

PUCRS

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

THIAGO WENDT VIOLA

**MODELOS EXPERIMENTAIS DE MORADIA EMPOBRECIDA E PRIVAÇÃO DO CUIDADO
MATERNO NA INFÂNCIA: EFEITOS SOBRE O FUNCIONAMENTO COGNITIVO,
MECANISMOS MOLECULARES E NEUROEPIGENÉTICOS**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA / PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**MODELOS EXPERIMENTAIS DE MORADIA EMPOBRECIDA E PRIVAÇÃO DO
CUIDADO MATERNO NA INFÂNCIA: EFEITOS SOBRE O FUNCIONAMENTO
COGNITIVO, MECANISMOS MOLECULARES E NEUROEPIGENÉTICOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
PUCRS para obtenção de título de Doutor em
Pediatria e Saúde da Criança

THIAGO WENDT VIOLA

PROF. DR. RODRIGO GRASSI-OLIVEIRA
ORIENTADOR

PORTO ALEGRE
2018

DADOS DE CATALOGAÇÃO

Ficha Catalográfica

V795m Viola, Thiago Wendt

Modelos experimentais de moradia empobrecida e privação do cuidado materno na infância : efeitos sobre o funcionamento cognitivo, mecanismos moleculares e epigenéticos / Thiago Wendt Viola . – 2018.

108 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.


Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira.

1. estresse precoce. 2. cognição. 3. sistema dopaminérgico. 4. marcadores imunológicos. 5. sistema corticotrofinérgico. I. Grassi-Oliveira, Rodrigo. II. Título.


Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável: Marcelo Votto Teixeira CRB-10/1974


COMPROVANTE DE ACEITE PARA REVISÃO DE ARTIGO ORIGINAL (Estudo 1)

Your co-authored submission 



 **Psychoneuroendocrinology** <Evisesupport@elsevier.com>
para mim ▾

12.04 (Há 3 minutos) ☆ ↶ ▾

 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

Dear Mr. Viola,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Psychoneuroendocrinology

Title: Childhood impoverished housing impairs adolescent risk assessment: a sex-specific effect associated with histone epigenetic regulation of Crfr1 in the medial prefrontal cortex

Corresponding Author: Rodrigo Grassi-Oliveira

Co-Authors: Marco Andrea Riva, Timothy Bredy, Li Xiang, Paul R. Marshall, Lucas Albrechet-Souza, Anderson Centeno, rodrigo orso, Érika Kesterling, Kerstin Creutzberg, Luis Eduardo Wearick-Silva, Thiago Viola

Rodrigo Grassi-Oliveira submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating to http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=PNEC.

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#)

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at rodrigo.grassi@puccs.br.

Thank you,
Psychoneuroendocrinology

This message was sent automatically. Please do not reply

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da criança. Agradeço ao Grupo de Pesquisa em Neurociência Cognitiva do Desenvolvimento pelo apoio, amizade e força de trabalho. Agradeço muito ao coordenador do grupo e meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira, cuja sabedoria, criatividade e motivação, têm fomentado e cativado meu desejo e gosto pela ciência ao longo dos últimos anos. O Prof. Rodrigo tem sido um amigo e um grande modelo de pesquisador para mim, dando suporte para a realização de todas as etapas deste trabalho.

Agradeço muito ao Prof. Timothy Bredy pela oportunidade de realizar um extenso treinamento em epigenética, biologia molecular e neurociência comportamental em seu laboratório. Agradeço muito aos meus colegas de pesquisa, Luis Eduardo Wearick-Silva, Rodrigo Orso, Kerstin Creutzberg, Érika Kerstering, Francisco Lumertz, Anderson Centeno, Xiang Li, Paul Marshall e Conor Murphy pela parceria, ensinamentos e auxílio em diversas etapas do trabalho realizado. Agradeço muito também a equipe de trabalho do prédio 14 (CEMBE) da PUCRS, pelos auxílios realizados na manutenção dos animais utilizados.

Agradeço aos meus pais, amigos e familiares próximos por todo apoio e ajuda durante todos os momentos que precisei. Da mesma forma agradeço muito a Bruna Bayer, minha namorada, e sua família, pela paciência e companheirismo durante a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de doutorado, essencial para a dedicação a esta pesquisa, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concebida de doutorado sanduíche.

RESUMO

Introdução: O desenvolvimento infantil em ambientes e condições adversas, como frente a escassez de recursos econômicos ou de cuidado parental, é considerado fator de risco para doenças neurológicas e psiquiátricas. Alterações em processos cognitivos parecem mediar esta relação, contudo, os mecanismos neurobiológicos adjacentes aos efeitos de experiências adversas precoces sobre a cognição ainda não foram completamente revelados. Evidências apontam que a neurotransmissão dopaminérgica e o sistema corticotrofinérgico possuem importantes funções na neurobiologia da tomada de decisão e avaliação do risco, que são processos cognitivos associados a funcionalidade do córtex cerebral. Similarmente, a memória de trabalho é outro domínio cognitivo que envolve atividade cortical, e alguns estudos apontam que alterações na sinalização neuroimunológica podem contribuir para o declínio destas funções cognitivas superiores.

Objetivos: Investigar o efeito da exposição a moradia empobrecida na infância sobre o processamento cognitivo de avaliação do risco e mecanismos neurobiológicos e epigenéticos corticais associados em camundongos adolescentes da linhagem C57BL/6. Além disso, investigar o efeito da privação do cuidado materno na infância e da ativação sistêmica do receptor do tipo toll (TLR)-3 sobre a memória de trabalho e mecanismos neurobiológicos corticais associados em camundongos machos adolescentes da linhagem BALB/c.

Métodos: Foram propostos dois estudos com modelos experimentais murinos. O primeiro estudo utilizou um modelo de moradia empobrecida do dia pós-natal (P) 2 ao P9. Quando os animais encontravam-se no período da adolescência, o processamento de avaliação do risco foi investigado por uma tarefa que explora um conflito entre dois estímulos biologicamente fundamentais na vida de um roedor, a motivação de consumir uma solução doce e altamente palatável (leite condensado) tendo que se expor a pistas olfativas de um predador natural, o coite. Os níveis de expressão de genes dopaminérgicos (*Drd1*, *Drd2*) e corticotrofinérgicos (*Cfr*, *Crfr1*) no córtex medial pré-frontal (mPFC) foram investigados por PCR em tempo real. Os níveis de alterações de histonas (H3K9me3, H3R2me2s) foram avaliados na região promotora de genes associados aos desfechos comportamentais. Adicionalmente, os níveis de corticosterona plasmática foram avaliados por ELISA. No segundo estudo, o modelo de adversidade utilizado foi o de privação do cuidado materno do P2 ao P15. Similarmente, quando os animais encontravam-se no período da adolescência, ocorreu a administração sistêmica de um agonista de TLR-3, um receptor viral relacionado a sinalização inflamatória, e posteriormente os animais

foram testados em uma tarefa de memória de trabalho. Os níveis de expressão gênica de genes pró-inflamatórios (*Nfkb1*, *Il6* e *Tnf- α*) e do próprio receptor (*Tlr3*), foram avaliados no mPFC por PCR em tempo real.

Resultados: no primeiro estudo, observou-se um aumento de comportamentos do tipo ansioso, maior responsividade do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) e uma diminuição do processamento de avaliação do risco nas fêmeas expostas a moradia empobrecida, ao passo que não ocorreram alterações nos animais machos. A diminuição de avaliação do risco foi associada a um aumento na expressão de *Crfr1* no mPFC, o que se correlacionou com um aumento dos níveis de H3R2me2s na região promotora deste gene. No segundo estudo, observou-se que a ativação sistêmica de TLR-3 exacerbou os prejuízos de memória de trabalho decorrentes da exposição a privação do cuidado materno, e este efeito correlacionou-se aos níveis de expressão de *Nfkb1* no mPFC.

Conclusões: os achados do estudo 1 indicam um efeito deletério da exposição a moradia precária na infância sobre o processamento de avaliação do risco em fêmeas, revelando um prejuízo específico referente ao engajamento cognitivo frente a situações potencialmente perigosas. Além disso, evidenciou-se um efeito a nível epigenético de regulação da expressão cortical de *Crfr1*, indicando um importante papel deste gene sobre a relação entre pobreza na infância e alterações cognitivas em fêmeas adolescentes. Por fim, os achados do estudo 2 demonstraram que a ativação sistêmica do TLR-3 pode exacerbar os prejuízos de memória de trabalho induzidos pelo estresse precoce, revelando um papel mediador da sinalização neuroinflamatória no córtex cerebral relacionada as alterações cognitivas decorrentes da exposição a privação do cuidado materno.

Palavras-chave: estresse precoce, cognição, marcadores imunológicos, sistema dopaminérgico, sistema corticotrofinérgico, avaliação do risco, memória de trabalho

ABSTRACT

Introduction: Child development in adverse environments and conditions, such as with the lack of economic resources or with parental care deprivation, is considered a major risk factor for neurological and psychiatric diseases. Altered cognitive processing is thought to mediate this relationship, however, the neurobiological mechanisms underlying the effects of early adverse experiences on cognition have not yet been fully revealed. Evidence indicates that dopaminergic neurotransmission and the corticotrophinergic system have important functions in the neurobiology of decision-making and risk assessment, which are cognitive processes associated with the functionality of the cerebral cortex. Similarly, working memory is another cognitive domain that underlies cortical activity, and some studies indicate that alterations in neuroimmunologic signaling may contribute to the decline of these higher order cognitive functions.

Objectives: To investigate the effects of impoverished housing conditions during early life on risk assessment processing and its associated cortical neurobiological and epigenetic mechanisms in C57BL/6 adolescent mice. In addition, we investigated the effects maternal care deprivation during early life, and the effects of systemic activation of the toll-type receptor (TLR)-3 on working memory performance, and its associated cortical neurobiological mechanisms in male BALB/c mice.

Methods: Two studies with rodent experimental models were proposed. The first study used a model of impoverished housing from the postnatal day (P) 2 to P9. During adolescence, risk assessment was investigated using a behavioral paradigm that explores the conflict between two biologically relevant stimuli: the motivation to consume a sweet and highly palatable solution while being threatened by predatory olfactory cues. The expression of dopaminergic (*Drd1*, *Drd2*) and corticotrophinergic (*Cfr*, *Crfr1*) genes in the medial prefrontal cortex (mPFC) were investigated by real-time PCR. The accumulation of histone marks (H3K9me3, H3R2me2s) were assessed at the promoter region of genes associated with behavioral outcomes. In addition, plasma corticosterone levels were assessed by ELISA. In the second study, a rodent model of maternal care deprivation from P2 to P15 was applied. During adolescence, animals were injected with a TLR-3 agonist, which is a viral receptor implicated with inflammatory signaling, and then tested in a working memory task. The expression of pro-inflammatory genes (*Nfkb1*, *Il6* and *Tnf- α*) and the receptor itself (*Tlr3*), were performed in the mPFC by real-time PCR.

Results: In the first study, we found increased anxiety-like behavior, increased HPA axis response to stress and impaired RA processing in female adolescent mice, with no effect in males. These sex-specific effects were associated with increased *Crf1* mRNA expression in the medial prefrontal cortex (mPFC), which correlated with an increase in the occupancy of the histone mark H3R2me2s, a histone modification known to be involved in transcriptional activation and epigenetic priming, within the promoter of the *Crf1* gene. In the second study, we found that systemic administration of a TLR-3 agonist can modulate and exacerbate early life stress induced working memory impairments, and that higher gene expression levels of *Nfkb1* in the mPFC was associated a lower working memory performance.

Conclusions: The findings of the first study indicated a deleterious effect of impoverished housing exposure on risk assessment processing in females, which could be detrimental for cognitive performance in potentially dangerous situations, and suggest that the epigenetic priming of the *Crf1* gene may represent a critical factor mediating the relationship between early life stress and altered cognitive processing later in life in females. Finally, the findings of the second study demonstrated that the systemic activation of TLR-3 can induce working memory impairments, revealing an important mediating role of the neuroinflammatory signalling in the cerebral cortex associated with the cognitive changes resulting from maternal care deprivation exposure during early in life.

Keywords: early life stress, cognition, immunological markers, dopaminergic system, corticotrophinergic system, risk assessment, working memory

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral dos estudos.....	25
Figura 2. Linha do tempo dos experimentos.....	32
Figura 3. Modelo de moradia empobrecida na infância.....	33
Figura 4. Aparato do paradigma PORT.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

TLR – Receptores do tipo Toll

P – Dia pós-natal

DRD1 – Receptor de dopamina D1

DRD2 – Receptor de dopamina D2

CRF – Fator liberador de corticotrofina

CRFR1 – Receptor do fator liberador de corticotrofina do tipo 1

mPFC – Córtex medial pré-frontal

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

TLR-3 – Receptor do tipo Toll 3

NF-kB – Fator nuclear kappa B

IL – Interleucina

TNF – Fator de necrose tumoral

PCR – Reação em cadeia de polimerase

HPA – Hipotálamo-pituitária-adrenal

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

QI – Quociente de inteligência

PORT – *Predator-Odor Risk-Taking*

RNA – Ácido ribonucleico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

POLY I:C – *Polyinosinic:polycytidylic acid*

cDNA – DNA complementar

CT – *Cycle threshold*

ANOVA – Análise de variância

CORT - Corticosterona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1.2.1. O impacto da pobreza sobre o desenvolvimento cognitivo.....	15
1.2.2. Dopamina, corticotrofina e avaliação do risco.....	16
1.2.3. Alterações de histonas e regulação da expressão gênica.....	19
1.2.4. Efeitos da privação do cuidado materno sobre o desenvolvimento.....	20
1.2.5. Sinalização neuroimune e cognição.....	21
1.2.6. Justificativa e síntese dos estudos.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral (Estudo 1).....	27
2.2. Objetivos específicos (Estudo 1).....	27
2.3. Objetivo geral (Estudo 2).....	28
2.4. Objetivos específicos (Estudo 2).....	28
3. MÉTODOS.....	29
3.1. Considerações éticas.....	30
3.2. Amostra e delineamento experimental.....	30
3.3. Modelo de moradia empobrecida na infância.....	33
3.4. Modelo de privação do cuidado materno na infância.....	33
3.5. Análise do comportamento materno.....	34
3.6. Análise do peso corporal.....	35
3.7. Teste comportamental de avaliação do risco.....	35
3.8. Teste comportamental de avaliação da ansiedade.....	37
3.9. Teste comportamental de memória de trabalho.....	37
3.10. Administração de agonista de TLR-3.....	38
3.11. Coleta de tecido cerebral.....	38
3.12. Análise de expressão gênica.....	38
3.13. Análise de modificações de histonas.....	40
3.14. Análise dos níveis de CORT.....	41
3.15. Análise estatística dos dados.....	41
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	42
4.1. A exposição a moradia empobrecida na infância produz prejuízos na avaliação de risco e é associada a alterações na expressão de <i>Crf1</i> no mPFC de camundongos fêmeas adolescentes.....	44
4.2. A neuroinflamação aguda provocada pela ativação sistêmica de TLR-3 exacerba os prejuízos de memória de trabalho induzidos pelo estresse precoce em camundongos adolescentes.....	46
5. REFERÊNCIAS.....	48
6. ANEXOS E APÊNDICES.....	59
Aprovação CEUA.....	60
Estudo 1 - Impoverished housing conditions leads to increased stress reactivity, impaired risk assessment, and epigenetic priming associated with increased corticotropin releasing factor receptor 1 gene expression in the medial prefrontal cortex of adolescent female mice.....	61
Estudo 2 - Acute neuroinflammation elicited by TLR-3 systemic activation exacerbates early life stress induced working memory impairments in male adolescent mice.....	91
Declaração de ciência do professor orientador em concordância com as alterações realizadas.....	108

1. INTRODUÇÃO

Esta tese de doutorado é composta de dois estudos que utilizaram modelos experimentais murinos, buscando revelar o impacto de experiências adversas no início da vida sobre desfechos cognitivos e neurobiológicos. O primeiro estudo foi uma investigação dos efeitos da exposição a moradia empobrecida na infância em relação ao processamento cognitivo de avaliação do risco, bem como sobre a expressão gênica e alterações de histonas no córtex cerebral. O segundo estudo refere-se a uma investigação do impacto da privação do cuidado materno sobre o desempenho de memória de trabalho e sinalização neuroimune cortical.

1.2. REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1. O impacto da pobreza sobre o desenvolvimento cognitivo

A desigualdade econômica é um fenômeno sócio-político mundial determinante na atual elaboração de políticas de saúde pública (1). As populações de baixa-renda financeira frequentemente estão expostas a uma maior diversidade de fatores de risco para diversas doenças, além de terem maior dificuldade na busca por tratamentos e práticas de prevenção/promoção de saúde (2). A pobreza está essencialmente associada a uma menor qualidade de vida, aumento da mortalidade (3) e vulnerabilidade para o desenvolvimento de obesidade (4), diabetes (5), HIV (6), asma (7), doenças neurológicas (7) e transtornos psiquiátricos (5).

Um fator mediador crítico na associação entre pobreza, qualidade de vida e desfechos neuropsiquiátricos se refere à influência do nível socioeconômico sobre o funcionamento cognitivo (6, 8, 9). Evidências epidemiológicas e experimentais demonstram as consequências negativas da privação de recursos básicos sobre os processos cognitivos, um efeito determinante para a continuidade do ciclo de pobreza nas populações de baixa-renda (10). A influência deletéria da pobreza na cognição é ainda mais crítica na infância, devido a fundamental importância do conjunto renda-recursos-educação parental sobre o desenvolvimento de processos cognitivos, emocionais, motores e de linguagem dos recém-nascidos (11). Evidências sugerem que a influência do nível educacional materno sobre o quociente de inteligência (QI) infantil seja mediado em 60% pela qualidade do ambiente físico de desenvolvimento e nível de estimulação da criança (12). Deste modo, a pobreza e o desfavorecimento socioeconômico são fatores preditivos de baixo QI, bem como para o aumento da incidência de transtornos de aprendizagem e diminuição dos anos de escolaridade formal em crianças e adolescentes (13).

Ainda que o estudo do impacto da pobreza sobre a cognição seja um campo de pesquisa com mais de nove décadas de história, o estudo neurocientífico dessa relação é recente (11). Os mecanismos neurobiológicos adjacentes ao desenvolvimento cognitivo em condições de pobreza não são bem compreendidos, embora tal conhecimento seja importante para a identificação de novos alvos de intervenção/prevenção para indivíduos expostos à pobreza e privação de recursos básicos ao longo da infância. Do ponto de vista neuroestrutural, evidências recentes demonstram que o baixo nível socioeconômico em crianças é associado a uma redução de 8-10% de matéria cinzenta em regiões cerebrais do córtex frontal (14). Estima-se que a influência desta redução seja de até 20% sobre os fatores

envolvidos com prejuízos acadêmicos decorrentes da pobreza, particularmente devido ao córtex pré-frontal ser uma região crucial para o funcionamento executivo, memória de trabalho, e julgamento e tomada de decisões. Deste modo, o primeiro estudo desta tese buscou investigar as bases neurobiológicas e epigenéticas do efeito da pobreza na infância sobre o desenvolvimento do córtex pré-frontal e funções cognitivas associadas, particularmente sobre o processamento de avaliação do risco na adolescência, por meio de uma pesquisa experimental animal.

Considerando que durante os primeiros meses de vida importantes alterações no processamento cognitivo já são percebidas em recém-nascidos de famílias pobres, que vivem em condições de moradia precária (12), o modelo de pobreza adotado nesta proposta se refere à exposição a moradia empobrecida na infância, particularmente durante o P2 ao P9 de camundongos recém-nascidos. Tal modelo experimental é conhecido como *limited bedding*, e ao longo dos últimos anos vem sendo utilizado como uma manipulação precoce que contempla aspectos de moradia precária em roedores, caracterizada pela redução de material para construção do ninho dos neonatos (15). Uma vez que o período da infância em camundongos estende-se até o P21, estima-se que os primeiros 9 dias de vida deste roedor mimetizem o primeiro ano de vida de um ser humano (16).

1.2.2. Dopamina, corticotrofina e avaliação do risco

A avaliação de risco é um processo cognitivo que envolve uma análise de custo-benefício, sendo fundamental para o comportamento humano de julgamento e tomada de decisão (17). Por exemplo, comprar ou não um carro, experimentar ou não uma substância ilícita, são situações que necessitam de uma avaliação cognitiva mais detalhada em relação às alternativas disponíveis, bem como quais ganhos e riscos estão envolvidos e as possíveis consequências vinculadas em cada escolha. Desta forma, a avaliação de risco é um processo dinâmico, pois é dependente da situação, opções e motivações do indivíduo (18).

Como nos demais processos cognitivos, a avaliação de risco pode estar comprometida em certos indivíduos, manifestando-se como parte integrante da sintomatologia de transtornos psiquiátricos como Esquizofrenia (19), Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (20), Transtorno Bipolar (21), Jogo Patológico e especialmente Dependência Química (22). Fatores situacionais e transitórios também afetam a dinâmica da avaliação de risco, como o desenvolvimento, no qual adolescentes apresentam maior exposição a situações de risco (e.g. comportamento desafiadores e opositores, uso de substâncias) em comparação a crianças e

adultos (23); e a exposição a estressores, que modificam o curso do pensamento e, portanto, da avaliação do risco (24).

A elaboração de modelos experimentais com roedores para o estudo de funções cognitivas superiores, como a tomada de decisão e avaliação do risco, é recente (25, 26). Paradigmas como o *Iowa Gambling Task* e o *Delay-Discounting*, tarefas neuropsicológicas consagradas na investigação da tomada de decisão sobre incerteza com seres humanos, foram convertidas com sucesso para a utilização em estudos com roedores (27, 28). Isto gerou novas possibilidades na investigação de processo neuroquímicos envolvidos na avaliação do risco, bem como quais seriam os mecanismos moleculares cruciais para o desempenho de escolhas e decisões associadas ao risco. No entanto, nestes paradigmas o “risco” em potencial refere-se à perda ou atenuação da recompensa utilizada ao longo da tarefa. Portanto, tais paradigmas não conseguem reproduzir a tomada de decisão baseada no risco real para o animal, uma vez que não há alternância entre um estímulo avaliado como um “perigo” em potencial, e um estímulo reforçador. Tal limitação foi recentemente superada através do desenvolvimento de tarefas comportamentais que investigam a avaliação de risco por meio da escolha do animal em se expor a uma situação aversiva para receber um alimento como recompensa (29).

O paradigma *Predator-Odor Risk-Taking* (PORT) é uma tarefa que explora um conflito entre dois estímulos biologicamente fundamentais na vida de um roedor, a motivação de consumir uma solução doce e altamente palatável (leite condensado) e expor-se a pistas olfativas de um predador natural, o coiote (29). Desta forma, o animal é apresentado a uma situação nova em que precisa avaliar os riscos de percorrer um ambiente potencialmente aversivo (e.g. maravalha com urina de coiote) para alcançar a recompensa envolvida na situação. Neste paradigma, o leite condensado é utilizado como um estímulo reforçador, devido ao aumento no volume de consumo desta substância após breves exposições ao estímulo. Desta forma, a tarefa envolve diferentes etapas, o que permite a investigação de dois processos distintos envolvidos na busca pela recompensa.

A preferência e busca por um estímulo reforçador permite a avaliação do “*liking*”, que corresponde ao nível de prazer atribuído a um determinado estímulo. Por outro lado, o balanço entre aversão e aproximação ao risco na busca pela recompensa corresponde ao processo conhecido como “*wanting*”, referindo-se ao esforço necessário para obter determinado estímulo previamente apreendido como prazeroso (30). A circuitaria neurobiológica difere para cada um destes processos. O *liking* está diretamente relacionado com a atividade do sistema de recompensas cerebral, incluindo regiões dos gânglios basais

como o corpo estriado e área tegmental ventral. O *wanting*, por outro lado, está relacionado com a funcionalidade de regiões corticais frontais, particularmente do córtex pré-frontal medial (mPFC), bem como de núcleos cerebrais envolvidos com o processamento de estímulos aversivos, como a amígdala.

O mPFC é composto predominantemente de neurônios piramidais glutamatérgicos (\pm 80%) (31). Todavia, a neurotransmissão dopaminérgica que ocorre no mPFC tem um papel fundamental sobre o controle comportamental, particularmente sobre o processamento do julgamento e tomada de decisões. Evidências apontam que os receptores dopaminérgicos D1 e D2 podem influenciar o processamento de tomada de decisão atuando em redes de neurônios pré-frontais que se comunicam com neurônios localizados no estriado ventral e amígdala (32). Isto se deve pelo papel dopaminérgico estriatal na regulação da motivação e iniciação comportamental na busca de recompensas, e pelo seu papel no processamento da aversão ao risco quando presente em neurônios da amígdala.

Um estudo documentou que o bloqueio farmacológico da sinalização D1 no mPFC prejudica o processamento do valor atribuído a estímulos de recompensa em roedores, ao passo que o bloqueio da sinalização D2 diminui a frequência de escolhas de risco em paradigmas de tomada de decisão (32). Além disso, alguns estudos com humanos identificaram associações entre polimorfismos nos genes *Drd1* e *Drd2* a distintos padrões de tomada de decisão e avaliação do risco por meio de avaliação neuropsicológica (33, 34).

Além da neurotransmissão dopaminérgica, o fator liberador de corticotrofina (CRF) também vem sendo investigado como um dos neuromoduladores envolvido nas bases neurobiológicas da tomada de decisão e avaliação do risco, uma vez que o estresse pode influenciar padrões de comportamentos de aproximação/evitação ao risco e busca por recompensa. Tradicionalmente, o CRF é conhecido por suas funções de regulação na resposta ao estresse, via controle da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (35). Contudo, os axônios de neurônios corticotrofinérgicos projetam-se para regiões extra-hipotalâmicas, incluindo áreas corticais, influenciando o processamento de funções neurovegetativas e cognitivas. O CRF possui dois receptores principais no sistema nervoso, o receptor do hormônio liberador de corticotrofina 1 (CRFR1) e 2. O CRFR1 é abundantemente expresso no córtex cerebral, sobretudo no mPFC (36).

Em relação ao processamento da informação de busca por recompensa (*liking*), o bloqueio sistêmico da sinalização de CRFR1 via drogas antagonistas pode atenuar os efeitos do estresse sobre comportamentos de auto-administração de cocaína (37). Além disso, estudos

com humanos documentaram associações entre polimorfismos no gene CRFR1 e um maior risco para o desenvolvimento de transtornos aditivos (38), bem como a prejuízos na performance de tarefas neuropsicológicas de tomada de decisão sobre risco (39). Ao nível molecular, um estudo recente verificou que o bloqueio da expressão gênica de *Crfr1* via RNAs de interferência administrado diretamente no mPFC, pode reverter os prejuízos cognitivos e de funções executivas decorrentes da exposição crônica ao estresse (40). Além disso, outro estudo demonstrou que os níveis de RNA mensageiro de *Crfr1* no mPFC correlacionam-se com a frequência de escolhas “vantajosas” em uma tarefa experimental de tomada de decisão em roedores (41), sugerindo um importante papel do CRFR1 cortical nas bases neurobiológicas da tomada de decisão e avaliação do risco.

