

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA POR 24h NA MEMÓRIA EMOCIONAL DE RATOS ADULTOS

Viviane Côrtes Ceschim

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas – Modalidade Médica

BOTUCATU – SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA POR 24h NA MEMÓRIA EMOCIONAL DE RATOS ADULTOS

Viviane Côrtes Ceschim

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Suchecki

Co-orientadora: Profa. Dra. Paula Ayako Tiba

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas – Modalidade Médica

BOTUCATU – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ceschim, Viviane Côrtes.

Efeitos da privação materna por 24h na memória emocional de ratos adultos / Viviane Côrtes Ceschim. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora: Deborah Suchecki

Co-orientadora: Paula Ayako Tiba

1. Adolescência - Aspectos psicológicos 2. Estresse

Palavras-chave: Eixo HPA; Memória emocional; Privação materna; Transtorno de estresse pós-traumático

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, que sempre me deu oportunidades maravilhosas, as quais tento agarrar com força sempre.

À minha família e amigos, que sempre estiveram ao meu lado, dando forças nos momentos ruins, e comemorando os bons. Sem vocês, nada disso seria possível.

À minha orientadora, que não só abriu as portas do mundo científico para mim, mas também abriu seus braços para me acolher, sendo muito mais que uma simples orientadora. E obrigada pelas fontes de risada!

À minha co-orientadora e ex-professora do cursinho, que contribuiu para que eu conseguisse entrar na faculdade e, quando eu voltei, pegou-me pela mão e deu a base de conhecimentos necessários para que eu conseguisse desenvolver esse trabalho e muitos outros que com certeza virão.

Ao povo da Psicobio, em especial à sala 15, que me fez perceber que não sou tão louca assim... Obrigada por me aturar, principalmente na TPM, por me escutar e pela força que vocês sempre me deram!

Ao grupo de Estresse da Psicobio (berçário também!), que contribui sempre com suas opiniões e conhecimentos, fazendo com que eu aprenda cada vez mais.

Aos amigos de Botucatu e de Santos, que mesmo de longe, sempre me ajudaram e estiveram do meu lado.

Aos animais de laboratório, pois sem eles esse trabalho não seria realizado.

SUMÁRIO

1 Introdução	5
1.1 Privação Materna	6
1.2 Transtorno de Estresse Pós-Traumático	8
2 Justificativa e Objetivos	12
3 Materiais e Métodos	13
3.1 Animais	13
3.2 Privação Materna	13
3.3 Exposição ao Evento Traumático	14
3.4 Reexposição ao Contexto Aversivo	15
3.5 Condicionamento de Medo ao Contexto e Extinção	15
3.6 Peso Corporal	15
3.7 Coleta de Sangue	16
3.8 Análise Estatística	17
4 Resultados	18
5 Discussão	25
6 Referências	28

RESUMO

Entre as diversas estratégias de investigação dos efeitos de experiências estressantes no início da vida de um rato, pode-se citar a privação do filhote da mãe por 24h, durante o período neonatal. A privação materna (PM) por 24h entre os dias pós-natais (DPN) 3 e 4 resulta em um hiperresponsividade ao estresse na adolescência (20-30 dias de vida), enquanto que essa mesma manipulação entre os DPN 11 e 12 resulta em hiporresponsividade, avaliado na mesma idade. Traumas na infância e/ou adolescência constituem fator de risco para o desenvolvimento de transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), uma desordem psiquiátrica caracterizada por rememoração persistente do evento traumático, com dificuldade de extinção dessa memória. Sendo assim, o presente projeto avaliou como um estresse nos primeiros dias de vida (privação materna) e um trauma na adolescência (choque intenso inescapável) interagem de forma a promover maior vulnerabilidade para o desenvolvimento de comportamento tipo-TEPT em ratos. As manipulações na infância, ao contrário do esperado, não interagiram com o trauma na infância, e não alteraram a resposta ao condicionamento e à extinção da resposta de medo, avaliadas pelo comportamento de congelamento. Em relação à resposta de ACTH após o estresse na adolescência, os animais submetidos à privação materna não apresentaram pico de secreção deste hormônio, como ocorreu no grupo controle, sugerindo uma alteração da resposta hormonal causada pela experiência adversa na infância. Sendo assim, a privação materna não influenciou as alterações comportamentais nos animais adultos provocadas pelo trauma na adolescência, mas pode ter alterado a resposta de ACTH ao trauma, na adolescência.

1 INTRODUÇÃO

Em mamíferos, a resposta de estresse é mediada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA, do inglês *hypothalamic-pituitary-adrenal*) em que hipotálamo sintetiza o hormônio liberador de corticotrofina (CRH, do inglês *corticotropin releasing hormone*), que é liberado na circulação porta-hipofisária. Na adeno-hipófise (hipófise anterior), o CRH promove clivagem da pro-opiomelanocortina e secreção de seus derivados, como por exemplo o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *adrenocorticotrophic hormone*) e beta-endorfina. O ACTH é então liberado na corrente sangüínea e, no córtex da adrenal, induz a síntese e liberação de glicocorticóides (GCs). O principal GC nos humanos é o cortisol e nos ratos, é a corticosterona (CORT). Os GCs circulantes ligam-se aos receptores mineralocorticóide (MR; tipo I), com alta afinidade, e aos receptores glicocorticóide (GR; tipo II) com baixa afinidade. Os GRs são encontrados em estruturas corticais e subcorticais, com distribuição preferencial no córtex pré-frontal. Os MRs, por sua vez, têm sua distribuição no encéfalo restrita a estruturas límbicas, como o hipocampo. No vale do ritmo circadiano de secreção de GCs (fim da tarde e período noturno nos humanos, e período da manhã nos ratos), estes ocupam mais de 90% dos MRs e somente 10% dos GRs. Contudo, durante um estresse e/ou no pico do ritmo circadiano, há aumento na concentração de CRH, resultando no aumento nas concentrações de ACTH e de GCs circulantes. Com isso, ocorre saturação dos MRs e ocupação de aproximadamente 67-74% dos GRs, cuja principal função é promover o *feedback* negativo, tanto no hipotálamo e na hipófise, como no hipocampo, diminuindo assim a síntese e liberação de mais GCs na circulação (para revisões, ver De Kloet *et al.*, 1998; Arborelius *et al.*, 1999; Lupien *et al.*, 2007).

Há evidências de que experiências estressantes no início da vida implicam em profundos efeitos na resposta de estresse na vida adulta de várias espécies como roedores, primatas não-humanos e humanos, com marcantes diferenças dos resultados dessas experiências entre essas espécies (Levine, 2005). Como estudos em humanos demandam muito tempo e são extremamente difíceis de serem conduzidos, devido a questões éticas incontornáveis, modelos animais são usados para a análise dos efeitos adversos dessas experiências.

Para isso, pode-se expor filhotes de ratos a uma situação estressante, sendo que

a privação materna por 24 horas é um paradigma muito utilizado. Em ratos, vários estudos demonstram que entre os dias 4 e 14 de vida ocorre o período de hiporresponsividade ao estresse (PHRE), caracterizado por resposta diminuída das glândulas adrenais ao ACTH (Levine, 2001; Okimoto *et al.*, 2002), ou seja, mesmo após a administração aguda de ACTH, não ocorrem respostas consideráveis de CORT (Rosenfeld *et al.*, 1992). Durante esse período o CRH e o ACTH são sintetizados e liberados em baixas concentrações (Walker *et al.*, 1986; Rundle & Funder, 1988), assim como a arginina vasopressina (AVP) - um peptídeo hipotalâmico que potencializa a ação do CRH (Rundle & Funder, 1988). O PHRE é essencial para o desenvolvimento e maturação do sistema nervoso central (SNC), uma vez que a exposição a altas concentrações de GCs causa efeitos deletérios no desenvolvimento (Bohn, 1984; De Kloet *et al.*, 1988) e em alguns parâmetros funcionais do eixo adrenocortical (Schapiro, 1965). Por outro lado, concentrações insuficientes de GCs também resultam no desenvolvimento anormal do SNC (Meyer, 1985).

O PHRE resulta de fatores intrínsecos e extrínsecos. Entre os primeiros estão a imaturidade das vias que integram áreas corticais com o hipotálamo do neonato (Grino *et al.*, 1989). Já entre os fatores extrínsecos, a presença materna tem sido considerada o principal fator. Isso se deve ao fato de que alguns comportamentos maternos regulam níveis específicos do eixo: a amamentação regula a secreção de CORT (Rosenfeld *et al.*, 1993; Suchecki *et al.*, 1993b) mantendo a insensibilidade das adrenais ao ACTH, enquanto que a limpeza anogenital regula a secreção de ACTH (Suchecki *et al.*, 1993b; van Oers *et al.*, 1998c).

1.1 Privação Materna

A privação materna por 24h durante o PHRE induz alterações imediatas e a longo prazo no eixo HPA. Os efeitos imediatos incluem aumento da sensibilidade das adrenais ao ACTH (Rosenfeld *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1991) e menor peso e temperatura corporais (Suchecki *et al.*, 1993a). Suchecki *et al.* (1995) observaram que em animais privados da mãe por 24h nos dias 8, 11 ou 14 de vida, as concentrações plasmáticas de ACTH 120 minutos após um estresse leve ainda estavam altas em relação ao basal, sugerindo que o mecanismo de *feedback* negativo nesses animais é parcialmente

funcional, o que foi confirmado por van Oers *et al.* (1998a).

- Privação Materna entre os dias 3 e 4 de vida

Os efeitos imediatos da privação materna entre os dias 3 e 4 de vida (PM 3) incluem aumento das concentrações basais de CORT (Levine, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1991) e induzidas por ACTH que permanecem elevadas por 2h, retornando aos valores basais 6h após a reunião com as mães (Rosenfeld *et al.*, 1991).

A longo prazo, esses animais apresentam uma resposta de estresse hiper-reativa (van Oers *et al.*, 1999). Quando testados no dia pós-natal (DPN) 20, apresentaram maior expressão de RNA mensageiro (RNAm) de CRH e da proteína *c-fos* – o gene *c-fos* é um gene de expressão imediata que, quando ativado, regula a transcrição de vários outros genes – no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) induzidos por estresse (van Oers *et al.*, 1998c). Quando testados no DPN 60, apresentaram maiores concentrações basais de ACTH e CORT, menor expressão de RNAm de GR no NPV e na adeno-hipófise, enquanto que a expressão de RNAm de GR e de MR no hipocampo estavam inalterados (Rots *et al.*, 1996).

