

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA NA FASE NEONATAL
SOBRE A FRUSTRAÇÃO EM RATOS

JOELMA ALVES LÚCIO

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre - RS

Outubro/2020

JOELMA ALVES LÚCIO

EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA NA FASE NEONATAL
SOBRE A FRUSTRAÇÃO EM RATOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Dalmaz

Coorientadora: Dr^a. Natividade de Sá Couto Pereira

Porto Alegre - RS

Outubro/2020

“Aquele foi o melhor dos tempos, foi o pior dos tempos; aquela foi a idade da sabedoria, foi a idade da insensatez, foi a época da crença, foi a época da descrença, foi a estação da Luz, a estação das Trevas, a primavera da esperança, o inverno do desespero; tínhamos tudo diante de nós, tínhamos nada diante de nós, íamos todos direto para o Paraíso, íamos todos direto no sentido contrário.”

Um conto de duas cidades, Charles Dickens, 1859.

AGRADECIMENTOS

Essa dissertação representa a realização do sonho de uma menina que nasceu em Rondônia e sempre sentiu que seu destino estava longe dali, uma menina que sempre amou os livros, aprender e ensinar. Muitas pessoas foram importantes nesse processo e gostaria de agradecer a cada uma e a todas elas por colaborarem com meu crescimento profissional e, tão importante quanto, com minha evolução pessoal.

Agradeço aos meus pais, Juarez e Silvani, que sempre souberam que eu iria estudar muito. Agradeço em especial a minha mãe, que fez um joguinho da memória com as letras do alfabeto antes mesmo que eu fosse para a escola, e que me ajudava com todas minhas tarefas de casa.

Obrigada a minha irmã Priscila, que era minha aluna na nossa ‘escolinha’. Por sempre ser tão diferente de mim e mesmo assim me amar, mesmo eu sendo muito medrosa para acompanhá-la em muitas das suas aventuras pelo sítio onde morávamos. Obrigada por ter seguido minha profissão e hoje ser essa farmacêutica competente que você é.

Muitos professores me inspiraram ao longo do tempo. Minha tia Rosa, minha primeira professora, e também minha tia Eunice. Meu professor de português da 5ª série, Prof. Sérgio. Professor César, o melhor professor de História do mundo. Durante minha graduação em Farmácia na FIMCA muitos professores me inspiraram e se preocuparam comigo, o Prof. César, Prof. Elieth, Prof. Gleense, Prof. Tatiana, Prof. Celina e Prof. Eduardo Honda. Se eu soubesse como seria a vida após a graduação teria aproveitado muito mais o conhecimento e companhia de todos vocês.

Em especial quero agradecer a dois dos meus professores da graduação que me inspiraram sobremaneira, Prof. Carla Celedônio e Prof. Cléberon Fernandes. Acho que nunca tinha pensado na carreira de pesquisadora até conhecê-los. Foi com o meu TCC que realizei na EMBRAPA/RO que descobri realmente a profissão que me fez feliz dentro da Farmácia, a de pesquisadora. Mesmo que minha vontade de ser professora sempre tivesse existido, foi ali, no final do curso de farmácia, que enxerguei como perseguir aquele sonho.

Obrigada a Prof. Carla Dalmaz, minha orientadora, que é uma pesquisadora incrível, inteligente, talentosa, mas acima de todas essas coisas, e que eu valorizo acima de todas elas, uma pessoa genuinamente boa, alegre, divertida, cuidadosa. A Prof. Carla me conheceu em um dia e aceitou que eu fizesse um estágio no seu laboratório, mesmo eu não tendo experiência na sua linha de pesquisa e dizendo pra ela, que eu queria demais fazer um mestrado, que era o sonho da minha

vida e tudo que eu queria era uma oportunidade. Agradeço imensamente por ter me acolhido no seu laboratório, por ter me consolado nas vezes que eu chorei e fiquei com medo de não conseguir, por ter me apoiado nos momentos difíceis e por ter me mandado fotos da neve quando estava no Canadá. Por ter me dado aula no feriado para que eu pudesse dar essa mesma aula no dia seguinte. Por ser compreensiva e ao mesmo tempo exigir quando sabia que eu poderia fazer mais. Por estar sempre animada e por animar todo mundo, e por ser feliz sendo pesquisadora, professora e orientadora/

Nati, também minha orientadora e meu exemplo, sempre vou te agradecer por me ajudar a me tornar a pesquisadora e a pessoa que sou. Obrigada pela sua dedicação ao meu projeto, por todas as nossas conversas e ensinamentos. Por ser um exemplo no nosso laboratório, sempre disposta a ajudar e ensinar.

Agradeço a todos os meus amigos do Laboratório 37. Alunos de iniciação científica (Alexandre, Emily, Rafael, Roger, Inaê, Giulia, Bianca, Eduardo, Luisa) por todas as horas que passamos fazendo comportamento em uma sala escura de 2m², inclusive nos feriados e nos finais de semana. Por me ensinarem e me ajudarem. Alunas de mestrado (Aline e Ana Paula) por estarem sempre do meu lado, por serem minhas parceiras, colaboradoras e mestres. Todas as pessoas que compartilharam essa jornada comigo (Carine, Cristie, Randri).

Rachel, obrigada por sempre se preocupar com seus alunos, por ser um exemplo de professora e por me ensinar tanto no meu estágio didático. Minha primeira aula na UFRGS é um dos dias mais felizes da minha vida. Alessandra, Ariadni, Carol e Andressa, obrigada pela parceria de sempre e pelas risadas.

Professora Rosa, obrigada pela oportunidade de fazer meu estágio didático com a senhora (e por entender minha ansiedade). Marina e Andreo, que bom que pudemos compartilhar nosso tema de pesquisa.

Agradeço meus colegas e professores do PPG Neurociências e do PPG Bioquímica: Angel, Drika, Ana Paula Martini, Matheus, Querusche, Gabi, Letícia, Josi, Prof. Maria Elisa, Prof. Taís e Prof. Jorge.

Muito obrigada a todos meus colegas farmacêuticos da graduação, tenho muita saudade dos nossos bons e velhos tempos e muito da profissional que sou hoje devo a vocês. Agradeço a minha prima Cristina por fazer parte da minha vida e me ajudar tanto e de tantas formas.

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Estresse precoce	10
1.1.1 Modelos animais de estresse precoce: separação materna	10
1.1.2 Efeitos sexo-específicos da separação materna	10
1.2 Frustração	11
1.2.1 Tarefa da redução inesperada de recompensa (tRIR)	12
1.2.2 Circuitos encefálicos relacionados a frustração: amígdala e hipocampo	14
1.2.3 Resposta ao estresse	14
1.2.4 Plasticidade sináptica	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Aspectos éticos	18
4.2. Desenho experimental e tamanho amostral	18
4.3. Cuidados na manutenção dos animais	20
4.4 Separação materna (SM) neonatal	20
4.5 Experimento 1 - Tarefa de Redução Inesperada da Recompensa (tRIR)	21
4.5.1 Análise do ciclo estral	23
4.5.2 Análise da Tarefa de Redução Inesperada de recompensa pelo <i>software</i> AnyMaze®	24
4.6 Experimento 2 - Avaliação neuroquímica	24

4.6.1 Aquisição das amostras: Dissecção do Hipocampo Dorsal (HcD) e da Amígdala Basolateral (ABL)	24
4.6.2 Preparo das amostras para avaliação neuroquímica: Extração de Proteínas	25
4.6.3 Western blotting	25
4.7 Análise estatística	27
5. RESULTADOS	27
5.1 Tarefa de redução inesperada de recompensa	27
5.2 Experimento 2 - Avaliação Neuroquímica	31
5.2.1 Machos - HcD	31
5.2.2 Machos - ABL	33
5.2.3 Fêmeas - HcD	35
5.2.4 Fêmeas - ABL	37
6. DISCUSSÃO	39
7. PERSPECTIVAS	44
REFERÊNCIAS	45

ANEXO I - Resultados dos testes estatísticos

ANEXO II - Carta de Aprovação do projeto de pesquisa pela CEUA/UFRGS

RESUMO

A separação materna é um modelo de estresse precoce que modifica parâmetros neurobiológicos a longo prazo levando a diferenças significativas nos estados emocionais. Um desses estados é possivelmente a frustração, um estado emocional negativo que pode estar envolvido com a vulnerabilidade ao desenvolvimento de alguns tipos de transtornos psiquiátricos. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da separação materna no período neonatal sobre a frustração em ratos adultos, considerando possíveis efeitos sexo-específicos. Além disso, buscamos verificar alterações na plasticidade sináptica e na resposta ao estresse que poderiam medir as alterações comportamentais observadas. Ninhadas de ratos Wistar foram divididas em controles (sem intervenção) e submetidas à separação materna (separadas da genitora durante 3h por dia em incubadora a 32° C nos dias 1 a 10 de vida). A partir do dia 80 de vida, 139 animais (93 fêmeas e 46 machos) foram submetidos à tarefa de redução inesperada de recompensa. Vinte e quatro horas após a última sessão, o hipocampo dorsal e a amígdala basolateral foram dissecados para avaliação neuroquímica usando a técnica de *western blotting*. Os resultados indicaram que os animais que passaram pela separação materna apresentam maior vulnerabilidade à redução inesperada de recompensa (maior frustração) em relação aos controles [$F(3,942,327,191) = 2,789$, $p = 0,027$], sendo que este efeito parece ser mais preponderante nos machos. Relacionadas a esse achado, observamos alterações nos imunocontéudos das subunidades GluN2A (diminuição) [$F(1,24) = 8,710$, $p = 0,007$] e GluN2B (aumento) [$F(1,24) = 9,686$, $p = 0,005$] no hipocampo dorsal dos machos separados. Não observamos alterações significativas na sinaptofisina, PSD95, SNAP25 ou CRHR1 no hipocampo ou na amígdala. Também não foram observadas diferenças em quaisquer dessas proteínas nas fêmeas. Concluimos que a separação materna afeta a resposta à redução inesperada de recompensa, de forma aparentemente mais proeminente nos animais machos. Alterações do imunocontéudo das subunidades GluN2A e GluN2B do receptor NMDA no HcD desses animais sugerem um rearranjo da composição deste receptor, possivelmente tornando mais forte a memória aversiva relacionada à redução de recompensa. As fêmeas separadas parecem apresentar um perfil de resiliência à redução inesperada da recompensa.

Palavras-chave: Plasticidade sináptica; efeitos sexo-específicos; separação materna; redução inesperada de recompensa.

ABSTRACT

Maternal separation is a model of early stress that modifies long-term neurobiological parameters leading to significant differences in emotional states; one of them is frustration, a negative emotional state which may be involved with susceptibility to psychiatric disorders. The aim of this research was to evaluate the effects of maternal separation on frustration in adult rats, considering possible sex-specific effects. In addition, we verified modifications in synaptic plasticity, which could be related to the behavioral alterations observed. Litters of Wistar rats, 139 animals (93 females and 46 males) were divided into control (no intervention) and subjected to maternal separation (separated from the dam 3h per day at 32° C from post-natal day (PND) 1 to PND10). From PND80, animals were subjected to the unexpected reduction of reward. Twenty-four h after the last behavioral session, animals were killed and dorsal hippocampus (dHC) and basolateral amygdala (BLA) were dissected for neurochemical evaluation using western blot. The results showed that males that went through maternal separation had higher vulnerability to the unexpected reduction of reward (they showed higher frustration) when compared to controls [F (3.942.327.191) = 2.789, p = 0.027], while females did not present this effect. Possibly related to this finding, we also observed alterations on NMDA subunits GluN2A (reduced immunocontent) [F (1.24) = 8.710, p = 0.007] and GluN2B (increased immunocontent) [F (1.24) = 9.686, p = 0.005] in the dHC of male animals. No significant modifications were observed on synaptophysin, PSD95, SNAP25 or CRHR1 in dHC or BLA. No significant differences were observed in any one of these proteins in females. We concluded that maternal separation affects the response to unexpected reduction in reward, more particularly in males. Alterations in the amount of NMDA receptor subunits GluN2A and GluN2B in dHC of these animals suggest a change in the ratio of these subunits, possibly making stronger the aversive memory related to the reward reduction. In agreement with the resilience profile of the separated females, no alterations were observed in the immunocontent of the proteins analyzed in dHC or BLA of these animals.

Keywords: synaptic plasticity; sex-specific effects; maternal separation; unexpected reduction of reward.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema experimental

Figura 2. Tentativas por dia na tRIR.

Figura 3. Linha do tempo da tRIR.

Figura 4. Latência para chegar ao alvo (segundos) agrupadas em blocos de 3 tentativas, ao longo dos dias 10 a 13.

Figura 5. Média de entradas no alvo ao longo dos Dias 10 a 13 do experimento.

Figura 6. Consumo dos cereais doces nos grupos grande recompensa no dia 10.

Figura 7. Imunoconteúdo das subunidades GluN2A (A) e GluN2B (B) do receptor NMDA no HcD de machos, 24hs após o Dia 13, último dia em que os animais foram submetidos à avaliação comportamental.

Figura 8. Imunoconteúdo das proteínas de plasticidade sináptica SNAP25 (A), Sinaptofisina (B) e PSD95 (C) no HcD de ratos machos, 24hs após o Dia 13.

Figura 9. Imunoconteúdo do receptor CRHR1 no HcD, 24hs após o Dia 13.

Figura 10. Imunoconteúdo das subunidades GluN2A (A) e GluN2B (B) do receptor NMDA na ABL de machos, 24h após o Dia 13.

Figura 11. Imunoconteúdo das proteínas de plasticidade sináptica SNAP25 (A), Sinaptofisina (B) e PSD95 (C) na ABL de ratos machos, 24h após o Dia 13

Figura 12. Imunoconteúdo do receptor CRHR1 na amígdala basolateral, 24h após o Dia 13.

Figura 13. Imunoconteúdo das subunidades GluN2A (A) e GluN2B (B) do receptor NMDA no HcD de fêmeas, 24h após o Dia 13.

Figura 14. Imunoconteúdo das proteínas de plasticidade sináptica SNAP25 (A), Sinaptofisina (B) e PSD95 (C) no HcD de ratas, 24hs após o Dia 13.

Figura 15. Imunoconteúdo do receptor CRHR1 no HcD, 24h após o Dia 13.

Figura 16. Imunoconteúdo das subunidades GluN2A (A) e GluN2B (B) do receptor NMDA na amígdala basolateral de fêmeas, 24h após o Dia 13.

Figura 17. Imunoconteúdo das proteínas de plasticidade sináptica SNAP25 (A), Sinaptofisina (B) e PSD95 (C) na amígdala basolateral de ratas, 24h após o Dia 13.

Figura 18. Imunoconteúdo do receptor CRHR1 na amígdala basolateral de fêmeas, 24h após o Dia 13.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Etapas da frustração

Tabela 2. Grupos do Experimento 1 - Tarefa de Redução Inesperada de Recompensa

Tabela 3. Grupos do Experimento 2 – Avaliação Neuroquímica

Tabela 4. Anticorpos primários utilizados no Experimento 2

LISTA DE ABREVIATURAS

ABL – Amígdala basolateral

bl. - bloco

CRH – hormônio liberador de corticotropina (do inglês)

CRHR1 – receptor do hormônio liberador de corticotropina do tipo 1 (do inglês)

DPN – dia pós-natal

FI - Fêmea Intacto

FS - Fêmeas Separado

GR – grande recompensa

Hc - Hipocampo

HcD – hipocampo dorsal

HPA – Hipotálamo – hipófise (pituitária) - adrenal

IGR - Intacto Grande Recompensa

IPR - Intacto Pequena Recompensa

MI - Macho Intacto

MS - Macho Separado

NMDA – N-metil D-aspartato

PR – pequena recompensa

PSD95 – proteína de densidade pós-sináptica de 95 kDa (do inglês)

SGR - Separado Grande Recompensa

SNAP25 – proteína associada ao sinaptossoma de 25 kDa (do inglês)

SNARE - *SNAP Receptor*

SPR - Separado Pequena Recompensa

tRIR – tarefa de redução inesperada de recompensa

ttmtpn – tratamento pós-natal

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse precoce

Estudos epidemiológicos relacionados com o estresse no início da vida demonstraram um maior risco para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (ansiedade, depressão e transtorno de estresse pós-traumático - TEPT) em indivíduos que passaram por essa condição precocemente (CHEN; BARAM, 2016; PERVANIDOU; CHROUSOS, 2018; SILBERMAN; ACOSTA; ZORRILLA ZUBILETE, 2016). A combinação dos efeitos das adversidades enfrentadas ao longo da vida com a predisposição genética de cada indivíduo, que juntos regulam a expressão gênica, levam ao surgimento de efeitos críticos na função celular e eventualmente em sistemas como um todo, gerando alterações no funcionamento do encéfalo e, conseqüentemente, no comportamento (MATOSIN; HALLDORSOTTIR; BINDER, 2018). O estresse durante períodos de vulnerabilidade do desenvolvimento do encéfalo tem efeitos robustos e permanentes na estrutura e funções encefálicas e na saúde física e emocional do indivíduo ao longo da vida (PERVANIDOU; CHROUSOS, 2018).

