

DANIELA ROCHA COSTA FÓSCOLO

Influência da separação materna na resposta  
endócrino-metabólica ao estresse na vida  
adulta

Dissertação de mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-graduação em  
Ciências Biológicas – Fisiologia e  
Farmacologia do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais como requisito parcial  
para a obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

Belo Horizonte

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

The selfish, they're all standing in line  
Faithing and hoping to buy themselves time  
Me, I figure as each breath goes by  
I only own my mind

The North is to South what the clock is to time  
There's east and there's west and there's everywhere life  
I know I was born and I know that I'll die  
The in between is mine  
I am mine

(Ed Vedder)

## À Catarina

“To louco pra te ver chegar  
To louco pra te ter nas mãos  
Deitar no teu abraço, retomar o pedaço  
Que falta no meu coração  
Eu não existo longe de você  
E a solidão é o meu pior castigo  
Eu conto as horas pra poder te ver  
Mas o relógio tá de mal comigo”

## Ao Rodrigo

*“I don't know what it is  
That makes me love you so  
I only know  
I never want to let you go  
'Cos you started something  
Can't you see  
That ever since we've met  
You've had a hold on me  
It happens to be true  
I only wanna be with you”*

(Raymonde/Hawker)

# Agradecimentos

---

Ao Professor Cândido pelos ensinamentos, paciência, amizade por tantos anos passados e por outros tantos que virão.

À Professora Adelina pela presença constante e conselhos valiosos

À Professora Umeko pelo otimismo e apoio.

Aos amigos do laboratório das antigas: Jack, Danusa, Nilo, Simonton, Ary, Najara, Alex, Cláudio, Juliana, Marcivane; simplesmente por ser parte da minha origem.

Aos colegas do laboratório de agora: Daniel, Juliana, Laura, Luciana, Fernanda, Michele, Kinulpe, Frederico, Carina, Mauro Sérgio; por fazerem o meu dia-a-dia melhor e pela amizade

À Gisele pela incomparável paciência para ensinar, corrigir e apoiar.

À Patrícia e Janine pelo auxílio técnico e presença constante.

Aos colegas e Professores de outros laboratórios, em especial NNC e Hipertensão.

À Iva pelo ombro amigo.

Aos funcionários do Cebio, em especial à Leide pelo cuidado com os meus filhotes.

E, finalmente à família Trololó: Mãe, Pai, Valéria, Paulo Eduardo, Paty, Cecília, Vuruzinho, tios, primos, cunhados, agregados... E, minhas estrelinhas Victor e Ana Laura.

# Resumo

---

Foi investigada a secreção de prolactina e as alterações na resposta ao estresse em ratos adultos machos submetidos à separação materna (MS) periódicas (180 minutos por dia), durante as duas primeiras semanas de vida. Contenção e exposição ao vapor de éter foram realizadas de maneira aleatória quando os animais estavam com 10-12 semanas de idade. Exposição ao éter: os ratos foram expostos ao vapor de éter durante 10 minutos. Contenção: os animais foram introduzidos em tubos plásticos (21 cm de comprimento e 4,5 cm de diâmetro) por 20 minutos. A canulação do átrio direito foi realizada através da veia jugular interna cinco dias antes do experimento. Em ambos os protocolos, amostras de sangue foram colhidas imediatamente antes (0), 5, 15 e 20 minutos após o início da exposição ao estresse. Outro grupo de animais foram submetidos ao mesmo protocolo experimental, de separação materna e estresse na vida adulta, sacrificados e os cérebros foram retirados para posterior realização de imunohistoquímica para cFos no núcleo paraventricular, área pré-ótica e núcleo medial da amígdala. No locus coeruleus e núcleo do trato solitário foram realizados também a co-localização com tirosina hidroxilase. Nossos resultados mostraram uma resposta endócrina e metabólica atenuada à exposição ao éter no grupo MS em relação ao grupo controle. Os parâmetros metabólicos avaliados glicose plasmática, prolactina, lactato e a secreção de insulina foram 32%, 55%, 41% e 73% menores ( $p < 0,01$ ), respectivamente no grupo MS que no grupo controle.

Por outro lado, as respostas endócrinas e metabólicas ao estresse de contenção não foram afetados pela separação materna. Nossos dados demonstram que experiências em períodos precoces da vida pós-natal afetam outros sistemas hormonais além do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, bem como as vias neuronais centrais e suas atividades relacionadas às respostas metabólicas e hormonais ao estresse na vida adulta. Estas modificações parecem não serem específicas, mas dependentes da situação de estresse; afetando principalmente os circuitos relacionados com a resposta ao estresse físico.

A separação materna induz igualmente uma maior ativação no Locus coeruleus em ambos os estresses (64% e 46% maiores quando comparados ao controle). O núcleo paraventricular e supra-óptico apresentaram um aumento no número de neurônios ativados no grupo de separação materna de aproximadamente 2,5 vezes. Os núcleos neurônios dos núcleos centrais superiores mostraram uma resposta mais intensa ao estresse de contenção, quando comparado ao grupo de exposição ao éter. Por outro lado, o núcleo medial da amígdala respondeu igualmente aos dois tipos de estresse e também não houve diferença nos animais submetidos à separação materna. O núcleo pré-óptico mediano foi o único núcleo estudado cujos neurônios apresentaram uma ativação mais intensa no estresse com éter, e sofreram também uma influência significativa da separação materna.

Os dados da ativação central confirmam a especificidade da resposta ao estresse, indicam que a separação materna pode induzir uma reprogramação

neuroendócrina nestes animais e que um dos núcleos centrais envolvidos no balanço energético seria o núcleo pré-óptico medial.

Palavras-chaves: separação maternal neonatal, estresse por éter, estresse de contenção, prolactina, insulina, glicose, imunohistoquímica, circuitos neurais



# Abstract

---

We investigated prolactin secretion and metabolic changes in stress response in adult male rats submitted to periodic maternal separation (MS; 180 min/day) at 2 weeks of life. Restraint and ether exposure were randomly performed when the animals were 10–12 weeks of age. Restraint exposure: the animals were placed into plastic tubes (21 cm long, 4.5 cm diameter) for 20 min. Ether exposure: the rats were exposed to ether for 10 min. Atrial cannulation for blood sampling was performed through the jugular vein 5 days before the experiments. In both protocols, blood samples were taken immediately before (0), and 5, 15 and 20 min after the beginning of stress exposure. Another group of animal were submitted to maternal separation and stress protocols and after the experiments rats were euthanized and the brains were removed e processed for immunohistochemistry for cFos on paraventricular nucleus, preoptica area, amygdaloid medial nucleus. On Locus coeruleus and solitary tract nucleus tyrosine hydroxilase was also co-localized. Ours results showed attenuated endocrine and metabolic responses to ether exposure in the maternal separation (MS) group compared to the control group. The measured metabolic parameters, plasma glucose, prolactin, lactate, and insulin secretion, were 32%, 55%, 41%, 73% lower ( $P < 0.01$ ), respectively, in MS than in control animals. On the other hand, the endocrine and metabolic stress responses to restraint exposure were not affected by maternal separation. Our data demonstrated that early life experiences affect the hormonal systems beyond the hypothalamic–pituitary–adrenal axis, such as the central neuronal

pathways, and their activities related to hormonal and metabolic responses to stress in adulthood. These modifications seem to be specific, but dependent on stress situation affecting mainly the circuitry related to physical stress

Maternal separation caused an increase on Fos activated neurons in both stresses (64% and 46% higher when compared with control group). Paraventricular nucleus and supraoptic nucleus were 2, 5 more activated on maternal separation group. Hypothalamic nucleus showed a bigger activation on restraint stress when compared to ether stress. On the other hand, medial nucleus of amygdala activation was the same when compared to maternal separation group in both stress protocols. Medial preoptic nucleus were the only central nucleus evaluated that showed a more intense response on ether stress and also a robust activation by maternal separation-

Our central data confirmed the specificity and heterogeneity of stress response, and indicated that maternal separation could cause a neuroendocrine programming on these animals. Probably, energetic balance was controlled, at least in part, by medial preoptic nucleus.