- Privação Materna entre os dias 11 e 12 de vida

Quando testados imediatamente após a privação materna, os animais privados da mãe entre os dias 11 e 12 de vida (PM 11), apresentam maiores concentrações de ACTH e CORT basais e induzidos por estresse (Levine, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1991; Suchecki *et al.*, 1993a; Smith *et al.*, 1997). Quando esses animais retornam para a mãe, após a administração de ACTH, as concentrações de CORT permanecem altas por pelo menos 2h, retornando aos valores basais somente após 6h de reunião, indicando que a presença da mãe inibe a resposta de estresse (Rosenfeld *et al.*, 1991). Além disso, a PM11 resulta em menor expressão de RNAm de CRH (Smith *et al.*, 1997; van Oers *et al.*, 1998b; Dent *et al.*, 2000a) e de GR (van Oers *et al.*, 1998b) no NPV, e de GR e MR na região CA1 do hipocampo. Contudo, ocorre aumento na expressão de AVP (Dent *et al.*, 2000b), e na expressão basal e induzida por estresse de RNAm de *c-fos* (Smith *et al.*, 1997; van Oers *et al.*, 1998b) e de gene indutor do fator de crescimento neuronal, indicadores utilizados para se detectar ativação cerebral (Smith *et al.*, 1997). Já no córtex

adrenal, ocorre maior expressão de RNAm de *c-fos*, o que indica que também há ativação adrenocortical (Okimoto *et al.*, 2002).

Suchecki *et al.* (2000) observaram que animais PM 11, quando expostos ao campo aberto com estímulos de luz e som por 5 minutos no DPN 30, andam mais pelo centro e fazem menos *grooming* (comportamento de autolimpeza) do que os animais controle não-privados (CTL), indicando que animais PM 11 apresentam menos comportamento do tipo ansioso do que os CTL.

Quando adolescentes, os animais PM 11 são hiporresponsivos a um estressor leve (injeção de salina no DPN 20 - van Oers *et al.*, 1997; 1999 - e no DPN 30 - Suchecki & Tufik, 1997). Ademais, quando esses animais são testados no DPN 20, observa-se diminuição da expressão de RNAm de GR no NPV e no hipocampo, de MR na região CA1 do hipocampo, e de CRH no NPV (van Oers *et al.*, 1999). Porém, ao serem testados no DPN 60, não se observam mais as diferenças entre grupos, predominando apenas as diferenças entre gêneros. Assim, parece que os efeitos da privação materna na resposta de CORT a um estressor leve são prolongados, mas não permanentes (Suchecki & Tufik, 1997).

1.2 Transtorno de Estresse Pós-Traumático

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) envolve a rememoração persistente de eventos traumáticos, com dificuldade de extinção dessa memória. Essa patologia psiquiátrica afeta uma subpopulação de indivíduos vulneráveis confrontados com uma experiência estressante que excede suas capacidades de se adaptarem. Um possível fator para explicar essa vulnerabilidade poderia ser as diferentes histórias de vida (Diehl *et al.*, 2007), como a variação na vivência de experiências estressantes prévias (Resnik *et al.*, 1995). Há de se ressaltar também, como fator de risco, a neurobiologia individual, incluindo aí os fatores genéticos (Yehuda *et al.*, 2001).

Maercker *et al.* (2004) observaram que a experiência traumática na infância está relacionada tanto à depressão maior como ao TEPT, e que ocorrendo durante a adolescência, há maiores riscos de o indivíduo desenvolver TEPT do que depressão maior. Além disso, os indivíduos com TEPT manifestam importante co-morbidade com várias desordens psiquiátricas (Jacobsen *et al.*, 2001).

O TEPT induz alguns sintomas em longo prazo, como rememoração, fuga de situações que se assemelham ao trauma, diminuição do interesse por atividades diárias, embotamento afetivo e estado de hiper-alerta, com insônia, irritabilidade, dificuldade de concentração e resposta de sobressalto exagerada (Ruiz *et al.*, 2007). Em nível endócrino, esses pacientes apresentam hiper-ativação do eixo simpático-adrenal associada à hipofunção do eixo HPA (Graef, 2003). As concentrações de CRH no líquido cefalorraquidiano estão aumentadas (Bremner *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 1999), ao contrário das de ACTH, que estão diminuídas (Santa Ana *et al.*, 2006). Com relação às concentrações de cortisol, embora haja certa divergência nos estudos, em geral os dados mostram que estão diminuídas (de Kloet *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2007). Kanter *et al.* (2001) observaram maiores concentrações de globulina ligadora de cortisol, proteína que torna o cortisol menos disponível (em sua forma livre) para atuar nos tecidos alvo. Além disso, alguns estudos sugerem que baixas concentrações de cortisol urinário logo após o trauma são um fator de risco para posterior desenvolvimento do TEPT (Delahanty *et al.*, 2000). Wang & Mason (1999) relataram também aumento na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, o qual interage com os eixos simpático-adrenal e HPA. O tônus vagal está diminuído e há maior reatividade da condutância elétrica da pele e resposta ocular de sobressalto (ato de piscar) amplificada em presença de estímulos condicionados aversivos (Graeff, 2003).

A justificativa mais difundida para as altas concentrações de CRH no líquido combinadas com as baixas concentrações de cortisol plasmático, encontrados no TEPT, reside no aumento do *feedback* negativo em nível hipofisário, que poderia ser explicado por aumento da densidade de GR (Yehuda *et al.*, 1993) e aumento da sensibilidade do GR (Rohleder *et al.*, 2004). Dessa forma, ocorreria intensa supressão da liberação de cortisol em resposta a baixas doses de dexametasona (Yehuda *et al.*, 1995; 2004) e diminuição da liberação de ACTH em resposta à administração de cortisol (Yehuda *et al.*, 2006). Entretanto, outras formas de testar a atividade do eixo HPA podem sugerir outros mecanismos adicionais, como por exemplo, insensibilidade da adrenal ao ACTH. Essa idéia é justificada pela ausência de alteração na secreção de ACTH em resposta à administração exógena de cortisol, descartando, assim, um efeito do *feedback* negativo (Kanter *et al.*, 2001). Portanto, a questão do(s) mecanismo(s) responsável(is) pelas

baixas concentrações basais de cortisol em pacientes com TEPT ainda encontra-se em aberto.

Vários modelos animais de TEPT têm sido desenvolvidos. Experiências estressantes, desafios aversivos e situações que relembram o trauma resultam em efeitos duradouros nas respostas comportamentais, autonômicas e hormonais, mimetizando muitas das alterações observadas em pacientes com TEPT. Esses modelos incluem, entre outros, choque nas patas (Pynoos *et al.*, 1996), trauma aquático (manter o animal embaixo d'água por 30 segundos – Richter-Levin, 1998), e exposição a um predador (Cohen *et al.*, 2003).

No modelo de Pynoos *et al.* (1996), o animal é exposto a um estressor (um curto e intenso choque elétrico nas patas) seguido por repetidas situações que relembrem o trauma. Essa exposição repetida poderia fazer um paralelo com o fato de que indivíduos traumatizados são freqüentemente expostos a situações que relembram o trauma, mas não ao evento traumático em si. Louvart *et al.* (2005) examinaram um modelo baseado no descrito acima, em que ratas adultas foram submetidas a um choque nas patas de 2mA, por 10 segundos, e depois foram expostas a uma situação que relembra o trauma em cada semana seguinte ao trauma, por 3 semanas. As ratas que receberam o choque apresentaram hipofunção do eixo HPA, aumento de comportamento tipo-ansioso, alteração de comportamento social e hipoatividade locomotora quando comparadas com as que não receberam choque, efeitos estes que persistiram por mais de um mês após o trauma. Louvart *et al.* (2006), ao examinarem o mesmo modelo do estudo anterior, compararam machos e fêmeas e replicaram os resultados, mostrando algumas diferenças entre os gêneros: nos animais expostos ao trauma, enquanto a resposta de CORT ao estressor em machos não se alterou, em fêmeas esteve diminuída. Houve aumento da expressão de RNAm de MR na região CA2 hipocampal somente em machos e diminuição da expressão desses receptores no NPV em machos e fêmeas.

Cohen *et al.* (2007) observaram que, assim como em humanos, diferentes eventos traumáticos parecem afetar diferentemente a característica, gravidade e incidência do comportamento tipo-TEPT, e que experiências estressantes prévias aumentam a suscetibilidade para o desenvolvimento desse comportamento.

- Memória

Pacientes com TEPT apresentam alterações cognitivas, como prejuízo na memória declarativa e fragmentação de memórias autobiográfica e daquelas relacionadas ao trauma. Além disso, o TEPT também está relacionado com a facilitação da memória não-declarativa, como respostas condicionadas e reexperiência do evento traumático quando o indivíduo é exposto a situações que relembram o trauma (Brewin, 1996 *apud* Bremner, 1999). Muitos modelos animais procuram entender essas alterações. Dentre eles, Wang *et al.* (2000), em um modelo de trauma aquático (o mesmo realizado por Richter-Levin, 1998, descrito acima), verificam que os animais com comportamento tipo-TEPT apresentam prejuízo de desempenho no labirinto aquático e menor plasticidade sináptica após um evento traumático, e encontraram também uma correlação entre esses dois efeitos; e Louvart *et al.* (2006) mostram que os animais com comportamento tipo-TEPT, 70 dias após um forte choque nas patas, entram menos em um local que relembra o trauma, demonstrando que eles têm uma boa memória do evento traumático.

Vários estudos têm demonstrado que, sob condições de estresse crônico, as memórias dependentes do hipocampo e do córtex pré-frontal estão prejudicadas, enquanto que a memória emocional, dependente da amígdala, está facilitada. Isso se deve ao fato de que nessas condições ocorre retração dendrítica em neurônios do hipocampo e do córtex pré-frontal e aumento da arborização dendrítica na amígdala (Wolf, 2008). Bossini *et al.* (2007) mostraram que pacientes com TEPT apresentam menor volume hipocampal. Alguns pesquisadores sugerem que essa atrofia já está presente no momento do trauma e que poderia ser considerada como fator de risco para o desenvolvimento do TEPT (Gilbertson *et al.*, 2002), mas de qualquer maneira poderia estar relacionada com possíveis prejuízos de memória encontrados em pacientes com TEPT.

As memórias dotadas de conteúdo emocional são mais facilmente lembradas do que as neutras devido à ação de hormônios e neurotransmissores que são liberados por ocasião das emoções e promovem a consolidação dos traços de memória (LaBar & Cabeza, 2006). A ativação noradrenérgica do núcleo basolateral da amígdala é muito importante para a modulação de traços de memória, que são armazenados em outras

regiões do cérebro, como o hipocampo (para revisão, ver Wolf, 2008).

Um dos paradigmas mais utilizados para estudar a memória emocional em animais é o condicionamento clássico de medo, em que um estímulo condicionado neutro (EC – luz, som, contexto, por exemplo) é pareado com um estímulo não-condicionado aversivo (ENC – choque nas patas de um rato, por exemplo). O ENC adquire propriedades aversivas e, mesmo quando apresentado sozinho, evoca reações emocionais de medo: alterações autonômicas, como aumento da frequência cardíaca e pressão arterial (Cohen & Randall, 1984; Iwata & Ledoux, 1988; LeDoux, 1993); alterações neuroendócrinas, como liberação de ACTH e CORT (Van de Kar et al., 1991; LeDoux, 1993; Sullivan et al., 2004); e respostas comportamentais, como o sobressalto e a resposta de congelamento ou “freezing” (Blanchard & Blanchard, 1969; 1972; Fanselow & Bolles, 1979; Davis, 1992; LeDoux, 1993; Fendt & Fanselow, 1999). A extinção desse medo eventualmente ocorre quando há repetidas exposições ao EC, sem a presença do ENC, levando a uma diminuição gradual na resposta aprendida. Estudos com roedores indicam que a amígdala é crucial para a memória de medo condicionado, enquanto que o córtex pré-frontal e o hipocampo são importantes para a extinção desse medo (Maren & Quirk, 2004).