Uma vez que a ligação do CRF ao seu receptor CRFR1 aumenta as taxas de potenciais de ação em neurônios dopaminérgicos, evidências recentes reforçam a ideia da existência de uma importante relação de neuromodulação entre ambos os sistemas dopaminérgicos e corticotrofinérgicos em relação ao processamento do julgamento, tomada de decisão e avaliação do risco (42, 43). Entretanto, até o momento, pouco se sabe se a exposição a adversidades durante o desenvolvimento, como a pobreza na infância, poderia acarretar em alterações nos sistemas dopaminérgicos e corticotrofinérgicos no mPFC. Nesse sentido, o estudo 1 desta tese buscou investigar a relação entre a expressão gênica de *Drd1*, *Drd2*, *Crf* e *Crfr1* no mPFC e o processamento de avaliação do risco em condições de busca por recompensa, bem como se a exposição a moradia empobrecida na infância poderia interferir nesta relação.

1.2.3. Alterações de histonas e regulação da expressão gênica

A estrutura da cromatina é um dos principais componentes envolvidos no controle e regulação da expressão gênica em células eucarióticas (44). A cromatina é constituída do DNA e de proteínas que se associam a este, denominadas de histonas. Uma vez que o DNA possui uma grande quantidade de informações codificadas e as células precisam adquiri-las sempre que necessário, a cromatina sofre alterações em sua estrutura com o objetivo de expor determinadas regiões do DNA e, conseqüentemente, permitir o acesso de fatores de transcrição específicos envolvidos na expressão gênica. Nesse sentido, o estudo das alterações de histonas que se relacionam a uma maior (eucromatina), ou menor (heterocromatina) acessibilidade a regiões do DNA que regulam a expressão de genes, como por exemplo,

regiões promotoras que antecedem o primeiro exon, tem sido objeto de investigação de diversos campos da biologia molecular e epigenética (45).

Estudos de sequenciamento total do genoma permitiram a identificação de marcadores de histonas associados ao aumento ou repressão da transcrição de diversos genes (46, 47). Em particular, a metilação da histona H3R2 é uma marca associada a uma maior acessibilidade ao DNA e ao aumento da expressão gênica, ocorrendo principalmente nas regiões promotoras próximas ao local de início da transcrição do primeiro exon de inúmeros genes. Por outro lado, a metilação da histona H3K9, é uma marca associada à condensação e compactação da cromatina, conseqüentemente diminuindo a expressão gênica. Tais marcas epigenéticas relativas a histona H3 vêm sendo relacionadas ao controle da transcrição de genes envolvidos em diversos processos neurobiológicos, como a neurogênese, sinaptogênese, funcionamento cognitivo e regulação emocional (45, 48). Além disso, intervenções farmacológicas que envolvem a inibição da atividade de enzimas envolvidas na acetilação/metilação de histonas, têm sido estudadas e consideradas promissoras alvos terapêuticos no tratamento de diversos transtornos neurocognitivos (49, 50).

Contudo, pouquíssimo avanço ocorreu em termos da identificação das bases neurobiológicas de como a pobreza afeta a cognição e a funcionalidade de circuitos cerebrais específicos, sobretudo em relação aos mecanismos epigenéticos. Todavia, o campo da neuroepigenética encontra-se em rápida expansão na última década, uma vez que os mecanismos de regulação da funcionalidade genômica são cruciais para a relação entre o substrato neural e processos cognitivos, assim como para a relação entre ambiente, genoma e funcionamento cerebral (51). Tendo em vista que o estudo 1 desta tese teve como objetivo investigar a expressão de genes dopaminérgicos e corticotrofinérgicos no mPFC e sua relação com o processamento de avaliação do risco, um segundo objetivo deste trabalho foi investigar quais alterações de histonas estariam associadas a regulação da expressão de tais genes, assim como qual seria o efeito produzido pela exposição a moradia empobrecida na infância sobre estes desfechos.

1.2.4. Efeitos da privação do cuidado materno sobre o desenvolvimento

Como exposto anteriormente, o desenvolvimento cognitivo pode sofrer alterações deletérias decorrentes da exposição a adversidades nas primeiras etapas da infância, que não se restringem somente a situações de privação de recursos e pobreza. Por exemplo, um estudo de coorte prospectivo identificou prejuízos cognitivos em crianças com história de negligência

familiar e privação de cuidado materno aos 7, 11 e 16 anos de idade (52). Além disso, evidências apontam para prejuízos de memória de trabalho associados à negligência na infância em adolescentes e adultos jovens diagnosticados com Esquizofrenia (53), ou com Dependência de Cocaína (54). Uma vez que o cuidado materno envolve o atendimento de questões afetivas, emocionais, cognitivas, nutricionais e de sobrevivência dos recém-nascidos, o vínculo entre mãe e filho é fundamental para o desenvolvimento do sistema nervoso e funcionamento cognitivo ao longo da infância e adolescência.

Do ponto de vista neuroendócrino, há uma vasta literatura documentando os efeitos da privação prolongada do cuidado materno na infância sobre o desenvolvimento e funcionamento do eixo HPA, caracterizadas como uma hiper- ou hipo- liberação de hormônios corticoides frente a situações adversas (55-57). Evidências também apontam para consequências neurobiológicas, incluindo alterações em vias de sinalização neurotrófica, sobre a plasticidade neuronal, e em vias de neurotransmissão hipotalâmicas, hipocampais e corticais (56). Tais alterações são associadas a uma reduzida capacidade de memória e aprendizagem, e um aumento de comportamentos de ansiedade e depressão, observadas tanto na adolescência como na adultez (58).

Embora tais achados tenham contribuído significativamente para o entendimento dos processos neurobiológicos mais suscetíveis aos efeitos do estresse no início da vida, algumas lacunas na literatura ainda permanecem. Uma delas se refere ao estudo da relação entre a privação do cuidado materno, cognição e sinalização neuroimune.

1.2.5. Sinalização neuroimune e cognição

A sobrevivência de um indivíduo é mediada por suas capacidades de reconhecimento, interpretação e resposta a estímulos advindos do ambiente. Tais capacidades têm suas bases biológicas no sistema nervoso e sistema imune, que além das habilidades de reconhecimento e resposta, também são sistemas que se adaptam por meio da formação de memórias específicas para cada interação/resposta realizada (59). Deste modo, diversos estudos vêm documentando a importância da interação entre células nervosas e imunes para o funcionamento ideal de ambos os sistemas citados (60, 61).

Nesse sentido, o sistema imune possui também um papel neurofisiológico pertinente ao funcionamento cognitivo. Por exemplo, a depleção experimental da imunidade adaptativa em roedores foi associada a prejuízos cognitivos referentes à consolidação de memórias visuoespaciais (62). Entretanto, tais prejuízos são revertidos frente à restauração da atividade

imunológica por meio da transferência de células T autólogas. Essa relação é mediada por vias de comunicação do sistema imune periférico para o sistema nervoso central, bem como por sinais produzidos pela sinalização neuroimune dentro do cérebro. A sinalização neuroimune é composta por complexas interações entre células imunológicas periféricas, especialmente células T e macrófagos, células cerebrais com funções imunes, particularmente células de micróglia e astrócitos, para com neurônios e células precursoras neuronais (59).

Tais interações são mediadas, em parte, pela função de diversas citocinas, como a interleucina (IL)-1b, IL-6, e o fator de necrose tumoral (TNF)- α , uma vez que neurônios e células gliais respondem a secreção destes mensageiros imunológicos (63). Por exemplo, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a IL-6 possui funções regulatórias sobre processos neuronais incluindo a funcionalidade e plasticidade sináptica (64). Além disso, o fator nuclear kappa B (NF-kB), responsável pela regulação da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, também possui funções regulatórias sobre a neurogênese e sinaptogênese (65). Não obstante, a sinalização neuroimune inclui processos adicionais, como a capacidade de resposta de células gliais a neurotransmissores clássicos, como glutamato e monoaminas, e a hormônios, como os glicocorticoides (59).

Considerando que a exposição ao estresse agudo ou crônico pode afetar o funcionamento cognitivo (66), hipóteses foram formuladas de que a sinalização neuroimune poderia estar mediando ou contribuindo para tais desfechos cognitivos (67). Em relação ao estresse no início da vida, evidências de estudos com humanos impulsionaram tal ideia, uma vez que alterações no funcionamento do sistema imune vêm sendo repetidamente documentadas em diferentes etapas do desenvolvimento decorrentes da exposição a adversidades na infância (68-70). Por exemplo, uma associação entre a negligência parental e um aumento dos níveis circulantes plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , foi demonstrada, sugerindo que um “estado” inflamatório crônico pode aumentar as chances dos indivíduos expostos ao estresse precoce de desenvolverem transtornos neurocognitivos (71). Além disso, adultos com histórico de negligência infantil apresentam elevados níveis circulantes de células NK, CD4 e CD8, tanto em condições patológicas quanto na ausência de qualquer doença (72).

A nível central, evidências derivadas de estudos com roedores demonstraram que a privação do cuidado materno neonatal aumenta a ativação de células gliais hipocampais, bem como elevando os níveis de expressão gênica de IL-1b e reduzindo a capacidade de consolidação de memórias de longo-prazo (73). Com o intuito de investigar os mecanismos

adjacentes ao efeito do estresse precoce sobre as alterações neuroimunes em células gliais, pesquisadores buscaram investigar o papel dos receptores do tipo Toll (TLR) (74). Os TLR são uma família de proteínas, em geral transmembrânicas, que fazem parte do sistema imunológico inato, sendo responsáveis pelo reconhecimento de patógenos e pela estimulação da resposta inflamatória. Deste modo, a ativação dos TLR pode gerar a ativação da via do NF- κ B, que conseqüentemente induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias (75).

Um considerável número de estudos documentou que a exposição ao estresse na idade adulta elicia a ativação de TLR, sobretudo do TLR-4, que é responsável pela detecção de bactérias gram-negativas (74, 76-78). Tais evidências dão suporte à ideia de que o estresse induz respostas neuroinflamatórias e que os TLR possuem um importante papel nesta relação. Além disso, um estudo recente demonstrou um aumento da expressão do TLR-4 no hipotálamo em camundongos adultos expostos a privação de cuidado materno na infância, particularmente nas células gliais residentes nesta região cerebral (79).

Todavia, a investigação neuroimunológica do impacto do estresse precoce tem se restringido sobretudo ao estudo do TLR-4, cujas principais funções referem-se à susceptibilidade a infecções bacterianas, buscando compreender como essa relação poderia interferir com o comportamento e/ou cognição. Ao contrário do TLR-4, o TLR-3 é principalmente expresso intracelularmente em células gliais e neuronais, onde atua como um sensor para RNAs de cadeia dupla, sendo estes produtos de vírus auto-replicantes (80). Deste modo, o TLR-3 possui um papel central na regulação das respostas imunes de defesa a infecções virais, e alterações na sinalização de TLR3 são associadas à vulnerabilidade para o desenvolvimento de transtornos neurocognitivos como a Esquizofrenia (81).

Em células microgлияis e astrócitos, a ativação do TLR-3 aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, um efeito que indiretamente diminui a expressão de receptores glutamatérgicos neuronais, prejudicando a consolidação de memórias de longo-prazo no hipocampo (82, 83). Além disso, os níveis de expressão de TLR-3 no mPFC correlacionam-se negativamente com a performance cognitiva de camundongos adolescentes (84). Tais evidências sugerem que o TLR-3 possui um papel importante sobre o processamento cognitivo, embora ainda pouco se saiba sobre os efeitos do estresse precoce em relação à sinalização neuroimune mediada pelo TLR-3. Assim, o estudo 2 desta tese investigou tal relação utilizando um modelo de separação materna do P2 ao P15 em camundongos recém-nascidos.

1.2.6. Justificativa e síntese dos estudos

Como exposto, há uma série de estudos com humanos e outras espécies que já documentaram o impacto deletério da exposição a adversidades na infância sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central e desempenho cognitivo. A pobreza e privação do cuidado materno são fatores associados a prejuízos cognitivos e alterações morfológicas cerebrais e em mecanismos de neuroplasticidade. Todavia, apesar das evidências disponíveis, algumas lacunas na literatura permanecem, particularmente sobre os efeitos da moradia empobrecida na infância sobre o processamento da avaliação do risco e suas bases neurobiológicas, bem como sobre os efeitos da privação do cuidado materno infantil e os efeitos sobre a sinalização neuroimune via TLR-3 e desfechos cognitivos associados (Figura 1).

Além disso, a investigação dos mecanismos epigenéticos no sistema nervoso central e sua relação com desfechos cognitivos e comportamentais é relativamente recente, e pouco se sabe sobre o papel de tais mecanismos em relação ao processamento da avaliação do risco e memória de trabalho. Assim, os estudos que compõem esta tese buscaram revelar os efeitos da exposição a adversidades na infância sobre desfechos comportamentais, moleculares e neuroepigenéticos, visando revelar novas informações em relação às alterações e consequências do estresse no início da vida sobre o desenvolvimento cerebral e cognitivo.

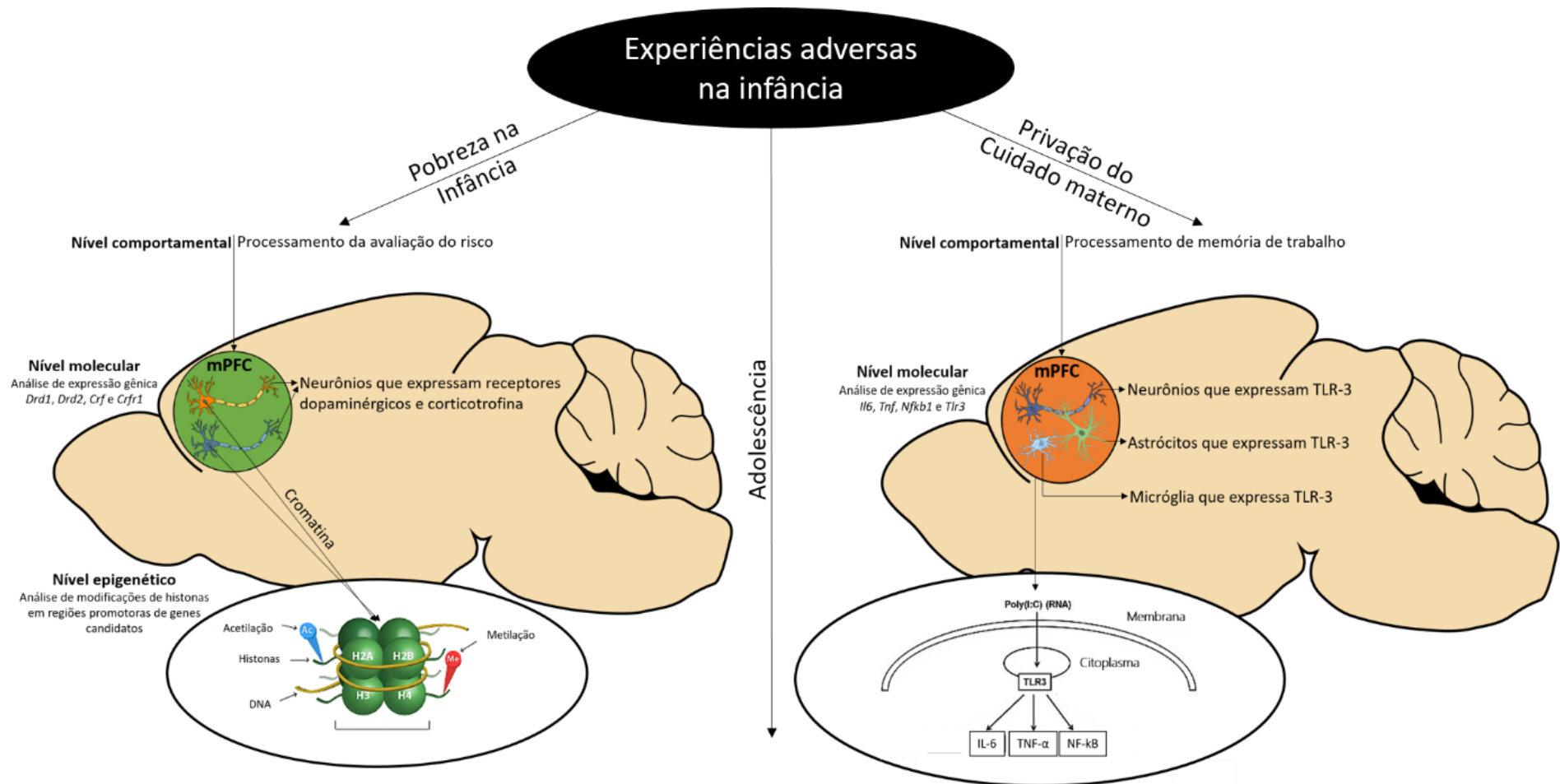


Figura 1. Visão geral dos estudos. Estudo 1 ilustrado na figura a esquerda. Estudo 2 ilustrado na figura a direita.

2. OBJETIVOS

ESTUDO 1

2.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito da exposição a moradia empobrecida na infância sobre o processamento de avaliação do risco e mecanismos moleculares e epigenéticos corticais associados em camundongos adolescentes da linhagem C57BL/6.

2.2. Objetivos Específicos

1) Investigar o efeito da moradia empobrecida na infância sobre o processamento de avaliação do risco em condições normais e em condições de busca por recompensa em camundongos adolescentes da linhagem C57BL/6;

2) Investigar o efeito da moradia empobrecida na infância sobre comportamentos de ansiedade em camundongos adolescentes da linhagem C57BL/6;

3) Investigar o efeito da moradia empobrecida na infância sobre a expressão gênica de *Drd1*, *Drd2*, *Crf* e *Crf1* no mPFC de camundongos C57BL/6 adolescentes;

3) Investigar o efeito da moradia empobrecida na infância sobre os níveis plasmáticos de corticosterona (CORT) em camundongos C57BL/6 adolescentes;

5) Correlacionar os níveis de expressão gênica com os desfechos comportamentais avaliados;

6) Investigar o efeito da moradia empobrecida na infância sobre os níveis de metilação das histonas H3K9 e H3R2, na região promotora dos genes candidatos supracitados, no mPFC de camundongos C57BL/6 adolescentes;

7) Investigar o efeito do sexo sobre os objetivos específicos supracitados.

ESTUDO 2

2.3. Objetivo Geral

Investigar o efeito da privação do cuidado materno na infância e da ativação sistêmica de TLR-3 sobre a memória de trabalho e mecanismos moleculares corticais associados em camundongos machos adolescentes da linhagem BALB/c.

2.4. Objetivos Específicos

1) Investigar o efeito da privação do cuidado materno na infância e da ativação sistêmica de TLR-3 sobre a memória de trabalho e atividade locomotora em camundongos machos adolescentes da linhagem BALB/c;

2) Investigar o efeito da privação do cuidado materno na infância e da ativação sistêmica de TLR-3 sobre a expressão gênica de *Il6*, *Tnf*, *Nfkb1* e *Tlr3* no mPFC de camundongos machos adolescentes da linhagem BALB/c;

3) Correlacionar os níveis de expressão gênica com os desfechos comportamentais avaliados.

3. MÉTODOS

3.1. Considerações éticas

Os estudos que compõem esta tese foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), cujo número de registro é 15/00473. Além disso, os procedimentos foram realizados seguindo a Lei Arouca (n° 11.794/08) e o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals do National Institutes of Health (NIH, Estados Unidos). Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração peletizada comercial para pequenos roedores (Nuvilab CR-1, Colombo, PR, Brasil). Com exceção dos períodos de restrição hídrica, os animais tiveram livre acesso a água em suas caixas-residência. Após o desmame, os animais foram alocados em grupos de 2 a 4 por caixa de acordo com o sexo. As caixas-residência foram limpas uma vez por semana, sendo forradas com volume padronizado de maravalha. No término dos experimentos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

3.2. Amostra e delineamento experimental

No estudo 1, a linhagem de camundongos utilizada foi a C57BL/6, pois são amplamente utilizados em estudos genéticos e trata-se de um excelente modelo para pesquisas relacionadas a comportamentos que envolvem busca por recompensa (85). Para a realização do estudo 1 foram necessárias 3 coortes de animais (Figura 2). A primeira coorte contou com 30 mães prenhas que foram aleatoriamente destinadas a uma das duas condições experimentais após o nascimento da ninhada: moradia empobrecida na infância ou desenvolvimento padrão. Os filhotes foram utilizados para a investigação comportamental, neuroendócrina e molecular associada a avaliação do risco. Considerando o potencial efeito do sexo sobre os desfechos citados, o estudo 1 contou inicialmente com 4 grupos experimentais:

- Camundongos machos adolescentes expostos a moradia empobrecida na infância ($n=25$);
- Camundongos machos adolescentes com desenvolvimento padrão ($n=25$);
- Camundongos fêmeas adolescentes expostas a moradia empobrecida na infância ($n=25$);
- Camundongos fêmeas adolescentes com desenvolvimento padrão ($n=25$).

A segunda coorte de animais contou com 10 mães prenhas que foram destinadas a condição experimental desenvolvimento padrão após o nascimento dos filhotes. Estes animais

foram utilizados para um estudo comportamental adicional comparativo entre o efeito da urina de coioite ($n=14$) e do odor de citronela ($n=14$) sobre o processamento de avaliação do risco. A terceira coorte contou com 12 mães prenhas que foram aleatoriamente destinadas a uma das duas condições experimentais citadas. Estes animais foram utilizados para os estudos moleculares ao longo do desenvolvimento ($n=6$ para cada uma das condições experimentais).

No estudo 2, a linhagem de camundongos utilizada foi a BALB/c, pois são amplamente utilizados em estudos imunológicos. Para a realização deste estudo 18 mães prenhas foram aleatoriamente destinadas a uma das duas condições experimentais após o nascimento da ninhada: privação do cuidado materno ou desenvolvimento padrão (Figura 2). Estes animais foram utilizados para a investigação comportamental e molecular associada a performance de memória de trabalho. Além disso, com o intuito de investigar os efeitos da ativação imunológica via TLR-3 sobre o processamento cognitivo, os animais do estudo 2 foram aleatoriamente destinados a uma das duas condições experimentais no final da adolescência: administração sistêmica do agonista de TLR-3 Poly (I:C), ou administração de solução salina. Deste modo, o estudo 2 contou com 4 grupos experimentais:

- Camundongos machos adolescentes expostos a administração de Poly (I:C) e a privação do cuidado materno na infância ($n=12$);
- Camundongos machos adolescentes expostos a administração de solução salina e a privação do cuidado materno na infância ($n=11$);
- Camundongos machos adolescentes expostos a administração de Poly (I:C) e ao desenvolvimento padrão na infância ($n=11$);
- Camundongos machos adolescentes expostos a administração de solução salina e ao desenvolvimento padrão na infância ($n=10$).

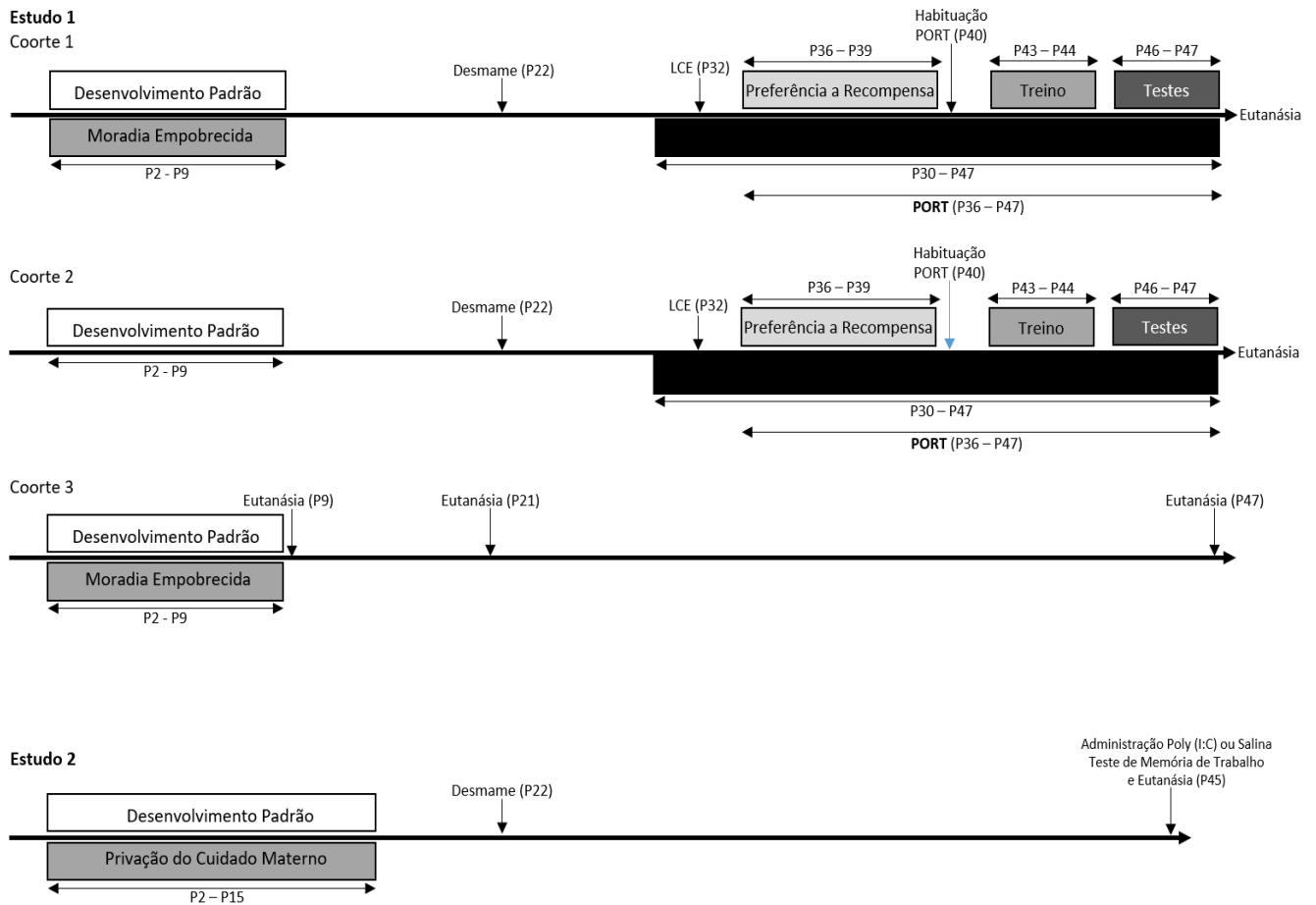


Figura 2. Linha do tempo dos experimentos. Estudo 1 coorte 1: após o nascimento das ninhadas, as mães foram randomizadas para uma das duas condições experimentais (Desenvolvimento Padrão ou Moradia Empobrecida), ao longo de 8 dias (P2-P9). Os animais foram desmamados no P22. Os animais realizaram o teste do LCE no P32, ao passo que iniciaram o protocolo de restrição hídrica (15 horas diárias) no P30. Os testes de preferência pela solução de leite condensado em relação a água foram realizados ao longo de 4 sessões (P36-P39). A habituação ao aparato do PORT com 3 compartimentos foi realizada no P40. As sessões de treino para coleta da recompensa foram realizadas do P43 ao P44. Os testes com maravalha neutra e com maravalha misturada com urina de coioete foram realizados no P46 e P47 respectivamente. Os animais foram eutanasiados no P47. Estudo coorte 2: procedimentos similares aos descritos para a coorte 1, porém esta coorte contou somente com animais expostos ao desenvolvimento padrão. Estudo 1 coorte 3: procedimentos similares a coorte 1 em relação ao tratamento pós-natal. Os animais não foram expostos a nenhuma manipulação comportamental e foram eutanasiados no P9, P21 e P47. Estudo 2: após o nascimento das ninhadas, as mães foram randomizadas para uma das duas condições experimentais (Desenvolvimento Padrão ou Privação do Cuidado Materno), ao longo de 14 dias (P2-P15). Os animais foram desmamados no P22. Administração de Poly (I:C), um agonista de TLR-3, ou salina no P45, bem como ocorreu a realização do teste comportamental de memória de trabalho e eutanásia. P, dia pós-natal. LCE, labirinto em cruz elevado. PORT, *predator-odor risk-taking*.