Por mais de um século se tem investigado o período neonatal como um período sensível em que o ambiente é capaz de, ao interagir com a carga genética do indivíduo, tornar o organismo mais (ou menos) suscetível a psicopatologias em adultos. Diversos mecanismos foram propostos, mas uma noção central permanece: o período neonatal é um momento em que experiências têm efeitos duradouros (ALYAMANI; MURGATROYD, 2018; BALE et al., 2011). Entre esses efeitos, mudanças na suscetibilidade ao estresse têm sido observadas, e sabe-se que essas mudanças afetam funções cerebrais por meio de mecanismos moleculares específicos (MALTER COHEN et al., 2013; SACHS et al., 2018). Dessa forma, o estresse neonatal em roedores é frequentemente utilizado para investigar como variações no ambiente neonatal afetam aspectos neurobiológicos e de comportamento no adulto (PRYCE; FELDON, 2003), assim como impactam no desenvolvimento do encéfalo de maneira sexo-específica, predispondo os organismos a vários distúrbios neurológicos (BALDY; CHAMBERLAND; KINKEAD, 2015; DE SOUZA et al., 2018). O período neonatal em roedores, especificamente, parece se correlacionar com o final da gestação e início da infância em humanos, sobretudo na maturação de estruturas límbicas e corticais (CLANCY et al., 2007; CLANCY; DARLINGTON; FINLAY, 2001).

1.1.1 Modelos animais de estresse precoce: separação materna

Os estudos com animais têm permitido aprofundar o conhecimento das bases neurobiológicas que determinam a resposta ao estresse, os circuitos encefálicos relevantes, além de investigar como esses mecanismos podem ser modulados para modificar a resposta final.

A separação materna no período neonatal, em roedores, é um dos modelos mais utilizados para investigar o estresse precoce. Apesar de existirem inúmeras variações no protocolo dessa intervenção pós-natal, esse paradigma geralmente envolve a separação de animais neonatos de suas mães por no mínimo três horas. A separação materna interfere com a influência regulatória pós-natal que a genitora tem sobre o desenvolvimento do filhote (NOVICK et al., 2018).

A separação materna leva a diferenças significativas nos estados emocionais. Por exemplo, estudos do nosso laboratório e de outros grupos de pesquisa têm mostrado que os roedores apresentam dificuldade na reconsolidação de memórias em tarefas de medo condicionado (COUTO-PEREIRA et al., 2019; DIEHL et al., 2014), na extinção desse mesmo tipo de memórias (DIEHL et al., 2014), aumento do comportamento tipo-ansioso (DE LIMA et al., 2020; KAMBALI et al., 2019) e tipo-depressivo (MARAIS et al., 2008).

Em modelos animais envolvendo roedores e primatas a interrupção, mesmo que temporária, do vínculo da mãe-filhote, induz mudanças duradouras na neurobiologia, fisiologia e comportamento emocional dos animais adultos por meio da programação da responsividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (NISHI et al., 2013).

1.1.2 Efeitos sexo-específicos da separação materna e de variações hormonais no comportamento

Estudos com roedores demonstram diferenças sexo-específicas nos efeitos da separação materna no período neonatal sobre o comportamento na fase adulta (LUNDBERG et al., 2017). O porquê das diferenças entre os sexos nos desfechos da exposição ao estresse existirem e continuarem presentes durante toda a vida é uma pergunta importante, que pode ser a chave para entender questões individuais de saúde e doença, e sugere-se que é vantajoso que machos e fêmeas respondam de forma diferente ao estresse (BALE; EPPERSON, 2015). Também devemos considerar que o próprio desenvolvimento normal do encéfalo é organizado pela exposição a

hormônios durante o desenvolvimento, onde indivíduos do sexo masculino sofrem influências de níveis de hormônios andrógenos elevados logo após o nascimento, que levam à masculinização, um processo que afeta a diferenciação celular e sua conectividade. Além disso, durante o desenvolvimento do sistema nervoso, a participação de estrogênios na proliferação e na morte celular é um componente crítico na programação do dimorfismo sexual do encéfalo (MCCARTHY, 2008; ZHANG et al., 2008).

No que se refere ao comportamento em adultos, além das diferenças comportamentais sexo-específicas, também há, em mulheres, uma variabilidade considerável de respostas aos mesmos estímulos nas distintas fases do ciclo menstrual, devido a diferenças hormonais entre elas (MONTERO-LÓPEZ et al., 2018; SUNDSTRÖM-POROMAA, 2018). Tendo em vista a curta duração do ciclo estral em ratas, elas constituem um bom modelo para o estudo dessas alterações. O ciclo estral de ratas tem duração média de quatro ou cinco dias e é caracterizado por quatro fases: estro, metaestro, diestro e proestro (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

1.2 Frustração

A frustração é uma reação emocional que se manifesta quando uma expectativa prévia não é concretizada (AMSEL, 1962; PAPINI, 2003). É um estado emocional que pode ser gerado pela omissão ou diminuição em quantidade ou qualidade de uma recompensa apetitiva esperada (PSYRDELLIS et al., 2016). Estudos sugerem que o estado emocional relacionado à frustração é semelhante ao causado pelo medo, pela ansiedade e até mesmo pela dor (CUENYA et al., 2012).

A perda inesperada de uma recompensa pode ter efeitos aversivos, levando até a impactos negativos sobre o estado físico do indivíduo. Eventos estressantes da vida cotidiana, como morte do cônjuge, divórcio, morte de um familiar próximo, perda de emprego e aposentadoria, envolvem algum tipo de perda de recompensa (PAPINI, 2003). Essas situações estressantes que envolvem a perda de recompensa têm uma característica em comum: expectativas são violadas. Modelos animais que permitem a manipulação cuidadosa de parâmetros de perda de recompensa podem contribuir significativamente para o nosso conhecimento da interrelação entre esses fatores (PAPINI, 2003).

1.2.1 Tarefa da redução inesperada de recompensa (tRIR)

Quando um animal aprende a esperar uma recompensa apetitiva em determinada situação, a violação dessa expectativa pela omissão ou diminuição dessa recompensa induz, primeiramente, um novo aprendizado sobre a mudança no ambiente e, em segundo lugar, um novo aprendizado sobre a reação emocional do próprio organismo em relação à mudança no ambiente (frustração). Esses efeitos são particularmente notáveis se a omissão da recompensa é inesperada (PAPINI, 2003).

Os efeitos do contraste negativo sucessivo (CNS), que ocorre na tarefa de redução inesperada de recompensa (tRIR) são mudanças no comportamento antecipatório e consumatório de animais que receberam uma recompensa menor do que eles esperavam. Pressupõe-se que os efeitos causados pela tRIR reflitam frustração e parecem ser influenciados por um estado de contexto afetivo (AMSEL, 1992; AMSEL; WARD, 1954; PAPINI, 2003). Efeitos de contraste entre incentivos, ou a resposta dos animais a uma redução inesperada na recompensa, foram percebidos quando os animais reduziram sua velocidade de corrida quando recebiam uma recompensa que possuía um menor valor apetitivo para eles. Esses animais não só corriam mais devagar do que quando recebiam a recompensa preferida, como corriam mais devagar que os animais que sempre receberam a recompensa de menor valor apetitivo (ELLIOTT, 1928). A interpretação mais comum dessas mudanças de comportamento é que a diferença entre a recompensa esperada e a recebida induz no animal um estado emocional negativo.

A teoria da frustração de Amsel foi desenvolvida para explicar os efeitos comportamentais da redução inesperada da recompensa em situações experimental (PAPINI, 2003). A redução da recompensa pode ser entendida como omissão, redução em quantidade ou qualidade da recompensa apetitiva. Ela é inesperada quando ocorre na presença de um sinal que antes era pareado com uma recompensa de maior valor do que a atual. De acordo com a teoria da frustração de Amsel (AMSEL, 1958), são quatro os estágios que seguem a redução inesperada da recompensa (Tabela 1):

1 - a redução inesperada da recompensa leva a um estado emocional aversivo de frustração primária;

2 - o estímulo associado ao evento frustrante vai disparar a frustração secundária ou antecipatória, fazendo com que o animal o evite no futuro;

3 - os animais se tornam tolerantes à redução inesperada da recompensa por meio do contracondicionamento (associando a frustração secundária com a nova recompensa), o que levará, por fim, ao último estágio:

4 - o aumento da persistência quando se depararem com a nova recompensa.

O contracondicionamento observado no estágio três da frustração implica na mudança hedônica no valor da frustração secundária, de aversivo para novamente apetitoso, aumentando o comportamento de persistência frente à redução da recompensa (PAPINI, 2003).

Tabela 1. Etapas da frustração

Fenômeno	Mecanismo	Requisito
Sequelas	Frustração primária	Discrepância negativa entre o valor da recompensa esperada e obtida
Efeito antecipatório	Frustração secundária	Conflito entre aproximação e fuga
Persistência	Contracondicionamento	Exposição (moderada a longa) a condições inesperadas de recompensa.

Adaptado de (PAPINI, 2003)

Podemos entender a frustração primária como mudanças de comportamento do animal quando ele está diretamente em contato com a recompensa, como aumento do comportamento de busca e exploração, redução do consumo da recompensa (líquida ou sólida); e a frustração secundária como mudanças comportamentais no animal no período que antecede a obtenção da recompensa, como diminuir a velocidade da corrida na busca pela recompensa, diminuição do comportamento operante e evitação do lugar onde ocorreu a diminuição da recompensa (AMSEL, 1992).

A função adaptativa dos mecanismos envolvidos na frustração pode ser facilitar o processo de mudança entre uma resposta que anteriormente era bem-sucedida, mas que não funciona mais,

para uma nova resposta que pode colocar o animal em contato com os recursos necessários à sua sobrevivência (STOUT et al., 2002).

1.2.2 Circuitos encefálicos relacionados à frustração: amígdala e hipocampo

Resultados sugerem que, neurobiologicamente, o aprendizado por meio de mecanismos de medo condicionado e da frustração é parecido, mas não totalmente sobreposto (SALINAS et al., 1997). Duas estruturas encefálicas que participam do circuito de resposta à frustração são a amígdala e o hipocampo.

A amígdala é parte de uma rede que participa tanto no condicionamento aversivo quanto na adaptação à redução inesperada de recompensa (PAPINI, 2003). O medo é uma das funções mais associadas à amígdala, mas existem diversos estudos associando esta estrutura com o processamento de recompensas e com o uso de recompensas como motivador e reforçador de comportamentos (GUARINO; CONRAD; PAPINI, 2020; KAWASAKI et al., 2017a; LEDOUX, 2007). A amígdala, particularmente o complexo basolateral (ABL), que também estabelece conexões com o tálamo e o hipocampo (Hc) (LEDOUX, 2007), desempenha um papel na consolidação de associações estímulo-recompensa com carga emocional (LEDOUX, 2014). Já o Hc tem um papel crucial na memória (KNIERIM, 2015; LISMAN et al., 2017; SALINAS; WHITE, 1998), particularmente a sua região dorsal (FANSELOW; DONG, 2010). A ABL e o Hc também estão envolvidos na regulação da produção de glicocorticoides (cortisol, o principal hormônio relacionado ao estresse em humanos, e corticosterona em roedores) (GROSS; CANTERAS, 2012), como comentado acima.

1.2.3 Resposta ao estresse

Na presença de um estressor, o eixo Hipotálamo-hipófise (pituitária)-adrenal (HPA) modula a resposta endócrina ao estresse, como por exemplo, a violação de uma expectativa, regulando a liberação de glicocorticóides. A amígdala estimula o hipotálamo a liberar CRH (hormônio liberador de corticotropina), desencadeando a secreção de ACTH (hormônio adenocorticotrópico) pela hipófise anterior, que por sua vez faz com que a glândula adrenal

sintetize o hormônio responsável pela mediação da resposta ao estresse, cortisol nos humanos e o seu correspondente em roedores, a corticosterona (ZHANG et al., 2019a). O hipocampo, via receptores de glicocorticóides, atua regulando esse sistema em conjunto com a amígdala, suprimindo a liberação de CRH pelo hipotálamo no caso do hipocampo, enquanto a amígdala parece estimular essa resposta (LEDOUX, 2007, 2014).

A primeiras duas semanas após o nascimento constituem em ratos um período hiporresponsivo ao estresse (CHEN; BARAM, 2016). Apesar disso, o estresse precoce pode atuar tanto exacerbando ou atenuando a resposta do eixo HPA em resposta a um estressor na vida adulta, fenômenos associados com psicopatologia (ZHANG et al., 2019b, 2019a). Os receptores CRH (CRHR) e de glicocorticóides estão localizados por todo o sistema de recompensa do cérebro, e alterações na responsividade do eixo HPA podem afetar tanto a neurotransmissão quanto o comportamento relacionados ao sistema de recompensa. A sobreposição desses dois sistemas (estresse e recompensa) sugere que alterações na neurobiologia do estresse pode influenciar a resposta do sistema de recompensa (NOVICK et al., 2018), modulando a resposta do animal em situações em que a expectativa de uma recompensa não é atingida.

1.2.4 Plasticidade sináptica

Estudos demonstram que a SM pode programar modificações encefálicas por meio de alterações na plasticidade sináptica (AMINI-KHOEI et al., 2019; OVTSCHAROFF; BRAUN, 2001). A primeira glicoproteína de membrana da vesícula sináptica a ser isolada e clonada foi a sinaptofisina, que está envolvida em diferentes fases da neurotransmissão (formação do poro de fusão, regulação da liberação do neurotransmissor, endocitose da vesícula) e é considerada um marcador indireto do número de sinapses (DANDI et al., 2018; VALTORTA et al., 2004). Estudos anteriores já evidenciaram que o estresse no período neonatal altera a expressão de sinaptofisina no hipocampo de roedores machos, com as alterações mais marcantes sendo encontradas na idade adulta (ANDERSEN; TEICHER, 2004). Outra proteína importante na neuroplasticidade, a SNAP25 (proteína solúvel de ligação ao complexo de fusão, sensível à N-etilmaleimida, do inglês *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein*), uma proteína do complexo SNARE (*SNAP Receptor*), está envolvida na exocitose de neurotransmissores pelas vesículas sinápticas, assim como na regulação de canais iônicos e estabilização de espinhos dendríticos

(KÁDKOVÁ; RADECKE; SØRENSEN, 2019). Adaptações na expressão de proteínas envolvidas com a liberação de vesículas de neurotransmissores, como por exemplo a SNAP25, no hipocampo, estão envolvidas com a capacidade de responder a um estressor na vida adulta; prejuízos nestes processos de plasticidade estão associados a maior vulnerabilidade a eventos estressores (ZHOU et al., 2016).

A PSD95 (proteína de densidade pós-sináptica 95 kDa) é uma das proteínas reguladoras que constituem a densidade pós-sináptica, ajuda a organizar a estrutura tridimensional da membrana celular pós-sináptica, principalmente no que diz respeito à localização dos receptores pós-sinápticos glutamatérgicos (está diretamente ligada aos receptores NMDA e indiretamente aos receptores AMPA, através da proteína acessória TARP) (COLEY; GAO, 2018). As sinapses glutamatérgicas são o principal alvo de estudos quanto ao armazenamento de informações no sistema nervoso central envolvendo as alterações na força das sinapses dependentes da experiência e do aprendizado. Os receptores N-metil-D-aspartado (NMDA) têm um papel fundamental em muitos aspectos da plasticidade sináptica e da formação de memórias (KOPP; LONGORDO; LÜTHI, 2007). Tem-se demonstrado que mudanças na composição dos receptores NMDA são capazes de alterar o aprendizado. Por exemplo, a superexpressão de genes que codifica a subunidade GluN2B leva a fortalecimento de memórias (KOPP; LONGORDO; LÜTHI, 2007; WHITE; YOUNGENTOB, 2004).

A hipótese dessa pesquisa era a de que os ratos machos separados teriam uma maior dificuldade em lidar com a frustração do que os animais machos que não enfrentaram qualquer estressor no início da vida, demonstrada por um maior tempo necessário para normalização da resposta à recompensa após a sua diminuição, levando em consideração estudos prévios onde ratos machos que passaram pela separação materna tiveram prejuízos em tarefas envolvendo emocionalidade. Além disso, em função de estudos mostrando diferentes respostas ao estresse em fêmeas (BRIVIO; LOPEZ; CHEN, 2020), hipotetizamos que as elas se adaptariam mais facilmente à frustração e que as suas respostas seriam diferentes de acordo com a fase do ciclo estral que elas se encontravam ao realizar a tarefa. Quanto a possíveis mecanismos subjacentes a esses efeitos, nossa hipótese postulava que alterações no imunoconteúdo de proteínas envolvidas plasticidade sináptica no hipocampo e amígdala estariam associadas aos efeitos comportamentais, além de alterações no CRHR1.

2. JUSTIFICATIVA

O estresse precoce pode programar a vulnerabilidade à frustração relacionada ao comportamento frente à redução inesperada de recompensa. Esse diferente fenótipo, resultante de modificações no ambiente precocemente no desenvolvimento e com impacto a longo prazo na vida do indivíduo, poderia eventualmente afetar a suscetibilidade à dependência química (MANZO et al., 2015), por exemplo, bem como contribuir para o surgimento de distúrbios alimentares (HALMI, 2013). Como existem poucos estudos envolvendo eventos estressantes precoces (como a separação materna) correlacionados com a frustração, esperamos poder colaborar para um melhor entendimento de como o estresse no início da vida é capaz de afetar a maneira como os animais reagem aos diferentes graus de frustração e se há diferenças sexo-específicas nessas respostas.

Elucidar os mecanismos por meio dos quais a suscetibilidade à frustração surge e se esses desfechos são sexo-específicos é importante para fornecer esclarecimentos sobre a etiologia de inúmeras doenças, levando à identificação de potenciais novos alvos preventivos ou terapêuticos para patologias (BALE et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da separação materna no período neonatal sobre a frustração em ratos adultos, considerando possíveis efeitos sexo-específicos.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar se a separação materna afeta o grau de frustração em uma tarefa de redução inesperada de recompensa na vida adulta, em ratos, considerando possíveis efeitos sexo-específicos.