Recentemente, foi observado que em pacientes com TEPT, as mudanças no fluxo sanguíneo cerebral no giro frontal medial (localizado no córtex pré-frontal medial) estão negativamente correlacionadas com as mudanças na amígdala bilateral. Enquanto o fluxo no giro frontal medial diminuía, ele aumentava na amígdala. Além disso, também foi observado que a gravidade dos sintomas do TEPT se correlaciona negativamente com a atividade do giro frontal medial, e positivamente com a atividade da amígdala. Provavelmente isso explica a resposta de medo condicionado exagerada e o prejuízo na extinção desse medo (para revisão, ver Rauch *et al.*, 2006).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Vários estudos mostram que experiências estressantes no início da vida resultam em profundos efeitos na resposta hormonal a outros estressores na vida adulta. O desenvolvimento de um modelo animal que faça um paralelo com experiências estressantes em humanos é muito difícil, mas é possível que a privação materna possa

mimetizar a perda do cuidador em crianças (ver Heim & Nemeroff, 2001). Ademais, Maercker *et al.*, (2004) demonstraram que quando um indivíduo vivencia um trauma durante a adolescência, ocorre aumento da vulnerabilidade para o desenvolvimento de TEPT. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar como um evento adverso nos primeiros dias de vida (privação materna) e um evento traumático na adolescência (choque intenso inescapável) poderiam interagir para modificar a resposta de medo na idade adulta. As respostas comportamental de medo e hormonal foram eleitas, uma vez que pacientes com TEPT exibem inadequação destas respostas. Dessa forma, pretendemos iniciar, com este trabalho, uma série de estudos na tentativa de estabelecer um modelo experimental para esse distúrbio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas ninhadas da linhagem Wistar, provenientes do biotério do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP. As ratas prenhes foram alojadas individualmente em gaiolas plásticas e depois de três a quatro dias, as gaiolas foram inspecionadas diariamente para detecção de filhotes. O dia do nascimento foi designado DPN 0. No DPN 1, as ninhadas foram homogeneizadas para 4 a 5 machos e 4 fêmeas. Os animais foram desmamados aos 21 dias de vida e separados por gênero em caixas com 4 animais, pertencentes à mesma ninhada. Somente os animais do gênero masculino foram utilizados a partir desse dia. Durante todo o procedimento, os animais tiveram livre acesso à ração e água, exceto durante a privação materna. Foram realizadas 5 replicações. Todos os experimentos comportamentais tiveram início às 08h00.

Todos os procedimentos realizados foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP #0593/08).

3.2 Privação Materna

As ninhadas do grupo PM 3 foram afastadas de suas mães por 24h, com início às 10h00 do DPN 3 até o DPN 4; as ninhadas do grupo PM 11 foram afastadas da mãe pelo mesmo período de tempo, do DPN 11 até o DPN 12. Durante a privação materna, as

ninhadas permaneceram em caixas com maravalha limpa, sobre uma manta térmica, com temperatura entre 30-33°C. Os filhotes do grupo CTL não foram manipulados, exceto pela limpeza das caixas, até o dia do desmame.

A cada três dias, metade da maravalha das gaiolas-moradia foi trocada, para manutenção da limpeza.

3.3 Exposição ao Evento Traumático

Para a exposição ao evento traumático, foi utilizada uma caixa de condicionamento (22 x 21 x 22 cm) formada por paredes pretas com quadrados de cartolina branca (2 medindo 5,5 x 5,5 cm e 3 medindo 4,0 x 4,0 cm) afixados. Uma placa de acrílico transparente forma a tampa da caixa. A base consiste de grades metálicas (0,4 cm de diâmetro) com 1,2 cm de distância entre elas, conectadas a uma fonte geradora de choques elétricos (Ugo Basile modelo 7551). Entre os DPNs 30 e 34 (adolescência), metade dos machos de cada ninhada (2 animais) foi exposta à caixa de condicionamento, de forma que cada animal foi colocado individualmente na caixa e após 2 minutos de adaptação, o animal recebeu um choque de 2mA nas patas, durante 10 segundos (animais choque [CH]). A outra metade dos animais foi exposta à caixa, sem receber choque (animais não-choque [NCH]). O tempo de congelamento (*“freezing”* – definido como uma completa imobilidade do animal, com ausência de movimento das vibrissas e de farejar, exceto pelos movimentos necessários à respiração – Fanselow & Bolles, 1979) foi registrado continuamente durante os 2 minutos de adaptação e por 1 minuto após o término do choque, ou por 3 minutos contínuos no caso dos animais do grupo NCH.

Após a exposição à caixa de condicionamento, os animais foram alojados individualmente em outras caixas, até que todos os animais da mesma caixa tivessem sido expostos ao procedimento, quando retornaram às gaiolas-moradia.

A caixa de condicionamento foi limpa no intervalo entre os animais com álcool 70% para remover odores deixados por eles.

Em outra fase do estudo, ninhadas adicionais foram utilizadas, com a finalidade de obter plasma para dosagens de ACTH. Para isso os animais foram sacrificados imediatamente e aos 20, 40 e 60 minutos após saírem da caixa de condicionamento.

3.4 Re-exposição ao Contexto Aversivo

Entre os DPNs 74 e 78 (idade adulta), todos os animais foram novamente colocados na caixa de condicionamento, individualmente, e o tempo de congelamento foi medido por 5 minutos, a fim de se avaliar a duração do trauma ocorrido na adolescência, medida pela reação de medo expressa por comportamento de *freezing*.

A caixa de condicionamento foi limpa no intervalo entre os animais com álcool 70% para remover odores deixados por eles.

3.5 Condicionamento de Medo ao Contexto e Extinção

Condicionamento de medo ao contexto (CMC): dois dias após a re-exposição ao contexto aversivo, os animais foram colocados individualmente em outra caixa de condicionamento, semelhante à utilizada para o evento traumático (30 x 30 x 60 cm), formada por paredes pretas. Uma placa de acrílico transparente forma a tampa da caixa. A base consiste de grades metálicas (0,4 cm de diâmetro) com 1,2 cm de distância entre elas, conectadas a uma fonte geradora de choques elétricos (AVS Projetos Especiais). Após 2 minutos de adaptação, os animais receberam 5 choques de 0,8mA nas patas, durante 1 segundo, com intervalo de 29 segundos entre eles. O tempo de congelamento foi registrado durante os 2 minutos de adaptação e por 1 minuto após o término dos choques.

Extinção: após o condicionamento, os ratos foram re-expostos ao contexto aversivo sem receberem choques, e o tempo de congelamento foi registrado continuamente durante 5 minutos. Os parâmetros utilizados para este procedimento tiveram como base o trabalho de Tiba, 2008.

Após as exposições à caixa de condicionamento, os animais foram alojados individualmente e só retornaram às suas gaiolas-moradia quando todos os outros animais da mesma caixa tivessem sido expostos ao procedimento.

A caixa de condicionamento foi limpa no intervalo entre os animais com álcool 70% para remover odores deixados por eles.

3.6 Peso Corporal

Os animais foram pesados imediatamente antes da exposição ao evento traumático (adolescência) e imediatamente antes da re-exposição ao contexto aversivo (idade adulta).

3.7 Coleta de Sangue

O sangue foi coletado em tubos contendo uma solução de EDTA (60mg/mL; 0,1mL/tubo). As amostras foram centrifugadas a 2.300 rpm por 15 min a 4°C e o plasma extraído foi mantido em freezer a -20°C até a determinação das concentrações de ACTH, pelo método de quimiluminescência.

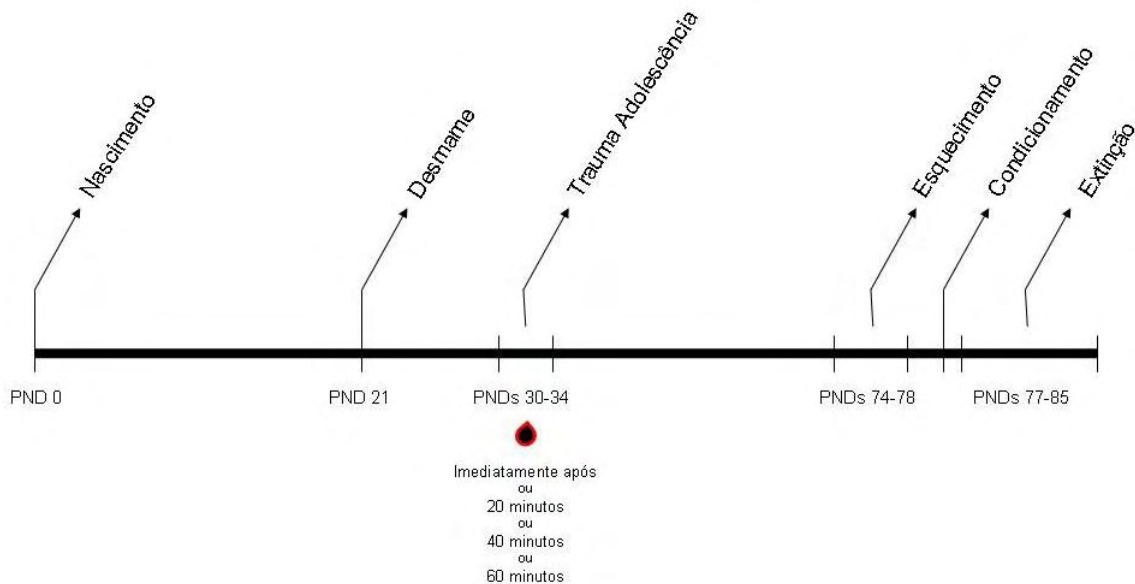


Figura 1: Esquema representativo das manipulações dos animais do grupo CTL. O dia do nascimento foi designado DPN 0. Até o desmame (DPN 21) os animais não foram manipulados, exceto para a limpeza das caixas. Entre os DPNs 30 e 34, eles foram pesados e expostos ou não a um choque intenso nas patas (CH e NCH, respectivamente), e alguns deles foram sacrificados imediatamente, 20, 40 ou 60 min após ser retirado da caixa de condicionamento, para posterior dosagem da concentração plasmática de ACTH. Os que não foram sacrificados foram pesados novamente e re-expostos ao ambiente aversivo na idade adulta (DPN 74-78) e dois dias depois eles foram submetidos ao condicionamento de medo ao contexto e re-exposição ao contexto por cinco dias (extinção).

