

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA/NEUROCIÊNCIAS

NAYARA COBRA BARREIRO BARROCA

Estresse pós-traumático experimental:

Influência do estresse precoce e caracterização de circuitos neuronais

RIBEIRÃO PRETO

2020

NAYARA COBRA BARREIRO BARROCA

Estresse pós-traumático experimental:

Influência do estresse precoce e caracterização de circuitos neuronais

Versão original

Dissertação apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Neurologia/ Opção: Neurociências

Orientador: **Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco**

RIBEIRÃO PRETO

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cobra Barreiro Barroca, Nayara

Estresse pós-traumático experimental: Influência do estresse precoce e caracterização de circuitos neuronais
Ribeirão Preto, 2019.

115 p.

Dissertação apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Norberto Garcia-Cairasco

1. Estresse precoce. 2. Transtorno do estresse pós-traumático. 3. Comportamento materno. 4. Egr1. 5. Arc. 6. c-Fos. 7. Plasticidade sináptica. 8. Circuitos neuronais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

BARROCA, N. C. B. (2019). **Estresse pós-traumático experimental: Influência do estresse precoce e caracterização de circuitos neuronais** (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Aprovado em: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

*Às crianças em situação de violência, negligência e vulnerabilidade,
seja física, social ou emocional. Meu desejo é que um dia esse trabalho não faça sentido,
por não haver mais crianças em condições assim.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia/Neurociências, onde o trabalho foi realizado, pela infraestrutura e apoio, e aos funcionários dessa instituição, que facilitaram minha passagem por aqui.

Às agências de fomento – CNPq, CAPES, FAEPA-FMRP – pelo suporte financeiro ao laboratório, e especialmente à FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado e de estágio no exterior.

Ao Laboratório de Neurofisiologia e Neuroetologia Experimental (LNNE), especialmente ao Prof. Dr. Norberto García Cairasco, meu orientador, pela acolhida, incentivo diário, suporte nas minhas ambições e a oportunidade de aprender e desenvolver esse trabalho no laboratório. Mais do que ciência, aqui renovei minha certeza de que um país justo só se faz com educação, arte e sociedade. Você é inspiração por se dedicar com tanto carinho a esses pilares que nos fazem humanos.

Ao Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia (LNN) e ao Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, co-orientador, por abrir as portas do laboratório para que eu desenvolvesse parte importante dessa pesquisa e por todas discussões que resultaram em aprendizados e trocas muito além da colaboração científica. Estendo o agradecimento aos membros de laboratório que me auxiliaram na inserção em um ambiente diferente, e tiveram paciência com minhas demandas de agendamento da arena, especialmente ao Tayllon dos Anjos Garcia, que, além disso, me acompanhou em todo o treinamento para análises comportamentais.

Ao Prof. Dr. Eduardo Henrique de Lima Umeoka, ou Edu, co-orientador, pela amizade e por estar ao meu lado em todas as etapas do meu crescimento científico, me auxiliando na elaboração, execução e discussões do projeto principal e da BEPE. Você foi meu ponto de equilíbrio sem nem se dar conta! Esteve presente sempre que precisei, mesmo quando um de nós estava na Holanda e o outro no Brasil, ou ainda quando encerrou o vínculo com USP e foi ser Professor em outro estado (que sorte

dos seus alunos!). Admiro muito a pessoa e o cientista que é. É muito bom trabalhar com você e desejo vida longa à nossa parceria.

To the University of Amsterdam - Swammerdam Institute for Life Sciences (SILS), where the abroad internship was conducted, for the institutional infrastructure and support, as well as the staff of this Institution. Special thanks to Prof. Dr. Harm Krugers for welcoming me in his lab and all the knowledge shared. Thanks to the entire Prof. Dr. Lucassen research group (students, PhD, technicians), specially Niek Brosens, who introduced me into the electrophysiology experiments, and Gideon Meerhoff for his great support in the immunohistochemistry. Living in Amsterdam for a while, the learning of techniques and skills, and the opportunity of developing part of my Master's with so respectfull group was one of the most special experiences of all my life. I can't be more grateful to all members who make me feel at home, even crossing an Ocean. "Dank je wel!"

Ao time LNNE: Gabriel, Adrieli, Samuel, Jordan, Suélen, Lívea, Polianna, Matheus, Willian, Rui, Artur, Alexandra e Ana Luiza, por me auxiliarem sempre que solicitado, por dividirem as dificuldades da Pós-Graduação e da vida. Pelo companheirismo e carinho. A convivência, o amor e a amizade de vocês eu quero para sempre e foi o que fez o Mestrado mais leve e divertido!

À Ana Luiza Ferreira e ao Samuel Grisote, por realizarem para mim as perfusões dos animais, quando não podia estar em dois lugares ao mesmo tempo. À Heloísa Costa, por compartilhar comigo sua experiência com as avaliações comportamentais de cuidado materno. Ao Artur Fernandes, por me introduzir no mundo da biologia molecular. Ao Rui Milton, pela paciente ajuda com o ImageJ. Ao Julian Tejada pelo auxílio com os cálculos de matrizes, taxas de entropia e construção de grafos. Ao Rubens Melo (Rubinho), técnico do Departamento de Fisiologia, pela paciência nos meus pedidos de auxílios com o criostato. Aos técnicos do LNNE, José Antônio Oliveira e Flavio Del Vecchio, pela amizade e por fazerem esse laboratório funcionar, sendo os motores do laboratório, o apoio e o abraço necessário a qualquer hora.

Aos meus amigos de graduação, minha família desde que cheguei nessa cidade há quase 10 anos. Igor (Pepino), Mara (Xamã), Marina (Soldier), Renan (Bastardo), Vanessa (Poti), Yunan (Pajé): Ribeirão Preto só tem sentido porque tive vocês. Especialmente a Poti, com quem dividi o teto e a vida todo o tempo, num ambiente de irmandade que só agradeço. Aos amigos de fora de Ribeirão: às meninas de Pouso Alegre e às de Washington-PA-EUA, partes importantes e especiais da minha vida e que acompanham meus passos até aqui, com todo apoio e carinho que eu poderia desejar.

Aos meus pais, Thelma e Fernando, por serem meu porto seguro e meu cantinho de apoio, compreensão e amor em tudo que eu já me propus a fazer. Por confiarem em mim e acreditarem na pesquisa que eu faço, dando o suporte que eu precisei para continuar fazendo. A empolgação de vocês com minhas conquistas foi e é combustível para eu seguir me dedicando. Ao meu irmão, Thiago, e especialmente à minha irmã, Mariana, que mesmo muitas vezes sem entender as minhas dificuldades, foi o ouvido e o colo que eu procurei. Sou privilegiada de ter uma família tão presente e de tanto carinho.

Ao Fábio, por a quilômetros de distância se fazer tão presente, ser o meu amor e a minha paz. Por ter encarado comigo todas dificuldades de um relacionamento a distância. Pela compreensão com as ausências que se fizeram necessárias durante a execução desse projeto. A certeza do seu apoio, do nosso amor e do seu abraço-casa me deu mais segurança para trilhar esse caminho.

.....

Sou feliz e privilegiada por concluir esse Mestrado ao lado de tanta gente querida e competente. Dedicar à ciência e à educação, em um país onde professores e cientistas são tratados com tanto descaso, é o meu ato de resistência. Sigo acreditando e lutando por uma educação pública, gratuita, inclusiva e de qualidade, seja dentro do laboratório, na sala de aula, ou nas ruas.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro de:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP):

Concessão de bolsa de Mestrado (Processo 2017/10484-6) e de estágio no exterior – BEPE (Processo 2018/21240-3);

Projeto Temático, coordenador Prof. Norberto Peporine Lopes - auxílio financeiro no pagamento dos custos de animais de experimentação (Processo 2014/50265-3);

Projeto Individual, coordenador Prof. Norberto Garcia Cairasco - auxílio financeiro ao laboratório (Processo 2019/05957-8).

- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), coordenador Prof Dr Jaime Eduardo Cecilio Hallak – auxílio financeiro ao laboratório, sobretudo no pagamento dos custos de animais de experimentação e reagentes de biologia molecular (Processo CNPq: 465458/2014-9 e Processo FAPESP: 2014/50891-1).

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Apoio financeiro ao laboratório.

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) – Apoio financeiro ao laboratório.

- Fundação de Assistência ao Ensino e Pesquisa (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – auxílios para participação de eventos.

RESUMO

BARROCA, Nayara Cobra Barreiro. **Estresse pós-traumático experimental: Influência do estresse precoce e caracterização de circuitos neuronais**. 2020. Dissertação (Mestrado em Neurologia/Neurociências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Situações estressantes no início da vida (ELS), como abuso físico, sexual e emocional ou negligência, estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de psicopatologias na vida adulta, como por exemplo, o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), um transtorno desencadeado por um evento traumático, notavelmente caracterizado por sintomas relacionados a revivências do trauma, respostas de evitação e de hipervigilância. Os sintomas do TEPT refletem mudanças induzidas pelo estresse nos sistemas neurobiológicos e adaptação inadequada desses sistemas à exposição a estressores intensos, havendo fatores que contribuem para a vulnerabilidade ou resiliência individual ao transtorno. O objetivo foi avaliar os efeitos de um modelo de ELS no padrão de cuidado maternal e suas consequências na dinâmica de ativação hipocampal por proteínas relacionadas à plasticidade sináptica (*Egr1*, *Arc* e *c-Fos*) e na atividade eletrofisiológica, durante as primeiras três semanas de desenvolvimento, bem como as consequências comportamentais e circuitos neuronais ativados após um segundo estressor agudo na vida adulta, em modelo experimental de TEPT baseado no paradigma de confronto com predador. Identificamos alterações no padrão de cuidados materno, notavelmente uma maior taxa de entropia para o grupo ELS, uma maior amplitude de registros de correntes excitatórias (mEPSCs) em fatias hipocampais no P9 ELS, bem como densidade reduzida de células *dVenus+* e *c-Fos+* em P21 ELS. Além disso, pudemos observar uma diferença qualitativa no padrão de ativação e distribuição de células positivas para *dVenus*, *Egr1*, *Arc* e *c-Fos*, independentemente do protocolo ELS, uma indicação de mudanças no desenvolvimento. Destacam-se, ainda, algumas diferenças comportamentais diante de exposição ao predador entre grupos ELS e CTRL no modelo comportamental tipo-TEPT, como alterações nas respostas de fuga para machos e tempo de permanência em áreas protegidas para fêmeas, além de aumento na densidade de células *c-Fos+* no PVN de animais ELS que foram expostos ao trauma.

Palavras-chave: Estresse precoce; transtorno do estresse pós-traumático; comportamento materno; *Egr1*; *Arc*; *c-Fos*, plasticidade sináptica, circuitos neuronais.

ABSTRACT

BARROCA, N. C. B. **Experimental posttraumatic stress disorder: the influence of early life stress and characterization of neural circuits.** 2020. Dissertação (Mestrado em Neurologia/Neurociências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Early life stress (ELS) situations such as physical, sexual and emotional abuse or neglect are associated with a higher risk of developing psychopathology in adulthood, such as posttraumatic stress disorder (PTSD), triggered by a traumatic event, notably characterized by symptoms related to trauma relief, avoidance and hypervigilance responses. PTSD symptoms reflect stress-induced changes in neurobiological systems and their inadequate adaptation to exposure to intense stressors, with factors contributing to individual vulnerability or resilience to the disorder. The aim of this study was to evaluate the effects of an ELS protocol on maternal care pattern and its consequences on the dynamics of hippocampal activation by proteins related to synaptic plasticity (*Egr1*, *Arc* and *c-Fos*) and in the electrophysiological hippocampal activity/currents (mEPSCs) from P9 to P21, as well as the behavioral consequences and activation of neuronal circuits after a second acute stressor in adulthood, in an experimental PTSD model based on the predator confrontation paradigm. We identified changes in maternal care pattern, notably a higher entropy rate for ELS group, a greater amplitude of mEPSC recordings in P9 ELS, as well as reduced *dVenus+* and *c-Fos+* cell density in ELS P21. Furthermore, we could observe a qualitative difference in the pattern of activation and distribution of *Egr1*, *Arc* and *c-Fos* positive cells, regardless of the ELS protocol, an indication of developmental changes. We highlight some behavioral differences after exposure to predators between ELS and CTRL groups in the PTSD-like model, such as alterations in escape responses for ELS males and time spent in the burrow for ELS females, as well as an increase in the density of *c-Fos+* cells in the PVN of ELS animals that were exposed to trauma.

Keywords: Early life stress; posttraumatic stress disorder; maternal behavior; *Egr1*; *Arc*; *c-Fos*, synaptic plasticity, neural circuits.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Delineamento experimental do projeto. A) Linha do tempo com os procedimentos realizados em cada momento da neuroprogressão. B) Detalhamento dos grupos experimentais. 33

Figura 2. Porcentagem do total de ocorrências dos comportamentos não-maternais A) mãe alimentando-se, B) mãe longe do ninho explorando a caixa C) mãe fazendo auto-limpeza, D) mãe longe do ninho não-explorando a caixa; e comportamentos maternos E) mãe em posição passiva, F) mãe lambendo/limpando filhotes (*licking/grooming*), (G) construção de ninho/carregando filhotes (H) blanket + cifo, somando-se os 8 dias de observações para cada uma das 4 sessões diárias, para grupos ELS (n=13) e CTRL (n=12). * p < 0.05 diferente de CTRL na mesma sessão; # p < 0.05 diferente do próprio grupo as 8h; % p < 0.05 diferente do próprio grupo às 19h. 39

Figura 3. A) Taxa de entropia por Cadeias de *Markov* das sequências comportamentais somando-se os 8 dias de observações para cada uma das quatro sessões diárias, para grupos ELS (n=13) e CTRL (n=12). * p < 0.05 diferente de CTRL na mesma sessão; # p < 0.05 diferente do próprio mesmo grupo as 8h; % p < 0.05 diferente do próprio grupo às 19h. B) Grafos representativos da dinâmica de transição entre os oito comportamentos analisados para uma mãe de cada grupo, na sessão das 8h. Cada letra representa um dos comportamentos, conforme descrito anteriormente. O tamanho dos nós (círculos) é proporcional a frequência de ocorrência de cada comportamento e as setas representam as transições entre comportamentos (transições duplicadas não mostradas). Nós azuis referem-se aos comportamentos não-maternais e vermelhos, comportamentos maternos. 42

Figura 4. Peso corporal (g) de camundongos C57BL6 (Brasil) A) machos e B) fêmeas, CTRL e ELS, em P2, P10, P15 e P21. * p < 0.0001 quando comparado com o CTRL. n = 15 (CTRL macho); 19 (ELS macho); 14 (CTRL fêmea) e (12 ELS fêmea)..... 44

Figura 5. Peso corporal (g) de camundongos Arc::dVenus (Holanda) A) machos e B) fêmeas, CTRL e ELS, em P2, P9 e P21. * p < 0.0001 quando comparado ao controle. n = 13 (macho CTRL); 17 (macho ELS); 14 (fêmea CTRL) e 9 (fêmea ELS)..... 44

Figura 6. Expressão relativa do mRNA de *Egr1* em CTRL e ELS em P21. n = 15 (CTRL); 12 (ELS). 53

Figura 7.. Parâmetros avaliados nos eventos de mEPSCs em animais P9 e P21. Da esquerda (cinza claro) para a direita (preto): P9 CTRL (n = 19); P9 ELS (n = 17); P21 CTRL células dVenus negativas (n = 8); P21 CTRL células dVenus positivas (n = 4); P21 ELS células dVenus negativas (n = 6); P21 ELS células dVenus positivas (n = 5). A) Frequência (Hz); B) Amplitude (pA) e c) Tempo de decaimento (ms). D) Exemplo de um registro de evento de mEPSCs. * p < 0.001 quando comparado a qualquer outro grupo, # p < 0.0001 efeito da idade (P9 < P21)..... 54

Figura 8. A) Fotomicrografia de 40 µm de secções coronais do hipocampo de camundongos Arc::dVenus, mostrando células dVenus positivas. De cima para baixo: P9 CTRL, P9 ELS, P21 CTRL (secção anterior); P21 ELS (secção anterior); P21 CTRL (secção posterior) e P21 ELS (secção

posterior). Barras de escala representam 100 μm . Representação estereotóxica com ponto vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia está mostrada em B) para secções anteriores e em C) para secções posteriores. 56

Figura 9. Contagem de células positivas para dVenus, por área, em filhotes P21. Na coluna esquerda, estão os resultados obtidos a partir da contagem em secções anteriores e na coluna direita, a partir das secções posteriores. Linhas de cima para baixo: lâmina infrapiramidal do DG, lâmina suprapiramidal do DG e DG total (lâminas infra + suprapiramidais). As barras de cinza claro a preto representam CTRL masculino (n = 5 anterior e 5 posterior), CTRL feminino (n = 7 anterior e 5 posterior), ELS masculino (n = 11 anterior e 9 posterior) e ELS feminino (n = 7 anteriores e 4 posteriores), respectivamente. G) Representação dos critérios utilizados para delimitar lâminas infra e suprapiramidais. GCL: camada de células granulares, SGZ: zona subgranular (Ilustração editada de ALVES et al. 2017). # p < 0.05 efeito do ELS (ELS < CTRL). 57

Figura 10. Proporção de células dVenus+ que também são positivas para Arc, em filhotes P21. A) Fotomicrografia de 40 μm de seções coronais do hipocampo de camundongo Arc::dVenus com marcações para Arc. Barras de escala representam 100 μm . B) Representação estereotóxica com ponto vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia. C) Proporção (porcentagem) de células dVenus+ também Arc+. As barras cinza, azul, preto e laranja representam os grupos CTRL macho (n = 2), CTRL fêmea (n = 9), ELS macho (n = 7) e ELS fêmea (n = 14), respectivamente. 58

Figura 11. Imunoistoquímica para Egr1. A) Fotomicrografia de 40 μm de seções coronais do hipocampo de camundongos mostrando imunorreatividade à proteína Egr1 no DG de P9 CTRL (n = 8), P9 ELS (n = 4), P21 CTRL (n = 8) e P21 ELS (n = 7). Barras de escala representam 100 μm . Representação estereotóxica com ponto vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia está mostrada em B) para P9 e C) para P21. D) Intensidade de Egr1 no DG de P9 e H) intensidade de Egr1 na região CA1 de P21. 60

Figura 12. Imunoistoquímica para Arc. A) Fotomicrografia de seções coronais de 40 μm do hipocampo de camundongos mostrando imunorreatividade para proteína Arc no DG de P9 CTRL, P9 ELS, P21 CTRL (n = 8 anterior e 5 posterior) e P21 ELS (n = 6 anterior e 7 posterior). Barras de escala representam 100 μm . Representação estereotóxica com ponto vermelho indicando a região observada nas imagens microscópicas é mostrada em B) para P9; C) para P21 (fatia anterior) e D) para P21 (fatia posterior). Densidade de células Arc+ em P21 está representado nos gráficos E) e F), para as regiões anterior e posterior, respectivamente. 61

Figura 13. Imunoistoquímica c-Fos. A) Fotomicrografia de 40 μm de seções coronais do hipocampo de camundongos mostrando imunorreatividade à proteína c-Fos no DG de P9 CTRL, P9 ELS, P21 CTRL (secção anterior), P21 ELS (secção anterior), P21 CTRL (secção posterior) e P21 ELS (secção posterior). Barras de escala representam 100 μm . Representação estereotóxica com pontos vermelhos indicando a região observada é mostrada em B) para P9; C) para P21 (fatia anterior) e D) para P21 (fatia posterior). 63

- Figura 14. Quantificação de c-Fos. Na coluna da esquerda, resultados da quantificação realizada nas fatias anteriores e na colunas direita, nas fatias posteriores. Linhas de cima para baixo: intensidade c-Fos em P9, densidade de células c-Fos+ na lâmina infrapiramidal do DG em P21, na lâmina suprapiramidal do DG em P21 e DG total em P21. n = 6 (P9 CTRL), 3 (P9 ELS), 8 (P21 CTRL anterior), 10 (P21 CTRL anterior), 7 (P21 CTRL posterior), 9 (P21 CTRL posterior), 9 (P21 ELS posterior). * p <0.01 diferente de CTRL. 64
- Figura 15. Esquema representativo da arena poligonal para serpentes e disposição inicial dos animais e dos objetos: A- Escadas, B- toca, C- serpente ou exúvia resultante da ecdise do ofídio, D- camundongo e E- filmadora para registro dos comportamentos. 66
- Figura 16. Fotomicroscopias de secreção vaginal corada, obtida de camundongas em diferentes fases do ciclo estral. A) Proestro, B) Estro, C) Metaestro e D) Diestro. Barra de escala equivale a 100 µm. 69
- Figura 17. Porcentagem do tempo total espendido dentro da toca por camundongos CTRL e ELS. A) machos e B) fêmeas. n= 6 (machos CTRL), 9 (machos ELS); 11 (fêmeas CTRL – 18% em proestro, 54% em estro, 9% metaestro, 18% diestro); 11 (fêmea ELS – 45% estro; 18% metaestro, 36% diestro)..... 72
- Figura 18. Comportamentos de avaliação de risco de camundongos CTRL e ELS, eliciado durante a exposição à serpente, sendo A) porcentagem do tempo total machos, B) porcentagem do tempo total fêmeas, C) BI machos e D) BI fêmeas n= 6 (machos CTRL), 9 (machos ELS); 11 (fêmeas CTRL – 18% em proestro, 54% em estro, 9% metaestro, 18% diestro); 11 (fêmeas ELS – 45% estro; 18% metaestro, 36% diestro)..... 73
- Figura 19. Comportamentos de fuga de camundongos CTRL e ELS, eliciado durante a exposição à serpente, sendo A) porcentagem do tempo total machos, B) porcentagem do tempo total fêmeas, C) BI machos e D) BI fêmeas. n= 6 (machos CTRL), 9 (machos ELS); 11 (fêmeas CTRL – 18% em proestro, 54% em estro, 9% metaestro, 18% diestro); 11 (fêmeas ELS – 45% estro; 18% metaestro, 36% diestro). 73
- Figura 20. Comportamentos de interação com a serpente de camundongos CTRL e ELS, eliciado durante a exposição à serpente, sendo A) porcentagem do tempo total machos, B) porcentagem do tempo total fêmeas, C) BI machos e D) BI fêmeas. n= 6 (machos CTRL), 9 (machos ELS); 11 (fêmeas CTRL – 18% em proestro, 54% em estro, 9% metaestro, 18% diestro); 11 (fêmeas ELS – 45% estro; 18% metaestro, 36% diestro). * p < 0.05, quando comparado com o CTRL..... 74
- Figura 21. Porcentagem do tempo total espendido dentro da toca por camundongos CTRL e ELS durante a re-exposição ao contexto com exúvia, sendo A) machos e B) fêmeas. n= 6 (machos CTRL sem trauma), 6 (macho CTRL + trauma), 10 (machos ELS sem trauma), 9 (macho ELS + trauma), 11 (fêmeas CTRL sem trauma – 54% estro, 9% metaestro, 36% diestro), 11 (fêmea CTRL + trauma – 18% estro, 36% metaestro, 36% diestro), 10 (fêmeas ELS sem trauma – 80% estro, 10% metaestro, 10% diestro), 10 (fêmeas ELS + trauma – 20% estro, 70% metaestro, 10% diestro). Efeito significativo do ELS (p < 0.0001) para fêmeas..... 76

Figura 22. Comportamentos de avaliação de risco de camundongos CTRL e ELS, expostos previamente a serpente (grupo trauma) ou não (sem trauma), durante a reexposição ao contexto com exúvia, sendo A) porcentagem do tempo total machos, B) porcentagem do tempo total fêmeas, C) BI machos e D) BI fêmeas. n= 6 (machos CTRL sem trauma), 6 (macho CTRL + trauma), 10 (machos ELS sem trauma), 9 (macho ELS + trauma), 11 (fêmeas CTRL sem trauma – 54% estro, 9% metaestro, 36% diestro), 11 (fêmea CTRL + trauma – 18% estro, 36% metaestro, 36% diestro), 10 (fêmeas ELS sem trauma – 80% estro, 10% metaestro, 10% diestro), 10 (fêmeas ELS + trauma – 20% estro, 70% metaestro, 10% diestro). Efeito significativo do ELS no BI de fêmeas ($p < 0.05$)... 77

Figura 23. Comportamentos de fuga de camundongos CTRL e ELS, expostos previamente a serpente (grupo trauma) ou não (sem trauma), durante a reexposição ao contexto com exúvia, sendo A) porcentagem do tempo total machos, B) porcentagem do tempo total fêmeas, C) BI machos e D) BI fêmeas. n= 6 (machos CTRL sem trauma), 6 (macho CTRL + trauma), 10 (machos ELS sem trauma), 9 (macho ELS + trauma), 11 (fêmeas CTRL sem trauma – 54% estro, 9% metaestro, 36% diestro), 11 (fêmea CTRL + trauma – 18% estro, 36% metaestro, 36% diestro), 10 (fêmeas ELS sem trauma – 80% estro, 10% metaestro, 10% diestro), 10 (fêmeas ELS + trauma – 20% estro, 70% metaestro, 10% diestro). * $p < 0.001$ diferença quando comparado grupos com e sem trauma. Efeito significativo também do trauma na porcentagem de tempo para machos, e no IB para fêmeas. 78

Figura 24. Comportamentos de interação com a exúvia para camundongos CTRL e ELS, expostos previamente a serpente (grupo trauma) ou não (sem trauma), durante a reexposição ao contexto com exúvia, sendo A) porcentagem do tempo total machos, B) porcentagem do tempo total fêmeas, C) BI machos e D) BI fêmeas. n= 6 (machos CTRL sem trauma), 6 (macho CTRL + trauma), 10 (machos ELS sem trauma), 9 (macho ELS + trauma), 11 (fêmeas CTRL sem trauma – 54% estro, 9% metaestro, 36% diestro), 11 (fêmea CTRL + trauma – 18% estro, 36% metaestro, 36% diestro), 10 (fêmeas ELS sem trauma – 80% estro, 10% metaestro, 10% diestro), 10 (fêmeas ELS + trauma – 20% estro, 70% metaestro, 10% diestro). * $p < 0.05$ quando comparado a CTRL. 79

Figura 25. Imunoistoquímica para c-Fos. A) Fotomicrografia de 40 μm de seções coronais do PVN de camundongos mostrando imunorreatividade à proteína c-Fos CTRL sem trauma ($n = 7$), CTRL com trauma ($n=6$), ELS sem trauma ($n=9$) e ELS com trauma ($n=9$). Barras de escala representam 100 μm . B) Representação estereotáxica com ponto vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia e C) Densidade de células c-Fos+ no PVN. 3V= Terceiro ventrículo. * $p < 0.0001$ em comparação com qualquer outro grupo. 82

Figura 26. Imunoistoquímica para c-Fos. A) Fotomicrografia de 40 μm de seções coronais da PAG de camundongos mostrando imunorreatividade à proteína c-Fos para CTRL sem trauma ($n = 5$), CTRL com trauma ($n=6$), ELS sem trauma ($n=7$) e ELS com trauma ($n=7$). Barras de escala representam 100 μm . B) Representação estereotáxica com ponto vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia e C) Densidade de células c-Fos+ na PAG. Aq= Aqueduto. 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média da porcentagem do total de eventos (%) \pm EPM para todos os comportamentos maternos e não maternos avaliados de P2 a P9. 40	
Tabela 2. Média da taxa de entropia \pm EPM para todas as sessões analisadas.....	41
Tabela 3. Média do peso corporal (g) \pm EPM para machos e fêmeas, CTRL e ELS.	44
Tabela 4. Sequencias de primers utilizados na qPCR	45
Tabela 5. Média \pm SEM para todos os parâmetros avaliados nos registros dos mEPSCs, em P9 e P21.	54
Tabela 6. Número médio de células dVenus+ por mm ² \pm EPM para machos e fêmeas, CTRL e ELS, nas regiões anterior e posterior do hipocampo, incluindo DG total, lâmina infra e suprapiramidal. ..	55
Tabela 7. Número médio de células c-Fos positivas / mm ² \pm EPM para P21 CTRL e P21 ELS, nas regiões anterior e posterior do hipocampo, incluindo lâmina infra e suprapiramidal do DG e DG total.	62
Tabela 8. Média \pm EPM da porcentagem do tempo total (%) e do IB dos comportamentos analisados durante a sessão de exposição à serpente.	74
Tabela 9. Média \pm EPM da porcentagem do tempo total (%) e do IB dos comportamentos analisados durante a sessão de re-exposição ao contexto.	80
Tabela 10. Média \pm EPM da densidade de células c-Fos+ (células/mm ²) no PNV e na PAG.	81
Tabela 11. Resumo dos principais efeitos neurais e comportamentais encontrados após o ELS.....	103

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Resposta ao estresse e estresse na vida precoce	19
1.2. Alterações funcionais e de desenvolvimento resultantes do estresse na vida precoce	20
1.3. Consequências do estresse na vida precoce na vida adulta	22
1.4. O transtorno de estresse pós-traumático	23
1.5. Uso de modelos animais no estudo de psicopatologia	26
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES	28
3. OBJETIVOS	29
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
4.1. Animais	30
4.2. Experimentos realizados ao longo da neuroprogressão	31
5. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE ELS	34
5.1. Materiais e métodos	34
5.1.1. Modelo de ELS: ninho limitado (Limited bedding and nesting – LBN)	34
5.1.2. Avaliação comportamental do cuidado materno	34
5.1.3. Análise da taxa de entropia	36
5.1.4. Avaliação do ganho de peso da ninhada	37
5.2. Resultados	37
5.2.1. Cuidado materno	37
5.2.2. Taxa de entropia	41
5.2.3. Peso corporal	43
6. EFEITOS A CURTO PRAZO DOS ELS NA PLASTICIDADE SINÁPTICA	45
6.1. Materiais e métodos	45
6.1.1. Expressão do gene <i>Egr1</i> por PCR em tempo real (qPCR)	45
6.1.2. Eletrofisiologia: correntes excitatórias pós-sinápticas em miniatura (mEPSCs)	46
6.1.3. Imunoistoquímica	47
6.1.3.1. Preparação do tecido	47
6.1.3.2. Células <i>dVenus+</i> em camundongos transgênicos <i>Arc::dVenus</i>	47

6.1.3.3. Imunofluorescência: co-localização de Arc com células dVenus+	48
6.1.3.4. Imunoistoquímica com DAB	48
6.1.3.4.1. Imuno-reatividade a Egr1	48
6.1.3.4.2. Imuno-reatividade a Arc	49
6.1.3.4.3. Imuno-reatividade a c-Fos	50
6.1.3.4.4. Finalização dos procedimentos	50
4.9.4.1. Análise imunoistoquímica	51
6.2. Resultados	52
6.2.1. Expressão gênica de Egr1	52
6.2.2. Eletrofisiologia: mEPSCs	52
6.2.3. Células dvenus positivas	54
6.2.4. Co-localização células Arc+ e dVenus+	57
6.2.5. Imunoreatividade a Erg1	57
6.2.6. Imunoreatividade a Arc	58
6.2.7. Imunoreatividade a c-Fos	61
7. EFEITOS A LONGO PRAZO DO ELS EM MODELO EXPERIMENTAL DE TEPT	65
7.1. Materiais e métodos	65
7.1.1. Trauma na vida adulta com exposição a predador: modelo de TEPT	65
7.1.2. Esfregação vaginal (determinação da fase do ciclo estral das fêmeas)	69
7.1.3. Imunoistoquímica	70
7.1.3.1. Preparação dos tecidos: perfusão	70
7.1.3.2. Imuno-reatividade a c-Fos	70
7.1.3.3. Análise imunoistoquímica	70
7.2. Resultados	71
7.2.1. Comportamento defensivo em modelo experimental de TEPT	71
7.2.1.1. Sessão exposição a serpente	71
7.2.1.2. Sessão reexposição ao contexto (com exúvia da ecdise da serpente)	75
7.2.2. Imunoreatividade a c-Fos	80
8. DISCUSSÃO	84
9. CONCLUSÕES	102
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resposta ao estresse e estresse na vida precoce

A resposta ao estresse resulta de um sistema altamente coordenado, complexo e evolutivamente conservado nas espécies, sendo crucial para a sobrevivência e adaptação de indivíduos em um ambiente dinâmico e resulta da habilidade de alterar de forma rápida e duradoura a atividade neuronal e, conseqüentemente, a fisiologia, o comportamento e a cognição em resposta a estressores (JOELS; BARAM, 2009; DASKALAKIS; YEHUDA; DIAMOND, 2013; LUCASSEN et al., 2014). Diferentes moléculas mediadoras, como hormônios e neurotransmissores, interagem promovendo uma resposta adequada a estressores, os quais podem ser entendidos como eventos que podem levar a riscos reais ou potenciais à homeostase dos indivíduos, especialmente durante situações imprevisíveis e incontroláveis (MCEWEN, 2003; DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; JOËLS et al., 2007; JOELS; BARAM, 2009; LUCASSEN et al., 2014).

A resposta ao estresse é principalmente desencadeada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), o qual consiste no núcleo paraventricular do hipotálamo, na parte anterior da glândula hipófise e no córtex da glândula adrenal, e é modulado pelo ritmo circadiano (DE KLOET; SARABDJITSINGH, 2008). Após exposição a um estressor, o núcleo paraventricular do hipotálamo é ativado e secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o qual estimula a hipófise anterior a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que através da circulação atinge o córtex (camada fasciculada) das glândulas adrenais e estimula a síntese e a liberação dos glicocorticoides (PALMA-GUDIÉL et al., 2015). Os produtos finais da ativação do eixo HHA, os glicocorticoides (corticosterona em roedores e cortisol em primatas), fazem mediação da

resposta ao estresse e promovem *feedback* negativo, bloqueando a resposta ao estresse na ausência do estressor (VAN VOORHEES; SCARPA, 2004; JOELS; BARAM, 2009).

A experiência do estresse pode ocorrer a qualquer momento ao longo da vida, do período pré-natal ao envelhecimento. Em seres humanos, a vida precoce corresponde ao período que vai desde a fecundação ao começo da adolescência, e representa um período em que a presença dos pais ou cuidadores é muito importante para que as crianças aprendam a responder a estressores de maneira física e emocionalmente saudável (LADD et al., 1999). Assim, embora determinado nível de estresse seja normal e um processo fundamentalmente adaptativo, e exerça papel no desenvolvimento de habilidades necessárias para lidar e se adaptar a situações novas e potencialmente ameaçadoras (JOELS; BARAM, 2009; LUCASSEN et al., 2014; OSÓRIO et al., 2017), a ativação repetida ou intensa de sistemas responsivos ao estresse, em particular durante a vida precoce, pode produzir efeitos prejudiciais no cérebro e no comportamento (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; DASKALAKIS; YEHUDA; DIAMOND, 2013).

1.2. Alterações funcionais e de desenvolvimento resultantes do estresse na vida precoce

Em períodos perinatais, o ambiente exerce um impacto crítico na maturação da estrutura e função do cérebro, e anormalidades estruturais relacionadas à experiência de estresse precoce (*early life stress*, ELS) são encontradas principalmente em regiões cerebrais envolvidas no controle e na mediação emocionais (LUPIEN et al., 2009; BOCK et al., 2014; CURLEY; CHAMPAGNE, 2016), as quais completam seu desenvolvimento em períodos diferentes. O hipotálamo e a hipófise, por exemplo, desenvolvem-se, sobretudo, durante a fase pré-natal, enquanto a glândula adrenal, embora também inicie o seu desenvolvimento nesse mesmo período, ainda necessita de algum tempo após o

nascimento até que esteja totalmente desenvolvida (10 a 20 anos em seres humanos e por volta de 35 dias em ratos) (NICOLAS, 2013). Além disso, o hipocampo, que é um importante fator de interação com o eixo HHA, tem o desenvolvimento completo a partir do primeiro até em torno do vigésimo segundo dia pós-natal em ratos, enquanto, em primatas, isso se dá durante os primeiros anos de vida (AMARAL; DENT, 1981; KUMAR et al., 2011; LOI et al., 2014; CHEN; BARAM, 2016; DERKS et al., 2017), estando portanto, suscetível a influências externas ocorridas durante esse período (CHEN; BARAM, 2016; DERKS et al., 2017).

O ELS parece associado com a alteração morfológica de neurônios e a transmissão sináptica em diferentes regiões do cérebro (OOMEN et al., 2010, 2011). Alguns estudos demonstraram efeitos específicos do ELS no hipocampo, como aqueles que levam a alterações na potencialização de longa duração (*long-term potentiation*, LTP), importante processo subjacente à formação de memória, no giro dentado e no Corno de Ammon hipocampal especificamente na camada CA1 (DERKS et al., 2017). Também foi observado que o ELS reduz a proporção de correntes pós-sinápticas excitatórias (EPSC) dependentes de NMDA/AMPA nos neurônios CA1 do hipocampo, mas sem alterações persistentes na arquitetura dendrítica dessas áreas (PILLAI et al., 2018). Além disso, o cuidado materno pode afetar as respostas ao estresse, especialmente aquelas associadas ao aprendizado e à memória, relacionadas a alterações na plasticidade sináptica do hipocampo. Assim, tanto a plasticidade estrutural quanto a funcional podem ser prejudicadas por ELS (LIU et al., 2000; CHAMPAGNE et al., 2008; LOI et al., 2017).

Há crescentes evidências advindas de estudos com roedores que examinam o impacto de um ambiente estressante em genes e na síntese de proteínas associadas à plasticidade sináptica, mas a implicação funcional da regulação induzida por estresse permanece incerta.

A magnitude e a direção das alterações observadas parecem depender do tipo e gravidade do estressor, idade e sexo do animal durante a exposição ao estresse (GRÖGER et al., 2014). Genes de expressão imediata (*immediate early genes – IEG*), os quais podem ser ativados e transcritos rapidamente e que são estimulados por sinais extrínsecos e intrínsecos às células, como de *Early growth response 1 (Egr1)*, *Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc)* e o proto-oncogene *c-Fos* são particularmente importantes, devido ao seu envolvimento em processos subjacentes à atividade neuronal (GOUTY-COLOMER et al., 2016; DUCLOT; KABBAJ, 2017). Esses IEG são regulados de maneira rápida e seletiva em neurônios de regiões cerebrais específicas, como aquelas associadas ao aprendizado e à formação da memória (Minatohara et al. 2016).

1.3. Consequências do ELS na vida adulta

Consequências na vida adulta decorrentes do ELS podem estar relacionadas a situações de perda parental, separação dos pais, doenças, violência familiar, negligência, abuso físico, sexual ou emocional (ADVANI; HENSLER; KOEK, 2007; BAES et al., 2012). Ainda, parece haver uma associação entre os diferentes subtipos de estressores experienciados durante a infância e o desenvolvimento, persistência e gravidade da psicopatologia em adultos (CARR et al., 2013; CHABY; ZHANG; LIBERZON, 2017). Uma explicação para as consequências futuras do estresse experienciado na infância seria a ativação alterada do sistema de resposta ao estresse, decorrente de mudanças permanentes no desenvolvimento do eixo HHA (LADD et al., 1999; HEIM et al., 2000; VAN VOORHEES; SCARPA, 2004; DE KLOET; JOËLS; HOLLSBOER, 2005; JOËLS et al., 2007). Dessa forma, uma vez que o eixo HHA tenha sido superativado durante os processos de desenvolvimento, este ficaria permanentemente instável, vulnerável ou

disfuncional (ANISMAN et al., 1998; JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003; LUPIEN et al., 2009; FARAVELLI et al., 2010; LUCASSEN et al., 2014). Assim, são crescentes as evidências que suportam a ideia de que a exposição precoce a um ambiente adverso pode ser um elemento subjacente à vulnerabilidade a psicopatologias na vida adulta como, por exemplo, a depressão, distúrbios de ansiedade, abuso de drogas e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (LADD et al., 1999; HEIM et al., 2000; COHEN; BROWN; SMAILE, 2001; HEIM; NEMEROFF, 2001; FARAVELLI et al., 2010; YEHUDA et al., 2010; BAES et al., 2012).

1.4. O transtorno de estresse pós-traumático

Enquanto a maioria dos indivíduos é capaz de lidar com o estressor e manter ou recuperar a homeostase, uma pequena, mas significativa, porção dos indivíduos falha em recuperar-se e exibe comportamentos e respostas fisiológicas prolongados e anormais às experiências traumáticas, como manifestado na sintomatologia do TEPT (HEIM; NEMEROFF, 2009; SHERIN; NEMEROFF, 2011). O TEPT é um distúrbio psiquiátrico crônico e altamente debilitante (RYAN et al., 2016), caracterizado por uma reação anormal a uma adversidade intensa e que, por definição, está relacionada com a ocorrência de um evento traumático (YEHUDA; ANTELMAN, 1993; GRAEFF, 2003; HEIM; NEMEROFF, 2009) ou a exposições múltiplas/crônicas ao longo do tempo (RYAN et al., 2016), e se desenvolve em aproximadamente 7-10% da população após um trauma (KESSLER et al., 2005; FRAGKAKI; THOMAES; SIJBRANDIJ, 2016).

O TEPT é uma psicopatologia muito heterogênea, podendo se manifestar de diferentes formas, mas apresentando como sintomas centrais as experiências repetidas do evento traumático (*flash-backs*), comportamento de evitação, alterações cognitivas

negativas e excitabilidade aumentada (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014), além de acentuados níveis de ansiedade generalizada e medo (KACZKURKIN et al., 2017). A revivência das experiências traumáticas se dá por lembranças intrusivas e persistentes e pesadelos, aos quais seguem-se sentimentos de angústia; a evitação é o esforço despendido em evitar pensamentos, sentimentos e contextos associados ao trauma, mesmo atividades ou pessoas; a excitabilidade aumentada inclui insônia, irritabilidade, dificuldade de concentração e hipervigilância (RUIZ et al., 2007).

Na quinta edição do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-V) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014), o TEPT foi removido da classe de transtornos de ansiedade e categorizado em uma nova classe: “transtornos relacionados a trauma e estresse”, que requer exposição a um evento traumático ou estressante como critério diagnóstico. O significativo contraste entre a incidência de trauma durante a vida (40-70%) e a prevalência (7-10%) para desenvolvimento de TEPT dá suporte à importância de se identificarem mecanismos subjacentes à vulnerabilidade ao estresse (BORGHANS; HOMBERG, 2015; FRAGKAKI; THOMAES; SIJBRANDIJ, 2016). O número de indivíduos diagnosticados com TEPT é crescente, mas não há até o momento tratamento farmacológico específico para essa condição, de forma que antidepressivos ou antipsicóticos são prescritos para a maioria dos pacientes na tentativa de tratar os seus sintomas (CORRAL-FRIAS et al., 2013).

Os sintomas do TEPT parecem refletir mudanças induzidas pelo estresse nos sistemas neurobiológicos e adaptação inadequada desses sistemas à exposição a estressores severos (HEIM; NEMEROFF, 2009). Os sistemas neurobiológicos que têm sido implicados na fisiopatologia do TEPT incluem o eixo HHA, bem como vários neurotransmissores (norepinefrina, dopamina, serotonina, GABA, opioides endógenos,

etc.) e neuromoduladores (endocanabionoides) que compreendem circuitos encefálicos que regulam respostas ao estresse e ao medo, incluindo o córtex “pré-frontal”, o hipocampo, o complexo amigdalóide e os núcleos do tronco encefálico (NEWPORT; NEMEROFF, 2000; RUIZ et al., 2007; HEIM; NEMEROFF, 2009; SHERIN; NEMEROFF, 2011), e a região anterior do córtex do giro do cíngulo (BORGHANS; HOMBERG, 2015). Além disso, atualmente, avanços na biologia molecular do TEPT trazem a relevância de uma variedade de mecanismos, incluindo os genéticos e epigenéticos, que parecem relacionados com as mudanças biológicas observadas após a exposição a eventos precoces e transtorno do estresse pós-traumático (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; YEHUDA et al., 2010, 2011; SONG; GLEESON, 2018), com numerosos *loci* de genes candidatos encontrados metilados diferencialmente em indivíduos com TEPT (RYAN et al., 2016).

Nesse contexto, há diversos fatores que parecem afetar as consequências pós-traumáticas, contribuindo para vulnerabilidade ou resiliência individual ao desenvolvimento de TEPT (HEIM; NEMEROFF, 2009; SHERIN; NEMEROFF, 2011; BOCK et al., 2014; RYAN et al., 2016; OSÓRIO et al., 2017). A resiliência é um processo dinâmico, pelo qual um indivíduo pode superar de forma adaptativa um evento estressante ou traumático, enquanto mantêm-se funções físicas e psicológicas relativamente normais ao longo do tempo (OSÓRIO et al., 2017), estando ligada a um processo psicológico ativo e a uma reorganização de redes encefálicas e alterações moleculares, que permitem que o indivíduo lide com desafios ambientais (RIBONI; BELZUNG, 2017). Já a vulnerabilidade ao estresse é provavelmente influenciada por predisposições genéticas e características específicas do estressor (natureza, intensidade e duração) (RYAN et al., 2016), em que os indivíduos são incapazes de recrutar essa reorganização (RIBONI; BELZUNG, 2017).

Experiências prévias claramente modulam o risco para desenvolvimento de TEPT em resposta a um trauma. Devido à alta plasticidade e maturação intensa de regiões límbicas, períodos de desenvolvimento exibem significativa vulnerabilidade ao estresse, podendo levar a alterações profundas na estrutura e funções de regiões encefálicas, como redução do volume hipocampal, funções alteradas do complexo amigdalóide e do córtex pré-frontal, que são considerados fatores de risco para TEPT (HEIM; NEMEROFF, 2001; DANNLOWSKI et al., 2012). O ELS pode também induzir alterações latentes no desenvolvimento encefálico, com consequências funcionais que são apenas desencadeadas por um estresse adicional (*second hit*) tardiamente (TOTH et al., 2016). O resultado da exposição ao estresse dependerá da idade de exposição (CHABY; ZHANG; LIBERZON, 2017) e, conseqüentemente, do estado de desenvolvimento de uma determinada região, por exemplo, problemas resultantes de exposições a adversidades no momento de desenvolvimento do córtex frontal devem ser diferentes das que comprometeram o desenvolvimento do hipocampo ou do complexo amigdalóide (BOCK et al., 2014).

1.5. Uso de modelos animais no estudo de psicopatologia

Há similaridades importantes entre características neurobiológicas humanas e os modelos animais estudados, como a resposta geral de mamíferos a qualquer elemento estressor, que têm em comum as vias endócrina, autonômica, imunológica e comportamental (LADD et al., 1999). Modelos animais são importantes no entendimento de mecanismos subjacentes aos efeitos do ELS na prole, e tem fornecido informações sobre como o estresse no início do desenvolvimento produz efeitos ao longo da vida sobre o comportamento e reatividade ao estresse em animais, e relação com psicopatologias (HEIM et al., 2008). Muitos desses modelos têm focado nos efeitos do cuidado

materno, na tentativa de mimetizar condições em que esse cuidado está de alguma forma comprometido, já que o ambiente inicial de roedores é essencialmente determinado pela mãe, que representa não apenas nutrição e calor, mas informação inicial sobre o ambiente futuro da prole (COUTELLIER et al., 2008). Cuidado materno prejudicado, seja devido à separação materna ou a alteração na frequência e qualidade desse cuidado, tem mostrado provocar profundas e duradouras alterações fisiológicas na prole (ANISMAN et al., 1998), com efeitos comportamentais, neurológicos e endócrinos diferentes, dependendo da duração e período em que ocorre (ANISMAN et al., 1998; KUMAR et al., 2011).

Embora o ELS seja um fator de risco para o desenvolvimento de distúrbios como o TEPT, os mecanismos subjacentes não estão completamente elucidados (TOTH et al., 2016). Identificar as interações entre mecanismos moleculares e exposição a traumas na determinação do risco ao desenvolvimento de TEPT, bem como os fenótipos neurobiológicos subjacentes ao curso da doença e resposta a tratamentos é uma vasta área de estudo (HEIM; NEMEROFF, 2009). Além disso, novos estudos devem identificar períodos sensíveis aos efeitos do estresse precoce e sua reversão, bem como investigar a interação entre fatores que levam à predisposição, como sexo e genes, e fatores do desenvolvimento na determinação da vulnerabilidade neurobiológica para o TEPT. Dentro deste contexto, observa-se o esforço de alguns autores em investigar o impacto do ELS na vulnerabilidade para psicopatologias na vida adulta, com especial ênfase no efeito de maus-tratos na infância na vulnerabilidade para transtornos relacionados ao estresse (CARR et al., 2013; STRÜBER; STRÜBER; ROTH, 2014), direção que o presente projeto verteu-se.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

São evidentes os efeitos dos maus tratos sofridos na infância sobre a saúde mental desses indivíduos durante a idade adulta. Mimetizar essa situação num ambiente controlado de laboratório permite explorar substratos neurais, os quais são raramente tangenciados na prática clínica, e investigar as contribuições de experiências precoces adversas na vulnerabilidade para psicopatologias durante a vida adulta, com especial ênfase em transtornos relacionados ao estresse, como o TEPT.

Hipóteses:

- 1) Alterações no comportamento materno nas primeiras fases do desenvolvimento tornará o nascituro susceptível a desenvolver reações defensivas anormais e possivelmente exacerbadas na idade adulta, evocando-se respostas comportamentais anormais diante de situações estressantes ou de perigo iminente de morte;
- 2) Os estressores na vida precoce levarão a alterações funcionais e em padrões de atividade neuronal relacionado à plasticidade sináptica hipocampal a curto-prazo (pós estressores) e no sistema encefálico de aversão a longo-prazo (após exposição a segundo estressor na vida adulta).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar se um modelo de ELS estaria associado à vulnerabilidade ao desenvolvimento de comportamentos relacionados ao transtorno do TEPT em camundongos e à identificação dos substratos neuronais associados.

Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar o protocolo de ELS, por meio do acompanhamento do peso corporal dos filhotes e da avaliação do cuidado materno durante o período do protocolo;
- 2) Avaliar os efeitos a curto prazo do ELS na plasticidade sináptica:
 - a. Efeitos do protocolo ELS na expressão do gene *Egr1* em P9;
 - b. Efeitos do protocolo ELS nas correntes excitatórias pós-sinápticas em miniatura (*mEPSCs*) no hipocampo dos animais de P9 e P21;
 - c. Caracterização do padrão de fluorescência dos animais *Arc::dVenus* em níveis basais, após o protocolo ELS ou em condição controle (CTRL), em P9 e P21;
 - d. Efeitos do protocolo ELS na imunorreatividade a proteínas relacionadas à plasticidade sináptica (*Egr1* e *Arc*) e à ativação neural (*c-Fos*) no hipocampo dos animais em P9 e P21.
- 3) Avaliar os efeitos a longo prazo do ELS:
 - a. Comportamentos associados aos sintomas do TEPT em animais submetidos a adversidades na vida precoce e controles não estressados durante o confronto com serpentes peçonhentas na idade adulta;
 - b. Padrão de ativação neuronal nos animais após exposição ao protocolo experimental de TEPT (via imunistoquímica para *c-Fos*).

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL6 provindos do Biotério Central da Universidade de São Paulo, *Campus* Ribeirão Preto, incluindo machos e fêmeas usados para acasalamento e os filhotes nascidos. Os animais passaram por um período de habituação ao biotério de pelo menos uma semana antes do acasamento. Para o acasalamento, duas fêmeas foram alojadas em conjunto com um macho por uma semana, e, então, o macho foi removido da gaiola e a fêmea alojada individualmente até o parto. As fêmeas eram verificadas diariamente quanto ao nascimento. Os filhotes nascidos foram submetidos ao protocolo de estresse precoce do dia pós-natal (P)2 a P9 e depois mantidos até P120 quando foram submetidos ao protocolo de estresse pós-traumático. Após o nascimento, a ninhada foi mantida compreendendo a mãe e 6 filhotes, até o dia do desmame.

Os animais, adultos ou filhotes após o desmame, foram alojados em grupos de dois a quatro animais do mesmo sexo por caixa (30 cm x 20 cm x 15 cm), sendo estas forradas com maravalha e os animais com livre acesso à água e à ração. Os animais ficaram no Biotério de camundongos da FMRP-USP com um programa de iluminação artificial com ciclo claro-escuro 12 h x 12 h, com o início do período claro às 6 h, e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Todas as caixas são mini-isoladoras *Ventilife* para camundongos (Alesco, Campinas, Brasil) e mantidas numa estante com fluxo de ar controlado. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP (Processo: 17/2017), e todos os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Outra parte do projeto foi desenvolvida na Universidade de Amsterdã, Holanda. Nesse caso, os experimentos foram realizados com camundongos C57BL6 e também com camundongos transgênicos *Arc::dVenus* (EGUCHI; YAMAGUCHI, 2009). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a legislação vigente e o Comitê de Ética para experimentação animal da Universidade de Amsterdã. Os animais foram mantidos em condições padrão de alojamento (12 h x 12 h ciclo claro-escuro, com o início do período claro às 7 h, e temperatura 20 ± 2 ° C, umidade 40-60%, e rádio local ligada fornecendo ruídos de fundo) e o manuseio para acasamento, alojamento e protocolo de estresse precoce foi realizado de maneira similar à descrita anteriormente.

Além disso, foram utilizadas serpentes selvagens da espécie *Bothrops moojeni* (*Reptilia, Viperidae*) (n=6) como estressores agudos aos camundongos na vida adulta. As serpentes foram mantidas no *Ophidiarium* LNN-FMRP-USP/INeC, onde eram mantidas em temperatura ambiente constante de 25 ± 1 °C e 40-70% de umidade. As serpentes eram alimentadas em dois momentos específicos: a cada 24 h, com camundongos previamente mortos numa câmara de CO₂, e imediatamente antes do início de cada experiência, com um animal vivo. O uso das serpentes está autorizado pelo governo brasileiro (Comitê IBAMA, processo 3543.6986 / 2012-SP e 3543.6984 / 2012-SP) e governo do estado de São Paulo (SAMA / DeFau 15.335 / 2012, Projeto MEDUSA, processo SISBIO 41435).

4.2. Experimentos realizados ao longo da neuroprogressão

Os animais foram submetidos ao protocolo de ELS (ou situação controle sem estresse) de P2 a P9. No Brasil, FMRP, ninhadas ELS e controles foram avaliadas quanto ao cuidado materno nesse período e o acompanhando do peso corporal registrado. Na Holanda, Universidade de Amsterdã, os animais também foram submetidos ao mesmo protocolo de

indução de ELS. Um grupo de animais foi sacrificado em P9 e outro em P21 para avaliações eletrofisiológicas, de expressão gênica para *Egr1* (somente P21) e imunistoquímica para *Egr1*, *dVenus*, *Arc* e *c-Fos*. Em P21, foi feito o desmame dos animais, os quais eram definitivamente separados da mãe e mantidos os irmãos em toda a fase de crescimento até P120, quando foram submetidos ao estresse agudo com confronto com predador (trauma tardio) e à análise comportamental para TEPT. Uma semana depois, os animais foram reexpostos à arena do confronto, mas dessa vez, apenas com a exúvia da serpente (espojos resultantes da muda dos répteis, formado por células mortas da epiderme). Os mesmos comportamentos foram analisados durante a reexposição. Foram formados os seguintes grupos experimentais: A) grupo ELS + trauma tardio; B) grupo ELS + ausência de trauma tardio; C) grupo controle + trauma tardio; D) grupo controle + ausência de trauma tardio. Ao final das avaliações comportamentais, os animais foram perfundidos, os encéfalos após serem congelados e cortados passaram por avaliação imunistoquímica.

Um esquema do delineamento experimental unindo as duas etapas do projeto pode ser observado na Figura 1. A descrição completa dos protocolos experimentais realizados e dos respectivos resultados obtidos estão apresentados a seguir.

Os resultados estão apresentados como média \pm EPM e foram analisados utilizando o software *Prism GraphPad 6*. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$. Testes *t de Student* de amostras independentes foram realizados para avaliar as diferenças entre ELS e CTRL. Quando a suposição de normalidade não foi cumprida, foi realizado o teste de *Mann-Whitney*. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar as diferenças entre ELS e CTRL em diferentes idades, sexo, sub-regiões do hipocampo ou exposição ou não a trauma na vida adulta. Em caso de interação significativa entre os fatores, foi realizado o teste *post hoc* de *Sidak's*.

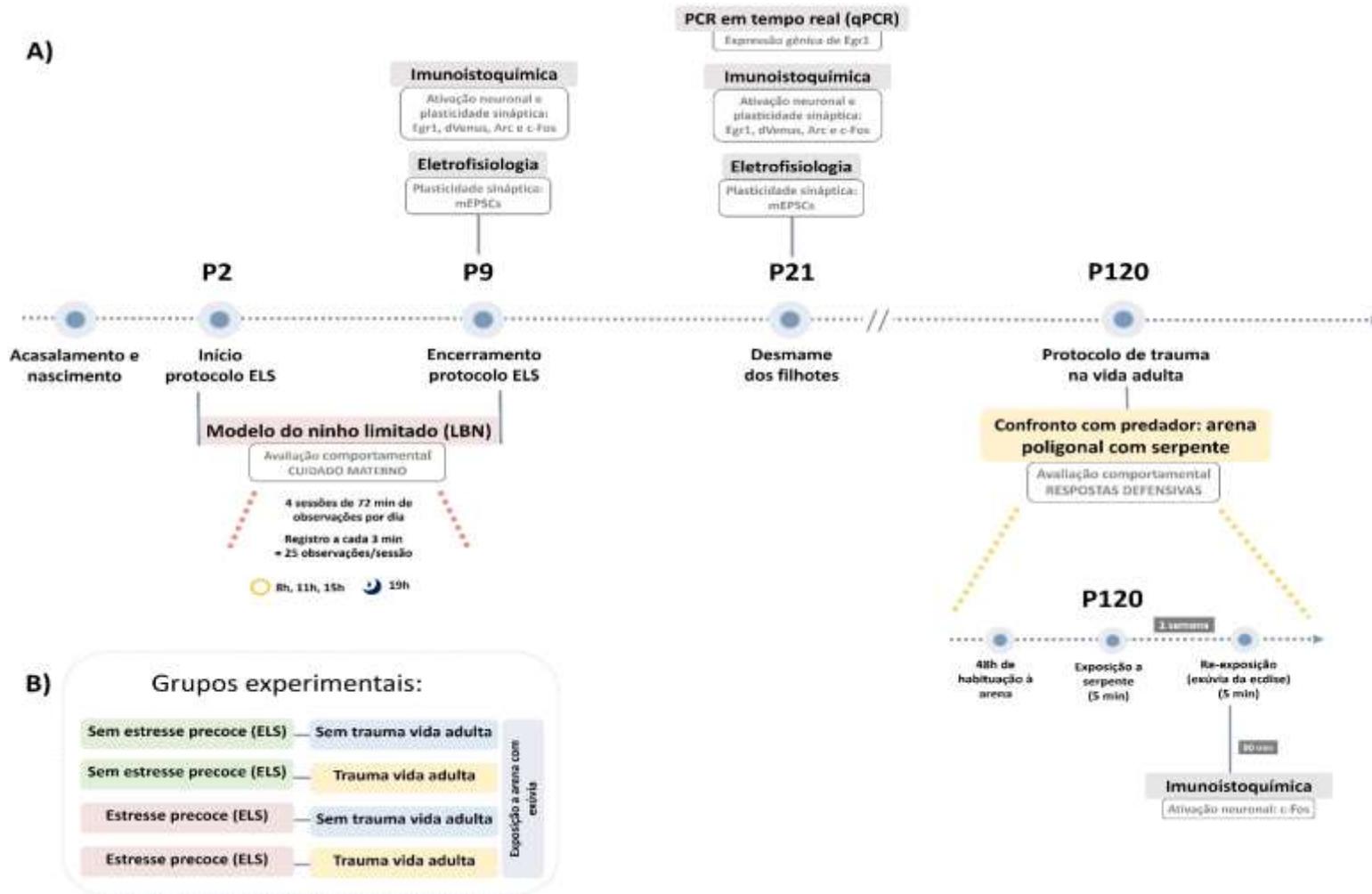


Figura 1. Delineamento experimental do projeto. A) Linha do tempo com os procedimentos realizados em cada momento da neuroprogressão, incluindo experimentos realizados no FMRP-USP e na Universidade de Amsterdam. B) Detalhamento dos grupos experimentais.

5. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE ELS

5.1. Materiais e métodos

5.1.1. Modelo de ELS: Ninho limitado (*Limited bedding and nesting – LBN*)

Foi utilizado o modelo de ninho limitado (LBN), o qual tem consistentemente mostrado efeitos que persistem até a vida adulta, aumentando o risco para o desenvolvimento de doenças psiquiátricas (RICE et al., 2008). As fêmeas grávidas foram monitoradas a cada 12 horas para determinação do dia de nascimento das ninhadas (P0). Dois dias após o nascimento (P2), as ninhadas foram reduzidas a 6 filhotes, incluindo ambos os sexos, e pesadas para determinação do peso corporal. Para minimizar os fatores genéticos, filhotes de várias ninhadas nascidos no mesmo dia foram misturados e distribuídos aleatoriamente entre as mães, bem como entre grupo ELS ou controle. Ninhadas controles eram colocadas em caixas convencionais e ninhadas ELS em caixas como as convencionais, porém com menor quantidade de maravalha (1/2), com uma plataforma de alumínio com grades com malhas de 0,9 x 0,9 cm, posicionada a 2,5 cm acima da maravalha, e o material para confecção do ninho (lenços de papel) foi reduzido pela metade (1/2). Os animais (mães e filhotes) foram mantidos em caixas convencionais (grupo controle) ou nessas caixas modificadas (grupo ELS) por um período de 8 dias (P2-P9). No período de P9 até P21 os animais foram mantidos em caixas convencionais, quando foram, então, separados de suas mães e mantidos em caixas convencionais com seus irmãos de mesmo sexo até a idade dos próximos experimentos.

5.1.2. Avaliação comportamental do cuidado materno

O comportamento de cada camundonga lactante em relação à ninhada de filhotes foi observado ao vivo em 4 sessões diárias, desde P2 até P9. Cada sessão teve 72 minutos de duração e ocorreu em horários regulares, sendo 3 sessões durante a fase clara (8h00, 11h00 e 15h00horas) e 1 sessão durante a fase escura (19h00) do ciclo claro-escuro. Em cada uma das sessões, o estado comportamental da mãe foi registrado a cada 3 min, totalizando 25 observações por sessão. Portanto, para cada mãe, foi registrado um total de:

- a) 100 observações por dia (25 observações por sessão x 4 sessões diárias)
- b) 200 observações referentes a cada sessão contemplando os 8 dias de observação (25 observações por sessão x 8 dias de observação P2-P9).

Os dados do comportamento materno estão expressos em % do número total de eventos nos 8 dias de observações seguindo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ comportamento} = [(\Sigma \text{ número de eventos do comportamento nos 8 dias de observação}) * 100]]$$

Os comportamentos avaliados (estados comportamentais) foram escolhidos de acordo com estudos prévios que analisaram comportamento materno (CALDJI et al., 1998; COSTA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2013) e foram classificados em parâmetros maternais ou não-maternais (COUTELLIER et al., 2008; COSTA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2013) conforme descritos a seguir.

Não-maternais:

A. Mãe alimentando-se;

- B. Mãe longe do ninho explorando a caixa;
- C. Mãe fazendo autolimpeza (*self-grooming*);
- D. Mãe longe do ninho não-explorando a caixa.

Maternais:

- E. Mãe em posição passiva (costas ou lado, mas em contato com filhotes);
- F. Mãe lambendo/limpando os filhotes (*licking/grooming*);
- G. Construção de ninho/carregando filhotes.
- H. Mãe sobre os filhotes (*blanket*) ou em cifose (*arched-back/nursing posture*)

5.1.3. Análise da taxa de entropia

Em cada sessão, os comportamentos observados foram registrados em sua ordem de aparecimento, obtendo-se assim uma sequência comportamental de cada sessão. Para cada mãe ligou-se o último comportamento de uma sessão com o primeiro comportamento da sessão de mesmo horário do dia seguinte. Assim, para cada um dos horários observados (08 h, 11 h, 15 h e 19 h) obtivemos uma longa sequência comportamental por mãe.

A fim de determinar o grau de imprevisibilidade dos cuidados maternos nas condições ELS e CTRL, a taxa de entropia da sequência comportamental foi calculada. Para tanto, primeiramente, verificamos se as sequências comportamentais de cada mãe se ajustavam ao modelo *Markoviano* (*Cadeias de Markov*) (KEMENY; SNELL, 1976; TEJADA et al., 2010) aplicando o teste de *chi* quadrado por meio do pacote *MarkovChain* no *software* R (versão x64.3.5.1), onde valores de $p > 0.05$ indicam que a sequência se ajusta ao modelo. *Cadeias de Markov* são utilizadas na descrição e modelagem sequencial de comportamentos animais em diferentes condições e descreve um comportamento assumindo que seus estados pertencem a um conjunto discreto de estados (TEJADA et al., 2010). Uma

vez demonstrado que as sequências seguiam padrão *Markoviano*, utilizamos o pacote *MCTM* (*Markov Chain Transition Matrix*) do R para construir uma matriz de transição dos estados comportamentais e o pacote *ccber* (*Cote Center Behavioral Entropy Rate*) do R para determinar a taxa de entropia da sequência comportamental de cada mãe. Após de estimadas as entropias de cada mãe, prosseguiu-se com a análise estatística convencional com as médias das taxas de entropia de cada grupo.

5.1.4. Avaliação do ganho de peso da ninhada

Na FMRP, os filhotes e mães utilizados na avaliação do comportamento materno tiveram seus pesos corporais registrados nos dias P2 (início do protocolo); P10 (após final do protocolo); P15 (poucos dias após o protocolo e dia de limpeza das caixas) e P21 (dia do desmame). Na Universidade de Amsterdam, os filhotes e mães tiveram seus pesos corporais registrados nos dias P2 (início do protocolo), P9 (dia do encerramento do protocolo) e P21 (dia do desmame).

5.2. Resultados

5.2.1. Cuidado materno

A Figura 2 apresenta os resultados referentes à porcentagem do número total de comportamentos observados por sessão durante os 8 dias de observação dos comportamentos (total = 200) para os grupos ELS e CTRL.

Em relação à categoria de comportamentos não-maternais, tivemos que para (A) Mãe alimentando-se, o teste de *Mann-Whitney* revelou menor porcentagem do comportamento para mães em condições de ELS em comparação com CTRL, apenas na fase escura do ciclo (às 19h00). Não foram observadas diferenças nos demais períodos observados. Para o comportamento (B) Mãe longe do ninho explorando a caixa, não houve diferença entre os

grupos em nenhum dos períodos de observação. Por outro lado, quando considerado (D) Mãe longe do ninho não-explorando a caixa, foi revelado efeito significativo do ELS em reduzir esse comportamento em todos os períodos observados. Para o comportamento (C) Mãe fazendo autolimpeza observou-se um aumento do comportamento para mães ELS às 11h, bem como às 15h, mas sem diferenças no primeiro (8 h) e último horário (19 h) de observações.

Já em relação comportamentos maternos, para (E) Mãe em posição passiva, não houve diferença entre os grupos em nenhum dos períodos observados. Para o comportamento (F) Mãe lambendo/limpando os filhotes, o teste de *Mann-Whitney* revelou aumento do comportamento para mães em condições de ELS em comparação com CTRL no período das 15 h, mas não para os demais períodos. O comportamento (G) Construção de ninho/carregando filhote foi maior para as mães ELS em todos os períodos analisados. Por fim, para o comportamento (H) Mãe sobre os filhotes ou em cifose, o teste de *Mann-Whitney* revelou uma redução do comportamento para mães em condições de ELS em comparação com CTRL apenas às 11 h, não havendo diferenças significativas nos outros períodos observados.

Os dados referentes as porcentagens de cada comportamento em cada uma das sessões e os referentes valores de p estão disponíveis na Tabela 1.

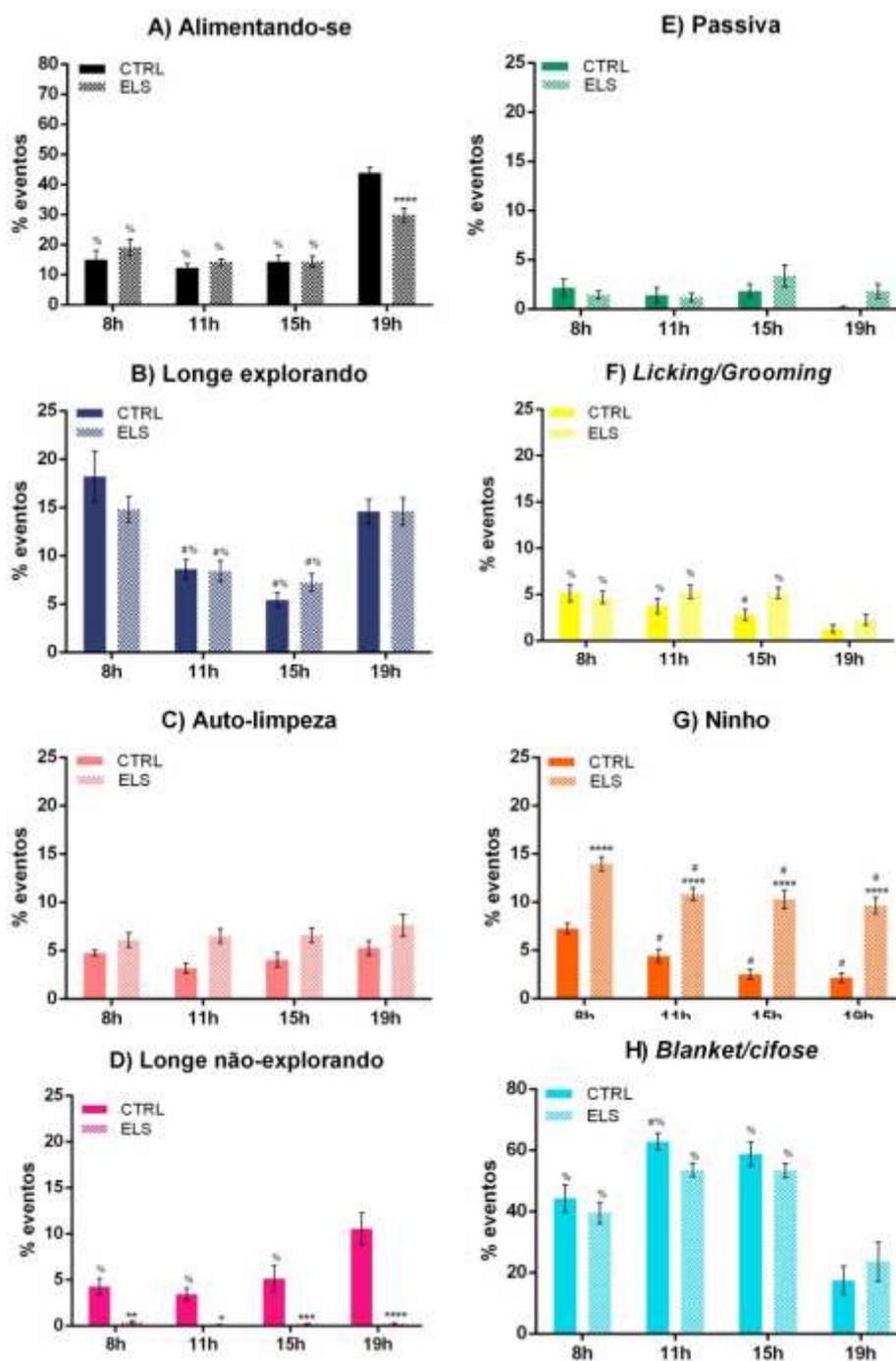


Figura 2. Porcentagem do total de ocorrências dos comportamentos não-maternais A) mãe alimentando-se, B) mãe longe do ninho explorando a caixa C) mãe fazendo auto-limpeza, D) mãe longe do ninho não-explorando a caixa; e comportamentos maternos E) mãe em posição passiva, F) mãe lambendo/limpando filhotes (*licking/grooming*), (G) construção de ninho/carregando filhotes (H) *blanket* + *cifose*, somando-se os 8 dias de observações para cada uma das 4 sessões diárias, para grupos ELS (n=13) e CTRL (n=12). * $p < 0.05$ diferente de CTRL na mesma sessão; # $p < 0.05$ diferente do próprio grupo as 8h; % $p < 0.05$ diferente do próprio grupo às 19h.

Tabela 1. Média da porcentagem do total de eventos (%) \pm EPM para todos os comportamentos maternos e não maternos avaliados de P2 a P9.

Comportamento	Média \pm EPM		Estatística
	CTRL	ELS	
08h			
A	15.08 \pm 2.93	19.08 \pm 2.69	p > 0.05
B	18.21 \pm 2.66	14.81 \pm 1.33	p > 0.05
C	4.75 \pm 0.30	6.07 \pm 0.75	p > 0.05
D	4.25 \pm 0.87	0.38 \pm 0.12	p < 0.0005
E	2.16 \pm 0.88	1.46 \pm 1.41	p > 0.05
F	5.16 \pm 0.92	4.69 \pm 0.65	p > 0.05
G	7.25 \pm 0.57	13.96 \pm 0.73	p < 0.0001
H	44.21 \pm 4.48	39.54 \pm 3.42	p > 0.05
11h			
A	12.29 \pm 1.41	14.31 \pm 1.02	p > 0.05
B	8.62 \pm 0.96	8.42 \pm 1.09	p > 0.05
C	3.16 \pm 0.51	6.50 \pm 0.73	p < 0.001
D	3.41 \pm 0.68	0.07 \pm 0.07	p < 0.0001
E	1.41 \pm 0.78	1.19 \pm 0.41	p > 0.05
F	3.75 \pm 0.81	5.26 \pm 0.71	p > 0.05
G	4.41 \pm 0.66	10.81 \pm 0.67	p < 0.0001
H	62.83 \pm 2.74	53.50 \pm 2.10	p < 0.0001
15h			
A	14.36 \pm 2.06	14.40 \pm 1.81	p > 0.05
B	5.41 \pm 0.76	7.22 \pm 0.93	p > 0.05
C	4.05 \pm 0.75	6.61 \pm 0.74	p < 0.05
D	5.12 \pm 1.42	0.15 \pm 0.06	p < 0.0005
E	1.85 \pm 0.72	3.35 \pm 1.13	p > 0.05
F	2.80 \pm 0.60	5.14 \pm 0.59	p < 0.0001
G	2.51 \pm 0.50	10.28 \pm 0.95	p < 0.0001
H	58.82 \pm 3.97	53.33 \pm 2.32	p > 0.05
19h			
A	43.83 \pm 1.89	29.84 \pm 2.38	p < 0.0001
B	14.57 \pm 1.27	14.62 \pm 1.41	p > 0.05
C	5.27 \pm 0.76	7.14 \pm 1.06	p > 0.05
D	10.52 \pm 1.72	0.19 \pm 0.09	p < 0.0001
E	0.16 \pm 0.09	1.83 \pm 0.72	p > 0.05
F	1.29 \pm 0.42	2.26 \pm 0.59	p > 0.05
G	2.17 \pm 0.48	9.64 \pm 0.83	p < 0.0001
H	17.52 \pm 4.56	23.54 \pm 6.37	p > 0.05

5.2.2. Taxa de entropia

O valor de p do teste de chi-quadrado para as sequências comportamentais de todas as mães foi 1, o que permite afirmar que as sequências comportamentais para todas as ninhadas se ajustam ao modelo *Markoviano*. A Figura 3 apresenta os resultados referentes às taxas de entropia para os grupos ELS e CTRL em todas as sessões observadas.

A ANOVA de duas vias revelou que efeito significativo do fator ELS ($F_{1,23} = 29.79$, $p < 0.0001$) e do fator sessão/horário de observação ($F_{3,69} = 19.14$, $p < 0.0001$), bem como interação entre os dois fatores ($F_{3,69} = 4.886$, $p < 0.001$). O teste *post-hoc* de *Sidak's* indicou que ELS apresentou taxa de entropia significativamente maior do que o CTRL em todas sessões da fase clara (8 h, 11 h e 15 h), mas essa diferença desaparece na fase escura do ciclo (às 19 h). Adicionalmente, a taxa de entropia do grupo CTRL variou ao longo do tempo: as taxas de entropia tanto às 8 h quando às 19 h foram significativamente maiores do que as taxas de entropia às 11 h e às 15 h. Não foi observada variação da taxa de entropia ao longo das sessões para o grupo ELS. As taxas de entropia dos dois grupos nas diferentes sessões estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Média da taxa de entropia \pm EPM para todas as sessões analisadas.

	Média \pm EPM		Estatística
	CTRL	ELS	
08 h	1.41 \pm 0.05	1.64 \pm 0.04	$p < 0.01$
11 h	1.15 \pm 0.05	1.48 \pm 0.04	$p < 0.0001$
15 h	1.04 \pm 0.06	1.46 \pm 0.05	$p < 0.0001$
19 h	1.54 \pm 0.04	1.59 \pm 0.06	$p > 0.05$

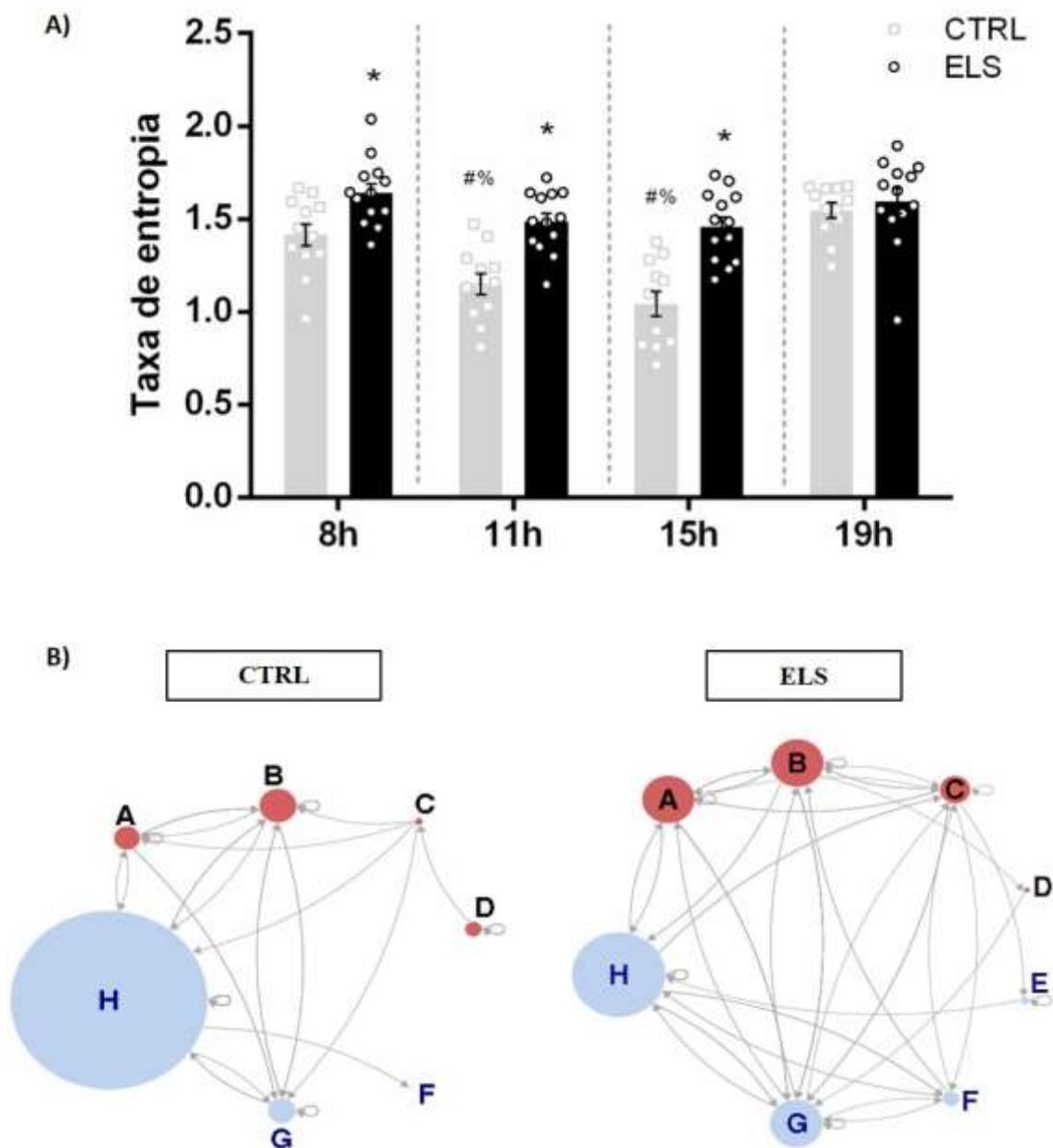


Figura 3. A) Taxa de entropia por Cadeias de *Markov* das seqüências comportamentais somando-se os 8 dias de observações para cada uma das quatro sessões diárias, para grupos ELS (n=13) e CTRL (n=12). * $p < 0.05$ diferente de CTRL na mesma sessão; # $p < 0.05$ diferente do próprio mesmo grupo as 8 h; % $p < 0.05$ diferente do próprio grupo às 19 h. B) Grafos representativos da dinâmica de transição entre os oito comportamentos analisados para uma mãe de cada grupo, na sessão das 8 h. Cada letra representa um dos comportamentos, conforme descrito anteriormente. O tamanho dos nós (círculos) é proporcional a frequência de ocorrência de cada comportamento e as arestas (setas) representam as transições entre comportamentos (transições duplicadas não mostradas). Nós **azuis** referem-se aos comportamentos não-maternais e **vermelhos**, comportamentos maternos.

5.2.3. Peso corporal

A Figura 4 apresenta os resultados referentes ao peso corporal dos filhotes em P2, P10, P15 e P21 (camundongos *C57BL6*, experimentos realizados no Brasil – FMRP/USP). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do ELS ($F_{3,134} = 53.61$, $p < 0.0001$), idade ($F_{3, 224} = 1027$, $p < 0.0001$) e interação entre os dois fatores ($F_{9, 224} = 5.15$, $p < 0.0001$). A análise *post-hoc* com o teste de *Sidak* revelou que os machos ELS apresentaram menor peso corporal em P10, P15 e P21, mas sem diferenças entre os grupos em P2. De maneira semelhante, para as fêmeas ELS também foi identificado peso corporal menor que fêmeas CTRL em P10, P15 e P21, mas sem alteração em P2.

A Figura 5 apresenta os resultados referentes ao peso corporal dos filhotes em P2, P9 e P21 (camundongos *Arc::dVenus*, experimentos realizados na Holanda – Universidade de Amsterdam). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do ELS ($F_{3,134} = 22.46$, $p < 0.0001$), idade ($F_{2, 134} = 1693$, $p < 0.001$) e interação entre os dois fatores ($F_{6,134} = 4.768$, $p < 0.001$). A análise *post-hoc* com o teste de *Sidak* revelou que os machos ELS apresentaram menor peso corporal em P9, mas sem diferenças entre os grupos em P2 ou P21. As fêmeas ELS também apresentaram menor peso corporal em comparação ao grupo CTRL em P9 e em P21 ($p < 0.0001$), embora sem diferenças em P2.

A média do peso corporal (g) \pm EPM para cada grupo está na Tabela 3. Os resultados indicam que o protocolo de ELS foi eficaz na indução de estresse em ambas situações.

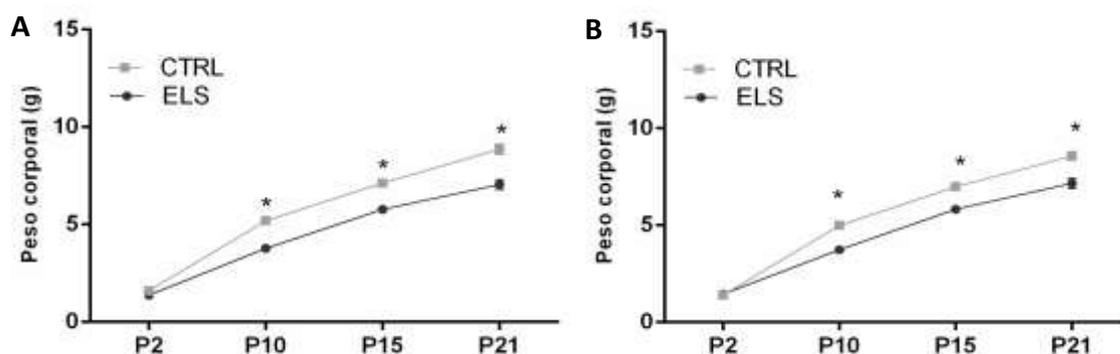


Figura 4. Peso corporal (g) de camundongos *C57BL6* (Brasil) A) machos e B) fêmeas, CTRL e ELS, em P2, P10, P15 e P21. * $p < 0.0001$ quando comparado com o CTRL. $n = 15$ (CTRL macho); 19 (ELS macho); 14 (CTRL fêmea) e (12 ELS fêmea).

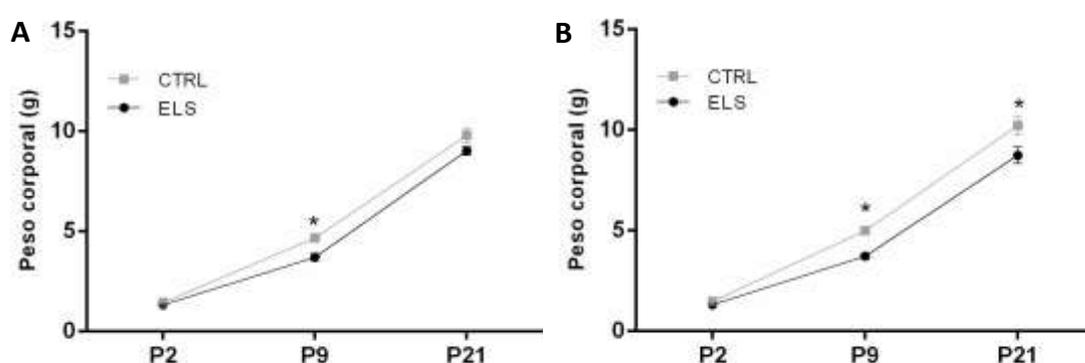


Figura 5. Peso corporal (g) de camundongos *Arc::dVenus* (Holanda) A) machos e B) fêmeas, CTRL e ELS, em P2, P9 e P21. * $p < 0.0001$ quando comparado ao controle. $n = 13$ (macho CTRL); 17 (macho ELS); 14 (fêmea CTRL) e 9 (fêmea ELS).

Tabela 3. Média do peso corporal (g) \pm EPM para machos e fêmeas, CTRL e ELS.

	Machos			Fêmeas		
	Média \pm EPM		Estatística	Média \pm EPM		Estatística
	CTRL	ELS		CTRL	ELS	
<i>C57BL6</i> - Brasil						
P2	1.61 \pm 0.07	1.38 \pm 0.07	$p > 0.05$	1.40 \pm 0.08	1.45 \pm 0.08	$p > 0.05$
P10	5.19 \pm 0.14	3.78 \pm 0.13	$p < 0.0001$	4.99 \pm 0.10	3.74 \pm 0.16	$p < 0.0001$
P15	7.13 \pm 0.17	5.78 \pm 0.13	$p < 0.0001$	6.99 \pm 0.16	5.83 \pm 0.17	$p < 0.0001$
P21	8.86 \pm 0.25	7.05 \pm 0.25	$p < 0.0001$	8.57 \pm 0.22	7.16 \pm 0.27	$p < 0.0001$
<i>Arc::dVenus</i> - Holanda						
P2	1.44 \pm 0.04	1.32 \pm 0.02	$p > 0.05$	1.47 \pm 0.04	1.32 \pm 0.01	$p > 0.05$
P9	4.67 \pm 0.16	3.70 \pm 0.16	$p < 0.0001$	5.02 \pm 0.09	3.73 \pm 0.11	$p < 0.0001$
P21	9.79 \pm 0.36	9.02 \pm 0.22	$p > 0.05$	10.23 \pm 0.43	8.74 \pm 0.40	$p < 0.0001$

6. EFEITOS A CURTO PRAZO DO ELS NA PLASTICIDADE SINÁPTICA

6.1. Materiais e métodos

6.1.1. Expressão do gene *Egr1* por PCR em tempo real (*qPCR*)

Após o protocolo ELS e o desmame dos filhotes (P21), a expressão relativa do gene *Egr1* foi avaliada no hipocampo de filhotes machos via amplificação de *cDNA* por *PCR* e analisada usando o software de *PCR* em tempo real (*Applied Biosystems*). Os hipocampus dos animais P9 foram dissecados. O RNA total foi extraído com o kit *mini RNeasy* (*Qiagen*), e a concentração e a qualidade do RNA determinadas por espectrofotometria (espectrofotômetro *ND-1000, Nanodrop™*, Wilmington, DE, EUA). Quantidades iguais de RNA total de cada amostra foram usadas para a síntese de *cDNA* e os níveis de expressão relativa de mRNA foram determinados usando o kit *qPCR* baseado em *SYBR Green* (*Qiagen*), com *primers* específicos para os genes *Egr1* e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), que foi usado como *housekeeping* gene e controle interno (as sequências de *primers* estão listadas na Tabela 4 e obtiveram 90-110% de eficiência). O ciclo de *threshold* (*Ct*), ponto crítico no qual o sinal fluorescente excede o *background* de cada gene, foi determinado por *qPCR*, e os valores de expressão relativos foram calculados usando os métodos comparativos de *Ct* ($\Delta\Delta Ct$) após a normalização para os valores de expressão de *GAPDH* como referência endógena (MO et al., 2015; QIN et al., 2015).

Tabela 4. Sequências de *primers* utilizados na *qPCR*

Gene alvo	Sequência <i>forward</i> (5'-3')	Sequência <i>reverse</i> (5'-3')
<i>GAPDH</i>	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
<i>Egr1</i>	GCATGCGTAACTTCAGTCGT	GCATGCGTAACTTCAGTCGT

6.1.2. Eletrofisiologia: correntes excitatórias pós-sinápticas em miniatura (*mEPSCs*)

Após o período do protocolo ELS, propriedades eletrofisiológicas foram determinadas no tecido hipocampal de filhotes machos. Em P9 ou P21, os camundongos foram sacrificados por decapitação, a fim de realizar o registro eletrofisiológico. Para a preparação do tecido, os encéfalos foram removidos e colocados em líquido cefalorraquidiano artificial gelado (aCSF) que consiste em (em mM): 118,1 NaCl, 2,5 KCl, 26,2 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ e 22,2 glicoses, em pH ~ 7,4, e foram continuamente gaseados com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Posteriormente, no mesmo aCSF, o cérebro com a região de interesse (hipocampo) foi seccionado em cortes coronais de 500 µm utilizando um vibrátomo (*Leica Biosystem VT 1000S*, Alemanha). Após os cortes e um período de recuperação de 20 minutos a 32 ° C, as fatias de hipocampo foram armazenadas em uma câmara de retenção à temperatura ambiente por pelo menos 1 hora, até o início dos registros (DERKS et al., 2016; KARST; JOËLS, 2016; KANATSOU et al., 2017; PILLAI et al., 2018).

Para registrar as *mEPSCs*, uma fatia contendo o hipocampo esquerdo foi colocada na câmara de registro e perfundida com fluxo constante de aCSF oxigenado a 32° C, contendo picrotoxina (PTX) (100 µM) e tetrodoxina (TTX) (1 µM) para bloquear canais de sódio e potenciais de ação induzidos por liberação de glutamato. Os registros de *whole cell patch clamp* foram realizadas utilizando um amplificador *AXOPATCH 200B* (*Axon Instruments*, EUA), com eletrodos de vidro borossilicato (1,5 mm de diâmetro externo, *Hilgerberg*, *Malsfeld*, Alemanha). As micropipetas foram construídas com um extrator de micropipeta *Sutter* (EUA) e sua resistência foi ajustada entre um intervalo de 3-6 MΩ. Por microscopia, o eletrodo foi direcionado a uma célula e, quando a resistência da membrana estava acima de 1 GΩ, a membrana sob o eletrodo foi rompida por sucção. A célula foi mantida em um

potencial de retenção de -70 mV e os eventos foram registrados por 10 min em cada célula. A aquisição dos dados foi realizada com *pClamp (Clampex)* 10.5. Os eventos foram examinados e as correntes identificadas como mEPSCs, quando o tempo de subida foi mais rápido que o tempo de decaimento e comparadas entre os grupos experimentais (MARTIN et al., 2009; SILVA et al., 2009; KARST; JOËLS, 2016; KANATSOU et al., 2017). A frequência, o tempo de decaimento e a amplitude de pico dos eventos de *mEPSCs* foram determinados usando o Programa *MiniAnalysis (Synaptosoft)* versão 6.0.7. O limiar de amplitude de 5 pA foi utilizado para a detecção de eventos.

6.1.3. Imunoistoquímica

6.1.3.1. Preparação do tecido

Os camundongos foram sacrificados por decapitação e os encéfalos foram removidos e pós-fixados em paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato (0,1 M PB, pH 7,4) a 4°C por 48 h e depois em uma solução tampão salina-fosfato (PBS) azida. Um dia antes do procedimento de secção, os encéfalos foram crioprotetidos em sacarose 20% em PB (0,1M, pH 7,4) até afundarem. Seções de 40 µm foram feitas usando um micrótomo deslizante (*Jung HN 40, Leica, Alemanha*) e as fatias transferidas para solução anticongelante (30% de etileno glicol, 20% de glicerol, 50% de PBS 0,05M, PB com solução salina a 0,9%) e armazenado a -20° C.

6.1.3.2. Células *dVenus+* em camundongos transgênicos *Arc::dVenus*

Os camundongos transgênicos *Arc::dVenus* apresentam a proteína *dVenus* fluorescente como repórter da ativação prévia do promotor *Arc* (Eguchi & Yamaguchi, S. 2009). Para caracterizar o padrão de ativação basal de células *dVenus+* após o protocolo

ELS, em comparação com o controle (contagem dos neurônios *dVenus+*), os encéfalos de camundongos machos e fêmeas de P9 e P21 foram preparados e seccionados conforme descrito anteriormente, e as fatias foram montadas com DAPI (*Vectashield Mounting Meio com DAPI, H-1200, Vector Laboratories Inc.*) em lâminas de vidro.

6.1.3.3. Imunofluorescência: co-localização de *Arc* com células *dVenus+*

Após lavagem da solução anticongelante por 3 vezes de 5 min em PBS 0.1M, as fatias foram incubadas com Fragmentos *Fab* por 30 min (*Affinipure Fab Fragment goat anti-mouse - Jackson ImmunoResearch*, 1:200 em PBS 0.1M), uma vez que foi utilizado um anticorpo primário de camundongo. As seções foram incubadas com solução de bloqueio (*normal donkey serum* 5% em PBS 0.1 M) por 30 min e, em seguida, com o anticorpo primário (*Donkey anti-mouse Alexa Fluor 594 - Thermo Fisher*, 1:500 em solução bloqueio) durante a noite a 4 ° C. No dia seguinte, após 3 lavagens de 5 min com 0.1 M de PBS, as fatias foram incubadas com anticorpo secundário (*Donkey anti-camundongo Alexa Fluor 594 - Thermo Fisher*, 1:500 em solução de bloqueio) por 120 min em temperatura ambiente. Após outra lavagem de 3 vezes de 5 min com PBS 0.1 M, as fatias foram colocadas em PB 0.01M, montadas em lâminas de vidro, e após secas e cobertas com meio de montagem com DAPI (*Vectashield Mounting Medium com DAPI, H-1200, Vector Laboratories Inc.*).

6.1.3.4. Imunoistoquímica com DAB

Aqui, foram utilizados camundongos machos do tipo selvagem *C57BL6*.

6.1.3.4.1. Imuno-reatividade a *Egr1*

Após lavagem da solução anticongelante por 3 vezes de 5 min em TBS 0.05M, as fatias foram incubadas para bloqueio da peroxidase endógena em H₂O₂ 0,3% em TBS por 15 min. Depois disso, foram seguidos outras 3 lavagens de 5 min TBS 0.05M e, em seguida, as

fatias foram incubadas com solução de bloqueio com albumina de soro bovino (BSA) 1% em TBS 0.05M + triton a 0.1%, por 30 min. As fatias foram, então, incubadas com o anticorpo primário (*Rabbit anti-Egr1 - Cell Signaling Technology, 15F7*, 1:2000 em solução de bloqueio) *overnight* a 4 ° C. No dia seguinte, após lavagem de 3 vezes de 5 min com TBS 0.05 M, as fatias foram incubadas com o anticorpo secundário (*Goat anti-rabbit Bio Rad Laboratories, 170-6515*, 1:200 em solução de bloqueio) por 120 min em temperatura ambiente. Seguiu-se outras 3 lavagens de 5 min com TBS 0.05 M e, então, as fatias foram tratadas por 90 min com ABC-elite (*Vectorstrain, rabbit IgG, PK-6101*, 1:800 em TBS). Depois disso, outra lavagem de 5 min com TBS 0.05M e outras 3 lavagens de 5 min com 0.05M TB foi seguida. Em seguida, 25 min de reação com DAB e mais 3 lavagens rápidas em TBS 0.05 M e 2 lavagens de 5 min com TB 0.05 M.

6.1.3.4.2. Imuno-reatividade a Arc

Após lavagem da solução anticongelante por 3 vezes de 5 min em PBS 0.1 M, as fatias foram incubadas para bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 0,3% em PBS por 30 min. Depois disso, as fatias foram incubadas com fragmentos Fab por 30 min (*Affinipure Fab Fragment, goat anti-mice, Jackson ImmunoResearch*, 1:200 em PBS 0.1 M), uma vez foi utilizado anticorpo primário feito em camundongo. Seguiram-se 3 lavagens de 5 min PBS 0.1 M e, em seguida, as fatias foram incubadas com solução de bloqueio com albumina de soro bovino (BSA) 1% em PBS 0.01M + triton a 0.1%, por 60 min. As fatias foram, então, incubadas com o anticorpo primário (*anti-Arc - Biotecnologia Santa Cruz de camundongo, sc-17839*, 1:500 em solução de bloqueio) *overnight* a 4 ° C. No dia seguinte, após 3 lavagens de 5 min com PBS 0.1 M, as fatias foram incubadas com o anticorpo secundário (*Sheep anti-mouse - GE Healthcare Life Sciences*, 1:400 em solução de bloqueio)

por 120 min em temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 5 min com PBS 0.1M, as fatias foram tratadas por 90 min com *ABC-elite* (*Vectorstrain, rabbit IgG, PK-6101*, 1:800 em TBS). Depois disso, seguiu-se uma lavagem de 5 min com PBS 0.1 M e outras 3 de 5 min com PB 0.05M PB pH 7,6. Em seguida, 20 min de reação com DAB, 3 lavagens rápidas em PBS 0.01M e 2 lavagens de 5 min com TB 0.05M.

6.1.3.4.3. *Imuno-reatividade a c-Fos*

Após lavagem da solução anticongelante por 3 vezes de 5 min em PBS 0.1 M, as fatias foram incubadas para bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 0,3% em PBS por 30 min. Seguiram-se 3 lavagens de 5 min PBS 0.1 M e, em seguida, as fatias foram incubadas com solução de bloqueio com albumina de soro bovino (BSA) 1% em PBS 0.01M + triton a 0.1%, por 60 min. As fatias foram, então, incubadas com o anticorpo primário (*Rabbit anti-c-Fos - Santa Cruz Biotechnology, sc-52*, 1:500 em solução de bloqueio) *overnight* a 4 ° C. No dia seguinte, após 3 lavagens de 5 min com PBS 0.1 M, as fatias foram incubadas com o anticorpo secundário (*Goat anti-rabbit, Bio Rad Laboratories, 170-6515*, 1: 400 em solução de bloqueio) por 120 min em temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 5 min com PBS 0.1M, as fatias foram tratadas por 90 min com *ABC-elite* (*Vectorstrain, rabbit IgG, PK-6101*, 1:800 em TBS). Depois disso, seguiu-se uma lavagem de 5 min com PBS 0.1 M e outras 3 de 5 min com PB 0.05M PB pH 7,6. Em seguida, 20 min de reação com DAB, 3 lavagens rápidas em PBS 0.01M e 2 lavagens de 5 min com TB 0.05M.

6.1.3.4.4. *Finalização dos procedimentos*

Após a conclusão de todos os protocolos com DAB, as fatias foram montadas em lâminas de vidro e deixadas secar durante a noite. No dia seguinte, foi realizada a desidratação das lâminas em série de álcoois (2 minutos em água, 2 minutos em álcool 50%,

2 minutos em álcool 70%, 2 minutos em álcool 95%, 2 vezes de 2 min em álcool 100%, 2 x 5 min em Xilol) e as lâminas foram cobertas com *Entellan*.

4.9.4.1. Análise imunoistoquímica

Análises quantitativas de *dVenus*, *Arc*, *Egr1* e *c-Fos* foram realizadas nas seções coronais do hemisfério direito do hipocampo em níveis anatômicos correspondentes entre os animais, incluindo região anterior (entre os pontos de bregma -1.58 e -2.30) e posterior (entre os pontos de bregma -2.92 e -3.40) do hipocampo (FRANKLIN; PAXINOS, 2007). A quantificação foi realizada às cegas às condições experimentais utilizando *FIJI - ImageJ 1.52p* (*National Institutes of Health, USA*). Anteriormente, imagens foram capturadas em aumento 10X utilizando um microscópio *Nikon Eclipse - software NIS Element versão 4.6*.

Para imunofluorescência (células *dVenus+* e sua co-localização com *Arc* endógena), as células positivas foram contadas manualmente no giro dentado (DG) do hipocampo. Para células *dVenus+*, a análise foi distinguida entre a camada infra e suprapiramidal do DG. Para a co-localização com *Arc*, foi contado o número de células *dVenus+* que também eram positivas para *Arc* no DG do hipocampo (anterior). A análise foi feita em 3 a 4 fatias por animal.

Para a coloração DAB, *Egr1* foi quantificado de forma automática utilizando a intensidade corrigida subtraindo-se o fundo (imagens de 8 bits com limiar fixo), na região CA1 do hipocampo para animais P21 e no DG (anterior) de animais P9. *C-Fos* foi quantificado por intensidade no DG (anterior) dos animais P9, e tanto intensidade como por densidade de células no hipocampo dos animais P21, nas regiões anterior e posterior, e distinguindo entre a camada infra e suprapiramidal dos DG. *Arc* foi quantificado

manualmente em todo o DG (anterior) dos animais P21, por densidade de células. A análise foi feita em 2 fatias por animal.

É importante destacar que tivemos algumas dificuldades técnicas ao trabalhar com fatias de encéfalos de animais em P9, pois se trata de um tecido extremamente delicado e frágil, levando muitas vezes a ser danificado durante o processo de imunocoloração. Por esse motivo, pudemos analisar apenas poucas fatias por animal, em quantidades que conferem baixo poder às estatísticas, e, portanto, esses resultados devem ser interpretados com cautela.

6.2. Resultados

6.2.1. Expressão gênica de *Egr1*

O experimento foi realizado apenas para P21 (e não para P9 como os outros parâmetros avaliados), porque esse experimento já havia sido realizado no laboratório, mostrando uma expressão reduzida de *Egr1* em filhotes machos P9 (dados não publicados). Para P21, o teste *t de Student* revelou expressão relativa de mRNA de *Egr1* similar entre CTRL e ELS ($p > 0.05$, 1.122 ± 0.249 CTRL e 1.103 ± 0.07539 ELS), como mostra a Figura 6.

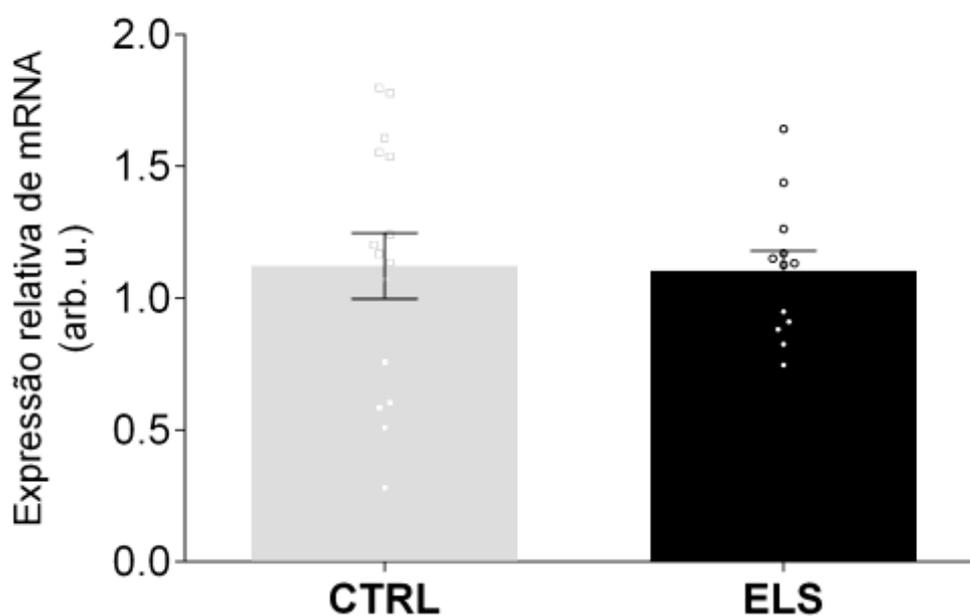


Figura 6. Expressão relativa do mRNA de *Egr1* em CTRL e ELS em P21. n = 15 (CTRL); 12 (ELS).

6.2.2. Eletrofisiologia: *mEPSCs*

Registros da atividade em miniatura foram obtidos de um total de 55 células do DG. A ANOVA não indicou diferença para a frequência de eventos ($F_{5,53} = 0.5484$, $p > 0.05$) entre os grupos (Figura 7A). A amplitude de *mEPSCs* foi aumentada nos neurônios de ELS em P9 ($F_{5,53} = 5.338$, $p < 0.001$) em comparação com qualquer outro grupo (Figura 7B) e um efeito da idade foi encontrado para o tempo de decaimento ($F_{1,51} = 40.25$, $p < 0.0001$), com P9 apresentando menor tempo de decaimento do que os grupos de P21 (Figura 7C). A média \pm EPM de cada parâmetro para cada grupo estão demonstrados na Tabela 5.

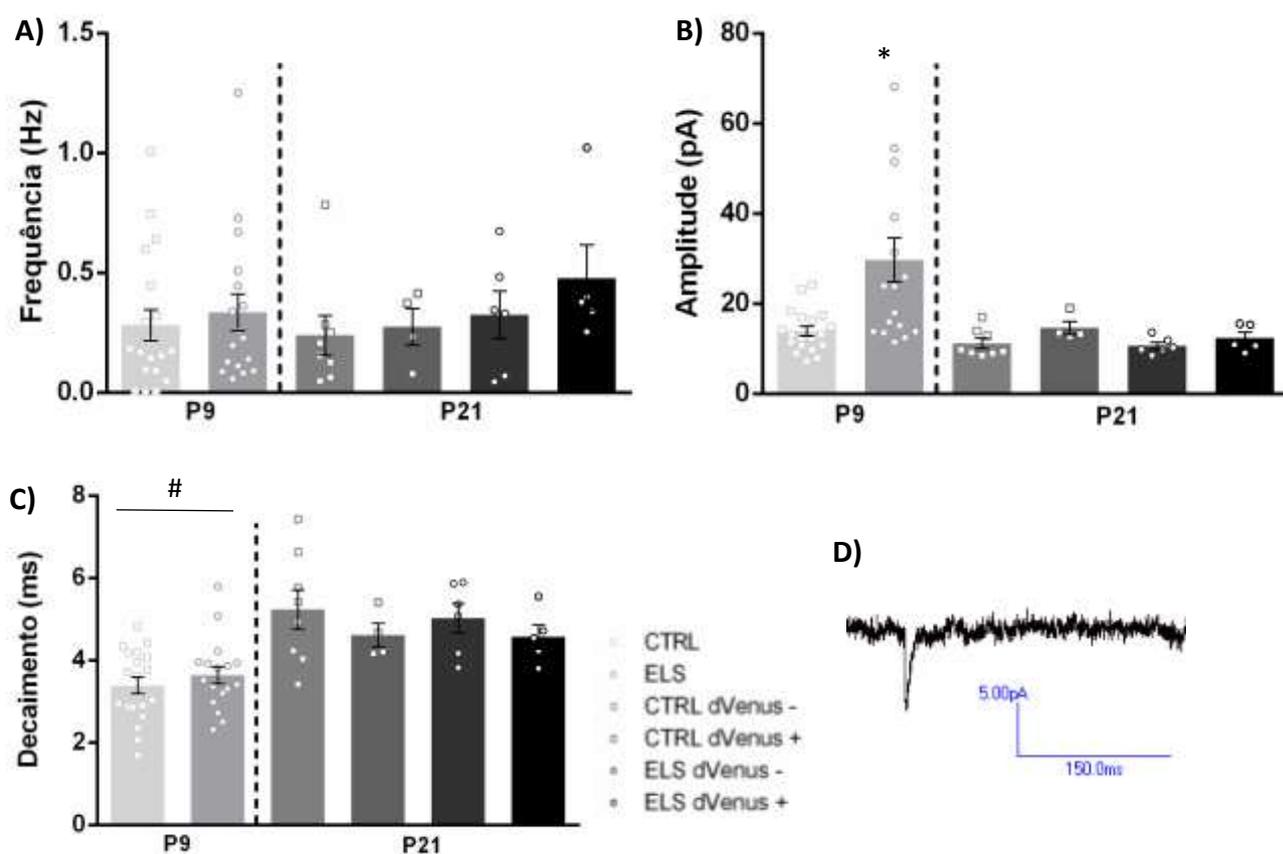


Figura 7. Parâmetros avaliados nos eventos de mEPSCs em animais P9 e P21. Da esquerda (cinza claro) para a direita (preto): P9 CTRL (n = 19); P9 ELS (n = 17); P21 CTRL células *dVenus* - (n = 8); P21 CTRL células *dVenus* + (n = 4); P21 ELS células *dVenus* - (n = 6); P21 ELS células *dVenus* + (n = 5). A) Frequência (Hz); B) Amplitude (pA) e c) Tempo de decaimento (ms). D) Exemplo de um registro de evento de mEPSCs. * p < 0.001 quando comparado a qualquer outro grupo, # p < 0.0001 efeito da idade (P9 < P21).

Tabela 5. Média ± SEM para todos os parâmetros avaliados nos registros dos mEPSCs, em P9 e P21.

	P9		P21			
	Mean ± EPM		Mean ± EPM			
	CTRL	ELS	CTRL <i>dVenus</i> -	CTRL <i>dVenus</i> +	ELS <i>dVenus</i> -	ELS <i>dVenus</i> +
Frequency	0.28 ± 0.06	0.33 ± 0.07	0.23 ± 0.07	0.27 ± 0.07	0.32 ± 0.09	0.47 ± 0.13
Amplitude	13.89 ± 1.06	29.75 ± 4.90	11.20 ± 3.07	14.62 ± 1.46	10.66 ± 0.73	12.35 ± 1.31
Decay	3.39 ± 0.20	3.64 ± 0.21	5.23 ± 0.47	4.61 ± 0.28	5.03 ± 0.35	4.56 ± 0.29

6.2.3. Células *dVenus* +

A avaliação qualitativa indicou um padrão diferente de ativação das células *dVenus* nos animais P9 e P21, como podemos observado na Figura 8. Nos animais P9, não foram encontradas células *dVenus* +, nem em CTRL ou em ELS.

Nos animais P21, foram examinadas as regiões anterior e posterior do DG, bem como as lâminas infra e suprapiramidais da DG. Para a análise quantitativa de P21, a ANOVA de duas vias revelou que os grupos apresentaram número semelhante de células *dVenus* + por área quando analisamos o DG total (lâminas infra e suprapiramidais juntas), nas regiões anterior e posterior ($p > 0.05$) (Figura 9C e 9F). Quando dividimos a análise entre essas duas lâminas, também não foi encontrada diferença na lâmina suprapiramidal ($p > 0.05$) (Figura 9B e 9E). No entanto, na lâmina infrapiramidal, região posterior, foi encontrado um efeito do ELS ($F_{1,19} = 7.841$, $p < 0.05$), mas nenhum efeito do sexo ou interação entre os dois fatores ($p > 0.05$) (Figura 9D). A média da densidade de células para todos os grupos e regiões analisadas está mostrada na Tabela 6.

Tabela 6. Número médio de células *dVenus* + por $\text{mm}^2 \pm \text{EPM}$ para machos e fêmeas, CTRL e ELS, nas regiões anterior e posterior do hipocampo, incluindo DG total, lâmina infra e suprapiramidal.

		Machos		Fêmeas	
		Média \pm EPM		Média \pm EPM	
		CTRL	ELS	CTRL	ELS
Anterior	Infrapiramidal	24.77 \pm 4.20	27.56 \pm 3.81	31.64 \pm 6.83	40.02 \pm 6.79
	Suprapiramidal	102.50 \pm 16.21	95.60 \pm 6.59	106.60 \pm 14.46	129.60 \pm 18.72
	Total	127.30 \pm 16.33	123.20 \pm 9.15	138.3 \pm 20.76	169.70 \pm 24.42
Posterior	Infrapiramidal	17.98 \pm 3.91	6.89 \pm 2.50	13.30 \pm 4.97	6.39 \pm 3.79
	Suprapiramidal	40.85 \pm 10.35	41.02 \pm 6.24	44.78 \pm 4.42	34.73 \pm 4.02
	Total	58.83 \pm 10.35	47.91 \pm 6.57	58.08 \pm 3.86	41.12 \pm 7.08

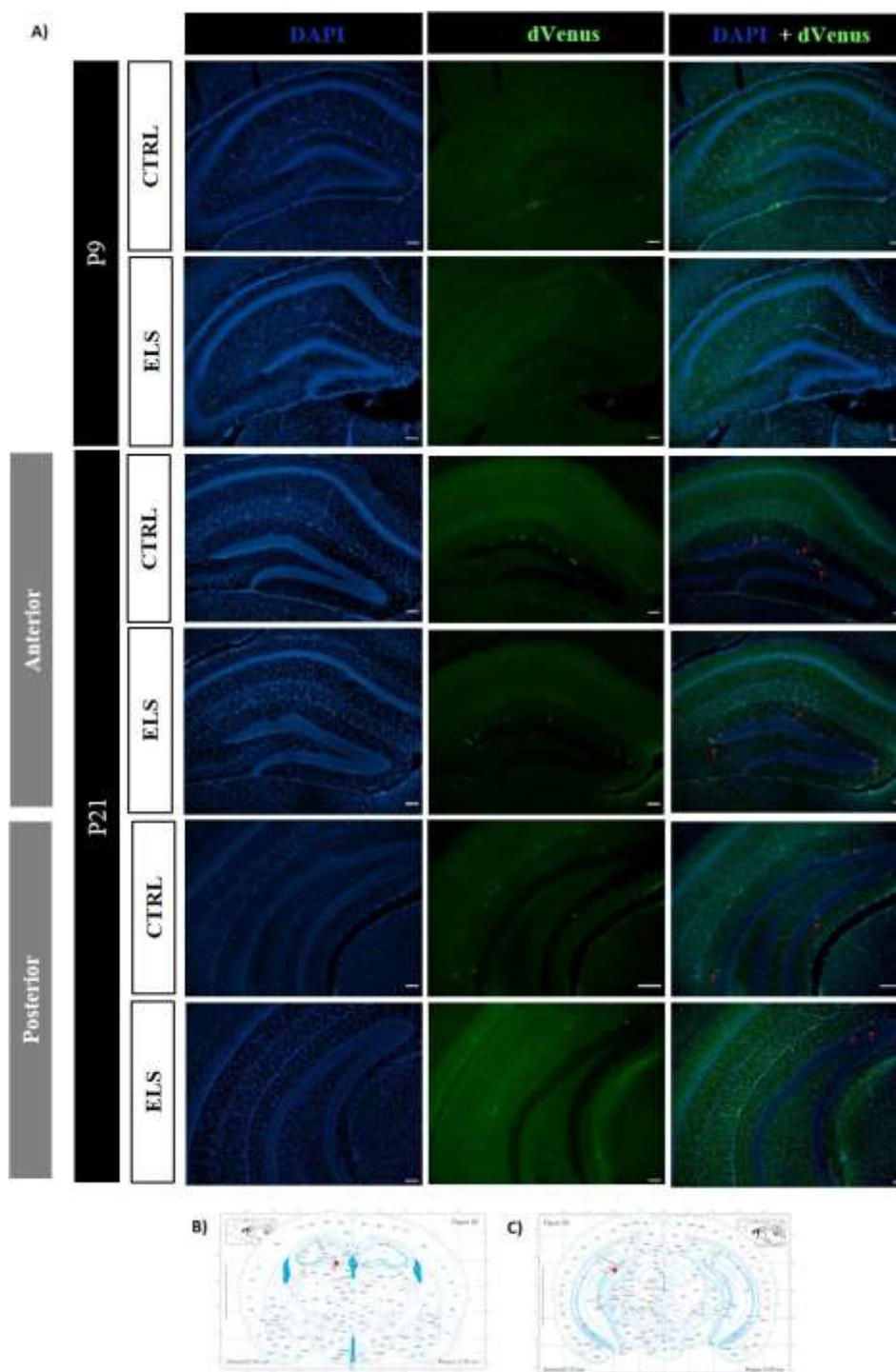


Figura 8. *dVenus*. A) Fotomicrografia de 40 μm de secções coronais do hipocampo de camundongos *Arc::dVenus*, mostrando células *dVenus* positivas. De cima para baixo: P9 CTRL, P9 ELS, P21 CTRL (secção anterior); P21 ELS (secção anterior); P21 CTRL (secção posterior) e P21 ELS (secção posterior). Barras de escala representam 100 μm . Representação estereotáxica com ponto vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia está mostrada em B) para secções anteriores e em C) para secções posteriores.

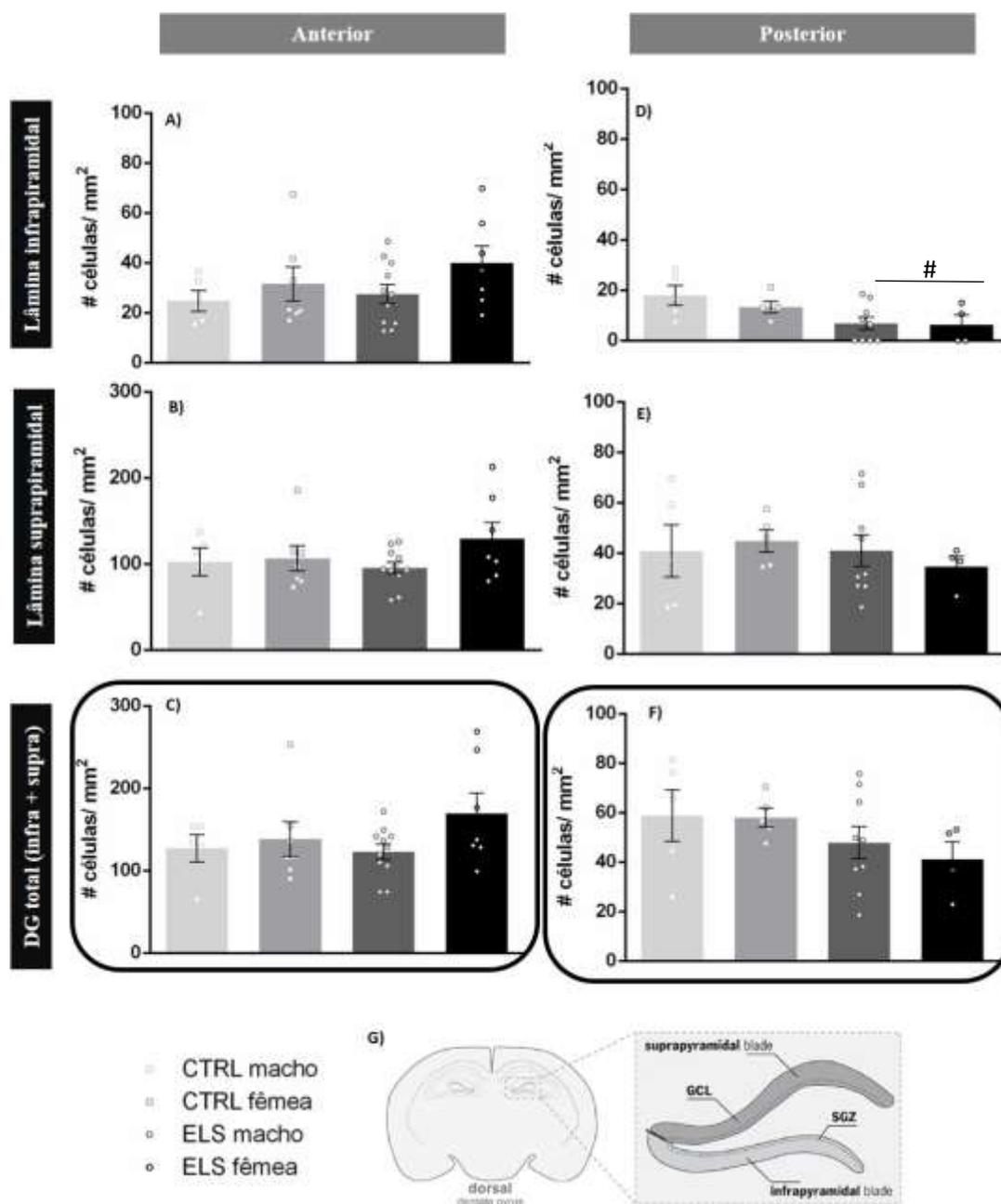


Figura 9. Contagem de células *dVenus* +, por área, em filhotes P21. Na coluna esquerda, estão os resultados obtidos a partir da contagem em secções anteriores e na coluna direita, a partir das secções posteriores. Linhas de cima para baixo: lâmina infrapiramidal do DG, lâmina suprapiramidal do DG e DG total (lâminas infra + suprapiramidais). As barras de cinza claro a preto representam CTRL masculino (n = 5 anterior e 5 posterior), CTRL feminino (n = 7 anterior e 5 posterior), ELS masculino (n = 11 anterior e 9 posterior) e ELS feminino (n = 7 anteriores e 4 posteriores), respectivamente. G) Representação dos critérios utilizados para delimitar lâminas infra e suprapiramidais. GCL: camada de células granulares, SGZ: zona subgranular (Ilustração editada de ALVES et al. 2017). # p < 0.05 efeito do ELS (ELS < CTRL).

6.2.4. Co-localização de células *Arc*⁺ e *dVenus*⁺

A ANOVA de duas vias revelou que os grupos CTRL e ELS apresentaram proporção semelhante de células *dVenus*⁺ que também são *Arc*⁺ ($p > 0.05$, 98.21% \pm 1.78 machos CTRL, 92.33% \pm 2.47 fêmeas CTRL, 92.79 \pm 2.63 machos ELS e 93.95 \pm 1.77 fêmeas ELS) (Figura 10).

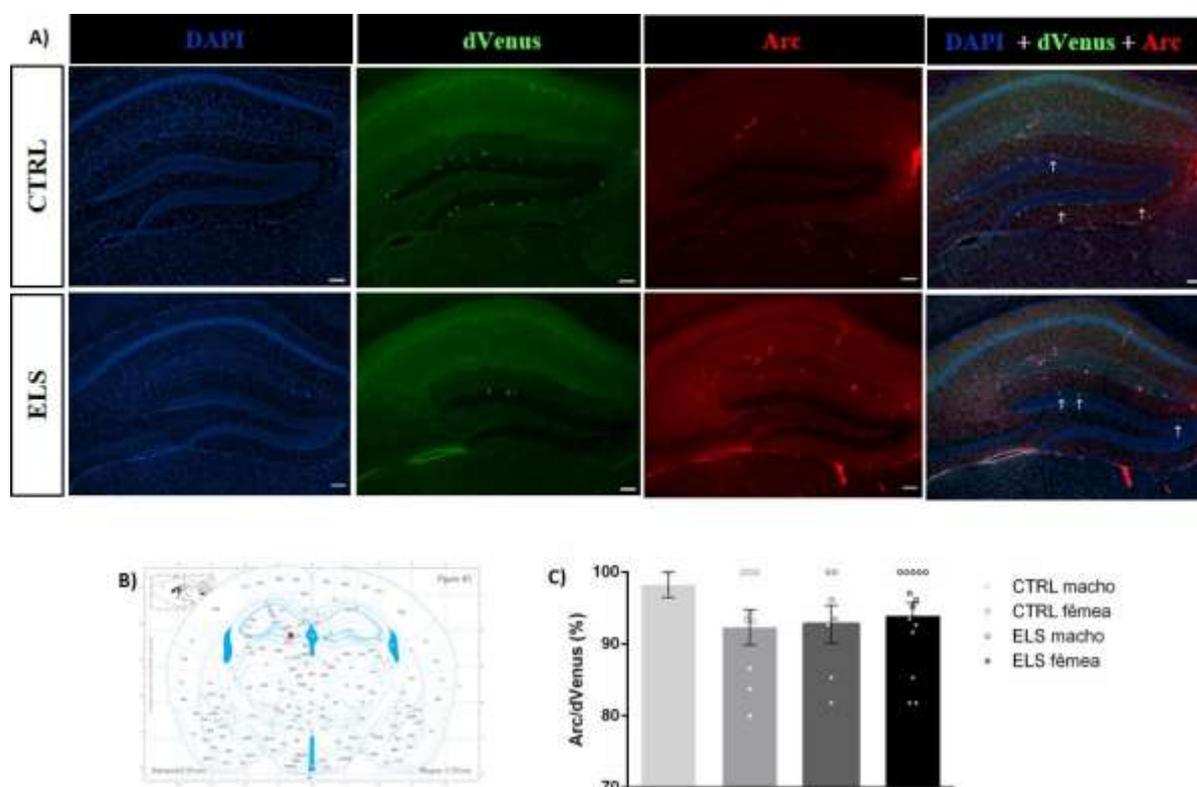


Figura 10. Proporção de células *dVenus*⁺ que também são *Arc*⁺, em filhotes P21. A) Fotomicrografia de 40 μ m de seções coronais do hipocampo de camundongo *Arc::dVenus* com marcações para *Arc*. Barras de escala representam 100 μ m. B) Representação estereotóxica com ponto vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia. C) Proporção (porcentagem) de células *dVenus*⁺ também *Arc*⁺. As barras cinza, azul, preto e laranja representam os grupos CTRL macho (n = 2), CTRL fêmea (n = 9), ELS macho (n = 7) e ELS fêmea (n = 14), respectivamente.

6.2.5. Imunoreatividade a *Egr1*

Resultados anteriores do laboratório quantificaram o nível de proteína *Egr1* por *Western Blotting*, mostrando níveis mais altos de *Egr1* em animais ELS do que CTRL em P9, mas nenhuma diferença em P21 (dados não publicados). A expressão de *Egr1* foi reduzida em animais P9 (dados não publicados), enquanto nenhuma diferença foi encontrada em P21 (apresentado aqui na Figura 6).

A avaliação qualitativa indicou um padrão diferente de ativação de *Egr1* em animais P9 e P21. Nos animais P9, as células positivas para *Egr1* são mais proeminentes no DG, mas pouquíssimas estão presentes em CA1, enquanto nos animais P21 observa-se o contrário, uma massa de células *Egr1* + em CA1 e quase nenhum sinal presente no DG (Figura 11A). Para P9, o teste *T de Student* revelou que CTRL e ELS apresentaram intensidade relativa semelhante de *Egr1* ($p > 0.05$, 2.70 ± 0.31 CTRL e 3.94 ± 0.31 ELS) no DG (Figura 11D). Os camundongos P21 também apresentaram intensidade semelhante de *Egr1* na região CA1 do hipocampo, independentemente do protocolo de ELS ($p > 0.05$, 15.68 ± 1.49 CTRL e 17.77 ± 1.33 ELS) (Figura 11E).

6.2.6. Imunoreatividade a *Arc*

A avaliação qualitativa indica um padrão diferente de ativação de *Arc* nos animais P9 e P21, como demonstrado na Figura 12. Nos animais P9, não foram encontradas células positivas para *Arc*, nem nas fatias de hipocampo CTRL nem ELS. Nos animais P21, foi analisado separadamente fatias das regiões anteriores e posteriores do DG. O teste *T de Student* revelou que CTRL e ELS apresentaram número semelhante de células *Arc* + por área, tanto na região anterior ($p > 0.05$, 118.70 ± 29.73 CTRL e 137.90 ± 28.93 ELS) quanto

na posterior ($p > 0.05$, 96.15 ± 22.47 CTRL e 70.37 ± 7.49 ELS) (Figuras 12E e 12F, respectivamente).

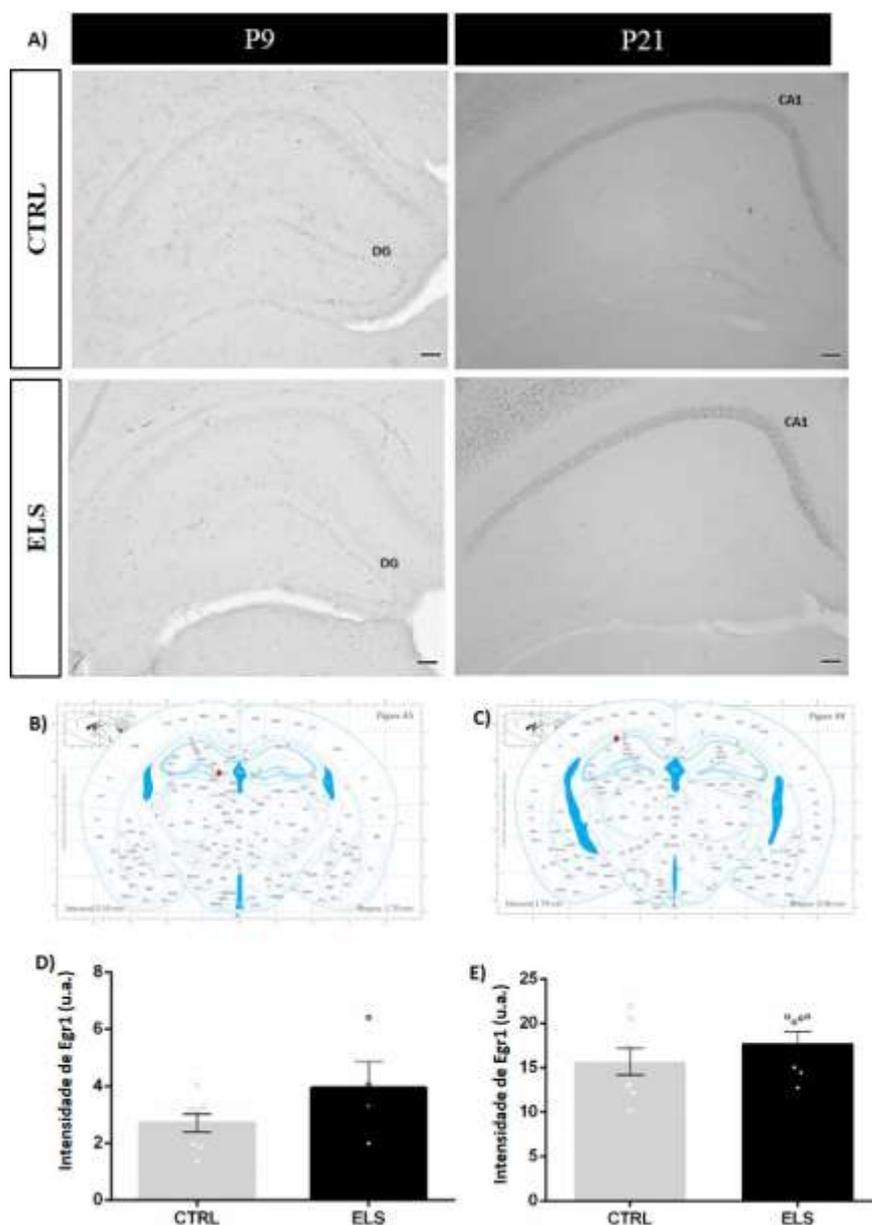


Figura 11. Imunoistoquímica para *Egr1* A) Fotomicrografia de 40 μm de seções coronais do hipocampo de camundongos mostrando imunorreatividade à proteína *Egr1* no DG de P9 CTRL ($n = 8$), P9 ELS ($n = 4$), P21 CTRL ($n = 8$) e P21 ELS ($n = 7$). Barras de escala representam 100 μm . Representação estereotáxica com ponto vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia está mostrada em B) para P9 e C) para P21. D) Intensidade de *Egr1* no DG de P9 e H) intensidade de *Egr1* na região CA1 de P21.

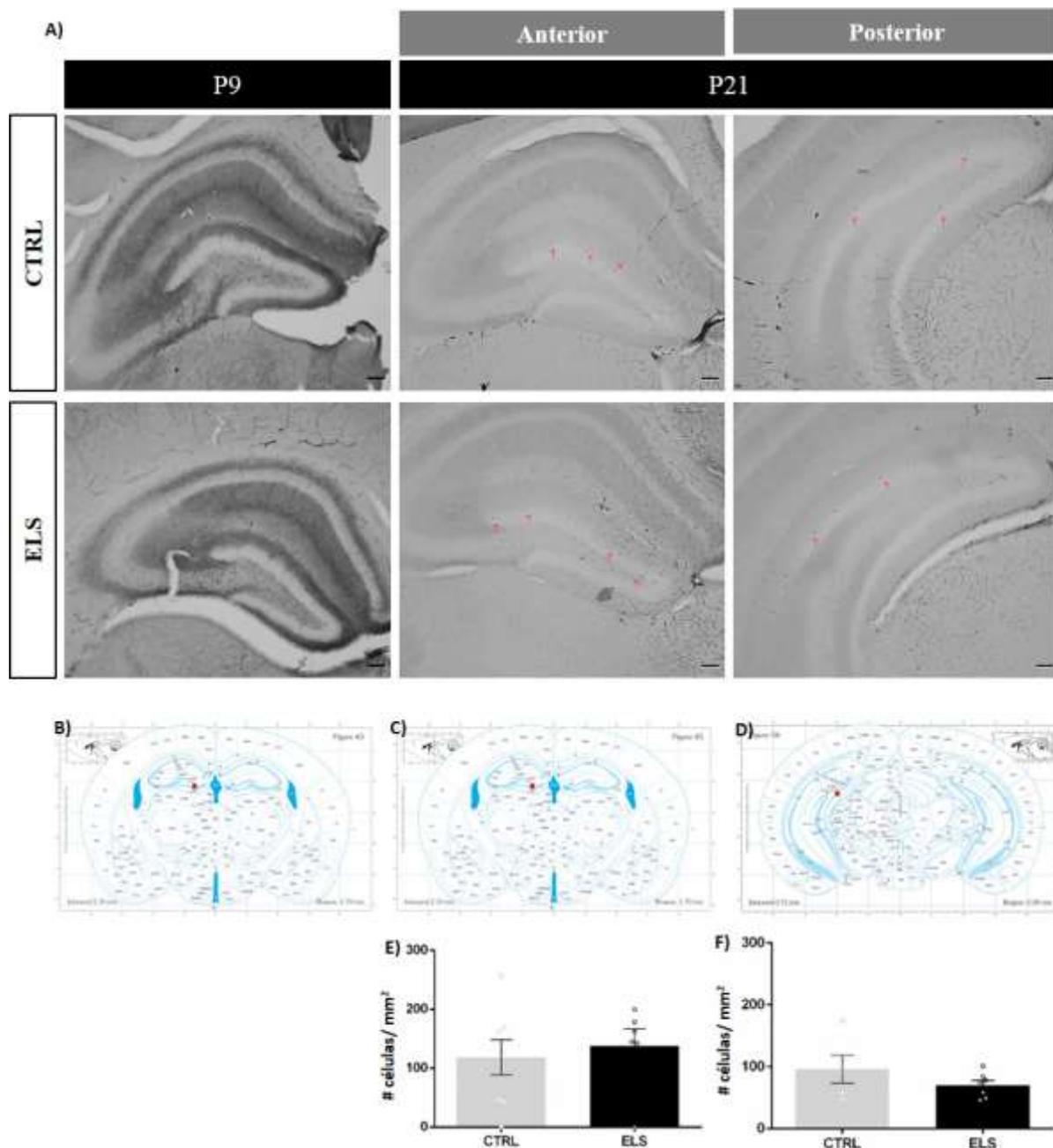


Figura 12. Imunoistoquímica para *Arc*. A) Fotomicrografia de seções coronais de 40 μm do hipocampo de camundongos mostrando imunorreatividade para proteína *Arc* no DG de P9 CTRL, P9 ELS, P21 CTRL (n = 8 anterior e 5 posterior) e P21 ELS (n = 6 anterior e 7 posterior). Barras de escala representam 100 μm . Representação estereotóxica com ponto vermelho indicando a região observada nas imagens microscópicas é mostrada em B) para P9; C) para P21 (fatia anterior) e D) para P21 (fatia posterior). Densidade de células *Arc* + em P21 está representado nos gráficos E) e F), para as regiões anterior e posterior, respectivamente.

6.2.7. Imunoreatividade a *c-Fos*

A avaliação qualitativa indicou um padrão diferente de ativação de *c-Fos* nos animais P9 e P21, como observado na Figura 13. Nos animais P9, muitas células positivas podem ser observadas em toda a fatia e, especialmente, uma massa de células presente no DG. Em P21, o sinal de *c-Fos* é mais fraco e uma massa de células está mais localizada na zona subgranular da DG, embora também possam ser observadas células individualizadas com sinal mais intenso espalhadas pelo DG. Quantitativamente, o teste *t de Student* revelou que P9 CTRL e ELS apresentaram intensidade semelhante de *c-Fos* ($p > 0.05$, 30.62 ± 1.46 CTRL e 25.26 ± 1.43 ELS). P21 CTRL e ELS também apresentaram número semelhante de células / mm^2 na região posterior, independentemente da lâmina de células DG avaliada ($p > 0.05$). Na região anterior, P21 ELS apresentou menor densidade de células na lâmina suprapiramidal e no DG total em comparação ao CTRL, mas densidade semelhante de células na lâmina infra-pirâmide ($p = 0,058$) (Figura 14). A média da densidade de células para animais P21 nas regiões analisadas está na Tabela 7

Tabela 7. Número médio de células *c-Fos* positivas / $\text{mm}^2 \pm \text{EPM}$ para P21 CTRL e P21 ELS, nas regiões anterior e posterior do hipocampo, incluindo lâmina infra e suprapiramidal do DG e DG total.

		Média \pm EPM	
		CTRL	ELS
Anterior	Infrapiramidal	166.90 \pm 15.95	130.00 \pm 10.00
	Suprapiramidal	217.80 \pm 13.80	154.00 \pm 6.81
	Total	380.10 \pm 27.68	284.00 \pm 14.13
Posterior	Infrapiramidal	98.07 \pm 16.31	124.80 \pm 15.29
	Suprapiramidal	55.86 \pm 11.42	63.37 \pm 9.67
	Total	153.90 \pm 23.89	193.20 \pm 22.05

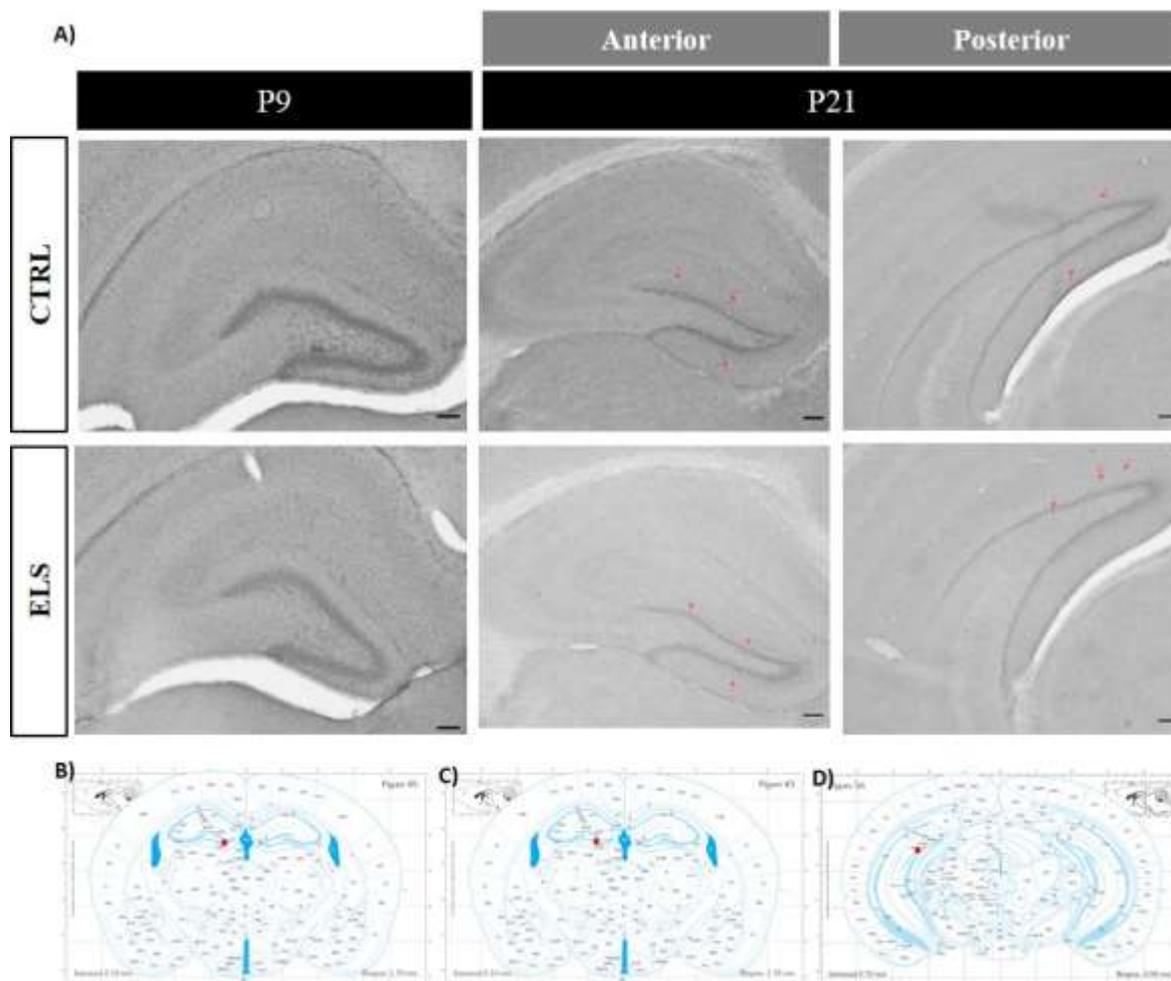


Figura 13. Imunoistoquímica *c-Fos*. A) Fotomicrografia de 40 μm de seções coronais do hipocampo de camundongos mostrando imunorreatividade à proteína *c-Fos* no DG de P9 CTRL, P9 ELS, P21 CTRL (secção anterior), P21 ELS (secção anterior), P21 CTRL (secção posterior) e P21 ELS (secção posterior). Barras de escala representam 100 μm . Representação estereotáxica com pontos vermelhos indicando a região observada é mostrada em B) para P9; C) para P21 (fatia anterior) e D) para P21 (fatia posterior).

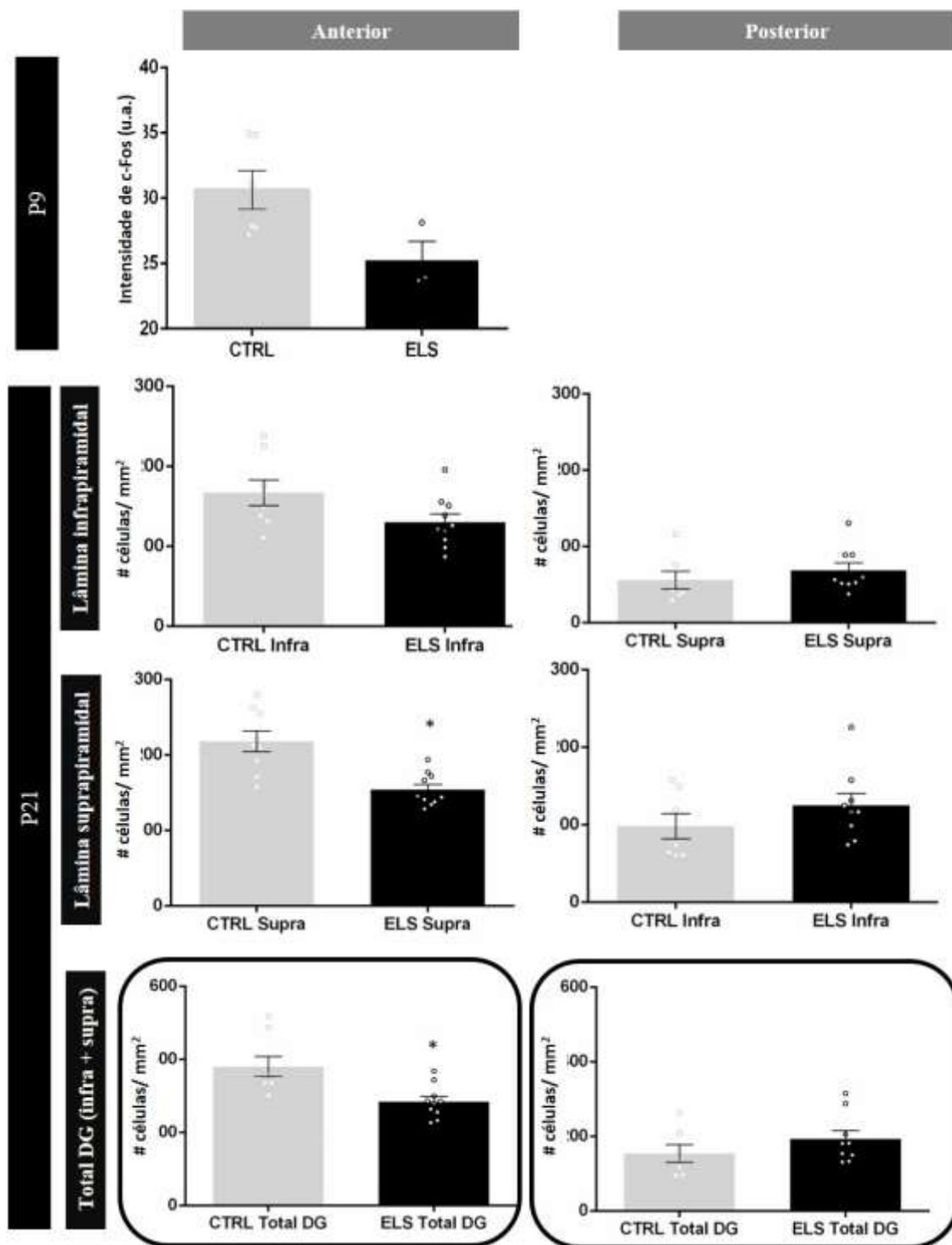


Figura 14. Quantificação de *c-Fos*. Na coluna da esquerda, resultados da quantificação realizada nas fatias anteriores e na colunas direita, nas fatias posteriores. Linhas de cima para baixo: intensidade *c-Fos* em P9, densidade de células *c-Fos*+ na lâmina infrapiramidal do DG em P21, na lâmina suprapiramidal do DG em P21 e DG total em P21. n = 6 (P9 CTRL), 3 (P9 ELS), 8 (P21 CTRL anterior), 10 (P21 CTRL anterior), 7 (P21 CTRL posterior), 9 (P21 CTRL posterior), 9 (P21 ELS posterior). * p < 0.01 diferente de CTRL.

7. EFEITOS A LONGO PRAZO DO ELS EM MODELO EXPERIMENTAL DE TEPT

7.1. Materiais e métodos

7.1.1. Trauma na vida adulta com exposição a predador: modelo de TEPT

Os camundongos foram habituados, durante dois dias, em uma arena acrílica quadrangular/poligonal transparente (154 x 72 x 64 cm) com acesso livre a alimentos e água. O piso da arena quadrangular é de acrílico transparente, disposto sobre uma plataforma de aço inoxidável, e é dividido por linhas vermelhas (4.2 mm de largura) em 20 retângulos iguais. O aparato foi colocado sobre uma superfície de granito (2 x 85 x 170 cm), elevada a 83 cm do chão do laboratório. Uma caixa de abrigo (“toca”) (26,5 x 17,5 x 12.5 cm), com paredes de acrílico preto foi posicionada em um canto da arena poligonal. A toca possui uma entrada circular com um diâmetro de 4 cm, permitindo que os roedores entrem e saiam da mesma. Além disso, duas plataformas de escape feita de acrílico cristal com pequenos degraus de acesso foram dispostas uma ao lado da caixa abrigo, e outra na parede lateral da arena (ALMADA et al., 2015; ALMADA; COIMBRA, 2015).

No dia seguinte à habituação, os camundongos foram expostos individualmente, durante 5 min, à arena poligonal contendo a serpente, sem qualquer barreira que impedisse o contato direto com o predador. Os animais do grupo controle não foram confrontados com o predador. Durante a exposição à arena, foi realizada filmagem para posterior análise comportamental. Após uma semana, os camundongos foram reexpostos durante 5 min (ALMADA et al., 2015; COIMBRA et al., 2017a, 2017b) à arena, mas dessa vez contendo apenas a exúvia resultante da ecdise da serpente, de forma a se avaliar a perduração do comportamento (resistência à extinção), bem como a capacidade de estímulos que

relembrem o "trauma" (no caso, a exúvia e o próprio contexto da arena) em evocar comportamentos tipo-TEPT. Reexposições também foram igualmente filmadas (câmera *Sony Handycam, HDRSR10*). Os vídeos foram assistidos para avaliação comportamental, mensurada com o programa *X-Plo-Rat 2005* (versão beta 1.0.1). As análises foram sempre realizadas de forma cega (sem o pesquisador saber a qual grupo pertencia cada animal observado). Um esquema da organização da arena e posicionamento dos animais e objetos na mesma está demonstrado na Figura 15.

A arena poligonal com uma toca consiste em um modelo projetado inicialmente pelo Prof. Norberto C. Coimbra (COIMBRA et al., 2017a, 2017b) para estudar respostas comportamentais do tipo pânico exibidas por pequenos roedores na presença de serpentes selvagens, além de ser um modelo adequado para classificar claramente as respostas de fuga não-orientadas (explosivas) e orientadas (ALMADA; COIMBRA, 2015; ULLAH et al., 2015; BIAGIONI et al., 2016).

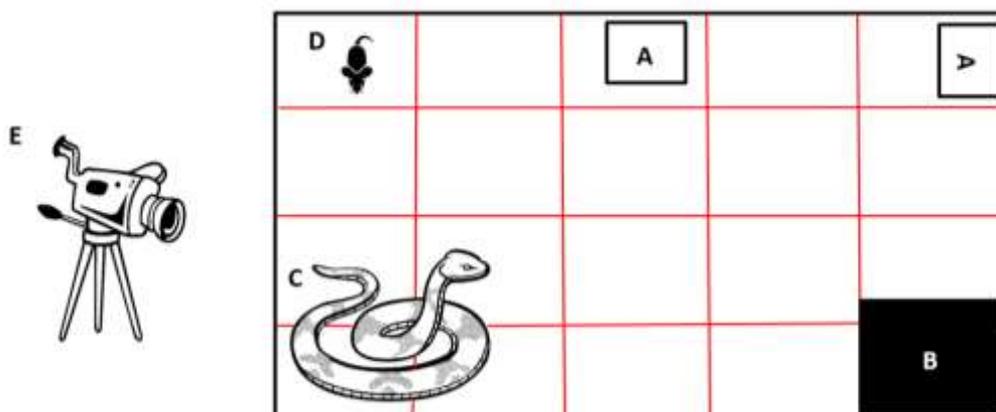


Figura 15. Esquema representativo da arena poligonal para serpentes e disposição inicial dos animais e dos objetos: A- Escadas, B- toca, C- serpente ou exúvia resultante da ecdise do ofídio, D- camundongo e E- filmadora para registro dos comportamentos.

Durante o confronto direto ou reexposição à arena, foram analisadas os seguintes comportamentos considerados representativos dos comportamentos de defesa (URIBEMARÍO et al., 2012; TWARDOWSCHY et al., 2013; ALMADA et al., 2015; ALMADA; COIMBRA, 2015; COIMBRA et al., 2017b):

A. Respostas de avaliação de risco (*risk assessment*), caracterizadas por: a) *strech attend posture*: postura exploratória temerosa, na qual o corpo é esticado para a frente, mas as patas traseiras do animal permanecem em posição, seguido de retração para a posição original; b) *flat back approach*: movimento de aproximação cautelosa, e estiramento do corpo; c) atenção defensiva: interrupção do comportamento em curso por menos de 6 segundos, geralmente seguido por farejo do ar circundante e escaneamento do ambiente experimental;

B. Imobilidade defensiva ou “*freezing*”: ausência de movimentos, com exceção dos relacionados com a respiração, durante pelo menos 6 segundos;

C. Fuga, composta por: a) fuga orientada: respostas de fuga (corridas e saltos verticais) direcionadas para as plataformas de abrigo e/ou toca, sempre em direção oposta àquela ocupada pelo predador; b) fuga não orientada ou “explosiva”: Respostas de fuga (corrida e saltos horizontais) direcionadas para o predador ou não direcionadas para áreas de abrigo, às vezes com choques com as amuradas; c) fuga total: soma da frequência de escapes orientados e não orientados, ou seja, correndo ou saltando em direção às escadas ou toca ou outras direções sem áreas protegidas, após observarem ou se aproximarem da serpente;

D. Interação com a serpente ou com a exúvia: contato corporal ou grande aproximação da serpente ou da exúvia, geralmente acompanhado de farejos.

E. Presença nas zonas protegidas: abrigo nas plataformas (escadas) e toca;

Para cada um dos comportamentos, calculou-se a porcentagem do tempo total que foi expandido no comportamento, bem como o índice comportamental (*behavioral index*, BI), que é a frequência de eventos corrigida descontando-se o tempo que o animal permaneceu em áreas protegidas, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{BI} = (100 * \text{número de ocorrências do comportamento}) / \text{tempo fora da toca}$$

7.1.2. Esfregaço vaginal (determinação da fase do ciclo estral das fêmeas)

Realizou-se o esfregaço vaginal nas fêmeas em até no máximo 2 horas após a exposição ou reexposição à arena, a fim de se identificar em qual a fase do ciclo estral elas se encontravam durante os testes. Optamos por fazer a avaliação da ciclagem após os experimentos, e não imediatamente antes da exposição, para evitar que algum possível estresse causado pelo procedimento interferisse no comportamento delas na arena.

Uma alça de inoculação foi inicialmente mergulhada em água e, então, introduzida na vagina da camundonga. A alça foi esterilizada entre um esfregaço e outro com a utilização de um isqueiro. O fluido retirado era espalhado em uma lâmina para microscopia de luz e corado com corante de uso hematológico (Panótipo Rápido, Laborclin, Paraná, Brasil), baseado no princípio de uso de um fixador (triarilmetano a 0,1%) e duas soluções corantes (xantenos a 0,1% e tiazinhas a 0,1%) por meio de imersões de 5 segundos em cada solução. As lâminas eram, então, lavadas em água e secadas ao ar.

Depois de secas, as lâminas foram observadas por microscopia óptica de campo claro. Alterações na aparência citológica dos esfregaços foram utilizadas para identificar as fases do ciclo estral: proestro, estro, metaestro e diestro, como demonstrado na Figura 16. A identificação das fases baseia-se nas diferentes configurações celulares (CALIGIONI, 2010; CORA; KOISTRA; TRAVLOS, 2015), sendo o *proestro* caracterizado por uma abundância de células epiteliais nucleadas, apresentando-se em grupos ou individualmente e ocasionalmente com algumas células cornificadas; *estro*, caracterizado predominantemente por células epiteliais cornificadas sem núcleo aparente e formato irregular; *metaestro*, definido por mistura de tipos celulares, com predominância de leucócitos e poucas células nucleadas e/ou cornificadas, e o *diestro*, caracterizado pela presença abundante de leucócitos com o núcleo multi-lobulado.

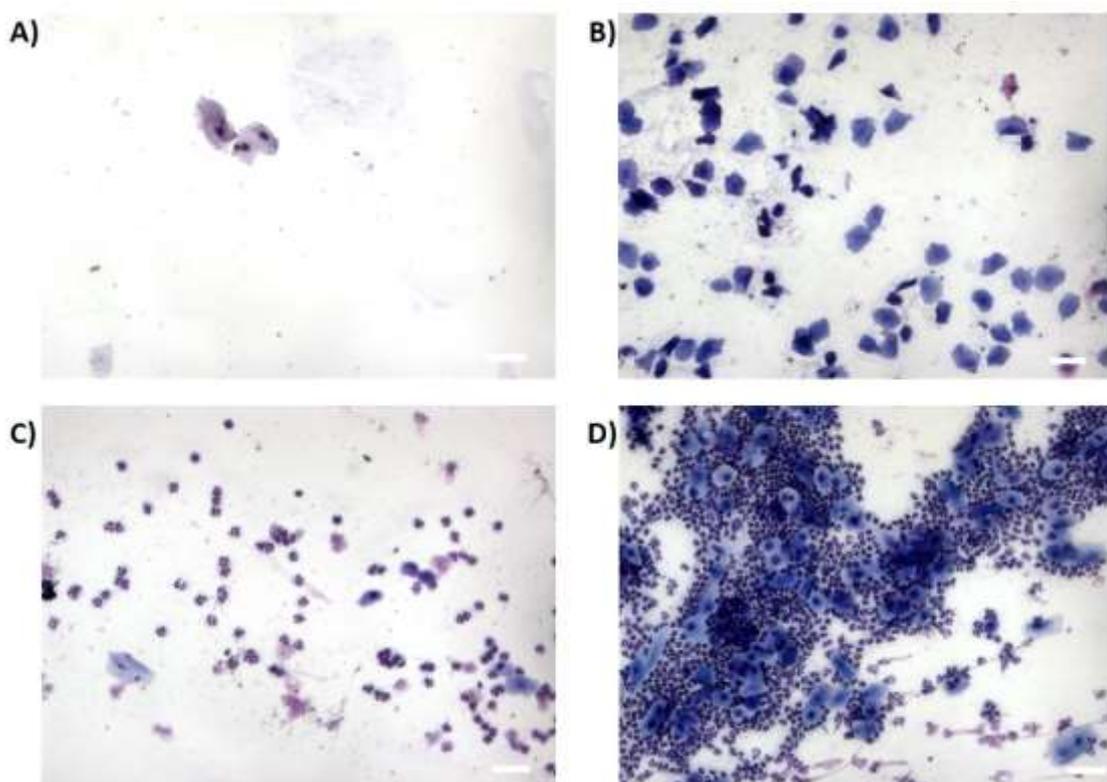


Figura 16. Fotomicroscopias de secreção vaginal corada, obtida de camundongas em diferentes fases do ciclo estral. A) *Proestro*, B) *Estro*, C) *Metaestro* e D) *Diestro*. Barra de escala equivale a 100 μm .

7.1.3. Imunistoquímica

7.1.3.1. Preparação dos tecidos: perfusão

Os animais foram perfundidos por via intracardíaca 90 min após a reexposição à arena, com solução tampão fosfato (PBS 0.1M, pH 7,4) e paraformaldeído a 4% (PFA 4%, pH 7,4). Os encéfalos foram retirados do crânio, pós-fixados em PFA a 4% por 24 horas e, em seguida, crioprotégidos em solução de sacarose a 20% (por 24h em cada solução). Finalmente, os encéfalos foram congelados em isopentano (a -40°C) e armazenados em *freezer* a -20°C.

Os encéfalos foram seccionados serialmente em cortes de 40 micrômetros de espessura em criostato *Microm HM-5005-E* (Alemanha) com temperatura em -22 e -18 °C, e as fatias foram armazenadas em solução anticongelante em *freezer* a -20°C até a realização dos ensaios.

7.1.3.2. Imuno-reatividade a *c-Fos*

Após preparação descrita anteriormente, as fatias foram submetidas a protocolo de imunistoquímica para *c-Fos* e finalização conforme descrito no item 6.1.3.4.3. e 6.1.3.4.4., apenas substituindo-se os anticorpos utilizados.

- Anticorpo primário: *Rabbit anti-c-Fos - Santa Cruz Biotechnology, sc-7202*, 1:1000

- Anticorpo secundário: *Goat anti-rabbit, Vector Laboratories BA-1000*, 1:1000

7.1.3.3. Análise imunistoquímica

Análises quantitativas de *c-Fos* foram realizadas em níveis anatômicos correspondentes entre os animais, em secções coronais do PVN (incluindo populações

magnoceulares e parvoceulares, entre os pontos de bregma -0.58 e -1.06; 4 a 5 fatias por animal) e PAG (dorso medial, entre os pontos de bregma -4.16 e -4.96, 2 a 5 fatias por animal) (FRANKLIN; PAXINOS, 2007). A quantificação foi realizada às cegas às condições experimentais utilizando *FIJI - ImageJ 1.52p* (National Institutes of Health, USA). As imagens foram capturadas em aumento de 20X para PVN e 10X para PAG, utilizando um microscópio *Olympus ScanScope BX61VS* (Japão).

7.2. Resultados

7.2.1. Comportamento defensivo em modelo experimental de TEPT

O experimento teve como objetivo avaliar os efeitos comportamentais do protocolo de ELS na vida adulta quando os animais foram submetidos a um estressor agudo (exposição a predador) e subsequente reexposição ao contexto, caracterizando um modelo experimental de TEPT. Os comportamentos avaliados foram: avaliação de risco, fuga, congelamento/imobilidade defensiva e interação com a serpente ou exúvia. As análises foram feitas com base na porcentagem média do tempo total (5 min) e no índice comportamental para cada grupo experimental em cada um desses comportamentos. Os resultados estão apresentados separadamente entre as sessões exposição e reexposição.

7.2.1.1. Sessão exposição à serpente

O teste de *Mann-Whitney* não indicou diferenças significativas entre os grupos ELS e CTRL na porcentagem de tempo total espendido dentro da **toca** (Figura 17), nem para machos nem para fêmeas.

No que se refere ao o comportamento de **avaliação de risco** (Figura 18), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ELS e CTRL nem na porcentagem de tempo total, nem no BI, nem para fêmeas nem para machos.

No que se refere o comportamento de **fuga** (Figura 19), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ELS e CTRL, nem para machos nem para fêmeas. Para a porcentagem de tempo total, o teste de *Mann-Whitney* revelou que o grupo ELS apresentou maior tempo de fuga em relação ao controle, em machos, mas não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre fêmeas.

Considerando o comportamento de **interação com a serpente** (Figura 20) não foram observadas diferenças significativas nem no BI nem na porcentagem do tempo total para fêmeas. Foram encontradas, entretanto, diferenças significativas entre machos. O teste de *Mann-Whitney* revelou que os machos ELS tiveram um maior BI, e houve um aumento percentual no tempo gasto nessas interações.

A Tabela 8 apresenta os valores médios de BI e porcentagem do tempo total expendido em cada um dos comportamentos durante a sessão de exposição à serpente.

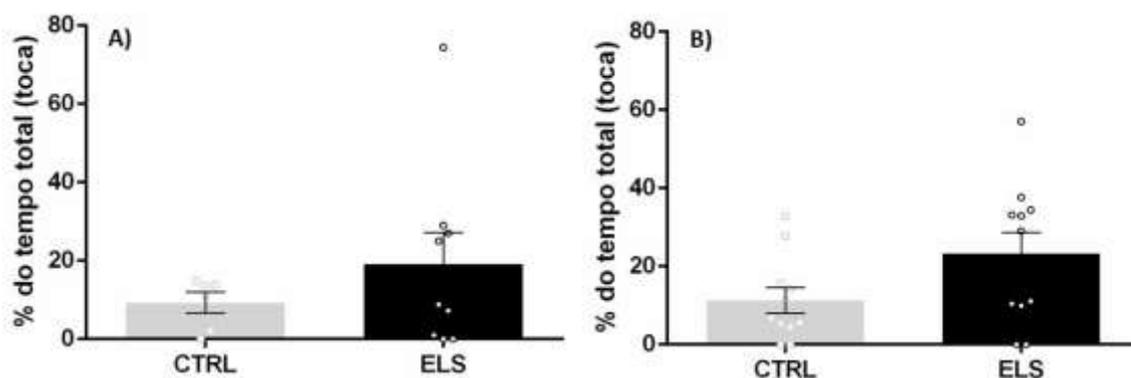


Figura 17. Porcentagem do tempo total expendido dentro da toca por camundongos CTRL e ELS. A) machos e B) fêmeas. n= 6 (machos CTRL), 9 (machos ELS); 11 (fêmeas CTRL – 18% em proestro, 54% em estro, 9% metaestro, 18% diestro); 11 (fêmea ELS – 45% estro; 18% metaestro, 36% diestro).

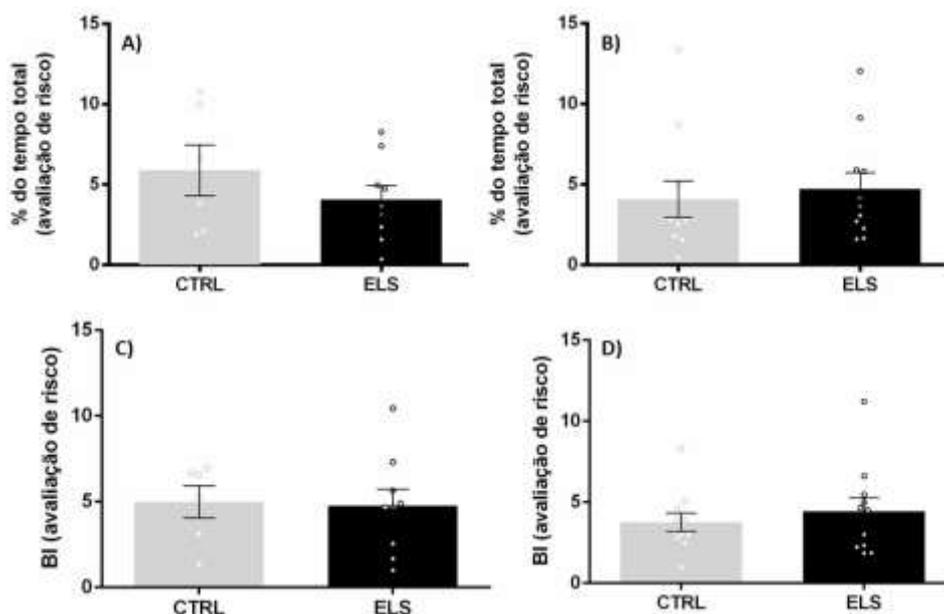


Figura 18. Comportamentos de avaliação de risco de camundongos CTRL e ELS, eliciado durante a exposição à serpente, sendo A) porcentagem do tempo total machos, B) porcentagem do tempo total fêmeas, C) BI machos e D) BI fêmeas n= 6 (machos CTRL), 9 (machos ELS); 11 (fêmeas CTRL – 18% em proestro, 54% em estro, 9% metaestro, 18% diestro); 11 (fêmeas ELS – 45% estro; 18% metaestro, 36% diestro).

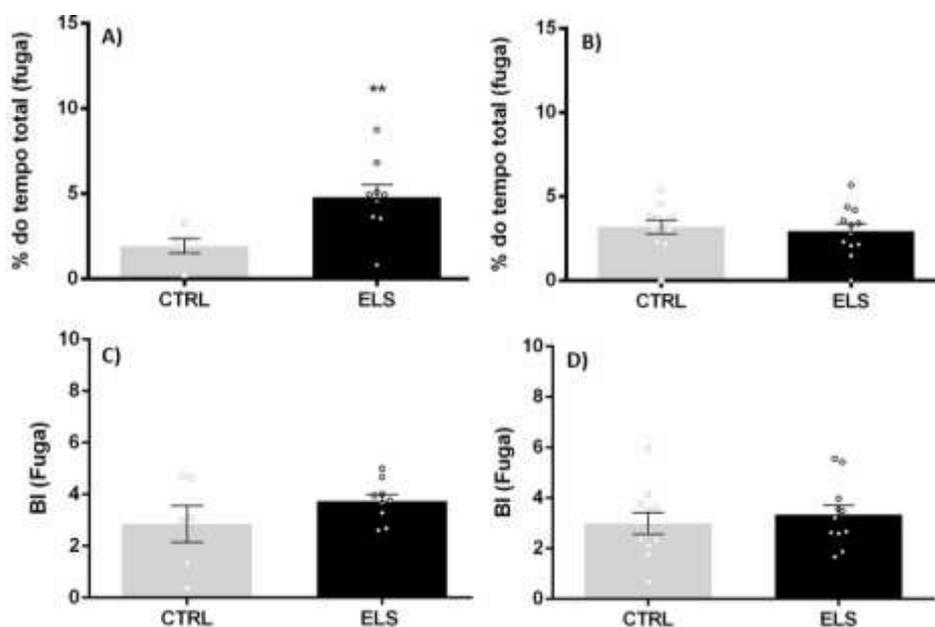


Figura 19. Comportamentos de fuga de camundongos CTRL e ELS, eliciado durante a exposição à serpente, sendo A) porcentagem do tempo total machos, B) porcentagem do tempo total fêmeas, C) BI machos e D) BI fêmeas. n= 6 (machos CTRL), 9 (machos ELS); 11 (fêmeas CTRL – 18% em proestro, 54% em estro, 9% metaestro, 18% diestro); 11 (fêmeas ELS – 45% estro; 18% metaestro, 36% diestro).

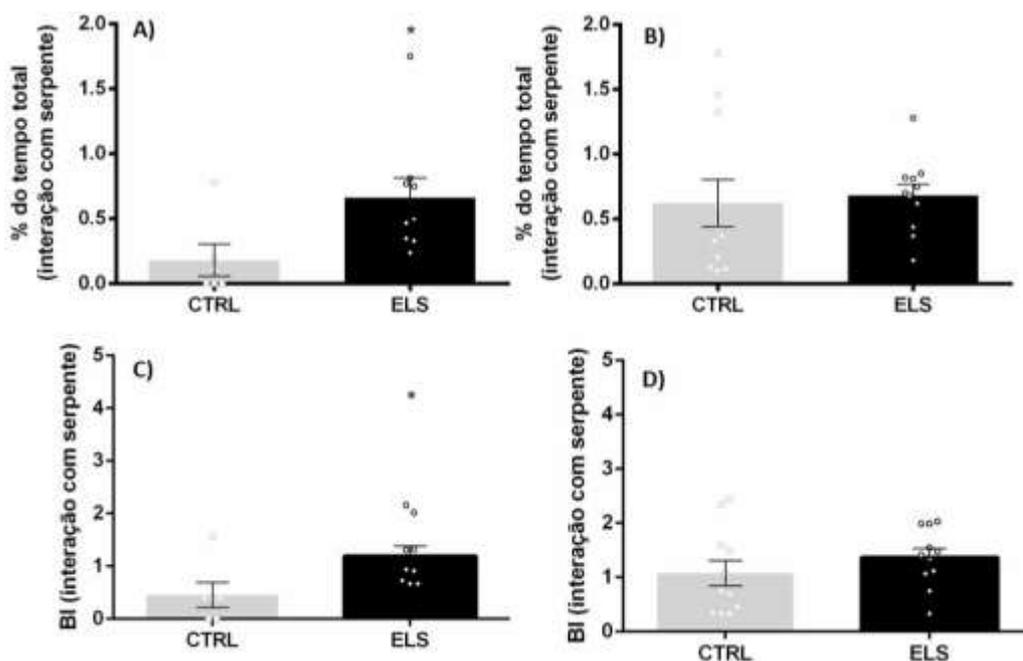


Figura 20. Comportamentos de interação com a serpente de camundongos CTRL e ELS, eliciado durante a exposição à serpente, sendo A) porcentagem do tempo total machos, B) porcentagem do tempo total fêmeas, C) BI machos e D) BI fêmeas. $n = 6$ (machos CTRL), 9 (machos ELS); 11 (fêmeas CTRL – 18% em proestro, 54% em estro, 9% metaestro, 18% diestro); 11 (fêmeas ELS – 45% estro; 18% metaestro, 36% diestro). * $p < 0.05$, quando comparado com o CTRL

Tabela 8. Média \pm EPM da porcentagem do tempo total (%) e do IB dos comportamentos analisados durante a sessão de exposição à serpente.

	Machos			Fêmeas		
	Média \pm EPM		Estatística	Média \pm EPM		Estatística
	CTRL	ELS		CTRL	ELS	
	Porcentagem do tempo total					
Toca	9.28 \pm 2.64	19.18 \pm 7.96	$p > 0.05$	11.27 \pm 3.23	23.25 \pm 5.45	$p > 0.05$
Avaliação de risco	5.89 \pm 1.58	4.06 \pm 0.86	$p > 0.05$	4.08 \pm 1.13	4.72 \pm 0.99	$p > 0.05$
Fuga	1.93 \pm 0.42	4.80 \pm 0.73	$p < 0.01$	3.18 \pm 0.38	2.95 \pm 0.43	$p > 0.05$
Interação com serpente	0.18 \pm 0.12	0.66 \pm 0.15	$p < 0.05$	0.62 \pm 0.18	0.68 \pm 0.88	$p > 0.05$
	Índice comportamental (BI)					
Toca	N/A	N/A		N/A	N/A	
Avaliação de risco	4.99 \pm 0.92	4.76 \pm 0.97	$p > 0.05$	3.75 \pm 0.56	4.43 \pm 0.83	$p > 0.05$
Fuga	2.86 \pm 0.70	3.73 \pm 0.26	$p > 0.05$	2.98 \pm 0.42	3.33 \pm 0.38	$p > 0.05$
Interação com serpente	0.43 \pm 0.23	1.19 \pm 0.18	$p < 0.05$	1.07 \pm 0.23	1.36 \pm 0.16	$p > 0.05$

7.2.1.2. Sessão reexposição ao contexto (com exúvia da ecdise da serpente)

Para a porcentagem de tempo total espendido dentro da **toca** (Figura 21), a ANOVA de duas vias não indicou diferença significativa do fator trauma, nem do fator ELS, tampouco interação entre os fatores para animais machos ($p > 0.05$). Para as fêmeas, foi observado efeito do fator ELS na média ($F_{1,37} = 38.86$, $p < 0.0001$), indicando que a experiência de ELS foi eficaz em aumentar o tempo que fêmeas passaram dentro da toca, independente da exposição ou não ao trauma na vida adulta. Não foram observados efeitos do trauma na vida adulta ou interação entre os dois fatores ($p > 0.05$)

No que se refere ao comportamento de **avaliação de risco** (Figura 22), a ANOVA de duas vias não identificou efeito significativo de nenhum dos fatores no tempo do comportamento ($p > 0.05$), seja em machos ou fêmeas. Entretanto, foi observado um efeito do fator ELS para fêmeas ($F_{1,37} = 5.30$, $p < 0.05$) no BI desse comportamento, sugerindo que o histórico de ELS aumente a avaliação de risco em fêmeas, independente do trauma na vida adulta.

Considerando o comportamento de **fuga** (Figura 23), a ANOVA revelou efeito significativo do fator trauma ($F_{1,27} = 4.83$, $p < 0.05$) para a porcentagem de tempo do comportamento em machos, mas sem interação entre os fatores ELS e trauma, sugerindo que a exposição ao estressor na vida adulta foi capaz de elicitare aumento nas respostas de fuga, independentemente do histórico de ELS. Para fêmeas, não foi observada diferença significativa na porcentagem de tempo ($p > 0.05$). Já em relação ao BI do comportamento, houve efeito significativo do fator trauma ($F_{1,27} = 16.47$, $p < 0.001$) bem como interação entre os dois fatores ($F_{1,27} = 12.36$, $p < 0.01$) para machos. A análise *post-hoc* com o teste de múltipla comparação de *Sidak's* revelou que o grupo ELS com trauma apresentou maior BI de fuga do que o grupo ELS que não teve contato anterior com a serpente ($p < 0.0001$). Para

fêmeas, também houve efeito significativo do fator trauma ($F_{1,37} = 4.68$, $p < 0.05$) no BI de fuga, mas sem efeito do ELS ou interação entre os fatores ($p > 0.05$).

Por fim, para o comportamento **interação com a exúvia** (Figura 24), a ANOVA de duas vias revelou interação entre os fatores ELS e trauma para a porcentagem de tempo do comportamento em machos ($F_{1,27} = 4.43$, $p < 0.05$), mas sem diferenças indicadas no teste *post-hoc*. Observou-se, ainda, interação entre os fatores ELS e trauma para o BI de interação com a exúvia em machos ($F_{1,27} = 5.53$, $p < 0.05$). A análise *post-hoc* com o teste de múltipla comparação de *Sidak's* revelou que, entre os que não passaram por trauma, o ELS foi eficaz em diminuir o BI de interação com a exúvia comparando com CTRL ($p < 0.05$). Não foi observada diferença significativa para fêmeas, nem em relação à porcentagem de tempo total de interação com a exúvia nem em relação ao BI ($p > 0.05$).

A Tabela 9 apresenta os valores médios de BI e porcentagem do tempo total expendido em cada um dos comportamentos durante a sessão de reexposição ao contexto.

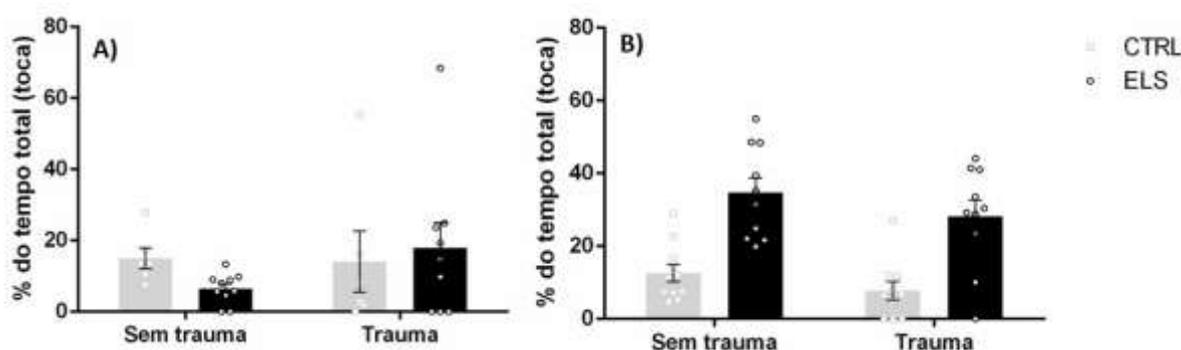


Figura 21. Porcentagem do tempo total expendido dentro da toca por camundongos CTRL e ELS durante a re-exposição ao contexto com exúvia, sendo A) machos e B) fêmeas. $n = 6$ (machos CTRL sem trauma), 6 (macho CTRL + trauma), 10 (machos ELS sem trauma), 9 (macho ELS + trauma), 11 (fêmeas CTRL sem trauma – 54% estro, 9% metaestro, 36% diestro), 11 (fêmea CTRL + trauma – 18% estro, 36% metaestro, 36% diestro), 10 (fêmeas ELS sem trauma – 80% estro, 10% metaestro, 10% diestro), 10 (fêmeas ELS + trauma – 20% estro, 70% metaestro, 10% diestro). Efeito significativo do ELS ($p < 0.0001$) para fêmeas.

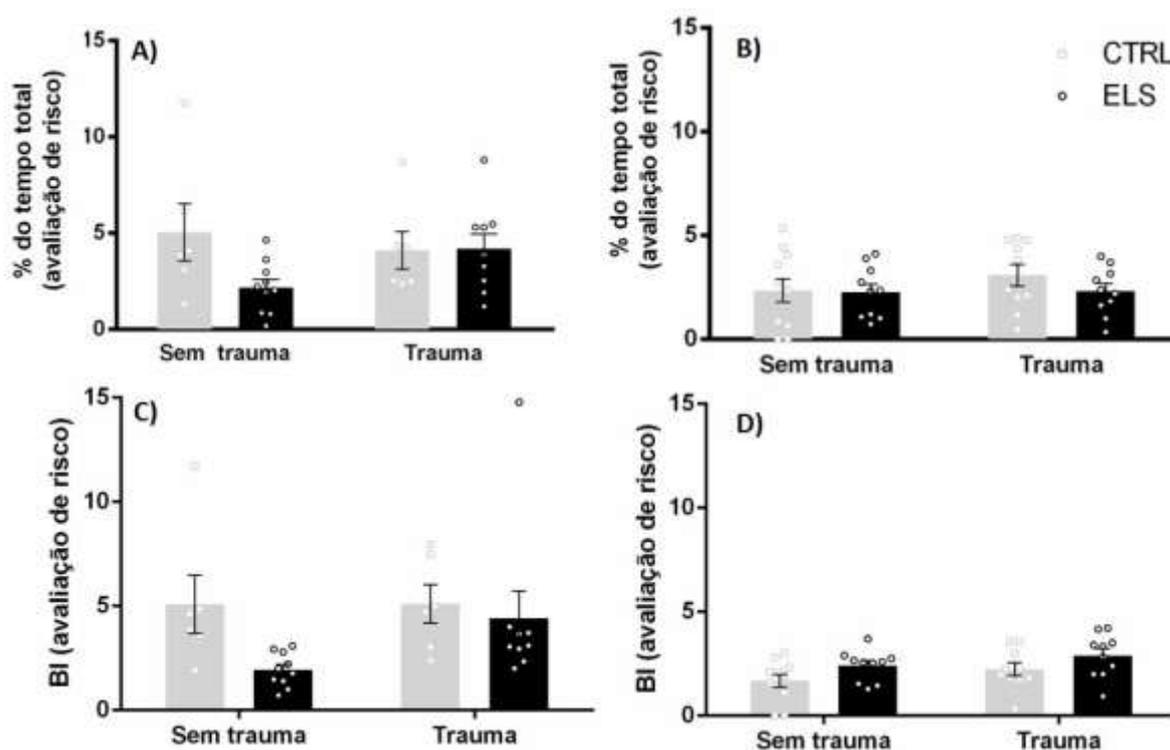


Figura 22. Comportamentos de avaliação de risco de camundongos CTRL e ELS, expostos previamente à serpente (grupo trauma) ou não (sem trauma), durante a reexposição ao contexto com exúvia, sendo A) porcentagem do tempo total machos, B) porcentagem do tempo total fêmeas, C) BI machos e D) BI fêmeas. $n = 6$ (machos CTRL sem trauma), 6 (macho CTRL + trauma), 10 (machos ELS sem trauma), 9 (macho ELS + trauma), 11 (fêmeas CTRL sem trauma – 54% estro, 9% metaestro, 36% diestro), 11 (fêmea CTRL + trauma – 18% estro, 36% metaestro, 36% diestro), 10 (fêmeas ELS sem trauma – 80% estro, 10% metaestro, 10% diestro), 10 (fêmeas ELS + trauma – 20% estro, 70% metaestro, 10% diestro). Efeito significativo do ELS no BI de fêmeas ($p < 0.05$).

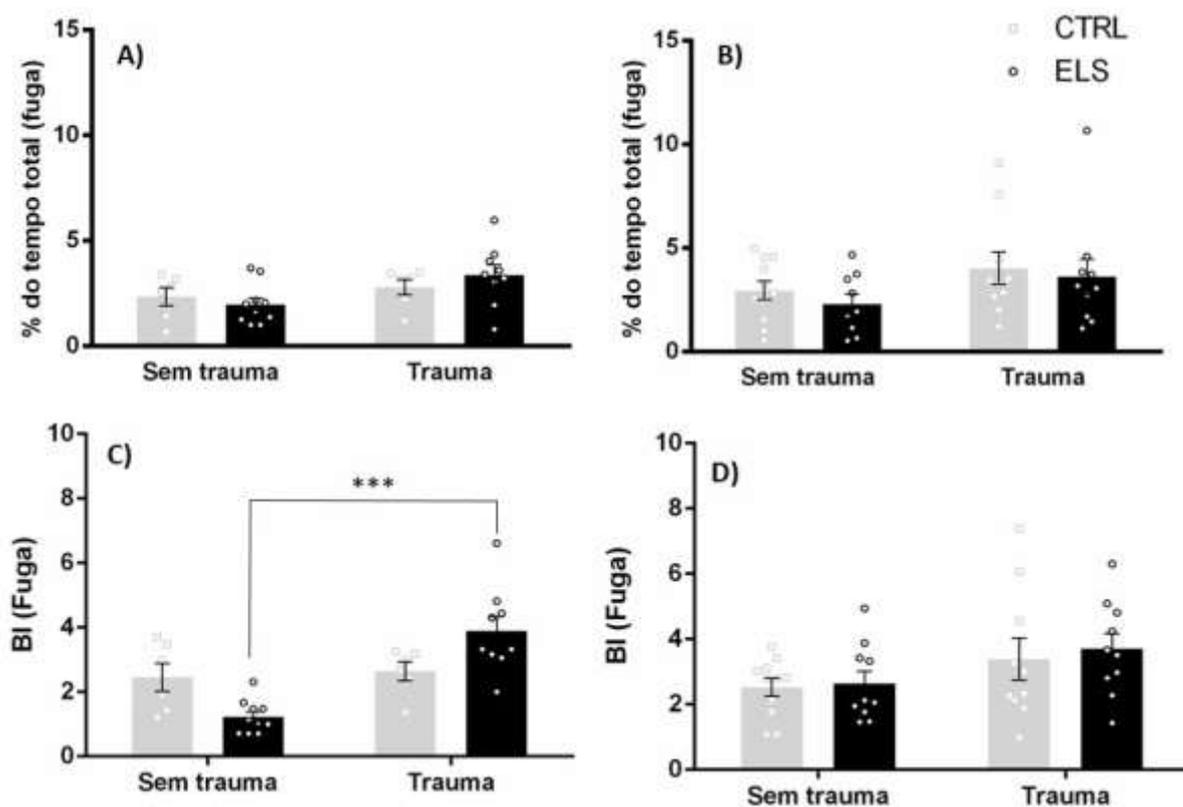


Figura 23. Comportamentos de fuga de camundongos CTRL e ELS, expostos previamente à serpente (grupo trauma) ou não (sem trauma), durante a reexposição ao contexto com exúvia, sendo A) porcentagem do tempo total machos, B) porcentagem do tempo total fêmeas, C) BI machos e D) BI fêmeas. $n = 6$ (machos CTRL sem trauma), 6 (macho CTRL + trauma), 10 (machos ELS sem trauma), 9 (macho ELS + trauma), 11 (fêmeas CTRL sem trauma – 54% estro, 9% metaestro, 36% diestro), 11 (fêmea CTRL + trauma – 18% estro, 36% metaestro, 36% diestro), 10 (fêmeas ELS sem trauma – 80% estro, 10% metaestro, 10% diestro), 10 (fêmeas ELS + trauma – 20% estro, 70% metaestro, 10% diestro). * $p < 0.001$ diferença quando comparado grupos com e sem trauma. Efeito significativo também do trauma na porcentagem de tempo para machos, e no BI para fêmeas.

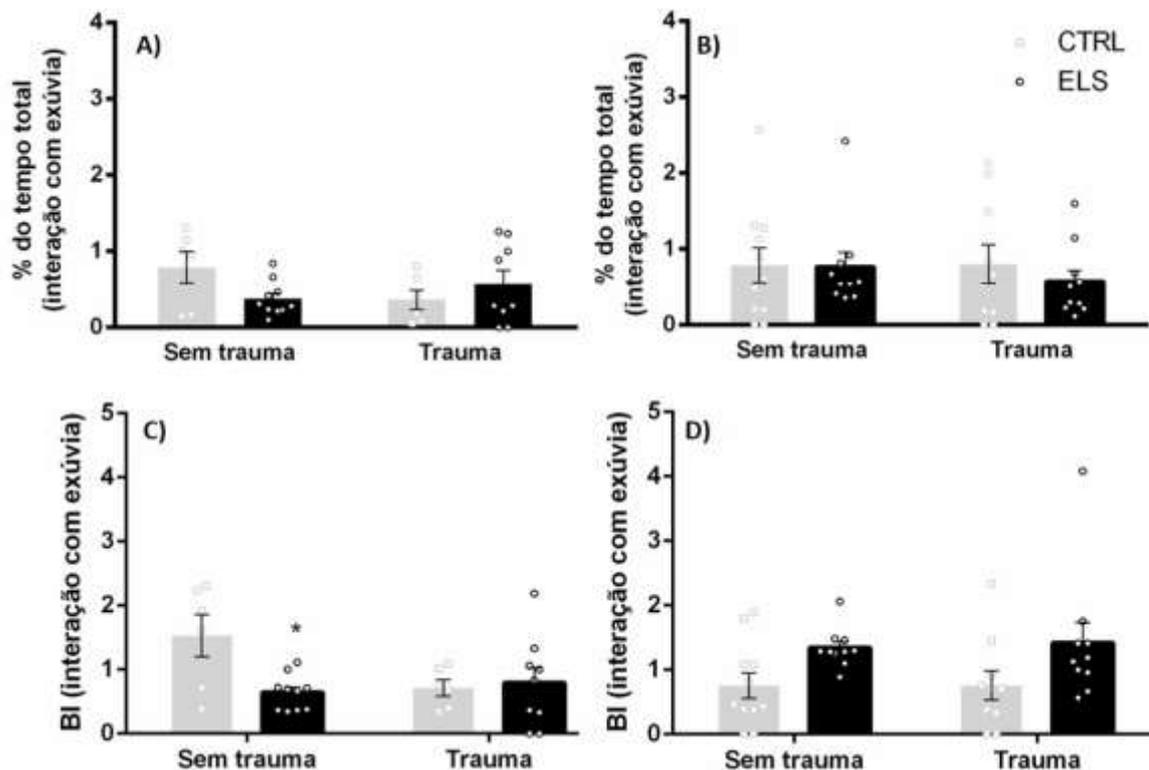


Figura 24. Comportamentos de interação com a exúvia para camundongos CTRL e ELS, expostos previamente à serpente (grupo trauma) ou não (sem trauma), durante a reexposição ao contexto com exúvia, sendo A) porcentagem do tempo total machos, B) porcentagem do tempo total fêmeas, C) BI machos e D) BI fêmeas. n= 6 (machos CTRL sem trauma), 6 (macho CTRL + trauma), 10 (machos ELS sem trauma), 9 (macho ELS + trauma), 11 (fêmeas CTRL sem trauma – 54% estro, 9% metaestro, 36% diestro), 11 (fêmea CTRL + trauma – 18% estro, 36% metaestro, 36% diestro), 10 (fêmeas ELS sem trauma – 80% estro, 10% metaestro, 10% diestro), 10 (fêmeas ELS + trauma – 20% estro, 70% metaestro, 10% diestro). * p < 0.05 quando comparado a CTRL.

Tabela 9. Média \pm EPM da porcentagem do tempo total (%) e do BI dos comportamentos analisados durante a sessão de re-exposição ao contexto.

	Média \pm EPM			
	CTRL S/ TR	CTRL + TR	ELS S/ TR	ELS + TR
Machos				
Porcentagem do tempo total				
Toca	15.02 \pm 2.90	14.08 \pm 8.60	6.52 \pm 1.33	17.89 \pm 7.14
Avaliação de risco	5.05 \pm 1.48	4.11 \pm 0.98	2.17 \pm 0.43	4.19 \pm 0.77
Fuga	2.35 \pm 0.43	2.80 \pm 0.37	1.98 \pm 0.30	3.38 \pm 0.48
Interação com serpente	0.78 \pm 0.20	0.36 \pm 0.12	0.37 \pm 0.07	0.57 \pm 0.17
Índice comportamental (BI)				
Toca	N/A	N/A	N/A	N/A
Avaliação de risco	5.09 \pm 1.38	5.10 \pm 0.91	1.93 \pm 0.25	4.40 \pm 1.31
Fuga	2.45 \pm 0.43	2.64 \pm 0.28	1.22 \pm 0.16	3.89 \pm 0.44
Interação com serpente	1.53 \pm 0.32	0.71 \pm 0.12	0.70 \pm 0.08	0.79 \pm 0.23
Fêmeas				
Porcentagem do tempo total				
Toca	12.56 \pm 2.30	7.75 \pm 2.57	34.68 \pm 4.04	28.24 \pm 4.43
Avaliação de risco	2.36 \pm 0.56	3.09 \pm 0.51	2.28 \pm 0.39	2.31 \pm 0.36
Fuga	2.95 \pm 0.45	4.03 \pm 0.77	2.19 \pm 0.60	3.90 \pm 1.03
Interação com serpente	0.78 \pm 0.23	0.80 \pm 0.25	0.76 \pm 0.19	0.56 \pm 0.14
Índice comportamental (BI)				
Toca	N/A	N/A	N/A	N/A
Avaliação de risco	1.67 \pm 0.30	2.24 \pm 0.30	2.40 \pm 0.23	2.88 \pm 0.33
Fuga	2.52 \pm 0.27	3.39 \pm 0.63	2.64 \pm 0.37	3.71 \pm 0.45
Interação com serpente	0.75 \pm 0.19	0.75 \pm 0.22	1.33 \pm 0.09	1.41 \pm 0.31

10.2.2. Imuno-reatividade a *c-Fos*

A ANOVA de duas vias indicou efeito significativo do fator trauma ($F_{1,27} = 16.01$, $p < 0.001$), do fator ELS ($F_{1,27} = 21.38$, $p < 0.0001$) e interação entre os dois fatores ($F = 1,27 = 8.95$, $P < 0.01$) para a densidade de células *c-Fos+* no PVN. O teste não indicou diferença significativa do fator trauma, nem do fator ELS, tampouco interação entre os fatores ($p > 0.05$) para a densidade de células *c-Fos+* na PAG.

O teste *post-hoc* de *Sidak* indicou que animais ELS que passaram pelo trauma na vida adulta apresentaram uma densidade de células *c-Fos+* significativamente maior do que qualquer outro grupo comparado (ELS sem trauma, CTRL com trauma e CTRL sem trauma, $p < 0.0001$) (Figura 25). Para a PAG, a ANOVA não detectou efeito de nenhum dos fatores na densidade de células *c-Fos+* ($p > 0.05$, Figura 26). A média da densidade de células no PVN e PAG para os grupos analisados está na Tabela 10.

Tabela 10. Média \pm EPM da densidade de células *c-Fos+* (células/mm²) no PVN e na PAG.

	Média \pm EPM			
	CTRL S/ TR	CTRL + TR	ELS S/ TR	ELS + TR
PVN	205.30 57.89	296.00 68.68	352.00 \pm 50.92	981.60 \pm 127.80
PAG	225.00 \pm 88.06	216.10 \pm 67.00	202.70 \pm 49.64	328.50 \pm 44.55

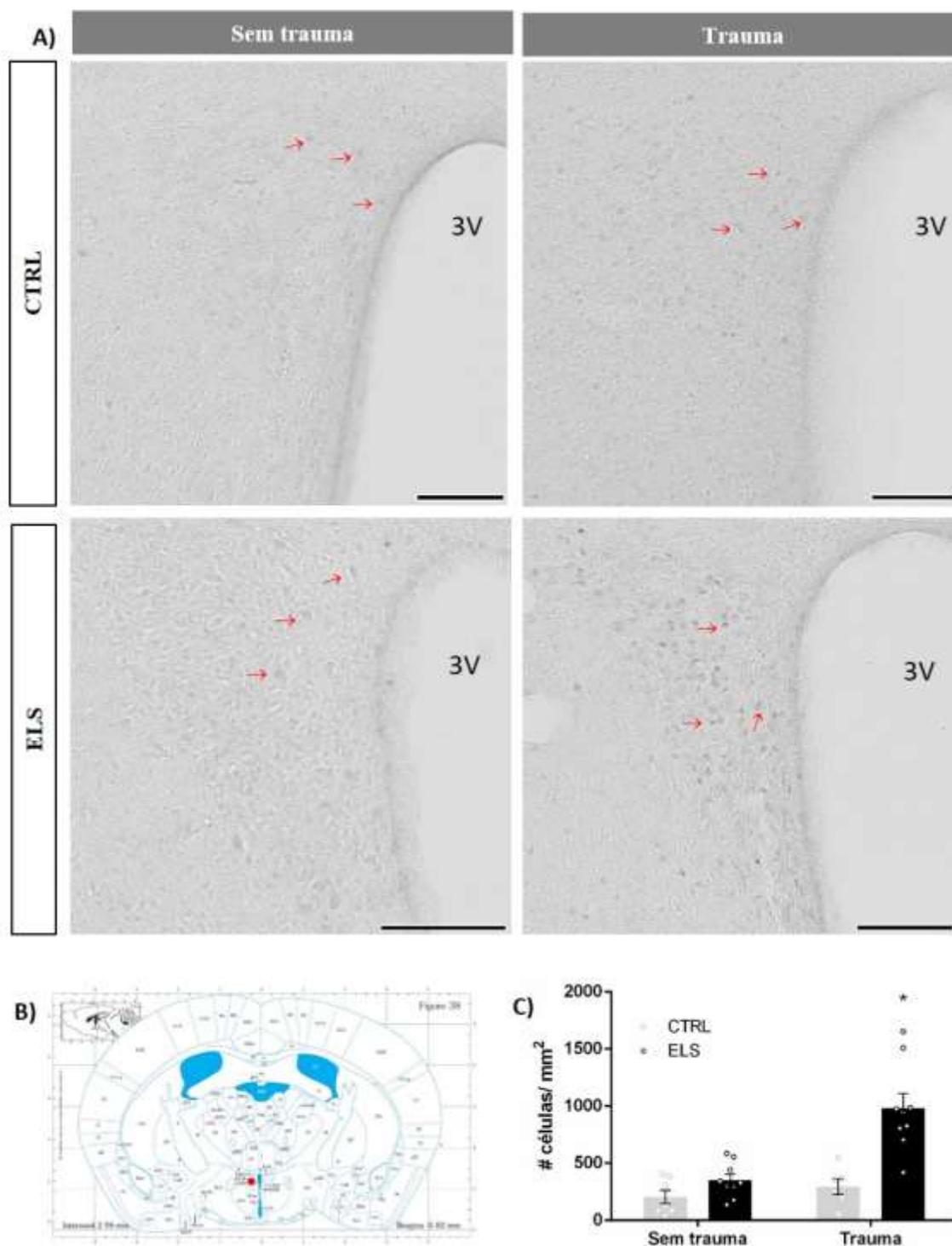


Figura 25. Imunoistoquímica para *c-Fos*. A) Fotomicrografia de 40 µm de seções coronais do PVN de camundongos mostrando imunorreatividade à proteína *c-Fos* CTRL sem trauma (n = 7), CTRL com trauma (n=6), ELS sem trauma (n=9) e ELS com trauma (n=9). Barras de escala representam 100 µm. B) Representação estereotáxica com ponto vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia e C) Densidade de células *c-Fos*+ no PVN. 3V= Terceiro ventrículo. * p < 0.0001 em comparação com qualquer outro grupo.

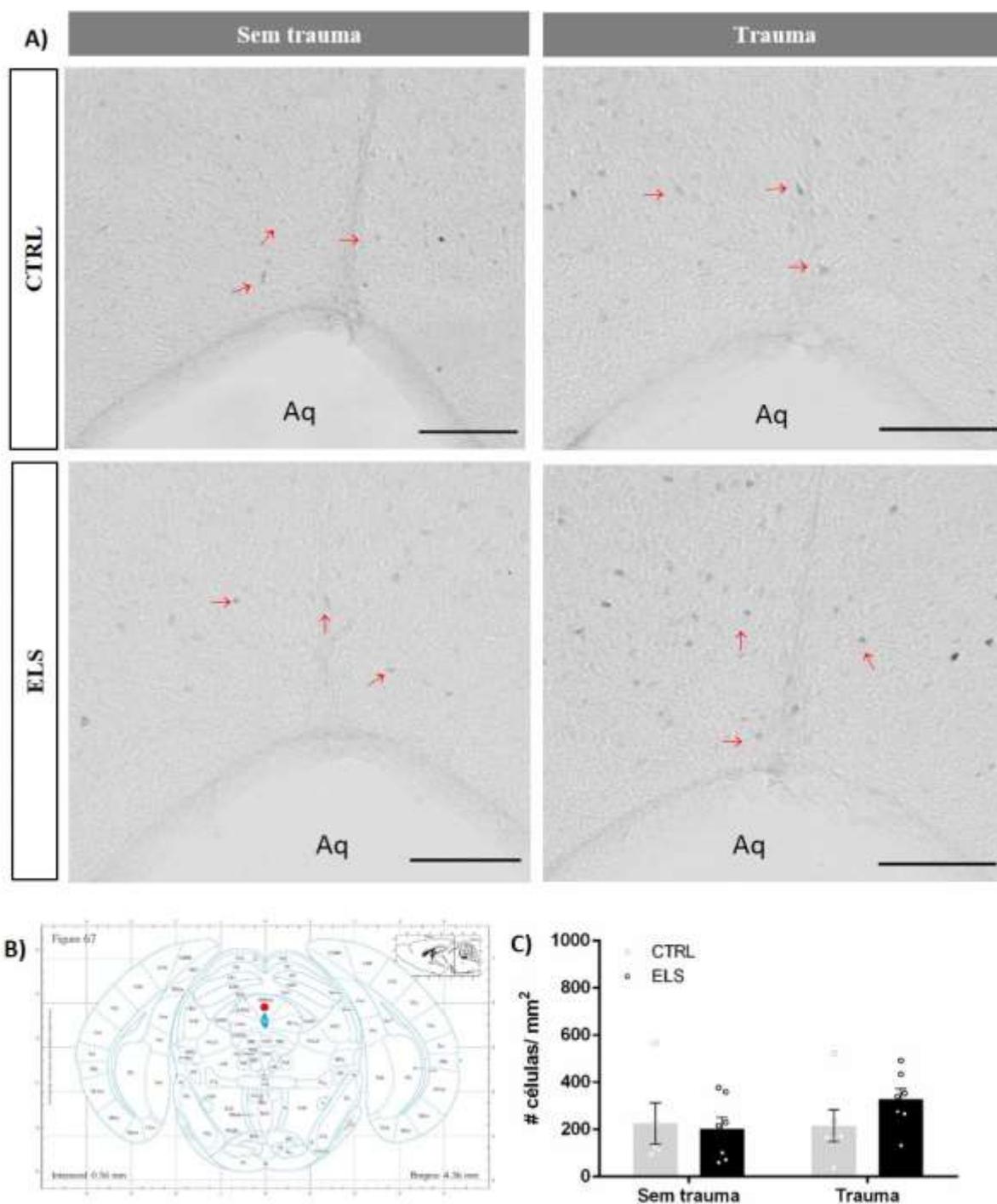


Figura 26. Imunoistoquímica para *c-Fos*. A) Fotomicrografia de 40 μm de seções coronais da PAG de camundongos mostrando imunorreatividade à proteína *c-Fos* para CTRL sem trauma (n = 5), CTRL com trauma (n=6), ELS sem trauma (n=7) e ELS com trauma (n=7). Barras de escala representam 100 μm. B) Representação estereotóxica com ponto vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia e C) Densidade de células *c-Fos*+ na PAG. Aq= Aqueducto.

8. DISCUSSÃO

Neste projeto, exploramos os efeitos de um modelo de ELS no padrão de cuidado maternal e suas consequências na dinâmica de ativação hipocampal de algumas proteínas relacionadas à plasticidade sináptica e ativação neuronal (*Egr1*, *Arc* e *c-Fos*) e na atividade eletrofisiológica, durante as primeiras três semanas de desenvolvimento (P9 e P21), bem como as consequências tardias após um segundo estressor agudo na vida adulta, em um modelo experimental de TEPT e os circuitos neuronais ativados. Os principais achados foram alterações no padrão de cuidado materno, notavelmente uma maior taxa de entropia para grupo ELS, uma maior amplitude de registros de mEPSCs no P9 ELS, bem como densidade reduzida de células *dVenus+* e *c-Fos+* em P21 ELS. Além disso, pudemos observar uma diferença qualitativa no padrão de ativação e distribuição de células positivas para *dVenus*, *Egr1*, *Arc* e *c-Fos*, independentemente do protocolo de ELS, uma indicação de mudanças no desenvolvimento. Destacam-se, ainda, algumas diferenças comportamentais entre grupos os ELS e CTRL no paradigma comportamental tipo-TEPT diante de exposição a predador, como alterações nas respostas de fuga, e aumento na densidade de células *c-Fos+* no PVN de animais ELS que foram expostos ao trauma em comparação os demais grupos.

A contribuição materna talvez seja um dos fatores mais importantes do ambiente vivenciado durante o desenvolvimento, e a maioria dos modelos animais de ELS tem utilizado comprometimentos na interação materna, seja em quantidade ou qualidade, para estudar impactos de experiências adversas precoces ao longo da vida (MOLET et al., 2014; CHEN; BARAM, 2016). O principal objetivo do paradigma experimental do LBN é manipular as características do cuidado materno pela redução do material oferecido para

confeção de ninho, limitando as intervenções externas do experimentador, sendo a flexibilidade uma de suas maiores vantagens, já que se pode graduar o nível de estresse de acordo com a quantidade de material fornecido, bem como alterar o período de desenvolvimento, no qual a ninhada será exposta, de acordo com janelas de desenvolvimento de interesse (MOLET et al., 2014; WALKER et al., 2017). Nas condições utilizadas nos nossos experimentos, encontramos que o LBN foi eficaz em induzir alterações no cuidado materno, aumentando significativamente a taxa de entropia da sequência comportamental de cuidados com os filhotes, além de alterações em comportamentos específicos, como maior número de eventos de construção de ninho e menor de longe-não explorando.

A literatura é diversa a respeito dos impactos do ELS no comportamento materno. Molet et al. (2016) utilizaram o mesmo protocolo e demonstraram que o comportamento total de *licking/grooming* e *nursing* foi equivalente entre mães controles e LBN, tal como observado por nós. Outro estudo, também encontrou pouca ou nenhuma mudança na duração total do cuidado materno ou de aspectos específicos do cuidado (MOLET et al., 2014). Rice et al. (2008), diferente dos nossos resultados, não encontraram diferenças no tempo que as mães passaram no ninho em contato com os filhotes nas condições LBN ou controle, mas viram que a frequência de saídas do ninho por mães em condição LBN foi significativamente superior às saídas de mães em caixas controles, indicando qualidade prejudicada do cuidado, devido a maiores interrupções, mesmo sem alteração na duração do tempo total. Assim, talvez os dados encontrados por nós, de maior entropia na sequência comportamental, talvez possam estar de certa forma refletindo isso, ou seja, o fato de que as mães ELS interromperam mais vezes os cuidados e, conseqüentemente, voltaram mais vezes ao ninho.

A fragmentação dos cuidados é o que parece ser mais significativo em alguns estudos, havendo padrões de interrupções do comportamento de *nursing*, o qual se apresenta de forma mais encurtada e mudanças frequentes entre comportamentos diferentes, seguindo uma sequência imprevisível (RICE et al., 2008; MOLET et al., 2016). Nossos resultados de aumento de taxa entropia, os quais fornecem um índice de previsibilidade dos comportamentos e grau de variação entre eles (DAVIS et al., 2017), corroboram esses achados.

Outra evidência de que o protocolo foi eficaz enquanto estressor são as diferenças no peso corporal entre filhotes que passaram ou não pelo ELS, sendo que os animais do grupo ELS apresentaram menor massa corpórea desde logo após o encerramento do protocolo até o dia do desmame, semelhante ao observado em outros trabalhos que empregaram o mesmo protocolo experimental (ARP et al., 2016; KANATSOU et al., 2017). Coutellier et al. 2008, por outro lado, não encontraram diferenças no peso de grupos que receberam diferentes tratamentos de cuidado materno, nem diferenças no peso entre filhotes machos e fêmeas, mas sim alterações comportamentais e fisiológicas na vida adulta (COUTELLIER et al., 2008). Além, disso Rice et al. (2008) encontraram que o grau de fragmentação dos cuidados maternos correlaciona-se negativamente com o peso corporal dos filhotes e positivamente com o nível corticosterona plasmática, sugerindo que esses parâmetros são independentemente regulados pela interação entre mãe e filhotes e que o aumento dos níveis de corticosterona não é simplesmente uma função da redução do peso corporal.

Um dos objetivos do projeto foi avaliar efeitos imediatos na dinâmica dos IEG *Egr1*, *Arc* e *c-Fos*. IEG apresentam resposta rápida e transitória à ativação sináptica (OKUNO, 2011) e têm sido comumente utilizados como marcadores moleculares para populações neuronais que sofrem alterações na plasticidade associadas à formação de memória de longo

prazo (SCHMIDT; MARRONE; MARKUS, 2012; MINATOHARA; AKIYOSHI; OKUNO, 2016). Os *IEGs* explorados no presente estudo, *Egr1*, *Arc* e *c-Fos*, são exemplos de *IEG* induzidos durante atividade neuronal associada a tarefas comportamentais, como em paradigmas de aprendizado, em regiões encefálicas específicas, como o hipocampo (MINATOHARA; AKIYOSHI; OKUNO, 2016). Além disso, evidências a partir de modelos animais, bem como estudos de neuroimagem em humanos indicam que um dos mecanismos subjacentes ao TEPT é, justamente, plasticidade sináptica aberrante (FRANCATI; VERMETTEN; BREMNER, 2007; PAPE; PARE, 2010; MAHAN; RESSLER, 2012).

Primeiramente, foi avaliado o impacto no *Egr1*. O interesse em explorar os efeitos do ELS no *Egr1* se deu ao seu relatado papel na regulação de múltiplos aspectos da plasticidade sináptica. Foi relatado que o *Egr1* está envolvido em mecanismos que integram os estímulos ambientais e modulam processos de ordem superior, como aprendizado e memória, bem como dependência, ansiedade e resposta ao estresse (GRÖGER et al., 2014; MO et al., 2015; DUCLOT; KABBAJ, 2017). Não foram encontradas diferenças na expressão de mRNA de *Egr1* em P9, embora experimentos prévios do grupo tenham identificado níveis mais baixos de expressão de *Egr1* em P21, tanto em machos quanto em fêmeas (dados não publicados). Além disso, não foram identificadas diferenças na imunorreatividade a *Egr1* no DG ou em CA1 após o ELS. Apesar de seus baixos níveis de expressão no início do desenvolvimento, o *Egr1* foi identificado como um importante mediador dos efeitos de experiência no início da vida por meio de seu controle transcricional do gene do receptor de glicocorticóide (GR) (REVEST et al., 2010; DUCLOT; KABBAJ, 2017).

Foi demonstrado que o cuidado materno na primeira semana de vida influencia a resposta neuroendócrina por mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA no promotor de GR, localizado em um sítio de ligação a *Egr1* (WEAVER, 2007), que

evidencia algum controle de *Egr1* sobre a expressão de GR (DUCLOT; KABBAJ, 2017). Groger et al. 2014 demonstraram regulação negativa aguda da expressão de *Egr1* em machos expostos a estressores pós-natais. Por outro lado, também foi observado que o ELS induzido por períodos repetidos de separação materna leva a uma regulação positiva rápida e significativa de *Arc* e de *Egr1* em hipocampo de camundongos (XIE et al., 2013).

Arc, conhecido por codificar proteínas sinápticas e afetar suas propriedades e expressão, parece ser necessário para o escalonamento sináptico celular após atividade neuronal, bem como aquele associado à facilitação da consolidação de memórias lábeis (GUZOWSKI et al., 2000; MINATOHARA; AKIYOSHI; OKUNO, 2016) também foi investigado aqui. Enquanto a expressão inicial de *Arc* parece contribuir para o desenvolvimento da memória, a expressão tardia do *Arc* está mais relacionada à manutenção da memória (NAKAYAMA et al., 2015). Não foi possível identificar células positivas para *Arc* no DG dos animais P9, e nenhuma diferença entre os grupos ELS e CTRL foi detectada em P21. Foi demonstrado que o *Arc* sofre regulação positiva após a exposição a um ambiente novo, embora não esteja claro qual é o significado e as conseqüências desse efeito (MINATOHARA; AKIYOSHI; OKUNO, 2016). Embora não tenhamos observado células *Arc+* em filhotes de P9 em níveis basais, considerando seu importante papel na plasticidade sináptica e na atividade de populações específicas de neurônios (*ensembles*) para memória, é possível que esse cenário fosse diferente se quantificado tardiamente após desafios, como após o próprio modelo de TEPT aqui empregado. Ainda, podemos especular que, considerando que *Arc* é regulado positivamente após a exposição a um novo ambiente, é muito provável que observemos níveis ou padrões alterados de *Arc* no encéfalo das mães expostas ao protocolo ELS, mas para os filhotes recém-nascidos, talvez a percepção de *ambiental e contextual* ainda esteja limitada nessa idade.

Uma abordagem importante usada aqui foi a utilização dos camundongos transgênicos *Arc::dVenus*. Egushi & Yamaguchi (2009) desenvolveram essa linhagem transgênica, com base nos constructos proteínas fluorescentes desestabilizadas pelo promotor (*promoter-destabilized fluorescence protein*), e esses camundongos exibem um alto nível de expressão do gene repórter impulsionado pelo gene promotor *Arc*, possibilitando o monitoramento da dinâmica da expressão de *Arc* e a detecção facilitada de seus sinais de fluorescência. Isso permite explorar quando, onde e em que tipo de neurônios, a expressão gênica muda em associação à regulação de circuitos e funções cerebrais específicas (EGUCHI; YAMAGUCHI, 2009).

Foi quantificada aqui a densidade das células *dVenus+* e também não encontramos células *dVenus+* no DG dos filhotes P9. Para P21, não encontramos diferença na região mais anterior do hipocampo avaliada, mas encontramos que o ELS levou a um número reduzido de células por área na lâmina infrapiramidal do DG na região posterior, quando comparado ao CTRL. Estudos tem destacado a importância de se observar as sub-regiões do DG, as quais podem ser diferenciadas através do eixo transversal, em lâmina suprapiramidal, entre CA1 e CA3, e lâmina infrapiramidal, em oposição ao hilo (WU et al., 2015; ALVES et al., 2018). As lâminas infra e suprapiramidais parecem apresentar diferenças em sua estrutura, fisiologia e padrões de expressão gênica, talvez exercendo papéis diferentes no funcionamento hipocampal (SNYDER et al., 2009; ALVES et al., 2018). Alguns estudos de neurogênese usando BrdU relataram aumento da proliferação celular também apenas na lâmina infrapiramidal (SNYDER et al., 2009).

Também encontramos diferentes padrões de ativação de *c-Fos* entre as lâminas da DG. O *c-Fos* é dinamicamente regulado no encéfalo e é obviamente uma ferramenta relevante para explorar a ativação neural e a conectividade funcional aberrante

(GUZOWSKI et al., 2000; MEYZA et al., 2007). Em nossos experimentos de imunistoquímica, não foram identificadas diferenças nos filhotes de P9, mas em P21, o ELS induziu menor densidade de células ativas no DG anterior. Quando dividimos o DG em lâminas infra e suprapiramidais, observamos que a lâmina suprapiramidal é o local responsável por essa diferença, e densidade semelhante foi encontrada na lâmina infrapiramidal. Alves et al. 2017 caracterizaram a neurogênese no DG e observaram que, em condições basais, novas células estavam localizadas preferencialmente na lâmina suprapiramidal, mas após estresse crônico, uma diminuição regional da geração de neurônios foi encontrada na lâmina suprapiramidal. Outros estudos mostram maior ativação neuronal de *c-Fos* na lâmina suprapiramidal após teste no labirinto aquático Morris ou exploração de um ambiente novo (SNYDER et al., 2009). No entanto, vale destacar que nenhum desses estudos avaliou as fases iniciais do desenvolvimento.

Em relação aos registros eletrofisiológicos, encontramos um significativo aumento de amplitude dos eventos em miniatura nos animais P9 ELS em comparação com os CTRL de mesma idade ou qualquer outro grupo de P21. Também encontramos um efeito da idade no tempo de decaimento das correntes sinápticas, que foi menor nos animais P9, independentemente da experiência de ELS. Registros de amplitude são geralmente mais estáveis e preferíveis quando não há potencial de ação para confundir, o que “parece ser o caso para o registro de animais em P8-9, em que se é difícil obter sinais estáveis e confiáveis, sendo a medição de amplitude mais confiável do que a determinação da inclinação (*slope* = variação de amplitude mv/ variação de tempo ms)” (DERKS et al., 2016). Em P9, as transmissões glutamatérgica e GABAérgica estão em desenvolvimento e sofrem alterações funcionais na segunda semana de desenvolvimento (DERKS et al., 2016), e os efeitos na amplitude dos *mEPSCs* podem estar relacionados a alterações na ativação dos

receptores pós-sinápticos de glutamato (QIU et al., 2019). Seria interessante analisar em detalhes o que está motivando essas alterações eletrofisiológicas, por exemplo, explorando se os níveis de corticosterona, que são elevados nos animais com ELS (RICE et al., 2008), seriam responsáveis por desencadear alterações da atividade neural, como um efeito agudo da ELS. Derks et al. (2016) encontraram uma supressão da potenciação induzida por corticosterona em adultos, por exemplo.

É interessante observar as diferenças qualitativas entre os encéfalos de P9 e P21, uma vez que mostraram um padrão completamente diferente de ativação dos *IEG*. Aspectos de desenvolvimento são parte fundamental do entendimento das consequências do ELS. Nos estágios iniciais, os circuitos neurais são imaturos e sinapses estão se desenvolvendo e, portanto, são muito maleáveis. Por exemplo, comprimento e complexidade dendrítica aumentam significativamente após o nascimento no período pós-natal precoce (em ratos), a quantidade de sinapses aumenta acentuadamente até a segunda semana pós-natal e isso relaciona-se ao aumento gradual da conectividade neuronal e maiores amplitudes de fEPSP (potenciais pós-sinápticos excitatórios de campo) observadas mais tardiamente em desenvolvimento (POKORNÝ; YAMAMOTO, 1981; DERKS et al., 2016).

Devemos considerar as limitações desses experimentos. Primeiro, devido a dificuldades técnicas no trabalho com fatias de encéfalos de P9, os quais são extremamente frágeis nessa idade, muitos dos experimentos de imunistoquímica foram realizados com poucas fatias, o que não confere poder suficiente à análise estatística. Um tamanho amostral maior forneceria dados mais robustos para interpretação. Além disso, especialmente sobre os protocolos de imunofluorescência (por exemplo, experimento de co-localização de *dVenus* com *Arc*), foi observada alguma autofluorescência inespecífica, dificultando alguma parte das análises e destacando a necessidade de perfusão dos animais antes dos protocolos. Além

disso, devido ao nosso interesse em investigar os efeitos imediatos do ELS em parâmetros basais, deve-se considerar que nas condições basais / naïve analisadas, os resultados são mais difíceis de detectar e são mais suscetíveis a ruídos e à variabilidade individual. Isso significa que, como o sinal observado é naturalmente muito baixo, pequenas alterações no ambiente podem resultar em variabilidade do grupo e impactos na representatividade dos dados. Assim, talvez, níveis basais não sejam a melhor abordagem para se explorar os efeitos do ELS na expressão desses *IEG*.

Questões remanescentes incluem qual seria o padrão desses *IEG* se desafiarmos esses animais, por exemplo, comportamentalmente (como observar a expressão e a imunorreatividade do *Egr1* após o protocolo de exposição à serpente ou outro paradigma de medo condicionado), bem como explorar mecanismos subjacentes aos efeitos descritos do ELS alterando-se a expressão de alguns genes-alvo. Além disso, como os resultados encontrados aqui não apontaram para a formação diferencial de engrama em P9, outra questão importante é “em que ponto temporal a memória começa? ”. Novos estudos que investiguem diferentes janelas de desenvolvimento são necessários para elucidar a partir de que ponto os animais são capazes de se lembrar (contextos, eventos positivos ou negativos, etc.) para uma melhor caracterização os mecanismos subjacentes à formação e/ou armazenamento da memória.

Quanto aos comportamentos expressos durante a exposição ou reexposição à arena, os efeitos variaram de acordo com a exposição prévia ou não ao ELS, com a exposição ou não à serpente (trauma), além de manifestações diferentes de acordo com o sexo do animal e se o parâmetro analisado foi a porcentagem do tempo total ou o BI de um dado comportamento. Durante a exposição à arena poligonal com a serpente, não foi observada qualquer alteração no comportamento eliciado por fêmeas ELS em comparação com as

CTRL. Quanto aos machos, ELS apresentou maior BI de interação com a serpente, bem como maior porcentagem de tempo em interação com a serpente e fuga, em comparação com os CTRL. Já durante a reexposição ao contexto experimental, encontramos um efeito do ELS no tempo de toca e no BI de avaliação de risco, bem como efeito do trauma no BI de fuga, para fêmeas. Nos machos não expostos previamente à serpente, foi observado menor BI de interação com a exúvia para o grupo ELS em comparação com CTRL. O BI de fuga dos machos ELS também foi maior durante a reexposição à arena do que durante a exposição à serpente, além do efeito do trauma no tempo de fuga. Esses resultados são, de certa forma, compatíveis com o já demonstrado sobre exposições a ELS induzirem efeitos a longo prazo no medo e ansiedade (KRUGERS et al., 2017), e com o que foi documentado por Walker et al. (2017), a respeito do paradigma LBN, especificamente, a longo prazo, aumentar reações de medo, ao mesmo tempo que também diminui resposta de busca de segurança.

Estudos prévios com o uso do paradigma de confronto presa versus predador demonstraram alguns resultados semelhantes aos encontrados aqui. De fato, os padrões de defesa antipredatórios, como fuga, imobilidade defensiva (congelamento), ameaça defensiva e ataque, são bastante similares entre espécies de vertebrados, embora variações ocorram de acordo com a espécie e situação (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988), e parecem relacionados às características do estímulo aversivo e dependentes da distância entre a presa e o predador (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; MCNAUGHTON; CORR, 2004). Alguns trabalhos mostraram que a presença de serpentes é eficaz em eliciar respostas defensivas claras, expressas por atenção defensiva (alerta), imobilidade defensiva e respostas de fuga em camundongos (TWARDOWSCHY et al., 2013; ALMADA; COIMBRA, 2015), ratos (BIAGIONI et al., 2016; COIMBRA et al., 2017a, 2017b) e hamsters (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). Outro trabalho demonstrou que uma única exposição ao cheiro de

predador (gato) aumentou a incidência de comportamentos do tipo-ansioso em ratos uma semana depois, com redução de exploração de braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado, quando comparado com animais não expostos ao cheiro do predador, além de ter aumentado a amplitude no teste de sobressalto (COHEN; ZOHAR, 2004; COHEN et al., 2014). Ainda, exposição prévia ao gato levou camundongos a diminuírem a exploração de quadrantes centrais no teste de campo aberto, bem como do lado claro no teste de caixa claro-escuro, embora, aqui, não se tenham encontrado alterações nas respostas de sobressalto (TOTH et al., 2016), levou ratos a aumentarem a resposta de congelamento em mesmo contexto onde o animal foi exposto previamente ao predador (ZOLADZ et al., 2015).

O modelo aqui utilizado, com arena poligonal com exposição a predador, é interessante para identificar particularidades etológicas de fuga tipo-pânico, mostrando-se adequado para estudo de respostas de fuga orientada e não-orientada (ALMADA; COIMBRA, 2015; BIAGIONI et al., 2016; COIMBRA et al., 2017a, 2017b). Assim sendo, embora contabilizamos aqui apenas fuga total, esse comportamento pode ainda ser diferenciado em fuga não-orientada e orientada, sendo o primeiro caso quando o roedor apenas afasta-se vigorosamente do predador ou move-se em direção contrária ao abrigo, e o segundo caracterizado pela fuga direcionada a uma dada área de abrigo (URIBE-MARIÑO et al., 2012). Nossos resultados, durante a exposição à serpente, mostraram aumento na resposta de fuga total para machos ELS. Embora pareça contraditório com o aumento de interações com o predador também apresentada pelo mesmo grupo, uma possibilidade é que um comportamento seja consequente do outro, por exemplo, os animais interagem com o predador e, em decorrência disso, realizam fugas em seguida. Esse tipo de especulação pode ser melhor elucidada com análises etológicas sequenciais (GARCIA-CAIRASCO et al., 1996; MARRONI et al., 2007).

A avaliação de risco também é um comportamento complexo que merece uma análise cuidadosa, sendo considerado um dos padrões comportamentais mais comuns, ocorrendo contextos com qualquer grau de desconhecimento ou imprevisibilidade, perigo de predação, perigos naturais, etc. (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). No nosso trabalho, consideramos avaliação de risco (*risk assessment*) o descrito em Blanchard et al. (1991) e Blanchard (2011) que considera que é um comportamento que envolve interrupção do comportamento em andamento (alertas) para aproximação e abordagem da fonte ou potencial fonte de ameaça com movimentos característicos, como aproximação cautelosa, com corpo estendido e rente ao solo (*low-back, stretch attend, stretch approach*), com avanços e recuos rápidos (BLANCHARD; BLANCHARD; RODGERS, 1991; BLANCHARD et al., 2011). Nos nossos experimentos, não encontramos diferenças entre animais ELS e CTRL na avaliação de risco durante a exposição à serpente, mas foi, em geral o comportamento mais frequente e que ocupou maior porcentagem do tempo total em todos os grupos analisados, indicando, de certa forma, a grande relevância desse comportamento nas reações defensivas, como já demonstrado por outros (COIMBRA et al., 2017b, 2017a; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018).

Como todo modelo animal de psicopatologias, o esperado é que ele seja comparável em aspectos sintomatológicos, de causalidade/base teórica e de respostas a tratamentos (validade de face, constructo e preditiva), o que no caso do TEPT é um desafio, considerando que a resposta humana a eventos traumáticos é extremamente diversa e sujeita a diversos fatores de risco e variação individual (COHEN; ZOHAR, 2004; DASKALAKIS; YEHUDA; DIAMOND, 2013; BORGHANS; HOMBERG, 2015). De acordo com os critérios de Yehuda & Antelman (1993) para avaliação de modelos animais de TEPT, pelo menos 5 critérios podem ser usados para indicar a semelhança com a condição, como (a) os

estressores, mesmo que breves, devem induzir sintomas biológicos ou comportamentais de PTSD; (b) o estressor deve ser capaz de produzir sintomas de maneira dose-dependente; (c) alterações biológicas produzidas devem persistir ou tornar-se mais pronunciadas ao longo do tempo; (d) alterações devem ter potencial para expressão bidirecional de mudanças comportamentais; e (e) a variabilidade da resposta entre os indivíduos na se manifesta de acordo com experiência e/ou genética (YEHUDA; ANTELMAN, 1993). A revisão de Borghans & Homberg (2015) indica que modelos que usam estresse psicossocial baseado em presença de predadores ou em odor de predador, além de contemplar, os oito critérios do DSM-5 para PTSD, também estão adequados a praticamente todos os critérios de Yehuda & Antelman (1992), e Whitaker et al. (2014) indicam que esses modelos são importantes, principalmente, por serem capazes de distinguir populações vulneráveis e resilientes, questão fundamental no TEPT.

Nesse sentido, modelos etológicos de medo inato e respostas de ansiedade têm sido utilizados como abordagem interessante para investigação de reações emocionais instintivas (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; URIBE-MARÍO et al., 2012; TWARDOWSCHY et al., 2013; ALMADA; COIMBRA, 2015). Deve-se, entretanto, ressaltar que, como para todo modelo, há diversas limitações. A comparação de padrões de comportamentos defensivos de roedores com comportamentos humanos considerados normais e anormais são apenas esforços para explicar a dinâmica do medo e da ansiedade e os sistemas encefálicos envolvidos (MCNAUGHTON; CORR, 2004; BLANCHARD, 2017). Cuidados devem sempre ser tomados para se evitar interpretações literais de modelos animais, não devendo ser utilizados para representar os transtornos que acometem seres humanos, mas para aproximar-se de certos parâmetros dos mesmos (COHEN; ZOHAR, 2004). É importante, neste cenário, lembrar dos limites de qualquer modelo animal, enxergando-os como “animais

modelos”, que modelam traços ou fatores específicos das doenças humanas, mas não as replicam (INSEL, 2007).

O modelo utilizado nesse projeto, de exposição a um trauma (exposição ao predador) e reexposição ao mesmo contexto uma semana depois, foi delineado na expectativa de que a reexposição ao contexto evocasse a memória aversiva da serpente e reações comportamentais mensuráveis, caracterizando-se assim um modelo experimental para o TEPT. Nessa perspectiva, investigando sobre mecanismos de memória aversiva na vida adulta após exposição a ELS, Arp et al. (2016) relatam ser improvável que a aquisição de medo seja diferente entre camundongos CTRL e ELS, uma vez que ao utilizarem o teste de medo condicionado, encontraram congelamento semelhante entre os dois grupos ao final da etapa de treinamento, bem como 24 h após treinamento. Por outro lado, encontraram aumento no congelamento para machos ELS durante o período “seguro”, sugerindo expressão inespecífica de medo enquanto não havia ameaça real para esses animais (ARP et al., 2016). Embora os mecanismos subjacentes ao maior congelamento diante de situações seguras nos animais que foram expostos ao ELS não esteja claro, os autores sugerem que isso pode ser resultado de processos comprometidos de aprendizagem de contexto (e de reconhecimento da segurança do contexto), generalização do medo (especificidade de medo prejudicada), habilidades de inibir respostas de medo ou uma combinação desses fatores (ARP et al., 2016).

O ELS também mostrou aumentar respostas de sobressalto (KALINICHEV et al., 2002) e, de maneira semelhante, protocolo de separação materna aumentou os efeitos adversos de choque inescapável nas patas (CHABY; ZHANG; LIBERZON, 2017) em roedores adultos. Além disso, a exposição a um segundo estressor na vida adulta aumentou comportamentos tipo ansiosos e de medo em animais submetidos à ELS (IMANAKA et al.,

2006), o que se correlaciona com o interesse principal desse projeto e o delineamento que propomos, bem como tem grande similaridade com efeitos duradouros do ELS em características do TEPT (CHABY; ZHANG; LIBERZON, 2017). Ainda, trabalhos avaliando o comportamento na vida adulta da prole de mães com taxas naturalmente altas de cuidado materno (alta taxa de *licking-grooming* e *arched-back nursing*) indicou respostas comportamentais de medo/ansiedade reduzidas em comparação com a prole de mães com baixa taxa desses cuidados, como maior exploração no teste de campo aberto, menor latência para iniciar alimentação e mais tempo se alimentando quando colocados em ambiente novo (CALDJI et al., 1998), bem como menor congelamento no teste de medo condicionado (CHAMPAGNE et al., 2008), indicando importantes contribuições desses cuidados maternos no desenvolvimento e respostas da prole a longo prazo. Os mecanismos envolvidos no modelo de LBN e relacionados a essas mudanças emocionais ainda não estão claros, mas problemas na maturação ou reconexões neuronais já foram propostas (CHEN; BARAM, 2016).

Diferenças comportamentais entre machos e fêmeas também têm sido cada vez mais exploradas, uma vez que reconhecidamente o sexo é uma variável biológica importante na consequência e vulnerabilidade ao estresse, tanto em modelos pré-clínicos quanto na população (DASKALAKIS; YEHUDA; DIAMOND, 2013; BOCK et al., 2014; CURLEY; CHAMPAGNE, 2016), além do considerável viés sexual na prevalência de distúrbios induzidos por adversidade precoce (BOCK et al., 2014). Filhotes machos e fêmeas submetidos ao modelo de LBN nem sempre apresentam fenótipos semelhantes (WALKER et al., 2017). Alguns trabalhos demonstraram respostas diferenciais em machos e fêmeas em testes de medo e ansiedade após protocolo de ELS, com camundongos machos expressando aumento de comportamentos do tipo-ansioso no teste de campo aberto e no labirinto em cruz

elevado, o que não foi observado para fêmeas (GUADAGNO; WONG; WALKER, 2018), e também no labirinto em “zero” elevado (COUTELLIER et al., 2008). Outro estudo demonstrou que o ELS levou a aumento de congelamento (*freezing*) em teste de medo condicionado ao som apenas para machos (ARP et al., 2016), enquanto Coutellier et al. (2008) encontraram respostas semelhantes no teste de campo aberto para camundongos machos e fêmeas submetidos a diferentes tratamentos de cuidados maternos.

Em revisão sobre o modelo LBN, Walker et al. (2017) encontraram que mais de 60% dos trabalhos relataram algum tipo de efeito significativo apenas para machos, enquanto cerca de 30% efeito apenas para fêmeas, o que contrasta com os relatos clínicos, onde mulheres parecem mais sensíveis às consequências do estresse precoce e ao desenvolvimento de transtornos relacionados ao estresse e ansiedade, incluindo o TEPT (KESSLER et al., 2005; DASKALAKIS; YEHUDA; DIAMOND, 2013; SCHÖNER et al., 2017). Nossos resultados preliminares indicam estratégias comportamentais e influências aparentemente diferentes para machos e fêmeas, especialmente na comparação no pós-trauma, ou seja, a reatividade após ter sido previamente exposto ao predador, bem como ao ELS

A literatura é vasta a respeito de estruturas relevantes na organização e geração das respostas comportamentais defensivas e integração de estados aversivos, como o hipotálamo, o complexo amigdalóide, a substância cinzenta paraventricular dorsal e os corpos quadrigêmeos (BRANDÃO et al., 2003, 2005; MCNAUGHTON; CORR, 2004). Mais especificamente sobre os comportamentos defensivos ou do tipo-pânico exibidos por roedores na arena poligonal diante de confronto com predador, estruturas diencefálicas, como o hipotálamo dorso-medial e posterior parecem criticamente envolvidos na organização de respostas de fuga orientada, enquanto neurônios da substância cinzenta

pariaqueductal dorsal estariam mais envolvidos na elaboração de respostas vigorosas não orientadas/explosivas (BIAGIONI et al., 2016). Por exemplo, reação límbica mesencefálica mais explosiva pode ser provocada em uma situação de ameaça intensa ou estímulo inesperado, e reação diencefálica em situações aversivas mais moderadas ou em reações de fuga orientadas para um local seguro para evitar a predação (URIBE-MARÍO et al., 2012; TWARDOWSCHY et al., 2013; ALMADA; COIMBRA, 2015; ULLAH et al., 2015; BIAGIONI et al., 2016).

Não encontramos diferenças na ativação da PAG dorso medial entre os grupos ELS e CTRL ou entre grupos que foram submetidos ou não ao trauma na vida adulta, o que seria esperado, dado o papel relatado da PAG nas respostas da fuga e o resultado comportamental encontrado, de fuga aumentada por os animais ELS que passaram pelo trauma em comparação com os que não passaram. Por outro lado, encontramos ativação aumentada do PVN em animais ELS que foram expostos à serpente, o que pode estar refletindo as mudanças comportamentais observadas. Além das estruturas aqui investigadas, o complexo amigdalóide, o hipocampo e a córtex pré-frontal são regiões do sistema límbico evidentemente alteradas no TEPT (MAHAN; RESSLER, 2012). A amígdala está relacionada com regulação do medo condicionado em estudos com humanos e com outros animais e recebe projeções do hipocampo e do córtex pré-frontal, os quais aparecem com ativação reduzida nos pacientes com TEPT, podendo estar relacionado com um controle reduzido da amígdala e sua hiperresponsividade à estímulos de medo (ETKIN; WAGER, 2007; FRANCATI; VERMETTEN; BREMNER, 2007; MAHAN; RESSLER, 2012) o que reflete numa desregulação na resposta de medo, como observado no TEPT.

Ainda, circuitos neurais específicos e diferentes estruturas encefálicas parecem responder em conformidade com a natureza do estímulo a que o indivíduo é exposto. Alguns

trabalhos têm mostrado, por exemplo, que o recrutamento de mecanismos dopaminérgicos na expressão de respostas a situações ameaçadoras parece depender do tipo de estímulo emocional aversivo, sendo diferentes quando o estímulo é de natureza condicionada ou incondicionada (BRANDÃO et al., 2005, 2015; MUTHURAJU et al., 2014). De maneira geral, estruturas mais rostrais do neuroeixo, como o complexo amigdalóide, parecem mediar a expressão de respostas condicionadas de medo, enquanto estruturas mais caudais, estariam modulando a expressão de respostas de medo incondicionado (BRANDÃO et al., 2015). Assim, seria interessante explorar a ativação de circuitos neuronais no modelo utilizado de TEPT, não somente pós re-exposição ao contexto (resposta condicionada), mas também logo após a exposição a serpente (resposta de medo incondicionada), a fim de se explorar potenciais diferenças de ativação diante das características diferentes que essas situações expressam.

Muitos sistemas estão afetados pelo ELS e podem contribuir para efeitos a longo prazo, regulação de processos de medo e maior vulnerabilidade a psicopatologias. Esses efeitos resultam da interação entre ambiente e genes, especialmente em períodos sensíveis (BOCK et al., 2014; CHEN; BARAM, 2016), trazendo a influência da regulação epigenética na expressão gênica desses sistemas, como a metilação do DNA de genes para a proteína de ligação ao *FKBP*, para o fator neurotrófico derivado do cérebro (Brain-derived neurotrophic factor – *BDNF*), do receptor GR (*NR3C1*), entre outros (CALDJI et al., 1998; KALINICHEV et al., 2002; YEHUDA et al., 2010; PALMA-GUDIÉL et al., 2015). Entender melhor a relação entre esses sistemas, bem como a melhor caracterização das janelas de desenvolvimento são importantes para potenciais estratégias de tratamentos em indivíduos vulneráveis.

9. CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados sugerem que o protocolo de LBN permite estudar consequências a curto e a longo prazo do ELS e que o paradigma comportamental de exposição a predador, especialmente, o de arena poligonal com serpentes pode ser uma ferramenta útil para explorar os efeitos comportamentais e neurobiológicos tipo-TEPT. Podemos concluir que as primeiras semanas pós-natais são janelas de desenvolvimento críticas do sistema nervoso, uma vez que a maioria dos parâmetros avaliados apresenta um padrão diferencial de ativação entre P9 e P21, independente da submissão ou não ao protocolo de ELS, e que este pode induzir alterações funcionais na atividade neuronal hipocampal, inferidas a partir da maior amplitude de mEPSCs em animais submetidos ao ELS em P9. Além disso, o ELS associado a estressores agudos na vida adulta parece contribuir para alterações de comportamentos defensivos e reações de medo, bem como ativação diferencial de alguns circuitos neuronais (resumo dos principais resultados na Tabela 11).

Assim, indivíduos vulneráveis e resilientes podem não contar com diferenças drásticas, mas sutis, por exemplo, tais como alterações na atividade eletrofisiológica em regiões cerebrais específicas e essas mudanças podem ser mais proeminentes após um segundo *hit* apresentado ou quando submetem-se esses indivíduos a desafios mais tardios. Estudos futuros explorando as consequências do ELS nos papéis e padrões de atividade dos *IEGs* na plasticidade sináptica e em outros períodos do desenvolvimento pós-natal, bem como o detalhamento dos circuitos subjacentes às consequências comportamentais e ao processamento emocional e de memória pós-trauma ainda são importantes para compreender a dinâmica do encéfalo em desenvolvimento e identificar indivíduos vulneráveis e resilientes a psicopatologias.

Tabela 11. Resumo dos principais efeitos neurais e comportamentais encontrados após o ELS.

	P9	P21	P120
Expressão gênica de <i>Egr1</i>	Não investigado. Resultados prévios do laboratório: ELS < CTRL (machos).	Sem diferenças	Não investigado
Eletrofisiologia (registros de <i>mEPSCs</i>)	ELS maior amplitude do CTRL, e do que P21 CTRL and P21 ELS.	Sem diferenças	Não investigado
Células <i>dVenus</i> positivas	Ausência de células <i>dVenus+</i>	ELS < CTRL apenas na lâmina infrapyramidal do DG (região posterior)	Não investigado
Imunofluorescência - colocalização <i>dVenus+</i> e <i>Arc+</i>	Ausência de células <i>dVenus+</i> e <i>Arc+</i>	Sem diferenças	Não investigado
Imunoistoquímica DAB - <i>Egr1</i>	Sem diferenças (DG)	Sem diferenças (CA1)	Não investigado
Imunoistoquímica DAB - <i>Arc</i>	Ausência de células <i>Arc+</i>	Sem diferenças	Não investigado
Imunoistoquímica DAB - <i>c-Fos</i>	Sem diferenças	ELS < CTRL (densidade de células) na lâmina suprapyramidal do DG e no DG total (região anterior)	ELS > CTRL (densidade de células) no PVN
Comportamento (cuidado materno e TEPT)	<i>De P2 a P9:</i> ELS > CTRL Taxa de entropia do cuidado materno; ELS > CTRL ninho; ELS < CTRL longe não-explorando; ELS < CTRL alimentando-se	Não investigado	ELS > CTRL fuga na sessão exposição (machos); ELS > CTRL interação com serpente na sessão exposição (machos); ELS > CTRL tempo de toca (fêmeas); ELS com truma > ELS sem trauma para fuga (machos); ELS sem trauma < CTRL sem trauma na interação com exúvia (machos)

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVANI, T.; HENSLER, J. G.; KOEK, W. Effect of early rearing conditions on alcohol drinking and 5-HT1A receptor function in C57BL/6J mice. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 10, n. 5, p. 595–607, 2007.

ALMADA, R. C. et al. Endocannabinoid signaling mechanisms in the substantia nigra pars reticulata modulate GABAergic nigroreticular pathways in mice threatened by urutu-cruzeiro venomous pit viper. **Neuroscience**, v. 303, p. 503–514, 2015.

ALMADA, R. C.; COIMBRA, N. C. Recruitment of striatonigral disinhibitory and nigroreticular inhibitory GABAergic pathways during the organization of defensive behavior by mice in a dangerous environment with the venomous snake *Bothrops alternatus* (Reptilia, Viperidae). **Synapse**, v. 69, n. 6, p. 299–313, 2015.

ALVES, N. D. et al. Chronic stress targets adult neurogenesis preferentially in the suprapyramidal blade of the rat dorsal dentate gyrus. **Brain Structure and Function**, v. 223, n. 1, p. 415–428, 2018.

AMARAL, D. G.; DENT, J. A. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. **Journal of Comparative Neurology**, v. 195, n. 1, p. 51–86, 1981.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-5**. [s.l.: s.n.]

ANISMAN, H. et al. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 16, n. 3–4, p. 149–164, 1998.

ARP, J. M. et al. Blocking glucocorticoid receptors at adolescent age prevents enhanced freezing between repeated cue-exposures after conditioned fear in adult mice raised under chronic early life stress. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 133, p. 30–38, 2016.

BAES, C. V. W. et al. Assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: Glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor function in depression with early life

stress - A systematic review. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 24, n. 1, p. 4–15, 2012.

BIAGIONI, A. F. et al. Neuroethological validation of an experimental apparatus to evaluate oriented and non-oriented escape behaviours: Comparison between the polygonal arena with a burrow and the circular enclosure of an open-field test. **Behavioural Brain Research**, v. 298, p. 65–77, 2016.

BLANCHARD, D. C. et al. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 4, p. 991–998, 2011.

BLANCHARD, D. C. Translating dynamic defense patterns from rodents to people. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 76, p. 22–28, 2017.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; RODGERS, R. J. Risk assessment and animal models of anxiety. **Advances in Pharmacological Science**, p. 117–134, 1991.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Ethoexperimental Approaches. **Annual Review of Psychology**, v. 39, p. 43–68, 1988.

BOCK, J. et al. Perinatal programming of emotional brain circuits: An integrative view from systems to molecules. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. 8 FEB, p. 1–16, 2014.

BORGHANS, B.; HOMBERG, J. R. Animal models for posttraumatic stress disorder: An overview of what is used in research. **World Journal of Psychiatry**, v. 5, n. 4, p. 387, 2015.

BRANDÃO, M. L. et al. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: Empirical and conceptual considerations. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 225–233, 2003.

BRANDÃO, M. L. et al. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1299–1311, 2005.

BRANDÃO, M. L. et al. Dual role of dopamine D₂-like receptors in the mediation of conditioned and unconditioned fear. v. 589, p. 3433–3437, 2015.

CALDJI, C. et al. Maternal care during infancy regulates the development of neural. **Proceedings of the National Academy of Sciences Neurobiology**, v. 95, n. April, p. 5335–5340, 1998.

CALIGIONI, C. Assessing reproductive status/stages in mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 48, p. 1–11, 2010.

CARR, C. P. et al. The role of early life stress in adult psychiatric disorders: A systematic review according to childhood trauma subtypes. **Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 201, n. 12, p. 1007–1020, 2013.

CHABY, L. E.; ZHANG, L.; LIBERZON, I. The effects of stress in early life and adolescence on posttraumatic stress disorder, depression, and anxiety symptomatology in adulthood. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 14, p. 86–93, 2017.

CHAMPAGNE, D. L. et al. Maternal care and hippocampal plasticity: Evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 23, p. 6037–6045, 2008.

CHEN, Y.; BARAM, T. Z. Toward understanding how early-life stress reprograms cognitive and emotional brain networks. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 197–206, 2016.

COHEN, H. et al. Distinctive hippocampal and amygdalar cytoarchitectural changes underlie specific patterns of behavioral disruption following stress exposure in an animal model of PTSD. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 12, p. 1925–1944, 2014.

COHEN, H.; ZOHAR, J. An animal model of posttraumatic stress disorder: The use of cut-off behavioral criteria. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1032, p. 167–178, 2004.

COHEN, P.; BROWN, J.; SMAILE, E. Child abuse and neglect and the development of mental disorders in the general population. **Development and psychopathology**, v. 13, n. 4, p. 981–999, 2001.

COIMBRA, N. C. et al. Critical neuropsychobiological analysis of panic attack- and anticipatory anxiety-like behaviors in rodents confronted with snakes in polygonal arenas and complex labyrinths: A comparison to the elevated plus- and T-maze behavioral tests. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 39, n. 1, p. 72–83, 2017a.

COIMBRA, N. C. et al. Opioid neurotransmission modulates defensive behavior and fear-induced antinociception in dangerous environments. **Neuroscience**, v. 354, p. 178–195, 2017b.

CORA, M. C.; KOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and

Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. **Toxicologic Pathology**, v. 43, p. 776–793, 2015.

CORRAL-FRIAS, N. S. et al. Involvement of the ventral tegmental area in a rodent model of post-traumatic stress disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 2, p. 350–363, 2013.

COSTA, H. H. V.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Continuous central infusion of cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases maternal care in lactating rats: Consequences for fear conditioning in adulthood males. **Behavioural Brain Research**, v. 257, p. 31–38, 2013.

COUTELLIER, L. et al. Variations in the postnatal maternal environment in mice: Effects on maternal behaviour and behavioural and endocrine responses in the adult offspring. **Physiology and Behavior**, v. 93, n. 1–2, p. 395–407, 2008.

CURLEY, J. P.; CHAMPAGNE, F. A. Influence of maternal care on the developing brain: Mechanisms, temporal dynamics and sensitive periods. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 40, p. 52–66, 2016.

DANNLOWSKI, U. et al. Limbic scars: Long-term consequences of childhood maltreatment revealed by functional and structural magnetic resonance imaging. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 4, p. 286–293, 2012.

DASKALAKIS, N. P.; YEHUDA, R.; DIAMOND, D. M. Animal models in translational studies of PTSD. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 9, p. 1895–1911, 2013.

DAVIS, E. P. et al. Exposure to unpredictable maternal sensory signals influences cognitive development across species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 39, p. 10390–10395, 2017.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: From adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–475, 2005.

DE KLOET, E. R.; SARABDJITSINGH, R. A. Everything has rhythm: Focus on glucocorticoid pulsatility. **Endocrinology**, v. 149, n. 7, p. 3241–3243, 2008.

DERKS, N. A. et al. Effects of early life stress on rodent hippocampal synaptic plasticity: a systematic review. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 14, n. April, p. 155–166, 2017.

DERKS, N. A. V. et al. Effects of early life stress on synaptic plasticity in the developing hippocampus of male and female rats. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–17, 2016.

DUCLLOT, F.; KABBAJ, M. The role of early growth response 1 (EGR1) in brain plasticity and neuropsychiatric disorders. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, n. March, p. 1–20, 2017.

EGUCHI, M.; YAMAGUCHI, S. In vivo and in vitro visualization of gene expression dynamics over extensive areas of the brain. **NeuroImage**, v. 44, n. 4, p. 1274–1283, 2009.

ETKIN, A.; WAGER, T. D. Functional neuroimaging of anxiety: A meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 10, p. 1476–1488, 2007.

FARAVELLI, C. et al. Childhood traumata, Dexamethasone Suppression Test and psychiatric symptoms: a trans-diagnostic approach. **Psychological medicine**, v. 40, n. 12, p. 2037–2048, 2010.

FRAGKAKI, I.; THOMAES, K.; SIJBRANDIJ, M. Posttraumatic stress disorder under ongoing threat: A review of neurobiological and neuroendocrine findings. **European Journal of Psychotraumatology**, v. 7, p. 1–13, 2016.

FRANCATI, V.; VERMETTEN, E.; BREMNER, J. D. Functional neuroimaging studies in posttraumatic stress disorder: review of current methods and findings. **Depression and Anxiety**, v. 24, p. 202–218, 2007.

FRANKLIN, K. B. J.; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Third edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., [s.d.]

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Research**, v. 26, n. 1, p. 177–192, 1996.

GOUTY-COLOMER, L. A. et al. Arc expression identifies the lateral amygdala fear memory trace. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 3, p. 364–375, 2016.

GRAEFF, F. G. Bases biológicas do transtorno de estresse pós-traumático. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. SUPPL. 1, p. 21–24, 2003.

GRÖGER, N. et al. Stress in utero alters neonatal stress-induced regulation of the synaptic plasticity proteins Arc and Egr1 in a sex-specific manner. **Brain Structure and Function**, v. 221, n. 1, p. 679–685, 2014.

GUADAGNO, A.; WONG, T. P.; WALKER, C. D. Morphological and functional changes in the preweaning basolateral amygdala induced by early chronic stress associate with anxiety and fear behavior in adult male, but not female rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, n. August 2017, p. 25–37, 2018.

GUZOWSKI, J. F. et al. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 3993–4001, 2000.

HEIM, C. et al. Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood Heim C. **Journal of the American Medical Association**, v. 284, n. 5, p. 592–597, 2000.

HEIM, C. et al. The link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 6, p. 693–710, 2008.

HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biological psychiatry**, v. 49, n. 12, p. 1023–1039, 2001.

HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. Neurobiology of post-traumatic stress disorder. **CNS Spectrums**, v. 14, n. 1, p. 13–24, 2009.

IMANAKA, A. et al. Importance of early environment in the development of post-traumatic stress disorder-like behaviors. **Behavioural Brain Research**, v. 173, n. 1, p. 129–137, 2006.

INSEL, T. R. From Animal Models to Model Animals. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 12, p. 1337–1339, 2007.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. SUPPL. 2, p. 46–51, 2003.

JOËLS, M. et al. Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 28, n. 2–3, p. 72–96, 2007.

JOELS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 459–466, 2009.

KACZKURKIN, A. N. et al. Neural substrates of overgeneralized conditioned fear in PTSD. **American Journal of Psychiatry**, v. 174, n. 2, p. 125–134, 2017.

KALINICHEV, M. et al. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 1, p. 131–140, 2002.

KANATSOU, S. et al. Overexpression of mineralocorticoid receptors in the mouse forebrain partly alleviates the effects of chronic early life stress on spatial memory, neurogenesis and synaptic function in the dentate gyrus. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. May, p. 1–13, 2017.

KARST, H.; JOËLS, M. Severe stress hormone conditions cause an extended window of excitability in the mouse basolateral amygdala. **Neuropharmacology**, v. 110, p. 175–180, 2016.

KEMENY, J. G.; SNELL, J. L. **Finite Markov Chains**. Princeton, NJ: Springer-Verlag, 1976.

KESSLER, R. C. et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. June 2005, p. 134–147, 2005.

KRUGERS, H. J. et al. Early life adversity: Lasting consequences for emotional learning. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 14–21, 2017.

KUMAR, G. et al. Early life stress enhancement of limbic epileptogenesis in adult rats: mechanistic insights. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24033, 2011.

LADD, C. O. et al. Chapter 7 Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. n. July 2015, p. 81–103, 1999.

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 8, p. 799–806, 2000.

LOI, M. et al. Age- and sex-dependent effects of early life stress on hippocampal neurogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. FEB, p. 1–11, 2014.

LOI, M. et al. Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents. **Neuroscience**, v. 342, p. 101–119, 2017.

LUCASSEN, P. J. et al. Neuropathology of stress. **Acta Neuropathologica**, v. 127, p. 109–135, 2014.

LUPIEN, S. J. et al. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 434–445, 2009.

MAHAN, A. L.; RESSLER, K. J. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: Implications for posttraumatic stress disorder. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 1, p. 24–35, 2012.

MARRONI, S. S. et al. Neuroanatomical and cellular substrates of hypergrooming induced by microinjection of oxytocin in central nucleus of amygdala, an experimental model of compulsive behavior. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 12, p. 1103–1117, 2007.

MARTIN, S. et al. Corticosterone alters AMPAR mobility and facilitates bidirectional synaptic plasticity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, p. 1–8, 2009.

MCEWEN, B. S. Mood disorders and allostatic load. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 200–207, 2003.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 285–305, 2004.

MEYZA, K. Z. et al. The effect of age on the dynamics and the level of c-Fos activation in response to acute restraint in Lewis rats. **Behavioural Brain Research**, v. 180, n. 2, p. 183–189, 2007.

MINATOHARA, K.; AKIYOSHI, M.; OKUNO, H. Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, n. JAN2016, p. 1–11, 2016.

MO, J. et al. Early growth response 1 (Egr-1) directly regulates GABA A receptor $\alpha 2$, $\alpha 4$, and θ subunits in the hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 133, n. 4, p. 489–500, 2015.

MOLET, J. et al. Naturalistic rodent models of chronic early-life stress. **Developmental Psychobiology**, v. 56, n. 8, p. 1675–1688, 2014.

MOLET, J. et al. Fragmentation and high entropy of neonatal experience predict adolescent emotional outcome. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. October 2015, 2016.

MUTHURAJU, S. et al. Distinct effects of haloperidol in the mediation of conditioned fear in the mesolimbic system and processing of unconditioned aversive information in the inferior. **Neuroscience**, v. 261, p. 195–206, 2014.

NAKAYAMA, D. et al. Long-delayed expression of the immediate early gene Arc/Arg3.1 refines neuronal circuits to perpetuate fear memory. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 2, p. 819–830, 2015.

NEWPORT, D. J.; NEMEROFF, C. B. Neurobiology of posttraumatic stress disorder. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, n. 2, p. 211–218, 2000.

NICOLAS, C. Evidence for a link between early life stress and adult aggression – The role of the hypothalamus- pituitary-adrenal axis. **BioSciences Master Reviews**, p. 1–8, 2013.

OKUNO, H. Regulation and function of immediate-early genes in the brain : Beyond neuronal activity markers. **Neuroscience Research**, v. 69, n. 3, p. 175–186, 2011.

OOMEN, C. A. et al. Severe Early Life Stress Hampers Spatial Learning and Neurogenesis, but Improves Hippocampal Synaptic Plasticity and Emotional Learning under High-Stress Conditions in Adulthood. **The Journal of Neuroscience**, v.30, n.19, p. 6635-6645 , 2010.

OOMEN, C. A. et al. Early maternal deprivation affects dentate gyrus structure and emotional learning in adult female rats. **Psychopharmacology**, v.214, p.249-260, 2011.

OSÓRIO, C. et al. Adapting to Stress: Understanding the Neurobiology of Resilience. **Behavioral Medicine**, v. 43, n. 4, p. 307–322, 2017.

PALMA-GUDIÉL, H. et al. Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: A critical review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 520–535, 2015.

PAPE, H. C.; PARE, D. Plastic synaptic network of the amygdala for the acquisition, expression

and extinction of conditioned fear. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 2, p. 419–463, 2010.

PASCHOALIN-MAURIN, T. et al. The Rodent-versus-wild Snake Paradigm as a Model for Studying Anxiety- and Panic-like Behaviors: Face, Construct and Predictive Validities. **Neuroscience**, v. 369, p. 336–349, 2018.

PILLAI, A. G. et al. Early life stress determines the effects of glucocorticoids and stress on hippocampal function: Electrophysiological and behavioral evidence respectively. **Neuropharmacology**, v. 133, p. 307–318, 2018.

POKORNÝ, J.; YAMAMOTO, T. Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. I. Development of dendritic arborisation in pyramidal neurons. **Brain Research Bulletin**, v. 7, n. 2, p. 113–120, 1981.

QIN, X. et al. Early growth response 1 (Egr-1) regulates N-methyl-daspartate receptor (NMDAR)-dependent transcription of PSD-95 and α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor (AMPA) trafficking in hippocampal primary neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 49, p. 29603–29616, 2015.

QIU, B. et al. Loss of FKBP5 Affects Neuron Synaptic Plasticity: An Electrophysiology Insight. **Neuroscience**, v. 402, p. 23–36, 2019.

REVEST, J. M. et al. The enhancement of stress-related memory by glucocorticoids depends on synapsin-Ia/Ib. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 12, p. 1140–1151, 2010.

RIBONI, F. V.; BELZUNG, C. Stress and psychiatric disorders: from categorical to dimensional approaches. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 14, p. 72–77, 2017.

RICE, C. J. et al. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. **Endocrinology**, v. 149, n. 10, p. 4892–4900, 2008.

RUIZ, J. E. et al. Psiconeuroendocrinologia do transtorno de estresse pós-traumático. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. suppl 1, p. s7–s12, 2007.

RYAN, J. et al. Biological underpinnings of trauma and post-traumatic stress disorder: Focusing on genetics and epigenetics. **Epigenomics**, v. 8, n. 11, p. 1553–1569, 2016.

SCHMIDT, B.; MARRONE, D. F.; MARKUS, E. J. Disambiguating the similar: The dentate

gyrus and pattern separation. **Behavioural Brain Research**, v. 226, n. 1, p. 56–65, 2012.

SCHÖNER, J. et al. Post-traumatic stress disorder and beyond: an overview of rodent stress models. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 10, p. 2248–2256, 2017.

SHERIN, J. E.; NEMEROFF, C. B. Post-traumatic stress disorder: The neurobiological impact of psychological trauma. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 263–278, 2011.

SILVA, A. J. et al. Molecular and cellular approaches to memory allocation in neural circuits. **Science**, v. 326, n. 5951, p. 391–395, 2009.

SNYDER, J. S. et al. Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: Young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. **Hippocampus**, v. 19, n. 4, p. 360–370, 2009.

SONG, S.; GLEESON, J. G. Early life experience shapes neural genome. **Science**, v. 359, n. 6382, p. 1330–1331, 2018.

STRÜBER, N.; STRÜBER, D.; ROTH, G. Impact of early adversity on glucocorticoid regulation and later mental disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 38, n. 1, p. 17–37, 2014.

TEJADA, J. et al. Characterization of the rat exploratory behavior in the elevated plus-maze with Markov chains. v. 193, p. 288–295, 2010.

TOTH, M. et al. Overexpression of forebrain CRH during early life increases trauma susceptibility in adulthood. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 6, p. 1681–1690, 2016.

TWARDOWSCHY, A. et al. The role of 5-HT_{1A} receptors in the anti-aversive effects of cannabidiol on panic attack-like behaviors evoked in the presence of the wild snake *Epicrates cenchria crassus* (Reptilia, Boidae). **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 12, p. 1149–1159, 2013.

ULLAH, F. et al. Relevance of dorsomedial hypothalamus, dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal gray matter in the organization of freezing or oriented and non-oriented escape emotional behaviors. **Behavioural Brain Research**, v. 293, p. 143–152, 2015.

URIBE-MARIÑO, A. et al. Anti-aversive effects of cannabidiol on innate fear-induced behaviors evoked by an ethological model of panic attacks based on a prey vs the wild snake *epicrates cenchria crassus* confrontation paradigm. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 412–421, 2012.

VAN VOORHEES, E.; SCARPA, A. The effects of child maltreatment on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Trauma, Violence & Abuse**, v. 5, n. 4, p. 333–352, 2004.

WALKER, C. D. 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**, v. 20, n. 5, p. 421–448, 2017.

WEAVER, I. C. G. Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention - Nature versus nurture: Let's call the whole thing off. **Epigenetics**, v. 2, n. 1, p. 22–28, 2007.

WU, M. V. et al. Functional differentiation of adult-born neurons along the septotemporal axis of the dentate gyrus. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 8, 2015.

XIE, L. et al. Early life stress-induced histone acetylations correlate with activation of the synaptic plasticity genes *Arc* and *Egr1* in the mouse hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 125, n. 3, p. 457–464, 2013.

YEHUDA, R. et al. Putative biological mechanisms for the association between early life adversity and the subsequent development of PTSD. **Psychopharmacology**, v. 212, n. 3, p. 405–417, 2010.

YEHUDA, R. et al. The role of genes in defining a molecular biology of PTSD. **Disease Markers**, v. 30, n. 2–3, p. 67–76, 2011.

YEHUDA, R.; ANTELMAN, S. M. Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. **Biological Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 479–486, 1993.

ZOLADZ, P. R. et al. Psychosocial predator-based animal model of PTSD produces physiological and behavioral sequelae and a traumatic memory four months following stress onset. **Physiology and Behavior**, v. 147, p. 183–192, 2015.