3.3. Modelo de moradia empobrecida na infância

O modelo de moradia empobrecida na infância utilizado no estudo 1 foi o *limited bedding* (15). Neste modelo, os animais eram transferidos após o nascimento (P2 ao P9) para uma caixa com recursos limitados para a construção do ninho. Esta caixa-residência continha uma malha de alumínio separando os filhotes e a mãe do fundo da caixa (aproximadamente 2.5 cm acima do chão da caixa). Sobre a malha de alumínio, somente havia 1g de algodão como material utilizado pela mãe para a construção do ninho (Figura 3). Embaixo da malha de alumínio havia uma pequena quantidade de maravalha convencional para cobrir o fundo da caixa e conter os dejetos dos animais. Durante os 8 dias de realização do modelo de moradia empobrecida, a caixa residência não foi limpa, promovendo mínima manipulação dos animais. A partir do P9, a mãe e os filhotes foram alocados em uma nova caixa-residência preparada de acordo com as condições desenvolvimento padrão. As caixas-residência dos animais em condição desenvolvimento padrão, continham quantidade padronizada de maravalha e 4g de algodão, bem como não continham a malha de alumínio impedindo o contato dos animais com a maravalha. A maravalha e o algodão foram trocados no P16 e P21, para ambas as condições experimentais.

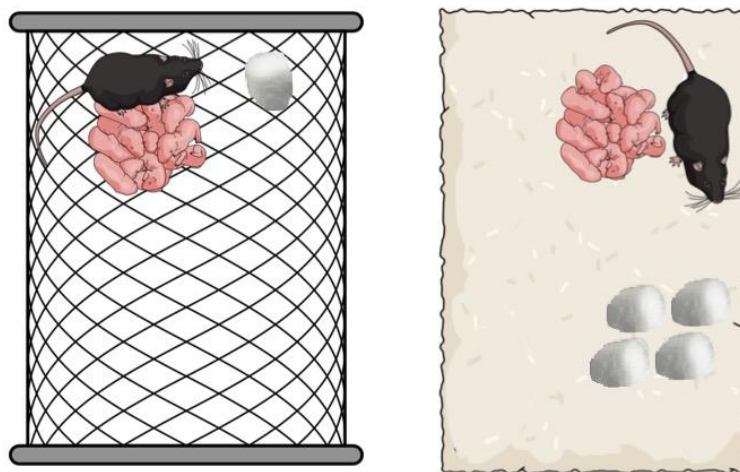


Figura 3. Modelo de moradia empobrecida na infância (esquerda) e desenvolvimento padrão (direita).

3.4. Modelo de privação do cuidado materno na infância

Os animais do estudo 2, expostos a privação do cuidado materno, foram submetidos a um modelo de separação materna baseado em um protocolo previamente utilizado em estudos com camundongos (86, 87). Neste modelo, a partir do P2 até o P15, a ninhada inteira era separada da mãe durante um período de 3 horas diárias. Primeiramente, a mãe era retirada e

alocada em uma nova caixa-residência. Após, os filhotes eram alojados em caixas-residência com maravalha, que eram mantidas sobre uma manta térmica elétrica aquecida a temperatura média de 34°C, e interna de 28°C. Considerando que vocalizações ultra-som entre mãe e ninhada podem atenuar os efeitos da separação materna, o ambiente destinado à realização da separação materna foi em uma sala diferente da qual se encontrava a mãe. Após o período de 3 horas de privação de contato com a mãe, os filhotes eram realocados na caixa-residência inicial com ninho e, em seguida, a mãe era alocada na caixa com sua ninhada.

As ninhadas do grupo desenvolvimento padrão não sofriam nenhuma manipulação experimental, apenas aquelas necessárias para a troca e limpeza de caixa, realizadas 1 vez por semana. As caixas-residência de ambos os grupos continham maravalha e material de ninho em quantidade padronizada de acordo com o vivário.

3.5. Análise do comportamento materno

No estudo 1, o comportamento materno foi avaliado ao longo de 8 dias (P2-P9), em três momentos diários distintos (manhã, tarde e noite). Em cada avaliação (observação durante 18 minutos), os seguintes comportamentos maternos eram registrados a cada intervalo de 3 minutos, totalizando 7 registros por observação:

- Amamentação;
- Lambendo os filhotes;
- Construção do ninho;
- Contato com os filhotes;
- Lambendo-se
- Comendo/Bebendo
- Sem interação com os filhotes.

Posteriormente, os registros foram agrupados em comportamentos de cuidado (amamentação, lambendo os filhotes, construção do ninho, ou em contato com os filhotes) e não cuidado materno (lambendo-se, comendo/bebendo, ou sem interação), e a porcentagem de cuidado materno foi estimada (número de registros de comportamentos de cuidado materno / total de registros) (88). Além disso, durante as observações, o número de vezes que a mãe se ausentou do ninho foi registrado.

3.6. Análise do peso corporal

No estudo 1, o peso corporal dos animais foi registrado no P9, P30 e P40.

3.7. Teste comportamental de avaliação do risco

O PORT é um protocolo comportamental que permite a investigação do processamento de avaliação do risco em condições de busca de recompensa e foi utilizado no estudo 1. No PORT, o estímulo reforçador utilizado é uma solução com 10% de leite condensado e 90% de água (29). Uma vez que o protocolo inclui o consumo de líquidos, foi necessária a realização de restrição hídrica ao longo de 15 horas diárias a partir do P30 até o último dia de testes (P47). Deste modo, as garrafas de água eram retiradas das caixas-residência as 18 horas da noite, e somente recolocadas após o término da tarefa comportamental, que tinha início as 8 horas da manhã do dia seguinte.

No P33, uma pequena tampa de tubo tipo Falcon contendo 2mls da solução de leite condensado foi alocada sobre a maravalha das caixas-residência dos animais, que tiveram acesso a solução ao longo de 2 dias. Este procedimento buscou diminuir as chances dos camundongos de desenvolverem fobia a novidade, no caso a solução de leite condensado, uma vez que o primeiro contato com o estímulo ocorreu na caixa-residência dos animais.

A partir do P36 até o P39, os animais realizaram as sessões de aquisição e teste para preferência de consumo da solução de leite condensado. Estas sessões foram realizadas em caixas de campo aberto (dimensão: 30cm de comprimento, 30cm de largura, 30cm de altura) que continham 2 tampas de tubo tipo Falcon, uma contendo a solução doce e a outra contendo somente água. Os animais permaneciam nas caixas de campo aberto ao longo de 15 minutos. O lado de alocação de cada tampa foi randomizado entre as 4 sessões. Antes e após cada sessão, os recipientes foram pesados para determinar o consumo de cada líquido e o volume total consumido. A preferência pela recompensa foi calculada pela divisão do volume de leite condensado consumido pelo volume total de ambas as soluções consumidas em cada dia. Os animais que não apresentaram o mínimo de 60% de preferência pelo consumo da solução de leite condensado em relação ao consumo de água, foram excluídos do estudo. Nesse sentido, $\pm 30\%$ dos animais não apresentaram preferência mínima, e não houveram diferenças entre os grupos de machos e fêmeas expostos e não expostos a moradia empobrecida na infância em relação a este parâmetro ($\chi^2 = 0.95; p = 0.81$).

Em seguida, no P40, os animais foram habituados ao aparato PORT, sendo colocados no centro do compartimento, com as portas abertas, permitindo o animal explorar os três

compartimentos durante um período de 20 minutos. O aparato do PORT é uma caixa de acrílico dividida em três compartimentos iguais, cada qual com 30cm de largura, 30cm de comprimento e 30cm de altura. Aberturas de 5cm de largura por 5cm de altura permitiam a passagem dos animais entre os compartimentos. Durante a habituação e nas demais sessões (treino e teste), o compartimento central era forrado com maravalha (Figura 4).

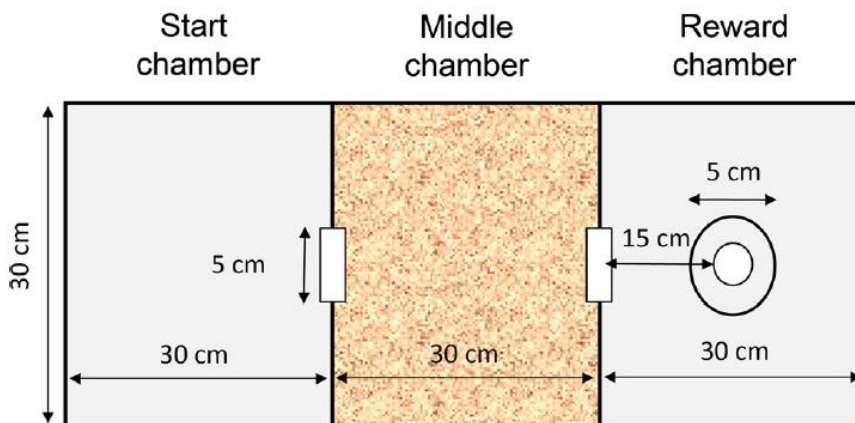


Figura 4. Aparato do paradigma PORT. Neste exemplo a solução de leite condensado esta situada no compartimento direito, embora haverá randomização em relação a localização da recompensa. *Start chamber*, compartimento inicial. *Middle chamber*, compartimento central contendo maravalha. *Reward chamber*, compartimento que contém a recompensa.

No P42 e P43, foram realizadas as sessões de treino para coleta da recompensa. Cada animal realizou oito *trials*, sendo 4 *trials* por dia. Em cada *trial* o animal foi alocado em um dos compartimentos laterais (“início”), com as portas abertas, permitindo-o explorar os três compartimentos e consumir a solução de leite condensado (40ul) situada na câmara oposta. A direção do percurso que os animais realizaram para obter a recompensa foi randomizada entre os animais, porém, tal direção permaneceu a mesma para cada animal ao longo dos *trials*. Após o animal obter a recompensa, ele era alocado em sua caixa-residência novamente, a espera do próximo *trial* (aproximadamente 5 minutos de espera). A latência para coletar a recompensa a partir do início de cada *trial*, e o tempo de exploração do compartimento central antes do animal adentrar o compartimento da recompensa, foram registrados.

Os testes do PORT (P46 e P47) foram realizados de forma semelhante ao treino. Os animais foram alocados no compartimento inicial, com as portas abertas, e o término do *trial* ocorreu quando o animal consumiu a solução de leite condensado no compartimento oposto. No P46, o *trial* de teste ocorreu de forma idêntica aos *trials* de treino, uma vez que o

compartimento central era forrado somente com maravalha. Entretanto, para o teste final (P47), a maravalha alocada no compartimento central foi misturada com 2mls de urina de coiole, com o intuito de gerar um ambiente de incerteza e risco para o camundongo, associado a pistas olfativas de um predador. A latência para coletar a recompensa a partir do início de cada *trial*, e o tempo de exploração do compartimento central antes do animal adentrar o compartimento da recompensa, foram novamente registrados. Após as sessões de preferência, treino e teste, os animais tiveram acesso livre a água. Além disso, todas as fêmeas encontraram-se no período de diestro em relação ao ciclo menstrual no dia do teste final.

3.8. Teste comportamental de avaliação da ansiedade

O comportamento do tipo ansioso foi investigado por meio do Labirinto em Cruz-Elevado (LCE) no P32 dos animais que participaram do estudo 1. A justificativa para investigação de ansiedade é devido a possibilidade desta afetar a avaliação do risco e o desempenho nos testes do paradigma PORT. No LCE os animais foram colocados em um labirinto (30cm do chão) com dois braços abertos (dimensão: 25cm de comprimento, 5cm de largura e 0.5cm de altura) e dois braços fechados (dimensão: 25cm de comprimento, 5cm de largura e 15cm de altura). O comportamento ansioso foi investigado pela preferência do animal pelos braços fechados, que são vistos pelo roedor como ambientes mais seguros em relação aos braços abertos. Deste modo, os animais foram alocados no centro do aparato no teste e o tempo de exploração dos braços abertos, braços fechados e no centro do labirinto foi registrado ao longo de 5 minutos. Além disso, foram registrados o número de vezes que o animal realizou os seguintes comportamentos de avaliação do risco: 1) mergulho de cabeça (*head dipping*) quando o animal se encontrava sobre os braços abertos ou no centro do labirinto; 2) quando o animal se erguia e retirava as patas dianteiras do chão (*rearing*) encontrava-se sobre o centro do labirinto.

3.9. Teste comportamental de memória de trabalho

Os animais do estudo 2 foram testados em uma tarefa de memória de trabalho espacial em um labirinto em forma de Y (dimensão: 25cm de comprimento, 7.5cm de largura, e 7.5cm de altura) no P45. Esta tarefa avalia a preferência pela novidade baseando-se na tendência natural que os camundongos apresentam para explorar ambientes novos em relação à ambientes familiares. Desta forma, o teste possui duas fases, o pré-teste e o teste. No pré-teste, somente 2 dos 3 braços do labirinto encontravam-se abertos para o animal explorar ao

longo de 5 minutos. Ao término do pré-teste, o animal era retirado do labirinto e alojado em uma caixa-residência individual por 1 minuto. Após esse curto intervalo, o animal era recolocado no labirinto, que agora apresentava os 3 braços abertos para exploração ao longo de 2 minutos. O tempo de exploração dos 3 braços foi registrado e o índice de desempenho de memória de trabalho foi calculado com a seguinte fórmula: $[(\text{Tempo gasto no braço novo} / \text{Tempo gasto em todos os braços}) * 100]$. Além disso, a distância percorrida no aparato foi utilizada como uma medida de atividade locomotora espontânea. A ordem de braços fechados e abertos foi randomizada entre os animais. Durante a realização do pré-teste e do teste, o chão do labirinto foi forrado com um volume de maravalha padronizado, e esta era trocada após o término de ambas as sessões para cada animal.

3.10. Administração de agonista de TLR-3

Cinco horas antes da realização do teste de memória de trabalho, os animais do estudo 2 foram pesados e em seguida administrados com uma dose única de 7.5mg/kg de Poly (I:C), ou solução salina, por via intraperitoneal. A dose utilizada é considerada baixa/moderada para camundongos de acordo com estudos anteriores (89), mas é capaz de induzir alterações imunológicas e comportamentais associadas a fenótipos de depressão.

3.11. Coleta de tecido cerebral

Os animais do estudo 1 foram eutanasiados 3 horas após a realização do teste final do PORT. Os animais do estudo 2 foram eutanasiados 6 horas após a administração de Poly (I:C) ou solução salina. Após o deslocamento cervical, os encéfalos foram rapidamente retirados e colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri rodeada de gelo. Imediatamente após a remoção, o cérebro foi dissecado e o tecido do mPFC extraído e colocado em tubos de 0.5ml, que foram rapidamente alocados em um isopor com gelo seco. Posteriormente os tecidos foram congelados em -80°C.

3.12. Análise de expressão gênica

Para isolar o RNA do tecido do mPFC ($n=6$ por grupo experimental), um protocolo comercial de TRIzol (Invitrogen) e clorofórmio segundo indicações do fabricante, foi utilizado. A pureza da extração e a concentração de RNA foram quantificadas espectrofotometricamente, calculando-se a razão entre os valores de absorbâncias a 260nm e 280nm. A síntese de cDNA a partir do RNA isolado foi realizada utilizando-se o kit miScript

II RT HiFlex Buffer (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento Rotor Gene (Qiagen). Os dados derivados dos ensaios de PCR em tempo real foram analisados por meio do método delta-delta ct, utilizando os dados derivados do grupo de animais fêmeas com desenvolvimento padrão como referência.

No estudo 1, os primers para análise da expressão dos genes dopaminérgicos foram adquiridos comercialmente (IDT) de acordo com as seguintes sequências:

- *Drd1: Forward* - ATGGCTCCTAACACTTCTACCA;
- *Drd1: Reverse* - GGGTATTCCCTAAGAGAGTGGAC;
- *Drd2: Forward* - ACCTGTCCTGGTACGATGATG;
- *Drd2: Reverse* - GCATGGCATAGTAGTTGTAGTGG.

Os primers para análise da expressão dos genes corticotrofinérgicos foram adquiridos comercialmente pela Qiagen, de acordo com os seguintes códigos:

- *Crf* (QT0029389);
- *Crf1* (QT00106232).

No estudo 2, os primers para análise da expressão dos genes inflamatórios foram adquiridos comercialmente (IDT) de acordo com as seguintes sequências:

- *Il6: Forward* - CCCCAATTTCCAATGCTCTCC;
- *Il6: Reverse* – GACCACAGTGAGGAATGTCCA;
- *Tnf: Forward* - CCTGTAGCCCACGTCGTAG;
- *Tnf: Reverse* – GGGAGTAGACAAGGTACAACCC;
- *Tlr3: Forward* - GTGAGATACAACGTAGCTGACTG;
- *Tlr3: Reverse* - TCCTGCATCCAAGATAGCAAGT.

O primer utilizado para análise da expressão de *Nfkb1* foi adquirido comercialmente pela Qiagen, de acordo com o seguinte código: QT00154091.

Para ambos os estudos, a expressão do gene *Pgk* foi utilizada como *housekeeping* para as análises de expressão gênica. O primer do *Pgk* foi adquirido comercialmente (IDT), de acordo com a seguinte sequência:

- *Pgk: Forward* – TGCACGCTTCAAAAGCGCACG;
- *Pgk: Reverse* – AAGTCCACCCTCATCACGACCC.

3.13. Análise de modificações de histonas

Os ensaios de imunoprecipitação de cromatina foram realizados para avaliar a associação entre modificações de histonas a uma determinada região do DNA, particularmente no estudo 1. Primeiramente 2 tecidos do mPFC foram agrupados de acordo com cada grupo experimental (10 tecidos de mPFC por condição experimental resultaram em 5 amostras por grupo), e macerados em PBS. Em seguida, as amostras foram fixadas em formaldeído 1% (5 minutos). A fixação foi interrompida com a adição de glicina (0.125M) por 10 minutos. Posteriormente, o complexo proteico e de DNA foi sonificado (5 pulsos a 90% de intensidade durante 15 segundos) para gerar fragmentos de cromatina com um comprimento entre 200 pares de bases a 1000 pares de bases. A cromatina foi imunoprecipitada usando anticorpos específicos (2 μ g de anticorpo para cada amostra) associados a *beads* magnéticas para cada histona durante 14 horas a 4°C. Após a precipitação, 2 lavagens em um tampão com um nível baixo de sal e mais 2 lavagens em um tampão com altos níveis de sal foram realizadas. Os complexos proteína-DNA precipitados foram separados do anticorpo com SDS 1% e NaHCO₃ 0.1M, durante uma incubação a 60°C por 5 horas. Em seguida, a digestão com proteinase K a 56°C (4 horas) foi realizada para eliminar as proteínas da cromatina, e o DNA genômico foi extraído com clorofórmio e precipitação com etanol. Os resultados das reações de PCR em tempo real utilizando amostras de DNA imunoprecipitadas, foram relativizados aos resultados de amostras sem tratamento/precipitação (*input sample*). Além disso, os resultados foram analisados por meio do método delta-delta ct, utilizando os dados derivados do grupo de animais fêmeas com desenvolvimento padrão como referência.

Os seguintes primers foram utilizados para investigar as modificações de histonas associadas a região promotora do gene *Crf1*:

- Região acima do ponto de início da transcrição (200 pares de bases): *Forward* – GGTGAACCTCCTGGATGGC;
- Região acima do ponto de início da transcrição (200 pares de bases): *Reverse* – GCAGGCAGCCTTTCTTCTCT;
- Região após o ponto de início da transcrição (200 pares de bases): *Forward* – GGCGCCTGGGAGCAG;
- Região após o ponto de início da transcrição (200 pares de bases): *Reverse* – CTTACGAGCCGGAGCTG.

Os seguintes anticorpos (Abcam) previamente validados para ensaios de imunoprecipitação de cromatina foram utilizados:

- AB194684-Anti-Histone H3 (Symmetric Di Methyl R2);
- AB8898-Anti-Histone H3 (Trimethyl K9).

3.14. Análise dos níveis de CORT

Os níveis sanguíneos de CORT foram avaliados 30 minutos após a realização do teste final do PORT, particularmente no estudo 1 ($n=8$ por condição experimental). Um total de 5ul de plasma foram utilizados para as análises realizadas com o kit de ELISA *Corticosterone Enzyme Immunoassay* (Arbor Assays), de acordo com as instruções do fabricante. A densidade óptica foi analisada no comprimento de onda de 450nm em um leitor de ELISA, e posteriormente transformadas em concentração (pg/mL) por meio da interpolação dos dados relativos a curva padrão.

3.15. Análise estatística dos dados

No estudo 1, as comparações entre 2 condições experimentais foram realizadas por meio do teste t não-pareado. As comparações entre 3 ou 4 condições experimentais (dados do LCE, níveis de CORT, expressão gênica) foram realizadas por meio de análises de variância (ANOVAs) de uma via. Os dados derivados do PORT foram analisados por meio de ANOVAs de medidas repetidas, com o fator teste (ausência de odor X urina de coiote) e o fator grupo (moradia empobrecida X desenvolvimento padrão), para cada sexo individualmente. As ANOVAs foram seguidas de testes post-hoc de Tukey. A análise de correlação de Pearson foi utilizada para avaliar a associação entre dados comportamentais e de expressão gênica.

No estudo 2, as comparações entre grupos foram realizadas por meio de ANOVAs, seguidas de testes post-hoc de Tukey. Em ambos os estudos os dados foram analisados em relação a sua distribuição por meio do teste de Shapiro Wilk, o que revelou normalidade na distribuição de todas as variáveis estudadas. As análises foram realizadas no software SPSS, com valores de 5% para alpha e 20% para beta. As representações gráficas dos dados (média e erro padrão) foram realizadas no software Graphpad Prism.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Desde a década de 1950, sabe-se que o cérebro de espécies mamíferas, como seres humanos e roedores, continuam a se desenvolver após o nascimento, e esse processo é o resultado de complexas interações entre fatores genéticos e ambientais (90). Este sistema cerebral “aberto a experiência” tem efeitos profundos no desenvolvimento cognitivo e emocional, visto que o sistema nervoso pode ser moldado para se adequar aos diversos ambientes nos quais ocorrem o desenvolvimento (91). No entanto, a alta plasticidade cerebral existente no início da vida torna o período inicial pós-natal um dos momentos mais críticos, uma vez que as experiências e vivências que ocorrem neste momento possuem uma maior saliência e impacto sobre o desenvolvimento do sistema nervoso (90, 92). As perturbações ambientais, especialmente aquelas aberrantes e de longa duração, podem interromper trajetórias de desenvolvimento tidas como normais ou típicas, e alterar uma via de desenvolvimento cerebral que resulte, posteriormente, em um perfil cognitivo ou emocional característico de doenças neurocognitivas como os transtornos mentais (93, 94).

Ainda que muitos estudos tenham buscado compreender o efeito dos fatores ambientais sobre o desenvolvimento cerebral (91, 94-98), tal tema segue sendo relevante e atual considerando a complexidade dos diversos fenótipos associados ao impacto de experiências ambientais, bem como tendo em vista a complexidade dos sistemas neurobiológicos que podem ser afetados devido a exposição a experiências ambientais adversas no início do desenvolvimento. A compreensão de alguns dos processos neurobiológicos que sofrem alterações decorrentes de fatores ambientais adversos e o surgimento de fenótipos cognitivos associados a transtornos neuropsiquiátricos, particularmente no período da adolescência, foi o principal objetivo desta tese, e para isso, dois modelos animais de estresse precoce em camundongos foram utilizados.

Com os estudos realizados, conclui-se que a exposição a ambientes adversos no início da vida pode produzir alterações cognitivas e neurobiológicas envolvidas na etiologia de transtornos mentais. Contudo, ainda que tais resultados aqui apresentados tenham gerado inéditas contribuições para o estudo do impacto do estresse precoce sobre o desenvolvimento do sistema nervoso, salienta-se que tais contribuições são somente pequenas peças de uma rede complexa de fatores envolvidos nesta relação. Estudos futuros são extremamente necessários para a translação destes, e outros achados pré-clínicos, em estratégias de prevenção e em intervenções eficazes na

reversão dos efeitos deletérios de experiências adversas precoces antes que estas atinjam significado clínico.

4.1. A exposição a moradia empobrecida na infância produz prejuízos na avaliação de risco e é associada a alterações na expressão de *Crf1* no mPFC de camundongos fêmeas adolescentes

Os dados derivados do estudo 1 demonstraram que a exposição a moradia empobrecida na infância resultou em alterações comportamentais e neurobiológicas em fêmeas adolescentes, enquanto que os animais machos não apresentaram alterações decorrentes de tal exposição. O fenótipo cognitivo e comportamental observado nas fêmeas expostas a pobreza na infância foi de maior impulsividade e menor avaliação do risco em situações de busca de recompensa, ao passo que estes animais também apresentaram maiores níveis de comportamentos de ansiedade. Este perfil comportamental foi associado a alterações neuroendócrinas e a um efeito a nível epigenético de regulação da expressão cortical de *Crf1*, indicando um importante papel deste gene sobre a relação entre pobreza na infância e alterações cognitivas em fêmeas adolescentes.