Keywords: Neonatal separation, Ether stress, Restraint stress, Prolactin, Insulin, Glucose, Immunohistochemistry, Neural circuitry

	10
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>4</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<i>Histórico .....</i>	<i>12</i>
<i>Conceitos.....</i>	<i>15</i>
<i>Classificação do estímulo estressor.....</i>	<i>17</i>
<i>Modelos de estresse utilizados neste trabalho .....</i>	<i>18</i>
<i>Paradigma da separação materna .....</i>	<i>24</i>
<i>Período hiporresponsivo ao estresse.....</i>	<i>27</i>
<i>Importância do modelo.....</i>	<i>29</i>
<i>Hipóteses.....</i>	<i>30</i>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<i>Objetivo geral.....</i>	<i>36</i>
<i>Objetivos específicos .....</i>	<i>36</i>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
<i>Animais .....</i>	<i>39</i>
<i>Paradigma de Separação Materna .....</i>	<i>39</i>
<i>Procedimento cirúrgico .....</i>	<i>40</i>
<i>Protocolos experimentais.....</i>	<i>40</i>
<i>Processamento das amostras .....</i>	<i>42</i>
<i>Grupo II.....</i>	<i>43</i>
<i>Imunohistoquímica.....</i>	<i>44</i>
<i>Estatística.....</i>	<i>47</i>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<i>Caracterização do modelo .....</i>	<i>50</i>
<i>Respostas Hormonais e Metabólicas à exposição ao éter .....</i>	<i>53</i>
<i>Respostas metabólicas e hormonais ao estresse de contenção.....</i>	<i>54</i>
<i>Avaliação dos circuitos neurais envolvidos .....</i>	<i>61</i>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>90</b>

**REFERÊNCIAS ..... 94**



# INTRODUÇÃO

---

## Histórico

O termo estresse tem origem na física. No final do século XVII, Robert Hook descreveu a lei que explicava como uma mudança na forma de um corpo elástico era proporcional a força deformante. Cem anos depois, Thomas Young definiu o estresse do ponto de vista físico como ‘uma resposta dentro do objeto, que é inerente a sua estrutura e é provocada por uma força externa’ <sup>1</sup>.

Desde o século XIX, estes conceitos começaram a serem usados na fisiologia, psicologia, medicina e na biologia cuja referência ao conceito de estresse pode ser rastreada nos trabalhos do químico alemão Liebig que escreveu “a condição do corpo que se chama saúde tem a concepção intrínseca do equilíbrio entre todas as causas de gasto e de abastecimento. Diante disto a vida animal é reconhecida como a ação mútua de ambos e, manifesta-se como a destruição e a restauração alternativas deste estado de equilíbrio” <sup>1</sup>

Claude Bernard (1813 –1878) induziu o conceito do ‘milieu intérieur’- meio interno-, no qual o organismo é um agrupamento de órgãos que se desenvolvem e se mantêm unidos isolando-se do mundo exterior <sup>2,3</sup>.

No século XX, Cannon foi o primeiro pesquisador a introduzir o conceito de homeostase para descrever um conjunto de processos fisiológicos coordenados que seria responsável pela manutenção do estado basal do organismo. Este conceito foi uma extensão do conceito de Claude Bernard

meio interno <sup>3</sup>. Inicialmente Cannon sugeriu que o sistema nervoso simpático (SNS) era um sistema essencial para a restauração da homeostase após uma situação estressora, para promover a sobrevivência do organismo e, que as adrenais e o SNS funcionavam como uma unidade produzindo adrenalina e noradrenalina respectivamente. E estes hormônios estariam associados à resposta de “fuga ou luta” <sup>2;4</sup>. De acordo com Cannon, qualquer que seja o estímulo agressor: exposição ao frio, hemorragia, hipoglicemia ou problemas psicológicos a resposta desencadeada seria essencialmente a mesma. O termo estresse propriamente dito nunca foi utilizado por Cannon <sup>5</sup>.

Selye em 1936 introduziu e popularizou o termo estresse como uma idéia científica e médica e o descreveu como uma resposta generalizada e inespecífica a um estímulo nocivo composto por uma tríade patológica constituída de hipertrofia adrenal, distrofia/involução timolinfática e úlceras gastrintestinais, ou seja, a *síndrome do estresse*. A teoria do estresse de Selye não negava a existência de padrões de respostas estressor-específicas, entretanto, ele enfatizava que estas respostas não constituíam ‘estresse’, por não compartilhar o componente inespecífico <sup>3</sup>.

Selye também introduziu o termo “síndrome geral de adaptação” composta de três fases sucessivas: os estágios de alarme, resistência e exaustão, onde em cada estágio a intensidade da resposta pode variar. A definição oferecida por Selye ao conceito de estresse estabelece que: ‘estresse é uma resposta inespecífica do organismo diante de qualquer demanda feita sobre ele, é um padrão estereotipado, filogeneticamente arcaico, que prepara o organismo para a luta ou para a fuga. Estas respostas primitivas são

provocadas por muitas situações da vida moderna, quando a atividade física é impossível ou socialmente inaceitável' <sup>6</sup>.

Em 1971, Lennart Levi propôs que os níveis de estresse podem ser alterados pela intensidade e qualidade do estímulo estressor, sendo que seria um erro considerar que as reações de estresse somente são induzidas se a experiência é desagradável <sup>7</sup>.

Goldstein (2003) propôs que alterações no sistema nervoso simpático não estão relacionadas apenas com situações emergenciais. Os níveis fisiológicos de atividade desse sistema podem variar para manter a homeostasia em situações rotineiras, dependendo da situação em que o organismo se encontra. De acordo com essa nova hipótese, cada atividade estaria relacionada com um diferente estado normal, controlado pelo sistema nervoso central (SNC) e mantido por ações coordenadas de vários sistemas efetores. Esse princípio levou ao conceito de *alostasia*, a estabilidade do meio interno seria alcançada através da mudança <sup>4;4</sup>

A regulação ao redor de um estado de energia aparentemente alterado é a essência da alostasia <sup>4</sup>. A alostasia depende da ativação de processos de adaptação por mediadores químicos como catecolaminas, esteróides e citocinas. Quando ocorre superexposição a situações crônicas estressantes, as respostas fisiológicas são iniciadas, resultando em resposta alostática. Ao conjunto de alterações necessárias para manter a alostasia dá-se o nome de carga alostática <sup>8</sup>.

Chrousos e Gold em 1992 modificaram a doutrina da não especificidade, propondo que acima de um limiar, qualquer estressor pode elicitar a síndrome do estresse, ou seja, até certo limiar, um agente estressor desencadeia respostas adaptativas específicas à sua natureza, entretanto, uma vez que este ponto seja excedido, ocorre uma reação sistêmica envolvendo os sistema de estresse no cérebro e seus componentes periféricos, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e o sistema nervoso simpático<sup>9</sup>.

## **Conceitos**

Os organismos vivos lutam para obter e manter-se em circunstâncias adequadas para o seu bem estar. Sob condições favoráveis, os indivíduos investem em funções vegetativas e agradáveis que são capazes de favorecer seu crescimento, desenvolvimento e a sobrevivência de suas espécies. Quando as condições ambientais são desfavoráveis, os indivíduos se adaptam às circunstâncias tentando deslocar-se para situações de maior conforto. As respostas adaptativas e homeostáticas direcionam-se no sentido de proteger o meio interno de mudanças que prejudiquem a sobrevivência das células e dos sistemas corporais. As respostas adaptadoras são proporcionais à intensidade do estímulo e variam de uma simples reação localizada a um estado generalizado e sistêmico que afeta todo o organismo<sup>2</sup>.

Quando nos deparamos com uma demanda excessiva ou ameaçadora, o indivíduo responde de uma forma estereotipada conhecida como estresse<sup>2-</sup>



<sup>5;9-17</sup>. O estresse é então definido como 'um estado onde o cérebro interpreta a quantidade de estímulo como excessiva ou sua qualidade como ameaçadora e responde de maneira generalizada' <sup>2</sup>. Estressores biológicos, físicos ou psicológicos geralmente precipitam respostas similares àquelas definidas por Selye como a '*síndrome geral de adaptação*'. Durante o estresse, o débito cardíaco e a respiração são aumentados e o fluxo sanguíneo é direcionado para suprir o novo estado de energia. O cérebro foca na percepção da ameaça e age de acordo com ela. O metabolismo aumenta e o combustível é utilizado para suprir o cérebro, coração e músculos. Todas estas são respostas compensatórias do organismo no sentido de atingir e sustentar um novo estado de equilíbrio com maior demanda de energia. Estas respostas fisiológicas ao estresse não são ubiqüitárias, mas variam em sua magnitude e/ou duração dependendo da natureza, variação da exposição e/ou da intensidade do estímulo experimental. <sup>18</sup>

## Classificação do estímulo estressor

Em uma revisão publicada em 2001 <sup>3</sup> os agentes estressores foram classificados em quatro categorias principais:

- Estressores que consistem em um estímulo físico ou que possuem um componente psicológico significativo, como dor, choque elétrico, imobilização
- Estressores psicológicos que refletem uma resposta aprendida às condições adversas vivenciadas previamente
- Estressores sociais que provocam distúrbios nas interações entre os indivíduos
- Estressores que modificam a homeostase cardiovascular ou metabólica como hemorragia, exercício, hipoglicemia.