- Verificar se a fase do ciclo estral modifica de forma diferente o grau de frustração em uma tarefa de redução inesperada de recompensa nas fêmeas adultas intactas e submetidas à separação materna neonatal.

- Correlacionar esses achados comportamentais com marcadores de neuroplasticidade e de resposta central ao estresse na amígdala e no hipocampo dorsal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

A metodologia executada nessa pesquisa é de uso habitual dos autores e obedeceu às normas propostas pelo “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996) e a Lei AROUCA n° 11.794 de outubro de 2008. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS) sob o número 35364.

Os procedimentos que constam nesse trabalho enquadram-se nas seguintes categorias, conforme o Guia de Severidade dos Procedimentos Científicos da CEUA desta Universidade: (1) abaixo do limiar: não se aplicam; (2) procedimentos de severidade leve (separação materna, restrição alimentar (20%) nas fases de treino e teste da frustração, teste da frustração); (3) procedimentos de severidade moderada (coleta lavado vaginal); (4) procedimentos de grau severo: não se aplicam e (5) procedimentos sem recuperação (eutanásia).

4.2 Desenho experimental e tamanho amostral

O desenho experimental deste projeto, ilustrado abaixo, envolveu 2 experimentos, sendo que a realização do experimento 2 dependeu da exposição prévia a uma situação de redução inesperada de recompensa (experimento 1) (Figura 1). O experimentador era cego quanto aos grupos aos quais pertenciam os animais quando da análise dos vídeos e membranas de Western blotting.

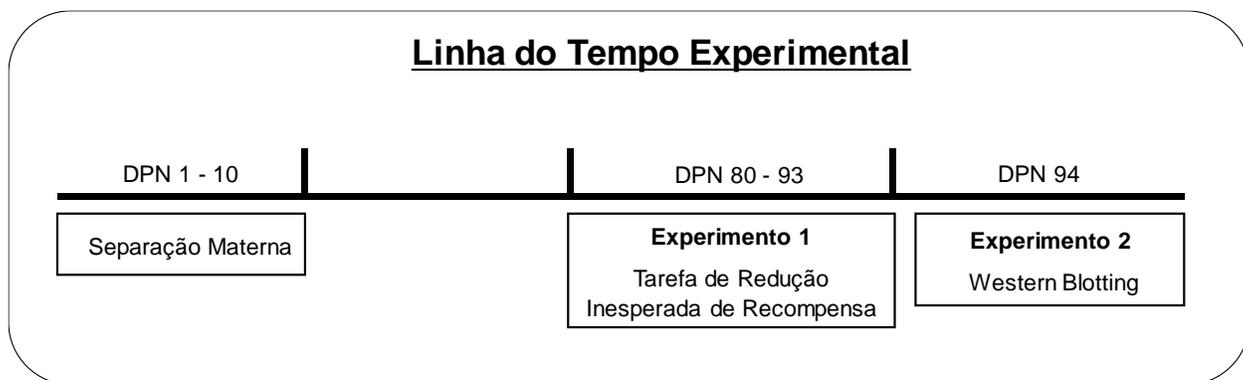


Figura 1. Esquema experimental

O tamanho amostral para cada experimento foi calculado para um valor de significância de $p = 0,05$, poder de 80%, usando estudos da área como base para a estimativa da variância e o n mínimo encontrado por grupo foi de 10 (SALINAS et al., 1997; SILVEIRA et al., 2010). Quando encontrado efeito significativo com um n amostral menor do que o estabelecido, em consonância como o princípio dos 3Rs (RUSSELL; BURCH, 1959), não completamos o quantitativo pré-estabelecido. Devido a variabilidade do ciclo estral das fêmeas também houve uma variabilidade no n desses grupos.

Foram utilizados **93 fêmeas e 46 machos** nesta pesquisa, distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais. A diferença no número total de animais entre machos e fêmeas deve-se a subdivisão das fêmeas em grupos correspondentes às fases do ciclo estral (ver **Tabela 2**).

O número de animais utilizado em cada grupo experimental está descrito na tabela abaixo. A fase do ciclo está descrita para as fêmeas no dia da redução da recompensa.

Tabela 2. Grupos do Experimento 1 - Tarefa de Redução Inesperada de Recompensa

Grupos				N
Machos	Separados	Grande Recompensa	-	8
		Pequena Recompensa	-	9
	Intactos	Grande Recompensa	-	12
		Pequena Recompensa	-	9
Fêmeas	Separados	Grande Recompensa	Estro	6
			Metaestro	4
			Diestro	5
			Proestro	5
		Pequena Recompensa	-	19
	Intactos	Grande Recompensa	Estro	6
			Metaestro	5
			Diestro	3
			Proestro	8
		Pequena Recompensa	-	17

4.3 Cuidados na manutenção dos animais

Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS, em caixas de dimensões 38 x 32 x 17 cm, confeccionadas em plexiglas com assoalho recoberto de maravalha autoclavada, e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12h (luz das 7h às 19h), com água e ração à vontade (a não ser nos 13 dias da tRIR, quando o consumo de ração foi reduzido em 20%) e temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

As ninhadas foram padronizadas em 6-9 filhotes nas 24 horas após o nascimento, considerado o dia pós-natal (DPN) 0; as ninhadas eram mistas, os filhotes que eram acrescentados/retirados das ninhadas com o intuito de padronizá-las eram selecionados aleatoriamente. Após a padronização, a ninhada passava a pertencer ao tratamento intacto (controle) ou separação materna; essa seleção também foi feita de maneira aleatória. Os filhotes foram mantidos com a mãe até o 21º dia de vida, tendo sido então desmamados e separados por sexo, 2 a 4 animais por caixa. Animais excedentes nas ninhadas foram submetidos à eutanásia conforme diretriz 33/2016 do CONCEA (CONCEA, 2016).

Do dia do desmame até o final do experimento a troca da maravalha das caixas-moradia foi completa e realizada duas vezes por semana.

Utilizou-se no máximo 2 animais de cada sexo e de cada ninhada para o mesmo grupo experimental (grande recompensa ou pequena recompensa), que será descrito no item 5.5 e apenas 1 animal de cada sexo e de cada ninhada nos experimentos bioquímicos, conforme descrito no item 5.6.1. Os protocolos experimentais estão descritos abaixo.

4.4 Separação materna (SM) neonatal

Do DPN 1 ao 10, os filhotes do grupo SM foram separados de suas mães e colocados em uma incubadora com temperatura de 32°C durante 3 horas, no ciclo claro (procedimento realizado entre 12 e 17h).

Cada ninhada foi manuseada com luva própria para evitar a propagação de odores entre os ninhos. Na separação dos filhotes de suas mães, eles foram retirados cuidadosamente do ninho e colocados em recipientes limpos, forrados com toalhas de papel, onde os irmãos permaneceram juntos durante as 3h da SM. Após esse período os filhotes foram devolvidos às suas respectivas caixas moradia. As mães permaneceram na caixa moradia na mesma sala da incubadora, podendo

assim ouvir as vocalizações dos seus filhotes. Após o período de 10 dias da SM, os filhotes deste grupo permanecem sem perturbação até o desmame, exceto pela limpeza das caixas moradia.

Os animais intactos (controle) não passaram por nenhuma intervenção no início da vida, a não ser pela limpeza das caixas moradia (DIEHL et al., 2007).

Do nascimento até o desmame dos animais, a limpeza da caixa moradia de todos os grupos experimentais desta pesquisa foi realizada apenas quando necessário e da seguinte forma: a maravalha suja foi removida da caixa e substituída por maravalha limpa. A maravalha próxima à área do ninho foi preservada.

4.5 Experimento 1 - Tarefa de Redução Inesperada da Recompensa (tRIR)

Para avaliar a resposta de frustração dos animais foi utilizada a tarefa de redução inesperada de recompensa, que tem duração de 13 dias (LESZCZUK; FLAHERTY, 2000; ROSAS et al., 2007; SABARIEGO et al., 2013; SALINAS et al., 1997). Durante esse período os animais de todos os grupos experimentais receberam 80% da alimentação que estavam acostumados a consumir. Essas medidas foram calculadas com base no consumo de cada caixa durante os três dias anteriores ao primeiro dia da tarefa. Além disso, durante esse mesmo período foi realizada a habituação ao consumo dos cereais doces, onde cada rato recebeu 1 unidade de cereal doce (Froot Loops®) na caixa moradia.

Em cada um dos 13 dias da tRIR os animais ficavam 20 minutos na sala onde a tarefa seria realizada antes do início do comportamento para que se ambientassem. A luz do ambiente era de intensidade moderada. A tRIR foi realizada no ciclo claro, entre 12 e 18hs.

A tRIR foi realizado em um corredor retangular medindo 41 x 12 x 110 cm, construído em MDF com paredes e piso na cor preta. Os animais foram colocados em uma das extremidades do corredor pelo pesquisador, e permaneceram 60s no aparato; o objetivo da tarefa era que eles chegassem à outra extremidade do corredor onde se encontravam os cereais doces (alvo) e os consumissem. Após os 60s os animais foram retirados do corredor pelo pesquisador, que os segurava gentilmente durante 30s e, ao fim desse período, colocava os animais novamente no aparato. Durante esse intervalo de 30s entre as tentativas também era feita a contagem dos cereais consumidos e feita a reposição para a quantidade original. Foram realizadas 6 tentativas de 60s por dia com intervalo de 30s entre elas para todos os animais que passaram pela tRIR (Figura 2) (SALINAS et al., 1997).

tRIR - Tentativas por dia	
	TENTATIVA
Dia 1	1, 2, 3, 4, 5, 6
Dia 2	7, 8, 9, 10, 11, 12
Dia 3	13, 14, 15, 16, 17, 18
Dia 4	19, 20, 21, 22, 23, 24
Dia 5	25, 26, 27, 28, 29, 30
Dia 6	31, 32, 33, 34, 35, 36
Dia 7	37, 38, 39, 40, 41, 42
Dia 8	43, 44, 45, 46, 47, 48
Dia 9	49, 50, 51, 52, 53, 54
Dia 10	55, 56, 57, 58, 59, 60
Dia 11	61, 62, 63, 64, 65, 66
Dia 12	67, 68, 69, 70, 71, 72
Dia 13	73, 74, 75, 76, 77, 78

Figura 2. Tentativas por dia na tRIR.

Todos os dias da tRIR foram gravados e posteriormente analisados através do *software* AnyMaze® Versão 6.22 (Stoelting Co, EUA) conforme descrito no item 4.5.2.

Na tRIR foi contabilizada a quantidade de cereais doces consumidos, a latência (em segundos) para chegar ao alvo, e o número de entradas no alvo e a distância total percorrida pelo rato no aparato. Destas quatro medidas, a única contabilizada no momento do experimento foi a quantidade de cereais consumida; as outras foram analisadas através do *software* AnyMaze®.

Quanto à recompensa recebida, esse experimento comportamental possui dois **grupos** (Figura 3):

- Grande Recompensa (GR): recebeu 10 *pellets* de cereal adocicado a cada tentativa (cada *pellet* corresponde a um quarto de cereal) nos 10 primeiros dias da tarefa, e 1 *pellet* nos dias 11, 12 e 13.
- Pequena recompensa (PR), o grupo controle da tarefa: recebeu 1 *pellet* de cereal doce a cada tentativa durante os 13 dias de experimento.

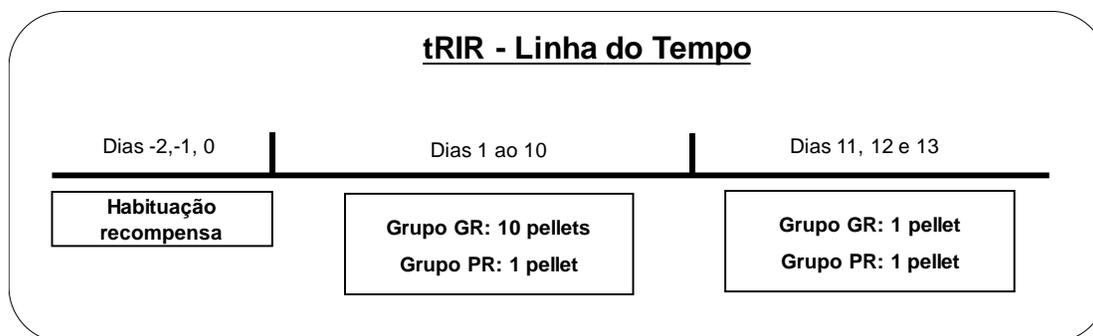


Figura 3. Linha do tempo da tRIR.

Aplicou-se o seguinte critério de exclusão: comer os cereais doces em menos de 50% das tentativas nos dias 9 e 10 da tarefa. Este critério baseia-se no fato de que um dos requisitos para a realização desta tarefa é que os animais tenham aprendido a esperar uma recompensa no final do corredor. **78 fêmeas** e **41 machos** participaram de todos os dias da tarefa de redução inesperada de recompensa ($n = 119$). No experimento 2, **7 animais** por grupo foram utilizados, totalizando 28 machos e 28 fêmeas (ARCEGO et al., 2018; COUTO-PEREIRA et al., 2019; LAMPERT et al., 2017).

As ratas fêmeas tiveram seu o ciclo estral avaliado durante os 13 dias da tRIR e no dia da eutanásia conforme descrito a seguir.

4.5.1 Análise do ciclo estral

Para determinar em qual fase do ciclo estral (estro, metaestro, diestro e proestro) as ratas se encontravam foi realizada a coleta do lavado vaginal utilizando uma pipeta com ponteira de polietileno, de ponta romba, contendo 40 μ l de solução salina 0,9%. A ponta da ponteira era introduzida no orifício vaginal e na sequência a solução salina era injetada, aspirada e colocada em uma lâmina previamente identificada para a visualização ao microscópio a fresco, com magnificação de 10 a 40 vezes, não sendo necessário o uso de lamínula (ANTUNES et al., 2016; MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; VILELA; JÚNIOR; SILVA, 2007).

Esse procedimento foi executado em todos os 13 dias de comportamento, após a realização da tRIR e antes da eutanásia desses animais levando em conta a importância da influência hormonal nesse tipo de experimento (FRYE; PETRALIA; RHODES, 2000; MARCONDES et al., 2001).

O dia utilizado para a definição do quantitativo de ratas pertencentes aos diferentes grupos descritos no item 5.2 foi o Dia 11 da tRIR, quando ocorre a redução inesperada da recompensa nos grupos GR. Devido a duração fixa da tRIR não foi possível sacrificar as fêmeas em apenas uma fase do ciclo estral.

O experimento 1 foi realizado em cinco levadas diferentes. Após a realização da tRIR os animais foram selecionados aleatoriamente para o experimento 2.

4.5.2 Análise da Tarefa de Redução Inesperada de recompensa pelo *software* AnyMaze®

Os vídeos gravados durante o experimento comportamental foram analisados posteriormente através do *software* AnyMaze®.

Foi definida uma área do aparato correspondente ao local onde se encontrava a recompensa, que se denominou área alvo, e as suas dimensões foram mantidas em todas as análises. Cada vídeo de cada tentativa foi analisado individualmente, e a análise começava assim que o animal era deixado no chão do aparato e terminava aos 60s.

Os dados coletados foram: latência (em segundos) para chegar ao alvo e número de entradas no alvo e a distância total percorrida pelo rato no aparato (em metros).

A latência foi analisada em blocos de 3 tentativas, resultando em duas medidas por dia, para as quais se calculou a média da latência das tentativas correspondentes. O número de entradas, locomoção e consumo foram analisados como média das 6 tentativas de cada dia da tRIR.

4.6 Experimento 2 - Avaliação neuroquímica

4.6.1 Aquisição das amostras: Dissecção do Hipocampo Dorsal (HcD) e da Amígdala Basolateral (ABL)

Os animais que passaram pela tRIR foram selecionados aleatoriamente para participarem das avaliações neuroquímicas, num total de 7 animais por grupo, conforme a Tabela 3. Vinte e quatro horas após o Dia 13 da tRIR, os animais foram rapidamente mortos por decapitação utilizando guilhotina, por um pesquisador treinado. Os cérebros foram removidos e rapidamente dissecados em gelo utilizando uma matriz de acrílico (#AL-1160, Alto) e fatiados coronalmente em fatias de 2mm com o intuito de separar as regiões de interesse, o HcD e a ABL. Essas estruturas foram identificadas utilizando um atlas do encéfalo de ratos (PAXINOS, G.; WATSON, 1986), sendo que os limites para HcD foram definidos pelas fatias a partir do bregma de -2mm até

aproximadamente -5.52mm e a para a ABL, que foi dissecada utilizando um *punch* de 2mm de diâmetro, as fatias utilizadas como referência foram do bregma -2mm ao -4mm. As amostras foram coletadas dos dois hemisférios cerebrais e imediatamente identificadas e armazenadas a -80°C para subsequente análise pela técnica de Western Blotting.

Tabela 3. Grupos do Experimento 2 – Avaliação Neuroquímica

Grupos			n
Machos	Separados	GR	7
		PR	7
	Intactos	GR	7
		PR	7
Fêmeas	Separados	GR	7
		PR	7
	Intactos	GR	7
		PR	7

4.6.2 Preparo das amostras para avaliação neuroquímica: Extração de Proteínas

As amostras do HcD e da ABL foram descongeladas em gelo e homogeneizadas em tampão de lise 1:8 (m:v) gelado, pH = 7,9: HEPES 10 mM (99,5% de pureza), KCl 10 mM, EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) 0,6mM, coquetel inibidor de protease (Roche®, Alemanha) edesoxicolato de sódio 2,5%. Foi adicionado NP-40 10% para uma concentração final de 1%, as amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos e agitadas em agitador tipo vórtex por 10 segundos. Posteriormente foram centrifugadas a 10.000 g, durante 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante contendo as proteínas foi coletado (ARCEGO et al., 2016).