Estes resultados possuem implicações importantes no entendimento das bases neurobiológicas do impacto de ambientes adversos no desenvolvimento, assim como para o entendimento da etiologia neuromolecular de doenças as quais o estresse pós-natal é fator de risco. O perfil cognitivo evidenciado no estudo 1 aponta para uma vulnerabilidade ao desenvolvimento de transtornos mentais aditivos, nos quais as alterações em processos cognitivos de julgamento e tomada de decisão e altos níveis de impulsividade são características marcantes, como no caso da dependência de álcool e outras drogas (22, 99, 100). Não obstante, estudos observacionais com humanos já documentaram a importante associação entre baixo nível socioeconômico, pobreza na infância, e um maior risco para o desenvolvimento de dependência química (8, 101). Além disso, evidências prévias do nosso laboratório de pesquisa apontam para variantes genéticas no gene *Crf1* como marcas moleculares críticas da associação entre experiências adversas na infância e dependência de cocaína/crack em mulheres (102). Além disso, já identificamos alterações nos processos de julgamento e tomada de decisão sobre o risco em mulheres dependentes de crack (103, 104).

Outro ponto importante refere-se ao efeito epigenético observado no mPFC dos animais fêmeas expostas a moradia precária. A modificação de histona H3R2me2s é uma marca epigenética recentemente revelada (105), o que implica em uma escassez de dados sobre este

mecanismo epigenético em estudos neurocientíficos. O laboratório do professor Timothy Bredy, no qual o presente aluno realizou um período de treinamento de 12 meses ao longo do doutorado, foi o primeiro laboratório a publicar um estudo documentando o papel da modificação H3R2me2s em relação ao processamento cognitivo. Especificamente, o estudo de Li e colaboradores (106) demonstrou que esta marca epigenética é associada a uma persiste e duradoura abertura da cromatina na região promotora do gene *Gphn* no mPFC, particularmente durante e após o processo de consolidação de memórias de extinção do medo. O estudo 1 desta tese apresenta a primeira evidência de que esta marca epigenética também está possivelmente implicada com a base molecular de outros processos cognitivos, como a avaliação do risco, e de que o estresse precoce pode afetar a funcionalidade deste mecanismo epigenético.

A região cerebral do mPFC foi o alvo estrutural do estudo 1, demonstrando que a exposição a moradia empobrecida na infância resultou em uma trajetória desenvolvimental distinta do sistema corticotrofinérgico cortical. Dois pontos importantes devem ser considerados em relação a estes resultados: 1) o mPFC vem sendo constantemente associado a diferenças entre os sexos em relação a etiologia e perfil clínico de usuários de drogas, sugerindo que o sistema corticotrofinérgico pode estar implicado no entendimento e apreensão de dados de neuroimagem previamente publicados (107-109); 2) o mPFC é considerado uma das regiões mais suscetíveis e “plásticas” aos efeitos decorrentes do estresse precoce, visto que uma série de correlatos comportamentais detectados posteriormente, como prejuízos em funções executivas, memória de trabalho, julgamento e tomada de decisão, estão fundamentalmente relacionados com a funcionalidade desta região cerebral (96, 110, 111). Nosso laboratório, inclusive, já demonstrou o efeito do estresse precoce sobre a expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), evidenciando associações entre os níveis de BDNF no mPFC e a consolidação de memórias contextuais envolvidas ao efeito da cocaína (112). Sendo assim, de um modo geral o estudo 1 revelou um novo perfil cognitivo decorrente da exposição a ambientes adversos na infância que ainda não tinha sido documentado e explorado da forma como o foi na presente tese, sobretudo pela aplicação de um paradigma comportamental (PORT) que foi recentemente apresentando a comunidade neurocientífica, e pela investigação de possíveis diferenças entre os sexos, uma variável que é frequentemente negligenciada em estudos pré-clínicos.

Do ponto de vista de perspectivas futuras, o legado do estudo 1 aponta para o potencial promissor de intervenções que tenham como alvo a funcionalidade do CRFR1, especialmente em

populações vulnerabilizadas pelos efeitos do estresse precoce em relação ao desempenho de funções cognitivas dependentes do mPFC. Diversas são as evidências de estudos pré-clínicos que apontam os efeitos terapêuticos do tratamento com antagonistas farmacológicos de CRFR1 (36, 37, 40, 113), seja por administração sistêmica ou intracerebroventricular, em processos cognitivos e comportamentais associados a diversas doenças neuropsiquiátricas. Nesse sentido, alguns estudos clínicos já estão sendo desenvolvidos para testar o potencial translacional das evidências produzidas por estudos pré-clínicos, em relação a eficácia e efetividade do uso de medicamentos que antagonizam o CRFR1 no tratamento de pacientes neuropsiquiátricos (114).

4.2. A neuroinflamação aguda provocada pela ativação sistêmica de TLR-3 exacerba os prejuízos de memória de trabalho induzidos pelo estresse precoce em camundongos adolescentes

Os dados derivados do estudo 2 demonstraram que a ativação sistêmica de TLR-3 exacerbou os prejuízos de memória de trabalho decorrentes da exposição a privação do cuidado materno, e este efeito correlacionou-se aos níveis de expressão de *Nfkb1* no mPFC. Este estudo forneceu evidências adicionais para apoiar a ideia de que o estresse precoce é um importante fator de risco para o desenvolvimento de prejuízos cognitivos e de que uma via possível envolvida com este fenótipo é através de sinalização neuroinflamatória (115). Além disso, o estudo 2 aponta para o potencial promissor de intervenções que enfoquem a regulação da resposta neuroimune, como no caso de tratamentos anti-inflamatórios, para a reversão ou prevenção de fenótipos cognitivos produzidos pelo estresse precoce.

Contudo, diferentemente do estudo 1, que está em preparação para submissão, experimentos adicionais estão sendo planejados com o intuito de testar hipóteses de intervenção referentes aos dados apresentados no estudo 2. O bloqueio da tradução do mRNA do *Nfkb1* no complexo proteico NF-kB momentos antes da ativação sistêmica do TLR-3, especificamente no mPFC, será testada com o intuito de prevenir a exacerbação dos prejuízos de memória de trabalho identificados nos animais expostos ao estresse precoce. Para isso, o nosso laboratório recentemente adquiriu um equipamento estereotáxico para camundongos, o que irá viabilizar o estudo de intervenções e manipulações direcionadas para circuitos e regiões cerebrais específicas, como o mPFC. Além disso, um oligonucleotídeo antisense para o gene *Nfkb1*, cuja função é inibir a tradução de uma proteína alvo, foi recentemente desenvolvido e adquirido por

nosso laboratório. Deste modo, o oligonucleotídeo antisense irá se ligar ao mRNA de *Nfkb1*, recrutando mecanismos moleculares de degradação do RNA, impedindo o processo de tradução (116).

Além disso, outras intervenções farmacológicas estão sendo projetadas para dar continuidade ao estudo 2. Um exemplo refere-se ao uso de bloqueadores do sistema angiotensinérgico, cujos achados de estudos pré-clínicos são extremamente promissores em relação ao potencial anti-inflamatório e anti-oxidante destes agentes, inclusive reduzindo a atividade da sinalização de NF-kB em células gliais (117). Por fim, também foi projetado uma investigação do perfil neuroepigenético associado a regulação da expressão gênica de *Nfkb1*, que irá buscar um aprofundamento dos dados dos níveis de mRNA identificados até aqui.

5. REFERÊNCIAS

1. Wilkinson RG. Socioeconomic determinants of health. Health inequalities: relative or absolute material standards? *BMJ*. 1997;314(7080):591-5.
2. Lessard LN, Alcalá E, Capitman JA. Pollution, Poverty, and Potentially Preventable Childhood Morbidity in Central California. *J Pediatr*. 2016;168:198-204.
3. Wickham S, Anwar E, Barr B, Law C, Taylor-Robinson D. Poverty and child health in the UK: using evidence for action. *Arch Dis Child*. 2016;101(8):759-66.
4. Żukiewicz-Sobczak W, Wróblewska P, Zwoliński J, Chmielewska-Badora J, Adamczuk P, Krasowska E, et al. Obesity and poverty paradox in developed countries. *Ann Agric Environ Med*. 2014;21(3):590-4.
5. Mendenhall E, Kohrt BA, Norris SA, Ndeti D, Prabhakaran D. Non-communicable disease syndemics: poverty, depression, and diabetes among low-income populations. *Lancet*. 2017;389(10072):951-63.
6. Maluccio JA, Palermo T, Kadiyala S, Rawat R. Improving Health-Related Quality of Life among People Living with HIV: Results from an Impact Evaluation of a Food Assistance Program in Uganda. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135879.
7. Spencer NJ, Blackburn CM, Read JM. Disabling chronic conditions in childhood and socioeconomic disadvantage: a systematic review and meta-analyses of observational studies. *BMJ Open*. 2015;5(9):e007062.
8. Kindt KC, van Zundert R, Engels RC. Evaluation of a Dutch school-based depression prevention program for youths in highrisk neighborhoods: study protocol of a two-armed randomized controlled trial. *BMC Public Health*. 2012;12:212.
9. Vance DE, Randazza J, Fogger S, Slater LZ, Humphrey SC, Keltner NL. An overview of the biological and psychosocial context surrounding neurocognition in HIV. *J Am Psychiatr Nurses Assoc*. 2014;20(2):117-24.
10. Mani A, Mullainathan S, Shafir E, Zhao J. Poverty impedes cognitive function. *Science*. 2013;341(6149):976-80.
11. Lipina SJ. Critical considerations about the use of poverty measures in the study of cognitive development. *Int J Psychol*. 2017;52(3):241-50.

12. Hamadani JD, Tofail F, Huda SN, Alam DS, Ridout DA, Attanasio O, et al. Cognitive deficit and poverty in the first 5 years of childhood in Bangladesh. *Pediatrics*. 2014;134(4):e1001-8.
13. Bradley RH, Corwyn RF. Socioeconomic status and child development. *Annu Rev Psychol*. 2002;53:371-99.
14. Blair C, Raver CC. Poverty, Stress, and Brain Development: New Directions for Prevention and Intervention. *Acad Pediatr*. 2016;16(3 Suppl):S30-6.
15. Rice CJ, Sandman CA, Lenjavi MR, Baram TZ. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology*. 2008;149(10):4892-900.
16. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci*. 2016;152:244-8.
17. Christopoulos GI, Tobler PN, Bossaerts P, Dolan RJ, Schultz W. Neural correlates of value, risk, and risk aversion contributing to decision making under risk. *J Neurosci*. 2009;29(40):12574-83.
18. Samanez-Larkin GR, Knutson B. Decision making in the ageing brain: changes in affective and motivational circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(5):278-89.
19. Cheng GL, Tang JC, Li FW, Lau EY, Lee TM. Schizophrenia and risk-taking: impaired reward but preserved punishment processing. *Schizophr Res*. 2012;136(1-3):122-7.
20. Kroyzer N, Gross-Tsur V, Pollak Y. Risk taking in adolescents with attention deficit hyperactivity disorder on a probabilistic choice task. *J Nerv Ment Dis*. 2014;202(3):247-52.
21. Russo M, Proujansky R, Gilbert A, Braga RJ, Burdick KE. Initial evidence for sex-specific effects of early emotional abuse on affective processing in bipolar disorder. *Eur Psychiatry*. 2014;29(1):52-7.
22. Vadhan NP, Hart CL, Haney M, van Gorp WG, Foltin RW. Decision-making in long-term cocaine users: Effects of a cash monetary contingency on Gambling task performance. *Drug Alcohol Depend*. 2009;102(1-3):95-101.
23. Laviola G, Macrì S, Morley-Fletcher S, Adriani W. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;27(1-2):19-31.
24. Wang C, Li M, Sawmiller D, Fan Y, Ma Y, Tan J, et al. Chronic mild stress-induced changes of risk assessment behaviors in mice are prevented by chronic treatment with fluoxetine but not diazepam. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;116:116-28.

25. Simon NW, Gilbert RJ, Mayse JD, Bizon JL, Setlow B. Balancing risk and reward: a rat model of risky decision making. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(10):2208-17.
26. Simon NW, Setlow B. Modeling risky decision making in rodents. *Methods Mol Biol*. 2012;829:165-75.
27. Homberg JR, van den Bos R, den Heijer E, Suer R, Cuppen E. Serotonin transporter dosage modulates long-term decision-making in rat and human. *Neuropharmacology*. 2008;55(1):80-4.
28. Tedford SE, Persons AL, Napier TC. Dopaminergic lesions of the dorsolateral striatum in rats increase delay discounting in an impulsive choice task. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122063.
29. Dent CL, Isles AR, Humby T. Measuring risk-taking in mice: balancing the risk between seeking reward and danger. *Eur J Neurosci*. 2014;39(4):520-30.
30. Berridge KC. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007;191(3):391-431.
31. McKlveen JM, Myers B, Herman JP. The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine, and Behavioral Responses to Stress. *J Neuroendocrinol*. 2015.
32. Jenni NL, Larkin JD, Floresco SB. Prefrontal Dopamine D1 and D2 Receptors Regulate Dissociable Aspects of Decision Making via Distinct Ventral Striatal and Amygdalar Circuits. *J Neurosci*. 2017;37(26):6200-13.
33. Voigt G, Montag C, Markett S, Reuter M. On the genetics of loss aversion: An interaction effect of BDNF Val66Met and DRD2/ANKK1 Taq1a. *Behav Neurosci*. 2015;129(6):801-11.
34. Tombeau Cost K, Unternaehrer E, Plamondon A, Steiner M, Meaney M, Atkinson L, et al. Thinking and doing: the effects of dopamine and oxytocin genes and executive function on mothering behaviours. *Genes Brain Behav*. 2017;16(2):285-95.
35. Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 1993;18(3):195-200.
36. Schreiber AL, Lu YL, Baynes BB, Richardson HN, Gilpin NW. Corticotropin-releasing factor in ventromedial prefrontal cortex mediates avoidance of a traumatic stress-paired context. *Neuropharmacology*. 2017;113(Pt A):323-30.

37. Han X, DeBold JF, Miczek KA. Prevention and reversal of social stress-escalated cocaine self-administration in mice by intra-VTA CRFR1 antagonism. *Psychopharmacology (Berl)*. 2017.
38. Rovaris DL, Mota NR, Bertuzzi GP, Aroche AP, Callegari-Jacques SM, Guimarães LS, et al. Corticosteroid receptor genes and childhood neglect influence susceptibility to crack/cocaine addiction and response to detoxification treatment. *J Psychiatr Res*. 2015;68:83-90.
39. Guillaume S, Perroud N, Jollant F, Jaussent I, Olié E, Malafosse A, et al. HPA axis genes may modulate the effect of childhood adversities on decision-making in suicide attempters. *J Psychiatr Res*. 2013;47(2):259-65.
40. Uribe-Mariño A, Gassen NC, Wiesbeck MF, Balsevich G, Santarelli S, Solfrank B, et al. Prefrontal Cortex Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1 Conveys Acute Stress-Induced Executive Dysfunction. *Biol Psychiatry*. 2016;80(10):743-53.
41. Georgiou P, Zanos P, Bhat S, Tracy JK, Merchenthaler IJ, McCarthy MM, et al. Dopamine and Stress System Modulation of Sex Differences in Decision Making. *Neuropsychopharmacology*. 2017.
42. Boyson CO, Holly EN, Shimamoto A, Albrechet-Souza L, Weiner LA, DeBold JF, et al. Social stress and CRF-dopamine interactions in the VTA: role in long-term escalation of cocaine self-administration. *J Neurosci*. 2014;34(19):6659-67.
43. Wanat MJ, Hopf FW, Stuber GD, Phillips PE, Bonci A. Corticotropin-releasing factor increases mouse ventral tegmental area dopamine neuron firing through a protein kinase C-dependent enhancement of I_h . *J Physiol*. 2008;586(8):2157-70.
44. Bredy TW. Behavioural epigenetics and psychiatric disorders. *Med Hypotheses*. 2007;68(2):453.
45. Wenderski W, Maze I. Histone turnover and chromatin accessibility: Critical mediators of neurological development, plasticity, and disease. *Bioessays*. 2016;38(5):410-9.
46. Ramaker RC, Bowling KM, Lasseigne BN, Hagenauer MH, Hardigan AA, Davis NS, et al. Post-mortem molecular profiling of three psychiatric disorders. *Genome Med*. 2017;9(1):72.
47. Taniguchi M, Carreira MB, Cooper YA, Bobadilla AC, Heinsbroek JA, Koike N, et al. HDAC5 and Its Target Gene, *Npas4*, Function in the Nucleus Accumbens to Regulate Cocaine-Conditioned Behaviors. *Neuron*. 2017;96(1):130-44.e6.

48. Russo SJ, Wilkinson MB, Mazei-Robison MS, Dietz DM, Maze I, Krishnan V, et al. Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *J Neurosci*. 2009;29(11):3529-37.
49. Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE, Xiao G, Kumar A, et al. Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron*. 2007;56(3):517-29.
50. Bredy TW, Sun YE, Kobor MS. How the epigenome contributes to the development of psychiatric disorders. *Dev Psychobiol*. 2010;52(4):331-42.
51. Marshall P, Bredy TW. Cognitive neuroepigenetics: the next evolution in our understanding of the molecular mechanisms underlying learning and memory? *NPJ Sci Learn*. 2016;1.
52. Geoffroy MC, Pinto Pereira S, Li L, Power C. Child Neglect and Maltreatment and Childhood-to-Adulthood Cognition and Mental Health in a Prospective Birth Cohort. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2016;55(1):33-40.e3.
53. Schalinski I, Teicher MH, Carolus AM, Rockstroh B. Defining the impact of childhood adversities on cognitive deficits in psychosis: An exploratory analysis. *Schizophr Res*. 2017.
54. Viola TW, Tractenberg SG, Pezzi JC, Kristensen CH, Grassi-Oliveira R. Childhood physical neglect associated with executive functions impairments in crack cocaine-dependent women. *Drug and Alcohol Dependence*. 2013;132(1-2):271-6.
55. Baes C, Martins CM, Tofoli SM, Juruena MF. Early Life Stress in Depressive Patients: HPA Axis Response to GR and MR Agonist. *Front Psychiatry*. 2014;5:2.
56. Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci*. 2014;8:166.
57. Schäfer I, Teske L, Schulze-Thüsing J, Homann K, Reimer J, Haasen C, et al. Impact of childhood trauma on hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity in alcohol-dependent patients. *Eur Addict Res*. 2010;16(2):108-14.
58. Vetulani J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacol Rep*. 2013;65(6):1451-61.
59. Berger T. Immunological processes related to cognitive impairment in MS. *Acta Neurol Scand*. 2016;134 Suppl 200:34-8.

60. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(1):46-56.
61. Kemeny ME. Psychobiological responses to social threat: evolution of a psychological model in psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun*. 2009;23(1):1-9.
62. Kipnis J, Cohen H, Cardon M, Ziv Y, Schwartz M. T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(21):8180-5.
63. Prieto GA, Cotman CW. Cytokines and cytokine networks target neurons to modulate long-term potentiation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017;34:27-33.
64. Gruol DL. IL-6 regulation of synaptic function in the CNS. *Neuropharmacology*. 2015;96(Pt A):42-54.
65. Engemann C, Haenold R. Transcriptional Control of Synaptic Plasticity by Transcription Factor NF- κ B. *Neural Plast*. 2016;2016:7027949.
66. Liu RT, Choi JY, Boland EM, Mastin BM, Alloy LB. Childhood abuse and stress generation: the mediational effect of depressogenic cognitive styles. *Psychiatry Res*. 2013;206(2-3):217-22.
67. McEwen BS, Gianaros PJ. Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1186:190-222.
68. Levandowski ML, Viola TW, Prado CH, Wieck A, Bauer ME, Brietzke E, et al. Distinct behavioral and immunoendocrine parameters during crack cocaine abstinence in women reporting childhood abuse and neglect. *Drug Alcohol Depend*. 2016;167:140-8.
69. Spitzer C, Wegert S, Wollenhaupt J, Wingenfeld K, Barnow S, Grabe HJ. Gender-specific association between childhood trauma and rheumatoid arthritis: a case-control study. *J Psychosom Res*. 2013;74(4):296-300.
70. Witek Janusek L, Tell D, Albuquerque K, Mathews HL. Childhood adversity increases vulnerability for behavioral symptoms and immune dysregulation in women with breast cancer. *Brain Behav Immun*. 2013;30 Suppl:S149-62.
71. Coelho R, Viola TW, Walss-Bass C, Brietzke E, Grassi-Oliveira R. Childhood maltreatment and inflammatory markers: a systematic review. *Acta Psychiatr Scand*. 2014;129(3):180-92.

72. do Prado CH, Grassi-Oliveira R, Daruy-Filho L, Wieck A, Bauer ME. Evidence for Immune Activation and Resistance to Glucocorticoids Following Childhood Maltreatment in Adolescents Without Psychopathology. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(11):2272-82.
73. Roque A, Ochoa-Zarzosa A, Torner L. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain Behav Immun*. 2016;55:39-48.
74. Martorana F, Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. Withaferin A Inhibits Nuclear Factor- κ B-Dependent Pro-Inflammatory and Stress Response Pathways in the Astrocytes. *Neural Plast*. 2015;2015:381964.
75. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014;5:461.
76. Biancardi VC, Stranahan AM, Krause EG, de Kloet AD, Stern JE. Cross talk between AT1 receptors and Toll-like receptor 4 in microglia contributes to angiotensin II-derived ROS production in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(3):H404-15.
77. Martín-Hernández D, Caso JR, Bris Á, Maus SR, Madrigal JL, García-Bueno B, et al. Bacterial translocation affects intracellular neuroinflammatory pathways in a depression-like model in rats. *Neuropharmacology*. 2016;103:122-33.
78. Kaneko YS, Ota A, Nakashima A, Mori K, Nagatsu I, Nagatsu T. Regulation of oxidative stress in long-lived lipopolysaccharide-activated microglia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(7):599-607.
79. Tang HL, Zhang G, Ji NN, Du L, Chen BB, Hua R, et al. Toll-Like Receptor 4 in Paraventricular Nucleus Mediates Visceral Hypersensitivity Induced by Maternal Separation. *Front Pharmacol*. 2017;8:309.
80. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-8.
81. Chen CY, Liu HY, Hsueh YP. TLR3 downregulates expression of schizophrenia gene *Disc1* via MYD88 to control neuronal morphology. *EMBO Rep*. 2017;18(1):169-83.
82. Salmina AB, Komleva YK, Lopatina OL, Kuvacheva NV, Gorina YV, Panina YA, et al. Astroglial control of neuroinflammation: TLR3-mediated dsRNA-sensing pathways are in the focus. *Rev Neurosci*. 2015;26(2):143-59.

83. Costello DA, Lynch MA. Toll-like receptor 3 activation modulates hippocampal network excitability, via glial production of interferon- β . *Hippocampus*. 2013;23(8):696-707.
84. Vetreno RP, Crews FT. Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and Toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2012;226:475-88.
85. Zimmermann KS, Hsu CC, Gourley SL. Strain commonalities and differences in response-outcome decision making in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2016;131:101-8.
86. Brenhouse HC, Andersen SL. Nonsteroidal anti-inflammatory treatment prevents delayed effects of early life stress in rats. *Biological psychiatry*. 2011;70(5):434-40.
87. Bailoo JD, Jordan RL, Garza XJ, Tyler AN. Brief and long periods of maternal separation affect maternal behavior and offspring behavioral development in C57BL/6 mice. *Developmental psychobiology*. 2013.
88. Orso R, Wearick-Silva LE, Creutzberg KC, Centeno-Silva A, Glusman Roithmann L, Pazzin R, et al. Maternal behavior of the mouse dam toward pups: implications for maternal separation model of early life stress. *Stress*. 2017:1-9.
89. Wu J, Huang S, Zhao X, Chen M, Lin Y, Xia Y, et al. Poly(I:C) treatment leads to interferon-dependent clearance of hepatitis B virus in a hydrodynamic injection mouse model. *J Virol*. 2014;88(18):10421-31.
90. Opendak M, Sullivan RM. Unique neurobiology during the sensitive period for attachment produces distinctive infant trauma processing. *Eur J Psychotraumatol*. 2016;7:31276.
91. Sánchez MM, Ladd CO, Plotsky PM. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Dev Psychopathol*. 2001;13(3):419-49.
92. Landers MS, Sullivan RM. The development and neurobiology of infant attachment and fear. *Dev Neurosci*. 2012;34(2-3):101-14.
93. Andersen SL, Teicher MH. Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *Trends Neurosci*. 2008;31(4):183-91.
94. Andersen SL, Teicher MH. Desperately driven and no brakes: developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33(4):516-24.
95. Vivinetto AL, Suárez MM, Rivarola MA. Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behav Brain Res*. 2013;240:110-8.

96. Roth TL, Lubin FD, Funk AJ, Sweatt JD. Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry*. 2009;65(9):760-9.
97. Luby J, Belden A, Botteron K, Marrus N, Harms MP, Babb C, et al. The effects of poverty on childhood brain development: the mediating effect of caregiving and stressful life events. *JAMA Pediatr*. 2013;167(12):1135-42.
98. Johnson FK, Kaffman A. Early life stress perturbs the function of microglia in the developing rodent brain: New insights and future challenges. *Brain Behav Immun*. 2017.
99. Crowley TJ, Dalwani MS, Mikulich-Gilbertson SK, Du YP, Lejuez CW, Raymond KM, et al. Risky decisions and their consequences: neural processing by boys with Antisocial Substance Disorder. *PLoS One*. 2010;5(9):e12835.
100. Garami J, Haber P, Myers CE, Allen MT, Misiak B, Frydecka D, et al. Intolerance of uncertainty in opioid dependency - Relationship with trait anxiety and impulsivity. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181955.
101. Wu S, de Saxe Zerden L, Wu Q. The influence of childhood welfare participation on adulthood substance use: evidence from the National Longitudinal Study of Adolescent to Adult Health. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2016;42(6):657-70.
102. Rovaris DL, Schuch JB, Grassi-Oliveira R, Sanvicente-Vieira B, da Silva BS, Walss-Bass C, et al. Effects of crack cocaine addiction and stress-related genes on peripheral BDNF levels. *J Psychiatr Res*. 2017;90:78-85.
103. Viola TW, Cardoso CdO, Francke IDA, Gonçalves HA, Pezzi JC, Araújo RB, et al. Tomada de decisão em dependentes de crack: um estudo com o Iowa Gambling Task. *Estudos de Psicologia (Natal)*. 2012;17(1):99-106.
104. Kluwe-Schiavon B, Viola TW, Sanvicente-Vieira B, Pezzi JC, Grassi-Oliveira R. Similarities between adult female crack cocaine users and adolescents in risky decision-making scenarios. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2016;38(7):795-810.
105. Migliori V, Müller J, Phalke S, Low D, Bezzi M, Mok WC, et al. Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin maintenance. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(2):136-44.
106. Li X, Wei W, Zhao QY, Widagdo J, Baker-Andresen D, Flavell CR, et al. Neocortical Tet3-mediated accumulation of 5-hydroxymethylcytosine promotes rapid behavioral adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(19):7120-5.