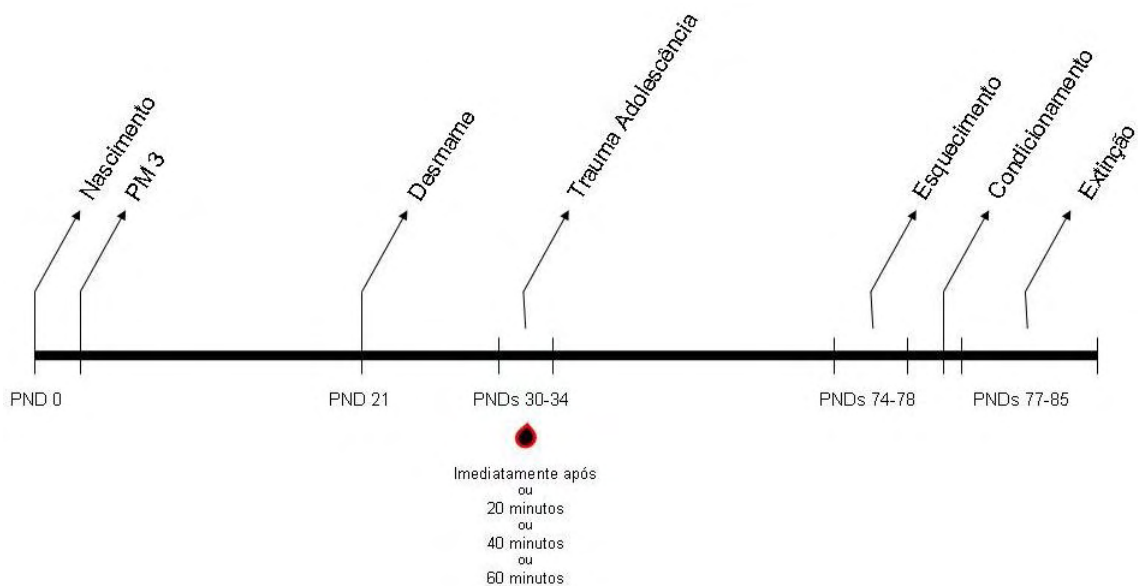


Figura 2: Esquema representativo das manipulações dos animais do grupo PM 3. O dia do nascimento foi designado DPN 0. No DPN 3, os filhotes foram separados da mãe por 24h, e não foram mais manipulados, exceto para a limpeza das caixas. Entre os DPNs 30 e 34, eles foram pesados e expostos ou não a um choque intenso nas patas (CH e NCH, respectivamente), e alguns deles foram sacrificados imediatamente, 20, 40 ou 60 min após ser retirado da caixa de condicionamento, para posterior dosagem da concentração plasmática de ACTH. Os que não foram sacrificados, foram pesados novamente e re-expostos ao ambiente aversivo na idade adulta (DPN 74-78) e dois dias depois eles foram submetidos ao condicionamento de medo ao contexto e re-exposição ao contexto por cinco dias (extinção).

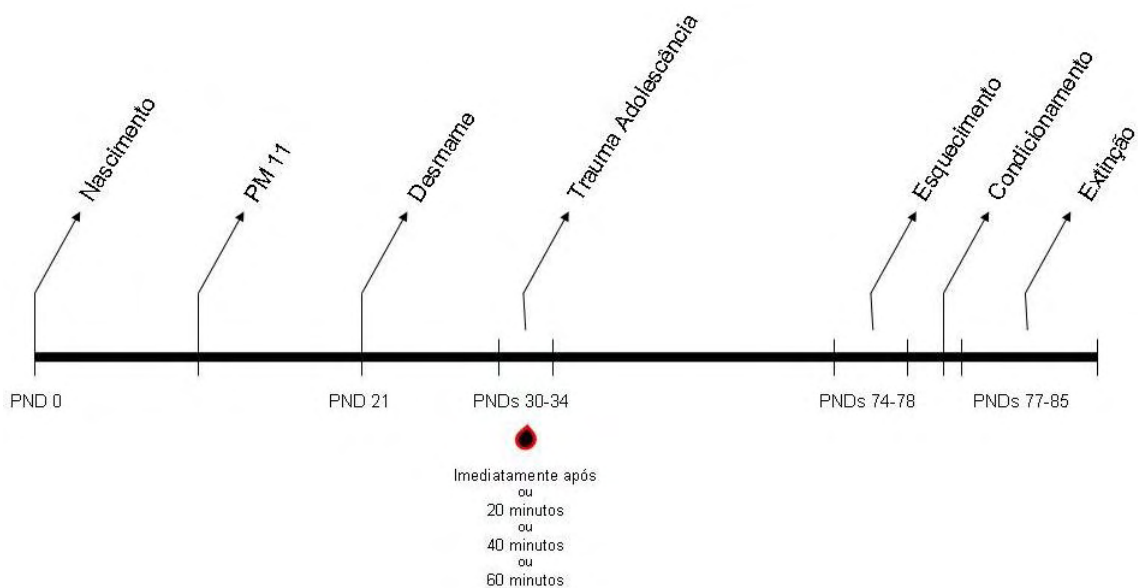


Figura 3: Esquema representativo das manipulações dos animais do grupo controle PM 11. O dia do nascimento foi designado DPN 0. No DPN 11, os filhotes foram separados da mãe por 24h, e não foram mais manipulados, exceto para a limpeza das caixas. Entre os DPNs 30 e 34, eles foram pesados e expostos ou não a um choque intenso nas patas (CH e NCH, respectivamente), e alguns deles foram sacrificados imediatamente, 20, 40 ou 60 min após ser retirado da caixa de condicionamento, para posterior dosagem da concentração plasmática de ACTH. Os que não foram sacrificados, foram pesados novamente e re-expostos ao ambiente aversivo na idade adulta (DPN 74-78) e dois dias depois eles foram submetidos ao condicionamento de medo ao contexto e re-exposição ao contexto por 5 dias (extinção).

3.8 Análise Estatística

O peso na adolescência foi analisado por ANOVA de uma via com o fator Grupo (CTL, PM 3, PM 11). Já o peso na fase adulta foi analisado por ANOVA de duas vias com os fatores Grupo e Trauma (NCH, CH).

Os dados comportamentais na adolescência e no condicionamento foram analisados por ANOVA de três vias com medidas repetidas cujos fatores foram Grupo, Trauma e Tempo de congelamento (medida repetida: média dos minutos 1 e 2 – antes do choque, e minuto 3 – depois do choque). Já os dados do esquecimento foram analisados por ANOVA de duas vias com Grupo, Trauma e Tempo de Congelamento (média dos 5 minutos) como fatores. O comportamento na extinção foi analisado por ANOVA de três vias com medidas repetidas com os fatores Grupo, Trauma e Tempo de Congelamento (média dos 5 minutos para cada dia de extinção).

Os dados hormonais no DPN 30 foram analisados por ANOVA de três vias e foram considerados os fatores Grupo, Trauma e Tempo (imediatamente, 20 min, 40 min, 60 min após sair da caixa de condicionamento).

Quando necessário, foi utilizado o teste *a posteriori* de Newman-Keuls. Em todos os casos, o nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

A Figura 4 mostra o peso corporal dos animais na adolescência. A ANOVA de uma via revelou um efeito do Grupo [$F_{(2,360)}=3,93$; $p=0,02$], e o teste *a posteriori* revelou que o peso dos animais PM 3 e PM 11 são significativamente menores que o dos animais CTL ($p=0,03$ e $p=0,02$, respectivamente).

Peso Corporal - Adolescência

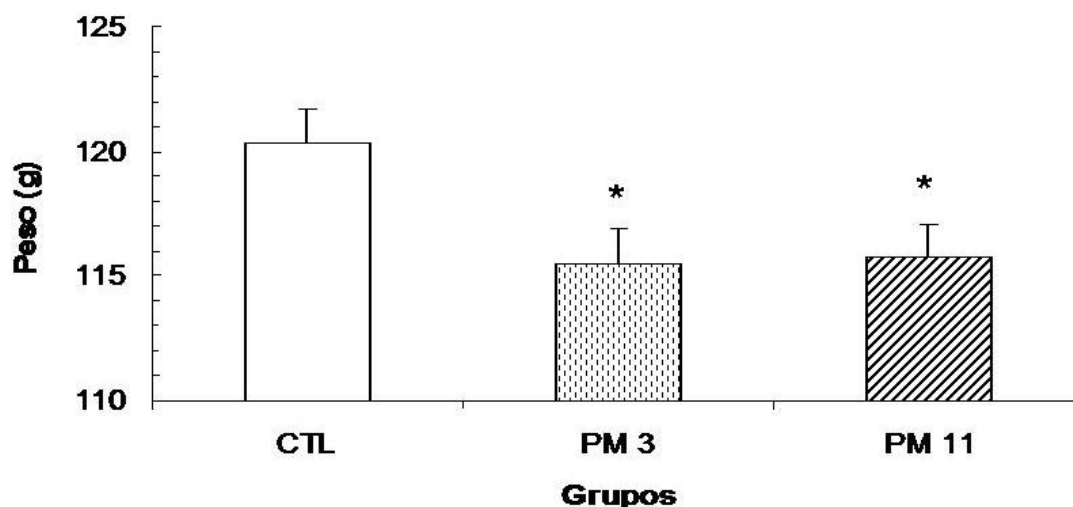


Figura 4: Peso corporal dos animais na adolescência (DPNs 30-34) dos grupos CTL (n=121), PM 3 (n=114) e PM 11 (n=128). Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. (*) – difere do CTL (ANOVA de uma via, seguida do teste de Newman-Keuls; $p \leq 0,05$).

Com relação ao tempo de congelamento após o evento traumático na adolescência, a ANOVA de três vias apontou um efeito do Trauma [$F_{(1,360)}=136,82$; $p<0,000001$], um efeito do Momento [$F_{(1,360)}=225,21$; $p<0,000001$], e uma interação Momento x Trauma [$F_{(1,360)}=147,89$; $p<0,000001$]. O teste de Newman-Keuls mostrou que o tempo de congelamento dos animais no último minuto foi maior que a média dos dois primeiros minutos, tanto para os animais que foram expostos ao trauma (animais CH; $p<0,000001$), como para os animais que só foram expostos à caixa de condicionamento (animais NCH; $p=0,04$), e que o tempo de congelamento no último minuto dos animais CH foi maior que o dos NCH ($p<0,000001$), o que já era esperado, uma vez que eles receberam um forte choque nas patas, expressando então mais comportamento de medo. Quando se analisa o tempo de congelamento total (durante os 3 minutos medidos), a ANOVA de três vias revela um efeito do Trauma [$F_{(1,360)}=119,73$; $p<0,000001$], e o teste *a posteriori* mostra que os animais CH apresentaram maior tempo de congelamento que os animais NCH ($p<0,000001$) (Figura 5).