4.6.3 Western blotting

A concentração de proteínas totais nas amostras (sobrenadante) foi determinada utilizando um kit comercial de ensaio de proteínas BCA [Pierce™, Thermo Fisher Scientific®, EUA]). As amostras (40 µg de proteínas totais) foram desnaturadas e reduzidas com dodecilsulfato de lítio (LDS) e mercaptoetanol 5% e carregadas em géis pré-moldados de poli(acrilamida) NuPAGE®

gradiente 4-12%(Life Technologies, ThermoFisherScientific®, EUA). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas (XCellSureLock® MiniCell, Invitrogen, EUA) para membranas de nitrocelulose (1h50min, a 50 V em solução tampão de transferência [Trizma 48 mM, glicina 39 mM, 20% de metanol]). As membranas foram então bloqueadas por 2 horas em solução tampão Tris contendo tween e 5% (m/v) de leite em pó desnatado.

As membranas foram incubadas durante a noite, a 4°C, com um dos seguintes anticorpos primários:

Tabela 4. Anticorpos primários utilizados no Experimento 2

Anticorpo (concentração)	Código	Marca/País
anti-CRHR1 (1:500)	#SAB2500272	Sigma-Aldrich/EUA
anti-GluN2B (1:1000)	#06600	Merck/Alemanha
anti-GluN2A (1:1000)	#M264	Sigma-Aldrich/EUA
anti-PSD95 (1:1000)	#36233	CellSignaling Technology/EUA
Anti-Sinaptofisina (1:1000)		Millipore/Alemanha
Anti-SNAP25(1:1000)	#s9684	Sigma-Aldrich/EUA
anti-Tubulina (1:2000)	#T6074	Sigma-Aldrich/EUA

Os anticorpos secundários utilizados constam na Tabela 5 e foram incubados por 2 horas em temperatura ambiente.

Tabela 5. Anticorpos secundários utilizados no Experimento 2

Anticorpo (concentração)	Código	Marca/País
anti-rabbit, conjugado com peroxidase (1:1000)	#AP132P	Merck-Millipore/Alemanha
anti-rabbit, conjugado com peroxidase (1:1000)	#NA934V	GE Healthcare/Reino Unido
anti-mouse (1:1000)	#402335	Calbiochem-Merck/Alemanha
anti-goat (1:1000)	#AP106P	Millipore/ Alemanha

As membranas foram reveladas kit de quimioluminescência (Amersham™ ECL, GE Healthcare, Reino Unido) e as imagens foram adquiridas por meio de um sistema de imagens

digitais (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences) e analisadas usando o software Image Studio Lite 5.2.5 (Li-cor, EUA). Os resultados foram quantificados como a razão entre a densidade óptica (DO) da proteína de interesse e da Tubulina da mesma amostra e são expressos em razão relativa do controle (grupo Intacto PR)(ARCEGO et al., 2016, 2018; COUTO-PEREIRA et al., 2016; LAMPERT et al., 2017).

4.7 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software SPSS versão 19.0. Na tarefa de redução inesperada de recompensa, para as variáveis latência em blocos de 3 tentativas e entradas no alvo utilizou-se ANOVA de medidas repetidas (usando como variável dependente latência por bloco de tentativa ou número de entradas no alvo e como fatores independentes intervenção neonatal, sexo, grupo (pequena ou grande recompensa), corrigindo-se por leva), enquanto para o consumo e locomoção no Dia 10 foi utilizada ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e sexo, corrigindo-se por leva).

Nas avaliações neuroquímicas foi utilizada ANOVA de duas vias, usando como fatores intervenção neonatal e grupo.

A esfericidade dos dados foi testada previamente à ANOVA de medidas repetidas, usando o Teste de Esfericidade de Mauchly. Quando não foi possível assumir a esfericidade, utilizou-se a correção de Greenhouse-Geisser. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. Resultados

No Anexo I apresentam-se todos os resultados dos testes estatísticos.

5.1 Tarefa de redução inesperada de recompensa

Na latência para chegar ao alvo no Dia 11, o dia onde ocorre a redução inesperada de recompensa para os grupos GR, foi encontrado um efeito significativo do grupo [$F(1,83) = 16,757$; $p < 0,001$] e uma interação entre o grupo e o bloco de tentativas [$F(1,83) = 27,227$, $p = <0,001$], validando assim a tRIR, já que os animais do grupo pequena recompensa (linhas tracejadas) são diferentes dos animais que recebem grande recompensa durante os 10 primeiros dias do protocolo (linhas sólidas), havendo um aumento significativo no segundo bloco de tentativas para os animais

do grupo GR (64-66), demonstrando um aumento da latência frente a percepção da redução inesperada da recompensa (Fig. 4). Ainda, foi encontrada uma interação significativa entre o bloco de tentativas, o grupo e o tratamento pós-natal no Dia 11, podendo se inferir que os animais S do grupo GR tiveram uma latência superior aos demais grupos [$F(3,942,327,191) = 2,789, p = 0,027$]. Essa diferença na latência para chegar ao alvo nos animais S do grupo GR permaneceu dias após a redução de recompensa, conforme demonstrado pela interação significativa entre bloco de tentativas, tratamento pós-natal e grupo [$F(3,942;327,191) = 2,789; p = 0,027$] (Fig. 4), sugerindo que estes animais têm mais dificuldade em se adaptar à situação. Quando esses resultados foram analisados utilizando as fases do ciclo estral agrupadas em fases folicular (proestro e estro) e lútea (metaestro e diestro) (ANTUNES et al., 2016; EMANUELE et al., 1997) como covariável não foram encontradas diferenças entre os grupos ou tratamentos [$F(1,40) = 1,131; p = 0,294$].

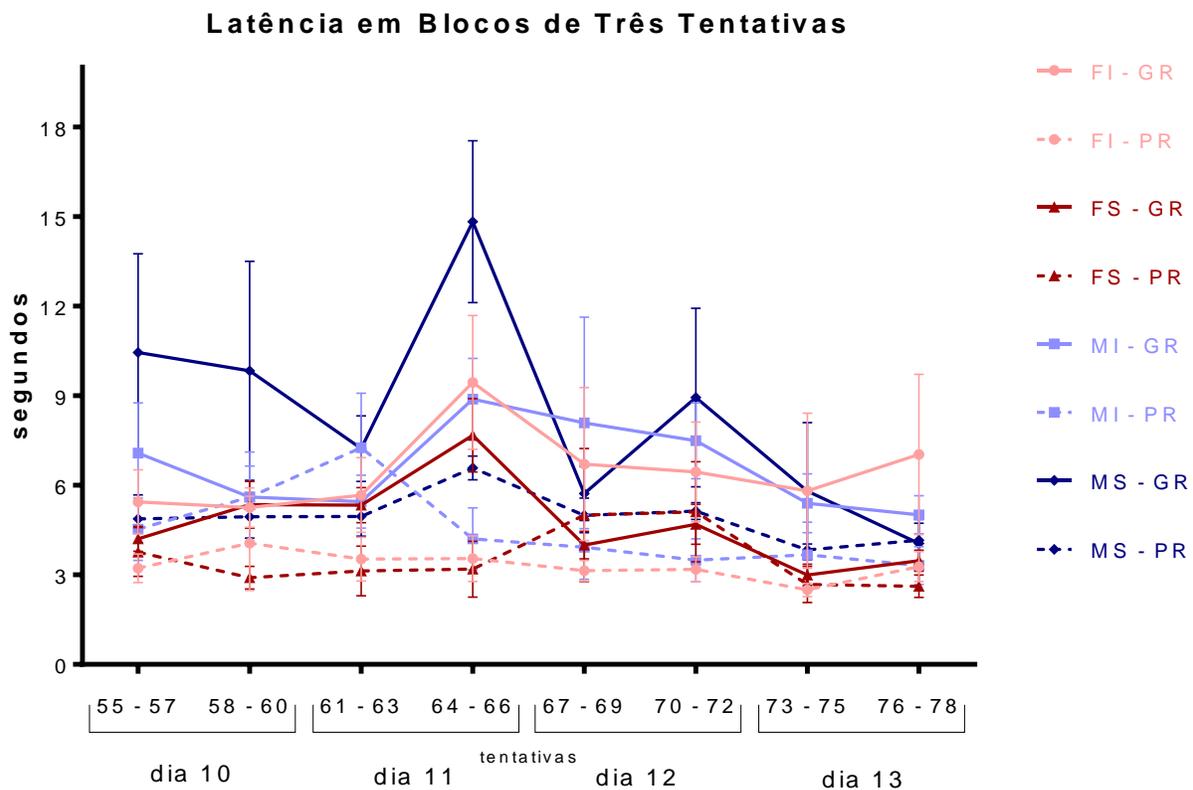


Figura 4. Latência para chegar ao alvo (segundos) agrupadas em blocos de 3 tentativas, ao longo dos dias 10 a 13. Os dados são apresentados como média \pm EPM. ANOVA de medidas repetidas (intervenção neonatal, sexo, grupo, bloco de tentativa, corrigindo-se por leva). n: 8-22

animais/grupo. IGR: Intacto Grande Recompensa, IPR: Intacto Pequena Recompensa, SGR: Separado Grande Recompensa, SPR: Separado Pequena Recompensa.

Nas entradas no alvo ao longo dos Dias 10 a 13 do experimento foi encontrada uma interação entre tempo, grupo e tratamento pós-natal [$F(3,249) = 5,437, p = 0,001$], uma interação entre tempo e grupo [$F(3,249) = 10,722, p < 0,001$] e um efeito do tempo nas entradas no alvo, [$F(3,249) = 9,099, p < 0,001$] (Fig.5) , onde podemos observar que ao longo dos Dias 11 a 13 há um aumento no número de entradas nos animais do Grupo GR frente a redução inesperada de recompensa, quando comparado com dia 10, o que não acontece com o grupo controle PR [$F(3,249) = 10,722, p < 0,001$]. Este efeito parece ser mais relevante para os animais S.

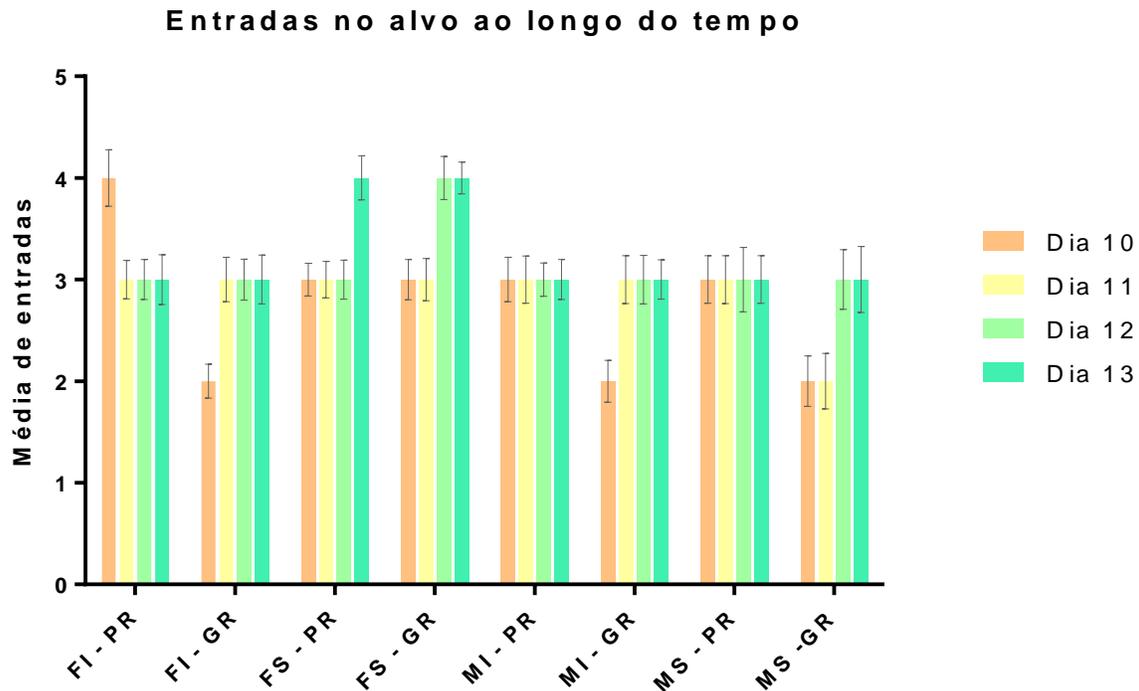


Figura 5. Média de entradas no alvo ao longo dos Dias 10 a 13 do experimento. Os dados são apresentados como média \pm EPM. ANOVA de medidas repetidas para o número de entradas no alvo, sendo fatores independentes intervenção neonatal, sexo e grupo (grande ou pequena recompensa), corrigindo-se por leva. N: 8-22 animais/grupo. FI: Fêmea Intacto, FS: Fêmea Separado, MI: Macho Intacto, MS: Macho Separado, GR: Grande Recompensa, PR: Pequena Recompensa.

Quanto ao consumo de cereais doces pelo grupo GR no Dia 10 da tarefa de redução inesperada de recompensa, não foram encontrados efeitos do sexo nem do tratamento pós-natal [$F(1,44) = 0,26$, $p = 0,872$ e $F(1,44) = 0,19$; $p = 0,892$, respectivamente] (Fig.6), demonstrando que todos os efeitos encontrados a partir do Dia 11 da tRIR não foram causados por uma diferença prévia no aprendizado da tarefa ou preferência ou não por alimentos doces.

Também foi avaliada a distância percorrida pelos animais no aparato no Dia 10 da tarefa comportamental, onde foi encontrado um efeito significativo do sexo, com as fêmeas mostrando maior atividade locomotora no aparato em relação aos machos [Fêmeas: $3,768 \pm 0,152$ m; Machos: $3,221 \pm 0,239$ m; $F(1,44) = 8,214$, $p = 0,006$]. Não foi encontrado efeito do tratamento pós-natal na atividade locomotora desses animais [$F(1,44) = 0,003$, $p = 0,958$], evidenciando que as alterações encontradas na latência não parecem se dever a efeitos na motricidade causados pela SM.

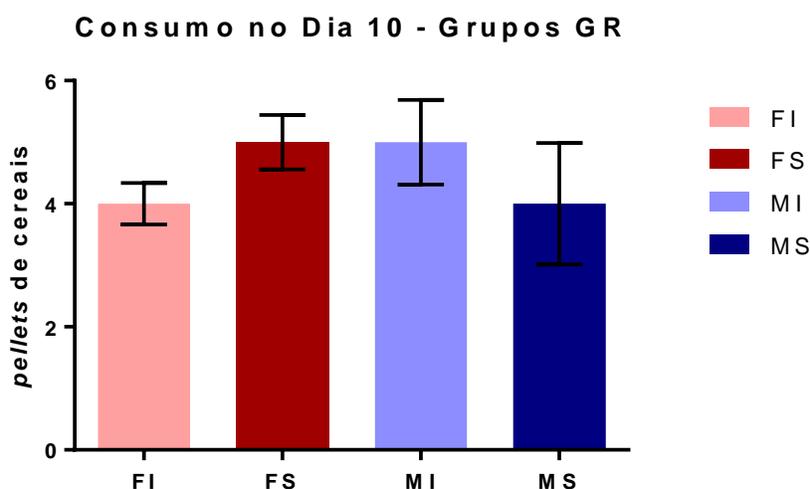


Figura 6. Consumo dos cereais doces nos grupos grande recompensa no dia 10. Os dados são apresentados como média \pm EPM. ANOVA usando sexo e tratamento pós-natal como fatores, corrigindo-se por leva. N: 8-22 animais/grupo. GR: Grande Recompensa, FI: Fêmea Intacto, FS: Fêmeas Separado, MI: Macho Intacto, MS: Macho Separado.

5.2 Experimento 2 – Avaliação Neuroquímica

5.2.1 Machos - HcD

Observou-se uma interação significativa entre o tratamento pós-natal e o grupo no imunoconteúdo da subunidade GluN2A [$F(1,24) = 8,710, p = 0,007$] (Fig.7A). Nos animais do grupo GR que passaram pela SM encontramos diminuição da subunidade GluN2A dos receptores NMDA quando estes são comparados com seus controles, enquanto os animais que não passaram pela SM não demonstram alterações nesta subunidade.

Na subunidade GluN2B também houve uma interação significativa entre o tratamento pós-natal e o grupo [$F(1,24) = 9,686, p = 0,005$] (Fig.7B), mas nesta subunidade observou-se um aumento no imunoconteúdo desta subunidade do receptor NMDA nos animais do grupo GR que passaram pela SM e uma diminuição nos animais do mesmo grupo que permaneceram sem nenhuma intervenção no início da vida.