107. Fattore L, Altea S, Fratta W. Sex differences in drug addiction: a review of animal and human studies. *Womens Health (Lond Engl)*. 2008;4:51-65.
108. Hammerslag LR, Gulley JM. Sex differences in behavior and neural development and their role in adolescent vulnerability to substance use. *Behav Brain Res*. 2016;298(Pt A):15-26.
109. Canterberry M, Peltier MR, Brady KT, Hanlon CA. Attenuated neural response to emotional cues in cocaine-dependence: a preliminary analysis of gender differences. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2016;42(5):577-86.
110. Yang XD, Liao XM, Uribe-Mariño A, Liu R, Xie XM, Jia J, et al. Stress during a critical postnatal period induces region-specific structural abnormalities and dysfunction of the prefrontal cortex via CRF1. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40(5):1203-15.
111. Brenhouse HC, Lukkes JL, Andersen SL. Early life adversity alters the developmental profiles of addiction-related prefrontal cortex circuitry. *Brain Sci*. 2013;3(1):143-58.
112. Viola TW, Wearick-Silva LE, De Azeredo LA, Centeno-Silva A, Murphy C, Marshall P, et al. Increased cocaine-induced conditioned place preference during periadolescence in maternally separated male BALB/c mice: the role of cortical BDNF, microRNA-212, and MeCP2. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016;233(17):3279-88.
113. Albrechet-Souza L, Viola TW, Grassi-Oliveira R, Miczek KA, de Almeida RMM. Corticotropin Releasing Factor in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in Socially Defeated and Non-stressed Mice with a History of Chronic Alcohol Intake. *Front Pharmacol*. 2017;8:762.
114. Dunlop BW, Rothbaum BO, Binder EB, Duncan E, Harvey PD, Jovanovic T, et al. Evaluation of a corticotropin releasing hormone type 1 receptor antagonist in women with posttraumatic stress disorder: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2014;15:240.
115. Nusslock R, Miller GE. Early-Life Adversity and Physical and Emotional Health Across the Lifespan: A Neuroimmune Network Hypothesis. *Biol Psychiatry*. 2016;80(1):23-32.
116. Schoch KM, Miller TM. Antisense Oligonucleotides: Translation from Mouse Models to Human Neurodegenerative Diseases. *Neuron*. 2017;94(6):1056-70.
117. Vian J, Pereira C, Chavarria V, Köhler C, Stubbs B, Quevedo J, et al. The renin-angiotensin system: a possible new target for depression. *BMC Med*. 2017;15(1):144.

6. ANEXOS E APÊNDICES



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 91/2015 - CEUA

Porto Alegre, 19 de novembro de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

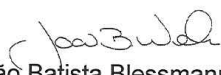
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00473 intitulado **“Mecanismos neuroepigenéticos envolvidos na avaliação do risco: Efeitos da exposição ao estresse precoce”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
250	Mus musculus	08/2015 – 12/2018

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira

IPB

Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512

CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: ceua@pucrs.br

Estudo 1 – Em preparação para submissão a Psychoneuroendocrinology

Title: Impoverished housing conditions leads to increased stress reactivity, impaired risk assessment, and epigenetic priming associated with increased corticotropin releasing factor receptor 1 gene expression in the medial prefrontal cortex of adolescent female mice

Authors: Thiago Wendt Viola¹, Luis Eduardo Wearick-Silva¹, Kerstin Creutzberg¹, Érika Kestering¹, Francisco Lumertz¹, Rodrigo Orso¹, Anderson Centeno¹, Lucas Albrechet-Souza², Paul R. Marshall³, Xiang Li³, Timothy W. Bredy³, Rodrigo Grassi-Oliveira¹

Affiliations: ¹Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Developmental Cognitive Neuroscience Lab, Porto Alegre, RS, Brazil. ²Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Institute of Psychology, Porto Alegre, RS, Brazil. ³University of Queensland, Queensland Brain Institute, Brisbane, Australia.

Financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Corresponding author: Rodrigo Grassi-Oliveira

Address: PUCRS, Avenida Ipiranga 6690 – Prédio 63; Jardim Botânico – Porto Alegre, RS, Brasil; Email: rodrigo.grassi@pucrs.br

Abstract

In this study, we investigated the effects of impoverished housing conditions during early life on risk assessment (RA) of adolescent male and female mice. RA was investigated using a behavioral paradigm that explores the conflict between two biologically relevant stimuli: the motivation to consume a sweet and highly palatable solution while being threatened by predatory olfactory cues. We found increased anxiety-like behavior, increased HPA axis response to stress and impaired RA processing in female adolescent mice, with no effect in males. These sex-specific effects were associated with increased *Crf1* mRNA expression in the medial prefrontal cortex (mPFC), which correlated with an increase in the occupancy of the histone mark H3R2^{me2s}, a histone modification known to be involved in transcriptional activation and epigenetic priming, within the promoter of the *Crf1* gene. These findings indicate a potent effect of early life poverty on RA in adolescent female mice, which could be detrimental for cognitive performance in potentially dangerous situations, and suggest that the epigenetic priming of the *Crf1* gene may represent a critical factor mediating the relationship between early life stress and altered cognitive processing later in life in females.

Key words: Poverty, Early life stress, Decision-making, Risk-assessment, anxiety, epigenetics.

1. Introduction

Economic inequality is a socio-political phenomenon that still offer unique challenges for global public health (1). Low-income populations often present counterproductive behaviors, such as less use of preventive health care (2), while they are more exposed to several risk factors for both physical and mental illnesses (3, 4). A key mediator factor on the association between low socioeconomic status and negative life outcomes refers to the influence of poverty on judgment and decision-making (5, 6). For example, individuals with a poverty background frequently expose themselves to adverse life events regardless of potentially long-term negative consequences (7), due to altered risk-assessment (RA) and greater difficulties in the processing of gains and losses (6). RA is a dynamic cognitive process that involves the acquisition of environmental information in potentially dangerous situations that, ultimately, optimize the most adaptive behavioral strategies depending on latent positive or negative outcomes (8).

Given the fundamental role of early life experiences on brain development and plasticity, poverty-induced cognitive impairments are even more critical during childhood (9). For instance, an MRI longitudinal study showed that low-income children had lower gray matter volume in the frontal lobe, and such effect explained 16% of the differences in cognitive ability among toddlers (10). In this sense, children raised in poor environments often have a later maturation of executive functions (11), and an earlier onset of risk-taking behaviors (6). These consequences are suggested to prime such vulnerable population for the development of several neuropsychiatric illnesses during adolescence and young adulthood, particularly impulsive and addictive disorders (7, 12).

The medial prefrontal cortex (mPFC) has a key contribution for behavioral control, risk perception and reward processing (13, 14). In particular, dopaminergic neurotransmission through D1 and D2 receptors modulate neuronal inputs between the mPFC and the ventral striatum during reward processing, while the mPFC-amygdala dopaminergic transmission has an important role in the encoding of aversive events (15). Evidence indicates that pharmacological blockade of D1 or D2 receptors in the mPFC could hinder RA processing through alterations in risk or reward sensitivity (15, 16). In addition to dopaminergic neurotransmission, corticotrophin releasing factor (CRF) is also involved in RA (17), particularly with respect to the influence of stress on reward sensitivity (18), as well as risk-seeking approach or avoidance (19). For example, the blockade of the CRF receptor type 1 (CRFR1) reverses stress-induced cognitive

and executive impairments (20). Furthermore, *Crfr1* gene expression in the mPFC correlates with risk-avoidance behaviors following predator odour exposure in rodents (21).

Dopaminergic and corticotrophinergic signaling in the mPFC therefore represent good candidates for an investigation into the effects of early life poverty on RA. However, because very few preclinical studies have analyzed such association, findings regarding how RA is altered by early life adversity are limited. Furthermore, emerging evidence supports the idea that the transcription of dopaminergic and corticotrophinergic genes is regulated through the activity of epigenetic mechanisms that can act as a rheostat, serving to turn up or turn down levels of gene expression in response to rapidly changing environmental demands (22, 23). More recently, it has been shown that epigenetic mechanisms can also prime genes for responsiveness to future events (24), and that the early postnatal environment has a crucial role on the corresponding changes in DNA or histones that is accompanied by gene expression and enduring behavioral phenotypes (25). Therefore, the study of the epigenetic landscape is also of particular interest since it has been implicated in the neurobiology of a variety of cognitive processes (26).

Here, using a mice model of impoverished housing during early infancy, we investigated the effects of early life poverty on adolescent RA processing. We utilized the predator-odor risk-taking (PORT) task for the investigation of RA (27), which explores a conflict between two biologically relevant stimuli for rodents: the motivation to consume a sweet and highly palatable solution while being threat by predatory olfactory cues. Since previous studies highlighted sex differences in decision-making and risk-taking processes (19, 28), we aimed to extend these findings with an investigation the performance of both adolescent male and female mice in the PORT task following early life adversity. In order to determine to what extent the dopaminergic and corticotrophinergic signaling may account for the effects of poverty and sex in RA processing, we measured gene expression levels of *Drd1*, *Drd2*, *Crf* and *Crfr1* in the mPFC.

Finally, histone acetylation/deacetylation and methylation of specific lysine residues on nucleosomal histone proteins (i.e., H3-K9) within promoter regions are ways that chromatin remodeling can influence gene transcription. In particular, modifications of histone H3 in the mPFC has been associated with the effects of stress and fear on cognition (29). Therefore, we also investigated the levels of H3K9me3, a histone mark associated with transcriptional repression, and the levels of H3R2me2s, a histone mark associated with gene expression, within the promoter region of behaviorally relevant candidate genes.

2. Methods

2.1. Animals

This study was performed with male and female C57BL/6 mice. All animals were housed under a 12 h/12 h light–dark cycle in ventilated Plexiglas cages with temperature maintained at 21 ± 1 °C. Food and water were available *ad libitum*, with the exception when animals underwent water restriction for PORT behavioral training and testing. Mice were weighted at the postnatal day (P) 9, P30 and P40. The experiments were conducted in accordance with the NIH laboratory animal care guidelines and approved by the Ethical Committee on the Use of Animals of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil. All behavioral testing were conducted in the light phase of the light-dark cycle, with luminosity at the level of 75 lux.

2.2. Mice model of impoverished housing during early infancy

The experimental design and timeline of all behavioral experiments are depicted in figure 1. Single-housed pregnant females (n=30) were visually checked daily for the presence of pups. Following birth, dams and litters were randomly assigned to one of two groups: standard rearing control condition or impoverished housing (30). From P2 to P9, standard rearing dams and litters were placed in cages with standard amounts of wood shavings and 4g of cotton as nesting material. Therefore, dams shredded the cotton to create an ample nest area for standard rearing pups. Dams assigned to impoverished housing conditions had reduced amount of nesting material (1g of cotton) for the period of 8 days (P2-P9). Moreover, the cage floor was covered with an aluminum mesh platform, and wood shavings were placed underneath it. Thus, while mouse droppings could fall below the platform without trapping the pups, impoverished housing dams could not reach the wood shavings. Following P9, impoverished housing dams and litters were allocated into new cages prepared according with standard rearing control conditions. Both groups were left completely undisturbed from P2 to P22, except for regular cage changes (fresh wood shavings and nesting material) at P9, P16 and P21. All pups were weaned at P22 and remained together with their same-sex littermates (2 or 4 animals per cage), under standard housing conditions.

2.3. Maternal behavior analysis

Previous evidence showed that limited nesting material following birth is associated with altered maternal behaviors of the mouse dam toward pups (30). Therefore, observations of maternal behavior (n=10 per group) were conducted from P2 to P9. The observations were conducted seven times over a period of 18 min (0, 3rd, 6th, 9th, 12th, 15th and 18th min) and were performed during three shifts of the day – 9 a.m., 3:30 p.m., and 7:15 p.m. The frequency of behaviors evaluated were nursing (N), licking pups (L), breastfeeding pups (B), contact with pups (C), no interaction with pups (X) and eating/drinking (E) (31). The behaviors N, L, B and C were categorized as maternal care related behaviors. Thus, the percentage of maternal care was computed by dividing the sum of all maternal care related behaviors by the number of all observations. Additionally, the frequency of exits of the dam from the nest was recorded during all observations.

2.4. Elevated plus-maze (EPM) test

Given that anxiety traits could fundamentally affect the perception of risk (8), the EPM was used for the study of anxiety and also RA. The EPM apparatus was constructed with black Plexiglas and consisted of two open arms (30 cm × 5 cm) and two closed arms (30 cm × 5 cm × 15 cm) connected via a central platform (5 cm × 5 cm). The apparatus was raised to a height of 50 cm above the ground. At P32 mice were transported to the experimental room and left undisturbed for 15 min prior to testing. They were placed individually in the center of the maze facing a closed arm and allowed 5 min of free exploration. The time spent in the open or closed arms, as well as in the center of the maze was recorded. In addition, the frequency of the following RA behaviors (8) was recorded: (1) when mice dipped their heads below the level of the maze floor (head dipping); (2) when stretching the head/shoulders from the center of the maze towards open arms (peeping out); and (3) when the animal stretches to its full length with the forepaws keeping the hind paws in the same place and turns back to the anterior position while exploring the center of the maze (stretched-attend posture).

2.5. PORT task

The PORT is a behavioral protocol that allows the investigation of RA under reward-seeking conditions (27). The rewarding stimulus used was a solution of condensed milk (10%) mixed with water (90%). Water restriction was required for 15 hours daily, beginning at P30 and

lasting until the final day of testing (P47). Water bottles were withdrawn at 6 pm, and animals only had access to water again in the morning of the next day, or after the completion of behavioral tasks. PORT behavioral procedures were performed between 8 am and 11 am.

Habituation to the rewarding solution was performed when mice were at P33. A Falcon tube cap containing the sweet solution (2 ml) was placed inside animal's home cages for the period of 48 hours. From P36 to P39, animals were daily tested for their preference regarding the consumption of the sweet solution over water. These 15 minutes sessions were performed in Plexiglas open field boxes (30 cm × 30 cm × 30 cm) containing two Falcon tube caps, one containing the sweet solution (2 ml) and the other containing only water (2 ml). To prevent side preference, the position of the caps was switched between sessions. Sweet solution and water consumption was measured by weighing the caps before and after test. The percentage of reward preference was computed using this equation [volume of sweet solution consumption / volume of sweet solution consumption + volume of water consumption]. Mice that did not present at least 60% of reward preference in the last testing session, were excluded from the analysis.

Habituation to the PORT apparatus was performed when animals were at P40, for 15 minutes. The PORT apparatus is a Plexiglas box divided into three equal compartments (30 cm × 30 cm × 30 cm each chamber). Compartments are connected by doors (5 cm × 5 cm), allowing animals to fully explore the apparatus. In all PORT sessions the floor of the central compartment was covered with wood shaving. From P42 to P43, mice performed training sessions to learn where to collect the sweet solution (40 ul) inside the PORT apparatus. Each animal performed 4 trials per day (total of 8 trials). At each trial, the animal was placed in one of the lateral compartments and allowed to explore the three compartments. The sweet solution (40ul) was positioned in the center of the opposed lateral compartment. Therefore, animals had to cross the apparatus to collect the sweet solution. Some mice moved from left to right and others right to left, but the direction was fixed for each individual subject throughout trials. Following reward consumption animals were placed back in their home cages and waited for the next trial (approximately 5 minutes of interval). The time spent to collect the reward was recorded for each trial.

Tests were performed similarly to training trials. Animals were placed in the initial compartment and allowed to explore the PORT apparatus until reward consumption. In the neutral condition test (P46), the floor of the central compartment was covered with wood

shavings just as a training trial. However, in the final test (P47), wood shavings were mixed with coyote urine (2 ml) to generate a potentially dangerous environment within the PORT central compartment (32). Therefore, the time spent in the central compartment, before the animal reached the reward-containing area, and the time spent to collect the reward were recorded.

Importantly, of the 100 animals used for behavioral training (n=25 per group), 30% did not show at least 60% of reward preference in the last preference test and were excluded from the analysis (no group differences, $\chi^2 = 0.95$; $p = 0.81$). Thus, the final sample size for behavioral analysis were: male impoverished housing (n=19), male standard rearing (n=16), female impoverished housing (n=17) and females standard rearing (n=18). Furthermore, all female mice were in diestrous stage of the estrous cycle at the final test.

2.6. Brain tissue collection

Three hours after the final test of the PORT task mice were euthanized. We selected this time point since previous evidence indicated enhanced gene expression of neurotransmitter receptors after 3 hours of a single exposure to predatory olfactory cues (33). Additionally, cohort of younger animals (P9 and P21) and animals that did not perform behavioral training (P47) were produced to verify changes in gene expression that could not be related to the effects of the PORT task. The brains were removed immediately after cervical dislocation by decapitation and the mPFC was dissected. Tissues were then frozen on dry ice and stored at -80°C until used for molecular analysis.

2.7. Gene expression analysis

Total RNA was isolated from 6 samples per group using QIAzol (Qiagen; Hilden, Germany) and chloroform standard protocols. RNA concentration was measured using the NanoDrop spectrophotometer. Total of 500 ng of RNA from each sample was reverse transcribed using the miScript II RT Kit (Qiagen). The following Quantitect primers (Qiagen) were used: CRF (QT0029389) and CRFR1; and the following IDT primers were used: Drd1: Forward - ATGGCTCCTAACACTTCTACCA; Drd1: Reverse - GGGTATTCCCTAAGAGAGTGGAC; Drd2: Forward - ACCTGTCCTGGTACGATGATG; Drd2: Reverse - GCATGGCATAGTAGTTGTAGTGG; Pgk: Forward - TGCACGCTTCAAAGCGCACG; Pgk: Reverse - AAGTCCACCCTCATCACGACCC. Each

SYBR Green PCR reaction was run in duplicate for each sample using a Rotor Gene Real-Time PCR machine (Qiagen). The fold change relative expression was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method with the female standard reared group as a reference. PGK ct values were used as endogenous control for mRNA analysis. To verify primer specificities, melting curve analyses and agarose gels were performed.

2.8. Histone modification analysis

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed following modification of the Invitrogen ChIP kit protocol. Tissues from two mice were pooled and counted as one sample (each group had five samples). Therefore, samples were fixed in 1% formaldehyde and cross-linked cell lysates were sheared by sonication (5 repeats of 15 seconds 90% pulses, with 30 seconds of interval) in 1% SDS lysis buffer to generate chromatin fragments with an average length of 300bp. The chromatin was then immunoprecipitated overnight at 4°C using the specific Abcam antibodies to each target: H3R2 symmetric dimethylation – H3R2^{me2s} (AB194684) and H3K9 trimethylation – H3K9^{me3} (AB8898). Protein-DNA-antibody complexes were precipitated with protein G-magnetic beads for 1 hour at 4°C, followed by three washes in low salt buffer, and three washes in high salt buffer. The precipitated protein-DNA complexes were eluted from the antibody with 1% SDS and 0.1M NaHCO₃, then incubated overnight at 65°C in 200 mM NaCl to reverse formaldehyde cross-link. Following proteinase K digestion, phenol-chloroform extraction, and ethanol precipitation, samples were subjected to qPCR using primers specific for 200bp segments corresponding to the promoter region of the *Crf1* gene: Upstream transcription start site (TSS): Forward – GGTGAACCTCCTGGATGGC; Reverse – GCAGGCAGCCTTTCTTCTCT; Downstream TSS: Forward – GGCGCCTGGGAGCAG; Reverse – CTTCACGAGCCGGAGCTG. Samples with no immunoprecipitation (input) were used to normalize qPCR data from immunoprecipitated samples. The $\Delta\Delta C_t$ method was used for ChIP analysis with the female standard reared group as a reference.

2.9. Corticosterone levels

As a measure of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis functioning, blood levels of corticosterone (CORT) were collected from 8 animals per group 30 minutes after the final PORT test. A total of 5 ul of plasma were used for analyzes performed with the Corticosterone

Enzyme Immunoassay (Arbor Assays) ELISA kit, according to the manufacturer's instructions. The optical density was analyzed at 450 nm wavelength in an ELISA plate reader, and the data was subsequently transformed into concentration (pg/ml) using standard curve parameters.

2.10. Statistical Analysis

Experimental differences were assessed by Student's *t*-test for maternal care behavior, body weight, and histone modifications. The one-way analysis of variance (ANOVA) was used for behavioral (EPM), HPA axis, and molecular (gene expression) data analysis. The PORT data were analyzed by means of repeated measures ANOVAs, with a condition factor (neutral x coyote urine) and a group factor (impoverished housing x standard rearing), for each sex individually. The ANOVAs were followed by Tukey *post-hoc* tests. Pearson's correlation analysis was used to evaluate the association between behavioral and gene expression data. Statistical significance was defined as $p < 0.05$ and results are expressed as the mean \pm SEM.

3. Results

3.1. Alterations in maternal behavior and body weight during infancy due to impoverished housing conditions

Exposure to impoverished housing leads to a fragmentation in childhood maternal care, manifested by an increased frequency of exits of the dam from the nest/pups in the impoverished housing group compared with standard reared group [$t(18) = 3.07, p < 0.01$; Figure 2A]. No significant differences were detected regarding the percentage of maternal care behaviors between groups [$t(18) = 1.48, p = 0.17$; Figure 2B]. Additionally, impoverished housing induced reduced body weight in infant animals (P9) compared with standard reared animals [$t(38) = 3.20, p < 0.01$; Figure 2C], but no differences were detected at P30 [$t(38) = 1.20, p = 0.23$; Figure 2D] and P40 [$t(38) = 0.52, p = 0.60$; Figure 2E].

3.2. Females exposed to impoverished housing showed decreased exploration of the open arms and RA behaviors in the EPM

Childhood impoverished housing exposure induced a sex-specific effect regarding anxiety-related behaviors during adolescence, manifested as less time spent in the open arms of the EPM [$F(3,67) = 4.31, p < 0.01$; Figure 3A] in female animals compared with standard reared

male animals ($p < 0.01$), and male animals exposed to impoverished housing conditions ($p = 0.03$). No significant differences were detected regarding the exploration time of the closed arms [$F(3,67) = 1.62, p = 0.19$; Figure 3B] and regarding the time spent at the center of the maze [$F(3,67) = 0.19, p = 0.90$; Figure 3C]. Moreover, females exposed to impoverished housing presented less RA behaviors in the EPM [$F(3,66) = 5.43, p < 0.01$; Figure 3D] compared with standard reared female ($p < 0.05$) and male mice ($p < 0.01$).

3.3. Females exposed to impoverished housing showed decreased RA processing under reward-seeking conditions

In the PORT task (Figure 4A), male mice presented a significant reduction in the latency to collect the reward among training trials [condition effect: $F(7,252) = 5.71, p < 0.01$; Figure 4B], while no group differences were detected in this learning process [group effect: $F(1,36) = 0.21, p = 0.64$]. In the test sessions, coyote urine exposure induced an increase in the latency to collect the reward compared with the neutral condition [condition effect: $F(1,33) = 4.73, p < 0.05$], but similarly no group differences were detected [group effect: $F(1,33) = 1.33, p < 0.05$].

Female mice also presented a significant reduction in the latency to collect the reward among training trials [condition effect: $F(7,231) = 8.06, p < 0.01$; Figure 4C], while no group differences were detected during the learning process [group effect: $F(1,33) = 0.09, p = 0.75$]. Similarly, coyote urine exposure induced an increase in the latency to collect the reward compared with the neutral condition in the testing sessions [condition effect: $F(1,33) = 7.67, p < 0.01$]. However, a reduction in the latency to collect the reward was observed in females exposed to impoverished housing in comparison with standard reared females [group effect: $F(1,33) = 4.37, p < 0.05$], and such differences were specific to the coyote urine testing trial ($p < 0.05$). Furthermore, this effect could not be attributed to changes in reward preference (Figure 4D), as both groups of males [$F(3,96) = 20.82, p < 0.01$] and females [$F(3,90) = 19.62, p < 0.01$] animals increased their preference for the consumption of the sweet solution over water, while no effects of impoverished housing exposure were observed regarding the acquisition of reward preference.

In addition, sex differences were also observed regarding HPA axis functioning 30 minutes after the coyote urine PORT test [$F(3,35) = 17.69, p < 0.01$; Figure 4E], given that females exposed to impoverished housing had lower CORT levels compared with standard

reared females ($p < 0.01$), while males exposed to impoverished housing had higher CORT levels compared with standard reared males ($p < 0.01$).

Since the predatory olfactory cues were introduced in the central compartment of the PORT apparatus, we examined potential differences between groups regarding the time spent in this area (Figure 4F). Male mice presented a significant increase in the exploration time of the central compartment when exposed to coyote urine compared with the neutral condition [condition effect: $F(1,33) = 4.63, p < 0.05$], but no group differences were detected [group effect: $F(1,33) = 0.29, p = 0.59$].

Female mice also presented a significant increase in the exploration time of the central compartment when exposed to coyote urine compared with the neutral condition [condition effect: $F(1,33) = 30.91, p < 0.01$], while no group differences were detected [group effect: $F(1,33) = 2.32, p = 0.13$]. However, only the standard reared females presented a significant increase in the time spent in the central compartment facing the coyote urine, while no differences were observed in females exposed to impoverished housing [interaction effect: $F(1,33) = 5.99, p < 0.05$]. These results suggested that only standard reared females engaged the RA processing in the PORT task, while females exposed to impoverished housing did not.

This notable effect among standard reared females prompted us to investigate if the increase in the time spent in central compartment was specific to the coyote urine odour, or given to novelty-seeking effects of distinct odours mixed with wood shavings (Figure 4G). Therefore, in an independent cohort of control animals we observed a significant increase in the exploration time of the central compartment when females were exposed to the coyote urine in the PORT test [$F(2,42) = 8.73, p < 0.01$], but not when they were exposed to citronella ($p < 0.01$) or no odour conditions (neutral condition, $p < 0.01$).

3.4. Association between female altered RA processing induced by impoverished housing conditions and Crfr1 gene expression in the mPFC

No significant between-groups differences were detected in the mRNA levels of *Drd1* [$F(3,21) = 0.01, p = 0.99$] and *Drd2* [$F(3,21) = 0.07, p = 0.95$] in the mPFC following the PORT test with coyote urine. Although no significant differences were detected in the mRNA levels of *Crf*, a trend to reduction was observed in males exposed to impoverished housing in comparison with standard reared females [$F(3,21) = 2.60, p = 0.07$]. Females exposed to impoverished

housing had significant higher mRNA levels of *Crfr1* in the mPFC [$F(3,21) = 5.52, p < 0.01$] compared with standard reared females ($p < 0.05$) and males exposed to impoverished housing ($p < 0.05$).

Correlation analysis revealed a significant negative association between *Crfr1* gene expression and the latency to collect the reward in the PORT test with coyote urine among females ($R^2 = 0.39; p < 0.05$), but not among male mice ($p > 0.05$).

Considering this sex-specific effect among female mice, we investigated whether the changes in *Crfr1* expression induced by impoverished housing exposure could be identified in earlier stages of female development. Significant lower mRNA levels of *Crfr1* were detected at the P9 [$t(10) = 3.49, p < 0.01$] in mice exposed to impoverished housing compared with the standard reared group, but not at P21 [$t(10) = 2.01, p = 0.10$]. Moreover, in the P47, a trend to reduction was observed in animals exposed to impoverished housing that did not perform behavioral training [$t(10) = 2.21, p = 0.06$]. These results demonstrated that impoverished housing exposure is associated with changes in the expression of *Crfr1* in the mPFC throughout childhood and adolescence, specifically in female mice, manifested as a decrease in the expression throughout development and an increase following the PORT test with coyote urine.

