

No parâmetro tempo investigando o pano (TIP) (figura 16), dentre dos grupos houve efeito significativo da sessão [ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,44) = 17,134$ ;  $P < 0,001$ ], interação entre sessão & separação maternal [ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,44) = 3,22$ ;  $P < 0,05$ ] e interação entre sessão &

enriquecimento [ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,44) = 12,372$ ;  $P < 0,01$ ]. Na comparação entre os grupos houve efeito significativo da separação [ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,44) = 13,246$ ;  $P = 0,001$ ] e do enriquecimento [ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,44) = 10,722$ ;  $P = 0,002$ ]; sem interação significativa entre a separação e enriquecimento ambiental [ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,44) = 3,543$ ;  $P = 0,067$ ].

A ANOVA de uma via, seguida pelo *post hoc* de Duncan, no TIP, mostra que o grupo Controle no dia 1 é estatisticamente diferente dos demais dias do mesmo grupo [ANOVA de uma via,  $F(2,30) = 14,38$ ;  $P < 0,001$ ]; no grupo Enriquecido, o dia 2 é estatisticamente diferente dos demais dias [ANOVA de uma via,  $F(2,33) = 4,04$ ;  $P = 0,027$ ]; no grupo Separado não há diferença significativa entre os dias [ANOVA de uma via,  $F(2,30) = 2,238$ ;  $P = 0,124$ ]; e no grupo Separado & Enriquecido, o dia 3 é significativamente diferente dos demais dias [ANOVA de uma via,  $F(2,30) = 7,221$ ;  $P = 0,003$ ].

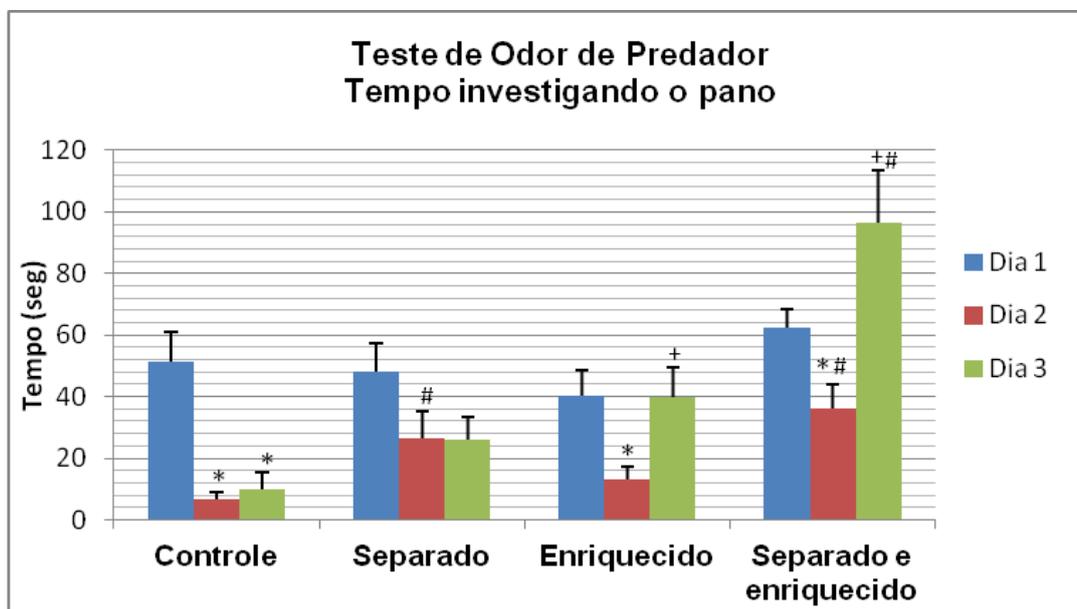


Figura 16. Tempo de exploração do odor do predador, em segundos, durante o período de 5 minutos, no teste de odor de predador. Dados expressos como média + EPM, N=11-13/grupo.

\*Diferente do dia 1 do mesmo grupo ( $P < 0,001$ )

+Diferente do dia 2 do mesmo grupo ( $P < 0,001$ )

#Diferente do grupo controle no dia equivalente (teste de Duncan,  $P < 0,001$ )

#### 4.6. Avaliação da preferência por etanol

A SM desencadeou um aumento significativo no consumo de etanol [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 16,96$ ;  $P < 0,001$ ] (figura 17). A ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan, mostra que o grupo Separado é estatisticamente diferente dos demais [ANOVA de uma via,  $F(3,40) = 8,49$ ,  $P < 0,001$ ].

Não houve efeito significativo do EA [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 0,201$ ;  $P = 0,656$ ]. Entretanto há uma interação significativa entre SM e EA [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 8,80$ ;  $P < 0,005$ ]. Sendo assim, a SM, como tratamento isolado, aumentou significativamente o consumo de etanol, e o tratamento conjuntos com enriquecimento ambiental foi capaz de prevenir esse efeito.

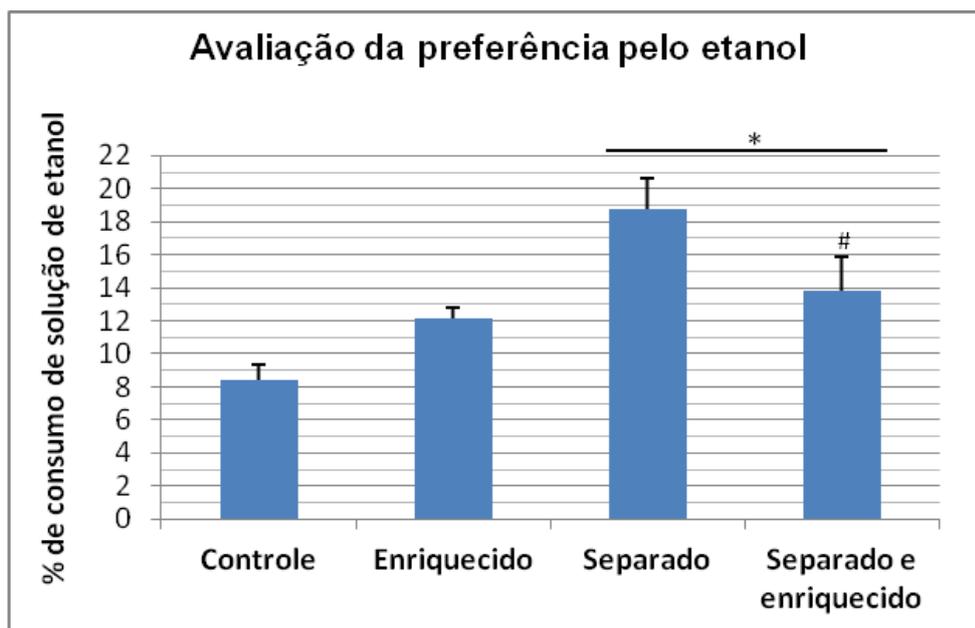


Figura 17. Porcentagem média de solução de etanol consumida no total de líquido ingerido nos períodos de 24hs. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, N=11-13/grupo. \*: Efeito significativo da Separação Maternal. #: Interação significativa entre os fatores Separação Maternal e Enriquecimento Ambiental.

#### 4.7. Teste de Reconhecimento de Objetos

Na avaliação da memória de curta duração (figura 18) (segunda sessão de exposição do dia 2), a ANOVA de duas vias mostrou uma interação significativa entre os fatores Separação Maternal e Enriquecimento Ambiental, o que é evidenciado pelo fato do grupo Separado e Enriquecido ter apresentado um menor tempo de exploração do objeto novo quando comparado aos tratamentos isolados [ANOVA de duas vias,  $F(1,44) = 5,152$ ;  $P = 0,029$ ].

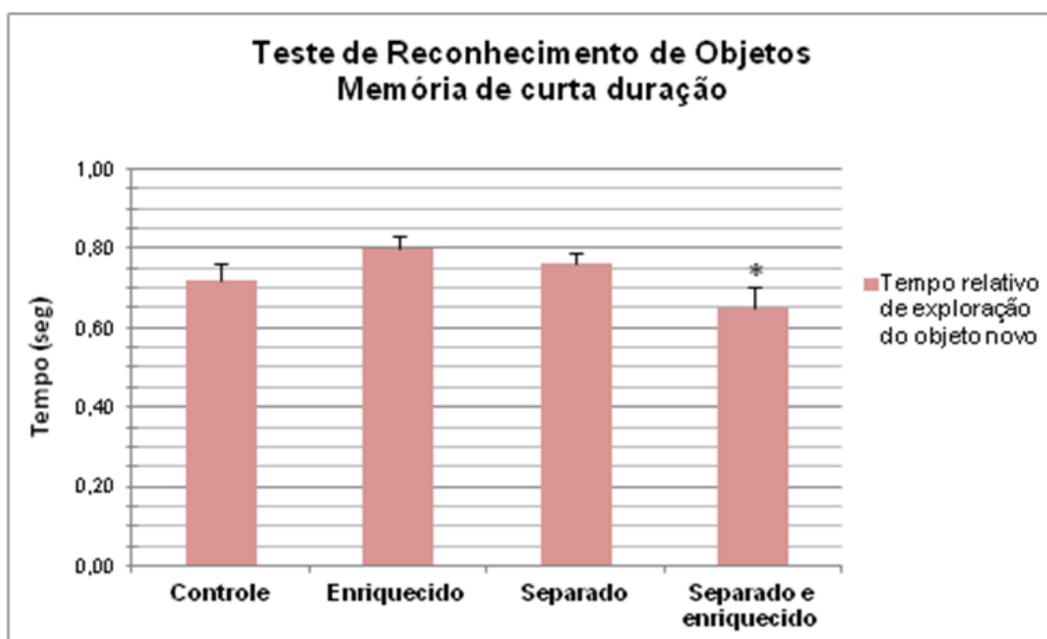


Figura 18. Tempo relativo de exploração do objeto novo na memória de curta duração do teste de reconhecimento de objetos, durante um período de 10 minutos. Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $N=10$ /grupo. \*: Interação significativa entre os fatores Separação Maternal e Enriquecimento Ambiental.

A figura 19 mostra que não houve diferença estatisticamente significativa na memória de longa duração.