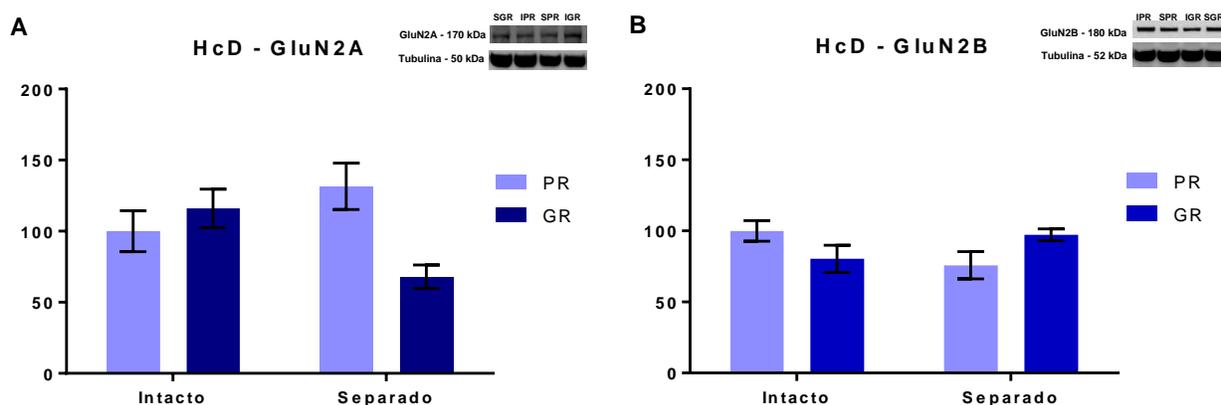


Figura 7. Imunoconteúdo das subunidades GluN2A (A) e GluN2B (B) do receptor NMDA no HcD de machos, 24hs após o Dia 13, último dia em que os animais foram submetidos à avaliação comportamental. Os dados são apresentados como média \pm SEM. *Interação tratamento pós-natal x grupo. ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e grupo). n: 7 animais/grupo. PR: Pequena Recompensa, GR: Grande Recompensa

Foi observada uma tendência de efeito da SM no imunoconteúdo da SNAP25 [$F(1,24) = 3,788, p = 0,063$] (Fig. 8A), com os animais deste grupo apresentando menores quantidades desta proteína quando comparados com os animais I. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nas proteínas Sinaptofisina [$F(1,24) = 0,231, p = 0,635$] (Fig. 8B) e PSD95 [$F(1,24) = 0,176, p = 0,679$] (Fig. 8C) no HcD dos ratos 24hs após o Dia 13 da tarefa comportamental.

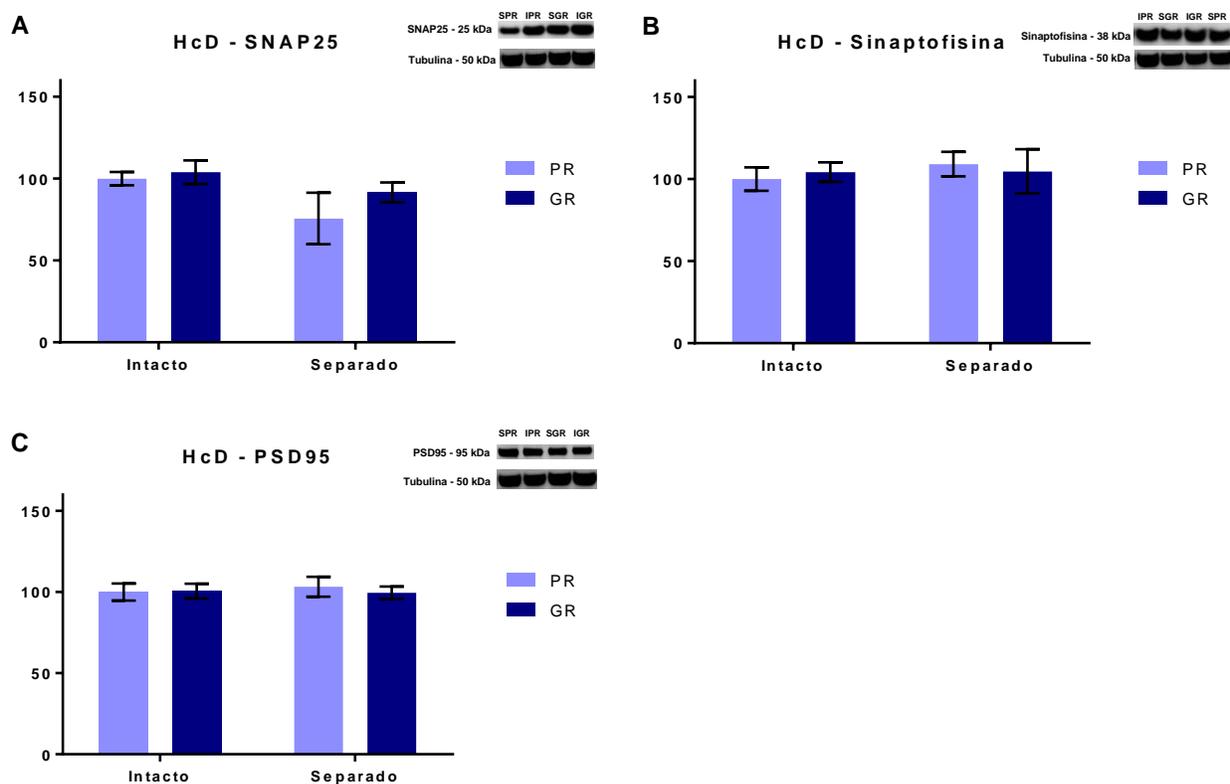


Figura 8. Imunoconteúdo das proteínas de plasticidade sináptica SNAP25 (A), Sinaptofisina (B) e PSD95 (C) no HcD de ratos machos, 24hs após o Dia 13. Os dados são apresentados como média \pm SEM. ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e grupo). n: 7 animais/grupo. PR: Pequena Recompensa, GR: Grande Recompensa.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação aos receptores de CRF1 no HcD dos animais 24h após o 13º dia da tRIR [$F(1,24) = 3,15, p = 0,089$] (Fig.9).

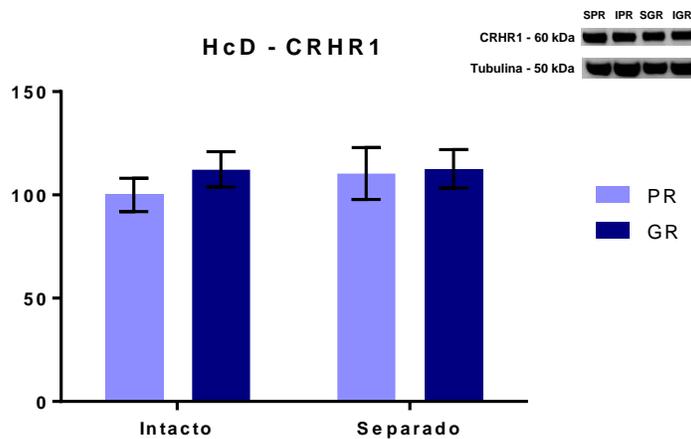


Figura 9. Imunoconteúdo do receptor CRF1 no HcD, 24hs após o Dia 13. Os dados são apresentados como média \pm SEM. ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e grupo). n: 7 animais/grupo. PR: Pequena Recompensa, GR: Grande Recompensa.

5.2.2 Machos - ABL

Não foram encontrados efeitos significativos entre os grupos nas subunidades GluN2A [F (1,24) = 0,007, p = 0,935] e GluN2B [F (1,24) = 1,113, p = 0,302] dos receptores NMDA na ABL dos machos 24h após o Dia 13 da tRIR (Fig.10).

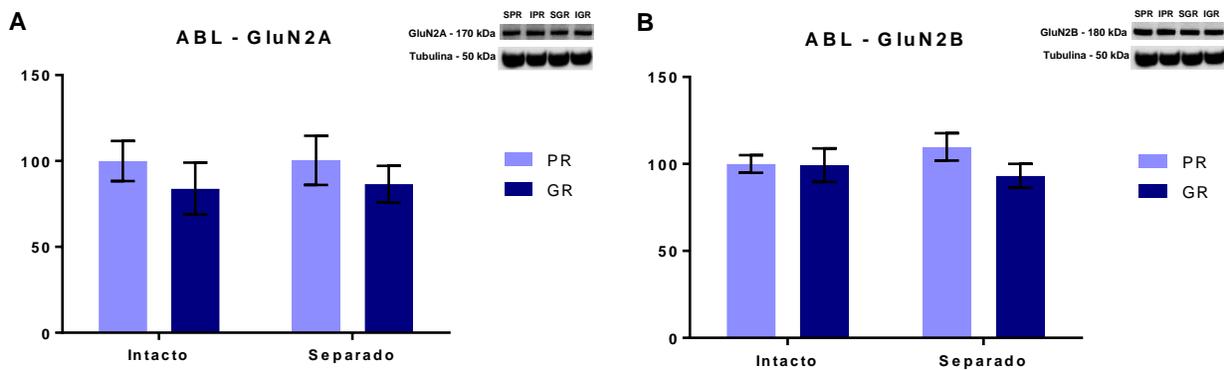


Figura 10. Imunoconteúdo das subunidades GluN2A (A) e GluN2B (B) do receptor NMDA na ABL de machos, 24h após o Dia 13. Os dados são apresentados como média \pm SEM. ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e grupo). n: 7 animais/grupo. PR: Pequena Recompensa, GR: Grande Recompensa.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nas proteínas SNAP25 [F(1,18) = 0,798, p= 0,383] (Fig. 11A), Sinaptofisina [F(1,24) = 0,34; p = 854] (Fig.11B) e PSD95 [F(1,24) = 0,975, p= 0,333] (Fig. 11C) na ABL dos ratos machos 24h após o Dia 13 do experimento 1.

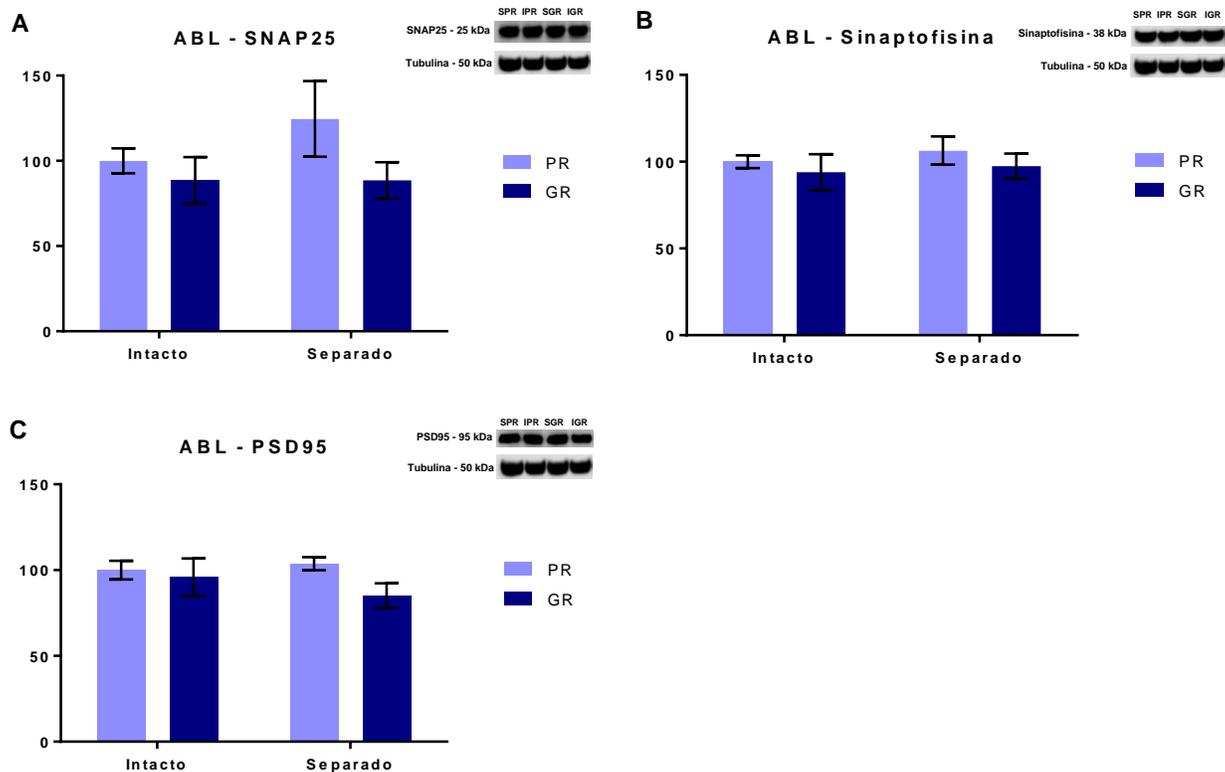


Figura 11. Imunoconteúdo das proteínas de plasticidade sináptica SNAP25 (A), Sinaptofisina (B) e PSD95 (C) na ABL de ratos machos, 24h após o Dia 13. Os dados são apresentados como média \pm SEM. ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e grupo). n: 4-7 animais/grupo. PR: Pequena Recompensa, GR: Grande Recompensa.

No imunoconteúdo do receptor de CRHR1 encontramos uma tendência a um efeito do grupo [$F(1,24) = 3,15$, $p = 0,089$] (Fig.12), sendo que o grupo GR tende a exibir menores níveis desse receptor.

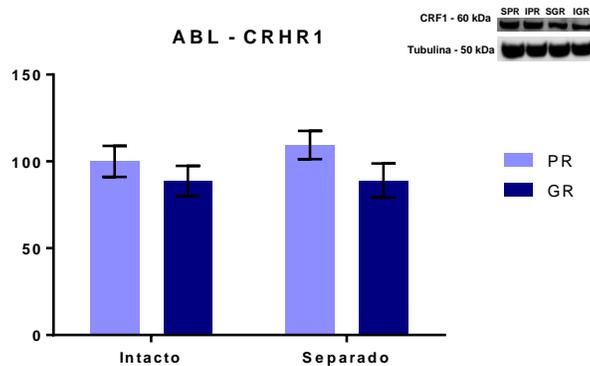


Figura 12. Imunoconteúdo do receptor CRHR1 na amígdala basolateral, 24h após o Dia 13. Os dados são apresentados como média \pm SEM. ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e grupo). n: 7 animais/grupo. PR: Pequena Recompensa, GR: Grande Recompensa.

5.2.3 Fêmeas - HcD

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação às subunidades do receptor NMDA no HcD dos animais 24hs após o DIA 13 da tRIR [$F(1,23) = 0,151, p = 0,701$] (Fig. 13A) e [$F(1,23) = 0,23, p = 0,636$] (Fig.13B).

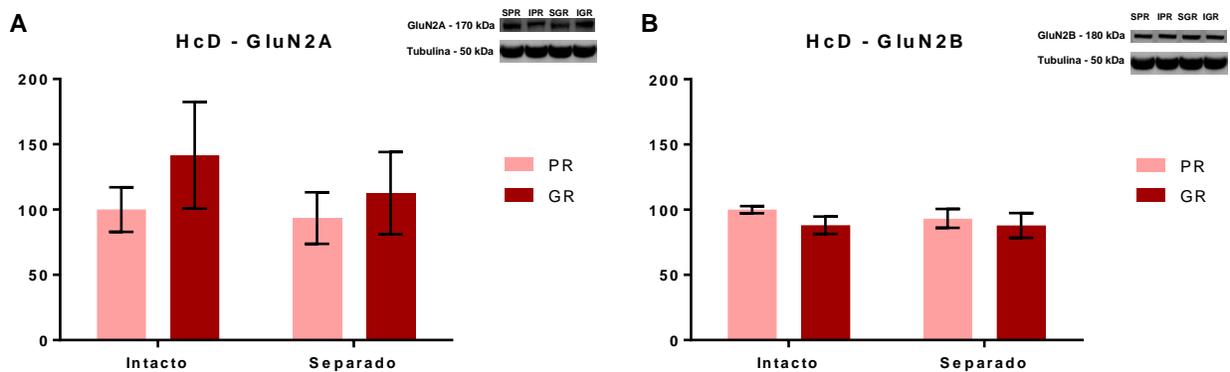


Figura 13. Imunoconteúdo das subunidades GluN2A (A) e GluN2B (B) do receptor NMDA no HcD de fêmeas, 24h após o Dia 13. Os dados são apresentados como média \pm SEM. ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e grupo). n: 6-7 animais/grupo. PR: Pequena Recompensa, GR: Grande Recompensa.

Para as proteínas de plasticidade sináptica também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos: SNAP25 [$F(1,23) = 0,3, p = 0,863$] (Fig. 14A), Sinaptofisina [$F(1,23) = 0,028, p = 0,869$] (Fig. 14B), PSD95 [$F(1,23) = 0,128, p = 0,724$] (Fig. 14C).

