



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Thayza Martins Melzer

**Os efeitos do estresse precoce nos comportamentos exploratório, de risco e de consumo
de álcool em camundongos adultos**

Florianópolis

2022

Thayza Martins Melzer

**Os efeitos do estresse precoce nos comportamentos exploratório, de risco e de consumo
de álcool em camundongos adultos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação
em Neurociências da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de Mestre em
Neurociências
Orientador: Prof^º. Dr^ª. Patricia de Souza Brocardo

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Melzer, Thayza Martins

Os efeitos do estresse precoce nos comportamentos exploratório, de risco e de consumo de álcool em camundongos adultos / Thayza Martins Melzer ; orientadora, Patricia de Souza Brocardo, 2022.
53 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Estresse precoce. 3. Separação materna. 4. Comportamento de risco. 5. Camundongos. I. Brocardo, Patricia de Souza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

Thayza Martins Melzer

Os efeitos do estresse precoce nos comportamentos exploratório, de risco e de consumo de álcool em camundongos adultos

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Viviane Aparecida Balvedi Polli, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Eloisa Pavesi, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Elisa C. Winkelmann Duarte, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Manuella Pinto Kaster, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Prof. Aderbal Silva Aguiar Jr.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.^a Patricia de Souza Brocardo, Dr.^a
Orientadora

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado ao grande amigo Alfredo Rui Ramos
(*in memoriam*) e a todas as pessoas que perderam suas vidas
para a COVID-19.

AGRADECIMENTOS

Ao Universo, que me permitiu estar presente aqui, neste momento e nesta Universidade, realizando este sonho que é a pós-graduação em Neurociências.

Todo o meu amor e um muito obrigada especial a minha mãe, Dulcemére, pelo apoio incondicional, pela paciência e pela compreensão durante este período (e em todos os outros da vida). Você é incomparável!

Ao meu pai, Paulo, e as minhas avós, Maria e Ondina, por todo amor, carinho e ensinamentos ao longo do nosso tempo juntos. Tudo que aprendi com vocês foi essencial para me fazer chegar até aqui. Vocês jamais serão esquecidos!

A Dr.^a Graciela Mendonça, Daiane Amorim, Julia Trindade e Beatriz Althoff, sem o apoio de vocês eu não chegaria até aqui. Obrigada por cuidarem tão bem de mim, por realizarem seu trabalho com tanta maestria e empatia. Vocês são inspiradoras! Esta conquista é fruto direto do trabalho de vocês.

A minha família, pelo apoio e pela força de sempre. E a minha família estendida: Patrícia, Maria Fernanda, Guilherme e Aglaes obrigada pela amizade inabalável, pelas conversas e pelos momentos de descontração.

A família que a Neuro me deu e que me acompanha até hoje: Scheila, Kelly, Carol e Cibelle, obrigada por dividirem esta jornada comigo e por tornarem tudo mais leve.

A professora Patricia, por permitir o meu ingresso no Laboratório de Neuroplasticidade (LANEP), pela paciência, confiança, humanidade e por cada ensinamento dividido comigo. Dizem que depois de um tempo a gente acaba se parecendo com quem nos orienta no mestrado/doutorado. Tomara!

As minhas parceiras de laboratório: Evelini, Priscilla, Marina, Anelise, Aléxia, Laura e Patricia, obrigada por todos os ensinamentos, conselhos, dicas e pela parceria (mesmo virtual) nesses últimos dois anos e meio. Agradeço especialmente a Laura por ter sido meu braço direito no desenvolvimento deste trabalho.

A Claudia, por me incentivar a ingressar no mestrado quando tive dúvidas e por me levar ao LANEP. Serei eternamente grata!

A todos os professores e professoras do Programa de pós-graduação em Neurociências, pelas lições aprendidas dentro e fora de sala de aula. Em especial as professoras Kiev, Elisa, Eloisa e Viviane, que acrescentam tanto nas discussões do nosso grupo. É um privilégio aprender com vocês.

A professora Manuella e ao pessoal do LANET por nos acolher tão bem no seu espaço e por todos os ensinamentos divididos. Estendo o agradecimento aos nossos “vizinhos” do LANED, sempre prestativos e prontos para auxiliar no que fosse preciso.

A Luciana, veterinária do CCB, que cuida tão bem dos animais e nos capacita para que o possamos garantir as melhores condições de vida para eles.

Aos animais que participaram deste estudo, todo o meu respeito.

A CAPES, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento desta pesquisa.

E a UFSC, uma universidade ímpar e que, infelizmente, continua sendo atacada de todos os lados por aqueles que não sabem ou não reconhecem a importância desta instituição para o país. Foi e continua sendo um privilégio me formar e me transformar aqui.

“Science is a fundamentally human endeavor, whose purpose is to help us understand the world, better our lives, feed our innate curiosity. It is meaningless, empty, and toxic if placed above or in opposition to human rights and human lives.”

(Katie Mack, 2020)

RESUMO

A resposta fisiológica ao estresse faz parte do funcionamento normal do organismo e aparece em decorrência de uma ameaça real ou percebida à homeostase do indivíduo. As principais estruturas envolvidas nesta resposta são as que formam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) que, quando ativado, secreta o cortisol, hormônio responsável por dar início a uma série alterações no organismo a fim de preparar o indivíduo para lidar com a ameaça. O estresse precoce, enfrentamento de situação adversa durante a infância até os 18 anos de idade, é capaz de causar uma série de prejuízos ao indivíduo – inclusive uma desregulação do eixo HHA. Isso ocorre devido a maior vulnerabilidade do sistema nervoso nesta fase, visto que este ainda não atingiu seu desenvolvimento completo. Dentre as consequências comportamentais do estresse precoce, pode-se destacar uma maior propensão a comportamentos de risco, incluindo o abuso de drogas como o álcool. Levando-se em consideração os prejuízos causados pelo estresse precoce e pelo consumo excessivo de álcool, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do estresse precoce nos comportamentos exploratório, anedônico, de risco e de consumo de álcool em camundongos que foram submetidos ao estresse precoce induzido pelo modelo de separação materna (SM). Neste protocolo, as mães foram separadas dos filhotes por 3 horas diárias durante todo o período de amamentação. Após completarem 60 dias de vida, os animais foram testados a fim de se observar diferenças comportamentais entre o grupo controle (N=16) e o grupo estressado (N=16). Os resultados mostraram que a SM foi capaz de atrapalhar o ganho de peso dos animais durante a amamentação, quando comparados ao controle. Os animais estressados também apresentaram um comportamento exploratório maior no teste do campo aberto e uma maior propensão para explorar os braços abertos do labirinto em cruz elevado. No comportamento anedônico, apenas as fêmeas SM apresentaram comportamento diferente do controle, mesmo resultado observado no consumo de álcool. Com o protocolo experimental escolhido e a idade avaliada não foi possível observar muitas diferenças no comportamento exploratório e de risco entre os animais. No entanto, o que foi encontrado demonstra que o estresse precoce é capaz de alterar o comportamento dos animais e que, por isso, se fazem necessárias mais pesquisas a fim de se buscar entender cada vez mais como e em que grau o estresse precoce é capaz de interferir na vida do indivíduo.

Palavras-chave: Separação materna. Comportamento de risco. Consumo de álcool. Camundongos.

ABSTRACT

The physiological stress response is part of the organism's normal functioning and appears due to a real or perceived threat to the individual's homeostasis. The main system involved in this response is the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which, when activated, secretes cortisol, a hormone responsible for initiating a series of changes in the body to prepare the individual to deal with the threat. Early life stress (ELS), the experience of an adverse situation during childhood up to 18 years of age, can cause a series of damages to the individual - including the dysregulation of the HPA axis. This is due to the greater vulnerability of the nervous system at this stage since it has not yet reached its full development. Among the behavioral consequences of ELS, there is a greater propensity to risk behaviors, such as drug abuse like alcohol. Considering the damage caused by ELS and excessive alcohol consumption, this study aimed to evaluate the effects of ELS on exploratory, anhedonic, risk-taking, and alcohol consumption behaviors in mice subjected to ELS induced by the maternal separation (MS) model. In this protocol, the dams were separated from the pups for 3 hours daily during the entire nursing period. After completing 60 days of life, the animals were tested to observe behavioral differences between the control group (N=16) and the stressed group (N=16). The results showed that MS could interfere with the animals' weight gain during nursing compared to the control. Stressed animals also showed greater exploratory behavior in the open field test and a greater propensity to explore the open arms of the elevated plus maze. In the anhedonic behavior, only the SM females showed a different behavior from the control; the same result was observed in alcohol consumption. With the chosen experimental protocol and the age evaluated, it was impossible to observe many differences in exploratory and risk behavior among the animals. However, what was found demonstrates that ELS can alter animals' behavior. Therefore, more research is needed to better understand to what degree ELS is capable of interfering in the life of the individual.

Keywords: Maternal separation. Risky behavior. Alcohol consumption. Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenças nas respostas normal e patológica ao estresse e estresse crônico	16
Figura 2: Regiões encefálicas relacionadas ao sistema de recompensa	19
Figura 3: Ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal pelo álcool	22
Figura 4: Representação esquemática dos grupos experimentais.....	29
Figura 5: Linha do tempo do protocolo experimental	29
Figura 6: Sequência dos testes comportamentais	31
Figura 7: Efeito do estresse precoce na atividade exploratória de camundongos adultos.....	36
Figura 8: Efeito do estresse precoce no comportamento anedônico em camundongos adultos	37
Figura 9: Efeito do estresse precoce no comportamento exploratório de camundongos adultos	39
Figura 10: Efeito do estresse precoce no consumo voluntário de álcool.....	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Parâmetros importantes no protocolo de separação materna	24
--------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do estresse precoce no peso dos animais ao longo da vida.....	34
--------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH – Hormônio adenocorticotrófico
- ANOVA – Análise de variância
- CEUA – Comitê do Uso Ético dos Animais
- CPF – Córtex pré-frontal
- CRH – Hormônio liberador de corticotrofina
- DPN – Dia pós-natal
- EPM – Erro padrão da média
- HHA – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
- i.p. – intraperitoneal
- LCE – Labirinto em cruz elevado
- OMS – Organização mundial da saúde
- PVN – Núcleo paraventricular
- SM – Separação materna
- SNA – Sistema nervoso autônomo
- UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	ESTRESSE PRECOCE	17
1.1.1	Comportamentos de risco	19
1.2	CONSUMO DE ÁLCOOL.....	21
1.3	PROTOSCOLOS EM ROEDORES PARA ESTUDO DOS EFEITOS DO ESTRESSE PRECOCE	22
1.3.1	Paradigma do material para ninho limitado.....	23
1.3.2	Protocolo da separação materna	23
1.4	JUSTIFICATIVA	26
1.5	OBJETIVOS	27
1.5.1	Objetivo Geral.....	27
1.5.2	Objetivos Específicos	27
2	MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1	ANIMAIS	28
2.2	PROTOSCOLO EXPERIMENTAL.....	28
2.2.1	Protocolo de estresse por separação materna	30
2.3	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	30
2.3.1	Comportamento exploratório	31
2.3.2	Comportamento anedônico.....	32
2.3.3	Comportamento de risco	32
2.3.4	Consumo de álcool	32
2.4	EUTANÁSIA E PROCESSAMENTO DO TECIDO CEREBRAL	33
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
3	RESULTADOS	34
3.1	PESO CORPORAL	34
3.2	COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO	35

3.3	COMPORTAMENTO ANEDÔNICO	36
3.4	AVALIAÇÃO DE RISCO	37
3.5	CONSUMO DE ÁLCOOL.....	40
4	DISCUSSÃO	41
5	CONCLUSÕES.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

A resposta fisiológica ao estresse faz parte do funcionamento normal do organismo das mais variadas espécies e é bastante conservada entre os vertebrados (ROMERO, 2004). Ela aparece em decorrência de uma ameaça real ou percebida a homeostase do indivíduo e tem como resultado a liberação de uma série de mediadores neuroendócrinos que irão atuar na reestruturação da homeostase perdida (CHROUSOS; GOLD, 1992). Além disso, uma resposta adequada a pistas ambientais está diretamente relacionada a autopreservação e ao sucesso evolutivo de uma espécie (SCHOENLE *et al.*, 2021).