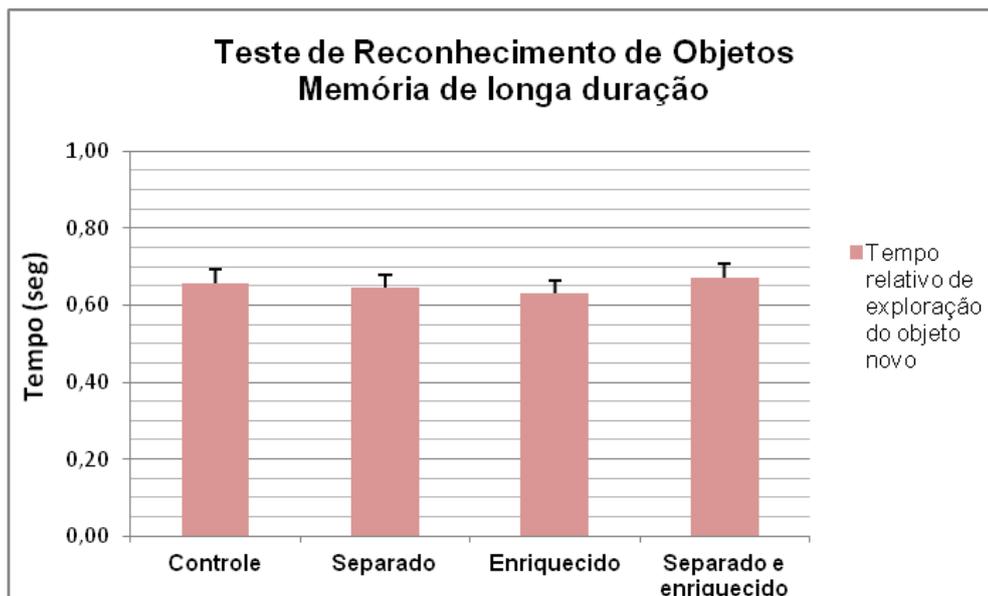


Figura 19. Tempo relativo de exploração do objeto novo na memória de longa duração do teste de reconhecimento de objetos, durante um período de 10 minutos. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, N=10/grupo.

#### 4.8. Níveis plasmáticos de corticosterona

Na ANOVA de três vias foi observado efeito significativo da imobilização [F (1,44) = 9,939;  $P = 0,003$ ] aumentando os níveis de corticosterona plasmática (figura 20).

Sem efeito significativo para os demais parâmetros [ANOVA de três vias, SM: F (1,44) = 0,127;  $P = 0,724$ ; EA: F (1,44) = 0,649;  $P = 0,426$ ; interação SM e EA: F (1,44) = 0,355;  $P = 0,555$ ; interação entre SM e imobilização F (1,44) = 2,664;  $P = 0,111$ ; interação EA e imobilização: F (1,44) = 1,950;  $P = 0,171$  e interação entre SM, EA e imobilização: F (1,44) = 1,369;  $P = 0,250$ ].

Ao observarmos o efeito da imobilização dentro dos grupos, vimos efeito significativo nos grupos Controle (teste t de *Student* para amostras independentes;  $t=-3,921$ ;  $P=0,006$ ) e Enriquecido ( $t=-3,195$ ;  $P=0,011$ ), com os animais estressados apresentando maior reatividade do eixo HHA ao estresse, em comparação com os animais não estressados. Sem efeito significativo nos grupos Separado ( $t=-1,503$ ;  $P=0,169$ ) e Separado & Enriquecido ( $t=0,476$ ;  $P=0,645$ ).

Vale citar que os animais Separados & Enriquecidos imobilizados, não apresentaram elevação significativa da corticosterona plasmática, sugerindo uma interação entre os fatores SM e EA.

Não foi observado hiperresponsividade do eixo HHA nos animais Separados, submetidos a estresse agudo, conforme trabalhos anteriores mostram (Plotsky & Meaney, 1993).

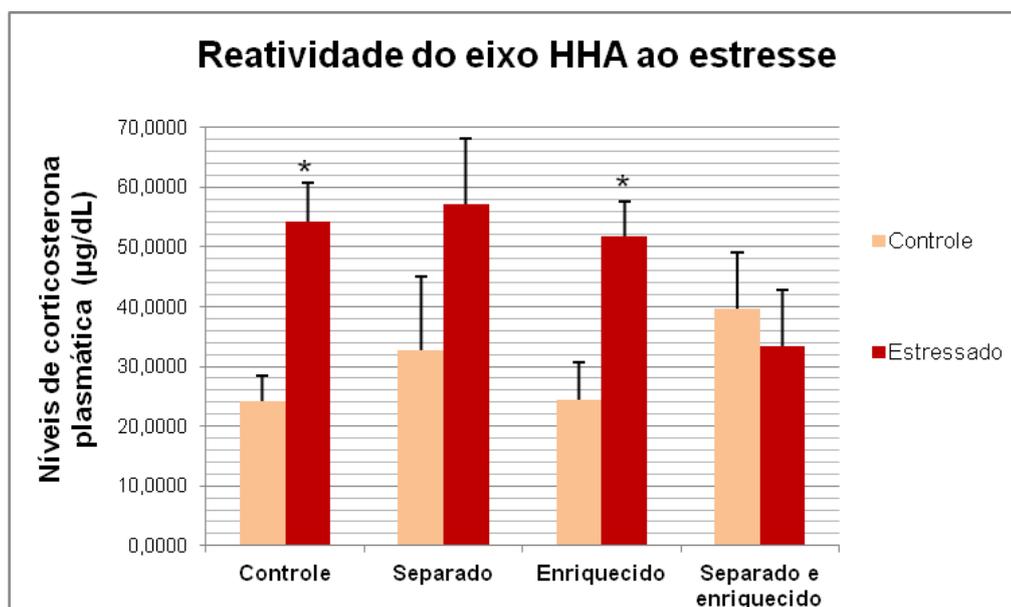


Figura 20. Níveis de corticosterona plasmática em animais controle e submetidos ao estresse agudo (imobilização por 30 minutos). Dados expressos como média  $\pm$  EPM, N=5-6/grupo. \*Efeito significativo da imobilização nos animais não separados.

#### 4.9. Concentração de Dopamina e seus metabólitos em estruturas encefálicas

##### 4.9.1. Análise do conteúdo dopaminérgico no córtex pré-frontal

Foi observado efeito significativo da SM, a qual promoveu um aumento nos níveis de dopamina no córtex pré-frontal, sem efeito do enriquecimento ambiental ou interação entre esses parâmetros [ANOVA de duas vias, SM:  $F(1,26) = 5,936$ ;  $P < 0,05$ ; EA:  $F(1,26) = 2,43$ ;  $P = 0,133$ ; interação SM e EA:  $F(1,26) = 0,098$ ,  $P = 0,757$ ] (figura 21).

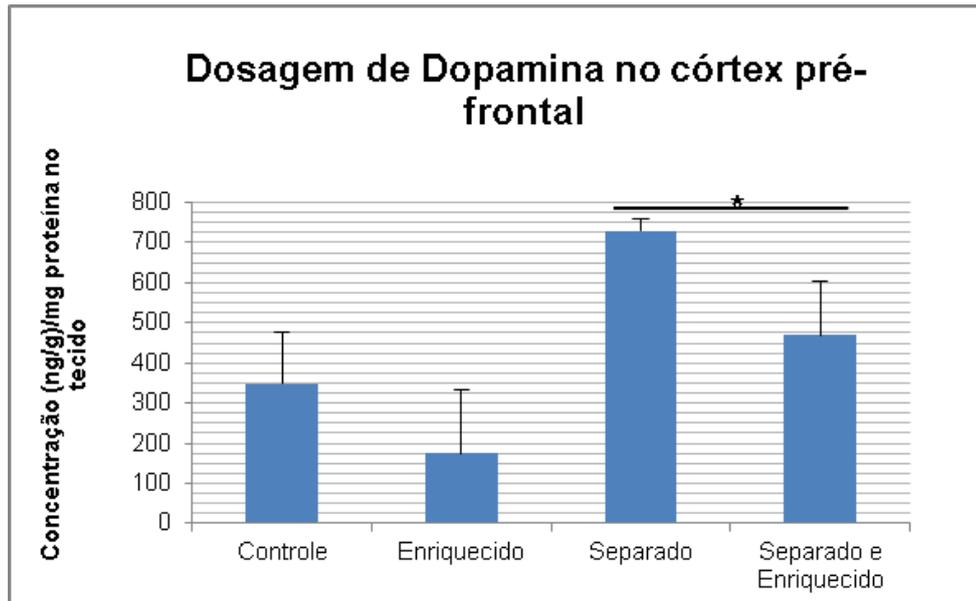


Figura 21. Dosagem de Dopamina no córtex pré-frontal. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, N=5-8/grupo. \*Efeito significativo da Separação Maternal.

Não houve efeito significativo dos tratamentos (SM e EA) nas concentrações de DOPAC e HVA, havendo apenas uma tendência a efeito da separação sobre o HVA [DOPAC: ANOVA de duas vias, SM:  $F(1,24) = 0,711$ ;  $P = 0,409$ ; EA:  $F(1,24) = 2,415$ ;  $P = 0,136$ ; interação SM e EA:  $F(1,24) = 0,152$ ;  $P = 0,701$ ]; [HVA: ANOVA de duas vias, SM:  $F(1,15) = 0,061$ ;  $P = 0,81$ ; EA:  $F(1,15) = 3,263$ ;  $P = 0,098$ ; interação SM e EA:  $F(1,15) = 1,31$ ;  $P = 0,277$ ] (figura 22).

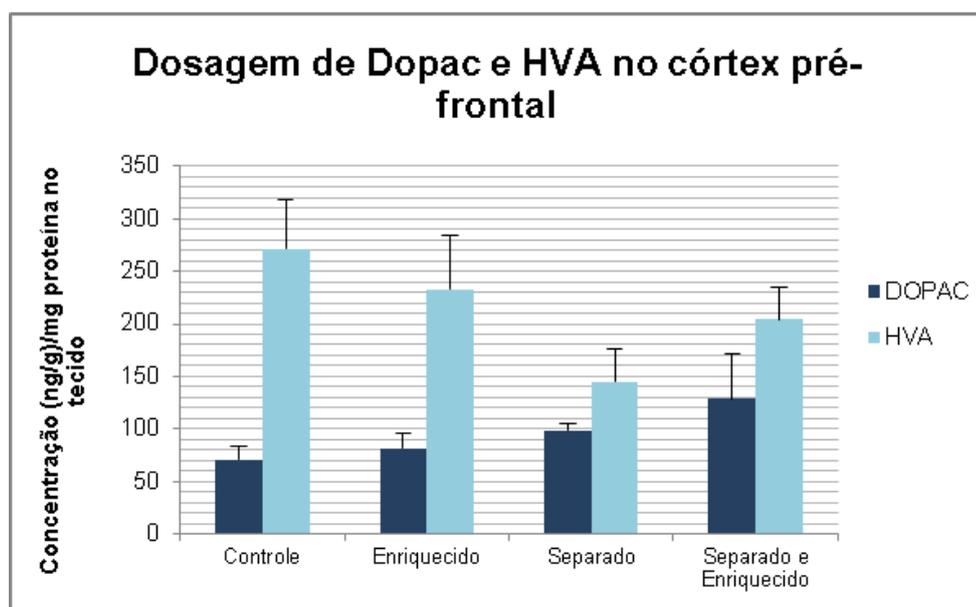


Figura 22. Dosagem de Dopac e HVA no córtex pré-frontal. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, N=3-7/grupo.