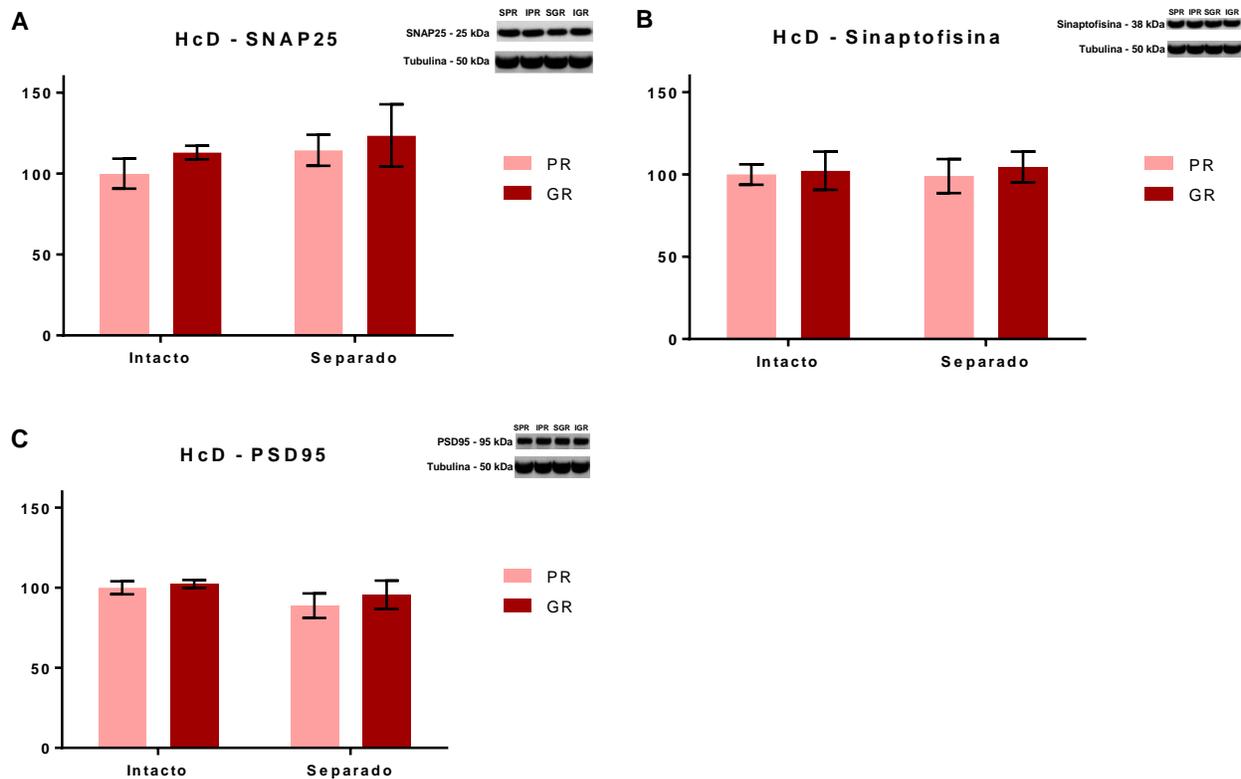


Figura 14. Imunoconteúdo das proteínas de plasticidade sináptica SNAP25 (A), Sinaptofisina (B) e PSD95 (C) no HcD de ratas, 24hs após o Dia 13. Os dados são apresentados como média \pm SEM. ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e grupo). n: 6-7 animais/grupo. PR: Pequena Recompensa, GR: Grande Recompensa.

O imunoconteúdo dos receptores CRHR1 no HcD das fêmeas não apresentou diferenças significativas entre os grupos [$F(1,23) = 0,139$, $p = 0,713$] (Fig. 15).

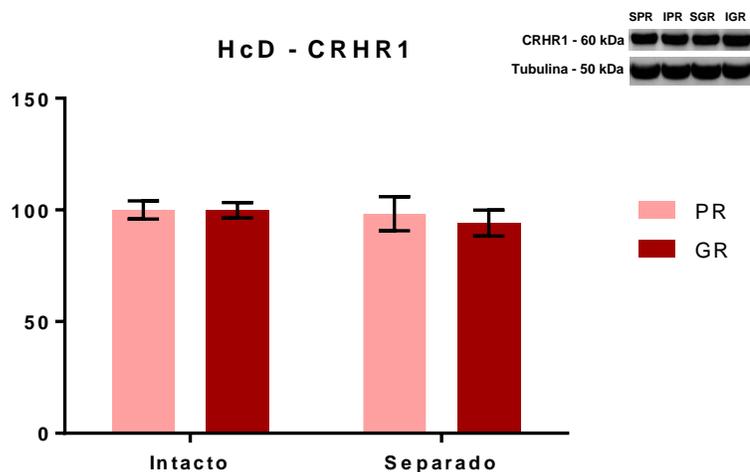


Figura 15. Imunoconteúdo do receptor CRHR1 no HcD, 24h após o Dia 13. Os dados são apresentados como média \pm SEM. ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e grupo). n: 6-7 animais/grupo. PR: Pequena Recompensa, GR: Grande Recompensa.

5.2.4 Fêmeas – ABL

Na ABL das fêmeas 24h após o Dia 13 da tRIR não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na subunidade GluN2A [$F(1,23) = 0,081$, $p = 0,779$] (Fig. 16A) nem na subunidade GluN2B [$F(1,23) = 0,732$, $p = 0,401$] (Fig. 16B) dos receptores NMDA.

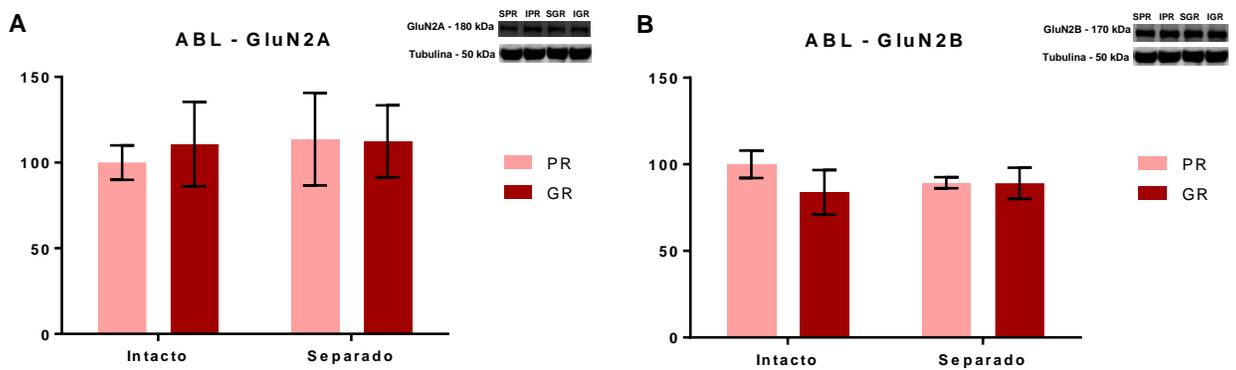


Figura 16. Imunoconteúdo das subunidades GluN2A (A) e GluN2B (B) do receptor NMDA na amígdala basolateral de fêmeas, 24h após o Dia 13. Os dados são apresentados como média \pm SEM. ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e grupo). n: 6-7 animais/grupo. PR: Pequena Recompensa, GR: Grande Recompensa.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no imunoconteúdo das proteínas de plasticidade sináptica: SNAP25 [$F(1,23) = 0,137$, $p = 0,715$] (Fig. 17A), Sinaptofisina [$F(1,23) = 0,418$, $p = 0,524$] (Fig. 17B), PSD95 [$F(1,23) = 0,071$, $p = 0,792$] (Fig. 17C).

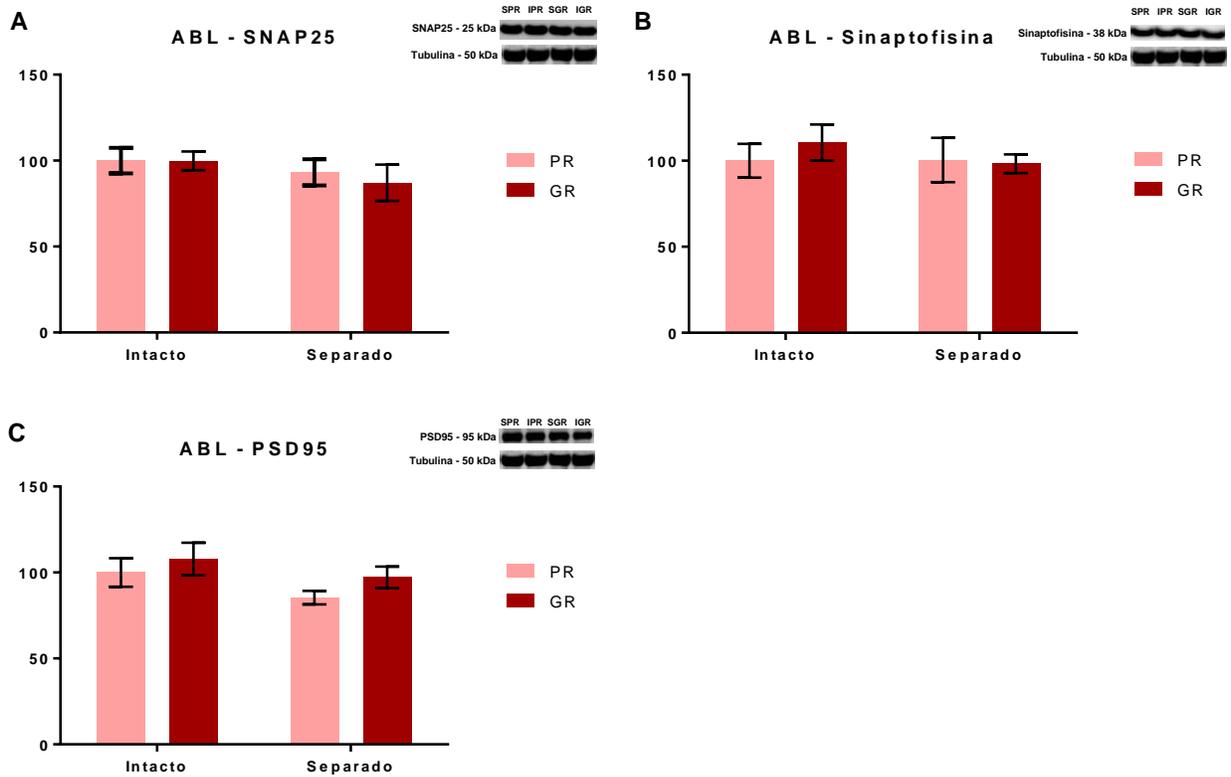


Figura 17. Imunoconteúdo das proteínas de plasticidade sináptica SNAP25 (A), Sinaptofisina (B) e PSD95 (C) na amígdala basolateral de ratas, 24h após o Dia 13. Os dados são apresentados como média \pm SEM. ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e grupo). n: 6-7 animais/grupo. PR: Pequena Recompensa, GR: Grande Recompensa.

Do mesmo modo, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no imunoconteúdo dos receptores CRF1 na ABL das fêmeas [$F(1,23) = 0,126$, $p = 0,726$] (Fig. 18).

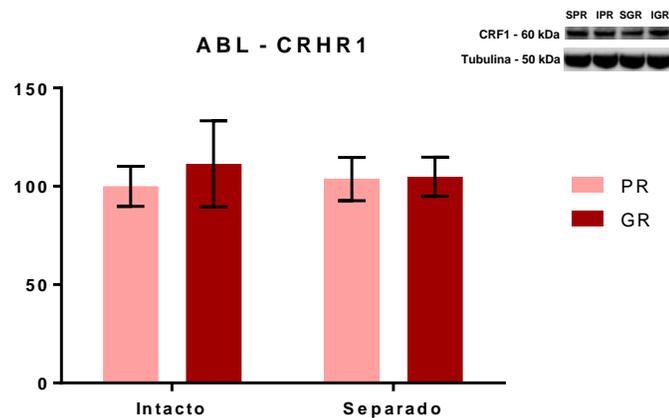


Figura 18. Imunoconteúdo do receptor CRF1 na amígdala basolateral de fêmeas, 24h após o Dia 13. Os dados são apresentados como média \pm SEM. ANOVA de duas vias (intervenção neonatal e grupo). n: 6-7 animais/grupo. PR: Pequena Recompensa, GR: Grande Recompensa.

6. Discussão

Os principais achados desta Dissertação mostram efeitos sexo-específicos tanto no comportamento quanto nas medidas neuroquímicas realizadas. Foi observada diferente vulnerabilidade à frustração pela redução inesperada de uma recompensa na idade adulta: os ratos machos separados mostraram maior latência de adaptação a uma nova situação de recompensa comparados aos animais controle e às fêmeas separadas. Paralelamente a esse efeito comportamental, houve redução diminuição no imunoconteúdo da subunidade GluN2A do receptor NMDA e aumento na subunidade GluN2B no hipocampo dorsal de ratos machos submetidos à separação materna, e esse efeito não foi observado nas fêmeas.

A perda de uma recompensa esperada pode ter um impacto negativo sobre o estado emocional do indivíduo, podendo torná-lo mais vulnerável a estressores subsequentes. Estudos sugerem que a resposta à frustração causada pela redução inesperada de recompensa pode levar ao surgimento de comportamentos aditivos, como o consumo excessivo de álcool, e antidepressivo (GUARINO; CONRAD; PAPINI, 2020; MANZO et al., 2015), sendo esse um fator de interesse quando tenta-se entender a origem desses comportamentos. Adicionalmente, experiências aversivas durante o desenvolvimento podem programar o organismo para responder de forma mais ou menos exacerbada a situações desfavoráveis na idade adulta. Até onde sabemos, esse é primeiro trabalho que avalia como o estresse precoce, mais especificamente a separação materna, influencia a resposta à redução inesperada de recompensa.

Adversidades no início da vida podem levar a alterações duradouras no encéfalo, tanto em humanos (TEICHER, 2018; TEICHER et al., 2016) quanto em roedores (GILDAWIE; HONEYCUTT; BRENHOUSE, 2020; HONEYCUTT et al., 2020; MAJCHER-MAŚLANKA; SOLARZ; CHOCHYK, 2019). O presente trabalho mostrou que a separação materna modificou a resposta de frustração frente à redução inesperada de recompensa. Esse achado vem ao encontro de outros estudos que mostraram alterações na emocionalidade em ratos adultos que passaram pela separação materna, como resistência a reconsolidação de memórias aversivas (COUTO-PEREIRA et al., 2019), comportamento tipo-ansioso (DE LIMA et al., 2020; KAMBALI et al., 2019) e tipo-

depressivo (MARAIS et al., 2008). Juntamente com esse achado foram encontradas alterações no HcD dos machos separados, com alterações no imunoconteúdo de subunidades do receptor NMDA.

A frustração utilizada neste trabalho de Dissertação foi induzida pela redução de recompensa; ela é causada, principalmente, pela violação de uma expectativa prévia (PAPINI, 2003); o aumento da frustração nos animais do grupo separado foi observado pelo aumento do tempo para chegar ao alvo quando houve a redução de recompensa (Dia 11) (COLEMAN-MESCHES; SALINAS; MCGAUGH, 1996; ELLIOTT, 1928; LESZCZUK; FLAHERTY, 2000; SALINAS et al., 1997; SALINAS; PARENT; MCGAUGH, 1996b). Os animais que passaram pela redução de recompensa tiveram um aumento da latência para chegar ao alvo no segundo bloco de tentativas no dia da redução inesperada de recompensa, mostrando que sua percepção dessa diminuição acontece de maneira gradativa, como esperado nesse experimento (ELLIOTT, 1928; SALINAS et al., 1997; SALINAS; PARENT; MCGAUGH, 1996b). Os resultados encontrados são sugestivos de maior vulnerabilidade à frustração nos animais machos que passaram pela separação materna. De maneira diferente, as fêmeas separadas exibiram uma latência similar as fêmeas intactas após a tarefa comportamental, apresentando um comportamento característico de resiliência à frustração. Outros efeitos sexo-específicos do estresse no início da vida sobre a capacidade de lidar com outros estressores na idade adulta já foram observados em estudos prévios, sendo relativamente bem estabelecido que a separação materna acarreta consequências mais adversas nos machos (DE LIMA et al., 2020; GILDAWIE; HONEYCUTT; BRENHOUSE, 2020; HONEYCUTT et al., 2020; ROMAN; PLOJ; NYLANDER, 2004; ZHENG et al., 2015).

Como medida de uma possível estratégia de enfrentamento frente à redução inesperada de recompensa, analisamos o número de entradas no alvo. O aumento no número de entradas pode ser interpretado como inconformidade com a redução da recompensa e dificuldade em lidar com a frustração. De fato, após a redução de recompensa houve um aumento no número de entradas nos animais do grupo S, representando a busca pela recompensa perdida e em seguida o contracondicionamento frente à mudança do valor da recompensa, gerando um aumento da persistência quando os animais se deparam com a nova recompensa (AMSEL, 1992; PAPINI, 2003).

Avaliou-se também o consumo e a locomoção dos animais durante o dia que precede a redução da quantidade de cereais doces (Dia 10) nos animais do grupo grande recompensa, uma

vez que tanto alterações na mobilidade quanto diferenças no valor (relevância) da recompensa poderiam influenciar a latência frente à redução. Levando em conta essas variáveis, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, corroborando com a interpretação de que os resultados obtidos (aumento da latência e aumento do número de entradas pós redução da recompensa) nessa tarefa refletem o comportamento de frustração frente à redução de recompensa, e não características prévias no comportamento dos animais deste grupo. Como esperado (BURKE et al., 2016), as fêmeas apresentaram maior locomoção no aparato do que os animais machos. Em contrapartida, de maneira surpreendente, as fêmeas não consumiram mais cereais doces do que os animais machos. Esse efeito poderia ser explicado por um possível efeito teto causado pelo tempo limite de cada tentativa (60 s): com um tempo mais longo, o efeito sexo-específico provavelmente seria observado nessa variável, uma vez que é sabido que fêmeas consomem mais alimentos doces do que machos (SCLAFANI et al., 1987).