3.5. Higher levels of the histone mark H3R2^{me2s} in the mPFC of female mice exposed to impoverished housing conditions

This notable dynamic change of *Crfr1* mRNA expression, prompted us to investigate the chromatin status surrounding the promoter region of the *Crfr1* gene following the PORT test with coyote urine, specifically in the mPFC of female mice exposed to impoverished housing or to standard rearing conditions. The level of histone H3 methylation (H3R2^{me2s} and H3K9^{me3}) was investigated by ChIP analysis, particularly 200bp upstream the TSS, and 200bp downstream the TSS. No significant differences were observed regarding the levels of H3K9^{me3}, a histone mark associated with transcriptional repression, at upstream the TSS [$t(8) = 0.77, p = 0.45$], and at downstream the TSS [$t(8) = 1.40, p = 0.19$]. However, a significant increase in the levels of H3R2^{me2s}, a histone mark associated with gene expression, was observed in the mPFC of female mice exposed to impoverished housing compared with standard reared females, particularly at the upstream region of the TSS [$t(8) = 2.38, p < 0.05$], but not at downstream the TSS [$t(8) = 1.60, p = 0.14$].

4. Discussion

In this study, we investigated the effects of childhood poverty on RA processing by using a mouse model of impoverished housing exposure during early infancy. Consistent with previous studies of early life adversity (31), impoverished housing led to reduced body weight of pups and altered maternal care across the first 9 days of the postnatal period. Furthermore, being raised in an impoverished environment resulted in altered behavioral and molecular phenotypes during adolescence, with distinguishable effects between sexes. Specifically, anxiety-like behaviors and increased HPA axis responsivity were observed only in female mice exposed to impoverished housing, as well as reduced RA processing when these animals were seeking for a reward (PORT), or in the absence of it (EPM). These patterns of behavioral alterations were associated with higher *Crf1* gene expression in the mPFC, which correlated with an euchromatin state at the proximal promoter region of the *Crf1* gene, exhibited as higher levels of the histone mark H3R2^{me2s}. Together, these results revealed that childhood poverty-related cognitive impairments could be extended to the acquisition of environmental information in potentially dangerous situations, and that the *Crf1* gene has an important role on the relationship between childhood poverty and altered RA processing.

Children raised in poor environments frequently expose themselves to adverse life events regardless of the long-term negative consequences, potentially due to altered risk-assessment (RA) and greater difficulties in the processing of gains and losses. These consequences are suggested to prime such vulnerable population for the development of impulsive and addictive disorders during adolescence. However, because very few preclinical studies have analyzed such association, the underlying molecular mechanisms remain unclear. Human studies simulating real-life risky decisions have showed that neuropsychiatric patients present patterns of impulsive behaviors due to the difficulties in delaying gratification, and impaired perception of risks and benefits in a set of actions (34). These concepts have been extensively explored in the context of addiction disorders (14, 35, 36), since a lack of RA and inhibition dysfunction suggest that chronic drug users have less self-control, which is needed to inhibit the hedonic impulse to repeatedly take the rewarding drug, regardless of potentially long-term negative consequences. Indeed, there is a well-documented link between low socioeconomic status in early life and adolescent substance abuse (37, 38), while recent evidence also demonstrated that altered

decision-making is a consequence of childhood poverty (6). In our set of experiments, mice had to gather environmental information about the possible presence of a predator, while being tempted to drive in a reward-related behavior. Therefore, risk-prone animals would present less latency to get the rewarding stimulus in such high-risk scenario, disregarding that a predator may be, or has recently been, nearby. We observed such behavioral pattern in female mice exposed to impoverished housing during early life, suggesting that early adversity contributes to higher levels of impulsivity and a lack of RA processing in reward-related conditions. This was supported by the findings of decreased exploration of the central compartment of the PORT, reduced HPA axis responsivity facing this high-risk scenario, as well as by lower frequency of RA-related behaviors in the EPM.

Interestingly, female mice exposed to childhood poverty presented higher anxiety-related behaviors exhibited as decreased exploration of the open arms in the EPM. This is in agreement with previous findings showing that early life adversity is associated with anxiety phenotypes in both female and male rodents within adolescence (39). Therefore, it could be expected that this anxiety trait would be associated with a less risky strategy in the PORT test, but we observed exactly the opposite in the female mice raised under impoverished conditions. One possibility is that the decreased activity of the stress-response network with its associated anxiety resulted from higher incentive salience as an adaptive coping mechanism in the PORT task, given that stressful conditions, such as predator odour exposure, have been proposed to induce incentive salience toward rewarding stimuli (40). This is supported by evidence showing that uncertainty enhance attraction towards reward cues, particularly among high anxiety animals (41), and that early life adversity was associated with higher levels of incentive salience (42). A second possibility is the link between intolerance of uncertainty and maladaptive behaviors such as impulsive decision-making. Intolerance of uncertainty is defined as a bias to interpret and react negatively to ambiguous situations (43). Fear of uncertain events has been associated with heightened psychological reactivity and amplified startle responses (44), which could be interpreted in our experiments as a reduction in the latency to collect the reward and less exploration of the center chamber in the PORT test. Therefore, in line with the ideas of enhanced incentive salience and intolerance to uncertainty, the present study indicated the development of a putative anxiety-like state associated with impulsivity and lack of RA processing in female mice exposed to childhood poverty. This is important since evidence suggests that intolerance of

uncertainty and altered incentive salience may promote impulsive and risk-prone behaviors, as well as increasing the vulnerability for the development of anxiety disorders, substance addiction, and the comorbidity between these conditions (44, 45).

Moreover, males and females differ in how they cope with risk. Females are more risk-averse, more influenced by available contingencies and more responsive to changes in their current environment than males, which are more risk-prone (46). For instance, a study that repeatedly exposed rodents to predator odour found that females only started to display high levels of exploratory behavior after repeated exposures to this adverse olfactory stimulus, when the risk had relatively diminished (47). Thus, the female-specific impoverished housing effect in the PORT task highlights that childhood poverty only affected the more responsive sex to risky situations. In this sense, our results corroborated with the idea that sex may play a significant role in determining the effects of early life adversity on behavioral outcomes (48), and that such differences could be attributed to sex-differences in the neurobiological basis underlying RA processing.

The primary role of the CRF system is to activate the HPA axis (49). In parallel, CRF neurons are found in extrahypothalamic areas, including the mPFC, and there they are suggested to have a significant role in cognitive processes (50). While extensive evidence demonstrated a critical role for CRF-CRFR1 system on behavioral adaptation to stress (51), few studies explored the role of CRFR1 regarding cognitive function, including the decision-making processes (19). Our molecular experiments revealed that females exposed to impoverished housing had significant higher mRNA levels of *Crfr1* in the mPFC than standard reared females and male animals following the PORT test. Furthermore, a negative association between *Crfr1* mRNA levels and RA processing was observed among female, but not male mice. Although we did not detect differences in *Crfr* mRNA levels, these results suggested that the CRF-CRFR1 system has an important role in how the female brain is engaged in the acquisition of environmental information in potentially dangerous situations, particularly when a cost-analysis is required. In fact, while we observed such effect in the mPFC, a previous study also documented that higher *Crfr1* expression in the amygdala was negatively correlated with judgment and decision-making processes specifically in female rodents (19). Therefore, future studies that experimentally block the CRFR1 will help to identify the exact role that CRFR1 signaling has on the PORT task and RA processing. This should be promising since previous studies documented that the systemic

administration of a CRFR1 antagonist enhanced optimal decision-making only in female rodents (19), while intra-mPFC CRFR1 blockage reversed stress-induced cognitive and executive impairments (20).

Our results also demonstrated that childhood poverty in female mice was associated with decreased *Crf* expression in the mPFC throughout development, and only following the PORT test enhanced gene expression was observed. This dynamic change in gene transcription could be potentially associated with epigenetic priming mechanisms, as previously documented regarding *Crf* expression. For instance, maternal deprivation induced DNA demethylation of the *Crf* gene promoter in the hypothalamus (52). However, this change in methylation is not reflected in altered levels of *Crf* expression until the animals are subject to acute stress, upon which *Crf* is significantly upregulated. We showed that following the PORT task female mice exposed to impoverished housing had higher levels of the histone mark H3R2^{me2s}, particularly in the region upstream the TSS of the *Crf* gene. The deposition of the histone modification H3R2^{me2s} leads to a poised euchromatin structure that is essentially associated transcriptional activation (53), which corroborates our finding of higher mRNA levels in the mPFC following the PORT test. Moreover, it has been recently reported that the H3R2^{me2s} mark is mostly detected on the -1 nucleosome relative to the TSS, where it has an important role in preventing other nucleosomes from assembling in the surrounding promoter region (53). Therefore, previous genome-wide data mapped the presence of this mark at specific euchromatic promoters, which are expressed in response to cell differentiation, cell-cycle processes or stress signals. These findings raise the possibility that the presence of predatory olfactory cues could be a stress signal that results in the accumulation of the H3R2^{me2s} mark at the promoter of the *Crf* gene, acting as a mechanism to prime an euchromatin state in response to experience (23), regulating gene expression in females exposed to impoverished housing within the PORT test. Furthermore, given the key role that 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) has on the deposition of the histone mark H3R2^{me2s} during behavioral adaptation (54), it would be interesting to investigate whether such DNA modification has also a role on the relationship between childhood poverty and altered RA processing. This idea is supported by recent findings that demonstrated higher 5hmC levels at neocortical glutamatergic gene promoters of mice exposed to early life adversity (55).

Although accumulating evidence implicates the dopaminergic system in RA processing (56), decision-making (19), and the performance of rodents in the PORT task (57), we did not

find any effects of childhood poverty on *Drd1* or *Drd2* expression in the mPFC. This is contrary to a previous study that documented altered *Drd1* and *Drd2* signaling in the mPFC of adolescent rodents caused by early life adversity (58). However, the postnatal stress model adopted in that study was the maternal separation, which is a stress model with fundamental differences regarding reduced nesting material and impoverished housing exposure during early infancy (48). Given that we did not investigate protein levels of dopamine receptors, neither the levels of synaptic dopamine release, we cannot rule out that the cortical dopaminergic system has a potential role in the relationship between childhood poverty and altered RA processing.

In conclusion, these findings indicate a potent effect of early life poverty on RA in adolescent female mice, which could be detrimental for cognitive performance in potentially dangerous situations, and suggest that the epigenetic priming of the *Crf1* gene may represent a critical factor mediating the relationship between early life stress and altered cognitive processing later in life in females. Furthermore, our observations supports previous evidence suggesting that *Crf1* is critically involved in the regulation of behavioral and neuroendocrine stress-related phenotypes by epigenetic mechanisms (59), but also offers new evidence regarding the role of the histone mark H3R2^{me2s} on the regulation of euchromatin states specifically at the promoter region of the *Crf1* gene. Given that the mPFC has a protracted development that continues throughout adolescence (60), our results highlight that this brain region and its associated cognitive functions are increasingly vulnerable to the effects of early life adversity, and that females appear to be more sensitive to the consequences of being raised in an impoverished environment.

Figures

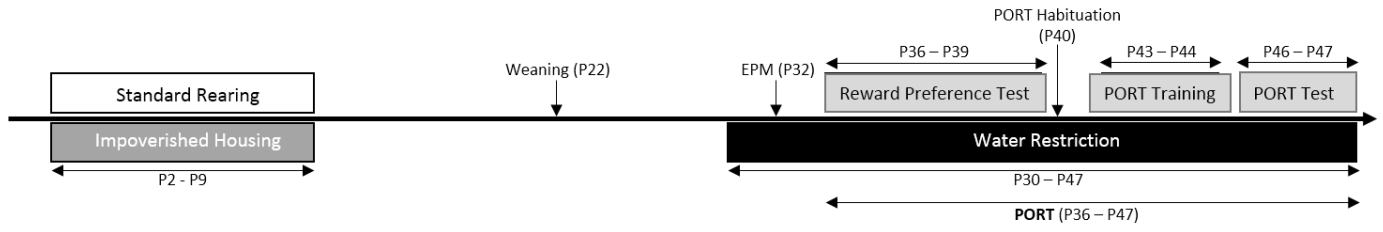


Figure 1.
Experimental design. EPM, elevated plus-maze. PORT, predator-odour risk-taking task.

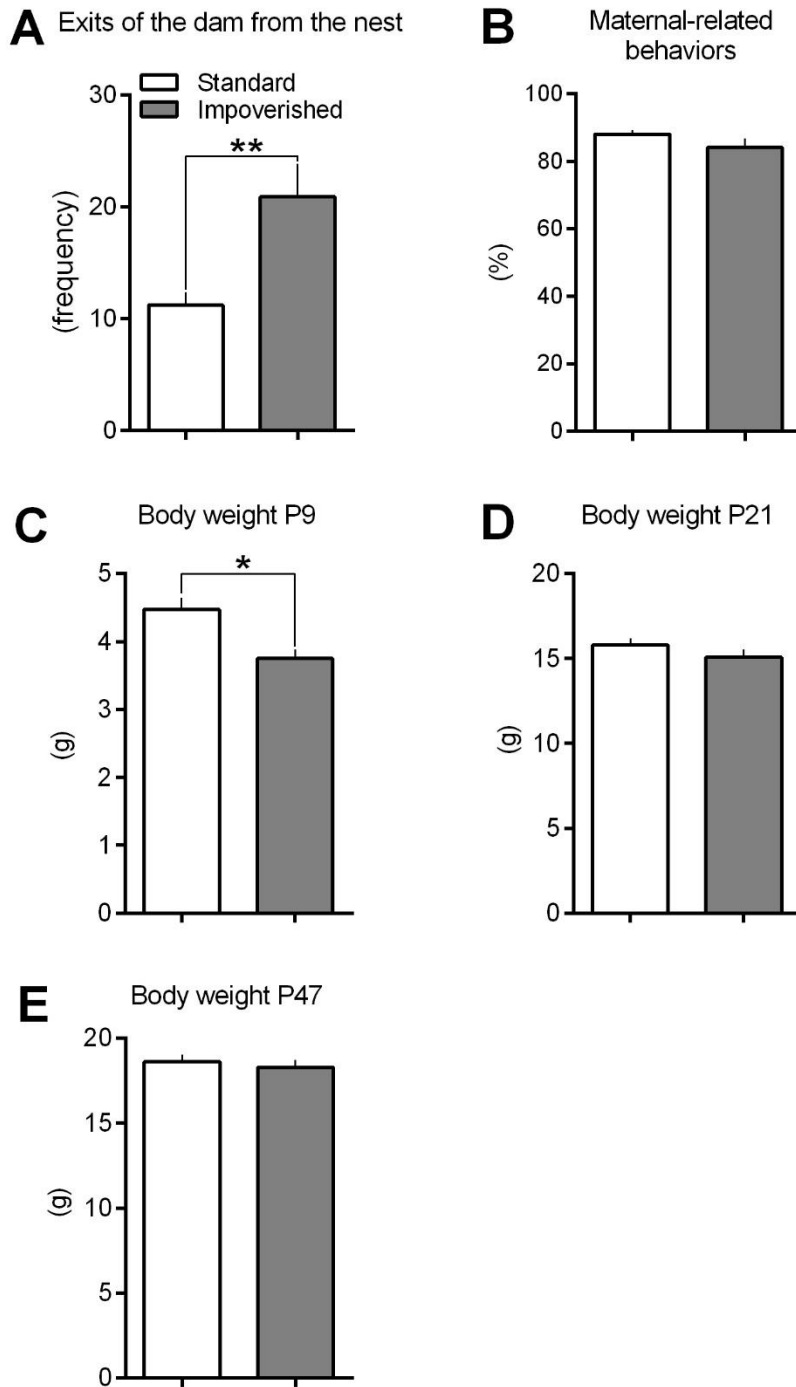


Figure 2. Maternal behavior and body weight comparisons between impoverished housing and standard reared groups. A, frequency of the exits of the dam from the nest. B, percentage of maternal-related behaviors. C, body weight at P9 in grams. D, body weight at P30 in grams. E, body weight at P40 in grams. **, $p < 0.01$.

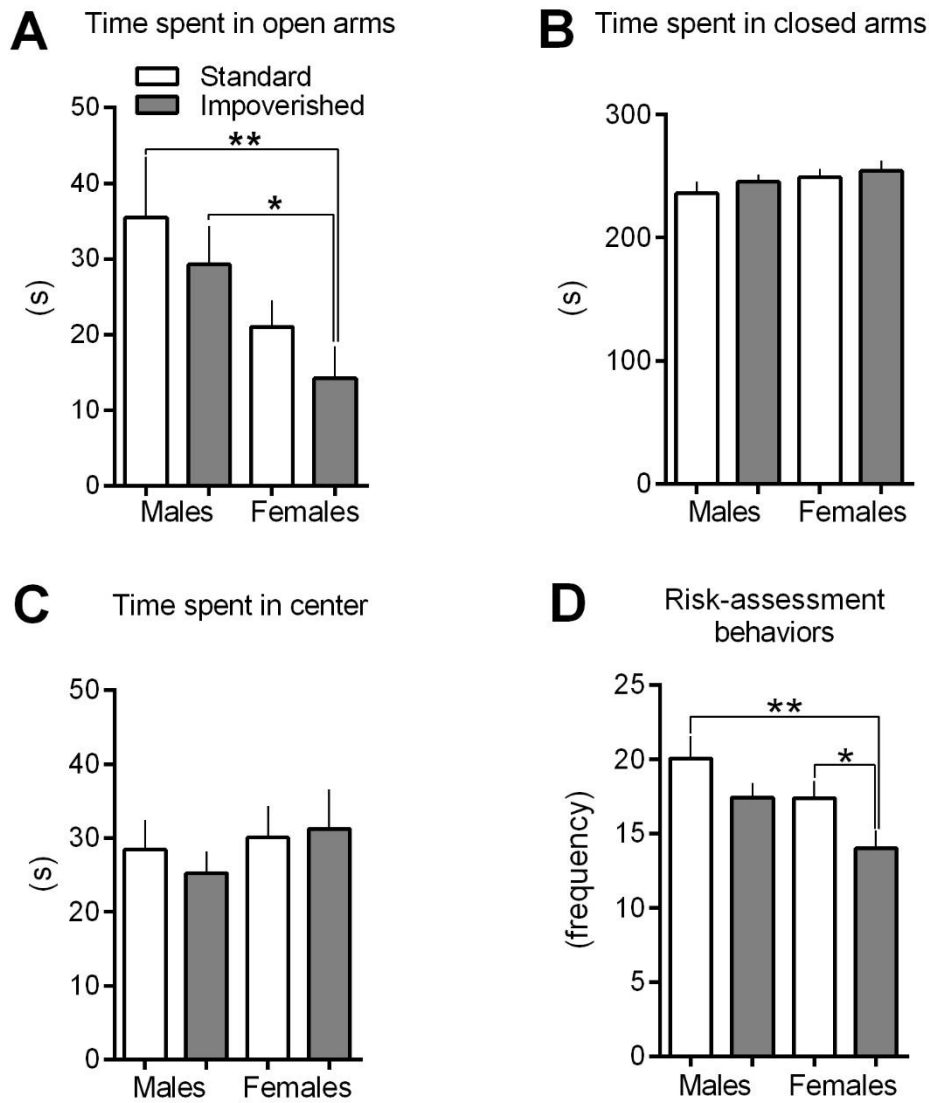


Figure 3. Between-group comparisons regarding the parameters of the EPM. A, time spent in open arms. B, time spent in closed arms. C, time spent in center area. D, frequency of RA behaviors. *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$.

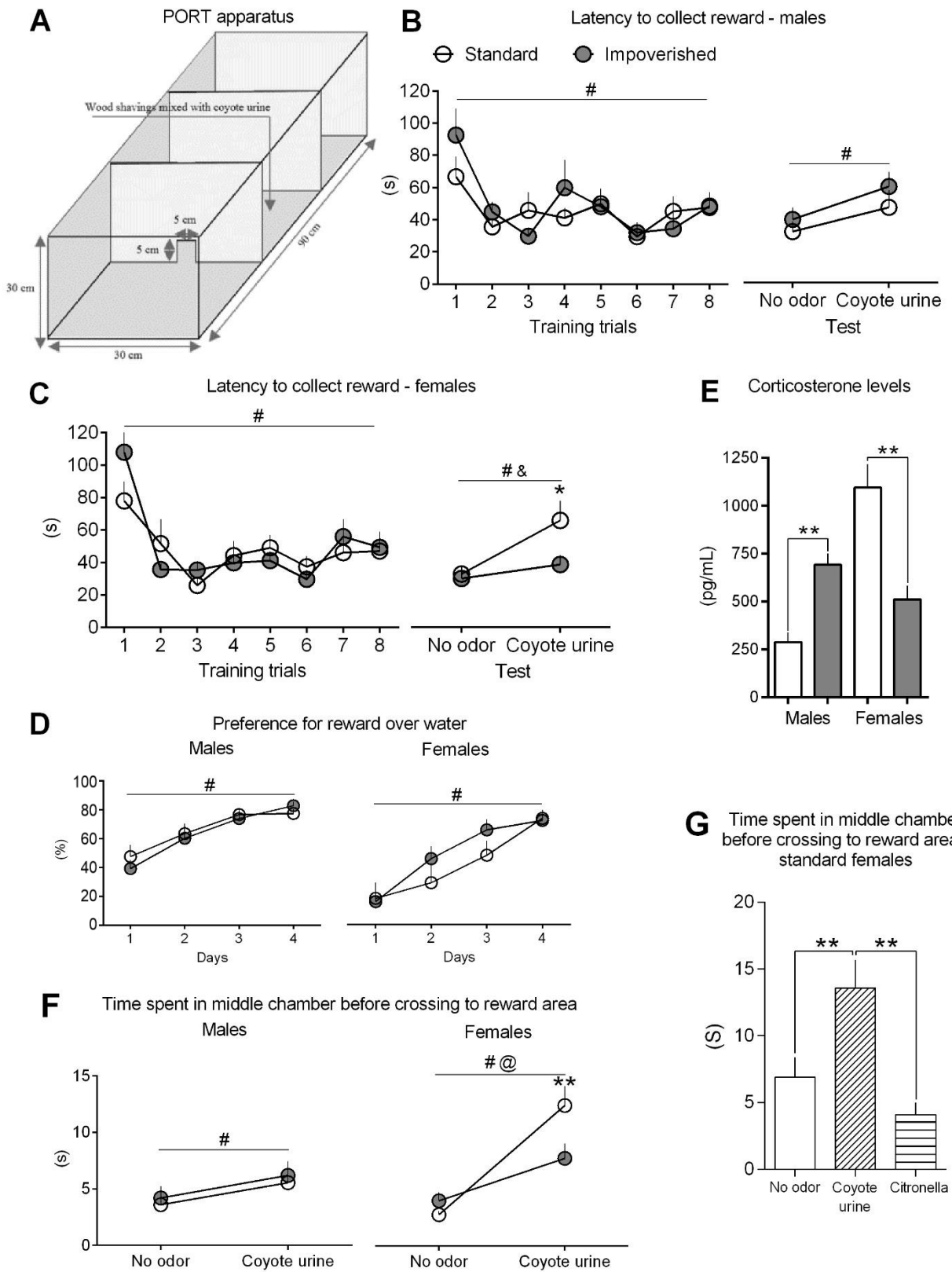


Figure 4.

Between-group comparisons regarding the parameters of the PORT. A, illustration of the PORT apparatus. B, latency to collect the reward among male mice. C, latency to collect the reward among female mice. D, time spent in the center compartment of the PORT among male mice. E, time spent in the center compartment of the PORT among female mice. F, reward preference tests. G, blood levels of CORT 30 minutes following the PORT test with coyote urine. H, time spent in the center compartment of the PORT among standard reared female mice. #, condition (trial) effect in the ANOVA. &, group effect in the ANOVA. @, condition per group interaction effect in the ANOVA. *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$.

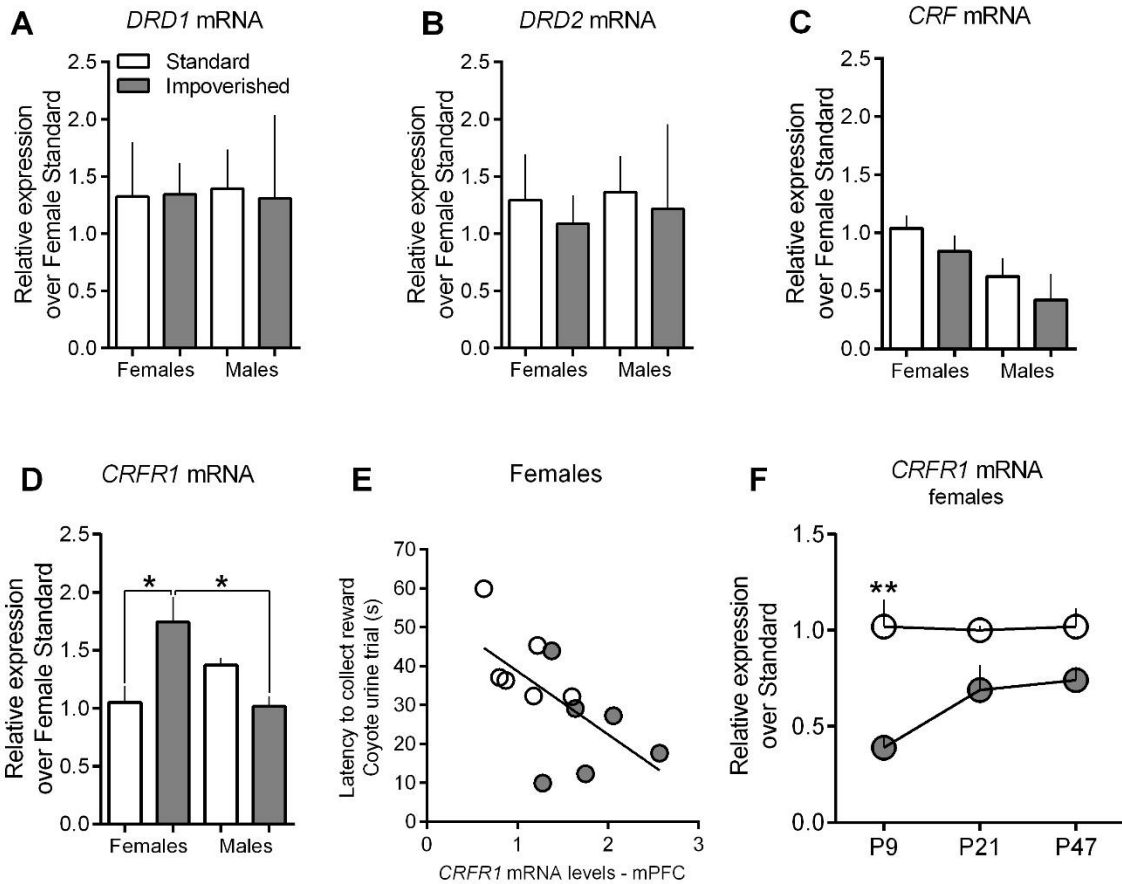


Figure 5.