Ao analisar a razão DOPAC/Dopamina, que infere o *turnover* dopaminérgico (atividade das enzimas de degradação e o quanto de dopamina está sendo metabolizada no local), observou-se efeito significativo do Enriquecimento Ambiental aumentando a razão DOPAC/Dopamina [ANOVA de duas vias, EA:  $F(1,23) = 4,526$ ;  $P < 0,05$ ; SM:  $F(1,23) = 2,725$ ;  $P = 0,115$ ; interação SM e EA:  $F(1,23) = 0,313$ ;  $P = 0,583$ ] (figura 23).

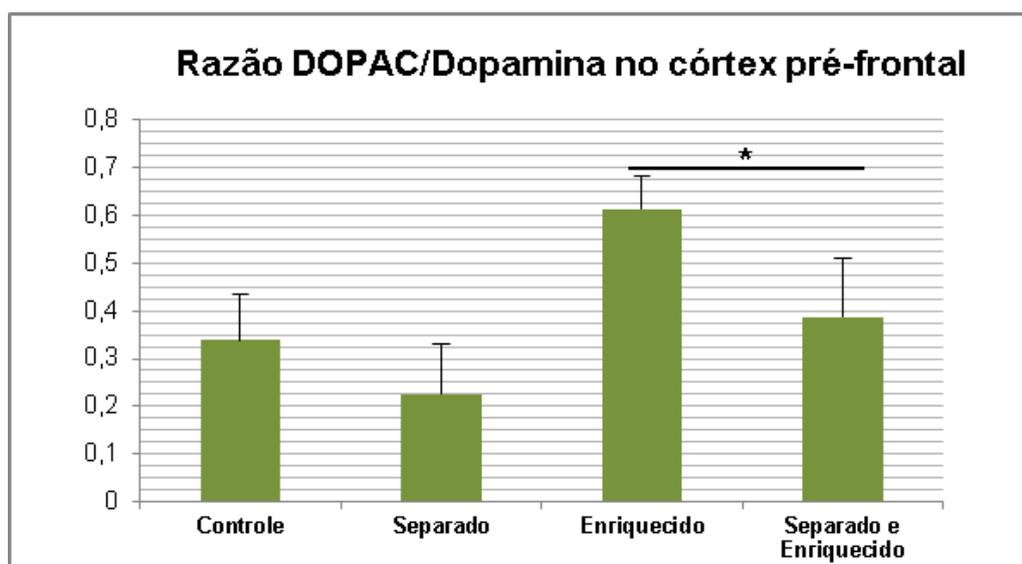


Figura 23. Razão DOPAC/Dopamina no córtex pré-frontal. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, N=5-6/grupo. \*Efeito significativo do Enriquecimento Ambiental.

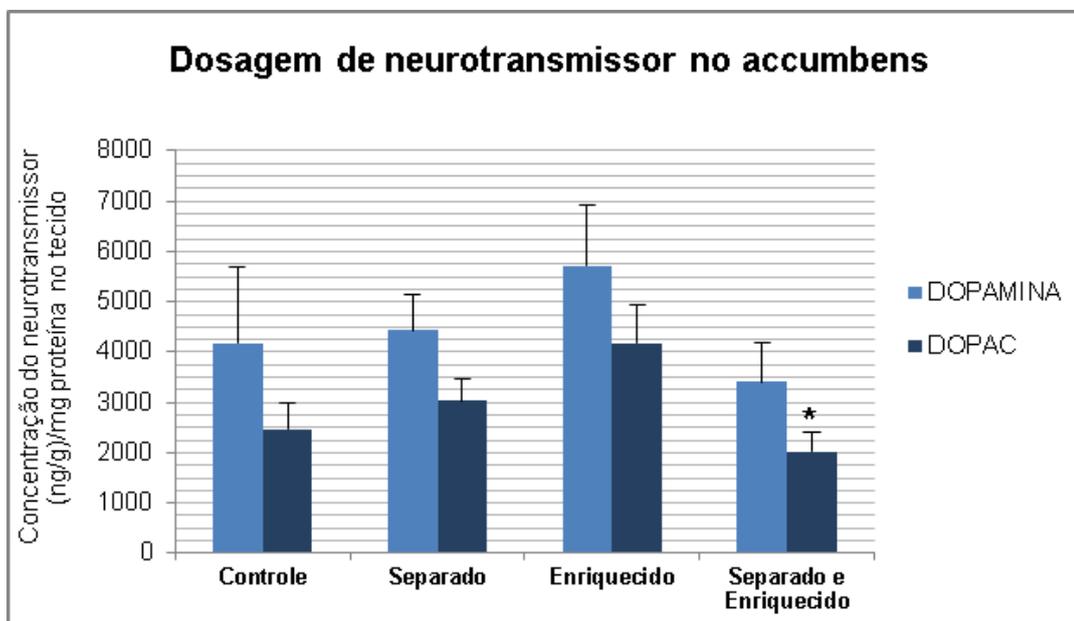
#### 4.9.2. Análise do conteúdo dopaminérgico no núcleo accumbens

Foi observada interação significativa entre SM e EA, reduzindo os níveis de DOPAC no núcleo accumbens [ANOVA de duas vias, SM:  $F(1,24) = 1,975$ ,  $P = 0,175$ ; EA:  $F(1,24) = 0,396$ ;  $P = 0,536$ ; interação SM e EA:  $F(1,24) = 5,821$ ;  $P = 0,026$ ] (figura 24).

Não se evidenciou diferença estatisticamente significativa dos tratamentos isolados nos níveis de dopamina, porém uma tendência à interação entre SM e EA reduzindo a concentração de dopamina nesse grupo [ANOVA de duas vias, SM:  $F(1,26) = 0,812$ ;  $P = 0,377$ ; EA:  $F(1,26) = 0,049$ ;  $P = 0,826$ ; interação SM e EA:  $F(1,26) = 0,812$ ;  $P = 0,377$ ; EA:  $F(1,26) = 0,049$ ;  $P = 0,826$ ; interação SM e EA:  $F(1,26) = 0,812$ ;  $P = 0,377$ ].

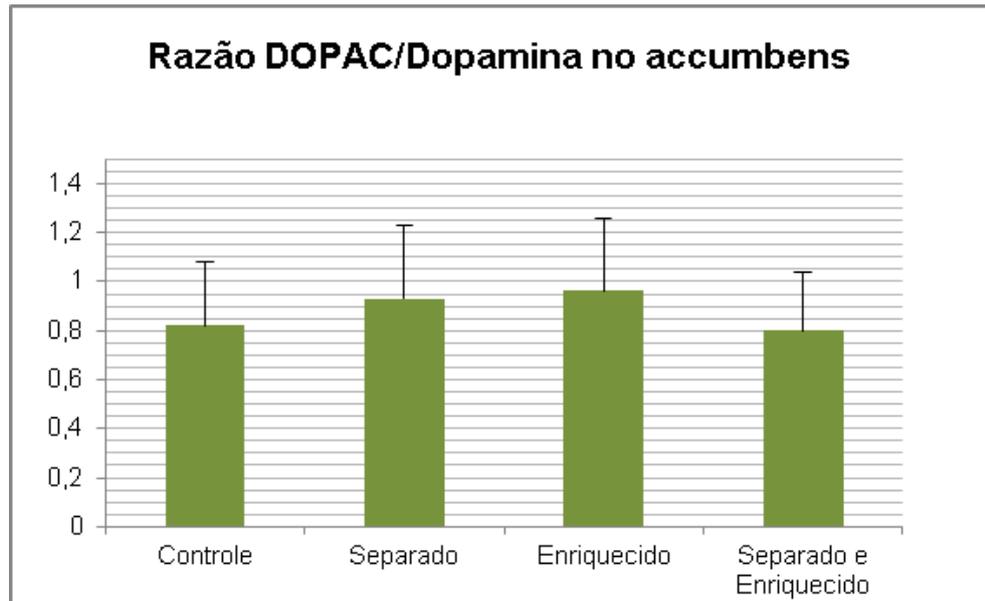
(1,26) = 1,265;  $P = 0,273$ ]; sem diferença significativa entre os grupos [ANOVA de uma via, seguida pelo *post hoc* Duncan,  $F(3,25) = 0,786$ ,  $P = 0,514$ ].

Não houve dados estatísticos suficientes para análise do HVA no NAcc.



**Figura 24. Dosagem de neurotransmissor no accumbens. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, N=5-8/grupo. \*Interação significativa entre SM e EA nos níveis de DOPAC no accumbens.**

Ao analisar a razão DOPAC/Dopamina no accumbens, que evidencia a atividade desse neurotransmissor nesse local, observou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos, nem efeitos dos tratamentos [ANOVA de uma via, seguida pelo *post hoc* Duncan,  $F(3,22) = 0,089$ ,  $P = 0,965$ ; ANOVA de duas vias, SM:  $F(1,23) = 0,009$ ,  $P = 0,926$ ; EA:  $F(1,23) = 0,001$ ;  $P = 0,979$ ; interação SM e EA:  $F(1,23) = 0,251$ ;  $P = 0,622$ ] (figura 25).