Quando se analisou o imunoconteúdo das subunidades GluN2A e GluN2B do receptor NMDA no HcD, encontramos interações significativas entre o tratamento pós-natal e a experiência de frustração nos animais machos. Houve diminuição do imunoconteúdo da subunidade GluN2A e um aumento da subunidade GluN2B do grupo que passou pela redução de recompensa, mas apenas no caso dos animais separados no período neonatal. Um dos possíveis mecanismos que explicam esse achado é a troca subunidade GluN2A pela GluN2B, que faz parte do processo de plasticidade envolvido na formação de memórias (BAEZ; CERCATO; JERUSALINSKY, 2018; MORRIS, 2013). Essa troca das subunidades pode estar relacionada com um fortalecimento da memória aversiva associada à redução de recompensa nesses animais. Os animais machos separados do grupo GR tiveram maior dificuldade em se adaptar à tarefa comportamental no dia subsequente à redução de recompensa, o que, junto com a alteração na composição dos receptores NMDA, pode indicar que o evento frustrante tem maior valência emocional negativa para esses animais, dificultando a função adaptativa que deveria ocorrer em resposta a frustração (AMSEL, 1962; PAPINI, 2003; STOUT et al., 2002). Nas fêmeas não foram encontradas diferenças entre os grupos no imunoconteúdo das subunidades do receptor NMDA no HcD, o que respalda o perfil aqui proposto de resiliência das fêmeas separadas frente à frustração, tendo em vista que as fêmeas que passaram pelo estresse precoce apresentam resposta similar às fêmeas que permaneceram sem perturbações no início da vida, tanto na resposta comportamental quanto nos parâmetros moleculares hipocâmpais relacionados com a (re)consolidação de uma memória aversiva frente a

um evento frustrante (CUENYA et al., 2015; ELLIOTT, 1928; RIEMER; THOMPSON; BURMAN, 2018).

No HcD também foram avaliados os imunocontêúdos de algumas proteínas de plasticidade sináptica. Quanto à SNAP25, envolvida com regulação da liberação de neurotransmissores das vesículas sinápticas e na estabilização de espinhos dendríticos (KÁDKOVÁ; RADECKE; SØRENSEN, 2019), encontramos uma tendência ao efeito da separação materna nos machos, mas não nas fêmeas. Diminuição nos níveis de SNAP25 estão associados a disfunções na transmissão sináptica, como acontece na esquizofrenia (RAMOS-MIGUEL et al., 2019; YANG et al., 2017) e no transtorno de déficit de atenção (WANG et al., 2018). Outra proteína analisada foi a sinaptofisina, utilizada comumente como um importante marcador pré-sináptico (KOLOS; GRIGORIYEV; KORZHEVSKYI, 2015; THIEL, 1993; VALTORTA et al., 2004), e que não apresentou alterações em seu imunocontêúdo em qualquer dos grupos experimentais. Quanto à análise da PSD95, que participa de ancoragem dos receptores NMDA no terminal pós-sináptico, estabilizando esses receptores na superfície neuronal (WON et al., 2016), não houve diferenças entre os grupos, independente do sexo. Poderia ser esperada uma alteração no imunocontêúdo dessa proteína nos machos separados, já que estes mostraram alterações nas subunidades dos receptores NMDA, contudo a ausência de alterações na proteína que ancora os receptores nos machos separados do grupo que passou pela redução inesperada de recompensa reforça a hipótese de que nesses animais não houve a redução dos receptores NMDA, e sim uma troca das subunidades GluN2A por GluN2B.

Ainda no HcD, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de CRHR1 entre os diferentes grupos ou entre os sexos.

Nas análises do imunocontêúdo das subunidades GluN2A e GluN2B dos receptores NMDA na ABL não se encontraram diferenças entre animais intactos e que passaram pela separação materna, entre os grupos de recompensa ou entre os sexos. A amígdala é umas das estruturas frequentemente implicadas com respostas frente à redução inesperada de recompensa (JUDICE-DAHER; TAVARES; BUENO, 2012; KAWASAKI et al., 2015; SALINAS; MCGAUGH, 1996), principalmente na percepção da diminuição do valor dessa recompensa (KAWASAKI et al., 2017b), porém, levando em conta que nossas medidas foram coletadas 24 h após o terceiro dia de redução inesperada de recompensa, esse resultado está de acordo com outro estudo que aponta a amígdala não como um local permanente do armazenamento dessa

memória/percepção do estímulo aversivo, mas como um local transitório envolvido com a modulação de informações emocionalmente significativas que são armazenadas em outro local (SALINAS; PARENT; MCGAUGH, 1996a).

As proteínas de plasticidade sináptica SNAP25, sinaptofisina e PSD95 na amígdala basolateral também não apresentaram diferenças em seus imunocontêúdos em qualquer dos fatores estudados na tarefa de redução inesperada de recompensa, independente do sexo. Contudo as amostras foram coletadas três dias após a redução de recompensa, quando os animais já haviam se adaptado à tarefa, como esperado. Sendo assim, uma medida logo após a redução de recompensa poderia trazer maior entendimento sobre a resposta primária à frustração.

Em relação aos receptores CRHR1 na amígdala, observamos uma tendência à diminuição do imunocontêúdo destes nos animais machos que passaram pela redução inesperada de recompensa, independente do tratamento pós-natal. Com a ativação do eixo HPA pela tarefa comportamental que envolve redução de recompensa (PECORARO; DE JONG; DALLMAN, 2009), o receptor CRHR1 poderia ter sofrido *downregulation* nesses animais em função da sua hiperativação em resposta à redução inesperada de recompensa. Esses resultados contrastam com os das fêmeas, que não apresentaram alterações desse receptor na ABL, o que pode implicar que, para as fêmeas, a tarefa de redução inesperada de recompensa apresenta menor valência emocional como situação aversiva.

Em resumo, os resultados encontrados demonstraram que a separação materna afeta a resposta à redução inesperada de recompensa, de forma aparentemente mais proeminente nos animais machos. Alterações do imunocontêúdo das subunidades GluN2A e GluN2B do receptor NMDA no HcD dos animais machos que passaram pela separação materna no período neonatal sugerem uma troca dessas subunidades, possivelmente tornando mais forte a memória aversiva relacionada à redução de recompensa. Corroborando o perfil de resiliência das fêmeas separadas, não foram encontradas alterações no comportamento, nem no imunocontêúdo das proteínas e receptores analisados no HcD nem na BLA desses animais. Este trabalho ressalta a importância de estudar os efeitos duradouros do estresse precoce sobre os padrões comportamentais na vida adulta, ressaltando a maior vulnerabilidade dos machos ao estresse no início da vida.

7. Perspectivas

Diante resultados encontrados, temos como perspectivas investigar marcadores de neuroplasticidade e estresse em outras estruturas encefálicas (HcV, CPFm, NAcc) de animais submetidos a SM e que realizaram a tRIR. Estudos futuros deverão aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos neurobiológicos associados a estes efeitos.

Para uma melhor compreensão das respostas a tRIR e a fim de entender os mecanismos moleculares envolvidos na resposta a frustração, torna-se fundamental investigar marcadores de neuroplasticidade e estresse logo após a tRIR em animais submetidos a SM, assim como níveis de corticotropina periféricos.

Levando em conta que a SM pode levar a diferentes alterações encefálicas e comportamentais ao longo do desenvolvimento (RIVEROS-BARRERA; DUEÑAS, 2016; WANG et al., 2015; XUE et al., 2013) e neste estudo avaliamos apenas seus efeitos relacionados a frustração na idade adulta, é interessante investigar respostas comportamentais e modificações encefálicas em animais submetidos a SM que realizariam a tRIR durante a adolescência.

É de interesse correlacionar estresse precoce e resposta a frustração em humanos em um estudo translacional.

REFERÊNCIAS

ALYAMANI, R. A. S.; MURGATROYD, C. Epigenetic Programming by Early-Life Stress. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, v. 157, p. 133–150, 2018.

AMINI-KHOEI, H. et al. On the role of corticosterone in behavioral disorders, microbiota composition alteration and neuroimmune response in adult male mice subjected to maternal separation stress. *International Immunopharmacology*, v. 66, p. 242–250, 1 jan. 2019.

AMSEL, A. The role of frustrative nonreward in noncontinuous reward situations. *Psychological Bulletin*, v. 55, n. 2, p. 102–119, 1958.

AMSEL, A. Frustrative nonreward in partial reinforcement and discrimination learning: Some recent history and a theoretical extension. *Psychological Review*, v. 69, n. 4, p. 306–328, 1962.

AMSEL, A. *Frustration theory - An Analysis of Dispositional Learning and Memory*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.

AMSEL, A.; WARD, J. S. Motivational properties of frustration: II. Frustration drive stimulus and frustration reduction in selective learning. *Journal of Experimental Psychology*, v. 48, n. 1, p. 37–47, 1954.

ANDERSEN, S. L.; TEICHER, M. H. Delayed effects of early stress on hippocampal development. *Neuropsychopharmacology*, v. 29, n. 11, p. 1988–1993, 2004.

ANTUNES, I. B. et al. The Female Rat. In: *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 95–109.

ARCEGO, D. M. et al. Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: Interplay of these factors changes these effects. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 50, p. 16–25, maio 2016.

ARCEGO, D. M. et al. Impact of High-Fat Diet and Early Stress on Depressive-Like Behavior and Hippocampal Plasticity in Adult Male Rats. *Molecular Neurobiology*, v. 55, n. 4, p. 2740–2753, abr. 2018.

BAEZ, M. V.; CERCATO, M. C.; JERUSALINSKY, D. A. NMDA receptor subunits change after synaptic plasticity induction and learning and memory acquisition *Neural Plasticity* Hindawi Limited, , 2018.

BALDY, C.; CHAMBERLAND, S.; KINKEAD, R. Sex-specific consequences of neonatal stress on laryngeal chemoreflex stimulation in rat pups: Contribution of excitatory currents onto key brainstem regions. *FASEB Journal*, v. 29, n. December, p. 1–16, 2015.

BALE, T. L. et al. Early Life Programming and Neurodevelopmental Disorders Tracy. *Biol Psychiatry*, v. 68, n. 4, p. 314–319, 2011.

BALE, T. L.; EPPERSON, C. N. Sex differences and stress across the lifespan. *Nat Neurosci.*, v. 18, n. 10, p. 1413–1420, 2015.

BRIVIO, E.; LOPEZ, J. P.; CHEN, A. Sex differences: Transcriptional signatures of stress exposure in male and female brains. *Genes, Brain and Behavior*, n. December 2019, p. 1–22, 2020.

BURKE, N. N. et al. Sex differences and similarities in depressive- and anxiety-like behaviour in the Wistar-Kyoto rat. *Physiology and Behavior*, v. 167, p. 28–34, 1 dez. 2016.

CHEN, Y.; BARAM, T. Z. Toward understanding how early-life stress reprograms cognitive and emotional brain networks *Neuropsychopharmacology* Nature Publishing Group, , 1 jan. 2016.

CLANCY, B. et al. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *NeuroToxicology*, v. 28, n. 5 SPEC. ISS., p. 931–937, 2007.

CLANCY, B.; DARLINGTON, R. B.; FINLAY, B. L. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*, v. 105, n. 1, p. 7–17, 2001.

COLEMAN-MESCHES, K.; SALINAS, J. A.; MCGAUGH, J. L. Unilateral amygdala inactivation after training attenuates memory for reduced reward. *Behavioural Brain Research*, v. 77, n. 1–2, p. 175–180, 1996.

COLEY, A. A.; GAO, W.-J. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 82, p. 187–194, 2 mar. 2018.

CONCEA. Resolução Normativa 33/2016. . 2016, p. 49.

COUTO-PEREIRA, N. DE S. et al. Neonatal interventions differently affect maternal care quality and have sexually dimorphic developmental effects on corticosterone secretion. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 55, p. 72–81, dez. 2016.

COUTO-PEREIRA, N. DE S. et al. Resilience and vulnerability to trauma: Early life interventions modulate aversive memory reconsolidation in the dorsal hippocampus. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 12, n. May, p. 1–19, 2019.

CUENYA, L. et al. Effects of isolation in adulthood on frustration and anxiety. *Behavioural Processes*, v. 90, n. 2, p. 155–160, jun. 2012.

CUENYA, L. et al. Transfer across reward devaluation tasks in inbred Roman rat strains. *Learning and Motivation*, v. 52, p. 22–31, 1 nov. 2015.

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, jun. 2018.

DE LIMA, R. M. S. et al. Early life stress and the programming of eating behavior and anxiety: Sex-specific relationships with serotonergic activity and hypothalamic neuropeptides. *Behavioural Brain Research*, v. 379, p. 112399, 3 fev. 2020.

DE SOUZA, J. A. et al. Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males. *Appetite*, v. 123, p. 114–119, 1 abr. 2018.

DIEHL, L. A. et al. 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 Research*, v. 1144, p. 107–116, 4 maio 2007.

DIEHL, L. A. et al. Contextual fear conditioning in maternal separated rats: The amygdala as a site for alterations. *Neurochemical Research*, v. 39, n. 2, p. 384–393, 2014.

ELLIOTT, M. H. The effect of change of reward on the maze performance of rats. University ed. Berkeley: Univ. of California Press, 1928.

EMANUELE, M. A. et al. Alcohol 's Effects on Female Reproductive Function. *Alcohol Research & Health*, n. Molitch 1995, p. 1–15, 1997.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010.

FRYE, C. A.; PETRALIA, S. M.; RHODES, M. E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 α ,5 α -THP. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 67, n. 3, p. 587–596, nov. 2000.

GILDAWIE, K. R.; HONEYCUTT, J. A.; BRENHOUSE, H. C. Region-specific Effects of Maternal Separation on Perineuronal Net and Parvalbumin-expressing Interneuron Formation in Male and Female Rats. *Neuroscience*, v. 428, p. 23–37, 2020.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 13, p. 651–658, 2012.

GUARINO, S.; CONRAD, S. E.; PAPINI, M. R. Frustrative nonreward: Chemogenetic inactivation of the central amygdala abolishes the effect of reward downshift without affecting alcohol intake. *Neurobiology of Learning and Memory*, p. 107173, jan. 2020.

HALMI, K. A. Perplexities of treatment resistance in eating disorders. *BMC Psychiatry*, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

HONEYCUTT, J. A. et al. Altered corticolimbic connectivity reveals sex-specific adolescent outcomes in a rat model of early life adversity. *eLife*, v. 9, 20 jan. 2020.

JUDICE-DAHER, D. M.; TAVARES, T. F.; BUENO, J. L. O. Involvement of the basolateral complex and central nucleus of amygdala in the omission effects of different magnitudes of reinforcement. *Behavioural Brain Research*, v. 233, n. 1, p. 149–156, 15 jul. 2012.

KÁDKOVÁ, A.; RADECKE, J.; SØRENSEN, J. B. The SNAP-25 Protein Family. *Neuroscience* Elsevier Ltd, , 10 nov. 2019.

KAMBALI, M. Y. et al. Effect of early maternal separation stress on attention, spatial learning and social interaction behaviour. *Experimental Brain Research*, v. 237, n. 8, p. 1993–2010, 1 ago. 2019.

KAWASAKI, K. et al. Function of the centromedial amygdala in reward devaluation and open-field activity. *Neuroscience*, v. 303, p. 73–81, 10 set. 2015.

KAWASAKI, K. et al. Reward loss and the basolateral amygdala: A function in reward comparisons. *Behavioural Brain Research*, v. 331, n. May, p. 205–213, 2017a.

KAWASAKI, K. et al. Reward loss and the basolateral amygdala: A function in reward comparisons. 2017b.

KNIERIM, J. J. The hippocampus *Current Biology* Cell Press, , 7 dez. 2015.

KOLOS, Y. A.; GRIGORIYEV, I. P.; KORZHEVSKYI, D. E. [A synaptic marker synaptophysin]. *Morfologiya* (Saint Petersburg, Russia), v. 147, n. 1, p. 78–82, 2015.

KOPP, C.; LONGORDO, F.; LÜTHI, A. Experience-dependent changes in NMDA receptor composition at mature central synapses. *Neuropharmacology*, v. 53, n. 1, p. 1–9, 2007.

LAMPERT, C. et al. Short post-weaning social isolation induces long-term changes in the dopaminergic system and increases susceptibility to psychostimulants in female rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 61, p. 21–30, 2017.

LEDOUX, J. The amygdala. *Current Biology*, v. 17, n. 20, p. 868–874, 2007.

LEDOUX, J. E. Coming to terms with fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 8, p. 2871–2878, 2014.

LESZCZUK, M. H.; FLAHERTY, C. F. Lesions of nucleus accumbens reduce instrumental but not consummatory negative contrast in rats. *Behavioural Brain Research*, v. 116, n. 1, p. 61–79, 15 nov. 2000.

LISMAN, J. et al. Viewpoints: How the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition *Nature Neuroscience* Nature Publishing Group, , 2017.

LUNDBERG, S. et al. Few long-term consequences after prolonged maternal separation in female Wistar rats. p. 1–22, 2017.

MAJCHER-MAŚLANKA, I.; SOLARZ, A.; CHOCYK, A. Maternal separation disturbs postnatal development of the medial prefrontal cortex and affects the number of neurons and glial cells in adolescent rats. *Neuroscience*, v. 423, p. 131–147, 15 dez. 2019.

MALTER COHEN, M. et al. Early-life stress has persistent effects on amygdala function and development in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 45, p. 18274–18278, 2013.

MANZO, L. et al. Anti-anxiety self-medication in rats: Oral consumption of chlordiazepoxide and ethanol after reward devaluation. *Behavioural Brain Research*, v. 278, p. 90–97, 1 fev. 2015.

MARAIS, L. et al. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neuroscience Research*, v. 61, n. 1, p. 106–112, 1 maio 2008.

MARCONDES, F. K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology and Behavior*, v. 74, n. 4–5, p. 435–440, 12 nov. 2001.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n. 4a, p. 609–614, 2002.

MATOSIN, N.; HALLDORSDDOTTIR, T.; BINDER, E. B. Understanding the Molecular Mechanisms Underpinning Gene by Environment Interactions in Psychiatric Disorders: The FKBP5 Model. *Biological Psychiatry*, v. 83, n. 10, p. 821–830, 15 maio 2018.

MCCARTHY, M. M. Estradiol and the Developing Brain. *Physiological Reviews*, v. 88, n. 1, p. 91–134, jan. 2008.