Between-group comparisons regarding gene expression analysis in the mPFC 3 hours following the PORT test with coyote urine. A, *Drd1* mRNA levels. B, *Drd2* mRNA levels. C, *Crf* mRNA levels. D, *Crfr1* mRNA levels. E, Pearson's correlation between *Crfr1* mRNA levels and the latency to collect the reward in the coyote urine test among female mice. *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$.

A *Crf1* gene proximal promoter region

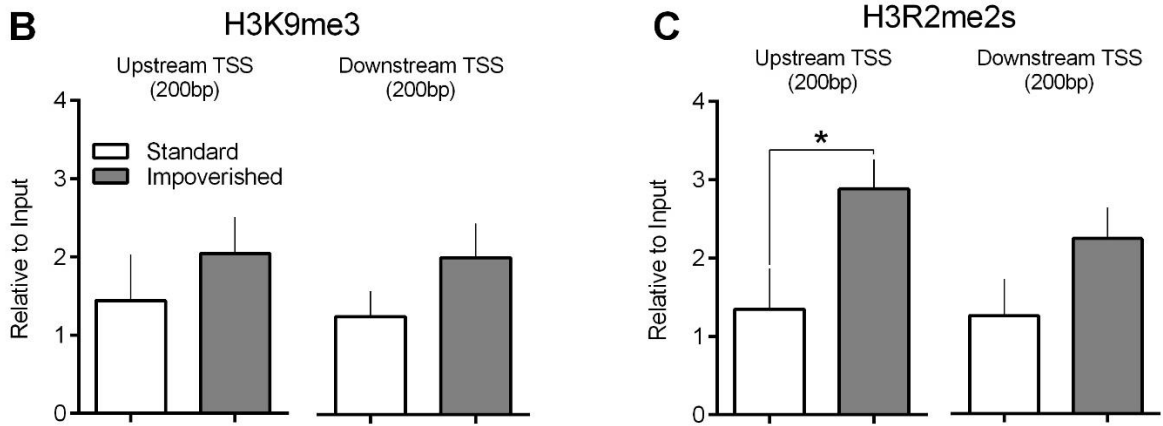
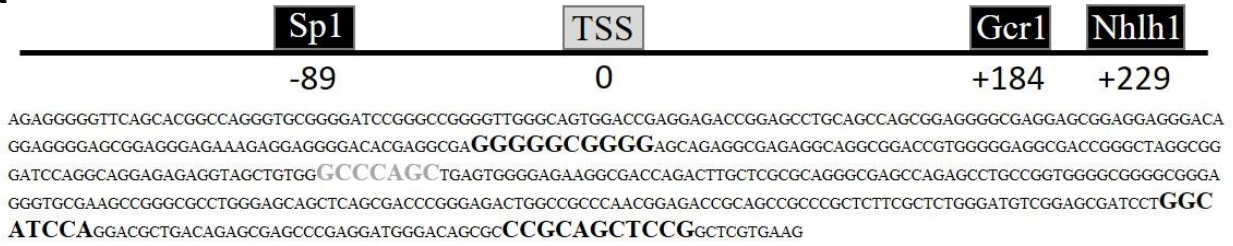


Figure 6. Between-group comparisons among female mice regarding histone modification analysis at the promoter region of the *Crf1* gene, in the mPFC 3 hours following the PORT test with coyote urine. A, proximal promoter region of the *Crf1* gene upstream (200bp) and downstream (200bp) the transcription start site, including the binding motifs for transcription factors, such as Sp1, Grc1 and Nhlh1. B, H3K9me3 levels at the promoter region. C, H3R2me2s levels at the promoter region. *, $p < 0.05$.

References

1. Wilkinson RG. Socioeconomic determinants of health. Health inequalities: relative or absolute material standards? *BMJ*. 1997;314(7080):591-5.
2. Katz SJ, Hofer TP. Socioeconomic disparities in preventive care persist despite universal coverage. Breast and cervical cancer screening in Ontario and the United States. *JAMA*. 1994;272(7):530-4.
3. Lessard LN, Alcalá E, Capitman JA. Pollution, Poverty, and Potentially Preventable Childhood Morbidity in Central California. *J Pediatr*. 2016;168:198-204.
4. Mendenhall E, Kohrt BA, Norris SA, Ndeti D, Prabhakaran D. Non-communicable disease syndemics: poverty, depression, and diabetes among low-income populations. *Lancet*. 2017;389(10072):951-63.
5. Mani A, Mullainathan S, Shafir E, Zhao J. Poverty impedes cognitive function. *Science*. 2013;341(6149):976-80.
6. Ursache A, Raver CC. Iowa Gambling Task Performance and Executive Function Predict Low-income Urban Preadolescents' Risky Behaviors. *Pers Individ Dif*. 2015;79:1-6.
7. Umeda M, Oshio T, Fujii M. The impact of the experience of childhood poverty on adult health-risk behaviors in Japan: a mediation analysis. *Int J Equity Health*. 2015;14:145.
8. Reis FM, Albrechet-Souza L, Franci CR, Brandão ML. Risk assessment behaviors associated with corticosterone trigger the defense reaction to social isolation in rats: role of the anterior cingulate cortex. *Stress*. 2012;15(3):318-28.
9. Bradley RH, Corwyn RF. Socioeconomic status and child development. *Annu Rev Psychol*. 2002;53:371-99.
10. Hair NL, Hanson JL, Wolfe BL, Pollak SD. Association of Child Poverty, Brain Development, and Academic Achievement. *JAMA Pediatr*. 2015;169(9):822-9.
11. Noble KG, Norman MF, Farah MJ. Neurocognitive correlates of socioeconomic status in kindergarten children. *Dev Sci*. 2005;8(1):74-87.
12. Bickel WK, Snider SE, Quisenberry AJ, Stein JS, Hanlon CA. Competing neurobehavioral decision systems theory of cocaine addiction: From mechanisms to therapeutic opportunities. *Prog Brain Res*. 2016;223:269-93.

13. Schall JD. Neural basis of deciding, choosing and acting. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(1):33-42.
14. Crowley TJ, Dalwani MS, Sakai JT, Raymond KM, McWilliams SK, Banich MT, et al. Children's brain activation during risky decision-making: A contributor to substance problems? *Drug Alcohol Depend.* 2017;178:57-65.
15. Jenni NL, Larkin JD, Floresco SB. Prefrontal Dopamine D1 and D2 Receptors Regulate Dissociable Aspects of Decision Making via Distinct Ventral Striatal and Amygdalar Circuits. *J Neurosci.* 2017;37(26):6200-13.
16. Sonntag KC, Brenhouse HC, Freund N, Thompson BS, Puhl M, Andersen SL. Viral over-expression of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex increase high-risk behaviors in adults: comparison with adolescents. *Psychopharmacology (Berl).* 2014;231(8):1615-26.
17. Guillaume S, Perroud N, Jollant F, Jaussent I, Olié E, Malafosse A, et al. HPA axis genes may modulate the effect of childhood adversities on decision-making in suicide attempters. *J Psychiatr Res.* 2013;47(2):259-65.
18. Viola TW, Wearick-Silva LE, De Azeredo LA, Centeno-Silva A, Murphy C, Marshall P, et al. Increased cocaine-induced conditioned place preference during periadolescence in maternally separated male BALB/c mice: the role of cortical BDNF, microRNA-212, and MeCP2. *Psychopharmacology (Berl).* 2016;233(17):3279-88.
19. Georgiou P, Zanos P, Bhat S, Tracy JK, Merchenthaler IJ, McCarthy MM, et al. Dopamine and Stress System Modulation of Sex Differences in Decision Making. *Neuropsychopharmacology.* 2017.
20. Uribe-Mariño A, Gassen NC, Wiesbeck MF, Balsevich G, Santarelli S, Solfrank B, et al. Prefrontal Cortex Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1 Conveys Acute Stress-Induced Executive Dysfunction. *Biol Psychiatry.* 2016;80(10):743-53.
21. Schreiber AL, Lu YL, Baynes BB, Richardson HN, Gilpin NW. Corticotropin-releasing factor in ventromedial prefrontal cortex mediates avoidance of a traumatic stress-paired context. *Neuropharmacology.* 2017;113(Pt A):323-30.
22. Takase K, Oda S, Kuroda M, Funato H. Monoaminergic and neuropeptidergic neurons have distinct expression profiles of histone deacetylases. *PLoS One.* 2013;8(3):e58473.
23. Baker-Andresen D, Ratnu VS, Bredy TW. Dynamic DNA methylation: a prime candidate for genomic metaplasticity and behavioral adaptation. *Trends Neurosci.* 2013;36(1):3-13.

24. Stroud H, Su SC, Hrvatin S, Greben AW, Renthall W, Boxer LD, et al. Early-Life Gene Expression in Neurons Modulates Lasting Epigenetic States. *Cell*. 2017;171(5):1151-64.e16.
25. Vialou V, Feng J, Robison AJ, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:59-87.
26. Marshall P, Bredy TW. Cognitive neuroepigenetics: the next evolution in our understanding of the molecular mechanisms underlying learning and memory? *NPJ Sci Learn*. 2016;1.
27. Dent CL, Isles AR, Humby T. Measuring risk-taking in mice: balancing the risk between seeking reward and danger. *Eur J Neurosci*. 2014;39(4):520-30.
28. Ness V, Arning L, Niesert HE, Stüttgen MC, Epplen JT, Beste C. Variations in the GRIN2B gene are associated with risky decision-making. *Neuropharmacology*. 2011;61(5-6):950-6.
29. Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem*. 2007;14(4):268-76.
30. Rice CJ, Sandman CA, Lenjavi MR, Baram TZ. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology*. 2008;149(10):4892-900.
31. Orso R, Wearick-Silva LE, Creutzberg KC, Centeno-Silva A, Glusman Roithmann L, Pazzin R, et al. Maternal behavior of the mouse dam toward pups: implications for maternal separation model of early life stress. *Stress*. 2017:1-9.
32. Wang ME, Fraize NP, Yin L, Yuan RK, Petsagourakis D, Wann EG, et al. Differential roles of the dorsal and ventral hippocampus in predator odor contextual fear conditioning. *Hippocampus*. 2013;23(6):451-66.
33. Liu Y, Formisano L, Savtchouk I, Takayasu Y, Szabó G, Zukin RS, et al. A single fear-inducing stimulus induces a transcription-dependent switch in synaptic AMPAR phenotype. *Nat Neurosci*. 2010;13(2):223-31.
34. Kluwe-Schiavon B, Viola TW, Sanvicente-Vieira B, Malloy-Diniz LF, Grassi-Oliveira R. Balancing Automatic-Controlled Behaviors and Emotional-Salience States: A Dynamic Executive Functioning Hypothesis. *Front Psychol*. 2016;7:2067.
35. Reske M, Stewart JL, Flagan TM, Paulus MP. Attenuated Neural Processing of Risk in Young Adults at Risk for Stimulant Dependence. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127010.

36. Kluwe-Schiavon B, Viola TW, Sanvicente-Vieira B, Pezzi JC, Grassi-Oliveira R. Similarities between adult female crack cocaine users and adolescents in risky decision-making scenarios. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2016;38(7):795-810.
37. Wu S, de Saxe Zerden L, Wu Q. The influence of childhood welfare participation on adulthood substance use: evidence from the National Longitudinal Study of Adolescent to Adult Health. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2016;42(6):657-70.
38. Evans GW, Kim P. Childhood poverty and young adults' allostatic load: the mediating role of childhood cumulative risk exposure. *Psychol Sci*. 2012;23(9):979-83.
39. Salzberg M, Kumar G, Supit L, Jones NC, Morris MJ, Rees S, et al. Early postnatal stress confers enduring vulnerability to limbic epileptogenesis. *Epilepsia*. 2007;48(11):2079-85.
40. Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology*. 2004;145(8):3754-62.
41. Hellberg SN, Levit JD, Robinson MJF. Under the influence: Effects of adolescent ethanol exposure and anxiety on motivation for uncertain gambling-like cues in male and female rats. *Behav Brain Res*. 2018;337:17-33.
42. Hynes TJ, Thomas CS, Zumbusch AS, Samson A, Petriman I, Mrdja U, et al. Early life adversity potentiates expression of addiction-related traits. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017.
43. Garami J, Haber P, Myers CE, Allen MT, Misiak B, Frydecka D, et al. Intolerance of uncertainty in opioid dependency - Relationship with trait anxiety and impulsivity. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181955.
44. Nelson BD, Kessel EM, Jackson F, Hajcak G. The impact of an unpredictable context and intolerance of uncertainty on the electrocortical response to monetary gains and losses. *Cogn Affect Behav Neurosci*. 2016;16(1):153-63.
45. Robinson J, Sareen J, Cox BJ, Bolton J. Self-medication of anxiety disorders with alcohol and drugs: Results from a nationally representative sample. *J Anxiety Disord*. 2009;23(1):38-45.
46. van den Bos R, Jolles J, van der Knaap L, Baars A, de Visser L. Male and female Wistar rats differ in decision-making performance in a rodent version of the Iowa Gambling Task. *Behav Brain Res*. 2012;234(2):375-9.

47. Jolles JW, Boogert NJ, van den Bos R. Sex differences in risk-taking and associative learning in rats. *R Soc Open Sci.* 2015;2(11):150485.
48. Walker CD, Bath KG, Joels M, Korosi A, Larauche M, Lucassen PJ, et al. Chronic early life stress induced by limited bedding and nesting (LBN) material in rodents: critical considerations of methodology, outcomes and translational potential. *Stress.* 2017;20(5):421-48.
49. Vale W, Rivier C, Brown MR, Spiess J, Koob G, Swanson L, et al. Chemical and biological characterization of corticotropin releasing factor. *Recent Prog Horm Res.* 1983;39:245-70.
50. George O, Sanders C, Freiling J, Grigoryan E, Vu S, Allen CD, et al. Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(44):18156-61.
51. Albrechet-Souza L, Viola TW, Grassi-Oliveira R, Miczek KA, de Almeida RMM. Corticotropin Releasing Factor in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in Socially Defeated and Non-stressed Mice with a History of Chronic Alcohol Intake. *Front Pharmacol.* 2017;8:762.
52. Chen J, Evans AN, Liu Y, Honda M, Saavedra JM, Aguilera G. Maternal deprivation in rats is associated with corticotrophin-releasing hormone (CRH) promoter hypomethylation and enhances CRH transcriptional responses to stress in adulthood. *J Neuroendocrinol.* 2012;24(7):1055-64.
53. Migliori V, Müller J, Phalke S, Low D, Bezzi M, Mok WC, et al. Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin maintenance. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(2):136-44.
54. Li X, Wei W, Zhao QY, Widagdo J, Baker-Andresen D, Flavell CR, et al. Neocortical Tet3-mediated accumulation of 5-hydroxymethylcytosine promotes rapid behavioral adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(19):7120-5.
55. Dong E, Tueting P, Matrisciano F, Grayson DR, Guidotti A. Behavioral and molecular neuroepigenetic alterations in prenatally stressed mice: relevance for the study of chromatin remodeling properties of antipsychotic drugs. *Transl Psychiatry.* 2016;6:e711.
56. Morgado P, Marques F, Ribeiro B, Leite-Almeida H, Pêgo JM, Rodrigues AJ, et al. Stress induced risk-aversion is reverted by D2/D3 agonist in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015;25(10):1744-52.

57. Blomeley C, Garau C, Burdakov D. Accumbal D2 cells orchestrate innate risk-avoidance according to orexin signals. *Nat Neurosci.* 2018;21(1):29-32.
58. Brenhouse HC, Lukkes JL, Andersen SL. Early life adversity alters the developmental profiles of addiction-related prefrontal cortex circuitry. *Brain Sci.* 2013;3(1):143-58.
59. Sotnikov SV, Markt PO, Malik V, Chekmareva NY, Naik RR, Sah A, et al. Bidirectional rescue of extreme genetic predispositions to anxiety: impact of CRH receptor 1 as epigenetic plasticity gene in the amygdala. *Transl Psychiatry.* 2014;4:e359.
60. Andersen SL, Teicher MH. Desperately driven and no brakes: developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009;33(4):516-24.

Estudo 2

Title: Acute neuroinflammation elicited by TLR-3 systemic activation exacerbates early life stress induced working memory impairments in male adolescent mice

Authors: Thiago Wendt Viola¹, Luis Eduardo Wearick-Silva¹, Kerstin Creutzberg¹, Érika Kestering¹, Saulo Tractenberg¹, Rodrigo Grassi-Oliveira¹

Affiliations: ¹Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Developmental Cognitive Neuroscience Lab, Porto Alegre, RS, Brazil.

Financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Corresponding author: Rodrigo Grassi-Oliveira

Address: PUCRS, Avenida Ipiranga 6690 – Prédio 63; Jardim Botânico – Porto Alegre, RS, Brasil; Email: rodrigo.grassi@pucrs.br

Abstract

Evidence has implicated Toll-like Receptors (TLRs) in the pathogenesis of cognitive impairment induced by systemic inflammation. Early life stress is associated with altered trajectories of neuroimmune signaling with implications for cognitive development. However, few experimental studies have examined the mechanisms responsible for the impact of TLR-3 activation on early life stress-related cognitive outcomes. This study investigated the effects of maternal deprivation (MD) during childhood and a viral immune challenge during adolescence on working memory performance of mice. Animals exposed to MD were separated from their dams daily for 180-min from postnatal day (PND) 2 to 15. At the PND 45 animals were challenged with a single injection of either Poly (I:C) or sterile saline, and then subjected to a spatial working memory test in a Y-maze apparatus. Gene expression was determined by qPCR. We demonstrated that a single peripheral administration of a TLR-3 agonist can exacerbate MD-induced working memory impairments in adolescent mice. At a molecular level, exposure to MD was associated with lower mRNA levels of *Il6*, *Nfkb1* and *Tlr3* in the medial prefrontal cortex (mPFC). However, when MD animals were exposed to Poly (I:C), a more robust activation of *Il6*, *Nfkb1* and *Tlr3* gene transcription was observed in these mice compared with standard reared animals. Finally, higher mRNA levels of *Nfkb1* in the mPFC was correlated with lower working memory performance, suggesting a role for NF- κ B signaling in the mechanisms underlying poor cognitive functioning induced by early life stress and systemic inflammation produced by viral mimetics.

Key words: Early life stress, Cognition, Working memory, Inflammation, Toll-like receptors, Neuroimmunomodulation.

1. Introduction

Toll-like Receptors (TLRs) are the first line of defense against exogenous and endogenous pathogens and are responsible for triggering innate immune responses (1). These receptors are expressed in a variety of immune cells, while in the brain, they are identified predominantly on microglia, astrocytes, and with limited expression levels on neurons (2). Upon stimulation, TLRs can impact numerous aspects of central nervous system homeostasis by the production of inflammatory mediators, such as cytokines and chemokines, particularly through activation of the transcription factor nuclear factor kappa B (NF- κ B) (3). Therefore, evidence has implicated TLRs in the pathogenesis of cognitive impairment induced by systemic inflammation or brain inflammatory illnesses (4), including Epilepsy, Bacterial Meningitis, Alzheimer's disease (5), but also stress-related neuropsychiatric disorders (6, 7).

Among the family of TLRs, the neuroinflammatory signaling mediated by TLR-2 and TLR-4 have been the most widely investigated, which are receptors that recognize infections of bacterial origin (4). For instance, administration of a TLR-4 agonist that induces peripheral and central inflammation, also results in increased hippocampal amyloid-beta, tumor necrosis factor (TNF)- α , and interleukin (IL)-6 levels with concomitant cognitive deficits in contextual fear-related memory (8, 9), suggesting that TLRs activation can be detrimental to brain functioning during acute inflammatory response. On the other hand, some TLRs are implicated in the recognition of viral infections, such as the TLR-3, TLR-7, TLR-8 and TLR-9. As a sensor for double-stranded RNAs of viral origin, TLR-3 is predominantly expressed intracellularly (10) and recent evidence demonstrated its functions on the regulation of hippocampal glial excitability (11). Although TLRs that respond to bacteria or viral ligands have important differences regarding their immune functions, the majority of evidence suggests that upon activation these receptors have a similar effect on brain functioning, in particular related to hippocampal-dependent spatial memory deficits (4, 12). However, intracerebral infusion of a TLR-3 agonist - Polyinosinic: polycytidylic acid [(Poly (I:C))] into the lateral ventricle was recently shown to induce working memory impairments in mice (13). As a key function of the medial prefrontal cortex (mPFC), working memory is a short-term memory process engaged during active maintenance and manipulation of information in order to guide behavior (14, 15). Despite that, few experimental studies have examined the mechanisms responsible for the impact of TLR-3 activation on mPFC-related cognitive outcomes (11).

Moreover, compelling evidence suggests that the nature and severity of cognitive deficits later in life depend upon many factors involved with brain development processes, including the experiences that occur during the sensitive period of early life (16). Stress exposure in the earliest years of childhood has been related to cognitive impairment including poor working memory performance (17). Beyond behavioral outcomes, early life stress is associated with a chronic inflammatory state (18) and glia cells abnormalities (19), which points out to altered neuroimmune signaling as a candidate pathway for mediating the consequences of postnatal stress on brain and cognitive functioning. For example, persistent higher levels of inflammatory markers in the brain, including TLR-4 and NF- κ B, were detected in adult animals exposed to infant maternal deprivation (MD), which is a well-known experimental model of early life stress (20). In addition, NF- κ B gene expression was upregulated in the mPFC of adolescent mice exposed to early life adversity, and this effect was associated with higher levels of cocaine-contextual memory (21).

Given the potential relationship between early life stress, altered cognitive functioning and TLR-3 mediated neuroinflammation, the current study investigated the effects of maternal care deprivation during childhood and a viral immune challenge during adolescence on the working memory performance of mice. The cumulative effect of both factors was also assessed at the molecular level in the mPFC, since mRNA levels of NF- κ B, IL-6, TNF- α and TLR-3 were measured following TLR-3 systemic activation or following saline administration. Considering that early life stress *per se* is associated with cognitive impairments, we hypothesized that Poly (I:C) administration would enhance stress-mediated working memory deficits as a immunological “second hit”, and that differential expression of the immune-related genes would be correlated with cognitive outcomes upon TLR-3 stimulation.

2. Methods

2.1. Animals

This study was performed with male BALB/c mice. All animals were housed under a 12 h/12 h light–dark cycle in ventilated cages with temperature maintained at 21 ± 1 °C. Food and water were available ad libitum. The experiments were conducted in accordance with the NIH laboratory animal care guidelines and approved by the Ethical Committee on the Use of Animals of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil.

2.2. Infant maternal care deprivation model

The early life stress model consists of exposing infant animals to daily episodes of maternal care deprivation during the first days of life. Thus, pregnant females were visually checked daily for the presence of pups. On the day of birth, the litters were randomly assigned to one of two groups: MD or animal facility rearing (AFR) control animals. The AFR litters were left undisturbed until weaning, except for cage cleaning at postnatal day (PND) 10. The MD litters were subjected to a procedure that was used in previous studies with BALB/c mice (21, 22). In this procedure, pups were separated from their dams daily for 180 min (15:00–18:00), from PND 2 to PND 15. To do this, first, the dam was transferred to another cage. Then, the whole litter was transferred to another clean cage with bedding material and placed in another room, to prevent vocal communication between the dam and pups. The temperature of pups' cage (33 ± 2 °C) was controlled using a digital heating pad placed under the cage to compensate for the dams' body heat. After the maternal care deprivation period, the pups were returned to their home cage, followed by the dam. All pups were weaned at PND 21 and remained together with their same-sex littermates (two or three animals per cage) under standard housing conditions.

2.3. Working memory test

At the PND 45 animals were subjected to a spatial working memory test in a black Plexiglas Y-maze apparatus (23). The Y-maze apparatus consists of three symmetrical arms (30 cm x 5 cm x 10 cm, each arm) and it uses the natural tendency of mice to explore novel over familiar arms. This working memory test consisted of two phases, called the sample and test phases. The allocation of arms (start, familiar and novel arm) to a specific spatial location was counterbalanced across the experimental groups.

In the sample phase, animals were allowed to explore two arms (referred to as 'start arm' and 'familiar arm'), while the access to the remaining arm ('novel arm') was obstructed by a removable barrier wall. To begin a trial, the animal was introduced at the end of the start arm and was allowed to freely explore both the start and the familiar arms. After 5 minutes of exploration, the animal was removed from the apparatus and kept in a holding cage for 1 minute, while the barrier wall was removed.

In the test phase, the animal was reintroduced to the maze and could freely explore all arms of the maze for 2 min. After the test, the animal was removed from the apparatus and placed back in their home cage. The wood shavings that covered the floor of the apparatus was changed in preparation for the next animal. On each trial, the time spent in each of the three arms was recorded. The relative time spent in the novel arm during the choice phase was calculated by the formula $[\text{time spent in the novel arm}/[\text{time spent in all arms}]] \times 100$ and used as the index for working memory performance. In addition, total distance moved on the entire maze was recorded and analyzed in order to assess general locomotor activity.

2.4. TLR-3 agonist administration

Poly (I:C) was used to mimic the acute phase of a viral infection, and it was prepared for injection by re-suspension in sterile saline and administered at a dose of 7.5 mg/kg (i.p.). This mild to moderate dose was chosen based on previous studies showing that this concentration of the TLR-3 agonist could induce behavioral and cognitive alterations in mice (24-26). Therefore, experimental groups were challenged with a single injection of either Poly I:C or sterile saline at PND 45.

2.5. Gene expression analysis

Six hours after the Poly (I:C) or saline injection animals were euthanized. We selected this time point since previous evidence indicated enhanced gene expression of brain pro-inflammatory genes after 6hrs of Poly (I:C) administration (26). The tissue from the mPFC was rapidly hand-dissected with a scalpel and stored at -80°C until molecular analysis. Total RNA was isolated from 6 samples per group using QIAzol (Qiagen; Hilden, Germany) and chloroform standard protocols. RNA concentration was measured using the NanoDrop spectrophotometer. Total of 500 ng of RNA from each sample was reverse transcribed using the miScript II RT Kit (Qiagen). The following primers (IDT) were designed, tested and used: *Il6* Forward (CCCCAATTTCCAATGCTCTCC), *Il6* Reverse (GACCACAGTGAGGAATGTCCA), *Tnf* Forward (CCTGTAGCCCACGTCGTAG), *Tnf* Reverse (GGGAGTAGACAAGGTACAACCC), *Tlr3* Forward (GTGAGATACAACGTAGCTGACTG), *Tlr3* Reverse (TCCTGCATCCAAGATAGCAAGT), *Pgk* Forward (TGCACGCTTCAAAAGCGCACG), *Pgk* Reverse (AAGTCCACCCTCATCACGACCC). The Quantitect primer (QT00154091) for *Nfkb1*

was purchased from Qiagen. Each SYBR Green PCR reaction was run in duplicate for each sample using a Rotor Gene Real-Time PCR machine (Qiagen). The fold change relative expression was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method with the AFR-vehicle group as a reference. PGK ct values were used as endogenous control for mRNA analysis. To verify primer specificities, melting curve analyses and agarose gels were performed.

2.6. Statistical Analysis

Group differences were assessed by two-way ANOVAs (group and treatment effects). The ANOVAs were followed by Tukey post-hoc tests. Pearson's correlation analysis was used to evaluate the association between behavioral and gene expression data. Statistical significance was defined as $p < 0.05$ and results are expressed as the mean \pm SEM.

3. Results

3.1. Effects of early life stress and TLR-3 activation on working memory performance

The experimental design of the study is illustrated in figure 1A. Significant group [$F(3,39) = 4.58, p < 0.05$] and treatment [$F(3,39) = 4.69, p < 0.05$] effects were detected on the performance of mice in the Y-maze, showing that both MD and Poly (I:C) exposure reduced the percentage of time exploring the novel arm during testing (Figure 1B). Post-hoc analysis revealed that only animals exposed to both MD and to Poly (I:C) presented significant less working memory performance compared with AFR-vehicle group ($p < 0.05$). These results demonstrated that MD-induced working memory impairments are exacerbated by Poly (I:C) systemic administration.

A significant treatment [$F(3,39) = 5.49, p < 0.05$] effect was observed on the distance traveled by mice during the working memory test, showing that Poly (I:C) administration reduced locomotor activity. However, exposure to MD did not affect locomotor activity given that no group [$F(3,39) = 0.14, p > 0.05$] differences were observed (Figure 1C).

3.2. Effects of early life stress and TLR-3 activation on gene expression levels

Significant group [$F(3,20) = 12.89, p < 0.01$] and treatment [$F(3,20) = 36.06, p < 0.01$] effects were detected on mRNA levels of *Tlr3*, showing that while MD exposure reduced, Poly (I:C) exposure increased *Tlr3* expression in the mPFC. Post-hoc analysis revealed the MD-

vehicle group had significant less *Tlr3* expression compared with the AFR-vehicle group ($p < 0.05$). In addition, the AFR-Poly (I:C) group ($p < 0.01$) and the MD-Poly (I:C) group ($p < 0.01$) had significant higher *Tlr3* expression compared with the MD-vehicle condition (Figure 2A).

A significant treatment [$F(3,20) = 26.75, p < 0.01$] effect was observed on mRNA levels of *Il6*, showing that Poly (I:C) exposure increased *Il6* expression in the mPFC, while no group differences were detected [$F(3,20) = 0.50, p > 0.05$]. However, post-hoc analysis revealed that only animals exposed to both MD and to Poly (I:C) presented significant higher *Il6* expression compared with the MD-vehicle group ($p < 0.05$), while no significant differences were detected regarding AFR groups (Figure 2B). No significant treatment [$F(3,20) = 0.28, p > 0.05$] or group [$F(3,20) = 2.84, p > 0.05$] effects were detected regarding mRNA levels of *Tnf- α* (Figure 2C).

A significant treatment [$F(3,20) = 11.48, p < 0.01$] effect was observed on mRNA levels of *Nfkb1*, showing that Poly (I:C) exposure increased *Nfkb1* expression in the mPFC, while no group differences were detected [$F(3,20) = 2.71, p > 0.05$]. However, post-hoc analysis revealed that only animals exposed to both MD and to Poly (I:C) presented significant higher *Nfkb1* expression compared with the MD-vehicle group ($p < 0.01$), while no significant differences were detected regarding AFR groups (Figure 2D).

These results demonstrated that MD and Poly (I:C) had opposite effects on gene expression levels of *Tlr3*, *Il6* and *Nfkb1*. In basal conditions, MD exposure was associated with lower mRNA levels of these genes in the mPFC. However, when stressed animals were exposed to Poly (I:C), a more robust activation of gene transcription was observed in animals exposed to MD compared with standard reared mice. Moreover, correlation analysis revealed a significant negative association between *Nfkb1* gene expression and the percentage of time exploring the novel arm during the Y-maze test ($R^2 = 0.20; p < 0.05$), showing that higher mRNA levels of *Nfkb1* in the mPFC was associated a lower working memory performance (Figure 2E).

4. Discussion

Exposure to stressful experiences during childhood, such as abuse and neglect, is associated with altered trajectories of brain and cognitive development (27). Structural and functional cortical modifications in line with deficits in cognitive processes such as executive functions (17), behavioral inhibition (28), and working memory (29), have been robustly documented in individuals with histories of early life adversity. Pre-clinical studies have explored

the molecular underpinnings of the cognitive phenotype produced by early life stress, and most of the studies have focused on the role of altered neurotransmission and neuroplasticity (30, 31), as well as the consequences of overactivation of the neuroendocrine system (32). Taking into account the relevant data that childhood stress could also affect the neuroimmune response (18), combined with the idea that systemic inflammation leads to activation of brain neuroimmune response (33), the current study provided evidence that a single peripheral administration of a TLR-3 agonist can modulate and exacerbate early life stress induced working memory impairments in adolescent mice. At a molecular level, we have identified that early life stress and Poly (I:C) had opposite effects on gene expression of neuroinflammatory markers IL-6 and NF- κ B, as well as concerning TLR-3 expression. In particular, exposure to maternal care deprivation was associated with lower mRNA levels of these genes in the mPFC. However, when maternally deprived animals were exposed to Poly (I:C) during adolescence, a more robust activation of *Ilf6*, *Nfkb1* and *Tlr3* gene transcription was observed in these mice compared with standard reared animals. Finally, higher mRNA levels of *Nfkb1* in the mPFC was correlated with lower working memory performance, suggesting a role for NF- κ B signaling in the mechanisms underlying poor cognitive functioning induced by early life stress and systemic inflammation produced by viral mimetics.

Our behavioral results are consistent with previous findings showing that either early life stress (29) or acute inflammation (13) could produce cognitive deficits that include working memory performance. Specifically, we demonstrated that only following a viral immune challenge the MD effect on cognition reached statistical significance in comparison to normally reared animals without acute inflammation. Therefore, these data support the hypothesis that an immunological “second hit” could not only aggravate the effects of postnatal stress on working memory, but it could also be a pathological trigger for cognitive decline in vulnerable individuals due to postnatal stress exposure (34). This combinatory effect has already been documented regarding viral diseases, such as HIV infection, given that HIV induced neurocognitive impairments are more pronounced in individuals with histories of early life stress (35), particularly on cognitive flexibility and working memory processes (36).

Although there is little information on brain and behavioral responses to TLR-3 *in vivo*, previous evidence demonstrated that direct activation of TLR-3 by intracerebroventricular infusion of Poly (I:C) impaired working memory (13), and that TLR-3 signaling can suppress

neuronal plasticity and induce neuroglial immune responses by driving gene expression of pro-inflammatory cytokines (11). In our experiments we observed increased mRNA levels of *Il6*, *Nfkb1* and *Tlr3* in the mPFC after 6 hours of a single injection of Poly (I:C) in a mild to moderate dose. Although we did not provide direct evidence of cellular specificity, it is possible that our gene expression data is closely involved with the response of glia cells, taking into account previous findings showing that astrocytes and microglia cells express TLR-3, and that these cells can synthesize pro-inflammatory cytokines in response to Poly (I:C) stimulation (37). Furthermore, when cortical glia cells are activated upon TLRs stimulation, the neuroinflammatory toxicity can be extended to primary cortical neurons, an effect that has been shown to be involved with cognitive impairment (11). For instance, activated microglia cells produce IL-6, IL-1 β , and TNF- α , and when these cytokines are released extracellularly they directly affect synaptic plasticity and working memory performance (33).

On the other hand, we observed that regardless of Poly (I:C) administration, exposure to maternal care deprivation was associated with lower mRNA levels of *Il6*, *Nfkb1* and *Tlr3* in the mPFC of adolescent animals, suggesting that early life stress has persistent effects on the transcription of neuroimmune genes. However, following Poly (I:C) administration, animals exposed to MD presented a significant enhancement in the expression of *Il6*, *Nfkb1* and *Tlr3* compared with the MD-vehicle group, an effect that was not significant when analyzing gene expression changes in standard reared animals. In this sense, these findings are in accordance with the concept of “glial priming”. Previous studies demonstrated that “primed” glia cells are characterized by an activated morphology with enlarged cell bodies, accompanied by persistent lower expression levels of pro-inflammatory cytokines (33). However, the inflammatory response produced by primed glia to a subsequent immune challenge is significantly exaggerated when compared to typical glia cells that receive a similar challenge, and this aberrant response is associated with detrimental brain functioning and cognitive impairment (38). Previous evidence supports this idea since infant maternal care deprivation was associated with increased number, density, and surface area of glia cells in the brain (39).

Interestingly, we also found that higher mRNA levels of *Nfkb1* in the mPFC was correlated with lower working memory performance, suggesting a close link between NF- κ B signaling and cognition. This is consistent with previous findings showing that enhanced cortical activation of NF- κ B signaling pathway is accompanied by impairment of working memory

functioning, particularly due to the deleterious effect of neuroinflammation on cognitive abilities (40). NF- κ B is a critical transcription factor implicated in the regulation of inflammatory responses, as it enhances the transcription of pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1 β and IL-6, as well as the oxidative stress related enzyme cyclooxygenase 2 (41). In this sense, our data fits well with the hypothesis that by controlling NF- κ B signaling in the brain, it would be possible to prevent working memory impairment in cognitively-impaired individuals (40), including those affected by early life stress. However, it still remains to be revealed whether the blockage of cortical NF- κ B gene expression would rescue the cognitive deficits induced by the exposure to TLR-3 activation and infant maternal care deprivation.

In conclusion, the present study provides further evidence to support the idea that early life stress is a major risk factor to cognitive impairment, and that one possible pathway involved with this phenotype is through altered neuroinflammation (34). In particular, we demonstrated that the systemic activation of TLR-3 during adolescence is capable of exacerbate working memory impairments attributed to infant maternal care deprivation, and that this effect is accompanied by modifications in cortical gene expression of *Il6*, *Nfkb1* and *Tlr3*. In this sense, our study adds further weight to the notion that interventions targeting anti-inflammatory pathways may be highly promising for the treatment of neurocognitive disorders (42), especially those that early life stress is accounted as a major risk factor.

Figures

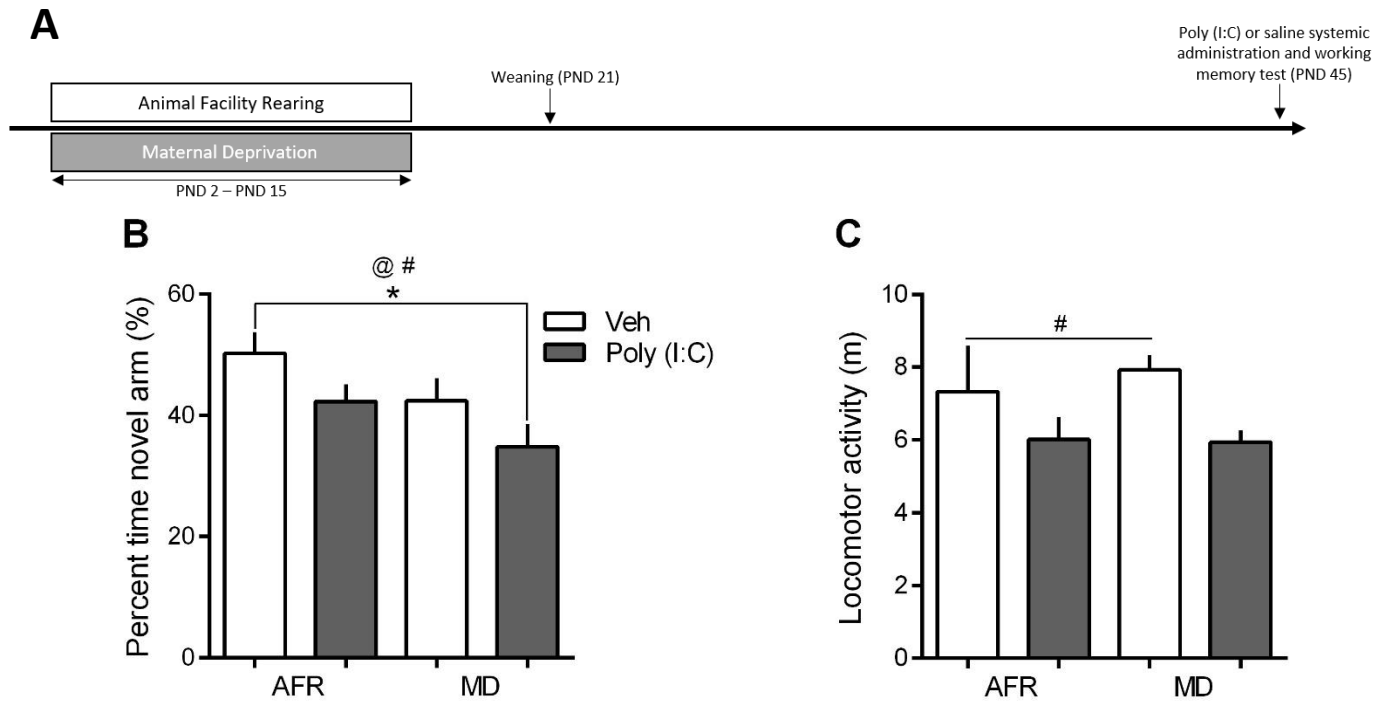


Figure 1.

A, Experimental design. B, Percent time in novel arm in the Y-maze working memory test. C, Locomotor activity in the Y-maze working memory test. #, treatment (Poly I:C x Vehicle) effect in the ANOVA. @, group (AFR x MD) effect in the ANOVA. *, $p < 0.05$. AFR, animal facility rearing. MD, maternal deprivation. $n = 10/12$ per group.

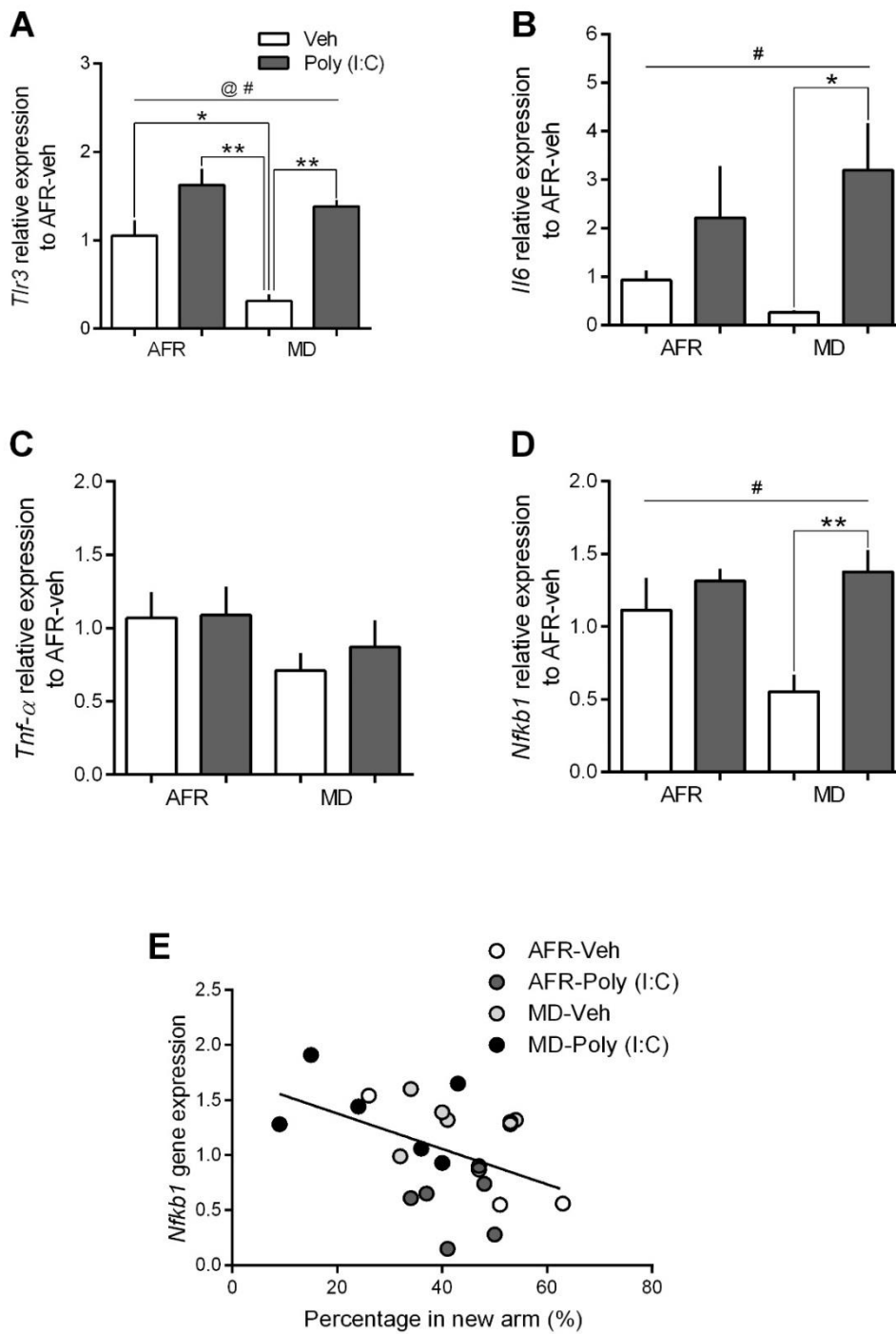


Figure 2. A, *Tlr3* gene expression levels in the mPFC. B, *Il6* gene expression levels in the mPFC. C, *Tnf-α* gene expression levels in the mPFC. D, *Nfkb1* gene expression levels in the mPFC. E. correlation analysis between *Nfkb1* gene expression and working memory performance score. #, treatment (Poly I:C x Vehicle) effect in the ANOVA. @, group (AFR x MD) effect in the ANOVA. *, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$. AFR, animal facility rearing. MD, maternal deprivation. $n = 6$ per group.

References

1. Qian C, Cao X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1283:67-74.
2. Liu HY, Chen CY, Hsueh YP. Innate immune responses regulate morphogenesis and degeneration: roles of Toll-like receptors and Sarm1 in neurons. *Neurosci Bull.* 2014;30(4):645-54.
3. Heiman A, Pallottie A, Heary RF, Elkabes S. Toll-like receptors in central nervous system injury and disease: a focus on the spinal cord. *Brain Behav Immun.* 2014;42:232-45.
4. Hanke ML, Kielian T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond).* 2011;121(9):367-87.
5. Mallard C. Innate immune regulation by toll-like receptors in the brain. *ISRN Neurol.* 2012;2012:701950.
6. Martín-Hernández D, Caso JR, Bris Á, Maus SR, Madrigal JL, García-Bueno B, et al. Bacterial translocation affects intracellular neuroinflammatory pathways in a depression-like model in rats. *Neuropharmacology.* 2016;103:122-33.
7. Martorana F, Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. Withaferin A Inhibits Nuclear Factor- κ B-Dependent Pro-Inflammatory and Stress Response Pathways in the Astrocytes. *Neural Plast.* 2015;2015:381964.
8. Bargi R, Asgharzadeh F, Beheshti F, Hosseini M, Sadeghnia HR, Khazaei M. The effects of thymoquinone on hippocampal cytokine level, brain oxidative stress status and memory deficits induced by lipopolysaccharide in rats. *Cytokine.* 2017;96:173-84.
9. Chen L, Hu L, Zhao J, Hong H, Feng F, Qu W, et al. Chotosan improves A β 1-42-induced cognitive impairment and neuroinflammatory and apoptotic responses through the inhibition of TLR-4/NF- κ B signaling in mice. *J Ethnopharmacol.* 2016;191:398-407.
10. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001;413(6857):732-8.
11. Costello DA, Lynch MA. Toll-like receptor 3 activation modulates hippocampal network excitability, via glial production of interferon- β . *Hippocampus.* 2013;23(8):696-707.
12. Costello DA, Lyons A, Denieffe S, Browne TC, Cox FF, Lynch MA. Long term potentiation is impaired in membrane glycoprotein CD200-deficient mice: a role for Toll-like receptor activation. *J Biol Chem.* 2011;286(40):34722-32.
13. Okun E, Griffioen K, Barak B, Roberts NJ, Castro K, Pita MA, et al. Toll-like receptor 3 inhibits memory retention and constrains adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(35):15625-30.

14. Auger ML, Floresco SB. Prefrontal cortical GABA modulation of spatial reference and working memory. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014;18(2).
15. Yang ST, Shi Y, Wang Q, Peng JY, Li BM. Neuronal representation of working memory in the medial prefrontal cortex of rats. *Mol Brain*. 2014;7:61.
16. Viola TW, Tractenberg SG, Pezzi JC, Kristensen CH, Grassi-Oliveira R. Childhood physical neglect associated with executive functions impairments in crack cocaine-dependent women. *Drug Alcohol Depend*. 2013;132(1-2):271-6.
17. Zou Z, Meng H, Ma Z, Deng W, Du L, Wang H, et al. Executive functioning deficits and childhood trauma in juvenile violent offenders in China. *Psychiatry Res*. 2013;207(3):218-24.
18. Coelho R, Viola TW, Walss-Bass C, Brietzke E, Grassi-Oliveira R. Childhood maltreatment and inflammatory markers: a systematic review. *Acta Psychiatr Scand*. 2014;129(3):180-92.
19. Roque A, Ochoa-Zarzosa A, Torner L. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain Behav Immun*. 2016;55:39-48.
20. Xu S, Qin B, Shi A, Zhao J, Guo X, Dong L. Oxytocin inhibited stress induced visceral hypersensitivity, enteric glial cells activation, and release of proinflammatory cytokines in maternally separated rats. *Eur J Pharmacol*. 2018;818:578-84.
21. Orso R, Creutzberg KC, Centeno-Silva A, Carapeços MS, Levandowski ML, Wearick-Silva LE, et al. NFκB1 and NFκB2 gene expression in the prefrontal cortex and hippocampus of early life stressed mice exposed to cocaine-induced conditioned place preference during adolescence. *Neurosci Lett*. 2017;658:27-31.
22. Viola TW, Wearick-Silva LE, De Azeredo LA, Centeno-Silva A, Murphy C, Marshall P, et al. Increased cocaine-induced conditioned place preference during periadolescence in maternally separated male BALB/c mice: the role of cortical BDNF, microRNA-212, and MeCP2. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016;233(17):3279-88.
23. Richetto J, Calabrese F, Meyer U, Riva MA. Prenatal versus postnatal maternal factors in the development of infection-induced working memory impairments in mice. *Brain Behav Immun*. 2013;33:190-200.
24. Murray C, Griffin É, O'Loughlin E, Lyons A, Sherwin E, Ahmed S, et al. Interdependent and independent roles of type I interferons and IL-6 in innate immune, neuroinflammatory and sickness behaviour responses to systemic poly I:C. *Brain Behav Immun*. 2015;48:274-86.
25. Arad M, Piontkewitz Y, Albelda N, Shaashua L, Weiner I. Immune activation in lactating dams alters sucklings' brain cytokines and produces non-overlapping behavioral deficits in adult female and

male offspring: A novel neurodevelopmental model of sex-specific psychopathology. *Brain Behav Immun.* 2017;63:35-49.

26. Gibney SM, McGuinness B, Prendergast C, Harkin A, Connor TJ. Poly I:C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurenine pathway activation and reduced BDNF expression. *Brain Behav Immun.* 2013;28:170-81.

27. Andersen SL, Teicher MH. Desperately driven and no brakes: developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009;33(4):516-24.

28. Russo M, Proujansky R, Gilbert A, Braga RJ, Burdick KE. Initial evidence for sex-specific effects of early emotional abuse on affective processing in bipolar disorder. *Eur Psychiatry.* 2014;29(1):52-7.

29. Yang XD, Liao XM, Uribe-Mariño A, Liu R, Xie XM, Jia J, et al. Stress during a critical postnatal period induces region-specific structural abnormalities and dysfunction of the prefrontal cortex via CRF1. *Neuropsychopharmacology.* 2015;40(5):1203-15.

30. Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry.* 2002;7(6):609-16.

31. Wearick-Silva LE, Marshall P, Viola TW, Centeno-Silva A, de Azeredo LA, Orso R, et al. Running during adolescence rescues a maternal separation-induced memory impairment in female mice: Potential role of differential exon-specific BDNF expression. *Dev Psychobiol.* 2017;59(2):268-74.

32. van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S. Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998;111(2):245-52.

33. Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(4):217-24.

34. Nusslock R, Miller GE. Early-Life Adversity and Physical and Emotional Health Across the Lifespan: A Neuroimmune Network Hypothesis. *Biol Psychiatry.* 2016;80(1):23-32.

35. Womersley JS, Seedat S, Hemmings SMJ. Childhood maltreatment and HIV-associated neurocognitive disorders share similar pathophysiology: a potential sensitisation mechanism? *Metab Brain Dis.* 2017;32(5):1717-33.

36. Spies G, Fennema-Notestine C, Archibald SL, Cherner M, Seedat S. Neurocognitive deficits in HIV-infected women and victims of childhood trauma. *AIDS Care.* 2012;24(9):1126-35.

37. Marinelli C, Di Liddo R, Facci L, Bertalot T, Conconi MT, Zusso M, et al. Ligand engagement of Toll-like receptors regulates their expression in cortical microglia and astrocytes. *J Neuroinflammation.* 2015;12:244.

38. Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:619-43.

39. Johnson FK, Kaffman A. Early life stress perturbs the function of microglia in the developing rodent brain: New insights and future challenges. *Brain Behav Immun.* 2017.
40. Echeverria V, Burgess S, Gamble-George J, Zeitlin R, Lin X, Cao C, et al. Sorafenib inhibits nuclear factor kappa B, decreases inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression, and restores working memory in APPswe mice. *Neuroscience.* 2009;162(4):1220-31.
41. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4):a000034.
42. Wang CH, Wang LS, Zhu N. Cholinesterase inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs as Alzheimer's disease therapies: an updated umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(22):4801-17.

Declaração de ciência do professor orientador em concordância com as alterações realizadas

Autorizo a publicação da versão final da tese intitulada **MODELOS EXPERIMENTAIS DE MORADIA EMPOBRECIDA E PRIVAÇÃO DO CUIDADO MATERNO NA INFÂNCIA: EFEITOS SOBRE O FUNCIONAMENTO COGNITIVO, MECANISMOS MOLECULARES E NEUROEPIGENÉTICOS**, do aluno Thiago Wendt Viola, que defendeu seu doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança. As alterações realizadas na versão final estão de acordo com as sugestões da banca da defesa.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Grassi-Oliveira', is written over a horizontal line.

Rodrigo Grassi-Oliveira

Professor na Escola de Medicina

Orientador do aluno Thiago Wendt Viola

Maio de 2018



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br