Trauma - Adolescência

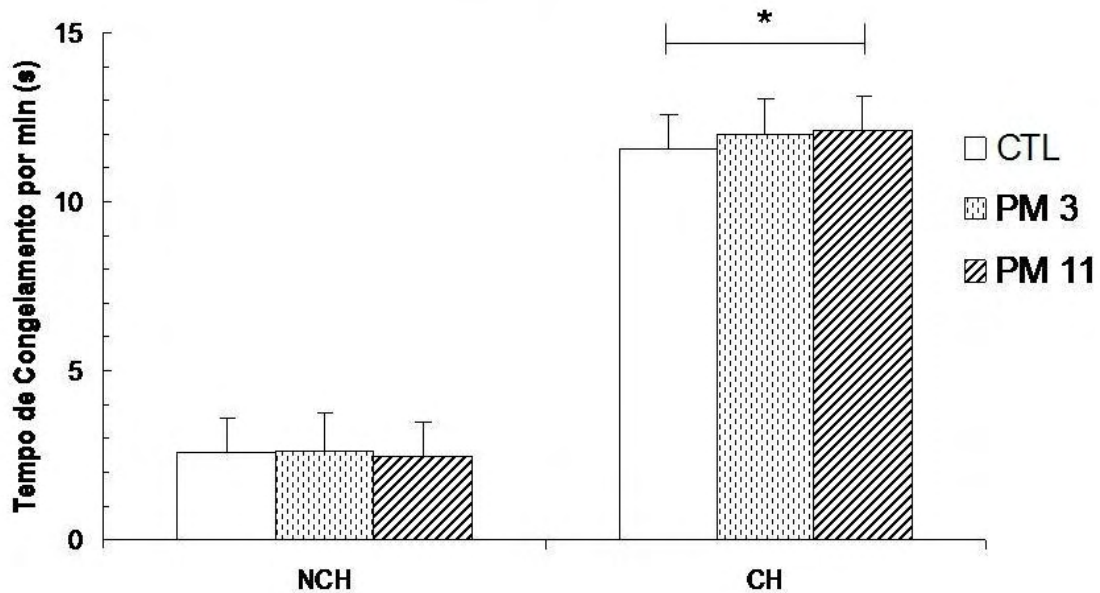


Figura 5: Tempo de congelamento total (durante os 3 min) na adolescência (DPNs 30-34), durante a exposição à caixa de condicionamento, para os animais CTL (61>n>63), PM 3 (55>n>59) e PM 11 (62>n>66), separados de acordo com a exposição ao choque intenso (CH) ou não (NCH). Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. (*) – difere do respectivo NCH (ANOVA de três vias, seguida do teste de Newman-Keuls – efeito Trauma; $p \leq 0,05$).

A ANOVA de três vias realizada para a análise hormonal revelou um efeito do Trauma [$F_{(1,262)}=53,35$; $p<0,000001$] e do Tempo [$F_{(3,262)}=23,26$; $p<0,000001$], e uma interação Grupo x Tempo [$F_{(6,262)}=2,27$; $p=0,04$]. O teste de Newman-Keuls mostrou que a concentração plasmática de ACTH dos animais CH foi maior que a dos NCH ($p=0,00001$). Além disso, mostrou que a concentração de ACTH imediatamente após sair da caixa de condicionamento é significativamente maior que a concentração 40 e 60 minutos após sair da caixa ($p=0,00006$ e $p=0,00002$, respectivamente), assim como a concentração 20 minutos após sair da caixa ($p=0,00002$ e $p<0,00001$, respectivamente). Ou seja, as concentrações nos dois primeiros tempos dosados (imediatamente e 20 minutos após sair da caixa de condicionamento) são iguais entre si, e as concentrações nos dois últimos tempos dosados (40 e 60 minutos após sair da caixa) também são iguais entre si, mas menores que as dos outros tempos. Ademais, a análise da interação pelo teste de Newman-Keuls mostrou que, para o grupo CTL, a concentração plasmática de ACTH 20 minutos após sair da caixa foi significativamente maior que nos outros tempos; para os grupos PM 3 e PM 11, a concentração de ACTH 60 minutos após sair da caixa

foi significativamente menor que imediatamente e 20 minutos após sair; 20 minutos após sair da caixa, a concentração de ACTH dos animais PM 3 ($p=0,02$) e PM 11 ($0,046$) é significativamente menor que a dos animais do grupo CTL. A Figura 6 mostra as concentrações plasmáticas de ACTH dos animais NCH e CH.

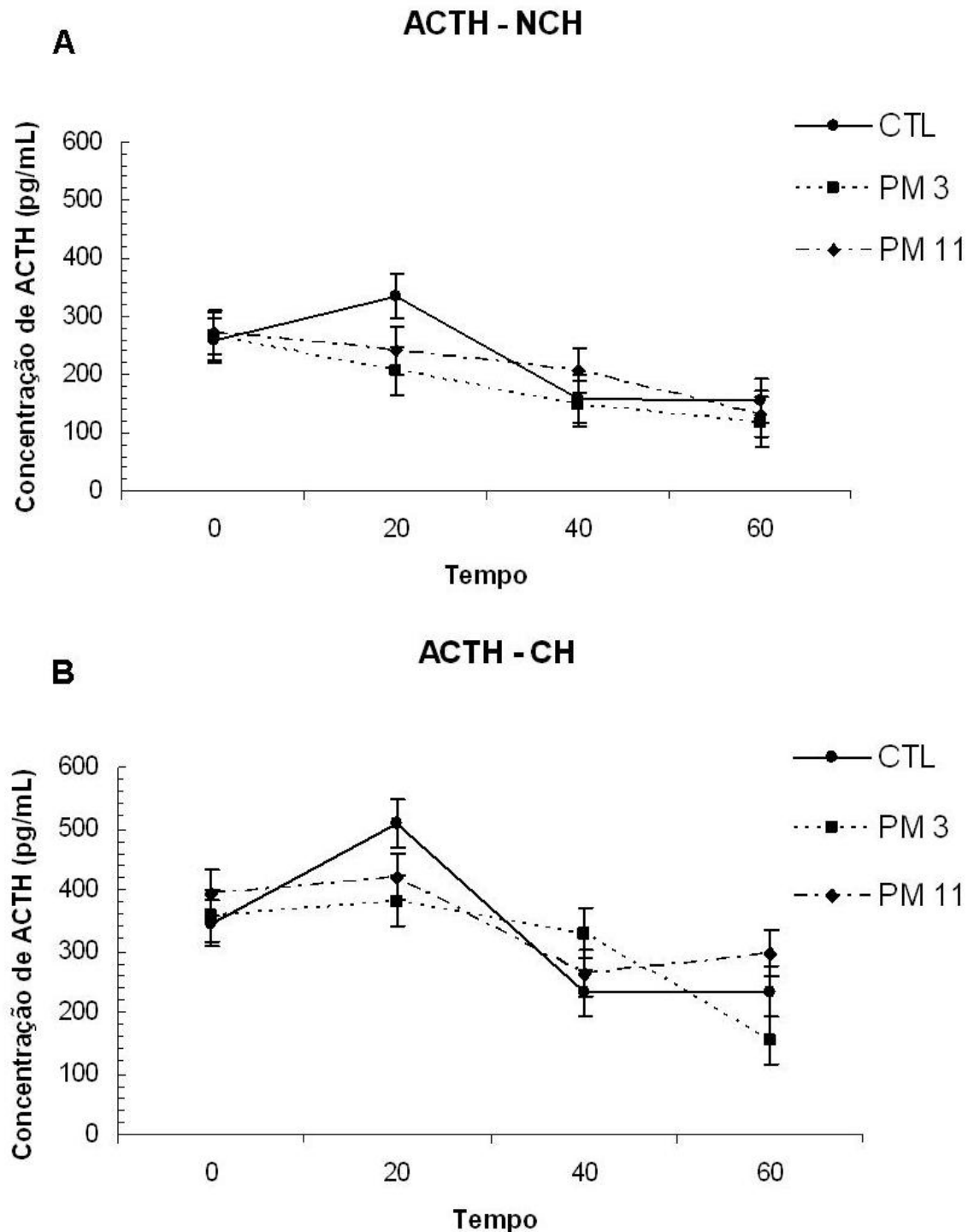


Figura 6: Concentração plasmática de ACTH imediatamente, 20, 40 e 60 min após retirar o animal da caixa de condicionamento, na adolescência. (A) representa os animais CTL (11>n>13), PM 3 (10>n>11) e PM 11 (11>n>13) que não foram submetidos ao choque intenso (NCH). (B) representa os animais CTL (11>n>13), PM 3 (11>n>12) e PM 11 (12>n>13) submetidos ao choque intenso (CH). Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. As concentrações dos animais CH são diferentes das dos animais NCH. As concentrações de ACTH imediatamente e

20 min são iguais entre si, e maiores que as concentrações 40 e 60 min após sair da caixa de condicionamento (ANOVA de três vias, seguida do teste de Newman-Keuls – efeito Trauma e efeito Tempo).

Com relação ao peso dos animais na idade adulta, a ANOVA de duas vias não apontou diferenças no peso (Figura 7).

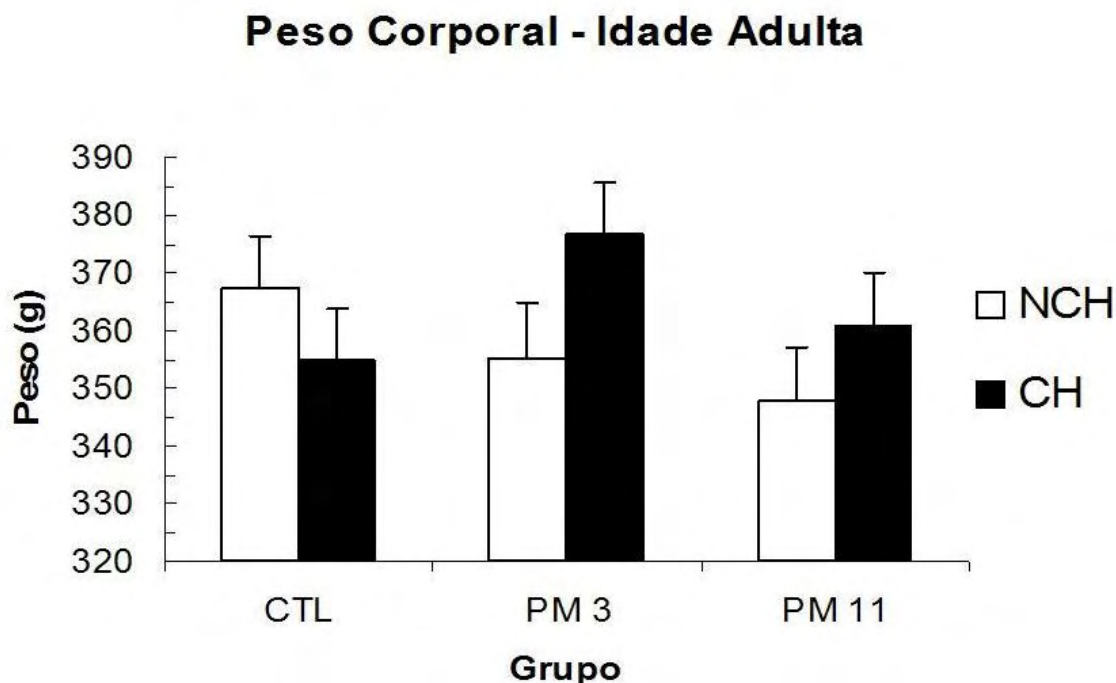


Figura 7: Peso corporal dos animais na idade adulta (DPNs 74-78) dos grupos CTL (12>n>13), PM 3 (10>n>12) e PM 11 (n=11), separados de acordo com a exposição ao choque intenso na adolescência (CH) ou não (NCH). Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão.