MONTERO-LÓPEZ, E. et al. The relationship between the menstrual cycle and cortisol secretion: Daily and stress-invoked cortisol patterns. *International Journal of Psychophysiology*, 29 mar. 2018.

MORRIS, R. G. M. NMDA receptors and memory encoding *Neuropharmacology* Elsevier Ltd, , 1 nov. 2013.

NISHI, M. et al. Effects of early life stress on brain activity: Implications from maternal separation model in rodents. *General and Comparative Endocrinology*, v. 181, n. 1, p. 306–309, 2013.

NOVICK, A. M. et al. The effects of early life stress on reward processing *Journal of Psychiatric Research* Elsevier Ltd, , 1 jun. 2018.

OVTCHAROFF, W.; BRAUN, K. Maternal separation and social isolation modulate the postnatal development of synaptic composition in the infralimbic cortex of *Octodon degus*. *Neuroscience*, v. 104, n. 1, p. 33–40, 10 abr. 2001.

PAPINI, M. R. Comparative psychology of surprising nonreward. *Brain, Behavior and Evolution*, v. 62, n. 2, p. 83–95, 2003.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4a ed. [s.l.: s.n.].

PECORARO, N.; DE JONG, H.; DALLMAN, M. F. An unexpected reduction in sucrose concentration activates the HPA axis on successive post shift days without attenuation by discriminative contextual stimuli. *Physiology & Behavior*, v. 96, n. 4–5, p. 651–661, 23 mar. 2009.

PERVANIDOU, P.; CHROUSOS, G. P. Early-Life Stress: From Neuroendocrine Mechanisms to Stress-Related Disorders. *Hormone Research in Paediatrics*, v. 89, n. 5, p. 372–379, 2018.

PRYCE, C. R.; FELDON, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: Manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 27, n. 1–2, p. 57–71, 2003.

PSYRDELLIS, M. et al. Cholinergic transmission underlies modulation of frustration by open field exposure. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 140, p. 8–16, jan. 2016.

RAMOS-MIGUEL, A. et al. Reduced SNAP25 Protein Fragmentation Contributes to SNARE Complex Dysregulation in Schizophrenia Postmortem Brain. *Neuroscience*, v. 420, p. 112–128, 10 nov. 2019.

RIEMER, S.; THOMPSON, H.; BURMAN, O. H. P. Behavioural responses to unexpected changes in reward quality. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 16652, 9 nov. 2018.

RIVEROS-BARRERA, I.; DUEÑAS, Z. La separación materna durante la lactancia altera los niveles basales del sistema neuroendocrino en ratas adolescentes y adultas. *Biomedica*, v. 36, n. 1, p. 67–77, 1 jan. 2016.

ROMAN, E.; PLOJ, K.; NYLANDER, I. Maternal separation has no effect on voluntary ethanol intake in female Wistar rats. *Alcohol*, v. 33, n. 1, p. 31–39, 1 maio 2004.

ROSAS, J. M. et al. Successive negative contrast effect in instrumental runway behaviour: A study with Roman high- (RHA) and Roman low- (RLA) avoidance rats. *Behavioural Brain Research*, v. 185, n. 1, p. 1–8, 2007.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Special Ed ed. [s.l.] Methuen, 1959.

SABARIEGO, M. et al. Incentive loss and hippocampal gene expression in inbred Roman high- (RHA-I) and Roman low- (RLA-I) avoidance rats. *Behavioural Brain Research*, v. 257, p. 62–70, 15 nov. 2013.

SACHS, B. D. et al. Title: Brain-region-specific molecular responses to maternal separation and social defeat stress in mice. *Neuroscience*, 2018.

SALINAS, J. A. et al. Posttraining intraamygdala infusions of oxotremorine and propranolol modulate storage of memory for reductions in reward magnitude. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 68, n. 1, p. 51–59, 1997.

SALINAS, J. A.; MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates memory for changes in reward magnitude : involvement of the amygdaloid GABAergic system. v. 80, p. 87–98, 1996.

SALINAS, J. A.; PARENT, M. B.; MCGAUGH, J. L. Ibotenic acid lesions of the amygdala basolateral complex or central nucleus differentially effect the response to reductions in reward. *Brain Research*, v. 742, n. 1–2, p. 283–293, 1996a.

SALINAS, J. A.; PARENT, M. B.; MCGAUGH, J. L. Ibotenic acid lesions of the amygdala basolateral complex or central nucleus differentially effect the response to reductions in reward. *Brain Research*, v. 742, n. 1–2, p. 283–293, 2 dez. 1996b.

SALINAS, J. A.; WHITE, N. M. Contributions of the hippocampus, amygdala, and dorsal striatum to the response elicited by reward reduction. *Behavioral Neuroscience*, v. 112, n. 4, p. 812–826, 1998.

SCLAFANI, A. et al. Sex differences in polysaccharide and sugar preferences in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 11, n. 2, p. 241–251, 1 jun. 1987.

SILBERMAN, D. M.; ACOSTA, G. B.; ZORRILLA ZUBILETE, M. A. Long-term effects of early life stress exposure: Role of epigenetic mechanisms. *Pharmacological Research*, v. 109, p. 64–73, 1 jul. 2016.

SILVEIRA, P. P. et al. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 28, n. 1, p. 111–118, 2010.

STOUT, S. C. et al. Aftereffects of the surprising presentation and omission of appetitive reinforcers on key-pecking performance in pigeons. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, v. 28, n. 3, p. 242–256, 2002.

SUNDSTRÖM-POROMAA, I. The Menstrual Cycle Influences Emotion but Has Limited Effect on Cognitive Function. In: *Ovarian Cycle*. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 349–376.

TEICHER, M. H. et al. The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, , 19 set. 2016.

TEICHER, M. H. Childhood trauma and the enduring consequences of forcibly separating children from parents at the United States border. *BMC Medicine*, v. 16, n. 1, p. 146, 22 dez. 2018.

THIEL, G. Synapsin I, Synapsin II, and Synaptophysin: Marker Proteins of Synaptic Vesicles. *Brain Pathology*, v. 3, n. 1, p. 87–95, 1993.

VALTORTA, F. et al. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *BioEssays*, v. 26, n. 4, p. 445–453, abr. 2004.

VILELA, M. G.; JÚNIOR, J. L. S.; SILVA, J. G. C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *Femina*, v. 35, n. 10, 2007.

WANG, C. et al. The impact of SNAP25 on brain functional connectivity density and working memory in ADHD. *Biological Psychology*, v. 138, p. 35–40, 1 out. 2018.

WANG, Q. et al. The different effects of maternal separation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behavioural Brain Research*, v. 280, p. 16–23, 1 mar. 2015.

WHITE, T. L.; YOUNGENTOB, S. L. The effect of NMDA-NR2B receptor subunit over-expression on olfactory memory task performance in the mouse. *Brain Research*, v. 1021, n. 1, p. 1–7, 2004.

WON, S. et al. PSD-95 stabilizes NMDA receptors by inducing the degradation of STEP61. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 113, n. 32, p. E4736–E4744, 9 ago. 2016.

XUE, X. et al. Maternal separation induces alterations of serotonergic system in different aged rats. *Brain Research Bulletin*, v. 95, p. 15–20, 1 jun. 2013.

YANG, H. et al. Brain-Specific SNAP-25 Deletion Leads to Elevated Extracellular Glutamate Level and Schizophrenia-Like Behavior in Mice. *Neural Plasticity*, v. 2017, 2017.

ZHANG, H. et al. Early life stress predicts cortisol response to psychosocial stress in healthy young adults. *PsyCh Journal*, v. 8, n. 3, p. 353–362, 2019a.

ZHANG, H. et al. Effect of prenatal stress on neural oscillations in developing hippocampal formation. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 89, n. June 2018, p. 456–464, 2019b.

ZHANG, J.-M. et al. Impact of sex and hormones on new cells in the developing rat hippocampus: a novel source of sex dimorphism? *European Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 4, p. 791–800, 2008.

ZHENG, A. et al. Maternal hydroxytyrosol administration improves neurogenesis and cognitive function in prenatally stressed offspring. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 26, n. 2, p. 190–199, 2015.

ZHOU, J. et al. Quantitative proteomic analysis reveals molecular adaptations in the hippocampal synaptic active zone of chronic mild stress-unsusceptible rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 19, n. 1, p. 1–19, 2016.

Anexo I - Resultados dos testes estatísticos

Experimento 1 (Tarefa de Redução Inesperada da Recompensa) - Resultados da análise de variância (ANOVA)

Variável dependente	Variáveis	DF	F	p	Esfericidade
Latência (s) em blocos de 3 tentativas nos dias 10 a 13	bl. tentativas	3,942	5,564	<0,001	Não
	bl. tentativas x sexo	3,942	0,651	0,625	
	bl. tentativas x ttmtpn	3,942	0,859	0,487	
	bl. tentativas x grupo	3,942	4,775	0,001	
	bl. tentativas x sexo x ttmtpn	3,942	1,112	0,350	
	bl. tentativas x sexo x grupo	3,942	1,385	0,239	
	bl. tentativas x ttmtpn x grupo	3,942	2,789	0,027	
	bl. tentativas x sexo x ttmtpn x grupo	3,942	0,375	0,824	
	sexo	1	0,550	0,460	
	ttmtpn	1	0,107	0,745	
	grupo	1	7,103	0,009	
	sexo x ttmtpn	1	0,039	0,844	
	sexo x grupo	1	0,644	0,424	
	ttmtpn x grupo	1	0,152	0,698	
	sexo x ttmtpn x grupo	1	1,434	0,234	
	bl. tentativas	1	11,901	0,001	Sim
	bl. tentativas x sexo	1	0,052	0,820	

Latência (s) em blocos de 3 tentativas no dia 11 (redução inesperada da recompensa)	bl. tentativas x ttmtpn	1	0,052	0,820	
	bl. tentativas x grupo	1	0,052	0,820	
	bl. tentativas x sexo x ttmtpn	1	4,098	0,046	
	bl. tentativas x sexo x grupo	1	3,474	0,066	
	bl. tentativas x ttmtpn x grupo	1	0,163	0,687	
	bl. tentativas x sexo x ttmtpn x grupo	1	0,317	0,575	
	sexo	1	1,650	0,202	
	ttmtpn	1	0,001	0,974	
	grupo	1	16,757	<0,001	
	sexo x ttmtpn	1	0,249	0,619	
	sexo x grupo	1	0,321	0,573	
	ttmtpn x grupo	1	3,806	0,054	
	sexo x ttmtpn x grupo	1	3,132	0,080	
Latência (s) em blocos de 3 tentativas no dia 11 nas fêmeas agrupadas por fases do ciclo estral (fase lútea ou folicular)	bl. tentativas	1	7,145	7,145	Sim
	bl. tentativas x ttmtpn	1	0,306	0,583	
	bl. tentativas x fase do ciclo	1	1,652	0,206	
	bl. tentativas x grupo	1	7,035	0,011	
	bl. tentativas x fase do ciclo x ttmtpn	1	1,652	0,206	
	bl. tentativas x fase do ciclo x grupo	1	1,585	0,215	

	bl. tentativas x ttmtpn x grupo	1	0,265	0,610	
	bl. tentativas x fase do ciclo x ttmtpn x grupo	1	0,490	0,488	
	fase do ciclo	1	0,002	0,967	
	ttmtpn	1	0,647	0,426	
	grupo	1	6,832	0,013	
	fase do ciclo x ttmtpn	1	0,034	0,855	
	fase do ciclo x grupo	1	0,596	0,445	
	ttmtpn x grupo	1	0,206	0,652	
	fase do ciclo x ttmtpn x grupo	1	1,131	0,294	
	tempo	3	9,099	<0,001	
	tempo x sexo	3	0,106	0,957	
	tempo x ttmtpn	3	0,889	0,447	
	tempo x grupo	3	10,722	<0,001	
	tempo x sexo x ttmtpn	3	0,280	0,840	
	tempo x sexo x grupo	3	0,669	0,572	
	tempo x ttmtpn x grupo	3	5,437	0,001	
	tempo x sexo x ttmtpn x grupo	3	1,072	0,362	
	sexo	1	16,369	<0,001	
	ttmtpn	1	1,823	0,181	
	grupo	1	4,087	0,046	
	sexo x ttmtpn	1	0,001	0,976	
Entradas no alvo nos dias 10 a 13					Sim

	sexo x grupo	1	3,493	0,065	
	ttmtpn x grupo	1	0,266	0,607	
	sexo x ttmtpn x grupo	1	0,734	0,394	
Consumo no Dia 10 – Grupo GR	sexo	1	0,026	0,872	Sim
	ttmtpn	1	0,019	0,892	
	sexo x ttmtpn	1	0,771	0,385	
Distância percorrida no Dia 10 (m)	sexo	1	8,214	0,006	Sim
	ttmtpn	1	0,003	0,958	
	sexo x ttmtpn	1	2,105	0,154	
Média da latência (s) no Dia 10	sexo	1	2,383	0,126	Sim
	ttmtpn	1	0,038	0,846	
	sexo x ttmtpn	1	0,406	0,526	

Experimento 2 (Avaliação neuroquímica) - Resultados da análise de variância (ANOVA)

		Variáveis	DF	F	p	
Machos	HcD	GluN2A	ttmtpn	1	0,372	0,548
			grupo	1	3,106	0,091
			ttmtpn x grupo	1	8,710	0,007
		GluN2B	ttmtpn	1	0,300	0,589
			grupo	1	0,019	0,892
			ttmtpn x grupo	1	9,686	0,005
		SNAP25	ttmtpn	1	3,788	0,063
			grupo	1	1,122	0,300
			ttmtpn x grupo	1	0,407	0,529
		Sinaptofisina	ttmtpn	1	0,291	0,595
			grupo	1	0,000	0,993
			ttmtpn x grupo	1	0,231	0,635
		PSD95	ttmtpn	1	0,049	0,826

			grupo	1	0,092	0,765
			ttmtpn x grupo	1	,176	0,679
		CRHR1	ttmtpn	1	0,296	0,592
			grupo	1	0,555	0,463
			ttmtpn x grupo	1	0,268	0,610
Machos	ABL	GluN2A	ttmtpn	1	0,013	0,912
			grupo	1	1,307	0,264
			ttmtpn x grupo	1	0,007	0,935
		GluN2B	ttmtpn	1	0,059	0,811
			grupo	1	1,313	0,263
			ttmtpn x grupo	1	1,113	0,302
		SNAP25	ttmtpn	1	0,798	0,383
			grupo	1	2,979	0,102
			ttmtpn x grupo	1	0,798	0,383
		Sinaptofisina	ttmtpn	1	0,415	0,526
			grupo	1	0,942	0,342
			ttmtpn x grupo	1	0,034	0,854
		PSD95	ttmtpn	1	0,222	0,642
			grupo	1	2,415	0,133
			ttmtpn x grupo	1	0,975	0,333
		CRHR1	ttmtpn	1	0,291	0,595
			grupo	1	3,150	0,089
			ttmtpn x grupo	1	0,265	0,611
Fêmeas	HcD	GluN2A	ttmtpn	1	0,378	0,545
			grupo	1	1,105	0,304
			ttmtpn x grupo	1	0,151	0,701
		GluN2B	ttmtpn	1	0,250	0,622
			grupo	1	1,612	0,217
			ttmtpn x grupo	1	0,230	0,636
		SNAP25	ttmtpn	1	1,238	0,277

			grupo	1	0,984	0,331
			ttmtpn x grupo	1	0,030	0,863
		Sinaptofisina	ttmtpn	1	0,005	0,944
			grupo	1	0,165	0,688
			ttmtpn x grupo	1	0,028	0,869
		PSD95	ttmtpn	1	2,189	0,153
			grupo	1	0,566	0,459
			ttmtpn x grupo	1	0,128	0,724
		CRHR1	ttmtpn	1	0,466	0,502
			grupo	1	0,153	0,699
			ttmtpn x grupo	1	0,139	0,713
Fêmeas	ABL	GluN2A	ttmtpn	1	0,130	0,722
			grupo	1	0,051	0,824
			ttmtpn x grupo	1	0,081	0,779
		GluN2B	ttmtpn	1	0,086	0,772
			grupo	1	0,787	0,384
			ttmtpn x grupo	1	0,732	0,401
		SNAP25	ttmtpn	1	1,483	0,236
			grupo	1	0,149	0,703
			ttmtpn x grupo	1	0,137	0,715
		Sinaptofisina	ttmtpn	1	0,366	0,551
			grupo	1	0,184	0,672
			ttmtpn x grupo	1	0,418	0,524
		PSD95	ttmtpn	1	2,773	0,109
			grupo	1	1,680	0,208
			ttmtpn x grupo	1	0,071	0,792
		CRHR1	ttmtpn	1	0,010	0,923
	grupo	1	0,190	0,667		
	ttmtpn x grupo	1	0,126	0,726		

Anexo II – Carta de Aprovação do projeto de pesquisa pela CEUA/UFRGS



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 35364

Título: Efeitos da separação materna na fase neonatal sobre a frustração em ratos

Vigência: 22/05/2018 à 31/08/2020

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CARLA DALMAZ - coordenador desde 22/05/2018
Natividade de Sá Couto Pereira - pesquisador desde 22/05/2018
ALINE DOS SANTOS VIEIRA - Aluno de Mestrado desde 22/05/2018
Joelma Alves Lúcio Padilha - Aluno de Mestrado desde 22/05/2018

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 01/10/2018 - Sala 330 do Anexo I do Prédio da Reitoria - Campus Centro - Av. Paulo Gama, 100. Porto Alegre- RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 69 fêmeas Wistar prenhes, primíparas, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, e de cuja prole serão utilizadas 220 fêmeas e 160 machos; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 5 de Outubro de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética