

PONTÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE PSICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA  
MESTRADO EM PSICOLOGIA

**EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA NOS  
COMPORTAMENTOS TIPO ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS  
ADULTOS**

**SAULO GANTES TRACTENBERG**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Psicologia.**

**Porto Alegre**

**Março, 2016**

PONTÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE PSICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA  
MESTRADO EM PSICOLOGIA

**EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA NOS COMPORTAMENTOS  
TIPO ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS ADULTOS**

**SAULO GANTES TRACTENBERG**

ORIENTADOR: PROF. Dr. RODRIGO GRASSI DE OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Psicologia. Área de Concentração em Cognição Humana.

**Porto Alegre  
Março, 2016**

PONTÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE PSICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA  
MESTRADO EM PSICOLOGIA

**EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA NOS COMPORTAMENTOS  
TIPO ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS ADULTOS**

**SAULO GANTES TRACTENBERG**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. FERNANDO BENNETI

*Departamento de Fisiologia*

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

Profª. Dra. ROSA MARIA MARTINS DE ALMEIDA

*Departamento de Psicologia*

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

**Porto Alegre  
Março, 2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

T759e Tractenberg, Saulo Gantes

Efeitos da separação materna nos comportamentos tipo ansiedade em camundongos adultos / Saulo Gantes Tractenberg. – Porto Alegre, 2016.

151 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Psicologia, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira

1. Ansiedade. 2. Estresse. 3. Cuidados Maternos.  
4. Psicologia. I. Oliveira, Rodrigo Grassi de. II. Título.

CDD 155.9

**Ficha Catalográfica elaborada por Loiva Duarte Novak – CRB10/2079**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a toda a equipe de modelos experimentais do Grupo de Pesquisa em Neurociência Cognitiva do Desenvolvimento (GNCD), alunos de iniciação científica, doutorado e pós-doutorado e demais colegas. Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira por toda compreensão, apoio e motivação para elaboração e execução deste trabalho e pelo incentivo a minha carreira acadêmica. Finalmente dedico aos meus pais e a minha namorada, Luisa, por me acompanharem durante esses últimos dois anos.

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente agradeço a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo fornecimento da bolsa de estudo, essencial para a dedicação a esta pesquisa.

Agradeço, em especial, a toda a equipe de trabalho em modelos experimentais do Grupo de Pesquisa em Neurociência Cognitiva do Desenvolvimento (GNCD), a qual esteve envolvida em diferentes etapas do presente trabalho, mas que independente do papel contribuiu substancialmente para que o mesmo fosse realizado. Aos alunos de iniciação científica, Laura Roithmann, Rafaelly Pazzin, Anderson Centeno, Rodrigo Orso e Emerson Hoffmann. Aos amigos e colegas pesquisa, Thiago Viola e Luis Eduardo Wearick Silva, que participaram ativamente e possibilitaram a troca de conhecimentos e aprendizagens. Ao Dr. Lucas Araújo de Azeredo e ao Mateus L. Levandowski pelas contribuições na revisão sistemática. Aos demais colegas, em especial Breno Sanvicente Vieira, Bruno Kluwe Schiavon e Lucas Bandinelli pela parceria e pelos momentos de descontração durante o trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira por toda compreensão, apoio e ensinamentos que contribuíram para a elaboração e execução deste trabalho. Agradeço também por sempre ter incentivado e auxiliado o desenvolvimento da minha carreira acadêmica e de pesquisa. Os últimos cinco anos foram de muitas aprendizagens, desafios e conquistas.

Agradeço a toda equipe de trabalho do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE), sob coordenação da Profa. Dra. Luisa Maria Gomes de Macedo Braga e da Marta Lorena Speck da Silva, pelos auxílios, treinamentos e colaboração.

Finalmente agradeço aos meus pais pela ajuda e apoio durante todos os momentos necessários no decorrer da minha trajetória acadêmica. A minha namorada, Luisa Z. Maciel, por ser minha companheira em todos os momentos ao longo desses dois últimos anos e sempre acreditar no meu potencial, mesmo nos momentos mais difíceis.

## RESUMO

**Introdução:** A exposição a estressores no início da vida vem sendo considerado um fator ambiental capaz de moldar o desenvolvimento cerebral, levando a consequências negativas e duradouras que se estendem a vida adulta. Acredita-se que o estresse precoce para além de alterações estruturais e funcionais pode estar associado ao aumento da vulnerabilidade para apresentação de fenótipos específicos, como ansiedade e responsividade ao estresse. Diversos mecanismos moleculares e neurobiológicos têm sido investigados e apontados como possíveis mediadores dessas alterações. **Objetivo:** A presente dissertação objetiva investigar os efeitos da separação materna (SM) no desenvolvimento do fenótipo tipo ansiedade em camundongos adultos. **Método:** Trata-se de um estudo experimental com camundongos, machos, da linhagem Balb/c, separados precocemente durante as primeiras duas semanas de vida do cuidado mãe por um período diário de 180 minutos. Os animais separados foram testados no dia pós-natal (PND) 60 em uma bateria de tarefas comportamentais relacionadas ao fenótipo de ansiedade e tiveram seu desempenho comparado a animais controle. **Resultados:** A SM afetou diferentes parâmetros de ansiedade, principalmente nas tarefas de campo aberto (*Open-field Test*) e teste claro e escuro (*Light Dark Test*). Também foram encontrados efeitos da SM em medidas fisiológicas, como o número de bolos fecais produzidos durante a realização das tarefas de comportamento tipo ansiedade. Outras medidas avaliadas por essas tarefas como, por exemplo, comportamentos de exploração/coleta de informações e avaliação de risco parecem também sofrer influência da exposição a SM no início da vida. **Conclusões:** Nossos resultados reforçam alguns achados da literatura que sugerem o estresse precoce, através da SM, como um fator de risco para o desenvolvimento de fenótipos comportamentais subjacentes a transtornos mentais principalmente relacionados ao espectro da ansiedade e responsividade ao estresse.

**Palavras-Chaves:** separação materna, ansiedade, camundongo, estresse precoce, balb/c.

**Área conforme classificação CNPq:** 7.07.00.00-1 - Psicologia

**Sub-área conforme classificação CNPq:** 7.07.02.00-4 Psicologia Experimental

## ABSTRACT

**Introduction:** Exposure to early life stress (ELS) has been considered an environmental factor that is able to shape the brain development, leading to negative and long-lasting consequences. It is believed that ELS, in addition to the recognized structural and functional deleterious effects, may be involved in the increase vulnerability to develop specific behavioral phenotype, such as anxiety and stress-responsiveness. Several molecular and neurobiological targets have been investigated and identified as potential mediators of these effects due ELS. **Objectives:** The present thesis aims to investigate the maternal separation (MS) effects in the development of anxiety-like behaviors in adult mice. **Methods:** Here, we presented an experimental study with male Balb/c mice separated from the dam during the first two weeks of life for a daily period of 180 min. MS mice were tested in postnatal day (PND) 60 in multiple anxiety tasks and had their performance were compared to non-separated mice. **Results:** MS affected different anxiety parameters, especially in the Open-field Test and Light Dark Test. We also found MS effects in physiological measures, such as the number of fecal boli produced during the tasks. Additional measures assessed by the anxiety-related tasks, for example, exploration/gathering information and risk assessment behaviors seem to be affected by exposure to early life stressors. **Conclusion:** Our findings corroborates prior studies suggesting that ELS, through MS paradigm, could be a risk factor for the development of behavioral phenotypes underpinning mental disorders, manly related to anxiety and stress-responsiveness spectrum.

**Key-words:** maternal separation, anxiety, anxiety-like behavior, early life stress, mice, balb/c.

**Área conforme classificação CNPq:** 7.07.00.00-1 - Psicologia

**Sub-área conforme classificação CNPq:** 7.07.02.00-4 Psicologia Experimental

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>5</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>9</b>
<b>RELAÇÃO DE TABELAS .....</b>	<b>10</b>
<b>RELAÇÃO DE FIGURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>1. APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>3. CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>32</b>
<b>4. CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>112</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>144</b>

**RELAÇÃO DE TABELAS****AN OVERVIEW OF MATERNAL SEPARATION EFFECTS ON BEHAVIORAL OUTCOMES IN MICE: EVIDENCE FROM A FOUR-STAGE METHODOLOGICAL SYSTEMATIC REVIEW**

**TABLE 1.** DESCRIPTIVE CHARACTERISTICS AND SUMMARY OF MAIN FINDINGS OF MATERNAL SEPARATION STUDIES IN MICE. .... **76**

**TABLE 2.** DESCRIPTIVE CHARACTERISTICS AND SUMMARY OF MAIN FINDINGS OF MATERNAL SEPARATION STUDIES IN MICE. .... **100**

## RELAÇÃO DE FIGURAS

### AN OVERVIEW OF MATERNAL SEPARATION EFFECTS ON BEHAVIORAL OUTCOMES IN MICE: EVIDENCE FROM A FOUR-STAGE METHODOLOGICAL SYSTEMATIC REVIEW

<b>FIGURA 1.</b> FOUR-STAGE SYSTEMATIC REVIEW .....	59
<b>FIGURA 2.</b> FLOWCHART OF SYSTEMATIC REVIEW .....	60
<b>FIGURA 3.</b> DEFINITION AND NOMENCLATURE PROPOSAL FOR MATERNAL SEPARATION MODELS AND METHODOLOGICAL OPTIONS. ....	61
<b>FIGURA 4.</b> PERCENTAGE OF METHODOLOGICAL REPORT CRITERIA FULFILLED BY MS MICE STUDIES .....	62
<b>FIGURA 5.</b> SUMMARY OF BEHAVIORAL EVIDENCE FOR ANIMAL MODELS OF EARLY DISRUPTION OF THE MOTHER-INFANT RELATIONSHIP.....	63
<b>FIGURA 6.</b> TOP EIGHT ENRICHED BIOLOGICAL MARKERS AND MOLECULAR PATHWAYS FOR ANIMAL MODELS OF EARLY DISRUPTION OF THE MOTHER-INFANT RELATIONSHIP .....	64

### EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA NOS COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E AVALIAÇÃO DE RISCO EM CAMUNDONGOS BALB/C

<b>FIGURA 1.</b> EFEITOS DA SM NOS COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE AVALIADOS PELO OF .....	130
<b>FIGURA 2.</b> EFEITOS DA SM NOS COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE AVALIADOS PELO EPM .....	131
<b>FIGURA 3.</b> EFEITOS DA SM NOS PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DE RISCO E COMPORTAMENTO DE EXPLORAÇÃO/COLETA DE INFORMAÇÃO AVALIADOS PELO EPM .....	132
<b>FIGURA 4.</b> EFEITOS DA SM NOS COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E AVALIAÇÃO DE RISCO NO LD.....	133

### MATERIAL SUPLEMENTAR

<b>FIGURA 1.</b> EFEITOS DA SM NO ÍNDICE TOTAL DE COMPORTAMENTO MATERNO .....	134
<b>FIGURA 2.</b> EFEITOS DA SM NOS PADRÕES DE CUIDADO MATERNO .....	135

## 1. APRESENTAÇÃO

A presente dissertação deriva de um projeto guarda-chuva intitulado “O impacto neuroendócrino do modelo de “*second hit*” durante períodos de vulnerabilidade do desenvolvimento na cognição e no comportamento de camundongos adolescentes e adultos”. Este projeto objetiva investigar o impacto de um modelo de dupla exposição a estressores durante períodos sensíveis do desenvolvimento, como a infância e adolescência, em desfechos neurobiológicos e na apresentação de fenótipos comportamentais e cognitivos em camundongos. Ainda, o projeto procura abordar tais efeitos a curto e em longo prazo, avaliando os animais em duas fases distintas do desenvolvimento, a adolescência (curto prazo) e a vida adulta (longo prazo).

Trata-se de um projeto que procura atender uma carência na literatura científica no que se refere aos efeitos potenciais da reexposição a estressores ainda durante períodos precoces do desenvolvimento. A avaliação de alterações neuroendócrinas, bem como investigação de alvos e mecanismos moleculares associados a tais modificações será capaz de expandir a compreensão a respeito das possíveis causas das alterações fenotípicas identificadas na vida adulta e que vêm sendo sugeridas como relacionadas a psicopatologias. Desta forma, abre-se caminho para um aprofundamento no entendimento das interações entre fatores ambientais (incluindo fatores associados ao cuidado parental) e genéticos, bem como do papel que modificações epigenéticas em resposta a exposição a fatores ambientais adversos possuem na vulnerabilização dos indivíduos para a manifestação de condições clínicas e psiquiátricas em fases posteriores do seu desenvolvimento.

Tendo em vista a dimensão e abrangência do projeto guarda-chuva, a presente dissertação procurou através dos seus dois estudos, revisar os modelos de separação materna a fim de identificar o modelo mais adequado a ser utilizado para mimetizar os efeitos de estressores no início da vida. Além disso, procurou-se realizar um estudo preliminar dos efeitos da separação materna em comportamentos tipo ansiedade, corroborando para uma validação comportamental do modelo de estresse precoce escolhido. Tais etapas são essenciais, pois permitem que futuras investigações de alvos biológicos e moleculares estejam alicerçadas em um modelo de estresse fenotipicamente validado.