**Figura 25. Razão DOPAC/Dopamina no accumbens. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, N=5-6/grupo.**

## **5. DISCUSSÃO**

A patofisiologia dos transtornos psiquiátricos é decorrente de disfunção em sistemas endócrinos e de neurotransmissores, com destaque para o eixo HHA e sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Nemeroff, 1998; Leonard, 2000), além de outros sistemas envolvidos. Eventos adversos cedo na vida têm potencial para ocasionar efeitos deletérios endócrinos, neuroquímicos e comportamentais expressos na idade adulta (Sanchez *et al.*, 2001). Nesse âmbito, este trabalho buscou compreender melhor a relação entre eventos adversos perinatais e o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, por meio de avaliações comportamentais e neuroquímicas.

### **5.1. Comparação entre os protocolos de Separação Maternal por 14 e 21 dias**

Como a literatura relata diferentes durações de protocolos de Separação Maternal, inicialmente tivemos o intuito de comparar os efeitos dos protocolos de separação maternal por 14 e 21 dias nos comportamentos de ansiedade e depressão na idade adulta.

Para isso, formamos dois grupos, sendo um SM por 14 dias e o outro SM por 21 dias, e em seguida submetemos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado, para avaliar comportamento de ansiedade, e ao Teste do Nado Forçado, para comportamento depressivo.

A partir dos resultados, observamos que diferentes durações do protocolo de SM não interferiram significativamente na ansiedade dos animais no LCE; porém animais separados por 21 dias, em comparação aos separados por 14 dias, apresentaram maior comportamento depressivo no Nado Forçado, com maior tempo de imobilidade e menor tempo de nado ativo. Esse resultado sugeriu que a execução de um protocolo de SM mais extenso teria um impacto maior na manifestação de comportamento depressivo na idade adulta, sendo, a partir de então, o tempo escolhido para a realização de nossos experimentos.

## 5.2. Avaliação da Resposta do eixo HHA ao estresse

Em resposta ao estresse agudo, instantaneamente ocorre ativação do eixo HHA, aumento dos níveis de glicocorticoides circulantes pelo córtex das adrenais, assim como de noradrenalina e dopamina; disponibilizando energia ao organismo para uma defesa imediata. Altos níveis de glicocorticoides regulam o eixo HHA por meio de *feedback* negativo. Entretanto, períodos de estresse sustentado, como a separação maternal, causam hiperativação do eixo HHA (Plotsky & Meaney, 1993), comprometimento do *feedback* negativo (Dallman *et al.*, 1994), dentre outras alterações que comprometem o equilíbrio neuroendócrino.

Estudos descrevem a Separação Maternal por 180 min/dia, dias 2-14 pós-natal causando hiperresponsividade do eixo HHA ao estresse agudo na vida adulta, ou seja, uma resposta exagerada, com hipersecreção e aumento dos níveis de glicocorticoides circulantes (Liu *et al.*, 2000; Plotsky & Meaney, 1993). Em adição, foi descrito que a SM aumenta a expressão do RNAm do CRF no hipotálamo e na amígdala (Ladd *et al.*, 2000), sendo o CRF um regulador primário do eixo e das respostas comportamentais ao estresse (Plotsky & Meaney, 1993); e ainda reduz a expressão de receptores de glicocorticoides no hipocampo dorsal e no córtex pré-frontal, comprometendo a sensibilidade ao feedback negativo do eixo HHA (Sampedro-Piquero & Arias, 2014; Ladd *et al.*, 2000).

Em nossos resultados observamos efeito significativo da imobilização nos animais não separados, conforme era esperado, com aumento da atividade do eixo HHA e dos níveis de corticosterona plasmática em resposta ao estresse agudo. Contudo, não observamos hiperresponsividade do eixo HHA ao estresse agudo em animais separados. Em meio a isso, o protocolo de SM por 21 dias pode estar contribuindo para desenvolvimento de resiliência no animal, que é a habilidade do indivíduo em se adaptar com sucesso ao estresse, traumas e adversidades crônicas (Feder *et al.*, 2009), estando associada a características genotípicas e psicossociais (Southwick *et al.*, 2005; de Kloet, 2008).

Por sua vez, o Enriquecimento Ambiental parece ter potencial para reverter os efeitos negativos do estresse perinatal, reduzindo os níveis de hormônios do estresse e aproximando a resposta do eixo HHA a resposta dos animais controle

(Francis *et al.*, 2002; Darnaudéry & Maccari; 2008). Isso pode estar relacionado a alterações epigenéticas, induzidas pelo EA num período de plasticidade neuroendócrina, o que será abordado mais a frente. Porém, em nosso trabalho, não observamos efeito significativo do EA nesse parâmetro.

Vale citar que como os erros padrões das médias estão grandes, se a amostra fosse maior talvez pudessem ser melhores vistos os efeitos dos tratamentos. Além disso, a variabilidade acentuada dos protocolos de SM e EA descritos na literatura podem contribuir para algumas variações observadas nas respostas neuroendócrinas e comportamentais.

Por outro lado, foram descritos aumentos dos níveis de receptores de CRF no locus coeruleus e núcleo dorsal da rafe (Ladd *et al.* 1996, 2000). Assim, a ativação crônica dos sistemas centrais que culminem na modulação do CRF pode resultar em ativação persistente dos sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos (Nemeroff, 1996), aumentando o risco de desenvolvimento de ansiedade e depressão.

### **5.3. Testes comportamentais para aferição de depressão**

Como a SM por 21 dias apresentou maior efeito comportamental depressivo no grupo piloto, nós definimos essa duração de SM como protocolo.

A partir daí, ao analisarmos o efeito dos tratamentos no desenvolvimento de um comportamento depressivo na idade adulta, observamos efeito significativo do Enriquecimento Ambiental aumentando o consumo de sacarose; e uma interação significativa entre SM e EA aumentando o comportamento ativo e reduzindo o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.

Ratos criados em condições de ambiente enriquecido mostram mais comportamentos ativos no teste do Nado Forçado em comparação ao controle (Mosferi *et al.*, 2015; Brenes *et al.*, 2008); sugerindo efeito antidepressivo do EA, que pode ser devido à indução de alterações epigenéticas em período de plasticidade neural, aumentando a expressão ou a sensibilidade dos receptores

dopaminérgicos pós-sinápticos mesocorticolímbicos, principalmente no NAcc, estrutura conhecidamente envolvida em processos motivacionais (Baik, 2013).

Assim como se observa o desenvolvimento de anedonia na clínica depressiva (Naranjo, 2001), também está descrito que animais separados apresentam diminuição da preferência por líquidos doces (Muscat *et al.*, 1992; Huot *et al.*, 2001) e aumento do tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (Lee *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2015). Porém, em nosso trabalho, não foi observado efeito significativo da SM nesse parâmetro. Contudo, a interação entre os tratamentos, observada no Nado Forçado, sugere que a separação gera uma labilidade que faz com que os animais se tornem mais suscetíveis ao efeito do enriquecimento ambiental, com aumento do tempo de nado ativo e diminuição do tempo de imobilidade.

#### **5.4. Testes comportamentais para aferição de ansiedade**

Os transtornos de ansiedade estão comumente presentes na clínica psiquiátrica. De acordo com Blanchard e colaboradores (1990, *apud* Netto, 2009), a ansiedade é desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e incerto.

Estudos prévios em roedores têm reportado uma tendência da SM aumentar os comportamentos de ansiedade nos animais, desencadeando aumento do tempo de permanência nos braços fechados e redução do tempo nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado, comparado ao controle (Bouet *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Huot *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2014). Tal aumento de ansiedade pode estar relacionado ao estresse sustentado desencadear hiperativação do eixo HHA e aumento da neurotransmissão noradrenérgica, dopaminérgica e serotoninérgica em estruturas encefálicas (Macri & Wurbel, 2007; Chrousos & Gold, 1992; Francis *et al.*, 1999). Porém, nós não observamos efeito significativo da SM no LCE.

Possivelmente a ausência de alteração nos parâmetros de ansiedade de deva às características do protocolo de SM estabelecido neste trabalho, as quais diferem

de outros protocolos descritos na literatura tanto na duração quanto no período da vida do animal em que a SM foi realizada.

Já em relação ao Enriquecimento Ambiental, estudos em roedores descrevem aumento do número de entradas e do tempo gasto nos braços abertos do LCE, indicando redução da ansiedade (Galani *et al.*, 2007; Friske & Gammie, 2005). Em contraste, nós observamos o EA reduzindo o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e aumentando o tempo de permanência nos braços fechados do LCE, o que sugere aumento da ansiedade inata.

Essa divergência pode ser devido à diferença nos protocolos de EA. E, ainda, gastar mais tempo nos braços fechados pode não ser necessariamente indicativo de aumento de ansiedade nesses animais. O animal enriquecido, por estar em constante exposição a ambientes novos, ao ser colocado no aparato do LCE pode não ter apresentado interesse em explorar o ambiente e, por isso, ter permanecido mais tempo nos braços fechados do mesmo. Adicionalmente, Vivinetto e colaboradores (2013) descreveram animais enriquecidos com menor reação a estímulos novos em geral; e Hutchinson (2005) que o EA pode levar a resultados indesejáveis, devido ao excesso de estímulo.

Em relação ao teste de odor de predador, roedores expostos a esse estímulo aversivo frequentemente exibem maior permanência em compartimentos escondidos, com aumento das reações de congelamento e das avaliações de risco e redução da atividade exploratória (Dielenberg & Mcgregor, 2001), sendo este, portanto, um modelo válido de indução de ansiedade.

Há poucos estudos relacionando o TOP com Separação Maternal e Enriquecimento Ambiental.

Vivinetto e colaboradores (2013) observaram que a SM por 4,5h/dia, 21 dias pós-natal, em ratos *Wistar* machos, gera um prejuízo no teste de esquiva inibitória com choque nas patas (teste que também avalia ansiedade e medo aprendidos do animal), sugerindo que a SM altera o aprendizado e a memória.

O ambiente enriquecido parece reverter os efeitos ansiogênicos da SM em parâmetros comportamentais e endócrinos (Francis *et al.*, 2002). Isso pode ser

devido à indução de alterações moleculares e estruturais, por exemplo, na expressão de genes e neurotrofinas, promovendo assim o reestabelecimento do equilíbrio neuroquímico em circuitos envolvidos com a ansiedade.

Em nossos resultados do TOP observamos, no dia 2 (condicionamento), que todos os animais apresentaram aversão ao odor do predador, como era esperado, o que foi evidenciado pela redução do tempo de exploração da fonte de odor e aumento do tempo no compartimento escondido.