Na análise do tempo de congelamento na idade adulta, para se avaliar o esquecimento do trauma ocorrido na adolescência, a ANOVA de duas vias revelou um efeito do Trauma [$F_{(1,63)}=8,18$; $p=0,006$], e o teste de Newman-Keuls revelou que os animais CH tiveram maior tempo de congelamento que os NCH ($p=0,006$) (Figura 8).

No condicionamento, a ANOVA de três vias apontou um efeito do Momento [$F_{(1,62)}=268,00$; $p<0,000001$], e o teste de Newman-Keuls mostrou que o tempo de congelamento dos animais no último minuto foi maior que a média dos dois primeiros minutos ($p=0,0001$), como esperado, pois os animais receberam vários choques nas patas, expressando então mais comportamento de medo. A Figura 9 mostra o tempo de congelamento dos grupos para os diferentes momentos.

Esquecimento

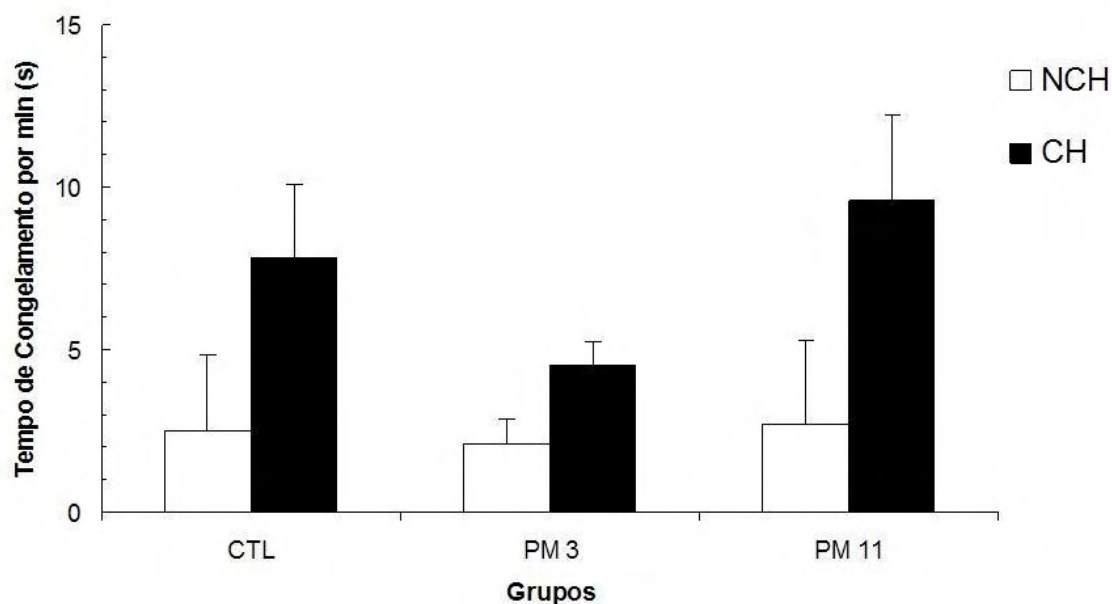


Figura 8: Tempo médio de congelamento na vida adulta (DPNs 74-78), durante a re-exposição ao ambiente aversivo, para os animais CTL (12>n>13), PM 3 (10>n>12) e PM 11 (n=11), separados de acordo com a exposição ao choque intenso na adolescência (CH) ou não (NCH). Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. O tempo de congelamento dos animais CH é diferente do tempo dos animais NCH (ANOVA de duas vias, seguida do teste de Newman-Keuls – efeito Trauma; $p \leq 0,05$).

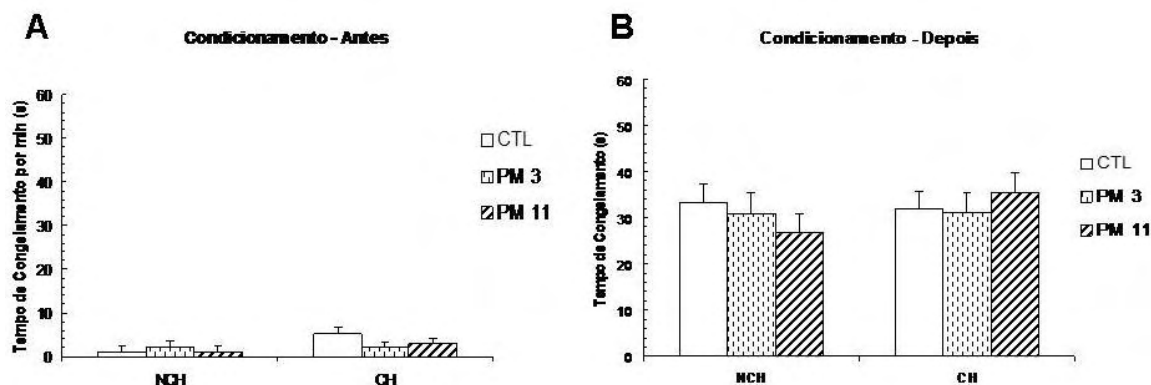


Figura 9: Tempo de congelamento no treino do condicionamento de medo ao contexto, antes (A) e depois (B) da apresentação dos choques nas patas, para os animais CTL (12>n>13), PM 3 (10>n>12) e PM 11 (n=11), separados de acordo com a exposição ao trauma na adolescência (CH) ou não (NCH). Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. O tempo de congelamento depois da apresentação dos choques é maior que o de antes (ANOVA de três vias, seguida do teste de Newman-Keuls – efeito Momento; $p \leq 0,05$).

Na extinção, a ANOVA de três vias com medidas repetidas revelou um efeito do Trauma [$F_{(1,62)}=13,85$; $p=0,0004$] e um efeito dos Dias [$F_{(4,248)}=104,50$; $p<0,000001$]. O teste *a posteriori* revelou que o tempo de congelamento dos animais CH foi maior que o dos NCH ($p=0,0006$) e que todos os dias foram diferentes entre si (Figura 10). A Figura

11 mostra o tempo de congelamento dos animais NCH e CH e as Figuras 12, 13 e 14 mostram o desempenho dos grupos CTL, PM 3 e PM 11, respectivamente.

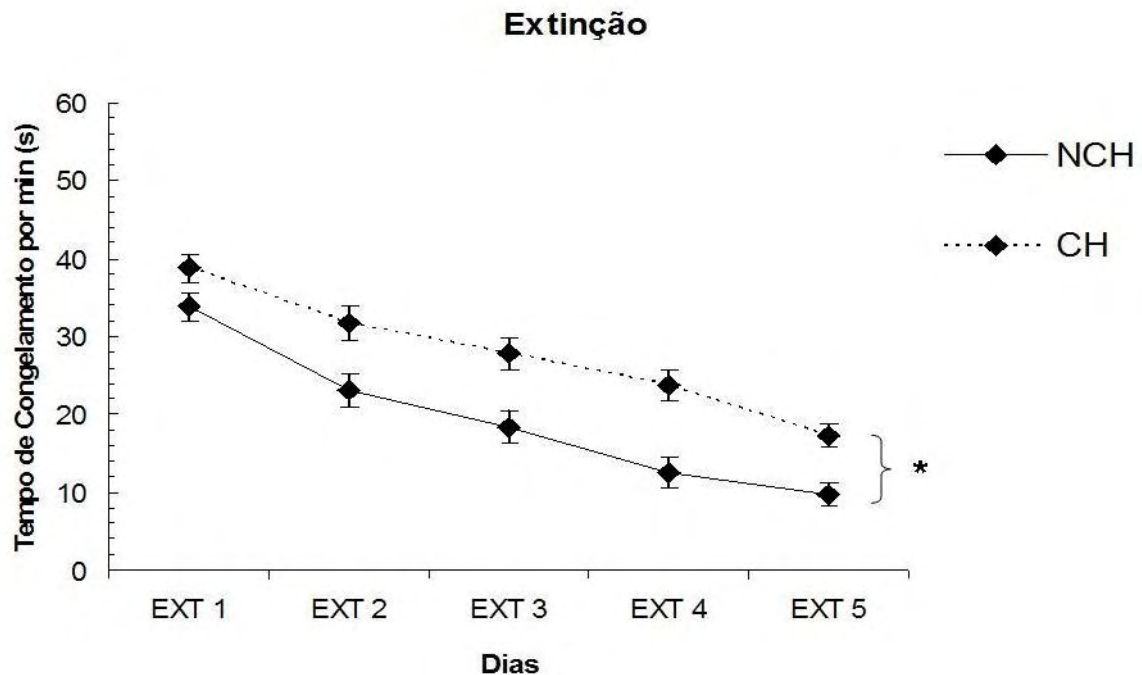
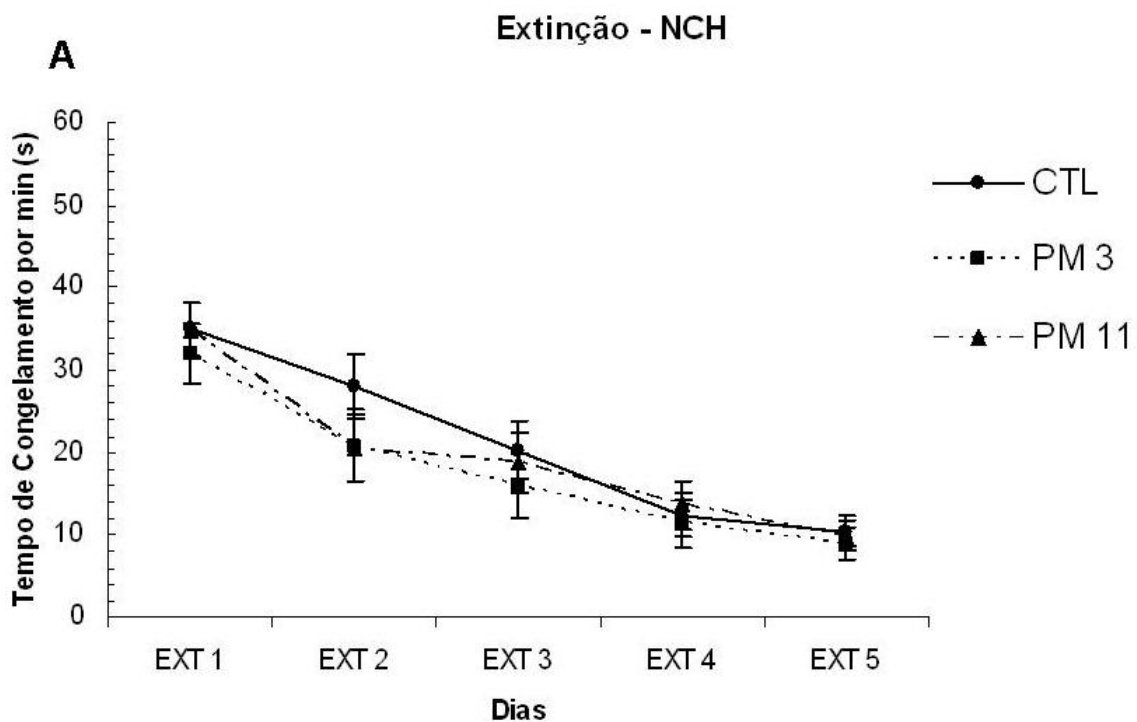


Figura 10: Tempo médio de congelamento durante os cinco dias de extinção na tarefa de condicionamento de medo ao contexto, para os animais submetidos ao choque intenso na adolescência (CH – n=35) ou não (NCH – n=33). Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão. Todos os dias foram diferentes entre si (*) – o tempo de congelamento dos animais CH foi diferente do tempo dos animais NCH (ANOVA de três vias com medida repetida, seguida do teste de Newman-Keuls – efeito Trauma e efeito Dias; $p \leq 0,05$).