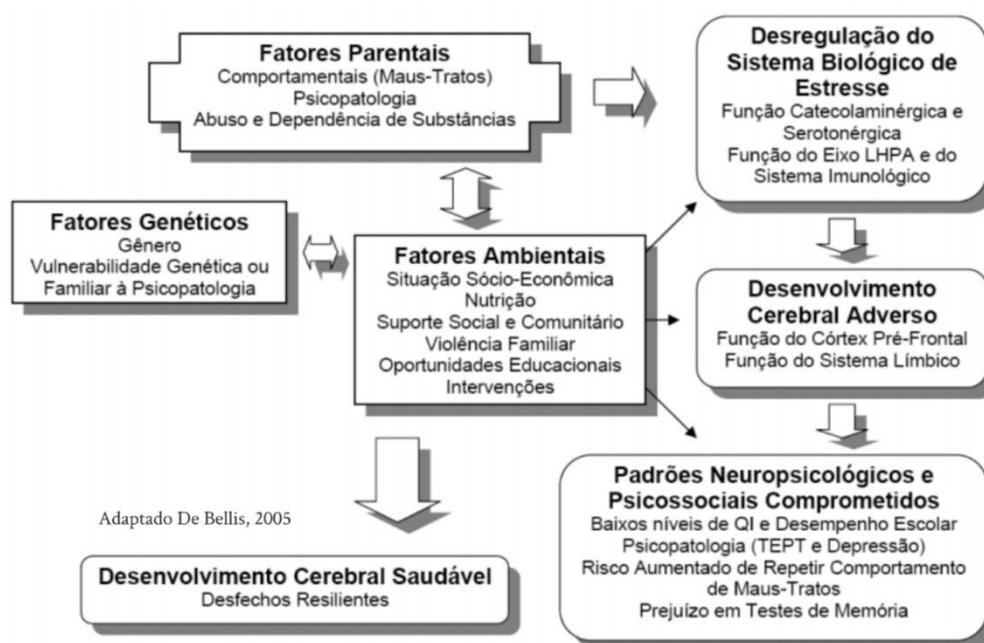
## 2. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do indivíduo representa um período de intensa vulnerabilidade à influência de fatores ambientais (Andersen, 2003; Andersen & Teicher, 2009; Teicher et al., 2003; Teicher & Samson, 2013). Sabe-se, por exemplo, que ambientes seguros e capazes de suprir as necessidades básicas da criança, sejam elas físicas ou emocionais, são considerados protetivos e levam a um desenvolvimento biopsicossocial adequado. Por outro lado, ambientes instáveis, constantemente ameaçadores e incapazes de prover as necessidades básicas da criança (e.g., alimentação, higiene, afeto e saúde) podem ser considerados desfavoráveis e prejudiciais para o adequado desenvolvimento do indivíduo (Ganguly & Brenhouse, 2015).

A extensão do impacto subjacente à exposição a tais ambientes vêm sendo temática frequente de diversos estudos em diferentes áreas do conhecimento. Vários estudiosos convergem a favor da hipótese de que eventos adversos e potencialmente estressores durante os primeiros anos seriam responsáveis por mediar diversas alterações neurobiológicas em diferentes sistemas do organismo, além de alterações estruturais e funcionais em regiões específicas do cérebro (Andersen & Teicher, 2009; Bremne & Vermetten, 2001; De Bellis, Keshavan, et al., 1999; Heim, Shugart, Craighead, & Nemeroff, 2010; Teicher, Andersen, Polcari, Anderson, & Navalta, 2002; Teicher et al., 2003). Isso porque durante o curso inicial do neurodesenvolvimento, o cérebro passa por múltiplos processos químicos e biológicos responsáveis por desenvolver, diferenciar e maturar adequadamente diferentes estruturas que compõem o nosso Sistema Nervoso Central (SNC) (Andersen, 2003; Teicher et al., 2003), de forma que estressores ambientais intensos podem interferir significativamente no curso desses processos, deixando uma marca permanente na estrutura e funcionamento do cérebro (Teicher et al., 2002).

Diversos modelos para o entendimento das consequências de estressores durante fases críticas do desenvolvimento foram propostos nas últimas duas décadas e, dentre esses modelos, um dos mais destacados é o modelo da “Traumatologia Desenvolvimental”, proposto por De Bellis (2002, 2005; 1999a; 1999b). Para De Bellis (2002), as consequências da vivência de situações estressoras na infância seriam causadas por uma rede de interações complexas entre fatores genéticos do indivíduo, suas experiências de vida e períodos sensíveis e de maior vulnerabilidade do neurodesenvolvimento. Essa interação seria responsável por mediar mudanças significativas no sistema biológico do estresse e no desenvolvimento

cerebral de determinadas regiões (e.g., hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal e corpo caloso). A desregulação do sistema biológico do estresse teria como consequência sequelas neurobiológicas permanentes através da exposição prolongada a elevados níveis de catecolaminas e glicocorticoides, considerados capazes de acelerar a degradação neuronal, interferir nos processos de mielinização e causar anormalidades desenvolvimentais nos processos de diferenciação e poda sináptica. Em última instância, estruturas e funções cerebrais teriam seus processos de desenvolvimento alterados o que conduziria em modificações duradouras ou, até mesmo, irreversíveis na expressão de determinados fenótipos comportamentais e cognitivos (De Bellis, 2002, 2005; Heim & Nemeroff, 2002; Lupien, McEwen, Gunnar, & Heim, 2009; Teicher & Samson, 2013) (Figura 1).



*Figura 1.* Esquema representativo do modelo da Traumatologia Desenvolvimental. Interação complexa entre fatores genéticos e ambientais, mais a influência de aspectos relacionados ao cuidado parental durante os primeiros anos de vida como fatores associados capazes de influenciar a trajetória desenvolvimento do sistema biológico do estresse, de determinadas estruturas e funções cerebrais e, conseqüentemente, ser responsável pela manifestação de padrões de funcionamento psicossociais e neuropsicológicos na vida adulta. Distinções entre desfechos saudáveis (resiliência) e desfechos suscetíveis (patológicos) (De Bellis, 2005).

As implicações das alterações produzidas pelas constantes e prolongadas ativações dos sistemas de resposta ao estresse também vêm sendo identificadas por uma série de estudos clínicos que sugerem uma significativa associação entre estresse precoce e diversas conseqüências deletérias para saúde global dos indivíduos expostos. O estresse precoce, por

exemplo, já é apontado como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Kelly-Irving et al., 2013), asma (Scott, Smith, & Ellis, 2012), obesidade e diabetes (Danese & Tan, 2014), como também possui relação com o aumento da vulnerabilidade para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (Scott, McLaughlin, Smith, & Ellis, 2012; Teicher & Samson, 2013). Dados provenientes de estudos de meta-análise revelam que, em indivíduos que sofreram situações de abuso e negligência durante a infância, há duas vezes mais chances de desenvolver transtornos de humor (Nanni, Uher, & Danese, 2012) e três vezes mais chances de desenvolver transtornos psicóticos na vida adulta (Varese et al., 2012). Outros transtornos psiquiátricos, como Transtornos de Ansiedade, Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) e Transtornos Relacionados ao Uso de substância, também são identificados como associados à vivência de situações adversas no início da vida (Afifi, Henriksen, Asmundson, & Sareen, 2012; Teicher & Samson, 2013). Ainda, não somente uma maior vulnerabilidade para o desenvolvimento desses transtornos, como também uma diferenciação na apresentação clínica dos mesmos vêm sendo identificada em investigações a partir de amostras de indivíduos com um mesmo diagnóstico, porém com história de vida distinta durante a infância (Teicher & Samson, 2013).

Uma importante recente revisão (Teicher & Samson, 2013) avançou no entendimento das distinções do perfil clínico e neurobiológico dos indivíduos expostos a estressores no início da vida. Os autores sugerem que tais indivíduos representariam uma especialização fenotípica dentro do espectro de sintomas de uma mesma psicopatologia, pois haveriam distinções marcadas na apresentação fenotípica desses transtornos, as quais não poderiam ser melhores explicados apenas por fatores genéticos. Sendo assim, as prováveis variações na manifestação clínica destes indivíduos seriam resultado de uma interferência ambiental e de sua interação com aspectos genéticos. Tal ideia corrobora evidências que revelam, em populações clínicas de indivíduos expostos a estresse precoce, um início precoce da doença, uma maior gravidade dos sintomas clínicos apresentados, um maior número de diagnósticos associados, além de uma pior resposta e prognóstico do tratamento. Em dependentes de substância, por exemplo, observam-se várias evidências provenientes de estudos associados às quais sugerem que estressores em fases sensíveis do desenvolvimento podem levar a um agravamento dos problemas relacionados com o uso de substâncias, tais como antecipação do primeiro uso, rápida progressão para dependência e dificuldades em se manter em abstinência (Andersen & Teicher, 2009; Francke, Viola, Tractenberg, & Grassi-Oliveira, 2013). Achados semelhantes também vêm sendo identificados em pacientes com depressão, ansiedade e TEPT (Hovens et al., 2012; Simon et al., 2009).

A explicação e os mecanismos moleculares e neurobiológicos responsáveis pela diferenciação fenotípica na apresentação dessas psicopatologias, no entanto, ainda não são completamente entendidos. Alguns autores defendem que tais desfechos estejam relacionados à desregulação em sistemas neuroendócrinos e imunológicos responsivos aos desafios ambientais, corroborando a hipótese de que a excessiva ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) e, conseqüente, ativação do sistema imunológico desempenham um papel neurotóxico capaz de interferir e afetar o desenvolvimento cerebral (Andersen, 2003; Ganguly & Brenhouse, 2015; Lupien et al., 2009). Entretanto, recentes estudos de epigenética têm demonstrado através de evidências em modelos pré-clínicos e clínicos que a exposição a estressores precoces, para além dos desfechos neurobiológicos conhecidos, está associada com alterações específicas na expressão de receptores de glicocorticóide (em inglês, GR) em regiões frontais e do hipocampo, alterações nos níveis de transcrição dessas proteínas e modificações nos padrões de metilação e acetilação de genes envolvidos na resposta ao estresse (Holmes et al., 2005; Murgatroyd & Spengler, 2011). Em conjunto, essas cascatas de alterações moleculares e neurobiológicas poderiam explicar a reprogramação do funcionamento do eixo HPA (Aisa, Tordera, Lasheras, Del Rio, & Ramirez, 2007; Fabricius, Wortwein, & Pakkenberg, 2008; Meaney, 2001; Navailles, Zimnisky, & Schmauss, 2010) e, conseqüentemente, vulnerabilidade para o desenvolvimento de transtornos mentais.

## **2.1. O eixo HPA e a resposta do organismo ao estresse**

O eixo HPA é um componente do sistema endócrino que detém a função de responder rapidamente às mudanças e desafios ambientais na tentativa de manter o organismo em homeostase (Bremne & Vermetten, 2001; Grassi-Oliveira, Ashy, & Stein, 2008). Frente a estressores, como por exemplo, situações de privação de cuidado ou exposição a ambientes instáveis e constantemente ameaçadores na infância, o organismo ainda em desenvolvimento é forçado a buscar uma rápida adaptação com objetivo de recuperar o seu estado de equilíbrio. Toda vez que o organismo encontra-se obrigado a responder de tal forma, o mesmo passa a atuar com uma carga alostática. Carga alostática refere-se ao processo de adaptação frente a um estressor agudo que envolve a liberação de hormônios neuroendócrinos responsáveis por restaurar a homeostase do organismo. Embora tal resposta seja uma forma de proteção do organismo, as recorrentes ativações deste mecanismo ou, até mesmo, a ineficiência de sua resposta em períodos sensíveis do desenvolvimento pode resultar em conseqüências deletérias para o desenvolvimento e funcionamento do organismo em fases subseqüentes (McEwen,

2000). Diversas alterações já foram identificadas em razão dessa ruptura da homeostase e acúmulo de carga alostática. As principais estão relacionadas à resposta do indivíduo ao estresse através do aumento da responsividade do eixo HPA e liberação excessiva e desregulada dos hormônios glicocorticóides (e.g., cortisol), bem como em neurotransmissores endógenos (e.g., catecolaminas) (Grassi-Oliveira et al., 2008). Além disso, evidências mais recentes apontam para uma relação entre o estresse precoce e alterações no sistema imunológico, a exemplo do aumento de mediadores inflamatórios e redução de mediadores anti-inflamatórios (Coelho, Viola, Walss-Bass, Brietzke, & Grassi-Oliveira, 2014; Fagundes, Glaser, & Kiecolt-Glaser, 2013). Essas alterações ocorreriam, segundo alguns autores, como uma tentativa de adaptar o organismo a demanda das altas cargas alostáticas, fenômeno conhecido como *early life stress programming* (Murgatroyd & Spengler, 2011).

Tipicamente, uma vez que o organismo encontra-se exposto a uma situação ameaçadora ou de alta demanda há a ocorrência de uma cascata de reações hormonais que se iniciam com o aumento da produção do Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH) pelo Hipotálamo. O aumento da produção e liberação do CRH estimula a produção e liberação do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) na Pituitária Anterior. A partir da estimulação do ACTH, a glândula adrenal passa a produzir e liberar hormônios glicocorticóides. Um sistema de *feedback* negativo é então ativado por meio de sinalizações para o hipotálamo a fim de reduzir a ativação do eixo HPA e promover adaptação e recuperação da situação estressora. Receptores específicos, como os GR e os receptores de Mineralocorticóide (MR, em inglês), encontram-se distribuídos por todo o cérebro, principalmente nas regiões envolvidas no funcionamento do eixo HPA (e.g., hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e hipotálamo) e possuem um papel crucial no que se refere à regulação e redução da responsividade do eixo HPA (Lupien et al., 2009).