No dia 3 (teste) não observamos efeito da SM, no entanto os animais enriquecidos apresentaram redução do tempo no compartimento escondido e aumento do tempo de exploração do pano. Isso não parece estar relacionado a prejuízo de memória, visto que Vivinetti e colaboradores (2013) descreveram, no teste de esquiva inibitória com choque nas patas, o EA (com protocolo semelhante ao deste trabalho) melhorando a memória dos animais, logo concluímos o potencial do EA em reduzir a ansiedade aversiva aprendida.

Logo, os resultados dos testes para aferição de ansiedade apresentaram divergências, com o EA sinalizando efeito ansiolítico no Teste de Odor de Predador, e ansiogênico no Labirinto em Cruz Elevado.

Isso pode ser devido ao comportamento aversivo depender do tipo de estímulo emocional eliciador da resposta e das estruturas encefálicas envolvidas. O LCE evidencia a ansiedade inata do animal e envolve a via amígdalo basolateral-núcleo accumbens (Carobrez & Bertoglio, 2005; Hogg, 1996). Por sua vez, o TOP evidencia memória e ansiedade aprendida, e foi descrito por Staples e colaboradores (2005) que a exposição ao odor do predador e o contexto de medo, aumentam a expressão de *Fos* no núcleo dorsal pré-mamilar, substância cinzenta periaquedutal ventrolateral, núcleo cuneiforme, lócus cerúleos e núcleo olfatório anterior. Dessa forma, diferentes vias e tipos de ansiedades envolvidas podem ter contribuído para a observação de resultados diferentes no efeito do EA.

## 5.5. Sistema mesocorticolímbico e abuso de álcool

Exposição ao estresse cedo na vida aumenta a vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos e a processos motivacionais na vida adulta, constituindo-se um fator de risco para a adição a drogas (Kessler *et al.*, 1997). A comorbidade entre transtorno psiquiátrico e abuso de álcool tem sido descrita desde a Antiguidade e observada de forma frequente na clínica (Lang *et al.*, 2014).

Em nossos resultados observamos que a SM aumentou a preferência pelo consumo de etanol na idade adulta, sendo o EA capaz de atenuar esse efeito.

Esse resultado corrobora a literatura que descreve animais separados com vulnerabilidade aumentada as drogas de abuso (Moffet *et al.*, 2007; Teicher *et al.*, 2006) e maior preferência pelo consumo de etanol quando comparados aos controles (Huot *et al.*, 2001; Ploj *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2008). Ainda, outras condições de estresse, como o isolamento social em roedores, também aumentam a preferência pelo consumo de etanol (Advani *et al.*, 2007; Deehan *et al.*, 2011).

Esse maior potencial ao abuso de substâncias parece estar relacionado ao quadro de estresse sustentado da SM mimetizar as alterações neuroendócrinas observadas no uso de drogas. Além das alterações aqui já descritas, também foi observado alteração da metilação do DNA no núcleo accumbens, que ocasiona alteração da expressão gênica e infrarregulação dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos (Zhang *et al.*, 2013; Robinson & Nestler, 2011). Logo, esse animal precisa de maior liberação dopaminérgica no NAcc para obter semelhante resposta a um animal controle, existindo uma “sensibilização cruzada” entre estresse e drogas. Corroborando, o etanol foi descrito com potencial ativador dos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos (Koob & Le Moal, 2001), o que contribui para o processo de gratificação cerebral.

Por sua vez, Deehan e colaboradores (2011), observaram de forma semelhante ao nosso resultado, que a exposição ao ambiente enriquecido reduziu o consumo, a preferência e a motivação para obter o etanol em ratos que anteriormente apresentavam preferência por etanol. Isso sugere que o EA tem potencial para reverter os efeitos prejudiciais da SM sobre a via mesolímbica,

podendo ser por indução epigenética, com aumento da expressão ou melhora da sensibilidade dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos no NAcc, aumento da expressão de auto-receptores D2 na ATV, resultando em melhora na regulação da síntese e liberação dopaminérgica no NAcc e ainda por aumento dos fatores neurotróficos que são protetores da função neural (Konkle *et al.*, 2010; Laviola *et al.*, 2008; Sale *et al.*, 2014).

Nas análises bioquímicas observamos efeito significativo da SM aumentando a quantidade de dopamina disponível no córtex pré-frontal.

Matthews e colaboradores (2001) observaram redução do turnover dopaminérgico no CPFm de ratos separados em fase adulta. E Heidbreder e colaboradores (2000) descreveram que o estresse de isolamento social em ratos reduziu o *turnover* dopaminérgico no CPFm, acompanhado de aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona e déficit cognitivo.

Abordamos que em condições estressoras normais os neurônios dopaminérgicos da ATV são ativados e aumentam a liberação de dopamina no córtex frontal, no intuito de potencializar as funções cognitiva e motora, em sinal de alerta ao organismo.

O estresse sustentado causa hiperativação da amígdala, que estimula a ATV a aumentar a síntese e liberação de dopamina no córtex pré-frontal (Enrico *et al.*, 1998). Isso concorda com o aumento da dopamina no CPF observado em nossos resultados. Também é descrita perda da função, da regulação e da atividade dopaminérgica do CPF, com redução do *turnover* dopaminérgico (Arnsten, 2009; Eslinger *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 1994).

Várias observações relatadas na literatura podem contribuir para esse efeito. Por exemplo, condições de estresse sustentado comprometem a diferenciação celular no CPF, alteram a regulação de genes apoptóticos (Levine *et al.*, 2007), reduzem o volume da estrutura (van Harmelen *et al.*, 2010), induzem polimorfismo da COMT e reduzem a capacidade de metabolização da dopamina (Papaleo *et al.*, 2008); bem como alteram a arquitetura dos dendritos pré-frontais, com redução do comprimento e da ramificação (Radley *et al.*, 2006) e retração dendrítica (Brown *et al.*, 2005).

Isso sugere aumento da disponibilidade de dopamina nas sinapses, com comprometimento, entretanto, da atividade dopaminérgica e função cortical.

Por sua vez, o EA induz aumento da neurogênese, da densidade sináptica e de fatores neurotróficos (Mora *et al.*, 2007), o que pode ter contribuído para o aumento significativo do *turnover* dopaminérgico no CPF, observado em nosso trabalho, e recuperação, até certo ponto, da função cortical frontal.

Dessa forma, o enriquecimento ambiental parece ter potencial para compensar os efeitos negativos do estresse cedo na vida no córtex pré-frontal, aumentando a atividade dopaminérgica nesse local.

No núcleo accumbens observamos interação significativa entre SM e EA, reduzindo os níveis de DOPAC, sem alteração no *turnover* dopaminérgico. Vale citar que a variabilidade dos dados da dopamina pode ter sido responsável por não permitir verificar efeito dos tratamentos isolados nessa estrutura.

O estresse sustentado causa hiperestimulação da amígdala e aumento da neurotransmissão dopaminérgica mesolímbica, concomitante à dessensibilização dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos no NAcc (Jahng *et al.*, 2010; Meaney *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2013). Então há aumento da disponibilidade de dopamina no NAcc, *downregulation* dos receptores pós-sinápticos e aumento da atividade dopaminérgica nessa estrutura, para proporcionar a mesma resposta motivacional, que um indivíduo controle teria com uma disponibilidade inferior de dopamina.

Isso é confirmado a partir de trabalhos que observaram aumento dos níveis de dopamina e do *turnover* dopaminérgico no estriado de ratos separados (Matthews *et al.*, 2001); no NAcc de ratos submetidos ao isolamento social (Hall *et al.*, 1998) e redução da expressão do receptor dopaminérgico D2 no NAcc em ratos separados (Li *et al.*, 2013). Corroborando, repetidas exposições ao estresse ou a drogas, aumentam a magnitude e a duração das respostas dopaminérgicas no NAcc a psicoestimulantes (Kalivas & Stewart, 1991). Ainda foi descrita a redução da densidade do transportador de dopamina (DAT) no NAcc de ratos separados (Meaney *et al.*, 2002). Logo, a recaptação desse neurotransmissor para o neurônio pré-sináptico estaria reduzida, permanecendo por mais tempo na fenda sináptica.

Em nosso trabalho, a interação significativa entre SM e EA, reduzindo a quantidade de DOPAC no NAcc, pode sugerir redução da recaptção, visto que esse é um metabólito obtido a partir da ação da MAO sobre a dopamina, no citoplasma do neurônio pré-sináptico.

O EA parece modular a expressão de genes no estriado, tais como tirosina hidroxilase e cinases, envolvidas em funções celulares e transdução de sinal (Thiriet *et al.*, 2005), sugerindo que o EA influencia a determinação de resistência a drogas de abuso.

O ambiente enriquecido oferta boas condições de habitação, estímulos cognitivos, motores e relacionamento social, promovendo um estilo de vida mais saudável. Essa estratégia não farmacológica sendo empregada na fase de plasticidade neural (final da infância e adolescência) tem potencial para exercer efeito compensatório sobre os déficits gerados pela separação maternal e melhorar o desempenho em testes comportamentais.

Dessa forma, o estresse sustentado cedo na vida parece desencadear hipofunção dopaminérgica mesocortical (Braun *et al.*, 2000), hiperfunção dopaminérgica mesolímbica (Gos *et al.*, 2006) e maior potencial para abuso de álcool, dentre outros prejuízos.

Vale salientar que neste trabalho nós analisamos a quantidade de dopamina e seus metabólitos disponíveis em duas estruturas encefálicas, sendo que para uma avaliação mais completa poderiam ser analisadas outras estruturas envolvidas no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, assim como o conteúdo dopaminérgico nas sinapses, no citoplasma neuronal, a densidade de enzimas metabolizadoras e do transportador de dopamina, expressão de receptores dopaminérgicos, assim como outros sistemas neurotransmissores que influenciam a patofisiologia dos transtornos psiquiátricos.

Partindo do fato de que o estresse prejudica a memória de trabalho e a flexibilidade cognitiva (Luethi *et al.*, 2009), ambos envolvidos na função do CPF, nós submetemos os animais ao Teste de Reconhecimento de Objetos. Entretanto, não observamos efeito significativo da SM e do EA nas memórias de curta e de longa duração, mas uma interação significativa entre SM e EA somente na memória de

curta duração, reduzindo o tempo de exploração do objeto novo em comparação ao controle.

A literatura descreve a função cognitiva em roedores, por meio do TRO, não sendo afetada pela SM 3h/dia, dias 2 a 14 pós-natal (Grace *et al.*, 2009) e pela SM 4,5h/dia, 21 dias pós-natal (Vivinetto *et al.*, 2013). Por outro lado, alguns trabalhos evidenciam prejuízo à memória, com diminuição da preferência pela exploração de objetos novos em camundongos machos separados (Niwa *et al.*, 2011) e déficit mnemônico em ratos separados, 180 min/dia, 10 dias pós-natal, evidenciado pelo tempo similar de exploração do objeto familiar e do objeto novo nas memórias de curta e de longa duração (Mello *et al.*, 2008).

O EA tem potencial para aumentar a gliogênese, as ramificações neurais e a formação de sinapses no córtex (Diamond *et al.*, 1966 *apud* Praag *et al.*, 2000), influenciando na melhora de funções cognitivas. No entanto, talvez esse teste não seja uma boa ferramenta para avaliação dos efeitos do EA e da SM descritos na literatura sobre a memória. Ou ainda podem ter ocorrido variações nos protocolos ou fatores genéticos dos animais.

## 6. CONCLUSÕES

- O protocolo de Separação Maternal por 21 dias desencadeou maior desenvolvimento de comportamento depressivo nos animais, observado no Teste do Nado Forçado, do que a SM por 14 dias, sem alteração significativa na ansiedade dos animais;
- Não observamos hiperresponsividade do eixo HHA nos animais separados em resposta ao estresse agudo na idade adulta, em contraponto ao que está descrito na literatura;
- Nos testes comportamentais para aferição de depressão, observamos que o EA aumentou a preferência pelo consumo de sacarose, e ocorreu uma interação significativa entre SM e EA aumentando o tempo de nado ativo e reduzindo o tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado. Tomados juntos, esses dados indicam um efeito antidepressivo do enriquecimento ambiental;
- Nos testes para aferição de ansiedade, não observamos efeito da SM. O EA, conforme descrito na literatura, teve efeito ansiolítico no TOP, reduzindo a ansiedade aversiva aprendida; porém no LCE aumentou o tempo de permanência nos braços fechados e reduziu o tempo e o número de entradas nos braços abertos, indicando aumento da ansiedade inata;
- A SM aumentou significativamente a preferência pelo consumo de etanol, e o tratamento conjunto com o EA foi capaz de atenuar esse efeito;
- No córtex pré-frontal, a SM aumentou a quantidade de dopamina, e a literatura indica redução do *turnover* dopaminérgico. O EA aumentou significativamente o *turnover* dopaminérgico nessa estrutura, sugerindo uma recuperação da atividade dopaminérgica cortical;
- No núcleo accumbens houve uma interação significativa entre SM e EA, reduzindo os níveis de DOPAC, sem alteração no *turnover* dopaminérgico;

- Não observamos efeito significativo da SM e do EA nas memórias de curta e de longa duração, mas uma interação significativa entre SM e EA somente na memória de curta duração, reduzindo o tempo de exploração do objeto novo em comparação ao controle.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Ainda podem ser analisados em trabalhos subsequentes, visando uma melhor compreensão:

- Expressão de receptores, do transportador e das enzimas metabolizadoras de dopamina em áreas do sistema dopaminérgico mesocorticolimbico;
- Análise de outros sistemas neurotransmissores envolvidos em transtornos psiquiátricos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVANI, T.; HENSLER, J.G.; KOEK, W. Effect of early rearing conditions on alcohol drinking and 5-HT<sub>1A</sub> receptor function in C57BL/6J mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 10, p. 595–607, 2007.

AGUGGIA, J. P.; SUÁREZ, M. M.; RIVAROLA, M. A. Early maternal separation: neurobehavioral consequences in mother rats. **Behavioural brain research**, v. 248, p. 25–31, 2013.

ALBERTS, J. R. Huddling by rat pups: ontogeny of individual and group behavior. **Developmental Psychobiology**, v. 49, p. 22-32, 2007.

ARAI, J. A.; FEIG, L. A. Long-lasting and transgenerational effects of an environmental enrichment on memory formation. **Brain Research Bulletin**, v. 85, p. 30-35, 2011.

ARNSTEN, A. F. T. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 410–422, 2009.

BAIK, J. H. Dopamine signaling in reward-related behaviors. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 11, p. 7-152, 2013.

BARONCELLI, L.; BRASCHI, C.; SPOLIDORO, M.; BEGENISIC, T.; MAFFEI, L.; SALE, A. Brain plasticity and disease: a matter of inhibition. **Neural plasticity**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Research Reviews**, v. 28, n. 3, p. 309-369, 1998.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Neuroscience**, v. 7, p. 137-150, 2006.

BESSA, J. M.; MESQUITA, A. R.; OLIVEIRA, M.; PÊGO, J. M.; CERQUEIRA, J. J.; PALHA, J. A.; ALMEIDA, O. F.; SOUSA, N. A transdimensional approach to the behavioral aspects of depression. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 3, p. 1-7, 2009.

BEVILAQUA, M. C.; CHAVES, P. R. Enriquecimento ambiental como ferramenta moduladora dos efeitos do estresse em ratos: análises

comportamentais. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v. 17, n. 17, p. 139 – 147, 2013.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; RODGERS, R. J. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. **Aggressive Behavior**, v. 16, p.165-175, 1990.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. **Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry**, v. 27, n. 8, p. 1177–1185, 2003.

BOHN, M. C. Granule cell genesis in the hippocampus of rats treated neonatally with hydrocortisone. **Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 2003-2012, 1980.

BORDINI, I.; PAULA, C. In: MELLO, M. F.; MELLO, A. A. F.; KOHN, R. **Epidemiologia da saúde mental no Brasil**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 254, p. 248–254, 1976.

BRAKE, W. G.; ZHANG, T. Y.; DIORIO, J.; MEANEY, M. J.; GRATTON, A. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavior responses to psychoestimulants and stressors in adult rats. **European Journal Neuroscience**, v. 19, p. 1863-1874, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Sistema Nacional de Agravos de Notificação**, 2014. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet-sinanet/violencia/bases/violebrnet.def>> acesso em 06 de maio de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Coordenação Geral de Saúde Mental. **Saúde Mental em Dados**, Ano II, n. 4, 2007.

BRAUN, K.; LANGE, E.; METZGER, M.; POEGGEL, G. Maternal separation followed by early social deprivation affects the development of monoaminergic fibre systems in the medial prefrontal cortex of Octodon Degus. **Neuroscience**, v. 95, p. 309-318, 2000.

BRENES, J. C.; RODRIGUEZ, O.; Fornaguera J.; Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in

prefrontal cortex and ventral striatum. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 89, n. 1, p. 85–93, 2008.

BROWN, S. M.; HENNING, S.; WELLMAN, C. L. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v.15, p.1714–1722, 2005.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005.

CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; ROUX, S.; PORSOLT, R. D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 49, p. 1-5, 2011.

CHARPAK, N.; RUIZ, J. G.; ZUPAN, J.; CATTANEO, A.; FIGUEROA, Z.; TESSIER, R.; CRISTO, M.; ANDERSON, G.; LUDINGTON, S.; MENDOZA, S.; MOKHACHANE, M.; WORKU, B. Kangaroo Mother Care: 25 years after. **Acta Paediatrica**, v. 94, p. 514–522, 2005.

CHROUSOS, G. P.; P. W. GOLD. The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. **Journal of the American Medical Association**, v. 267, p. 1244–1252, 1992.

CIRULLI, F.; BERRY, A.; ALLEVA, E. Early disruption of the mother–infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1-2, p. 73–82, 2003.

CISLER, J. M.; JAMES, G. A.; TRIPATHI, S.; MLETZKO, T.; HEIM, C.; HU, X.P.; MAYBERG, H. S.; NEMEROFF, C. B.; KILTS, C. D. Differential functional connectivity within an emotion regulation neural network among individuals resilient and susceptible to the depressogenic effects of early life stress. **Psychological Medicine**, v. 43, p. 507–518, 2013.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.

CONDE-AGUDELO, A.; BELIZÁN, J. M.; DIAZ-ROSSELLO, J. Kangaroo mother care to reduce morbidity and mortality in low birthweight infants. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, p. 1-116, 2011.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. Dopamine. **The biochemical basis of Neuropharmacology**, p. 225 – 270, 2003.

CRUZ, F. C.; QUADROS, I. M.; PLANETA, CDA. S.; MICZEK, K. A. Maternal separation stress in male mice: Long-term increases in alcohol intake. **Psychopharmacology**, v. 201, p. 459–468, 2008.

DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; STRACK, A. M.; 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**, v. 1018, p. 141–150, 2004.

DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; LEVIN, N.; WALKER, C. D.; BRADBURY, M. J.; SUEMARU, S.; SCRIBNER, K. S. Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 746, p. 22-31, 1994.

DARNAUDÉRY, M.; MACCARI, S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 2, p. 571-585, 2008.

DAVIS, M.; HITCHCOCK, J. M.; BOWERS, M. B.; BERRIDGE, C. W.; MELIA, K. R.; ROTH, R. H. Stress-induced activation of prefrontal cortex dopamine turnover: blockade by lesions of the amygdala. **Brain Research**, v. 664, n. 1-2, p. 207-210, 1994.

DAY-WILSON, K. M.; JONES, D. N.; SOUTHAM, E.; CILIA, J.; TOTTERDELL, S. Medial prefrontal cortex volume loss in rats with isolation rearing-induced deficits in prepulse inhibition of acoustic startle. **Neuroscience**, v. 141, n. 3, p. 1113–1121, 2006.

DE KLOET, E. R. About stress hormones and resilience to psychopathology. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 885-892, 2008.

DER-AVAKIAN, A; MARKOU, A. Neonatal maternal separation exacerbates the reward-enhancing effect of acute amphetamine administration and the anhedonic effect of repeated social defeat in adult rats. **Neuroscience**, v. 170, n. 4, p. 1189–1198, 2010.

DIAMOND, M. C. LAW F, RHODES H, LINDNER B, ROSENZWEIG MR, KRECH D, BENNETT EL. Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. **The Journal of Comparative Neurology**, v.128, p.117–126, 1966.

DIAMOND, M. C. Response of the brain to enrichment. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 2, p. 210–220, 2001.

DIELENBERG, R. A., MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors : a review. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 25, p. 597–609, 2001.

DIELENBERG, R. A.; ARNOLD, J. C.; MCGREGOR, I. S. Low-Dose Midazolam Attenuates Predatory Odor Avoidance in Rats. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 62, n. 2, p. 197-201, 1999.