As principais estruturas ativadas em resposta a um estímulo aversivo são as que compõem o Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA). A partir do momento em que um potencial estressor é identificado, esta informação é levada da amígdala até o hipotálamo - onde os neurônios do núcleo paraventricular (PVN) secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH). Este hormônio atua no lóbulo anterior da hipófise, estimulando a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que, por sua vez, atua no córtex da glândula adrenal levando a liberação de glicocorticoides - o cortisol, em humanos (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005; RUSSELL; LIGHTMAN, 2019; YARIBEYGI *et al.*, 2017).

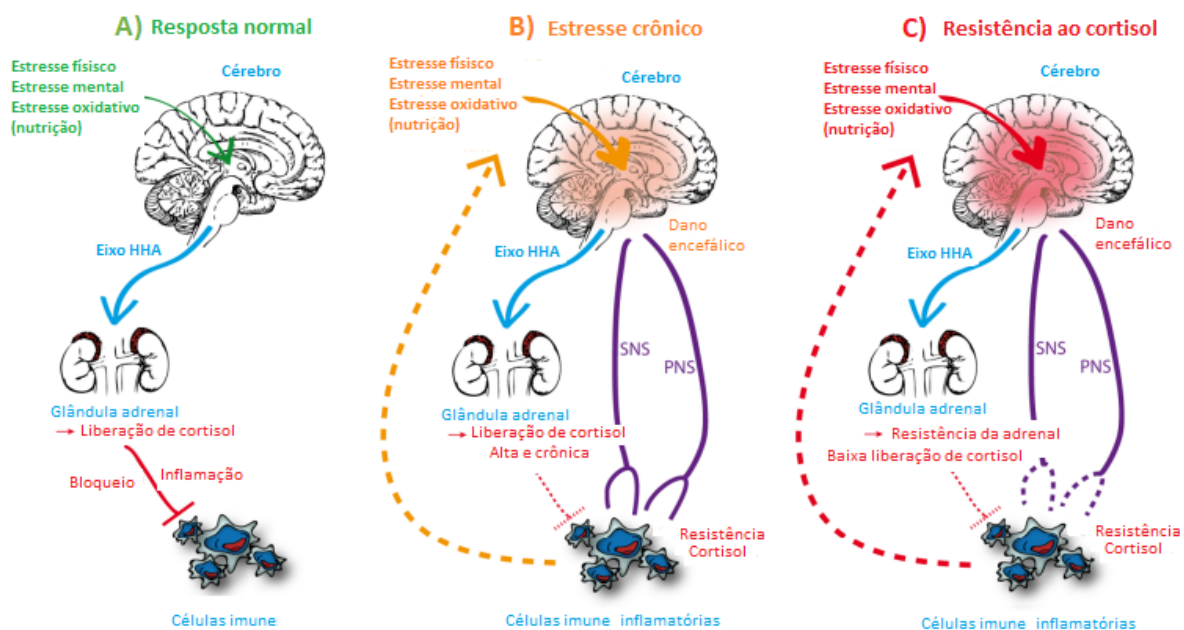
Ao mesmo tempo, o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) Simpático responde rapidamente ao estímulo estressor regulando uma série de funções importantes para uma resposta apropriada de “luta ou fuga”. A inervação direta do SNA Simpático na medula da glândula adrenal garante a liberação da adrenalina e da noradrenalina necessárias para o funcionamento cardiovascular, musculoesquelético, gastrointestinal e de qualquer outro sistema que precise estar alinhado para preservação do indivíduo (CARTER; GOLDSTEIN, 2014).

Passada a ameaça, os próprios sistemas de resposta ao estresse se autorregulam, sendo a presença do cortisol na corrente sanguínea um dos principais fatores para a inibição do funcionamento do eixo HHA, devido a presença de receptores de glicocorticoides tanto na hipófise e no hipotálamo quanto na própria glândula adrenal (RUSSELL; LIGHTMAN, 2019).

Entretanto, nem sempre esta autorregulação do eixo HHA ocorre da maneira correta. Já está bem descrito na literatura que situações de estresse crônico podem levar a uma alteração morfofisiológica das estruturas do eixo que variam desde um desbalanço na

quantidade de receptores de glicocorticoides presentes nas estruturas encefálicas ao excesso de liberação de cortisol no plasma sanguíneo (MCEWEN, 2017). A ativação exacerbada do eixo HHA está relacionada a uma série de complicações de saúde no indivíduo como doenças cardiovasculares, queda na imunidade e transtornos psiquiátricos (MARIN *et al.*, 2011; VASHIST; SCHNEIDER, 2014) (Figura 1). Também já estão descritos os efeitos do estresse crônico na neurogênese adulta. A proliferação celular e a diferenciação neuronal estão prejudicadas em indivíduos que apresentam ativação crônica do eixo HHA (OOMEN *et al.*, 2007).

Figura 1: Diferenças nas respostas normal e patológica ao estresse e estresse crônico



Legenda: Ao contrário da resposta ao estresse normal (A), em casos de estresse crônico ocorre a liberação de grandes quantidades de cortisol de maneira crônica somada a uma queda na capacidade deste hormônio de regular o funcionamento do eixo HHA (B). O resultado desta combinação pode ser extenso, resultando inclusive em dano nos tecidos do encéfalo devido a neuroinflamação (C). Adaptado de Vashista & Schneider, 2014.

As alterações fisiológicas que ocorrem no eixo HHA como resposta a uma situação estressante não são responsáveis apenas por uma maior concentração de cortisol no plasma sanguíneo, como também podem causar reestruturações permanentes no encéfalo (WALKER *et al.*, 2019).

O hipocampo é uma região encefálica relacionada a processos cognitivos como aprendizado e memória, e que também está envolvido com a resposta ao estresse (BARTSCH; WULFF, 2015). O hipocampo é ativado por diferentes estressores e possui uma alta densidade de receptores para glicocorticoides que, quando ativados, inibem a atividade do eixo HHA,

limitando a resposta ao estresse (KIM; PELLMAN; KIM, 2015). Além disso, ele também pode se tornar um alvo para os efeitos deletérios do estresse.

Ambas as substâncias, quando em excesso, são conhecidas por causar danos na arborização dendrítica, na morfologia dos espinhos dendríticos e na integridade sináptica. De fato, camundongos C57BL/6N machos que foram submetidos ao protocolo de estresse ambiental (serragem insuficiente na caixa de alojamento) do DPN2 ao DPN9 apresentaram arborização diminuída e menor densidade de espinhos dendríticos em neurônios piramidais na região CA3 do hipocampo (LIU *et al.*, 2016). Além disso, a exposição ao estresse precoce induz diminuição da neurogênese no giro denteado do hipocampo de animais de laboratório (FABRICIUS; WÖRTWEIN; PAKKENBERG, 2008).

Por milhares de anos os estressores estavam relacionados a manutenção da integridade física, proteção de território, busca por alimentos e outras atividades que expunham o indivíduo a ameaças ambientais. Entretanto, atualmente os principais eventos que desencadeiam as respostas de estresse estão relacionados ao contexto social das pessoas e a forma como elas se relacionam umas com as outras (SAPOLSKY, 2021).

Recentemente, foi possível observar os efeitos do isolamento social e de tantas outras mudanças no cotidiano das pessoas em decorrência da pandemia de COVID-19. Estudos têm demonstrado um aumento nos níveis de estresse durante os dois últimos anos, além de uma maior incidência de transtornos psiquiátricos que costumam estar relacionados ao estresse (HENSSLER *et al.*, 2021; LOADES *et al.*, 2020). Aumentou, também, a procura pelo uso de substâncias psicoativas - como o álcool - com o único intuito de buscar o seu efeito relaxante característico (KILLGORE *et al.*, 2021). Dentro deste contexto de pandemia, aumentaram também os casos de violência doméstica, brigas e desentendimentos entre familiares e pessoas que se viram forçadas a passar quase todo tempo em contato próximo no mesmo ambiente (GHOSH *et al.*, 2020; SACCO *et al.*, 2020).

1.1 ESTRESSE PRECOCE

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define estresse precoce como qualquer situação adversa enfrentada pelo indivíduo do seu nascimento até os 18 anos de idade (OMS, 2014). Pode-se considerar como situação adversa qualquer evento estressor como traumas, abusos (físico, sexual, psicológico), negligência, pobreza, violência e maus tratos diversos (OMS, 2014). Levando-se em consideração esta definição, o cenário é preocupante: ainda de

acordo com dados da OMS, aproximadamente 1 bilhão de crianças entre dois e 17 anos sofreram violência física, emocional ou sexual ou foram negligenciadas no ano de 2015 (HILLIS *et al.*, 2016). A população de pessoas dentro desta faixa etária no mesmo ano é de aproximadamente 2,3 bilhão de indivíduos, indicando que quase metade das crianças e adolescentes estão sujeitos ao estresse precoce (UNICEF, 2015).

Os principais casos de violência e de negligência ocorrem em ambiente doméstico, perpetrados pelos pais ou outros adultos responsáveis pelo bem-estar da criança. Entretanto, o ambiente escolar e comunitário também pode influenciar negativamente no desenvolvimento infantil, principalmente quando se leva em conta a incidência da prática de bullying (e também cyberbullying) pelos colegas e o contexto de violência urbana a que muitas crianças estão expostas (HILLIS *et al.*, 2016; OMS, 2014)

Já se sabe que o indivíduo que enfrenta estas situações nos estágios iniciais do seu desenvolvimento normalmente apresenta uma resposta ao estresse prejudicada, além de alterações morfofisiológicas no encéfalo capazes de perdurar ao longo de toda a sua vida (BLAIR; RAVEN, 2016; DE BELLIS, 2002). O estresse precoce, justamente por ocorrer no início da vida, acaba interferindo nos estágios iniciais do desenvolvimento e alterando, muitas vezes de forma definitiva, o funcionamento do organismo do indivíduo (YILDIZ; TANRIVERDI, 2018). A presença de glicocorticoides, neste caso o cortisol em humanos e a corticosterona em roedores, e do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) foi observada em maior quantidade no encéfalo de animais adultos que passaram pelo estresse precoce (CHEN; BARAM, 2016).

Em humanos, foi observada menor neurogênese adulta, alteração na densidade de receptores de glicocorticoides e menor arborização dendrítica no hipocampo de adultos que passaram por estresse precoce (HERZBERG; GUNNAR, 2020; MCEWEN; GIANAROS, 2010). Além disso, já se tem descrito o mal funcionamento do eixo HHA e uma diminuição na quantidade de substância cinzenta nos encéfalos desses indivíduos, além da alta incidência de transtornos psiquiátricos como ansiedade e depressão (HAIR *et al.*, 2015).

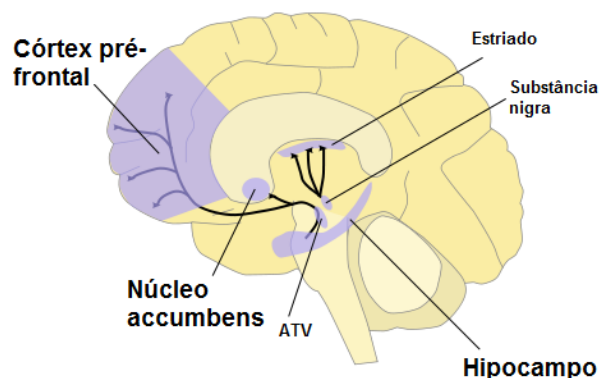
Na literatura é extensa a documentação do impacto dessas alterações fisiológicas no comportamento dos indivíduos - variando de comportamentos autodestrutivos, menor tolerância a situações adversas do dia a dia, maior vulnerabilidade ao abuso de substâncias, dificuldades de relacionamento interpessoal, dentre outros (CHOCYK *et al.*, 2013; HERZBERG; GUNNAR, 2020).

1.1.1 Comportamentos de risco

O termo comportamento de risco engloba uma série de ações “socialmente inaceitáveis com potenciais resultados negativos para os quais não foi tomada nenhuma precaução” (TURNER et al, 2004). Assim, são considerados comportamentos de risco o envolvimento em atividades criminosas, direção perigosa, violência, uso de álcool, tabaco e drogas ilícitas, dentre outros. Muito se especula os motivos que levariam uma pessoa a agir de maneira impulsiva e imprudente, principalmente quando as consequências prejudiciais de suas ações são aparentemente óbvias. Entretanto é preciso observar o processo de tomada de decisão, de avaliação de risco e, principalmente, os benefícios que aquela situação aparentemente negativa pode trazer ao indivíduo.

A adoção de comportamentos de risco é alimentada pela resposta, normalmente social, que é recebida. Regiões encefálicas relacionadas ao sistema de recompensa, como o núcleo accumbens, e ao processo de tomada de decisão e de avaliação de risco, como o córtex pré-frontal são ativadas nestes momentos (AMBROSIA et al, 2018) (Figura 2). Estudos realizados com adolescentes demonstraram uma ligação entre maus tratos na infância e desenvolvimento de comportamentos de risco na adolescência (NEGRIF, 2017). Esta pesquisa mostrou que o primeiro comportamento de risco a aparecer entre os jovens foi o sexual, seguido de delinquência e de uso de substâncias.

Figura 2: Regiões encefálicas relacionadas ao sistema de recompensa



Legenda: Alterações no funcionamento do sistema de recompensa estão relacionadas com o desenvolvimento de comportamentos de risco, principalmente relacionados ao abuso de substâncias. Fonte: adaptado de Halber, 2018.

O córtex pré-frontal (CPF) é a região do encéfalo responsável pelo processo de análise e de tomada de decisão. É a última região do encéfalo a finalizar seu desenvolvimento,

atingindo total maturação no início da fase adulta nos indivíduos (WOO *et al.*, 2021). Por ter este desenvolvimento mais tardio, o CPF é particularmente vulnerável a fatores ambientais presentes na vida da criança/adolescente (MACKEY; RAIZADA; BUNGE, 2014). Estudos de neuroimagem demonstraram volume reduzido no CPF medial de indivíduos que sofreram com estresse precoce, além de diminuição na atividade neuronal e da plasticidade sináptica nesta região (CHOCYK *et al.*, 2013).

Essas alterações estão relacionadas ao desenvolvimento de transtornos de ansiedade, a uma resposta mal adaptativa a outras situações estressoras e a alterações nos comportamentos de análise e tomada de decisões, que acabam deixando o indivíduo vulnerável a comportamentos de risco (CHOCYK *et al.*, 2013; WEMM; SINHA, 2019).

Dos comportamentos de risco citados anteriormente, o abuso de drogas talvez seja o que tenha mais evidência de correlação com o estresse precoce. Estudos têm demonstrado a relação entre a vivência destas adversidades na infância - o estresse precoce - e a dependência de álcool (ENOCH, 2011). Um estudo realizado com 3592 adultos sobre os seus hábitos de consumo de bebidas alcoólicas e histórico de estresse precoce mostrou que a média de idade de início de ingestão de álcool foi menor nas pessoas com experiências traumáticas (ROTHMAN *et al.*, 2008). Enquanto a maioria dos participantes respondeu que bebe para socializar e para se sentir bem, cerca de 10% afirmou fazer uso do álcool para “lidar com problemas e com o estresse”. Foi observado pelos pesquisadores que pessoas com histórico de estresse precoce apresentavam mais chances de utilizar o álcool para enfrentar as dificuldades.

Pilowsky e colaboradores (2009) demonstraram associação entre eventos traumáticos ocorridos na infância e adolescência com maior frequência de beber pesado episódico e início precoce do consumo de bebidas alcoólicas. Esta pesquisa, que entrevistou e investigou os comportamentos de jovens adultos, salientou que a vivência de dois ou mais eventos traumáticos aumentou a propensão de dependência de álcool na vida adulta em 1/3. A cronicidade e severidade destes episódios também foram associadas ao risco de recaídas em pacientes mulheres que estavam em tratamento para adição em cocaína (HAYMAN *et al.*, 2008).

Na literatura é possível encontrar estudos mostrando a relação entre o estresse precoce causado pela negligência parental com uma maior incidência de transtornos psiquiátricos como ansiedade, depressão, transtorno bipolar, de estresse pós-traumático e uso de drogas de abuso (NEMEROFF, 2016).

1.2 CONSUMO DE ÁLCOOL

Alcoolismo é um dos transtornos mentais mais comuns no mundo, com prevalência ao longo da vida de 29,1% - segundo critérios do Manual de Diagnóstico e Estatística 5 (DSM5, sigla em inglês) (GRANT et al, 2015), que causa consequências devastadoras para o indivíduo afetado, para sua família e a sociedade em geral. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2018) a cada ano três milhões de pessoas morrem como consequência direta do consumo abusivo de álcool, representando um total de 5,3% de total de pessoas mortas neste período. Além das mortes, o álcool está relacionado ao desenvolvimento de mais de 200 doenças, ferimentos e lesões, totalizando 5,1% da carga ocupacional e financeira dos sistemas de saúde.

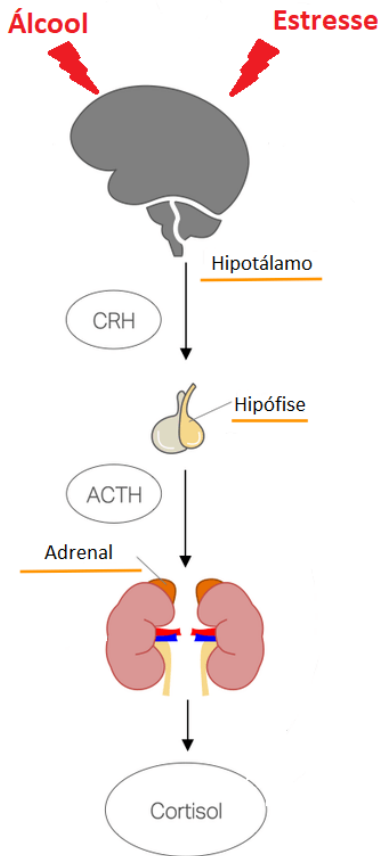
No Brasil, o consumo de álcool foi responsável por 2,9% do total de internações hospitalares no ano de 2018, somando mais de 45 milhões de reais em despesas de saúde (CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL, 2020). Mais de 70 mil óbitos registrados em 2017 tem relação com o álcool, a maioria relacionado a acidentes de trânsito, violência e problemas de saúde agravados pela bebida. A região Sul é a que apresenta maior proporção de internações por álcool no país, 3,4% do total – maior, inclusive, que a média nacional; 45,1% dos adultos fazem uso de bebidas alcoólicas e aproximadamente 1/3 deste grupo é bebedor abusivo.

Florianópolis é a terceira capital com maior frequência de consumo abusivo de bebidas alcoólicas entre homens (31%) e a quarta entre mulheres (14%). Ainda na capital, 12,1% das pessoas admitiu conduzir veículo após a ingestão de álcool (BRASIL, 2018) A herdabilidade do alcoolismo é de cerca de 50%, indicando que as influências genéticas e ambientais no consumo de álcool são igualmente importantes (GOLDMAN et al. 2005). Portanto, entender os fatores ambientais que podem influenciar o consumo de álcool pode ajudar na prevenção e no controle da ingestão e como consequência diminuir os impactos negativos dessa doença.

Além de levar ao desenvolvimento do comportamento de busca e consumo de álcool, o estresse também é um fator importante a ser considerado na recaída de pacientes em tratamento para transtornos relacionados ao uso de álcool. Isso porque tanto o estresse quanto o uso crônico de álcool induzem alterações no eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e no córtex pré-frontal capazes de deixar o indivíduo mais sensível a pistas ambientais e, assim,

mais propenso a retornar aos hábitos de busca e consumo de álcool (BLAINE *et al.*, 2017)BLAINE et al, 2015) (Figura 3).

Figura 3: Ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal pelo álcool



Legenda: Assim como um estímulo estressor, o álcool é capaz de ativar o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal.
Fonte: adaptado de Lindemann, 2016.

1.3 PROTOCOLOS EM ROEDORES PARA ESTUDO DOS EFEITOS DO ESTRESSE PRECOCE

Com o intuito de conseguir avaliar os efeitos do estresse precoce controlando a maior quantidade possível de variáveis, foram desenvolvidos protocolos em animais que tentam mimetizar situações estressoras e seus possíveis efeitos nos animais. De maneira geral, a intervenção é feita na mãe e os efeitos são observados em diferentes estágios da vida da prole. Muitas variações podem ser encontradas na literatura, mas os modelos mais comumente utilizados consistem na limitação da quantidade de material para ninho e da separação materna.

1.3.1 Paradigma do material para ninho limitado

Neste modelo a quantidade de maravalha usada para forrar a caixa de acrílico onde vivem os animais é reduzida drasticamente – em alguns protocolos pode chegar a ser retirada totalmente (GALLO *et al.*, 2019). A quantidade adequada de maravalha é importante para o bem-estar dos animais, uma vez que esta contribui para a manutenção da temperatura interna da caixa, absorve fezes e urina, aumentando o conforto dos animais. Além disso, quando a fêmea está prenha, ela também utiliza a maravalha na formação do ninho, comportamento normal de roedores (BLOM *et al.*, 1996).

Este protocolo usa a escassez de um material básico para a sobrevivência e o bem-estar dos animais para mimetizar uma situação de pobreza extrema, na qual a mãe e prole não teriam condições mínimas de sobrevivência e conforto (PERRY *et al.*, 2019). A falta de material básico para formação do ninho é suficiente para estressar a mãe e causar a fragmentação do cuidado com os filhotes; essa alteração no seu comportamento resulta no aumento do comportamento tipo-ansioso na prole em ratos (IVY *et al.*, 2008). Yang e colaboradores (2016) demonstraram que a redução de 3/4 do material na caixa dos animais resultou em menor arborização dendrítica do hipocampo da prole.

1.3.2 Protocolo da separação materna

O modelo utilizado neste estudo foi o da separação materna – que separa mãe e filhotes durante um período sensível do desenvolvimento. Este modelo animal de estresse precoce tem sido utilizado em estudos pré-clínicos para mimetizar um fator ambiental que gera alterações fisiológicas e comportamentais no indivíduo (ROMANO-LÓPEZ *et al.*, 2016). Isso porque nas primeiras semanas de vida dos roedores, a interação da mãe com os filhotes é responsável pela manutenção da temperatura corporal, desenvolvimento dos sentidos, além da fonte de alimento através da amamentação (BURENKOVA *et al.*, 2020). Qualquer interrupção neste processo pode levar a alterações no neurodesenvolvimento da prole, além de possíveis prejuízos decorrentes da interrupção da amamentação (KOSTEN; KEHOE, 2010).

Assim, durante o período de amamentação é essencial que a ninhada seja perturbada o mínimo possível a fim de garantir o pleno desenvolvimento dos filhotes. Dentro das regras de cuidado de experimentação animal, o único momento em que se deve interferir em uma ninhada é durante a limpeza e manutenção das caixas (BURN; PETERS; MASON, 2006).

Existem diversas variações neste protocolo, com resultados diferentes entre eles. No Quadro 1 é possível observar algumas das diferentes formas de intervenção:

Quadro 1: Parâmetros importantes no protocolo de separação materna

Período da intervenção	Primeiros 14 dias <small>Kim et al, 2015</small>	Últimos 14 dias <small>Horii-Hayashi et al, 2013</small>	Todo período de amamentação <small>Zhang et al, 2014</small>
	15 minutos <small>Wei et al, 2014</small>	3 horas <small>van Heerden et al, 2010</small>	Um único período de 24 horas <small>Derks et al, 2016</small>
	Removida da caixa moradia <small>Alcántara-Alonso et al, 2017</small>	Mantida na caixa moradia original (remoção dos filhotes) <small>Yoo et al, 2013</small>	
Filhotes	Não manipulados <small>Daskalakis et al, 2014</small>	Manipulados brevemente <small>Schwarz et al, 2011</small>	Mantidos juntos <small>Dandi et al, 2018</small>
	Manipulados por um tempo definido como parte do protocolo <small>Castelli et al, 2020</small>		Mantidos separados <small>Zhang et al, 2013</small>

Legenda: Algumas das possibilidades de interferências do contato mãe/filhotes no período de amamentação. Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Com frequência, filhotes que passam por algum tipo de alteração no tempo de contato com a mãe durante o período de amamentação apresentam alterações comportamentais nos estágios seguintes de vida (KOSTEN; LEE; KIM, 2006). Aumento no comportamento tipo-ansioso e maior consumo de álcool foi relatado em camundongos C57BL/6, adolescentes machos e fêmeas, submetidos a um protocolo de separação materna (MAGALHÃES et al., 2017). Ainda, Portero-Tresserra e colaboradores (2018) observaram que camundongos C57BL/6 adolescentes machos que passaram várias horas por dia separados da mãe durante o período de amamentação apresentaram menor atividade nas regiões encefálicas relacionadas ao sistema de recompensa e um maior consumo de álcool.

Em roedores, é possível analisar a atividade locomotora para exploração em um ambiente novo como uma forma de aferir o comportamento de risco desses animais

(LUKKES, 2017). Flagel e colaboradores (2010) conseguiram observar, em ratos adultos e seletivamente criados para expressar altos e baixos comportamentos de exploração, uma relação entre um maior comportamento exploratório e uma maior tendência ao abuso de substâncias aditivas. O estresse também interfere na atividade locomotora dos animais. Camundongos BALB/c e C57BL/6J jovens, depois de repetidas experiências no aparato de estresse por contenção, apresentaram maior comportamento exploratório no labirinto em cruz elevado e menos tempo imóveis no nado forçado (SADLER; BAILEY, 2016)

O cenário descrito acima mostra a importância dos estudos que visam compreender os desdobramentos do estresse precoce e os impactos que este pode gerar ao longo da vida do indivíduo. Assim, a hipótese deste trabalho é que animais expostos ao estresse precoce apresentam um maior comportamento exploratório, anedônico, de risco e de consumo de álcool.

1.4 JUSTIFICATIVA

O consumo excessivo de álcool é o fator causal de uma série de doenças, além de estar relacionado à ocorrência de acidentes e desenvolvimento de transtornos psiquiátricos. Sabe-se que fatores genéticos e ambientais podem alterar o padrão de consumo de álcool. No entanto, os mecanismos e a contribuição exata desses fatores ainda não são completamente compreendidos. Justamente por isso o tema dessa pesquisa é de extrema relevância para a comunidade científica.

Um dos fatores ambientais capazes de modular o comportamento humano em relação ao consumo de drogas de abuso é o estresse – principalmente o estresse precoce, capaz de gerar alterações morfofisiológicas permanentes no indivíduo. O protocolo experimental proposto neste estudo visa entender como o estresse precoce pode influenciar o consumo de álcool.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Avaliar os comportamentos exploratório, de risco e de consumo de álcool em camundongos que foram submetidos ao estresse precoce induzido pelo modelo de separação materna.

1.5.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do estresse precoce:

- No comportamento exploratório;
- No comportamento anedônico;
- Na avaliação de risco;
- No consumo voluntário de álcool.

2 MATERIAL E MÉTODOS

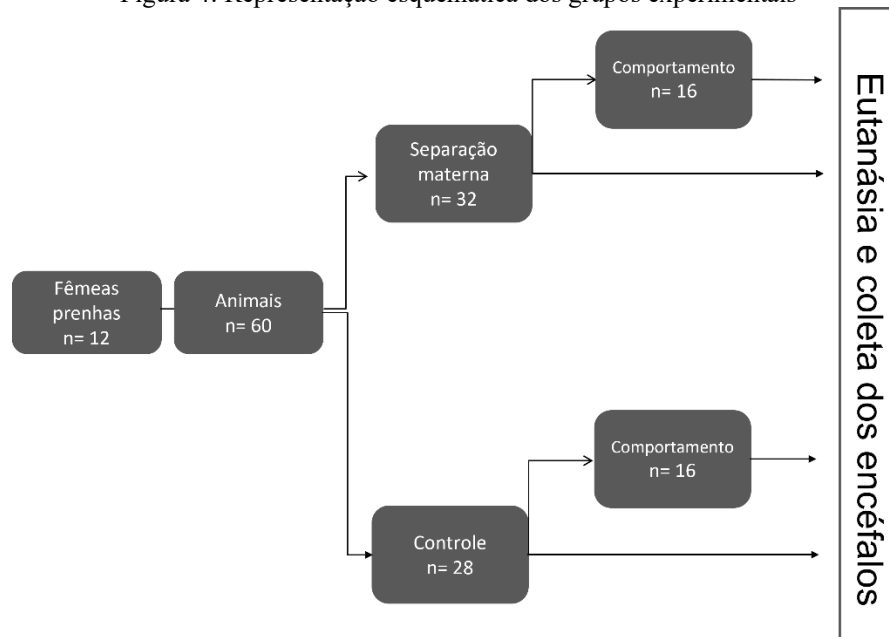
2.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6, machos e fêmeas, adultos jovens com idade aproximada de 60 dias, provenientes de 12 fêmeas prenhas provenientes da colônia mantida no Biotério Setorial do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos neste mesmo Biotério durante todo o período de experimentação. As condições do ambiente são controladas, com temperatura de 20-22° C, ciclo claro/escuro de 12 horas (7-19h) e livre acesso à água filtrada e ração (NUVITAL – Nuvilab CR1) proveniente do Biotério Central da UFSC. Todas as manipulações foram realizadas no período entre 9 e 17 horas. O dia do nascimento dos filhotes foi designado dia pós-natal zero (DPN0) e eles não foram manipulados até o dia seguinte (DPN1), quando foi dado início o protocolo de separação materna. No DPN21, os filhotes foram desmamados, separados por sexo e alocados em caixas plásticas opacas (41x34x16) em duplas. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê do Uso Ético dos Animais da UFSC (CEUA/UFSC) sob número de protocolo CEUA 2850080221. Todos os esforços foram realizados para minimizar ou evitar o sofrimento dos animais.

2.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O máximo de 02 machos e 02 fêmeas por ninhada por grupo experimental foi utilizado. Os animais foram divididos em dois grandes grupos com 16 animais cada: 1) Controle e 2) Separação materna (DPN1 ao DPN21). Como, em média, cada fêmea teve seis filhotes, alguns animais não puderam ser alocados nos grupos experimentos a fim de evitar viés de ninhada. Desta forma, estes animais não passaram pelos testes comportamentais, foram eutanasiados junto com os demais, e tiveram seus encéfalos retirados para análises posteriores. Para as análises de Neurogênese e Sinaptogênese, que serão realizadas posteriormente, foi necessário subdividir estes grupos, uma vez que as técnicas necessitam de preparações distintas (Figura 4).

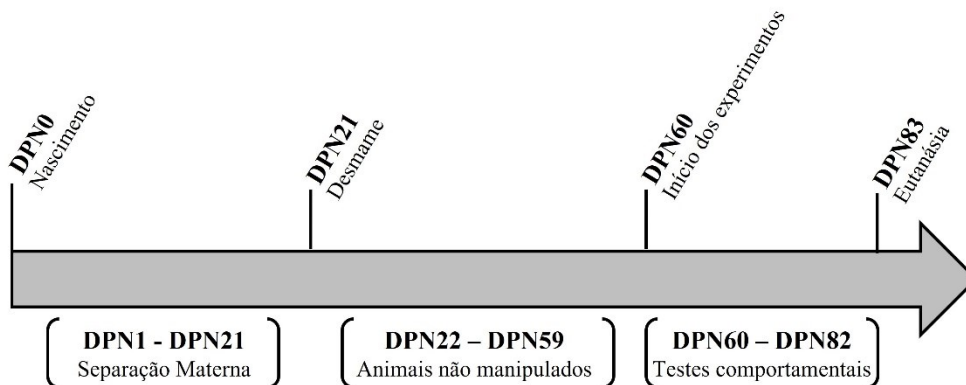
Figura 4: Representação esquemática dos grupos experimentais



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A partir do DPN60, idade que corresponde ao adulto jovem em humanos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais para avaliação do comportamento exploratório, anedônico, de risco e de consumo de álcool. Vinte e quatro horas após o término dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados e os encéfalos foram coletados – conforme figura 5.

Figura 5: Linha do tempo do protocolo experimental



Legenda: Linha do tempo dos experimentos a serem realizados nos animais. Fonte: elaborado pela autora, 2020.

2.2.1 Protocolo de estresse por separação materna

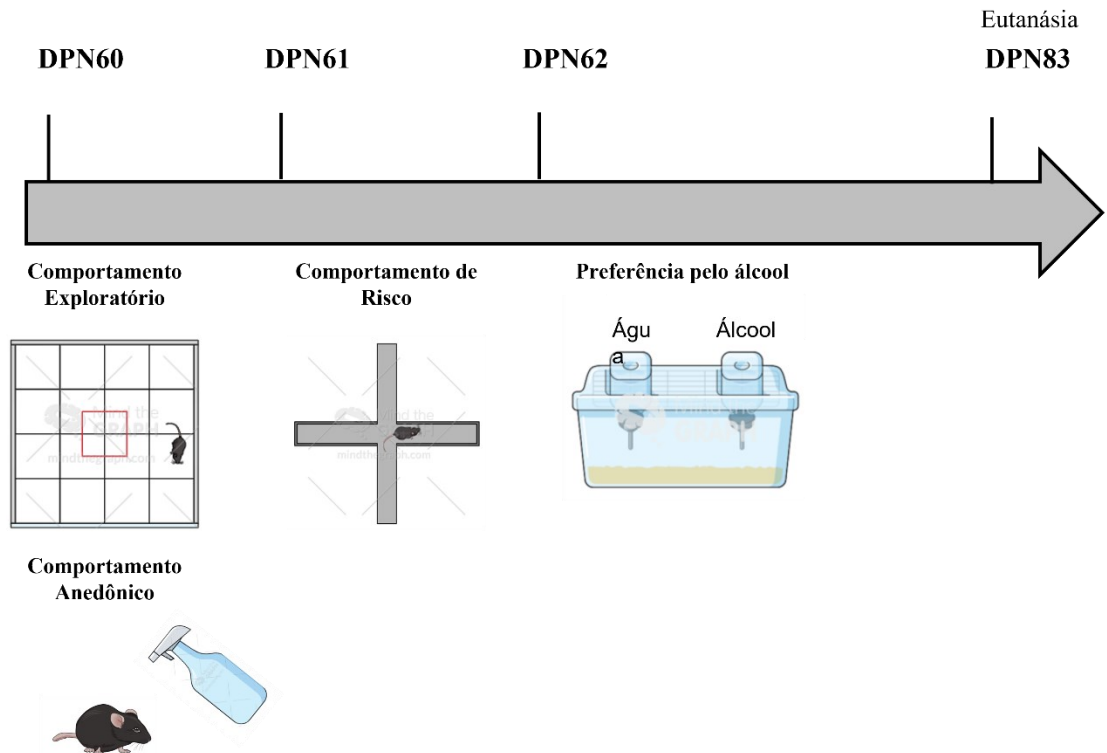
Metade dos animais utilizados nesta pesquisa foi submetida ao protocolo de separação materna. Levando-se em consideração os estudos realizados por Schmidt e colaboradores (2003) acerca da baixíssima liberação de corticosterona nos primeiros dias de vida dos animais, da revisão de Faturi e equipe (2009) mostrando a influência de outros mediadores durante esta fase e também do que foi discutido por Kosten e equipe (2012) em relação à manipulação dos filhotes, foi elaborada uma metodologia de separação materna diferenciada – unindo estas abordagens.

Assim, ninhadas inteiras foram escolhidas aleatoriamente para serem submetidas ao protocolo de separação materna do DPN1 ao DPN21 por 3 horas por dia, enquanto as ninhadas controle não foram perturbadas. As mães das ninhadas separação materna foram cuidadosamente removidas da caixa que dividiam com seus filhotes e colocadas em outra caixa individualmente e longe de suas ninhadas a fim de evitar qualquer tipo de comunicação. Passadas as três horas, as mães foram devolvidas às suas caixas originais. No DPN21, todos os filhotes foram desmamados da mãe, separados por sexo e alojados em duplas por caixa.

2.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Do DPN60 ao DPN82 foram aplicados quatro testes comportamentais a fim de observar possíveis alterações decorrentes da aplicação do protocolo de estresse precoce. Os testes consistiram na análise de quatro tipos de comportamento: exploratório, anedônico, de risco e de preferência pelo álcool. Na aplicação dos testes foi considerada a aversividade dos mesmos, mantendo-se a ordem do menos aversivo para o mais aversivo, conforme figura 6.

Figura 6: Sequência dos testes comportamentais



Legenda: Abreviaturas – Dia pós-natal DPN. Fonte: elaborado pela autora, 2022.

2.3.1 Comportamento exploratório

O primeiro teste aplicado nos animais foi para avaliar o comportamento exploratório, realizado no aparato Campo Aberto - uma caixa quadrada com medidas de 50x50 cm. Os animais foram colocados no centro do aparato e deixados para explorar livremente o novo ambiente por cinco minutos, conforme proposto por Bondar e colaboradores (2018).

A distância total percorrida no aparato, a quantidade de tempo passado no centro e na periferia assim como a distância percorrida nessas duas áreas foram contabilizadas através do software Any-maze (Stoelting, EUA- versão 4.99m). Um maior tempo passado nas regiões centrais do aparato e uma maior distância total percorrida estão relacionados a um maior comportamento exploratório.

2.3.2 Comportamento anedônico

Ainda no DPN60 foi avaliado o comportamento anedônico dos animais através do teste da borrifada de solução de sacarose 10%, adaptado do protocolo proposto por Ducottet & Belzung (2004). Uma solução de sacarose a 10% foi borrifada na região dorsal do camundongo e, em seguida, o mesmo foi colocado em um cilindro transparente para análise do comportamento de autolimpeza – comportamento normal dos roedores para manutenção da higiene e da aparência dos pelos. O sabor palatável da solução de sacarose serve como estímulo extra ao comportamento de autolimpeza. A latência para o início do comportamento de autolimpeza e o tempo total de autolimpeza foram registrados por um período de 5 minutos e tomados como um índice de anedonia.

2.3.3 Comportamento de risco

Dando continuidade ao protocolo experimental, no DPN61 os animais passaram pelo Labirinto em Cruz Elevado (LCE) com o intuito de avaliar o comportamento de risco dos indivíduos. O aparato consiste em dois braços abertos nas laterais e dois fechados, em forma de cruz. O animal foi colocado de frente para um dos braços fechados e deixado livre para explorar por cinco minutos, conforme descrito em Lalonde & Strazielle (2008). Com o auxílio do software Any-maze (Stoelting, EUA- versão 4.99m), foram contabilizados os tempos nos braços abertos, nos fechados e a quantidade de vezes que o animal cruzou o centro do aparato. Os movimentos de “olhar para baixo” (head dip) no braço aberto e a postura esticada antes de entrar no braço aberto (stretched attend posture) – ambas relacionadas ao comportamento exploratório, foram contabilizados manualmente. Estes comportamentos são considerados de avaliação de risco e um maior tempo passado nos braços abertos demonstra maior comportamento de risco daquele indivíduo (WALF & FRYE, 2007).

2.3.4 Consumo de álcool

Neste teste foi avaliada a preferência pelo álcool em livre escolha, onde os animais tinham a disposição duas garrafas: uma com água filtrada e outra com álcool (10% na primeira semana para habituar o paladar dos animais e 20% nas duas semanas seguintes), conforme descrito por Canicella e colaboradores (2014) – adaptado para camundongos. As

garrafas ficaram disponíveis nesta configuração 24 horas por dia em dias alternados (um dia com garrafas contendo água e álcool e no outro, água e água) por três semanas (dos DPN62 ao DPN82). Este período sem acesso ao álcool serve para mimetizar o consumo ocasional seguido de abstinência e acaba gerando maior procura por parte dos indivíduos.

No início e no final das 24 horas, as garrafas foram pesadas a fim de contabilizar o consumo dos animais. Os animais estavam acondicionados em duplas desde o momento do desmame. Assim, o consumo individual foi estabelecido como a metade do total consumido pela dupla. O experimento é realizado desta forma a fim de evitar estresse por isolamento, o que resultaria em um maior consumo de álcool, conforme descrito na literatura (CARNICELLA, 2014). A fim de evitar viés de preferência por lado, as garrafas de álcool serão colocadas em posições alternadas em cada dia de experimento.

2.4 EUTANÁSIA E PROCESSAMENTO DO TECIDO CEREBRAL

Aos 83 dias de idade, os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) com cetamina (100 mg/Kg,) e xilazina (10 mg/Kg) e perfundidos com solução salina 0,9%, seguida de paraformaldeído (PF) 4% ou apenas com solução salina 0,9% - dependendo da análise a ser realizada. Os encéfalos foram removidos da calota craniana e armazenados adequadamente para futuras análises imuno-histoquímicas para proliferação e diferenciação celular, e também para avaliação da arborização dendrítica através da técnica de Golgi.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o software estatístico GraphPad Prism versão 8.0.2 para Windows (La Jolla, Califórnia, EUA). Os outliers foram identificados pelo teste de Grubbs e removidos das análises. Para verificar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Para a análise do peso da prole, as diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas através de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. Os dados dos testes comportamentais foram avaliados por ANOVA de duas vias (sexo e estresse); quando nenhum efeito significativo do sexo foi obtido ($p > 0,05$), os dados de machos e fêmeas foram agrupados e analisados através do teste t de student. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M). Foi utilizado um intervalo de confiança de 95%, sendo que um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 PESO CORPORAL

O peso corporal dos filhotes foi medido em três momentos: no desmame (DPN21), no início do protocolo experimental (DPN60) e no dia da eutanásia (DPN83). Foi possível observar que os animais ganharam peso ao longo da vida, principalmente no período entre o desmame e o início da vida adulta (Tabela 2). Entre o início da vida adulta e a eutanásia os pesos se mantiveram estáveis.

Tabela 1: Efeito do estresse precoce no peso dos animais ao longo da vida

Grupo		DPN21	DPN60	DPN83
Machos	Controle	8,87±0,83	21,88±0,1,55	22,63±1,59
	Separação materna	7,62±0,74*	23±0,92	22,25±1,58
Fêmeas	Controle	9,37±0,74	20,25±1,38	20±1,41 [#]
	Separação materna	7,87±0,64**	20,25±0,70 ^{###}	20,50±1,19 ^{##}

As análises estatísticas deste experimento foram realizadas por ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo teste de Turkey. Os valores estão expressos em média ± E.P.M. (8 animais/grupo). *p<0,05 e **p<0,01 comparação do grupo estressado com o grupo controle; ^{##}p<0,01 e ^{###}p<0,001 comparação dos machos e fêmeas do mesmo grupo. DPN, dia pós-natal.

Foi possível observar uma diferença significativa entre os pesos dos machos em relação as fêmeas nos DPN60 [F (7, 21) = 9,363; p=0,0018] e DPN83 [F (7, 21) = 5,883; p<0,0178]. No início da vida adulta, foi os pesos dos machos e das fêmeas controle não diferiram, entretanto, quanto analisados os pesos dos animais que passaram pela separação materna, os resultados foram diferentes (p<0,001). No momento da eutanásia, os pesos de machos e fêmeas diferiram tanto entre os controles (p<0,05) quanto entre os estressados (p<0,01). Essa diferença não foi observada no momento do desmame [F(7,21)=9,860; p=0,0001]. Nesta fase, foi possível notar que os animais estressados não ganharam tanto peso quanto os animais controle, tanto os machos (p<0,05) quanto as fêmeas (p<0,01).

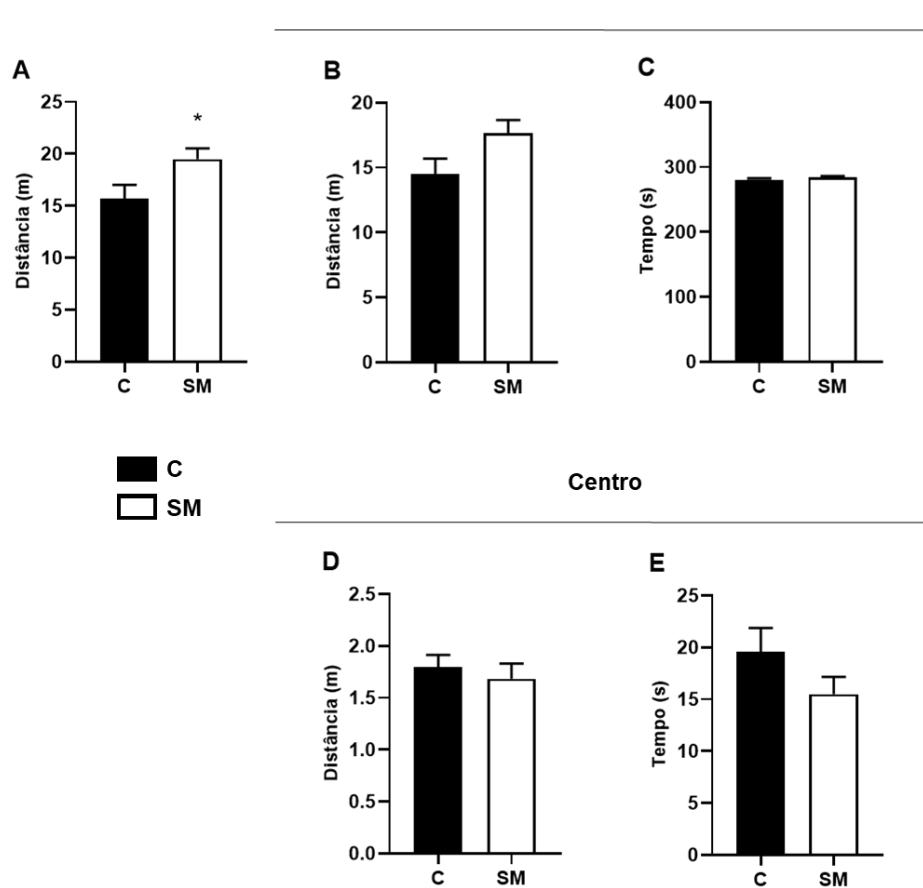
3.2 COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO

O comportamento exploratório dos animais foi avaliado através do teste do Campo aberto (Figura 7). Diferenças significativas não foram observadas entre os sexos nos parâmetros relacionados à atividade exploratória com a ANOVA de duas vias {distância total percorrida [$F(1, 24) = 0,001994$, $p=0,9648$], distância percorrida na periferia [$F(1, 24) = 0,003427$, $p=0,9538$], tempo na periferia [$F(1, 24) = 0,02417$, $p=0,8778$], distância percorrida no centro [$F(1, 24) = 0,08477$, $p=0,7734$] tempo no centro [$F(1, 24) = 0,02417$, $p=0,8778$]}. Assim, os dados dos machos e das fêmeas foram agrupados e analisados através do teste t de student com correção de Welch.

Foi observada uma diferença significativa entre os grupos controle e estressado quando avaliada a distância total percorrida no aparato ($p<0,05$) (Figura 7A). O grupo estressado percorreu uma distância total maior do que o controle no aparato. Apesar de não ter apresentado significância, a diferença entre os grupos na avaliação da distância percorrida e no tempo de permanência na periferia indica que o grupo estressado apresentou uma maior atividade exploratória desta área, uma vez que caminhou mais que o controle mesmo tendo passado tempo similar na área (Figuras 7B e C).

A distância percorrida e o tempo no centro do aparato não apresentaram diferença significativa entre os dois grupos (Figuras 7D e E). Com esses dados foi possível observar que o grupo estressado percorreu uma distância total maior e que grande parte desta atividade foi realizada na área periférica do aparato.

Figura 7: Efeito do estresse precoce na atividade exploratória de camundongos adultos



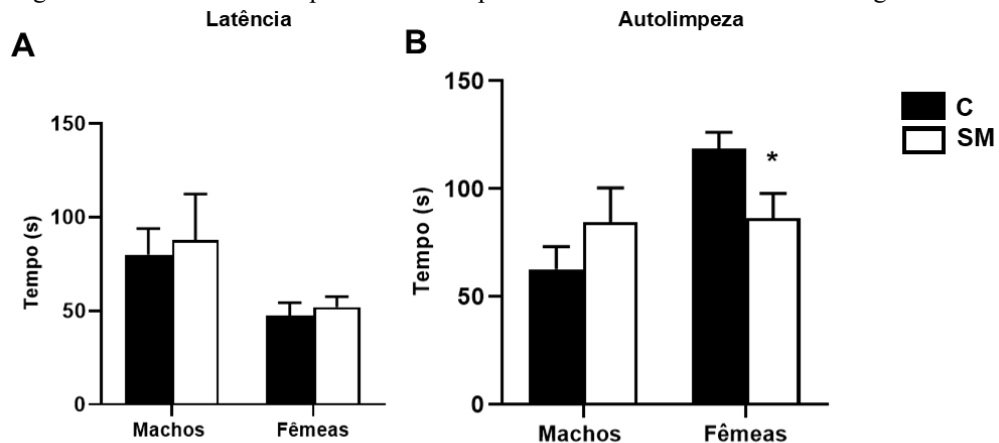
Legenda: Distância total percorrida no aparato (A). Distância percorrida na periferia (B) e tempo passado na periferia (C). Distância percorrida no centro (D) e tempo passado no centro (E). * $p < 0,05$ representando diferença entre os grupos controle e estressado. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. C, controle; SM, separação materna.

3.3 COMPORTAMENTO ANEDÔNICO

A presença do comportamento anedônico nos animais foi observada utilizando o teste da borrifada com solução de sacarose 10% (Figura 8). Com relação ao tempo de latência para início do comportamento de autolimpeza, não foram observadas diferenças significativas entre os sexos com a ANOVA de duas vias [$F(1, 24) = 0,01124, p = 0,9164$].

Já no tempo total do comportamento de autolimpeza foi observada diferença entre os grupos [$F(1, 24) = 5,261, p = 0,0309$]. Entre os machos, não houve diferença significativa. As fêmeas estressadas totalizaram um tempo menor quando comparada as do grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 8: Efeito do estresse precoce no comportamento anedônico em camundongos adultos



Legenda: Latência para início do comportamento de autolimpeza (A). Tempo total de autolimpeza (B) * $p < 0,05$ representando diferença entre as fêmeas dos grupos controle e estressado. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. C, controle; SM, separação materna.

3.4 AVALIAÇÃO DE RISCO

O comportamento de avaliação de risco é comumente observado em roedores e pode ser exemplificado no momento de hesitação antes do animal explorar em um ambiente novo – quando ele avalia os possíveis riscos de seguir por aquele caminho (YANG *et al.*, 2022). O padrão de exploração do labirinto em cruz elevado foi avaliado a fim de se mensurar a avaliação de risco e a consequente tomada de decisão dos animais (Figura 9).

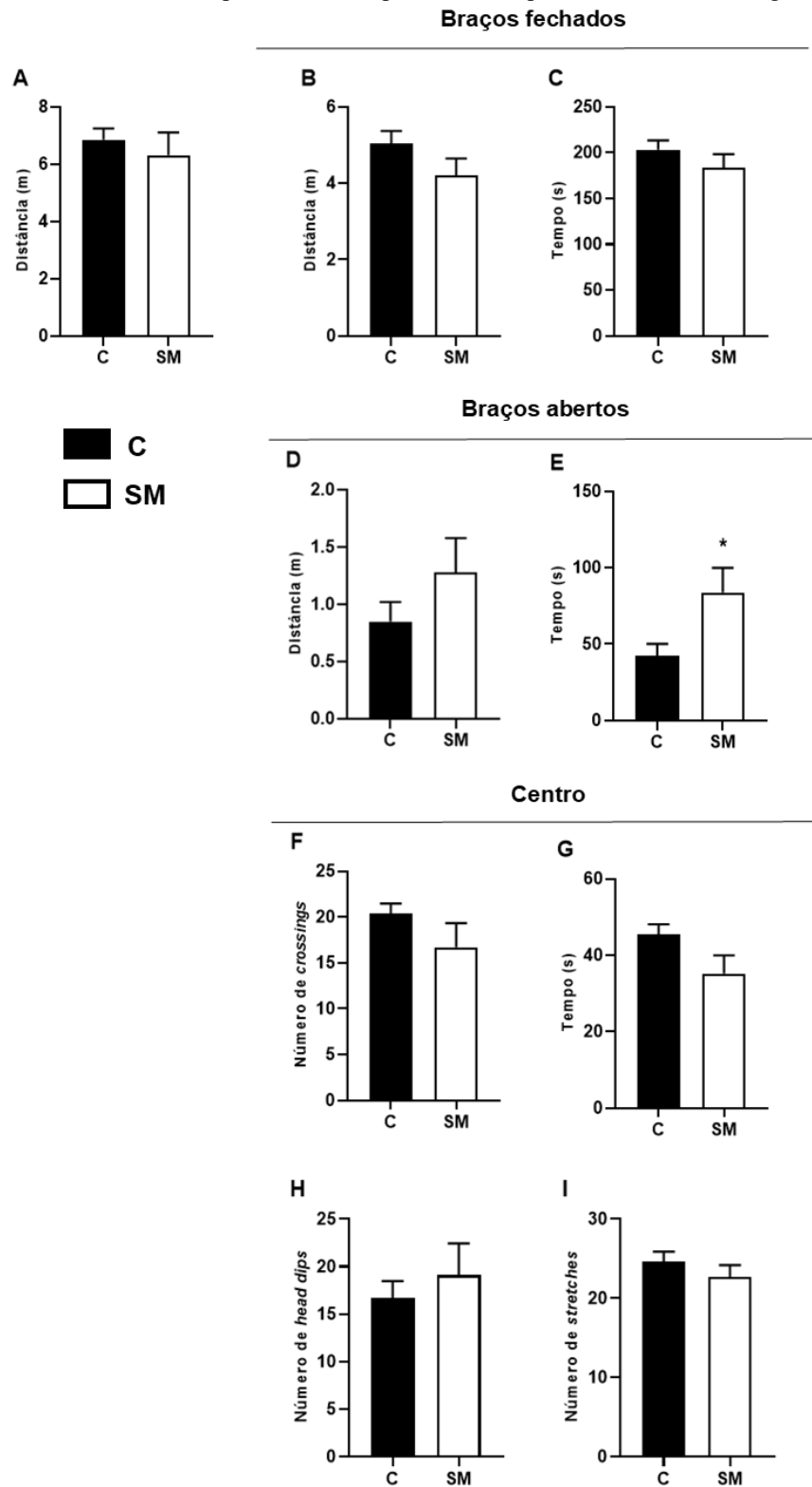
Diferenças significativas não foram observadas entre os sexos em nenhum dos parâmetros avaliados com a ANOVA de duas vias {distância total percorrida no aparato [F(1, 24) = 0,04893, $p=0,8268$], distância percorrida nos braços fechados [F(1,24)= 0,1582, $p=0,6943$], tempo nos braços fechados [F(1,24)= 0,1138, $p=0,7388$], distância percorrida nos braços abertos [F(1,24)= 0,0005777, $p=0,9810$], tempo nos braços abertos [F(1,24)=0,1944, $p=0,6632$], número de crossings [F(1,24)= 0,2091, $p=0,6516$], tempo no centro [F(1,24)= 0,1816, $p=0,6738$], número de *head dips* [F(1,24)= 0,4155, $p=0,5253$], número de *stretches* [F(1,24)= 1,956, $p=0,1748$]}. Portanto, os dados dos machos e das fêmeas foram agrupados e analisados através do teste t de student com correção de Welch.

Os parâmetros de distância total percorrida, distância e tempo nos braços fechados não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 9 A, B e C). Já o comportamento dos animais nos braços abertos diferiu entre os grupos controle e estressado. A distância percorrida, apesar de não apresentar significância estatística, foi maior pelo grupo

estressado; os animais que passaram pelo estresse precoce passaram mais tempo explorando os braços abertos ($p < 0,05$) (Figura 9 D e E).

O número de vezes que os animais atravessaram o centro e o tempo gasto no centro do aparato não apresentou diferença significativa entre os dois grupos (Figuras 9F e G). O mesmo resultado foi observado na quantificação dos movimentos *head dips* e *stretches* (Figura 9 H e I).

Figura 9: Efeito do estresse precoce no comportamento exploratório de camundongos adultos

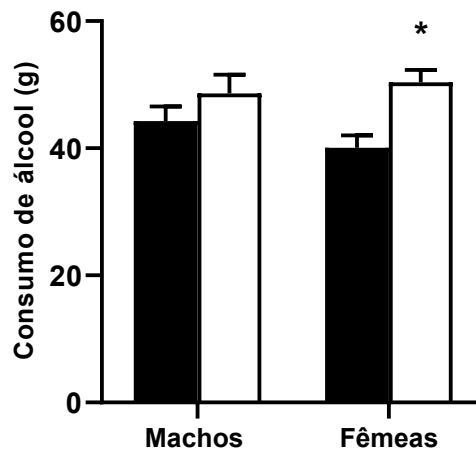


Legenda: distância total percorrida no aparato (A). Distância percorrida nos braços fechados (B) e tempo passado nos braços fechados (C). Distância percorrida nos braços abertos (D) e tempo passado nos braços abertos (E). Número de vezes que o animal cruzou o centro (F) e tempo passado no centro (G). Número de movimentos head dip (H) e stretch (I). * $p < 0,05$ representando diferença entre os grupos controle e estressado. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. C, controle; SM, separação materna.