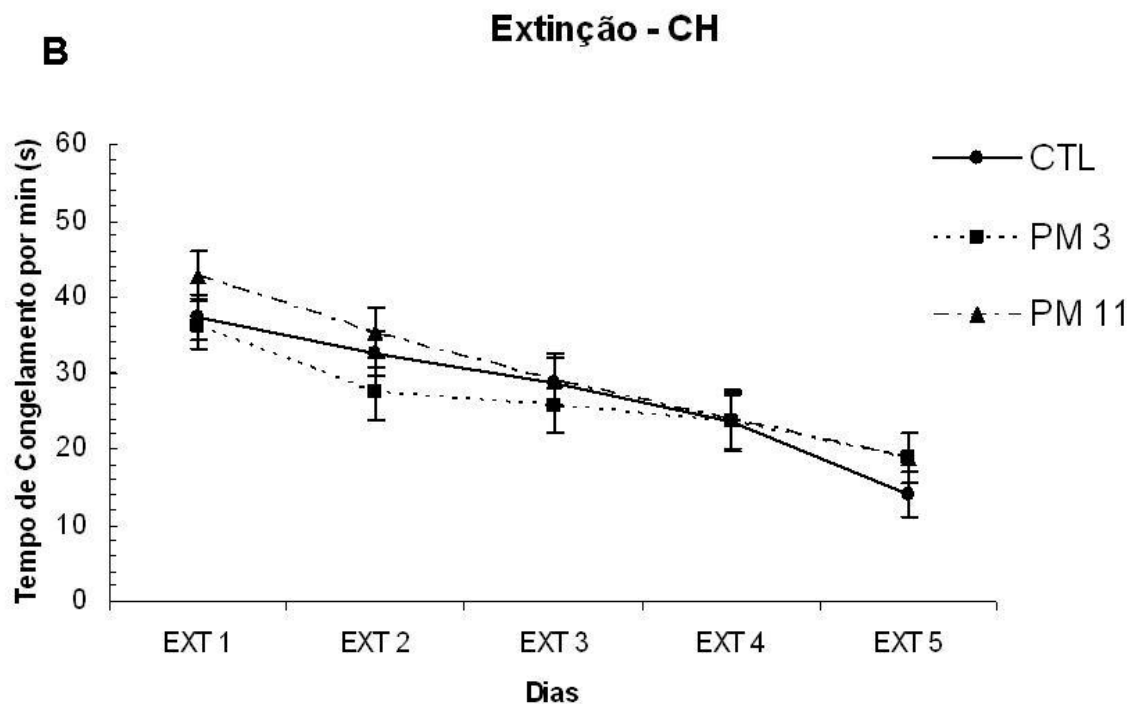


Figura 11: Tempo médio de congelamento durante os cinco dias de extinção na tarefa de condicionamento de medo ao contexto. (A) representa os animais CTL (n=12), PM 3 (n=10) e PM 11 (n=11) que não foram submetidos ao choque intenso na adolescência (NCH). (B) representa os animais CTL (n=13), PM 3 (n=11) e PM 11 (n=11) submetidos ao choque intenso na adolescência (CH). Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados concordam com outros trabalhos recentemente publicados que mostram que a exposição a um estressor durante a juventude ou adolescência pode provocar consequências adversas na idade adulta. Observamos também que os animais CH, quando comparados aos NCH, expressaram maior comportamento de medo ao serem re-expostos ao local do trauma, mostrando que mesmo passados 45 dias, os animais que receberam o choque intenso ainda lembram-se do ambiente aversivo. Imediatamente após o treino do condicionamento, o tempo de congelamento dos animais CH não difere do tempo dos NCH, mas ao longo dos cinco dias de extinção essa diferença re-aparece, sugerindo um efeito em longo prazo da manipulação estressante da adolescência. Maslova *et al.* (2002) mostraram que animais submetidos ao paradigma de estresse crônico variado na juventude (entre DPNs 21 e 32) apresentam maior resposta de sobressalto quando adultos (assim como observa-se nos pacientes com TEPT). Avital & Richter-Levin (2005) mostraram que até mesmo uma breve exposição a um estressor na juventude pode modular a resposta de estresse na vida adulta. Os animais expostos à três sessões de plataforma elevada por 3 minutos cada, no DPN 28,

e ao nado forçado por 15 minutos no DPN 60 e/ou 90 apresentaram maior comportamento tipo-ansioso e maior resposta de sobressalto do que os animais CTL e do que os expostos ao estresse somente na juventude ou na vida adulta. Tsoory & Richter-Levin (2006), usando outros estressores, também mostraram que uma experiência adversa na juventude (DPN 27 a DPN 29) ou adolescência (DPN 33 a DPN 35) provoca alterações na idade adulta. A experiência adversa consistiu em nado forçado por 10 minutos no 1º dia, exposição à plataforma elevada por 30 minutos no 2º dia, e choque nas patas no 3º dia. Quando adultos (aproximadamente DPN 60), os animais submetidos ao protocolo de estresse apresentaram menor comportamento exploratório em um ambiente novo e, quando testados na esquiva ativa de duas vias, evitaram menos receber o choque nas patas do que os animais CTL (ir para o outro ambiente quando escuta o som, antes do choque ser apresentado). Ainda nessa tarefa, observou-se que os animais que passaram pelo estresse na juventude apresentaram mais comportamento de “não-resposta” (não passar para o outro compartimento) do que os animais CTL. Um dia após essa tarefa (que foi o estressor na vida adulta), ao serem testados no campo aberto, tanto os animais submetidos ao estresse na juventude como aqueles submetidos na adolescência apresentaram aumento no comportamento tipo-ansioso que os animais submetidos somente ao estresse na idade adulta (esquiva).

Alguns pesquisadores acreditam que um importante fator para produzir essas alterações persistentes na resposta de estresse pode ser o fato de que alguns circuitos neurais dos animais adolescentes, como aqueles relacionados com o córtex pré-frontal, com o hipocampo e com a amígdala, ainda não estejam totalmente maduros (para revisão, ver Spear, 2000), e que o cérebro se torna menos suscetível aos efeitos do estresse conforme ele se torna mais maduro (Tsoory & Richter-Levin, 2006). No entanto, muitos estudos ainda são necessários para elucidar essa questão.

A análise da curva de concentração plasmática de ACTH após a manipulação na adolescência mostra que os animais CH apresentaram maior concentração de ACTH do que os animais NCH, o que já era esperado, uma vez que a exposição ao choque intenso provoca uma resposta de estresse mais acentuada do que um estressor leve (novidade). Normalmente, a curva tempo-resposta de ACTH apresenta um pico por volta de 10-20 min, o que ocorreu nos animais CTL. Entretanto, nos animais privados da mãe, esse pico

de secreção de ACTH não foi observado, sugerindo que a privação materna altera a resposta hormonal de estresse na adolescência. Curiosamente, resultados prévios (van Oers *et al.*, 1999; dados não publicados de nosso grupo) mostram que a resposta de ACTH à injeção de salina (estressor leve) é mais atenuada nos animais PM 11, quando testados no DPN 20 e 60, respectivamente. Essa discrepância pode indicar que animais submetidos a essa manipulação precoce estejam aptos a lidar com estressores leves, mas ao enfrentarem um estressor intenso, como o choque nas patas, a resposta de estresse se revele inadequada.

Quando testados na adolescência (entre DPNs 30-34), tanto o peso dos animais PM 3 quanto o dos PM 11 foram significativamente menores do que o dos animais não-privados, o que confirma os resultados de Suchecki & Tufik (1997) que verificaram que a redução do peso produzida pela privação materna persiste até 60 dias de vida. Provavelmente isso se deve ao fato de que o hormônio do crescimento está diminuído nos animais privados (para revisão, ver de Kloet & Oitzl, 2003). Quando adultos (entre DPNs 74 e 78), não observamos mais essa diferença, o que poderia indicar que o efeito da privação materna no peso corporal dos animais é duradouro, mas não permanente.

No presente trabalho, notamos influência da privação materna somente na adolescência, com relação ao peso corporal e às concentrações de ACTH, e não na curva de extinção do comportamento de medo aprendido. Logo, esses resultados poderiam sugerir que não há influência dessa manipulação na memória emocional de ratos submetidos ao trauma na adolescência e posterior extinção da tarefa de condicionamento de medo ao contexto na vida adulta. Contudo, vale lembrar que consideramos que a resposta de medo extinguiu após cinco dias de re-exposição. O trabalho utilizado para determinação deste critério sugeria que o comportamento estaria extinto quando o tempo de congelamento dos animais permanece o mesmo por três dias consecutivos, e utilizando este mesmo critério no presente estudo, verificamos que nenhum dos grupos extinguiu durante os 5 dias avaliados.

Em um próximo passo, utilizando esse mesmo protocolo experimental, mas com machos e fêmeas, analisaremos o desempenho dos animais até que ocorra a extinção da resposta de medo. Iremos avaliar, também, o comportamento social desses animais, uma vez que no TEPT ele está diminuído. Pretendemos, com isso, mostrar se a privação

materna exerce alguma influência no tempo de extinção e na interação social dos animais que foram submetidos ao trauma ou não.

6 REFERÊNCIAS

- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* 1999; 160:1-12.
- Avital A, Richter-Levin G. Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioural consequences of exposure to stress in the adult rat. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2005;8:163-73.
- Baker DG, West SA, Nicholson WE, Ekhtator NN, Kasckow JW, Hill KK, Bruce AB, Orth DN, Geraciotti TD Jr. Serial CSF corticotropin-releasing hormone levels and adrenocortical activity in combat veterans with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 1999;156:585-8.
- Blanchard DC, Blanchard RJ. Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol*. 1969;67:370-5.
- Blanchard DC, Blanchard RJ. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol*. 1972;81:281-90.
- Bohn MC. Glucocorticoid induced teratologies of the nervous system. In: Yanai, J. ed. *Neurobehavioral teratology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV 1984;365-87.
- Bremner JD, Licinio J, Darnell A, Krystal JH, Owens MJ, Southwick SM, Nemeroff CB, Charney DS. Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*. 1997;154:624-9.
- Bremner JD. Does stress damage the brain? *Biol Psychiatry*. 1999;1;45:797-805.
- Cohen DH, Randall DC. Classical conditioning of cardiovascular responses. *Annu Rev Physiol*. 1984;46:187-97.
- Cohen H, Zohar J, Matar M. The relevance of differential response to trauma in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*. 2003;53(6):463-73.
- Cohen H, Kaplan Z, Matar MA, Loewenthal U, Zohar J, Richter-Levin G. Long-lasting behavioral effects of juvenile trauma in an animal model of PTSD associated with a failure of the autonomic nervous system to recover. *Eur Neuropsychopharmacol*

- 2007;17:464-77.
- Davis M. The role of the amygdale in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci.* 1992;15:353-75.
- de Kloet CS, Vermetten E, Geuze E, Kavelaars A, Heijnen CJ, Westenberg HG. Assessment of HPA-axis function in posttraumatic stress disorder: pharmacological and non-pharmacological challenge tests, a review. *J Psychiatr Res* 2006;40:550-67.
- De Kloet ER, Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Sutanto W, Levine S. Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res* 1988;73:101-20.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 1998;19:269-301.
- De Kloet ER, Oitzl MS. Who cares for a stressed brain? The mother, the kid or both? *Neurobiol Aging.* 2003;24 Suppl 1:S61-5; discussion S67-8.
- Delahanty DL, Raimonde AJ, Spoonster E. Initial posttraumatic urinary cortisol levels predict subsequent PTSD symptoms in motor vehicle accident victims. *Biol Psychiatry* 2000;48:940-7.
- Dent GW, Smith MA, Levine S. Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. *Endocrinology* 2000a;141:1593-8.
- Dent GW, Okimoto DK, Smith MA, Levine S. Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology* 2000b;71:333-42.
- Diehl LA, Silveira PP, Leite MC, Crema LM, Portella AK, Billodre MN, Nunes E, Henriques TP, Fidelix-da-Silva LB, Heis MD, Gonçalves CA, Quillfeldt JA, Dalmaz C. Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. *Brain Res* 2007;1144:107-16.
- Fanselow MS, Bolles RC. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1979;93:736-44.
- Fendt M, Fanselow MS. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev.* 1999;23:743-60.
- Gilbertson MW, Shenton ME, Ciszewski A, Kasai K, Lasko NB, Orr SP, Pitman RK.

- Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. *Nat Neurosci* 2002;5:1242-7.
- Graef FG. Bases biológicas do transtorno de estresse pós-traumático. *Rev Bras Psiquiatr* 2003;25:21-4.
- Grino M, Burgunder JM, Eskay RL, Eiden LE. Onset of glucocorticoid responsiveness of anterior pituitary corticotrophs during development is scheduled by corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 1989;124:2686-92.
- Harvey BH, Naciti C, Brand L, Stein DJ. Endocrine, cognitive and hippocampal/cortical 5HT 1A/2A receptor changes evoked by a time-dependent sensitisation (TDS) stress model in rats. *Brain Res.* 2003;983(1-2):97-107.
- Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry.* 2001;49:1023-39.
- Iwata J, LeDoux JE. Dissociation of associative and nonassociative concomitants of classical fear conditioning in the freely behaving rat. *Behav Neurosci.* 1988;102(1):66-76.
- Jacobsen LK, Southwick SM, Kosten TR. Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: a review of the literature. *Am J Psychiatry* 2001;158:1184-90.
- Kanter ED, Wilkinson CW, Radant AD, Petrie EC, Dobie DJ, McFall ME, Peskind ER, Raskind MA. Glucocorticoid feedback sensitivity and adrenocortical responsiveness in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2001;50:238-45.
- LaBar KS, Cabeza R. Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:54-64.
- LeDoux JE. Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res.* 1993;58:69- 79.
- Levine S, Huchton DM, Wiener SG, Rosenfeld P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Dev Psychobiol* 1991;24:547-58.
- Levine S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol Behav* 2001;73:255-60.
- Levine S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 2005;30:939-46.

- Louvar H, Maccari S, Ducrocq F, Thomas P, Darnaudery M. Long-term behavioural alterations in female rats after a single intense footshock followed by situational reminders. *Psychoneuroendocrinology* 2005;30:316-24.
- Louvar H, Maccari S, Lesage J, Léonhardt M, Dickes-Coopman A, Darnaudéry M. Effects of a single footshock followed by situational reminders on HPA axis and behaviour in the aversive context in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:92-9.
- Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn* 2007;65:209-37.
- Maercker A, Michael T, Fehm L, Becker ES, Margraf J. Age of traumatisatation as a predictor of post-traumatic stress disorder or major depression in young women. *Br J Psychiatry* 2004;184:482-7.
- Maren S, Quirk GJ. Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:844-52.
- Meyer JS. Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiol Rev* 1985;65:946-1021.
- Maslova LN, Bulygina VV, Popova NK. Immediate and long-lasting effects of chronic stress in the prepubertal age on the startle reflex. *Physiol Behav.* 2002;1-15;75(1-2):217-25.
- Okimoto DK, Blaus A, Schmidt MV, Gordon MK, Dent GW, Levine S. Differential expression of c-fos and tyrosine hydroxylase mRNA in the adrenal gland of the infant rat: evidence for an adrenal hyporesponsive period. *Endocrinology* 2002;143:1717-25.
- Otte C, Muhtz C, Daneshkhah S, Yassouridis A, Kiefer F, Wiedemann K, Kellner M. Mineralocorticoid receptor function in posttraumatic stress disorder after pretreatment with metyrapone. *Biol Psychiatry* 2006;60:784-7.
- Pynoos RS, Ritzmann RF, Steinberg AM, Goenjian A, Prisecaru I. A behavioral animal model of post-traumatic stress disorder featuring repeated exposure to situational reminders. *Biol Psychiatry* 1996;39:129-34.
- Rauch SL, Shin LM, Phelps EA. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research – past, present, and future. *Biol Psychiatry* 2006;60:376-82.

- Resnick HS, Yehuda R, Pitman RK, Foy DW. Effect of previous trauma on acute plasma cortisol level following rape. *Am J Psychiatry* 1995;152:1675-7.
- Richter-Levin G. Acute and long-term behavioral correlates of underwater trauma--potential relevance to stress and post-stress syndromes. *Psychiatry Res.* 1998;79:73-83.
- Rohleder N, Joksimovic L, Wolf JM, Kirschbaum C. Hypocortisolism and increased glucocorticoid sensitivity of pro-Inflammatory cytokine production in Bosnian war refugees with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2004;55:745-51.
- Rosenfeld P, Gutierrez YA, Martin AM, Mallett HA, Alleva E, Levine S. Maternal regulation of the adrenocortical response in preweanling rats. *Physiol Behav* 1991;50:661-71.
- Rosenfeld P, Suchecki D, Levine S. Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. *Neuroscience Behavioral Rev* 1992;16:553-68.
- Rosenfeld P, Ekstrand J, Olson E, Suchecki D, Levine S. Maternal regulation of adrenocortical activity in the infant rat: effects of feeding. *Dev Psychobiol* 1993;26:261-77.
- Rots NY, De Jong J, Workel JO, Levine S, Cools AR. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary–adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *J Neuroendocrinol* 1996;8:501-6.
- Ruiz JE, Barbosa Neto J, Schoedl AF, Mello MF. Psiconeuroendocrinologia do transtorno de estresse pós-traumático. *Rev Bras Psiquiatr* 2007;29:S7-12.
- Rundle SE, Funder JW. Ontogeny of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin in the rat. *Neuroendocrinology* 1988;47:374-8.
- Santa Ana EJ, Saladin ME, Back SE, Waldrop AE, Spratt EG, McRae AL, LaRowe SD, Timmerman MA, Upadhyaya H, Brady KT. PTSD and the HPA axis: differences in response to the cold pressor task among individuals with child vs. adult trauma. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:501-9.
- Schapiro S. Neonatal cortisol administration: effect on growth, the adrenal gland and pituitary-adrenal response to stress. *J Pharmacol Exp Ther* 1965;139:771-4.
- Smith MA, Kim SY, van Oers HJ, Levine S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology* 1997;138:4622-8.
- Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci*

- Biobehav Rev. 2000 Jun;24:417-63.
- Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, Levine S. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 1993a;57:204-12.
- Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Dev Brain Res* 1993b;75:185-192.
- Suchecki D, Nelson DY, van Oers H, Levine S. Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology* 1995;20:169-82.
- Suchecki D, Tufik S. Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. *Am J Physiol* 1997;273:R1332-8.
- Suchecki D, Duarte Palma B, Tufik S. Pituitary-adrenal axis and behavioural responses of maternally deprived juvenile rats to the open field. *Behav Brain Res* 2000;111:99-106.
- Sullivan GM, Apergis J, Bush DE, Johnson LR, Hou M, Ledoux JE. Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus. *Neuroscience*. 2004;128:7-14.
- Tsoory M, Richter-Levin G. Learning under stress in the adult rat is differentially affected by 'juvenile' or 'adolescent' stress. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2006;9:713-28.
- Van de Kar LD, Piechowski RA, Rittenhouse PA, Gray TS. Amygdaloid lesions: differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. *Neuroendocrinology* 1991;54:89-95.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S. Persistent, but paradoxical, effects on HPA regulation of infants maternally deprived at different ages. *Stress* 1997;1:249-62.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Li C, Levine S. The ontogeny of glucocorticoid negative feedback: influence of maternal deprivation. *Endocrinology* 1998a;139:2838-46.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Whelan T, Levine S. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J Neurosci* 1998b;18:10171-9.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S. Early vs. late maternal deprivation differentially alters

- the endocrine and hypothalamic responses to stress. *Brain Res Dev Brain Res* 1998c;111:245-52.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S. Persistent effects of maternal deprivation on HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone. *J Neuroendocrinol* 1999;11:581-8.
- Walker CD, Perrin M, Vale W, Rivier C. Ontogeny of the stress response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. *Endocrinology* 1986;118:1445-51.
- Wang S, Mason J. Elevations of serum T3 levels and their association with symptoms in World War II veterans with combat-related posttraumatic stress disorder: replication of findings in Vietnam combat veterans. *Psychosom Med* 1999;61:131-8.
- Wang J, Akirav I, Richter-Levin G. Short-term behavioral and electrophysiological consequences of underwater trauma. *Physiol Behav.* 2000;70:327-32.
- Wolf, OT. The influence of stress hormones on emotional memory: Relevance for psychopathology. *Acta Psychol (Amst)* 2008;127:513-31.
- Yehuda R, Boissoneau D, Mason JW, Giller EL. Glucocorticoid receptor number and cortisol excretion in mood, anxiety, and psychotic disorders. *Biol Psychiatry* 1993;34:18-25.
- Yehuda R, Boissoneau D, Lowy MT, Giller EL Jr. Dose-response changes in plasma cortisol and lymphocyte glucocorticoid receptors following dexamethasone administration in combat veterans with and without posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1995;52:583-93.
- Yehuda R, Halligan SL, Bierer LM. Relationship of parental trauma exposure and PTSD to PTSD, depressive and anxiety disorders in offspring. *J Psychiatr Res* 2001;35:261-70.
- Yehuda R, Golier JA, Halligan SL, Meaney M, Bierer LM. The ACTH response to dexamethasone in PTSD. *Am J Psychiatry* 2004;161:1397-403.
- Yehuda R, Yang RK, Buchsbaum MS, Golier JA. Alterations in cortisol negative feedback inhibition as examined using the ACTH response to cortisol administration in PTSD. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:447-51.