Essa cadeia de ativações em resposta a ameaças e estressores agudos comumente são respostas fisiológicas adaptativas do organismo. No entanto, quando as ameaças e estressores tornam-se recorrentes e prolongados, as constantes ativações autonômicas e adrenocorticais podem levar a danos causados pela exposição prolongada aos hormônios glicocorticóides (Grace, Kim, & Rogers, 2011). Em períodos iniciais do desenvolvimento, essa necessidade constante de adaptação do organismo frente a estressores é capaz de modificar o funcionamento do eixo HPA, aumentando a vulnerabilidade para enfrentar futuras situações de estresse ou ameaça. Isso ocorre em razão do incompleto desenvolvimento e maturação das regiões e conexões responsáveis por regular o eixo HPA, principalmente em

relação à capacidade de exercer os mecanismos de *feedback* negativo (Andersen, 2003; Lupien et al., 2009)

Ainda, durante fases iniciais existe uma variabilidade adaptativa da resposta do eixo HPA frente a estressores. Em idades mais precoces onde o organismo encontra-se mais vulnerável, há uma tendência a uma hiporesponsividade frente a ativações ambientais, possivelmente como forma de proteger o organismo contra os efeitos neurotóxicos decorrentes da exposição excessiva a elevados níveis dos hormônios glicocorticóides. Enquanto, na idade adulta, as evidências indicam uma resposta mais acentuada e duradoura do organismo (Lupien et al., 2009; Rhee, Lephart, & Eliason, 2001). Portanto, de um ponto de vista neurobiológico, parece que a exposição a adversidades nos primeiros anos de vida acarreta em modificações duradouras no funcionamento do eixo HPA como uma tentativa de proteger o organismo dos insultos ambientais durante fases do desenvolvimento em que não há uma completa maturidade do mesmo.

## **2.2. Estresse precoce e o curso do desenvolvimento do cérebro**

O período que compreende desde o nascimento até a vida adulta é considerado um período crítico de mudanças para os indivíduos, abrangendo as mais marcadas transformações físicas, neurobiológicas, comportamentais e emocionais nos indivíduos (Lupien et al., 2009; Viveros, Marco, Lopez-Gallardo, Garcia-Segura, & Wagner, 2011). O curso das transformações cerebrais subjacentes a esta trajetória possui uma ontogênese única e específica em conformidade com o desenvolvimento de cada região cerebral (Andersen, 2003; Grassi-Oliveira et al., 2008; Lupien et al., 2009). A maioria dos neurônios possui um processo de desenvolvimento semelhante composto por diferentes etapas, tais como nascimento e diferenciação neuronal; migração para regiões específicas; arborização e aumento das ramificações e, por fim, estabelecimento de novas conexões e redes neurais. Embora tais processos sejam em sua maioria geneticamente determinados, algumas conexões são suscetíveis a influências das interações entre o organismo e o ambiente, podendo reforçar a formação de novas conexões ou até mesmo eliminar determinadas conexões por falta de uso (Andersen, 2003; Grassi-Oliveira et al., 2008).

O cérebro, desde o período embrionário, encontra-se em processo de formação atravessando diversos estágios até sua total maturação durante a vida adulta. Reconhece-se que períodos precoces, como o período neonatal e pós-natal são de extrema suscetibilidade aos efeitos decorrentes da exposição a estressores (Andersen, 2003). Apesar de algumas

estruturas cerebrais possuem um desenvolvimento acelerado ao longo dos primeiros anos de vida, atingindo sua maturação durante a primeira infância (e.g., hipocampo), outras estruturas possuem um desenvolvimento progressivo, estendendo-se ao longo de toda a infância e adolescência para sua completa maturação no início da vida adulta, como por exemplo, estruturas corticais e a amígdala (Lupien et al., 2009). Funcionalmente também existem distinções no que se refere ao curso do desenvolvimento, com a necessidade do desenvolvimento precoce das regiões específicas associadas às funções motoras e, posteriormente, o desenvolvimento de regiões responsáveis por determinadas funções cognitivas (Andersen, 2003). Assim, considerando tais diferenciações ontológicas no curso do desenvolvimento do SNC, reconhece-se que o estresse precoce poderia ser um fator capaz de interferir estruturalmente e funcionalmente no neurodesenvolvimento dessas regiões, principalmente aquelas que possuem seus processos de crescimento e maturação e diferenciação mais prolongados e tardios (Chocyk et al., 2013; Teicher et al., 2003).

### **2.3. Cuidado materno e as consequências desenvolvimentais**

Sabe-se que diversos fatores podem influenciar e moldar o desenvolvimento cerebral durante as etapas iniciais de vida. O período pós-natal representa uma etapa do desenvolvimento em que todos os mamíferos apresentam como característica em comum uma completa dependência de uma relação próxima com sua mãe ou cuidadora. A interação entre mãe-filhote vem sendo apontado como algo que perpassa o simples atendimento das necessidades nutricionais básicas (e.g., comer e beber), envolvendo também a exigência de comportamentos maternos vinculados à manutenção de um ambiente familiar estável e seguro, além da capacidade em proporcionar e estimular o contato do filhote com o corpo da mãe, fundamental para a manutenção térmica e desenvolvimento de uma relação saudável de apego (Gutman & Nemeroff, 2002; Harlow & Zimmermann, 1959; Hofer, 1970; Kraemer, 1992). A exposição a estressores extremos e prolongados é apontada como capaz de romper essas relações maternas com os filhotes, levando a efeitos adversos no desenvolvimento cerebral como, por exemplo, no desenvolvimento de sinapses no hipocampo e regiões pré-frontais, bem como em diferentes sistemas biológicos (Meaney, 2001).

Algumas evidências têm sustentado que variações no cuidado materno também seriam responsáveis por induzir efeitos duradouros na resposta neuroendócrina do organismo ao estresse, principalmente nos primeiros anos de vida, uma vez que os indivíduos recém-nascidos encontram-se despreparados para responder a estressores ambientais. Durante esses

períodos, percebe-se uma necessidade de que as mães lidem com as demandas ambientais e, progressivamente, preparem os filhotes para períodos de separação e individuação. Em situações nas quais a mãe/cuidadora torna-se incapaz prover condições maternas suficientes para que o filhote seja capaz de lidar com as demandas ambientais, evidenciam-se efeitos deletérios a curto e longo prazo sobre o desenvolvimento dos filhotes (Caldji, Diorio, & Meaney, 2000; Caldji et al., 1998; D. D. Francis & Meaney, 1999; Weaver et al., 2004).

Sabe-se que a qualidade da relação entre mãe e filhotes influencia o desenvolvimento de diferenças individuais no que se refere ao aumento da susceptibilidade e progressão para transtornos psiquiátricos, bem como para a apresentação de fenótipos relacionados a esses transtornos, como comportamentos de anedonia, ansiedade e medo. Diversos estudos clínicos têm evidenciado que estilos parentais de distanciamento e frieza estão associados com o aumento do risco de apresentar sintomas de ansiedade e depressão posteriormente na vida adulta (McGinn, Cukor, & Sanderson, 2005; Parker, Hadzi-Pavlovic, Greenwald, & Weissman, 1995; Randolph & Dykman, 1998). Embora, exista essa série de dados clínicos, muito do que se sabe sobre os efeitos deletérios da quebra da relação mãe-filhote provêm de modelos animais, principalmente pesquisas com roedores. Já é reconhecido que períodos breves de separação de roedores filhotes ( $\approx$  5 a 10 minutos) de suas cuidadoras durante as primeiras duas semanas de vida podem ser benéficos para o desenvolvimento dos mesmos, uma vez que resultam em uma redução da responsividade ao estresse na vida adulta (D. D. Francis & Meaney, 1999; Meaney, Aitken, Bhatnagar, & Sapolsky, 1991; Meaney, Aitken, van Berkel, Bhatnagar, & Sapolsky, 1988; Meaney et al., 1996). Além disso, quando adultos esses animais apresentam uma menor resposta de medo frente a tarefas comportamentais, assim como uma resposta atenuada do eixo HPA frente a estressores (Holmes et al., 2005). A explicação para tais desfechos fundamenta-se na indução de um maior cuidado materno a partir da exposição a períodos breves de separação e, conseqüentemente, maior preparo para que o filhote enfrente os desafios ambientais futuros (Meaney, Mitchell, et al., 1991).

Muito embora períodos breves de separação possam ser considerados benéficos, não apresentando quaisquer efeitos prejudiciais sobre o desenvolvimento, períodos prolongados de separação (e.g., entre 30 e 180 minutos) ou, até mesmo, períodos de 24 horas mostram-se como potencialmente deletérios para o adequado desenvolvimento dos filhotes (Andersen, 2015; Holmes et al., 2005; Pryce & Feldon, 2003). Uma das justificativas sugeridas por alguns autores refere-se a reduções significativas no cuidado materno, através da quebra diária das relações entre mãe-filhote, assemelhando-se a condições humanas de

negligência e falta de cuidado materno (Brenhouse & Andersen, 2011; Hennessy, Paik, Caraway, Schiml, & Deak, 2011). Dados de estudos com roedores, filhotes de mães “pouco cuidadoras” – as quais apresentavam baixas taxas de comportamento materno para com seus filhotes – revelam que, para além do aumento de comportamentos tipo depressão e ansiedade na vida adulta, existe uma profunda desregulação da resposta do eixo HPA frente a estressores ambientais (Caldji et al., 2000; D. Francis et al., 1996; Ladd et al., 2000; Meaney et al., 1988; Zaharia, Kulczycki, Shanks, Meaney, & Anisman, 1996). Os mesmos achados têm sido reportados por estudos de privação de cuidado do materno por um período de tempo diário ao longo de dias ou semanas (Aisa et al., 2007; Brenhouse & Andersen, 2011; Hohmann, Beard, Kari-Kari, Jarvis, & Simmons, 2012; Hohmann, Hodges, Beard, & Aneni, 2013; Kundakovic, Lim, Gudsnuk, & Champagne, 2013; Nishi, Horii-Hayashi, & Sasagawa, 2014). As desregulações poderiam ser identificadas através do aumento dos níveis periféricos de corticosterona nesses animais na vida adulta quando expostos a desafios e tarefas para avaliação de responsividade ao estresse (Szyf, Weaver, Champagne, Diorio, & Meaney, 2005). Além disso, foram observadas modificações epigenéticas nos padrões de metilação na região *exon* promotora do gene do Receptor de Glicocorticóide (*NR3C1*). O aumento da metilação nessa região seria responsável pela redução na expressão de RNA mensageiro na região do *NR3C1* no hipocampo, conduzindo a uma desregulação no sistema de *feedback* negativo do eixo HPA (Weaver, 2007; Weaver et al., 2004).

#### **2.4. Modelos animais para o estudo de estresse precoce: o modelo de separação materna**

Os modelos animais de estresse precoce têm sido largamente empregados em estudos que visam mimetizar experimentalmente as consequências desenvolvimentais da exposição à adversidade durante períodos iniciais de vida (Andersen, 2015; Molet, Maras, Avishai-Eliner, & Baram, 2014; Nishi et al., 2014; Pryce & Feldon, 2003; Vetulani, 2013). Dentre os modelos existentes, a SM é considerado um dos modelos mais robustos e capazes de proporcionar uma abordagem padronizada para avaliação das alterações neurobiológicas e comportamentais decorrentes dessa exposição (Andersen, 2015; Nylander & Roman, 2013; Schmidt, Wang, & Meijer, 2011; Vetulani, 2013). O paradigma de SM encontra-se fundamentado na importância do papel e dos comportamentos maternos no desenvolvimento do filhote, envolvendo aspectos da relação entre mãe e filhote que vão além do simples atendimento das necessidades nutricionais (Harlow & Zimmermann, 1959; Harrison, Jaehne, Jawahar, Corrigan, & Baune, 2014; Pryce & Feldon, 2003). Além disso, reconhece-se que a

perturbação da relação entre mãe e filhote é capaz de conduzir a uma forte reação de protesto e desespero do animal neonato. Essas reações significativas em conjunto com a imaturidade dos sistemas neurobiológicos responsáveis por responder aos estressores ambientais acarretaria no aumento da carga alostáticas, resultando em sérias consequências para funções fisiológicas e hormonais e induzindo alterações em fenótipos comportamentais, cognitivos e neuroquímicos na idade adulta (Andersen, 2003; Holmes et al., 2005; Vetulani, 2013).

Apesar do modelo original de SM ter sido desenvolvido por Levine (1967) e ser baseado em um período único de separação por 24 horas, o modelo mais utilizado baseia-se na separação de 3 a 4 horas ao longo do período que se estende do dia pós-natal (PND) 2 até o PND14 ou até o PND20-21. Várias outras variações de modelos de SM também são encontradas, incluindo distinções no tempo de privação de cuidado, na duração de dias, bem como nos procedimentos realizados pelos respectivos protocolos (Andersen, 2015; Anisman, Zaharia, Meaney, & Merali, 1998; Gutman & Nemeroff, 2002). Embora tais variações não pareçam significativas, têm se observado distinções entre diferentes estudos no que se refere às conclusões sobre a efetividade do paradigma de SM em produzir alterações em diferentes fenótipos comportamentais (e.g., ansiedade, depressão e medo). Os desfechos acabam se tornando dependentes da metodologia utilizada, uma vez que possivelmente haja diferenciações na intensidade da exposição ao estresse induzido pela privação materna entre os vários paradigmas de SM (Andersen, 2015; Vetulani, 2013).

## **2.5. Justificativa**

Apesar de diversas investigações em modelos clínicos e pré-clínicos terem sido realizadas na última década acerca dos efeitos do estresse precoce sobre o desenvolvimento, ainda se possui um conhecimento limitado em relação aos possíveis mecanismos responsáveis por mediar tais efeitos. Recentes estudos no campo da epigenética têm procurado alvos moleculares que possam estar no cerne de modificações biológicas específicas e, da consequente, expressão de fenótipos comportamentais distintos do que seria esperado na idade adulta. Embora muito desses estudos estejam sendo realizados com humanos, reforçando a validade biológica dos seus achados, seus desenhos retrospectivos e/ou associativos podem representar um fator limitante à extensão de suas interpretações. Estudos experimentais, no entanto, principalmente com modelos animais possibilitam, através da manipulação e do controle de diversas variáveis, uma maior capacidade de interpretação e conclusão de seus achados, especialmente no que se refere à descoberta de alvos e

mecanismos celulares e moleculares ligados ao estresse no início da vida, e suas implicações desenvolvimentais.

Não somente esses fatores têm se mostrado como uma vantagem dos estudos com modelos animais em comparação a estudos clínicos, mas também o aumento das evidências que sugerem a existência de uma variabilidade de repertórios comportamentais entre os animais, a exemplo de roedores, que se demonstram análogos aos avaliados em humanos. Alguns desses comportamentos inclusive têm sido validados como modelos potenciais de transtornos psiquiátricos, incluindo Transtornos de Humor e Ansiedade e Transtornos Relacionados ao Uso de Substância (Pryce & Feldon, 2003; Schmidt et al., 2011; Vetulani, 2013). Assim, avaliações de comportamentos em animais vêm sendo considerados como endofenótipos de determinados transtornos mentais, pois avaliam comportamentos pertencentes aos componentes centrais desses transtornos (Castellanos & Tannock, 2002). Isso possibilita comparações diretas entre as espécies caso seus resultados demonstrem-se com o mesmo efeito (Andersen, 2015)

Considerando que entre as pesquisas na temática de estresse precoce em modelos animais com roedores, o modelo de SM tem se destacado como um dos paradigmas mais bem consolidados e utilizados. Diversas evidências reforçam as associações encontradas entre o estresse pós-natal induzido pela SM e alterações em comportamentos tipo ansiedade e depressão, considerados análogos a condições psiquiátricas de depressão e ansiedade. Além disso, modificações no funcionamento de sistemas neuroendócrinos e imunológicos têm sido identificadas através da avaliação de marcadores específicos, incluindo hormônios glicocorticoides, expressão de proteínas em regiões cerebrais como hipocampo e córtex pré-frontal, bem como níveis centrais e periféricos de citocinas inflamatórias. Embora haja um corpo de evidências que convergem para alterações específicas decorrentes do estresse precoce, o modelo de SM têm apresentado alguns resultados inconclusivos e contraditórios em relação ao seu impacto neurobiológico e comportamental. Autores defendem que possíveis diferenças metodológicas e nos procedimentos experimentais podem ser responsáveis por algumas discrepâncias entre os estudos (Molet et al., 2014; Nylander & Roman, 2013; Schmidt et al., 2011). Por exemplo, por mais consolidado que esteja o modelo de SM, argumenta-se que ainda existem indefinições quanto à nomenclatura, definição conceitual e procedimento experimental entre os vários estudos que optam por utilizar esse modelo de estresse precoce. Tais diferenças acarretariam na prática em uma ausência de um único modelo de SM, abrindo uma lacuna para modelos de SM que se assemelham, porém que possuem especificidades em seus procedimentos (Nylander & Roman, 2013).

De uma maneira geral, a SM consiste em repetidas intervenções com objetivo de romper a relação mãe-filhotes, por meio da privação do cuidado materno durante os primeiros dias de vida dos neonatos. No entanto, existem diversas especificidades do modelo, como o tempo de exposição diária a privação de cuidado e duração em dias do protocolo de estresse, além de pequenas diferenças nos procedimentos adotados durante o procedimento. Tais diferenças sutis podem em alguns casos conduzir a resultados inconsistentes e pouco confiáveis. Ainda, outro aspecto a ser considerado são diferenças entre as linhagens, condições de manutenção e manipulação dos animais nos diferentes laboratórios. Esses fatores, em conjunto, representariam um sério problema para a replicação dos achados desses estudos, além de tornar complicada qualquer tentativa de compilação e análise dos seus resultados através de estudos sistematizados e meta-analíticos, ainda bastante escassos entre estudos pré-clínicos (Hooijmans, Leenaars, & Ritskes-Hoitinga, 2010; Kilkenny et al., 2009). Embora o modelo de SM não esteja livre de críticas e potenciais limitações na translação de seus achados para modelos com humanos, a SM em roedores é comprovadamente capaz de mimetizar os efeitos do estresse precoce, principalmente da negligência parental em crianças (Molet et al., 2014).

Tomado em consideração o exposto, a presente dissertação foi organizada em duas sessões distintas que compreendem duas investigações com objetivos distintos. A primeira sessão, composta pelo estudo 1 (estudo teórico), objetiva realizar uma revisão sistemática em quatro etapas, de caráter metodológico, dos estudos de SM que buscaram investigar desfechos comportamentais em camundongos. Esse estudo fundamenta-se nas várias evidências que sugerem para potenciais problemas metodológicos e conceituais no que se refere ao modelo de SM. Mais que isso, em razão da variabilidade sugerida por alguns autores entre os modelos de SM, a revisão busca compilar e estabelecer uma definição clara e padronizada acerca das definições, nomenclatura e abreviações para os modelos de SM. Ainda, a revisão possui o objetivo de fornecer um panorama geral a respeito dos efeitos observados pelos estudos de SM nos fenótipos comportamentais estudados, bem como em variáveis biológicas e moleculares. Já a segunda sessão, que compreende o estudo 2 (estudo empírico) da presente dissertação, almeja investigar os efeitos da SM em comportamentos tipo ansiedade em camundongos, machos, da linhagem Balb/c na idade adulta, a fim de identificar possíveis alterações fenotípicas em decorrência do estresse precoce.

## **2.6. Objetivos**

### **2.6.1 Estudo de Revisão**

- (1) Revisar os modelos de separação materna utilizados em camundongos para avaliar os efeitos do estresse precoce em desfechos comportamentais.
- (2) Avaliar a qualidade do relatório metodológico dos estudos com separação materna e desfechos de comportamento.
- (3) Propor uma definição clara e padronizada acerca das definições, nomenclatura e abreviações para os modelos de separação materna.
- (4) Descrever os principais efeitos da separação materna encontrados entre os estudos revisados.

### **2.6.2 Estudo Original**

- (1) Comparar o desempenho de camundongos adultos expostos e não expostos à separação materna na infância em uma bateria de tarefas de comportamentos tipo ansiedade.
- (2) Investigar possíveis alterações no comportamento materno e nos padrões de comportamento materno em decorrência da exposição das mães ao protocolo de separação materna.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo principal da presente dissertação foi investigar os efeitos da SM durante a infância em fenótipos comportamentais de ansiedade em camundongos da espécie Balb/c na idade adulta, através de uma bateria de tarefas consolidadas para avaliação de comportamentos tipo ansiedade. O estudo empírico foi desenhado para responder tal questão de pesquisa, de modo que, os achados desse estudo foram capazes de corroborar as evidências encontradas na literatura que referem a SM como um fator de risco ambiental para o desenvolvimento de fenótipos específicos subjacentes a determinadas psicopatologias. Além disso, observou-se que a SM influencia também comportamentos associados ao julgamento e tomados de decisão frente às situações de perigo e ameaça. Os achados, de maneira geral, revelaram que camundongos expostos a SM apresentam um aumento dos comportamentos tipo ansiedade, sendo também evidenciado um aumento na resposta fisiológica relacionada à ansiedade, através da quantificação do número de bolos fecais produzidos durante a realização das tarefas. No que se referem aos comportamentos relacionados ao julgamento e tomada de decisão, os camundongos expostos a SM apresentaram uma redução significativa nos índices de exploração/coleta de informações e avaliação de risco considerados comportamentos análogos a JTD (Cruz, Frei, & Graeff, 1994; Mikics, Barsy, Barsvari, & Haller, 2005; Rodgers & Johnson, 1995).

Considerando o campo de pesquisa pré-clínico sobre ELS e suas consequências desenvolvimentais, este estudo diferencia-se dos anteriores principalmente por abarcar em seu delineamento experimental uma bateria composta por diferentes tarefas que avaliam comportamentos tipo ansiedade. O uso de mais de uma tarefa que se propõe a avaliar um mesmo fenótipo comportamental minimiza a possibilidade de um viés nos resultados em decorrência de efeitos dependentes da tarefa. Dessa forma, nossos achados possuem potencial de reforçar a validade do modelo de SM como um modelo capaz de conduzir a alterações fenotípicas na idade adulta. Ainda, a partir da utilização de parâmetros adicionais de avaliação de comportamento nas tarefas utilizadas, foi possível avaliar o impacto do estresse precoce em comportamentos correlacionadas a ansiedade, como comportamentos relacionados à JTD e mudança de atividade. A validação do modelo de SM abre caminho para a investigação de possíveis alvos moleculares e biológicos que possam embasar tais diferenças comportamentais. Até onde se tem conhecimento, ainda não foram descobertos alvos específicos responsáveis pelos efeitos da SM no desenvolvimento desses comportamentos.

Sabe-se, no entanto, que os possíveis mecanismos relacionados a tais efeitos derivam de uma interação complexa entre modificações em nível celular, molecular e biológico em consequência a exposição recorrente a adversidades no início da vida (Murgatroyd & Spengler, 2011).

Por mais que o estudo empírico apresente algumas limitações, como não ter mensurações de variáveis biológicas e moleculares, principalmente em alvos associados à regulação do eixo HPA, vários estudos que investigaram desfechos comportamentais em conjunto com medidas neurobiológicas têm apresentado evidências consistentes que apontam para uma relação entre as alterações comportamentais e neurobiológicas investigadas. Por exemplo, De Palma (2015) avaliou os efeitos da SM em comportamentos tipo ansiedade e depressão e, concomitante, avaliou os níveis periféricos de corticosterona. Os resultados encontrados foram convergentes indicando um aumento dos comportamentos tipo ansiedade e depressão em conjunto com aumento dos níveis de corticosterona. Da mesma forma, Garcia-Gutiérrez (2015) encontrou um aumento dos comportamentos tipo ansiedade e depressão associados a uma redução dos níveis transacionais de *BDNF* e *NR3C1* região do hipocampo. Esses achados sugerem alterações moleculares e neurobiológicas como consequência de uma exposição ao estresse precoce e que, possivelmente, estão implicadas na manifestação dos fenótipos comportamentais investigados. Assim, a hipótese mais estabelecida a respeito dos efeitos do estresse precoce fundamenta-se na avaliação dos mecanismos responsáveis pela reprogramação do funcionamento do eixo HPA já em períodos precoces, através de alterações na expressão gênica, níveis transcripcionais e pós-transcripcionais de proteínas relacionadas aos receptores de glicocorticoide em diferentes regiões cerebrais que regulam a atividade do eixo HPA (Murgatroyd & Spengler, 2011). No entanto, alterações no sistema imunológico e nos níveis transcripcionais e pós-transcripcionais do *BDNF* parecem ter uma forte relação com as modificações do perfil neurobiológico dos indivíduos expostos ao estresse precoce (Branchi & Cirulli, 2014). O *BDNF* possui um papel importante no crescimento neuronal e plasticidade sináptica, processos essenciais para o adequado desenvolvimento de estruturas cerebrais (Bekinschtein, Cammarota, & Medina, 2014).

Embora ainda se observe uma inconsistência entre alguns achados associados a SM, com estudos apresentando resultados nulos ou que contradizem a hipótese da SM como capaz de produzir efeitos deletérios no desenvolvimento, discute-se que tais achados podem decorrer de sutis diferenças metodológicas entre os estudos. Algumas revisões sobre o paradigma de SM têm abordado tal temática, sugerindo que distinções entre os procedimentos de execução do modelo de SM, além de diferenças na escolha da linhagem dos camundongos

e do sexo dos animais a serem estudado podem influenciar para a variabilidade dos achados (Andersen, 2015; Holmes et al., 2005; Nylander & Roman, 2013; Pryce & Feldon, 2003; Schmidt, Wang, & Meijer, 2011).

Tendo em vista os recentes debates acerca das possíveis influências dos aspectos metodológicos nos resultados advindos de estudos de SM, a sessão teórica da dissertação procurou, através de uma abrangente revisão sistemática, revisar e descrever os modelos de SM utilizados em camundongos para avaliar os efeitos do estresse precoce em desfechos comportamentais. A descrição dos diferentes modelos de SM utilizados entre os estudos também permitiu a elaboração de uma proposta de definição conceitual e de nomenclatura padrão a ser seguida pelos estudos que utilizam protocolos de SM. Tal proposta almeja homogeneizar a nomenclatura e os procedimentos utilizados pelos estudos e, conseqüentemente, facilitar a compreensão e a interpretação dos efeitos decorrentes da SM nos desfechos avaliados. Ainda, um objetivo adicional da revisão procurou avaliar a qualidade dos relatórios metodológicos dos artigos revisados. Os dados provenientes dessa avaliação reforçam a importância da elaboração de relatórios metodológicos de qualidade, uma vez que diversos detalhes metodológicos e variáveis intervenientes têm se mostrado capazes de enviesar os efeitos da SM. Assim, o autor sugere que se faça a escolha do paradigma de SM a ser utilizado com embasamento da pergunta de pesquisa a ser respondida, procurando atender ao máximo as opções metodológicas sugeridas no estudo teórico. Essa medida irá possibilitar não somente uma maior homogeneização entre os estudos de SM, como também resultará em um maior controle das variáveis intervenientes. Assim, as pesquisas que utilizam modelos de SM serão capazes de mimetizar adversidades em períodos iniciais do desenvolvimento com maior fidedignidade.

As implicações destes achados se fazem relevantes no atual cenário da pesquisa pré-clínica nacional e internacional com modelos de SM, uma vez que se percebe um crescimento exponencial no número de estudos publicados com o tema. Acredita-se, que caso não haja uma padronização dos procedimentos experimentais utilizados pelos pesquisadores que adotam tal paradigma, com a crescente de evidências existe o risco de alcançarmos um número muito elevado de achados controversos, acarretando em uma perda significativa da validade do modelo. Neste sentido, a presente revisão almeja servir de guia para futuros estudos empíricos e de meta-análise com SM e desfechos comportamentais subjacentes.