3.5 CONSUMO DE ÁLCOOL

Com relação ao consumo de álcool, foi observado que o estresse foi capaz de induzir uma maior ingestão por parte dos animais (Figura 10). Foram observadas diferenças significativas no consumo com a ANOVA de duas vias [$F(1, 28) = 1,603, p=0,2160$]. As fêmeas estressadas apresentaram um maior consumo em relação as do grupo controle ($p<0,05$). A diferença da ingestão entre os machos não diferiu significativamente. Também não foi observada diferença entre o consumo de machos e fêmeas de nenhum grupo.

Figura 10: Efeito do estresse precoce no consumo voluntário de álcool



Legenda: Quantidade total de álcool consumida pelos animais. * $p<0,05$ representando diferença entre as fêmeas dos grupos controle e estressado. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. C, controle; SM, separação materna.

4 DISCUSSÃO

O protocolo de estresse precoce realizado neste estudo foi o de separação materna, que consistiu em separar a mãe dos filhotes por um período de 3 horas por dia durante os 21 dias do período de amamentação. Após este período, os animais se desenvolveram sem serem perturbados até chegarem na idade adulta, quando seu comportamento foi avaliado a fim de se observar a existência de diferenças entre os animais estressados e os controles. Foram analisados comportamentos exploratório, anedônico, de risco e de consumo de álcool, além do peso corporal dos animais, registrado no momento do desmame (DPN21), no início do protocolo experimental (DPN60) e no momento da eutanásia (DPN83).

Estudos demonstram a relação entre o baixo peso infantil e o ambiente em que esta criança está se desenvolvendo. De maneira geral, quanto maiores forem as adversidades enfrentadas durante este período, maiores são as chances do indivíduo não se desenvolver adequadamente (CARROLL *et al.*, 2017; NTAMBARA; CHU, 2021). Isso pode explicar a diferença de peso entre os animais do grupo controle e do grupo SM. Enquanto as ninhadas controle ficaram todo o período da amamentação próximas as mães, as que foram separadas acabaram sofrendo os prejuízos deste evento adverso. A média de peso de machos e fêmeas dos mesmos grupos não diferiu, ficando a diferença somente entre controle e estressado.

Já se sabe que o contato entre mãe e filhotes durante as primeiras semanas de vida é de extrema importância para o pleno desenvolvimento dos animais (WEAVER *et al.*, 2004). Durante esta fase os filhotes passam por transformações físicas significativas, desenvolvem os sentidos, passam a se localizar e a se alimentar sozinhos e muitas dessas mudanças são mediadas ou estimuladas pelo contato com a mãe (NEPHEW; MURGATROYD, 2013). A separação materna, além de interferir em todas estas questões, muda também o padrão de alimentação desses filhotes. Todos os dias esses animais passaram 3 horas sem o leite materno, o que já se mostrou suficiente para alterar o ganho de peso desta fase.

Após o período da amamentação, os animais de ambos os grupos ficaram aproximadamente 40 dias sem serem perturbados com água e ração à vontade. Este período foi suficiente para a diferença de peso entre os grupos se igualar, mostrando que os animais SM foram capazes de se recuperar, pelo menos em relação ao peso – o que não significa que os efeitos do estresse precoce a outros tipos de comportamento também tenham sido revertidos. Nesta fase da vida o peso médio dos machos superou o das fêmeas, como já era

esperado (MAUVAIS-JARVIS; ARNOLD; REUE, 2017). Do DPN60 ao DPN83 não houve alteração significativa de peso, mesmo com o consumo de álcool durante este período.

É comum ocorrer alterações no peso dos animais em protocolos de consumo de álcool, principalmente naqueles que envolvem o desenvolvimento do vício a ponto do animal diminuir a ingestão de alimento (KOŁOTA *et al.*, 2019). Uma possível explicação para não ter sido observada diferença de peso neste estudo pode ser justamente o acesso ao álcool em dias intercalados, dando tempo do animal se recuperar.

O comportamento exploratório foi o primeiro a ser avaliado nesta pesquisa, utilizando o aparato do campo aberto. Os parâmetros observados para se caracterizar este comportamento foram a distância total percorrida, a distância percorrida e o tempo gasto nas áreas periféricas e central do aparato. As fêmeas e os machos de cada grupo se comportaram de maneira semelhante no aparato, sendo observadas diferenças nos dados apenas quando agrupados em controle *vs.* SM – sem distinção de sexo.

A distância total percorrida pelos animais estressados foi maior do que a percorrida pelo grupo controle, corroborando o que encontrado em Sadler & Bailey (2016) que demonstraram uma maior atividade locomotora e exploratória em animais estressados. É interessante observar que o campo aberto é comumente utilizado para se avaliar comportamento do tipo-ansioso, uma vez que a forma que o animal explora o aparato pode ser relacionada com a presença e intensidade deste comportamento (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). Normalmente, os roedores tendem a explorar os cantos e regiões mais protegidas (como a área periférica do aparato) em detrimento de regiões mais abertas onde possam estar vulneráveis a predadores (CAROLA *et al.*, 2002).

Entretanto, o que vem se observando neste aparato quanto se analisa animais que passaram por um protocolo de estresse precoce é que estes animais tendem a apresentar um comportamento exploratório um pouco diferente do padrão esperado. Já está descrito na literatura que animais estressados tendem a explorar mais o aparato, além de passarem mais tempo nas áreas centrais (PELLOUX; COSTENTIN; DUTERTE-BOUCHER, 2015). Resultado parecido foi encontrado neste estudo, onde foi possível observar que os animais SM exploraram mais o campo aberto, entretanto a região mais explorada foi a periférica.

Quando se analisa os resultados do comportamento de risco no labirinto em cruz elevado, conseguimos observar que os animais estressados se arriscaram mais nos braços abertos do que os controle. Aqui o resultado diferiu do padrão encontrado no campo aberto. Não houve diferença entre os grupos nos parâmetros distância total percorrida, nem na

atividade exploratória nos braços fechados. Já nos braços abertos os resultados foram similares aos encontrados em (KOSTEN; LEE; KIM, 2006), retomando este padrão exploratório em áreas abertas de animais estressados.

Em humanos já é bem descrita a relação entre a adoção de comportamentos de risco e o estresse precoce (NEGRIFF, 2018). Tentou-se observar esta diferença no LCE através da contagem de *head dips* e de *stretches* - comportamentos associados a avaliação de risco - entretanto não foi observada nenhuma diferença entre os grupos. Aqui vale a ressalva de que este comportamento é bem descrito em ratos (WALF; FRYE, 2007) e que, por mais que estejam presentes no comportamento dos camundongos, ainda são poucos os estudos fazendo a correlação destes movimentos com uma avaliação de risco em um processo de tomada de decisão em camundongos.

O comportamento anedônico foi mensurado através da análise da latência para início da autolimpeza e do tempo total de autolimpeza após a borrifada de solução de sacarose 10% no dorso dos animais. A viscosidade da solução, o sabor palatável e o próprio distúrbio na pelagem são fatores que impulsionam o comportamento de autolimpeza típico de roedores. Com relação a latência, não houve diferença entre machos e fêmeas para dar início a autolimpeza.

No tempo total de autolimpeza, foi observada uma distinção entre o comportamento de machos e fêmeas já no grupo controle. O tempo total dos machos foi menor do que o das fêmeas, influenciando, assim, na comparação entre animais controle e estressados. Dentro deste cenário, quando observamos o tempo de autolimpeza entre os machos, o grupo SM totalizou um tempo maior do que o grupo controle – apesar de não ter sido uma diferença significativa. Já entre as fêmeas, o tempo total diminuiu no grupo SM, fazendo-se aqui a ressalva do tempo elevado do grupo controle. Uma possível razão para esta diferença entre as fêmeas pode estar relacionada aos diferentes desfechos da separação materna para machos e fêmeas. Este tempo separada da mãe pode ter levado a algum prejuízo que, por sua vez, resultou em um quadro anedônico – representado, aqui, pela queda no tempo de autolimpeza desses animais (BONDAR; LEPESHKO; RESHETNIKOV, 2018)

O último comportamento avaliado foi o consumo voluntário de álcool. A relação entre o estresse e, principalmente, o estresse precoce com uma maior procura e consumo de álcool já é bem conhecida. Em humanos, indivíduos que passaram pelo estresse precoce são mais propensos a fazer uso de álcool, além de serem mais vulneráveis ao desenvolvimento de dependência química (BLAINE *et al.*, 2017). Pesquisas pré-clínicas vêm encontrando

resultados semelhantes. Kosten e colaboradores (2019) demonstraram que animais estressados no início da vida apresentaram uma maior propensão ao consumo de álcool e de outras substâncias psicoativas (WALTERS; KOSTEN, 2019).

Neste estudo foi possível corroborar estes achados, porém apenas nas fêmeas. Entre os machos não houve diferença significativa no consumo de álcool pelo grupo estressado. Bondar e colaboradores (2018) também demonstraram que camundongos fêmeas consomem mais álcool do que os machos. Apesar do presente estudo não ter demonstrado esta diferença entre os sexos no grupo controle, um maior consumo basal pelas fêmeas pode explicar a diferença encontrada quando analisado o consumo total de álcool das fêmeas estressadas.

5 CONCLUSÕES

Com o protocolo experimental escolhido e a idade avaliada foram observadas diferenças significativas no comportamento exploratório, anedônico e de consumo de álcool dos camundongos estressados. Mesmo que as diferenças comportamentais encontradas tenham sido menos evidentes do que o hipotetizado, estes resultados demonstram que o estresse precoce é capaz de causar prejuízos mesmo quando em um nível menor de que o esperado. Com isto em mente, é importante o desdobramento desta pesquisa em outras - com variações nas idades da avaliação comportamental e dos comportamentos analisados, a fim de se buscar entender cada vez mais como e em que grau o estresse precoce é capaz de interferir na vida do indivíduo.

Com relação a esta pesquisa específica, os encéfalos coletados dos animais estão armazenadas e serão processadas posteriormente para se observar a proliferação e diferenciação celular através da imunomarcção por Ki67 e doblecortina (DCX) e também a arborização dendrítica através da impregnação de Golgi.

REFERÊNCIAS

- ALCÁNTARA-ALONSO, V. *et al.* Altered functionality of the corticotrophin-releasing hormone receptor-2 in the hypothalamic paraventricular nucleus of hyperphagic maternally separated rats. *Neuropeptides*, v. 63, p. 75–82, 2017.
- BARTSCH, T.; WULFF, P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, v. 309, p. 1–16, 2015.
- BLAINE, S. K. *et al.* Alcohol, Stress, and Glucocorticoids: From Risk to Dependence and Relapse in Alcohol Use Disorders. *Neuropharmacology*, v. 122, p. 136–147, 2017.
- BLAIR, C.; RAVER, C. C. Poverty, Stress, and Brain Development: New Directions for Prevention and Intervention. *Academic Pediatrics*, v. 16, n. 3, p. S30–S36, 2016.
- BLOM, H. J. M. *et al.* Preferences of mice and rats for types of bedding material. *Laboratory Animals*, v. 30, n. 3, p. 234–244, 1996.
- BONDAR, N. P.; LEPESHKO, A. A.; RESHETNIKOV, V. V. Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects. *Behavioural Neurology*, v. 2018, 2018.
- BURENKOVA, O. V. *et al.* Brief but enough: 45-min maternal separation elicits behavioral and physiological responses in neonatal mice and changes in dam maternal behavior. *Physiology and Behavior*, v. 222, p. 112877, 2020.
- BURN, C. C.; PETERS, A.; MASON, G. J. Acute effects of cage-cleaning at different frequencies on laboratory rat behaviour and welfare. *Animal Welfare* 2, v. 15, p. 161–172, 2006.
- CARNICELLA, S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol*, v. 48, n. 3, p. 243–252, 2014.
- CAROLA, V. *et al.* Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*, v. 134, n. 1–2, p. 49–57, 2002.
- CARROLL, G. J. *et al.* Evaluation of nutrition interventions in children in conflict zones: A narrative review. *Advances in Nutrition*, v. 8, n. 5, p. 770–779, 2017.
- CARTER, J. R.; GOLDSTEIN, D. S. Sympathoneural and Adrenomedullary Responses to Mental Stress. *In: COMPREHENSIVE PHYSIOLOGY: Wiley*, 2014. v. 72, p. 119–146.
- CASTELLI, V. *et al.* Targeting the Stress System During Gestation: Is Early Handling a Protective Strategy for the Offspring? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. v. 14, p. 1–12, 2020.
- CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response.

Annual Review of Physiology, v. 67, n. 1, p. 259–284, 2005.

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

CHOCYK, A. *et al.* Impact of early-life stress on the medial prefrontal cortex functions—a search for the pathomechanisms of anxiety and mood disorders. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 6, p. 1462–1470, 2013.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The Concepts of Stress and Stress System Disorders: Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 267, n. 9, p. 1244–1252, 1992.

DANDI, E. *et al.* Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 67, p. 19–32, 2018.

DASKALAKIS, N. P. *et al.* Immediate effects of maternal deprivation on the (re)activity of the HPA-axis differ in CD1 and C57Bl/6J mouse pups. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, p. 1–6, 2014.

DE BELLIS, M. D. Developmental traumatology: A contributory mechanism for alcohol and substance use disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, n. 1–2, p. 155–170, 2002.

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.

ENOCH, M.-A. The Role of Early Life Stress as a Predictor for Alcohol and Drug Dependence. **Psychopharmacology**, v. 214, n. 1, p. 17–31, 2011.

FABRICIUS, K.; WÖRTWEIN, G.; PAKKENBERG, B. The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus. **Brain Structure and Function**, v. 212, n. 5, p. 403–416, 2008.

GALLO, M. *et al.* Limited Bedding and Nesting Induces Maternal Behavior Resembling Both Hypervigilance and Abuse. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 13, n. July, p. 1–13, 2019.

GHOSH, R. *et al.* Impact of COVID-19 on children: Special focus on the psychosocial aspect. **Minerva Pediatrica**, v. 72, n. 3, p. 226–235, 2020.

HAIR, N. L. *et al.* Association of child poverty, brain development, and academic achievement. **JAMA Pediatrics**, v. 169, n. 9, p. 822–829, 2015.

HENSSLER, J. *et al.* Mental health effects of infection containment strategies: quarantine and isolation—a systematic review and meta-analysis. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 271, n. 2, p. 223–234, 2021.

- HERZBERG, M. P.; GUNNAR, M. R. Early life stress and brain function: Activity and connectivity associated with processing emotion and reward. **NeuroImage**, v. 209, p. 116493, 2020.
- HILLIS, S. *et al.* Global prevalence of past-year violence against children: A systematic review and minimum estimates. **Pediatrics**, v. 137, n. 3, 2016.
- HORII-HAYASHI, N. *et al.* Developmental Changes in Desensitisation of c-Fos Expression Induced by Repeated Maternal Separation in Pre-Weaned Mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 25, n. 2, p. 158–167, 2013.
- IVY, A. S. *et al.* Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: A clinically relevant model for early-life stress. **Neuroscience**, v. 154, n. 3, p. 1132–1142, 2008.
- KILLGORE, W. D. S. *et al.* Alcohol dependence during COVID-19 lockdowns. **Psychiatry Research**, v. 296, 2021.
- KIM, E. J.; PELLMAN, B.; KIM, J. J. Stress effects on the hippocampus: a critical review. **Learning & Memory**, v. 22, n. 9, p. 411–416, 2015.
- KIM, J. Y. *et al.* Beneficial effects of highly palatable food on the behavioral and neural adversities induced by early life stress experience in female rats. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 10, p. 1150–1159, 2015.
- KOŁOTA, A. *et al.* Influence of alcohol consumption on body mass gain and liver antioxidant defense in adolescent growing male rats. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 13, 2019.
- KOSTEN, T. A.; KEHOE, P. Immediate and enduring effects of neonatal isolation on maternal behavior in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 53–61, 2010.
- KOSTEN, T. A.; LEE, H. J.; KIM, J. J. Early life stress impairs fear conditioning in adult male and female rats. **Brain Research**, v. 1087, n. 1, p. 142–150, 2006.
- LIU, R. *et al.* Early postnatal stress suppresses the developmental trajectory of hippocampal pyramidal neurons: the role of CRHR1. **Brain Structure and Function**, v. 221, n. 9, p. 4525–4536, 2016.
- LOADES, M. E. *et al.* Rapid systematic review: The impact of social isolation adolescents in the context of COVID-19. **Journal of the American of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 59, n. 11, p. 1218–1239, 2020.
- LUKKES, J. L. . S. M. B. S. T. N. F. S. L. A. Early life stress and later peer distress on depressive behavior in adolescent female rats: effects of a novel intervention on GABA and D2 receptors. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 5, p. 139–148, 2017.
- MACKEY, A. P.; RAIZADA, R. D. S.; BUNGE, S. A. Environmental Influences on

- Prefrontal Development. **Principles of Frontal Lobe Function**, p. 145–163, 2014.
- MARIN, M. F. *et al.* Chronic stress, cognitive functioning and mental health. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, n. 4, p. 583–595, 2011.
- MAUVAIS-JARVIS, F.; ARNOLD, A. P.; REUE, K. A Guide for the Design of Pre-clinical Studies on Sex Differences in Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 6, p. 1216–1230, 2017.
- MCEWEN, B. S. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. **Chronic Stress**, v. 1, 2017.
- MCEWEN, B. S.; GIANAROS, P. J. Central role of the brain in stress and adaptation: Links to socioeconomic status, health, and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1186, n. 1, p. 190–222, 2010.
- NEGRIFF, S. Developmental pathways from maltreatment to risk behavior: Sexual behavior as a catalyst. **Development and Psychopathology**, v. 30, n. 2, p. 683–693, 2018.
- NEMEROFF, C. B. Paradise Lost: The Neurobiological and Clinical Consequences of Child Abuse and Neglect. **Neuron review**, v. 89, n. 5, p. 892–909, 2016.
- NEPHEW, B.; MURGATROYD, C. The role of maternal care in shaping CNS function. **Neuropeptides**, v. 47, n. 6, p. 371–378, 2013.
- NTAMBARA, J.; CHU, M. The risk to child nutrition during and after COVID-19 pandemic: What to expect and how to respond. **Public Health Nutrition**, v. 24, n. 11, p. 3530–3536, 2021.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global Status Report on violence prevention 2014. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564793> Acesso em: julho de 2022.
- OOMEN, C. A. *et al.* Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 12, p. 3395–3401, 2007.
- PELLOUX, Y.; COSTENTIN, J.; DUTERTE-BOUCHER, D. Differential involvement of anxiety and novelty preference levels on oral ethanol consumption in rats. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 15, p. 2711–2721, 2015.
- PERRY, R. E. *et al.* Developing a neurobehavioral animal model of poverty: Drawing cross-species connections between environments of scarcity-adversity, parenting quality, and infant outcome. **Development and Psychopathology**, v. 31, n. 02, p. 399–418, 2019.
- ROMANO-LÓPEZ, A. *et al.* Maternal separation and early stress cause long-lasting effects on dopaminergic and endocannabinergic systems and alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and frontal cortex in rats. **Developmental Neurobiology**, v. 76, n. 8, p. 819–831, 2016.

ROMERO, L. M. Physiological stress in ecology: Lessons from biomedical research. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 5, p. 249–255, 2004.

ROTHMAN, E. F. *et al.* Adverse childhood experiences predict earlier age of drinking onset: Results from a representative US sample of current or former drinkers. **Pediatrics**, v. 122, n. 2, p. 298–304, 2008.

RUSSELL, G.; LIGHTMAN, S. The human stress response. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 9, p. 525–534, 2019.

SACCO, M. A. *et al.* The impact of the Covid-19 pandemic on domestic violence: The dark side of home isolation during quarantine. **The Medico-legal journal**, v. 88, n. 2, p. 71–73, 2020.

SADLER, A. M.; BAILEY, S. J. Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. **Physiology and Behavior**, v. 167, p. 313–323, 2016.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids, the evolution of the stress-response, and the primate predicament. **Neurobiology of Stress**, v. 14, p. 100320, 2021.

SCHOENLE, L. A. *et al.* Does variation in glucocorticoid concentrations predict fitness? A phylogenetic meta-analysis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 300, n. July 2020, p. 113611, 2021.

SCHWARZ, J. M.; HUTCHINSON, M. R.; BILBO, S. D. Early-life experience decreases drug-induced reinstatement of morphine CPP in adulthood via microglial-specific epigenetic programming of anti-inflammatory IL-10 expression. *Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 49, p. 17835–17847, 2011.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, p. 1–6, 2015.

UNICEF. **UNICEF for every child. UNICEF Data: Monitoring the situation of children and women.** Disponível em: <https://data.unicef.org/>. Acesso em setembro de 2022.

VASHIST, S. K.; SCHNEIDER, E. M. Depression: An Insight and Need for Personalized Psychological Stress Monitoring and Management. **Journal of Basic & Applied Sciences**, v. 10, p. 177–182, 2014.

VAN HEERDEN, J. H. *et al.* Evaluating the behavioural consequences of early maternal separation in adult C57BL/6 mice; the importance of time. *Behavioural Brain Research*, v. 207, n. 2, p. 332–342, 2010.

WALF, A.; FRYE, C. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007.

WALKER, D. J. *et al.* Early-life adversity programs long-term cytokine and microglia expression within the HPA axis in female Japanese quail. **Journal of Experimental Biology**, v. 222, n. 6, 2019.

WALTERS, H.; KOSTEN, T. A. Early life stress and the propensity to develop addictive behaviors. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 78, n. June, p. 156–169, 2019.

WEAVER, I. C. G. *et al.* Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847–854, 2004.

WEI, L.; HAO, J.; KAFFMAN, A. Early life stress inhibits expression of ribosomal RNA in the developing hippocampus. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–16, 2014.

WEMM, S. E.; SINHA, R. Drug-induced stress responses and addiction risk and relapse. **Neurobiology of Stress**, v. 10, p. 100148, 2019.

WOO, E. *et al.* Chronic Stress Weakens Connectivity in the Prefrontal Cortex: Architectural and Molecular Changes. **Chronic Stress**, v. 5, 2021.

YANG, M. *et al.* Behavior of Rats in a Self-Paced Risky Decision-Making Task Based on Definite Probability. **Brain Sciences**, v. 12, n. 6, p. 795, 2022.

YARIBEYGI, H. *et al.* The impact of stress on body function: A review. **EXCLI Journal**, v. 16, p. 1057–1072, 2017.

YILDIZ, E.; TANRIVERDI, D. Child neglect and abuse: a global glimpse within the framework of evidence perspective. **International Nursing Review**, v. 65, n. 3, p. 370–380, 2018.

YOO, S. B. *et al.* Adolescence fluoxetine increases serotonergic activity in the raphe-hippocampus axis and improves depression-like behaviors in female rats that experienced neonatal maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 6, p. 777–788, 2013.

ZHANG, J. *et al.* Behavioral deficits, abnormal corticosterone, and reduced prefrontal metabolites of adolescent rats subject to early life stress. **Neuroscience Letters**, v. 545, p. 132–137, 2013.

ZHANG, X. *et al.* Early deprivation reduced anxiety and enhanced memory in adult male rats. **Brain Research Bulletin**, v. 108, p. 44–50, 2014.