DUBOIS, J.; DEHAENE-LAMBERTZ, G.; KULIKOVA, S.; POUPON, C.; HÜPPI, P. S.; HERTZ-PANNIER, L. The early development of brain white matter: A review of imaging studies in fetuses, newborns and infants. **Neuroscience**, v. 276, p. 48-71, 2014.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behavioral brain research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1988.

ENRICO, P.; BOUMA, M.; DE VRIES, J. B.; WESTERINK, B. H. The role of afferents to the ventral tegmental area in the handling stress-induced increase in the release of dopamine in the medial prefrontal cortex: a dual-probe microdialysis study in the rat brain. **Brain Research**, v. 779, n. 1-2, p. 205-213, 1998.

ESLINGER, P. J.; FLAHERTY-CRAIG, C. V.; BENTON, A. L. Developmental outcomes after early prefrontal cortex damage. **Brain and cognition**, v. 55, n. 1, p. 84–103, 2004.

FAN, Y.; SHI, F.; SMITH, J. K.; LIN, W.; GILMORE, J. H.; SHEN, D. Brain anatomical networks in early human brain development. **NeuroImage**, v. 54, p. 1862–1871, 2011.

FEDER, A.; NESTLER, E. J.; CHARNEY, D. S. Psychobiology and molecular genetics of resilience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 446-457, 2009.

FLORES, G.; WOOD, G. K.; LIANG, J. J.; QUIRION, R.; SRIVASTAVA, L. K. Enhanced Amphetamine Sensitivity and Increased Expression of Dopamine D2 Receptors in Postpubertal Rats after Neonatal Excitotoxic Lesions of the Medial Prefrontal Cortex. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 22, p. 7366–7375, 1996.

FRANCIS, D. D.; CALDJI, C.; CHAMPAGNE, F.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. The Role of Corticotropin-Releasing Factor – Norepinephrine Systems in Mediating the Effects of Early Experience on the Development of Behavioral and Endocrine Responses to Stress. **Biological psychiatry**, v. 46, n. 9, p. 1153-1166, 1999.

FRANCIS, D. D.; DIORIO, J.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Environmental Enrichment Reverses the Effects of Maternal Separation on Stress Reactivity. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 18, p. 7840–7843, 2002.

FRISKE, J. E.; GAMMIE, S. C. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. **Physiology & Behavior**, v. 85, p. 187–194, 2005.

FUSTER, J. M. Upper processing stages of the perception-action cycle. **Trends Cognitive Science**, v. 8, n. 4, p. 143-145, 2004.

GALANI, R.; BERTHEL, M. C.; LAZARUS, C.; MAJCHRZAK, M.; BARBELIVIEN, A.; KELCHE, C.; CASSEL, J. C. The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 88, n. 1, p. 1–10, 2007.

GALLETLY, C.; VAN HOOFF, M.; MCFARLANE, A. Psychotic symptoms in young adults exposed to childhood trauma--a 20 year follow-up study. **Schizophrenia Research**, v. 127, n. 1-3, p. 76-82, 2011.

GRACE, L.; HESCHAM, S.; KELLAWAY, L. A.; BUGARITH, K.; VIVIENNE, A. Effect of exercise on learning and memory in a rat model of developmental stress. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 4, p. 643–657, 2009.

HALL, F. S.; WILKINSON, L. S.; HUMBY, T.; INGLIS, W.; KENDALL, D. A.; MARSDEN, C. A.; ROBBINS, T. W. Isolation rearing in rats: pre- and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, p. 859–872, 1998.

HEIDBREDER, C. A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, p. 555–579, 2003.

HEIDBREDER, C. A.; WEISS, I. C.; DOMENEY, A. M.; PRYCE, C.; HOMBERG, J.; HEDOU, G.; FELDON, J.; MORAN, M. C.; NELSON, P. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. **Neuroscience**, v. 100, p. 749–768, 2000.

HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biological Psychiatry**, v. 49, p. 1023–1039, 2001.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 21-30, 1996.

HOLMES, A.; LE GUIQUET, A. M.; VOGEL, E.; MOLLSTEIN, R. A.; LEMAN, S.; BELZUNG, C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1335–1346, 2005.

HUOT R. L.; THRIVIKRAMAN 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**, v. 158, p. 366–373, 2001.

HUTCHINSON, J. M. C. Is more choice always desirable? Evidence and arguments from leks, food selection, and environment enrichment. **Biological Reviews**, v. 80, p. 73-92, 2005.

ICKES, B. R.; PHAM, T. M.; SANDERS, L. A.; ALBECK, D. S.; MOHAMMED, A. H.; GRANHOLM, A. C. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. **Experimental Neurology**, v. 164, p. 45–52, 2000.

JAHNG, J. W.; RYU, V.; YOO, S. B.; NOH, S. J.; KIM, J. Y.; LEE, J. H. Mesolimbic dopaminergic activity responding to acute stress is blunted in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. **Neuroscience**, v. 171, n. 1, p. 144-152, 2010.

JINGWEN, L. V.; YONGJUAN, XIN.; WENHAO, ZHOU.; ZILONG, QIU. The epigenetic switches for neural development and psychiatric disorders. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, p. 339–346, 2013.

KALINICHEV, M.; EASTERLING, K. W.; PLOTSKY, P. M.; HOLTZMAN, S. G. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 73, p.131–140, 2002.

KALIVAS, P. W.; STEWART, J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. **Brain Research**, v. 16, n. 3, p. 223-244, 1991.

KENDLER, K. S.; BULIK, C. M.; SILBERG, J.; HETTEMA, J. M.; MYERS, J.; PRESCOTT, C. A. Childhood sexual abuse and adult psychiatric and substance use disorders in women: an epidemiological and cot win control analysis. **Archives General Psychiatry**, v. 57, p. 953–959, 2000.

KESSLER, R.; DAVIS, C.; KENDLER, K. Childhood adversity and adult psychiatric disorder in the US National Comorbidity Survey. **Psychological Medicine**, v. 27, p. 1101–1119, 1997.

KHOURY, A.; GRUBER, S. H.; MORK, A.; MATHÉ, A. A. Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 30, p. 535–540, 2006.

KOE, A. S.; SALZBERG, M. R.; MORRIS, M. J.; Q'BRIEN, T. J.; JONES, N. C. Early life maternal separation stress augmentation of limbic epileptogenesis: The role of corticosterone and HHA axis programming. **Elsevier Psychoneuroendocrinology**, v. 42, p. 124-133, 2014.

KONKLE, A. T.; KENTNER, A. C.; BAKER, S. L.; STEWART, A.; BIELAJEW, C. Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 427-436, 2010.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 97–129, 2001.

KOPIN, I. J. Definitions of Stress and Sympathetic Neuronal Responses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 771, p. 19-30, 1995.

LADD, C. O., OWENS, M. J., NEMEROFF, C. B. Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. **Endocrinology**, v. 137, p. 1212–1218, 1996.

LADD, C.O.; HUOT, R. L.; THRIVIKRAMAN, K. V.; NEMEROFF, C. B.; MEANEY, M. J.; PLOTSKY, P. M. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. **Progress in Brain Research**, v. 122, p. 81–103, 2000.

LANG, J. P.; BONNEWITZ, M. L.; KUSTERER, M.; LALANNE-TONGIO L. Alcohol consumption in patients with psychiatric disorders: assessment and treatment. **Encephale**, v. 40, n. 4, p. 301-307, 2014.

LAVIOLA, G.; HANNAN, A. J.; MACRÌ, S.; SOLINAS, M.; JABER, M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. **Neurobiology of disease**, v. 31, n. 2, p. 159–168, 2008.

LEE, J. H.; KIM, J. Y.; JAHNG, J. W. Highly Palatable Food during Adolescence Improves Anxiety-Like Behaviors and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Dysfunction in Rats that Experienced Neonatal Maternal Separation. **Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 2, p. 169-178, 2014.

LEONARD, B. E. Evidence for a biochemical lesion in depression. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61, p. 12-17, 2000.

LI, M.; XUE, X.; SHAO, S.; SHAO, F.; WANG, W. Cognitive, emotional and neurochemical effects of repeated maternal separation in adolescent rats. **Brain research**, v. 1518, p. 82–90, 2013.

LINGZHE, KONG.; RUIYONG, WU.; LU, WANG.; WEIGE, FENG.; YAN, CAO.; FADAO, TAI. Postpartum repeated separation from pups affects the behavior and neuroendocrine parameters of mandarin vole fathers. **Physiology & Behavior**, v. 139, p. 89–96, 2015.

LIU, D.; CALDJI, C.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Influence of Neonatal Rearing Conditions on Stress-Induced Adrenocorticotropin Responses and Norepinephrine Release in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 12, p. 5–12, 2000.

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**, v. 277, n. 5332, p. 1659–1662, 1997.

LU, L. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. **Experimental Neurology**, v. 183, n. 2, p. 600–609, 2003.

LUETHI, M.; MEIER, B.; SANDI, C. Stress effects on working memory, explicit memory, and implicit memory for neutral and emotional stimuli in healthy men. **Front. Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 15, p. 2-5, 2009.

MACRI, S.; WURBEL, H. Environmental modulation of maternal behavior and behavioural and HPA-responses in rats. **Animal Behavioral**, v. 73, p. 171-184, 2007.

MARCO, E. M.; MACRÌ, S.; LAVIOLA, G. Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: evidence from animal models. **Neurotoxicity research**, v. 19, n. 2, p. 286–307, 2011.

MATTHEWS, K.; DALLEY, J. W.; MATTHEWS, C.; TSAI, T. H.; ROBBINS, T. W. Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and sex-

specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. **Synapse**, v. 40, p. 1–10, 2001.

MATTHEWS, K.; ROBBINS, T. W. Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1-2, p. 45-55, 2003.

MCEWEN, B. S. Protective and Damaging Effects of Stress Mediators. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 3, p. 171-179, 1998.

MCEWEN, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators: The good and bad sides of the response to stress. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 51, n. 6, p. 2-4, 2002.

MCGOWAN, P. O.; SUDERMAN, M.; SASAKI, A.; HUANG, T. C. T.; HALLETT, M.; MEANEY, M. J.; SZYF, M. Broad epigenetic signature of maternal care in the brain of adult rats. **Plos One**, v. 6, n. 2, p. 1-11, 2011.

MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 1161–1192, 2001.

MEANEY, M. J.; BRAKE, W.; GRATTON, A. Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems : a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse ? **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, n. 1-2, p. 127–138, 2002.

MELLO, P. B.; BENETTI, F.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. The physical exercise reverts the long-term memory caused by maternal deprivation in Inhibitory avoidance test, but not in Morris water maze and object recognition test. **Neurobiology of Learning and Memory** , 2008.

MORA, F.; SEGOVIA, G.; DEL, ARCO. A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. **Brain Research Reviews**, v. 55, p. 78–88, 2007.

MOSAFERI, B.; BABRI, S.; EBRAHIMI, H.; MOHADDES, G. Enduring effects of post-weaning rearing condition on depressive- and anxiety-like behaviors and motor activity in male rats. **Physiology & Behavior**, v. 142, p. 131-136, 2015.

MUSCAT, R.; PAPP, M.; WILLNER, P. Antidepressant-like effects of dopamine agonists in an animal model of depression. **Biological Psychiatry**, v. 31, p. 937–946, 1992.

NARANJO, C. A.; TREMBLAY, L. K.; BUSTO, U. E. The role for the brain reward system in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 25, p. 781– 823, 2001.

NEMEROFF, C. B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Molecular Psychiatry**, v. 1, p. 336-342, 1996.

NEMEROFF, C. B. The neurobiology of depression. **Scientific American**, v. 278, p. 42-49, 1998.

NETTO, E. F. C. Medo e ansiedade: Aspectos comportamentais e neuroanatômicos. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 54, n. 2, p. 62-65, 2009.

NICOLA, S. M. The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. **Psychopharmacology**, v. 191, n. 3, p. 521–550, 2007.

NIWA, M.; MATSUMOTO, Y.; MOURI, A.; OZAKI, N.; NABESHIMA, T. Vulnerability in early life to changes in the rearing environment plays a crucial role in the aetiopathology of psychiatric disorders. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, p. 459–477, 2011.

PAPALEO F, Crawley, J. N.; Song, J.; Lipska, B. K.; Pickel, J.; Weinberger, D. R.; Chen, J. Genetic dissection of the role of catechol-O-methyltransferase in cognition and stress reactivity in mice. **Journal Neuroscience**, v. 28, p. 8709–8723, 2008.

PASCUAL, R.; ZAMORA-LEÓN, S. P. Effects of neonatal maternal deprivation and postweaning environmental complexity on dendritic morphology of prefrontal pyramidal neurons in the rat. **Acta Neurobiologia e Experimentalis**, v. 67, p. 471–479, 2007.

PELLOW, S.; Chopin, P.; File, S. E.; Briley, M. Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PEREIRA, L. O; ARTENI, N. S.; PETERSEN, R. C.; DA ROCHA, A. P.; ACHAVAL, M.; NETTO, C. A. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 1, p. 101-108, 2007.

PHAM, T. M.; WINBLAD, B.; GRANHOLM, A. C.; MOHAMMED, A. H. Environmental influences on brain neurotrophins in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 167–175, 2002.

- PLOJ, K.; ROMAN, E.; NYLANDER, I. Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. **Neuroscience**, v. 121, n. 3, p. 787–799, 2003.
- PLOTSKY, P. M.; THRIVIKRAMAN, K. V.; MEANEY, M. J. Central and feedback regulation of hypothalamic corticotrophin-releasing factor secretion. **Pharmaceutical & Medicinal Chemistry**, v.172, p. 59-75, 1993.
- PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavior despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, p. 379-391, 1978.
- PORSOLT, R. D.; BERTIN, A; JALFRE, M. Behavior despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archive International of Pharmacodynamics Therapy**, v. 229, p. 327-336, 1977a.
- PORSOLT, R. D.; LE PICHON; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730-722, 1977b.
- RADLEY, J. J.; Rocher, A. B.; Miller, M.; Janssen, W. G.; Liston, C.; Hof, P. R.; McEwen, B. S.; Morrison, J. H. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 16, p. 313–320, 2006.
- REUL, J. M. Making memories of stressful events: a journey along epigenetic, gene transcription, and signaling pathways. **Frontiers in psychiatry**, v. 5, p. 1-11, 2014.
- ROBINSON, A. J.; NESTLER, E. J. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. **Neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 623-637, 2011.
- ROBINSON, T. E.; BECKER, J. B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain research**, v. 396, n. 2, p. 157-198, 1986.
- ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The psychology and neurobiology of addiction : an incentive – sensitization view. **Addiction**, v. 95, p. 91-117, 2000.
- RODGERS, C. Why Kangaroo Mother Care should be standard for all newborns. **Journal of Midwifery Womens Health**, v. 58, p. 249-252, 2013.
- ROSENZWEIG, M. R.; BENNET, E. L.; HEBERT, M.; MORIMOTO, H. Social grouping cannot for cerebral effects of enriched environments. **Brain Research**, v. 153, n. 3, p. 563-576, 1978.

ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L. Psychobiology of plasticity : effects of training and experience on brain and behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 78, p. 57–65, 1996.

ROUGÉ-PONT, F.; Marinelli, M.; Le Moal, M.; Simon, H.; Piazza, P. V. Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion. **Journal Neuroscience**, v.15, n. 11, p. 7189-7195, 1995.

SALE, A.; BERARDI, N.; MAFFEI, L. Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy. **Physiological reviews**, v. 94, n. 1, p. 189–234, 2014.

SAMPEDRO-PIQUERO, P.; BEGEGA, A.; ARIAS, J. L. Increase of glucocorticoid receptor expression after environmental enrichment: Relations to spatial memory, exploration and anxiety-related behaviors. **Physiology & Behavior**, v. 129, p. 118–129, 2014.

SANCHEZ, M. M.; LADD, C. O.; PLOTSKY, P. M. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. **Development and Psychopathology**, v. 13, p. 419–449, 2001.

SCHMIDT, M. V.; OITZL, M. S.; LEVINE, S.; DE KLOET, E. R. The HPA system during the postnatal development of CD1 mice and the effects of maternal deprivation. **Developmental Brain Research**, v. 139, p. 39-49, 2002.

SCHUBERT, M. I.; PORKESS, M. V.; DASHDORJ, N.; FONE, K. C.; AUER, D. P. Effects of social isolation rearing on the limbic brain: a combined behavioral and magnetic resonance imaging volumetry study in rats. **Neuroscience**, v. 159, n. 1, p. 21–30, 2009.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 10, n. 2, p. 230-231, 1936.

SOLINAS, M.; THIRIET, N.; CHAUVET, C.; JABER, M. Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 4, p. 572-592, 2010.

SORG, B. A.; KALIVAS, P. W. Effects of cocaine and footshock stress on extracellular dopamine levels in the ventral striatum. **Brain research**, v. 559, n. 1, p. 29-36, 1991.

SOUTHWICK, S. M.; VYTHILINGAM, M.; CHARNEY, D. S. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 1, p. 255-291, 2005.

SPIGA, F.; WALKER, J. J.; TERRY, J. R.; LIGHTMAN, S. L. HPA axis-rhythms. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 3, p. 1273-1298, 2014.

STAPLES, L. G.; HUNT, G. E.; CORNISH, J. L.; MCGREGOR, I. S. Neural activation during cat odor-induced conditioned fear and 'trial 2' fear in rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1265–1277, 2005.

TEICHER, M. H.; TOMODA, A.; ANDERSEN, S. L. Neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment: Are results from human and animal studies comparable? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1071, p. 313–323, 2006.

THIRIET, N.; SOLINAS, M.; BLONDEL, A.; JABER, M. Enriched environment induces adaptive changes in mouse striatum and modulates behavioural response to drugs. **Behavioural Pharmacology**, v. 16, p. S78, 2005.

TZSCHENTKE, T. M. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. **Progress in Neurobiology**, v. 63, p. 241-320, 2001.

VAN HARMELLEN, A. L.; VAN TOL, M. J.; VAN DER WEE, N. J.; VELTMAN, D. J.; ALEMAN, A.; SPINHOVEN, P.; VAN BUCHEM, M. A.; ZITMAN, F. G.; PENNINX, B. W.; ELZINGA, B. M. Reduced medial prefrontal cortex volume in adults reporting childhood emotional maltreatment. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 9, p. 832-838, 2010.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Neuroscience**, v. 1, n. 3, p.191-198, 2000.

VEENA, J.; SRIKUMAR, B. N.; RAJU, T. R.; SHANKARANARAYANA, RAO. B. S. Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats. **Neuroscience Letters**, v. 455, n. 3, p. 178-182, 2009.

VIVINETTO, A. L.; SUÁREZ, M. M.; RIVAROLA, M. A. Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. **Behavioural Brain Research**, v. 240, p. 110– 118, 2013.

WIDMAN, D. R.; ROSELLINI, R. A. Restricted Daily Exposure to Environmental Enrichment Increases the Diversity of Exploration. **Physiology & Behavior**, v. 47, p. 57-62, 1990.

WINBERG, J. Mother and newborn baby: mutual regulation of physiology and behavior – a selective review. **Developmental Psychobiology**, v. 47, p. 217–229, 2005.

WOODWARD, C. J. H.; EMERY, P. W. Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 419, p. 280 – 284, 1987.

YANG, Y.; RAINE, A. Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: a meta-analysis. **Psychiatry Research**, v. 174, p. 81–88, 2009.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZAPATA, A.; CHEFER, V. I.; SHIPPENBERG, T. S.; DENOROY, L. Detection and Quantification of Neurotransmitters in Dialysates. **Current Protocol Neuroscience**, p. 1-37, 2009.

ZHANG, Y.; ZHU, X.; BAI, M.; ZHANG, L.; XUE, L.; YI, J. Maternal deprivation enhances behavioral vulnerability to stress associated with miR-504 expression in nucleus accumbens of rats. **PLoS One.**, v. 8, n. 7, p. e69934, 2013.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Certificado do CEUA de aprovação do presente estudo

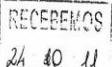
  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



# CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 057/2011, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **"Estratégias não farmacológicas para prevenção dos efeitos de longo prazo da separação materna"**, que tem como responsável o (a) docente **Ana Paula Santana de Vasconcelos Bittencourt**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 05/08/11. Este certificado expira-se em 30/08/2016.

Vitória (ES), 08 de agosto de 2011.


  
Presidente do  
Comitê de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UFES

### 9.2. Ganho ponderal ao longo do período de Enriquecimento Ambiental