Existem outras classificações para os estressores que são divididos em três categorias <sup>17</sup>:

- Condições externas que provoquem dor ou desconforto
- Distúrbios da homeostase interna
- Respostas associativas ou de aprendizado para a percepção de perigo, dor ou desconforto (estresse psicológico)

Em relação à duração, os estressores podem ser divididos em duas categorias <sup>3</sup>:

- Agudo: único e com tempo de exposição limitado

- Crônico: intermitente e com exposição prolongada ou exposição contínua

## **Modelos de estresse utilizados neste trabalho**

Estresse de contenção:

Uma grande variedade de paradigmas comportamentais foi desenvolvida para mimetizar o estresse psicológico de humanos em modelos animais. A maioria dos pesquisadores que trabalham com as bases neuroanatômicas e neuroquímicas para a liberação de hormônios induzida por estresse utilizam o paradigma do medo condicionado ou a contenção. A imobilização produz respostas neuroendócrinas similares ao medo, porém não envolve o componente de aprendizagem.

Hans Selye foi o primeiro pesquisador a utilizar o modelo de imobilização, e este promovia a manifestação da síndrome do estresse. O modelo original de contenção de Selye consistia em atar as pernas dos ratos e depois envolvê-los com uma toalha<sup>3</sup>.

Múltiplas estruturas cerebrais estão envolvidas na organização de respostas aos estímulos aversivos. Entre eles estão o hipotálamo, estruturas septo-hipocampais, amígdala, córtex pré-frontal e cingulado, grupos de corpos catecolaminérgicos (A1/C1 no núcleo do trato solitário, A6 no *locus coeruleus*),

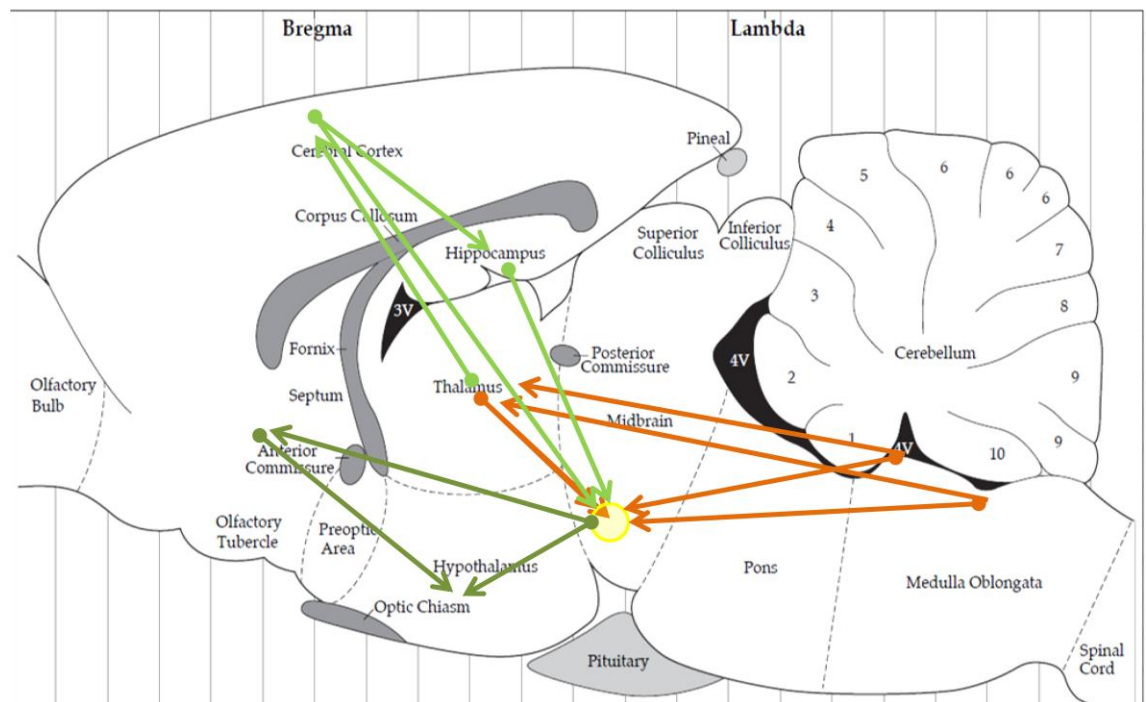
núcleo parabraquial, cuneiforme e dorsal da rafe. A maioria das aferências sensoriais passa através do sistema reticular ou através do tálamo, que funciona como uma estação que envia os sinais para o córtex sensorial. O córtex sensorial comunica estas informações diretamente ou via hipocampo com a amígdala lateral <sup>3;15;17-20</sup>.

A amígdala basal-lateral funciona como um centro integrador dos impulsos sensoriais provenientes do tálamo e das informações cognitivas do córtex e hipocampo. Os núcleos central e medial estariam envolvidos com as respostas comportamentais. Além disso, a amígdala exerce um papel nas respostas neuroendócrinas e cardiovasculares ao estresse. O hipotálamo recebe axônios de células da amígdala cuja via amígdala-hipotalâmica parece estar envolvida na resposta adrenocortical aos estímulos sensoriais <sup>3;15;17-20</sup>.

O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) atua como um integrador das respostas endócrinas, autonômicas, e das funções comportamentais sob uma grande variedade de estímulos psicológicos. O núcleo paraventricular recebe informações aferentes sensoriais do sistema límbico através do núcleo de origem da estria terminal (BNST), que faz inúmeras conexões com a amígdala. Muitos dos impulsos catecolaminérgicos para o núcleo paraventricular são provenientes vias colaterais do núcleo central da amígdala. Neurônios GABA-érgicos intra-hipotalâmicos também emitem conexões para o PVN <sup>14;17;20;21</sup>.

Fig 2

## Circuitos do estresse de contenção



Estes núcleos envolvidos participam da resposta ao estresse de confinamento, tanto a contenção quanto a imobilização. A localização comum de diversas populações neuronais que são ativadas durante o processamento central do estresse implica que ativação e também a intensidade da respostas dependeriam do estímulo aversivo.

Algumas das manifestações observadas nos animais submetidos à contenção são:

- Taquicardia que decai durante o período de confinamento, mostrando uma adaptação em curto prazo <sup>22</sup>

- Redução da temperatura corporal nos momentos iniciais de contenções prolongadas<sup>22</sup>
- Alteração no valor-alvo de temperatura corporal<sup>23</sup>
- Intensa ativação do eixo HPA, com elevação dos níveis de CRH, ACTH e corticosterona<sup>13</sup>
- Elevação da glicose plasmática já aos 5 minutos de contenção<sup>24;25</sup>
- Aumento da secreção de prolactina<sup>24;25</sup>

#### Estresse por exposição ao éter

A exposição a vapores de éter pode ser considerada um tipo de estressor com características eminentemente físicas. Estressores físicos, que representam uma ruptura na homeostase interna, desencadeiam uma resposta do sistema nervoso central que não ativa as vias de processamento cognitivo<sup>2;3</sup>. Estes estressores são desencadeados por estímulos interoceptivos que podem relacionar-se diretamente com neurônios efetores do hipocampo sem serem mediados por estruturas corticais ou límbicas<sup>26-28</sup>.

As regiões cerebrais que estão envolvidas na resposta ao éter ainda não foram completamente determinadas. A ativação do paraventricular, apesar de ser intensa no estresse por éter, não pode ser considerado como um bom preditor da intensidade da resposta do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, uma vez que é ativada em diversos tipos de estressores<sup>17;28</sup>. Regiões extra-

hipotalâmicas como o neocortex e o *striatum*, estão associadas indiretamente com a integração da resposta central. Enquanto que o hipocampo está implicado na inibição multissináptica do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal <sup>29</sup>, provavelmente a região CA3 <sup>27</sup>. Outras regiões hipotalâmicas como a área pré-optica e o hipotálamo dorso medial também estão relacionadas com o controle deste eixo <sup>27</sup>.

A ativação do córtex frontoparietal sugere que o éter recruta neurônios nesta região a despeito das características interoceptivas do estímulo. Por outro lado, Figueiredo ET AL, 2003 demonstrou haver um aumento da expressão de RNAm no córtex piriforme e núcleo dorsal endopiriforme. A ativação destas regiões estaria diretamente relacionada com a natureza olfatória da exposição aos vapores de éter, resultando numa ativação preferencial do córtex olfatório <sup>27</sup>.

Emmert em 1990 sugeriu que o estímulo desencadeado pelo éter ascende até o tronco cerebral pelos complexos dorso vagal e ventromedial da medula, até alcançar os níveis superiores como o paraventricular, levando à produção de hormônio adrenocorticotrófico. Alternativamente, o éter pode influenciar na secreção de hormônio adrenocorticotrófico através de uma ação direta na hipófise <sup>28</sup>.

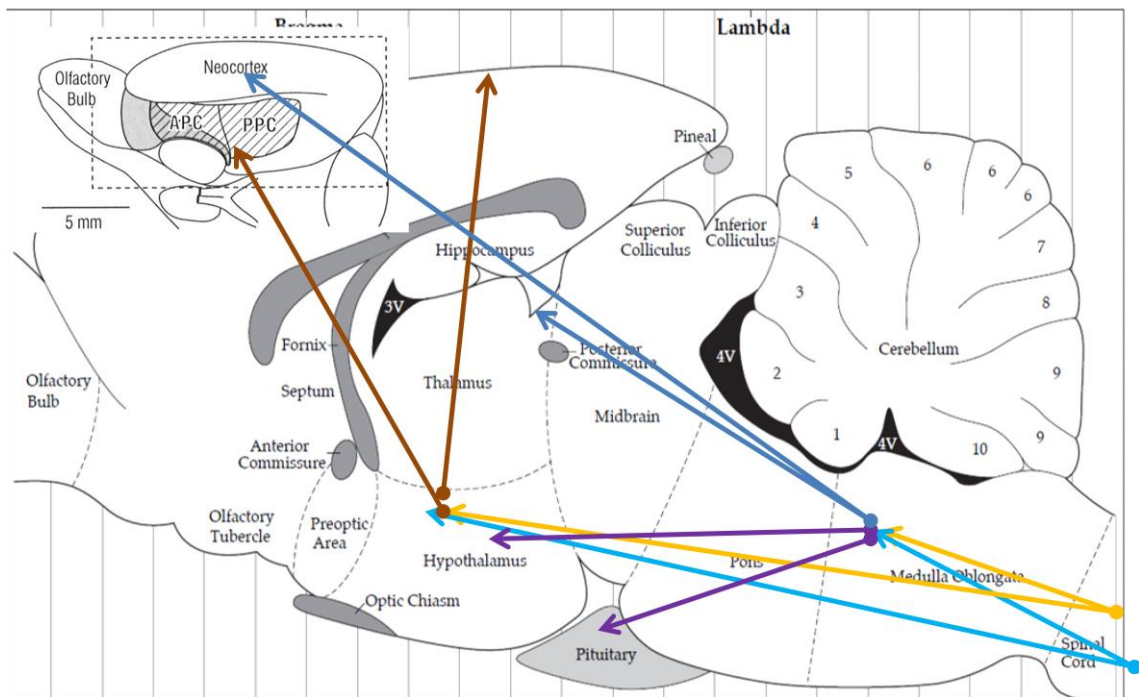
O núcleo paraventricular reconhecidamente atua como um componente chave para resposta ao estresse, principalmente através do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Entretanto, há novas evidências de que este núcleo estaria também envolvido no controle central da respiração. Traçadores neuroanatômicos mostraram conexões diretas entre os neurônios do

paraventricular até os motoneurônios frênicos e que a ativação química do núcleo paraventricular induz uma resposta motora diafragmática <sup>26</sup>, sugerindo também uma via de resposta ao estresse por éter.

Fig 3



## Circuitos do estresse por éter



Algumas manifestações observadas após a exposição ao éter:

- Elevação dos níveis plasmáticos de hormônio adrenocorticotrófico corticosterona <sup>27;28;30</sup> diminuição dos níveis plasmáticos de hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante e inibina <sup>31</sup>.
- Elevação da prolactina plasmática <sup>25;30;32</sup>
- Elevação da glicemia <sup>25</sup>

## Paradigma da separação materna

Experiências em períodos precoces da vida são fatores reconhecidamente causadores de alterações no desenvolvimento comportamental e do desenvolvimento cerebral em animais e humanos. Existe uma complexa gama de situações que ocorrem durante o desenvolvimento ou mesmo durante a vida adulta que resultam em vulnerabilidade ou resistência ao estresse. Um dos maiores componentes que influenciam este desenvolvimento é a natureza do ambiente durante o período pré-natal ou pós-natal <sup>26;33-62</sup> (Fig 1).

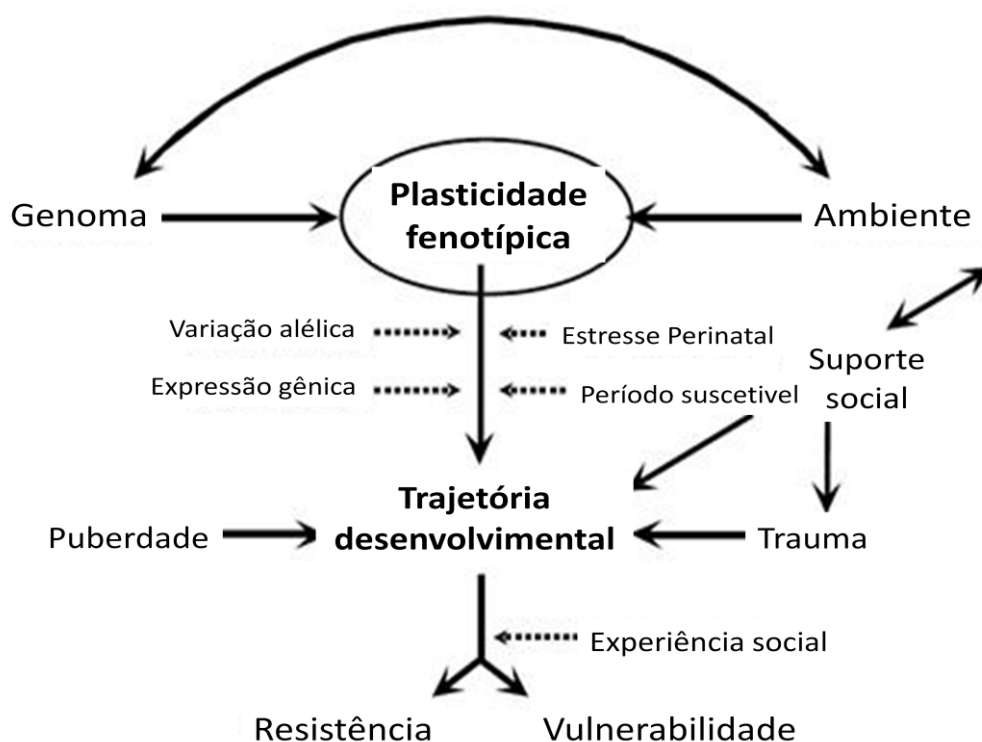


Fig1. Respostas fisiológicas e patológicas ao estresse. A resistência ou vulnerabilidade de um indivíduo às situações estressoras durante a vida adulta parece depender da carga genética e/ou de experiências nas primeiras semanas de vida <sup>5</sup>

Em 1956, Levine demonstrou que exposição a situações estressoras nos períodos iniciais geravam profundas alterações a longo termo tanto no

comportamento, quanto na resposta ao estresse, especificamente do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Os filhotes separados das mães por breves períodos apresentavam-se menos responsivos aos desafios durante a idade adulta <sup>63</sup>.

Alguns anos depois, Denenberg <sup>64</sup> propôs que estes efeitos poderiam ser mediados pelas alterações no comportamento materno gerado pela manipulação, fato que foi comprovado recentemente <sup>45;65</sup>.

Surpreendentemente, a separação materna diária por longos períodos (maiores que 120 minutos) na mesma idade provocam respostas menos consistentes. Os animais separados das nutrizes por um tempo de pelo menos 180 minutos, nas duas primeiras semanas de vida, apresentam respostas que variam desde uma maior responsividade ao estresse e dor até uma redução das manifestações de medo <sup>45</sup>. Desta forma, a preponderância destes dados sugere que o fenótipo do animal adulto que foi exposto à separação materna repetidamente contrasta com o fenótipo dos animais que foram separados brevemente.

Esta variação nas respostas entre os dois grupos sugere que somente as modificações no padrão de cuidado materno não são suficientes para explicar estas respostas <sup>45</sup> e que, o período pós-natal representa um momento onde o cérebro apresenta alto grau de plasticidade. Portanto, é difícil conceber a idéia que manipulações no ambiente ou diminuição de estímulos não teriam impacto na programação do cérebro em desenvolvimento <sup>66</sup>

Informações sobre o meio interno e externo atingem as células secretoras hipotalâmicas através de uma extensa e difusa rede neural. Informações sensoriais provenientes da cavidade oral, cavidade torácica e das vísceras são transmitidas até o sistema nervoso central via nervo vago e glossofaríngeo, enquanto as informações para centros inferiores ascendem via barorreceptores e vias somatossensoriais, justificando a idéia que a remoção materna gera alterações nestes estímulos por levar a uma privação de alimento, estimulação sensorial ativa e contato passivo <sup>60</sup>.

### **Período hiporresponsivo ao estresse**

Na fase final da gestação, períodos perinatal e pós-natal na maioria das espécies são caracterizados por uma intensa organização sináptica do sistema nervoso central. Este processo de sinaptogênese e remodelamento estão relacionados com uma maturação funcional dos principais sistemas de neurotransmissores e neuromodulatórios. Em estágios tardios da maturação e da vida adulta, a maioria destes processos é influenciada pela produção de glicocorticóides e hormônios tireoidianos. O excesso de glicocorticóides é deletério para o cérebro em processo de maturação, enquanto que baixos níveis de secreção de corticosterona permitem um desenvolvimento cerebral adequado. Nos ratos, o período pós-natal é crítico para o desenvolvimento e integração de vários sistemas centrais e periféricos para a manutenção da homeostase <sup>60</sup>.

Durante os estágios iniciais do desenvolvimento, o rato neonato desenvolve uma redução das respostas do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal aos diferentes tipos de estresse. Este período é chamado de 'período hiporresponsivo ao estresse' (SHRP) e seus limites encontram-se entre o 4º e o 14º dia pós-natal (PND), com os menores níveis de glicocorticóides aproximadamente no 9º dia. A resposta do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal geralmente está presente neste período, porém com sua intensidade reduzida aos diversos tipos de estresse (éter, calor, manipulação, procedimentos cirúrgicos, frio e choque elétrico). O cérebro parece ser capaz de ser ativado pelo estresse durante o período hiporresponsivo, porém sua ativação não se estende à resposta pituitário-adrenal. A intensidade de ativação deste eixo neste período sofre também influências de outras circunstâncias como a idade do animal, a duração do estresse, o tipo do estressor, o sexo, linhagem e a espécie dos animais <sup>51</sup>.

Foi sugerido que o período hiporresponsivo ao estresse facilita o desenvolvimento pós-natal do sistema nervoso central na ausência de altos níveis de glicocorticóides. A exposição elevada aos glicocorticóides pode levar a danos celulares, inibindo mecanismos relacionados com a mielinização e proliferação celular. Portanto, o período hiporresponsivo ao estresse pode ser considerado como um importante mecanismo de proteção para o rato neonato evitando um episódio prolongado de secreção de glicocorticóides durante este período crítico no desenvolvimento cerebral <sup>51</sup>.

Estudos posteriores mostraram que em contraste com a resposta das adrenais na secreção de corticosterona, que está deprimida nas duas primeiras

semanas de vida, a secreção plasmática de hormônio adrenocorticotrófico em resposta a diversos estressores não estava alterada no mesmo período <sup>60</sup>. Os valores plasmáticos de hormônio adrenocorticotrófico variam qualitativa e quantitativamente em função do agente estressor e do tempo do desafio. Estressores como o frio, éter, histamina, dor, endotoxinas e separação materna resultam em uma ativação significativa do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Estes achados induzem uma revisão do conceito original do período hiporresponsivo ao estresse. Além disso, a hiporresponsividade das adrenais não parece ser um simples processo maturacional, uma vez que a resposta das adrenais ao estresse no final da gestação e em neonatos no primeiro dia de vida parece estar funcionalmente intacta <sup>60</sup>.

### **Importância do modelo**

O termo *experiências adversas precoces* foi atualmente introduzido como conceito de um novo paradigma que visa investigar os efeitos adversos nas fases iniciais da vida dos neonatos. Deste modo vem aumentando o interesse em conhecer os fatores ambientais internos e externos que poderiam influenciar e regular a expressão de genes envolvidos na regulação das respostas comportamentais e fisiológicas. Há muito, foi reconhecido a importância dos cuidados parentais no período pós-natal como um dos principais fatores reguladores no desenvolvimento psicomotor, comportamental e endócrino tanto do indivíduo, quanto da ninhada <sup>67</sup>.

Estudos epidemiológicos indicam que exposição de crianças a experiências adversas em fases precoces da vida aumenta o risco de desenvolvimento síndromes na idade adulta como estresse pós-traumático, depressão, desordens ansiosas<sup>67</sup>, desordens de maturação e desenvolvimento sexual<sup>46</sup>, síndromes inflamatórias, alterações no trato gastrointestinal<sup>34;59</sup>, doenças cardiovasculares<sup>59</sup>, desordens alimentares como anorexia<sup>42</sup> e alterações nas funções respiratórias<sup>26</sup>.

Esforços consideráveis vêm sendo feitos para se identificar as vias comportamentais e fisiológicas modificadas em humanos adultos que vivenciaram situações adversas precoces e também modelos animais vivos nos quais manipulações específicas no relacionamento mãe-filhote reproduzem os efeitos agudos e/ou crônicos nas mesmas vias.

## **Hipóteses**

Considerando-se que o estresse é o estado em que o cérebro interpreta a quantidade do estímulo como excessiva e ameaçadora, e gera uma resposta generalizada<sup>2;9</sup>, a exposição à condições hostis desencadeia, como parte dos mecanismos de sobrevivência, a secreção de diversos hormônios, incluindo corticosterona/ cortisol, catecolaminas, prolactina, oxitocina, sexoesteróides e renina<sup>2;3;9;16;17;24;25;31</sup>.

As respostas adaptadoras ao estresse refletem a ativação complexa de circuitos neurais específicos e são programadas geneticamente, continuamente modificadas e constantemente moduladas pelos fatores ambientais<sup>2-</sup>

5;10;13;14;17;68. Os marcadores neuroendócrinos mais utilizados são o aumento rápido do hormônio liberador de corticotrofina, do hormônio adrenocorticotrófico e dos glicocorticóides<sup>2;4;9;13;14;19;32;35;39;44;45;49;52;55;69;70</sup>. Outra via muito estudada ativada pelo estresse é o eixo hipotálamo, sistema nervoso simpático periférico e medular da adrenal. A ativação simpática eleva a produção hepática de glicose e aumenta a liberação dos hormônios hiperglicemiantes adrenalina e glucagon, além da inibição da secreção de insulina<sup>24;25;70</sup>. A glicose plasmática e a secreção de insulina também podem ser utilizadas como marcadores de estresse.

A prolactina é outro marcador sensível tanto ao estresse com características físicas, quanto com características psicológicas. Esta possui inúmeros efeitos metabólicos e comportamentais: induz o aumento da secreção de glicocorticóides<sup>71;72</sup>, aumenta o limiar de dor, induz um comportamento defensivo e tem um efeito protetor contra a úlcera gástrica e hipertermia induzida pelo estresse<sup>17;20;24;25;32;71</sup>

O conceito recente da heterogeneidade do estresse propõe que para cada estressor existe um mecanismo de resposta central e periférico distinto e, que a ativação dos circuitos neurais relacionados ao estresse é dependente dos atributos do estímulo<sup>3</sup>. Estes padrões distintos de ativação central desencadeariam respostas neuroendócrinas e metabólicas diferentes. Estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que ratos submetidos ao estresse por éter tiveram um aumento da glicose plasmática maior que os ratos submetidos ao estresse de contenção. Por outro lado, a contenção evoca uma



resposta mais intensa e persistente na prolactina plasmática que a exposição ao éter<sup>24;25</sup>.

Uma parcela significativa da variação individual ao estresse pode ser atribuída aos fatores ambientais, incluindo os eventos nos períodos iniciais da vida e eventos mais tardios, ambos com efeitos permanentes ou em longo prazo. Como citado anteriormente, o período neonatal é uma fase de grande plasticidade cerebral e uma ativação anormal do sistema de estresse neste momento pode provocar um profundo efeito na sua função<sup>33;48;49;60;73</sup>.

A idéia sugerida por Levine há mais de 50 anos de que a manipulação neonatal geraria alterações na resposta ao estresse na vida adulta vem sendo continuamente confirmada e estudada<sup>74</sup>. A manipulação ou a separação materna dos animais durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal resulta em modificações salutaras nas respostas neuroendócrinas e comportamentais, inclusive das aquisições dos marcos motores desenvolvimentais, de maneira gênero dependente<sup>35;37;50;51;62</sup>.

O desenvolvimento do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal é profundamente afetado pelos eventos pós-natais. Os animais expostos a períodos de separação materna apresentam um aumento da responsividade ao estresse na idade adulta<sup>26;33-45;49;51-54;56-59;62;75-77</sup>, principalmente do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal. Este é um efeito em longo prazo e pode ser visto em ratos de 24 a 26 meses de idade, indicando um efeito duradouro<sup>48;67;74;78</sup>. Há evidências que alguns dos efeitos no eixo hipotálamo-pituitário-adrenal sejam provocados por alterações na densidade de glicorreceptores em determinadas regiões cerebrais como hipotálamo, hipocampo e córtex frontal, o

que mediará um feedback negativo nos glicocorticóides<sup>33;35;51;51;62;77</sup> e também uma redução nos receptores  $\alpha 2$  em regiões contendo células noradrenérgicas, especialmente o locus ceruleus e núcleo do trato solitário<sup>43;58</sup>.

Levine propôs que a manipulação altera o comportamento da mãe e que estas diferenças na interação mãe-filhote produziram as respostas metabólicas e comportamentais diferentes observadas nos ratos adultos. Liu ET AL. em 2000 mostrou que os cuidados maternos, particularmente lambar e a limpeza dos filhotes durante os 10 primeiros dias de vida, produzem uma diferença marcante na sensibilidade ao feedback dos glicocorticóides<sup>43;79</sup>. Por outro lado, a substituição da ninhada separada por uma ninhada adotiva diminui as modificações dos cuidados maternos e atenua as alterações da resposta ao estresse na vida adulta<sup>39</sup>, ou a limitação dos níveis de cuidado materno usando-se números diferentes de filhotes com intervalos variados também provoca variações nas respostas metabólicas<sup>45</sup>, indicando uma dissociação (ao menos parcial) destes fatores<sup>65</sup>.

Ratos manipulados após este período não demonstraram as mesmas respostas confirmando o postulado do 'período crítico', embora alterações ambientais em qualquer idade dentro dos trinta primeiros dias de vida pós-natal possam induzir outras modificações bioquímicas e morfológicas<sup>33;41;58;58;73;76;76;77</sup>.

Considerando-se as possíveis alterações induzidas pela separação materna nas manifestações do estresse, o presente estudo propõe avaliar a resposta hipofisária ao estresse através da secreção de prolactina e a ação periférica do sistema nervoso simpático atuando nos órgãos efetores

utilizando-se a secreção de insulina, concentração de lactato, glucagon e glicose plasmáticos. E, finalmente, se os circuitos neurais envolvidos com estes modelos de estresse são afetados pela separação materna e de que maneira.

## OBJETIVOS

---

## **Objetivo geral**

- ✓ Avaliar os efeitos da separação materna na resposta endócrina e metabólica em ratos submetidos ao estresse de contenção e ao estresse por éter

## **Objetivos específicos**

- ✓ Comparar dois modelos de estresse com características diferentes, verificando a especificidade da resposta metabólica usando-se:
  - I. Glicose plasmática
  - II. Secreção de insulina
  - III. Secreção de prolactina
  - IV. Concentração de lactato
  - V. Secreção de glucagon
  
- ✓ Avaliar a capacidade de modificação da programação neuroendócrina nos ratos submetidos à separação materna comparando-se os parâmetros endócrino-metabólicos estudados com ratos controle
  
- ✓ Identificar e comparar, através da expressão de c-Fos, os circuitos neurais classicamente ativados pelo estresse de contenção e pelo estresse por éter:
  - I. Núcleo do trato solitário

- II. Locus Coeruleus
- III. Amígdala
- IV. Núcleo Paraventricular
- V. Área pré-óptica

- ✓ Avaliar como a separação materna influencia a ativação dos circuitos neurais avaliados e quais são os padrões da modificação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

## **Animais**

Foram utilizados neste estudo ratos da linhagem Wistar machos, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os ratos foram mantidos em uma sala com temperatura seca controlada em  $24,1 \pm 1,5^{\circ} \text{C}$ , sob ciclo claro-escuro de 14-10 h, acesso livre à água e ração granulada (Purina lab chow). Após o parto os filhotes foram agrupados provenientes de ninhadas diferentes a fim de se minimizar as variações de linhagem em grupos de oito machos saudáveis e colocados em caixas de polietileno limpas. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para cuidado e uso de animais de laboratório da Universidade Federal de Minas Gerais.

## **Paradigma de Separação Materna**

A Separação Materna (SM) consistiu em retirar a mãe da caixa por 180 minutos, deixando os filhotes sem manipulação. Durante o período de separação, os filhotes foram alojados em outro ambiente para impedir a comunicação das mães por vocalizações ultra-sônicas<sup>80</sup>. A separação materna foi realizada entre o 2º e o 14º dia de vida pós natal (DPN) entre 12:00 e 15:00 h (dia do nascimento DPN zero).

Os animais do grupo controle foram deixados sem manipulação durante todo este período, excetuando-se os dias de limpeza das caixas e troca de



maravalha, que ocorria duas vezes por semana e para reposição de água e ração.

No 30º DPN os filhotes foram desmamados e colocados em caixas de polietileno com os 8 animais do mesmo tratamento até a idade de 8-12 semanas quando foram realizados os experimentos.

Os animais foram pesados nos dias 3, 9, 12, 30, 45, 60 e no dia do experimento. As três primeiras pesagens foram feitas com os filhotes em grupo para que fosse minimizado qualquer fator estressante durante o período hiporresponsivo, nos demais dias as pesagens foram individuais.

## **Procedimento cirúrgico**

Cinco dias antes dos experimentos os ratos tiveram um cateter de silastic implantado no átrio direito através da veia jugular (Harms & Ojeda, 1974) sob anestesia com tribromoetanol e posteriormente alojado em gaiolas individuais. Diariamente eles eram manipulados para familiarizá-los com os procedimentos de coleta de sangue e para reduzir a resposta não específica ao estresse durante os experimentos. O cateter foi lavado a cada dois dias com 1mL de salina contendo 25  $\mu$ U de heparina (Liquemine, Hoffman-La Roche)

## **Protocolos experimentais**

Os ratos foram submetidos de maneira aleatória a ambos os protocolos experimentais: contenção e exposição ao éter, com duas semanas de intervalo.

Os animais foram trazidos ao laboratório nas gaiolas individuais, pesados em uma balança eletrônica (Filizola) com precisão de 0,5 g. Após esse procedimento os ratos foram levados à sala de experimento e deixados em repouso durante 40 minutos para se ambientarem, após este período iniciava-se o experimento.

Estresse de contenção: introdução dos ratos em um tubo plástico (21 cm comprimento e 4,5 cm de diâmetro) onde havia restrição de movimento por 20 minutos. Amostras de sangue (0,5 mL) foram retiradas imediatamente antes, 5, 15 e 20 minutos após a imobilização, através de um tubo de polietileno conectado ao cateter venoso. O sangue retirado era repostado com o mesmo volume de salina.



Estresse por éter: Os ratos foram expostos a uma atmosfera com éter durante 10 min. Os animais eram colocados em uma cuba fechada com uma fonte de vapor de éter até a perda do tônus postural, em seguida eram retirados da cuba e a atmosfera de éter era mantida com uma máscara contendo um algodão embebido em éter. Amostras de sangue (0,5 mL) foram retiradas

imediatamente antes, 5, 15 e 20 minutos após a exposição ao éter, através de um tubo de polietileno conectado ao cateter venoso. O sangue retirado era repostado com o mesmo volume de salina.



### Processamento das amostras

Amostras de 0,5 mL foram coletadas em tubos plásticos contendo 10 $\mu$ L de aprotinina e mantidas no gelo. O plasma foi separado por centrifugação: 756 g (3000 rpm/ 10 min) e armazenado à -20 $^{\circ}$  até o dia do ensaio.

A glicose e o lactato foram dosados pelo método enzimático usando o 2300 STAT PLUS Glucose Analyser. A prolactina plasmática foi dosada pelo método de radioimunoensaio em duplicata usando materiais provenientes de NIDDK (Bethesda, MD, USA). O glucagon plasmático foi dosado por radioimunoensaio em duplicata usando um kit comercial (Linco Research, INC. St. Charles, Missouri, USA). A sensibilidade do ensaio foi 20 pg/mL. A insulina plasmática também foi dosada através de radioimunoensaio em duplicata usando Insulin RIA Kit (Linco Research, INC. St. Charles, Missouri, USA). A sensibilidade do ensaio foi 0,1 ng/mL.

As dosagens hormonais foram realizadas em apenas um ensaio, minimizando o erro entre ensaios.

## Grupo II

Os animais deste grupo foram utilizados para o processamento dos cérebros para imunohistoquímica e para análise e avaliação do tecido adiposo periférico. Os ratos foram submetidos ao paradigma da separação materna e posteriormente aos dois protocolos experimentais com exposição ao éter e a contenção. Após 90 minutos do final do experimento os animais foram submetidos à eutanásia com dose letal de anestésico, medido o comprimento naso-anal (CNA) e calculado o índice de Lee ( $CNA/\sqrt[3]{\text{peso}}$ ) sendo então retirados o tecido adiposo marrom, o epididimal, o inguinal e o retroperitoneal, que foram pesados.

Para o processamento dos cérebros para imunohistoquímica para c-Fos e Tirosina hidroxilase os ratos foram perfundidos através da aorta ascendente com 50 mL de tampão fosfato salina 0,01M (PBS 0,01M: tampão fosfato 0,01M em solução de NaCl 0.9%) contendo heparina (5UI/mL) à temperatura ambiente, seguido de 400 mL de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (PFA 4%) a 4°C. Após a perfusão, os cérebros foram pós-fixados em PFA 4% por 2 horas a 4°C.

Após a fixação foram submetidos à crioproteção após a fixação, os cérebros foram mergulhados em solução de sacarose 30% diluída em tampão fosfato 0,1M (PB 0,1M), a temperatura de 4°C, até a saturação. O tempo de saturação estimado foi de 48 horas, sendo verificada a posição do cérebro que, inicialmente flutua na solução e, após a saturação, precipita-se no fundo do recipiente.

Congelamento: após a crioproteção, os cérebros foram mergulhados em isopentana 99% (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>), mantida a temperatura entre -45 e -50°C, durante 1 minuto. Logo após o congelamento, os tecidos foram rapidamente armazenados a -70°C até o momento da obtenção dos cortes em criostato.

Utilizando como referência o Atlas Paxinos e Watson foram realizados cortes coronais semi-seriados 1:4 de 40 µm para as seguintes áreas cerebrais: núcleo pré-optico medial (NPOM), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), núcleo medial da amígdala (MeA), regiões catecolaminérgicas A1 e A2 no núcleo do trato solitário (NTS) e de 25 µm na região do Locus Coeruleus. Quatro séries foram obtidas e armazenadas em solução crioprotetora a -20°C, onde permaneceram até a realização da imunohistoquímica.

## **Imunohistoquímica**

A imunohistoquímica foi realizada pelo método de “free-floating”. Antes do início da imunohistoquímica os cortes foram lavados 3 vezes, por 5 minutos, em PBS 0.01M para remoção da solução crioprotetora. Nos passos do protocolo abaixo, todos os procedimentos foram realizados a temperatura ambiente (22°C), exceto as incubações com os anticorpos primários, que foram realizadas a 4°C:

- lavagem dos cortes com glicina 0,1M diluída em PBS 0,01M, por 10 minutos;
- lavagem dos cortes com PBS 0,01M, uma vez, por 5 minutos;

- incubação dos cortes com Triton X-100 0,4% (TX-100 0,4%) em PBS 0,01M por 30 minutos;
- lavagem dos cortes com PBS 0,01M, três vezes, por 5 minutos;
- incubação dos cortes com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% diluída em PBS 0,01M durante 50 min;
- lavagem dos cortes com PBS 0,01M, 5 vezes, por 5 minutos;
- incubação dos cortes com albumina bovina 3% (BSA 3%) em PBS 0,01M durante 1 hora;
- incubação dos cortes com o 1º anticorpo (1º AC) c-fos (Ab-5, Calbiochem), diluído 1:3000 para LC, em PBS+ (solução contendo TX-100, 0.3% e BSA 1% em PBS 0,01M), por 40 h a 4°C;
- lavagem dos cortes com PBS 0,01M, 5 vezes, por 5 minutos;
- incubação dos cortes com o 2º AC biotilado, anti-IgG de coelho produzido em cabra (BA-1000, Vectastain), diluído 1:600 em PBS+ durante 2 h;
- lavagem dos cortes com PBS 0,01M, 3 vezes, por 5 minutos;
- incubação dos cortes com o complexo formado pelos reagentes A (avidina DH) e B (peroxidase biotilada) do KIT ABC Elite (Vectastain), diluídos 1:100 em PBS 0,01M, durante 60 min;
- lavagem dos cortes com PBS 0,01M, 2 vezes, por 5 minutos;
- lavagem dos cortes com tampão acetato (0,175M; pH=7.5), uma vez, por 5 min;

- incubação dos cortes com solução contendo 3,3' diaminobenzidina-HCl (DAB 0,2 mg/mL; Sigma), sulfato de níquel (25 mg/mL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1µL/mL de uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) em tampão acetato 0,175M (pH=7.5), durante 15 min;
- lavagem dos cortes com tampão acetato (0,175M; pH=7.5), uma vez, por 5 min;
- lavagem dos cortes com PBS 0,01M, 2 vezes, por 5 minutos;
- lavagem dos cortes com PBS 0,01M, 5 vezes, por 5 minutos;
- incubação dos cortes com o 1º AC anti-TH, produzido em camundongo (anti-TH 2, Sigma), diluído 1:500000 para LC, em PBS+ por 48 h;
- lavagem dos cortes com PBS 0,01M, 5 vezes, por 5 minutos;
- incubação dos cortes com o 2º AC biotilado, anti-IgG de camundongo produzido em cavalo (BA-2001, Vector), diluído 1:600 em PBS+ durante 60 min;
- lavagem dos cortes com PBS 0,01M, 3 vezes, por 5 minutos;
- incubação dos cortes com o complexo formado pelos reagentes A (avidina DH) e B (peroxidase biotilada) do KIT ABC Elite (Vectastain), diluídos 1:100 em PBS 0,01M, durante 60 min;
- lavagem dos cortes com PBS 0,01M, 2 vezes, por 5 minutos;
- lavagem dos cortes com tampão Tris (0,05M; pH=7.6), uma vez, por 5 min;

- incubação dos cortes com solução de DAB (0,1 mg/mL; Sigma) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1µL/mL de uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) em tampão Tris-HCl 0,05M (pH=7.6), por 20 min;
- lavagem dos cortes com tampão Tris (0,05M; pH=7.6), uma vez, por 5 min;
- lavagem dos cortes com PBS 0,01M, 2 vezes, por 5 minutos;
- montagem dos cortes em lâminas gelatinizadas, secagem das lâminas e colagem das lamínulas utilizando Entellan (Merck).

Foram avaliados aproximadamente 120 µm de cada região cerebral avaliada iniciando-se nas seguintes coordenadas do Atlas Paxinos a partir do bregma: Núcleo pré-optico medial -0.36 mm; Núcleo Paraventricular -1,92 mm, Núcleo Supra-óptico – 1,08 mm; Núcleo Medial da Amígdala -2,28 mm; Locus Coeruleus -9,96 mm; regiões A1 e A2 do Núcleo do Trato Solitário -14,76 mm.

## **Estatística**

As diferenças entre as amostras plasmáticas foram determinadas por medidas repetidas de ANOVA two-way, seguida pelo método de comparação múltipla Holm-Sidak. Os valores de amostras pós-estresse foram comparadas com os valores basais pelo ANOVA one-way seguida pelo Holm-Sidak.

A regra trapezoidal foi usada para calcular a área sob a curva dos parâmetros metabólicos e a diferença entre os grupos foram determinadas pelo ANOVA, seguida pelo Holm-Sidak método de múltiplas comparações com nível



de significância  $P < 0,05$ . A comparação da ativação neuronal foi realizada pelo teste t- Student. Todos os cálculos foram realizados usando Sigma Stat 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## RESULTADOS

---

## Caracterização do modelo

Os pesos corporais do grupo Separação Materna nos dias pós-natal 3, 9, 12, 30 e 45 foram demonstrados na tabela I. O peso corporal do grupo MS nos DPN 30 e 45, quando os animais foram pesados individualmente, foram respectivamente 14% e 12% menores que o grupo controle respectivamente ( $P < 0.01$ ) (gráfico1)

Peso (g) pela idade em dias

Dia pós-natal	Separação materna	Controle
3	3.27	3.51
9	5.05	5.80
12	7.08	8.21
30	77.1 ± 1.4*	89.9 ± 2.1
45	151.5 ± 6.0*	171.9 ± 5.0

Tabela I- Peso corporal (g) pela idade dos ratos em dias de vida. Os filhotes foram pesados em grupo até o 12º e individualmente após este período (n=16). (\* $p < 0.01$ )

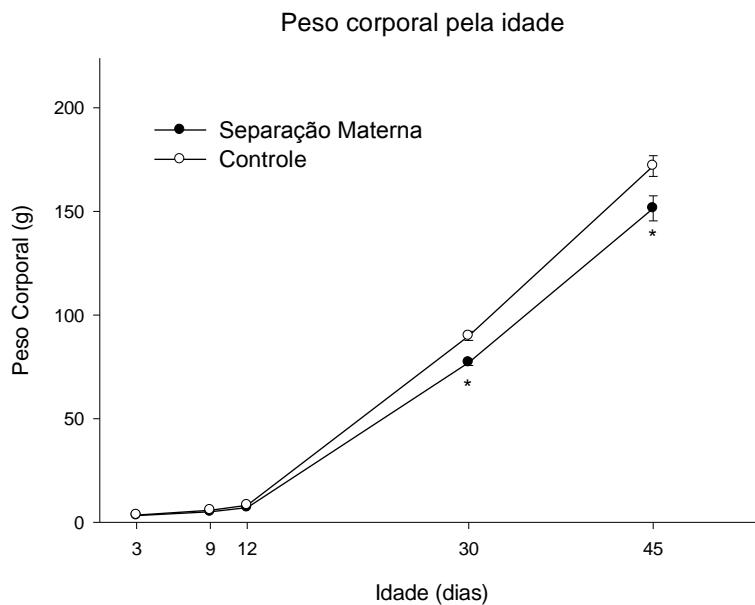
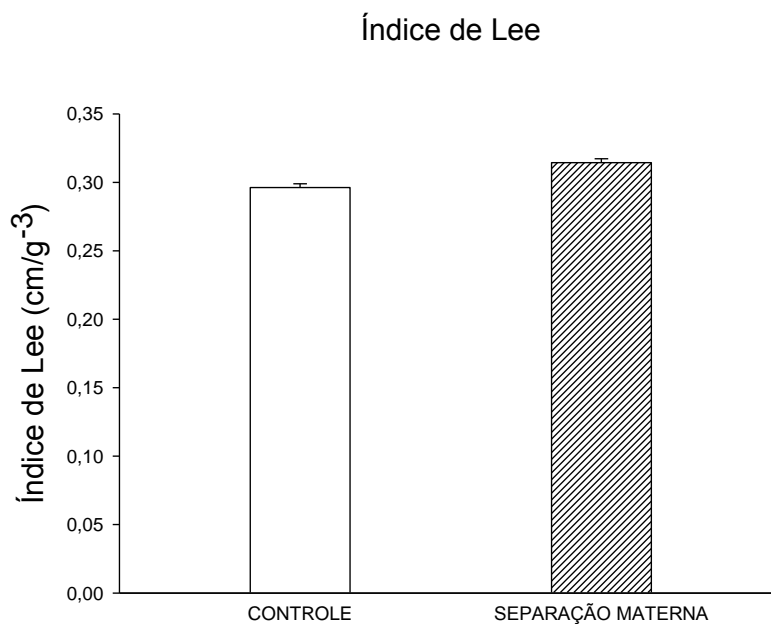


Gráfico 1- Ganho de peso corporal (g) em relação à idade em dias dos animais submetidos a SM comparados aos animais do grupo controle (\*  $p < 0,01$ ,  $n = 16$ )

O comprimento naso-anal do grupo separação materna também foi significativamente menor e o índice de Lee foi maior no grupo separação (gráficos 2 e 3) ( $P < 0,05$ ).



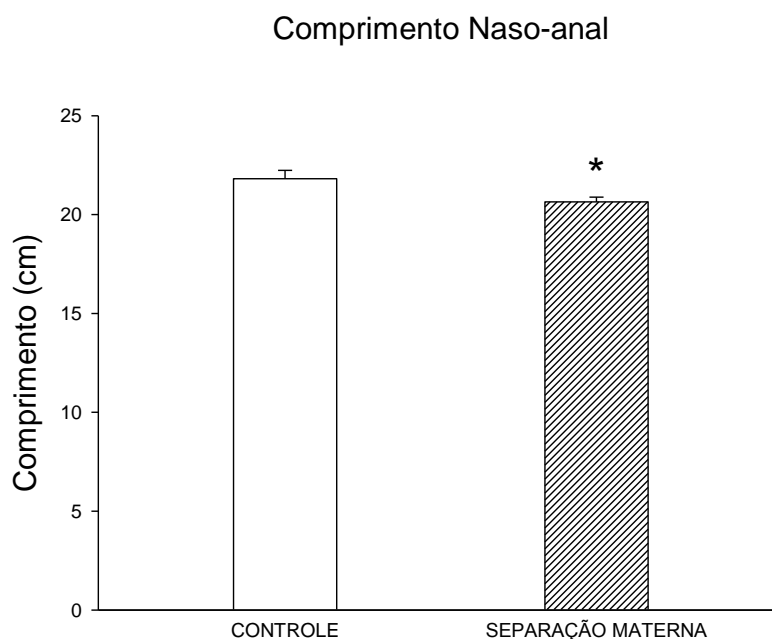


Gráfico 2 e 3 - Avaliação do índice de Lee e do comprimento naso-anal dos animais submetidos à Separação Materna comparados aos animais do grupo controle, no dia da eutanásia (n=8) (\*p<0,05)

Não foram observados diferenças entre os pesos dos tecidos adiposos retirados no grupo II. (Tabela II)

**Peso relativo do tecido adiposo**

	Marrom	Inguinal	Retroperitoneal	Epididimal
Controle	0,15±0,01	0,89±0,15	0,51±0,04	0,98±0,07
Separação Materna	0,18±0,11	0,64±0,08	0,51±0,08	1,02±0,11

Tabela II - Peso relativo do tecido adiposo {peso do tecido (g) / peso do animal (g)} (n=8)

## Respostas Hormonais e Metabólicas à exposição ao éter

No dia da exposição ao éter, as médias dos parâmetros basais não foram diferentes entre os grupos. A exposição ao éter induziu um aumento importante nos níveis plasmáticos de glicose, já observada aos 5 min. ( $P < 0,01$ ), com pico aos 15 min. Os níveis glicêmicos de ambos os grupos permaneceram acima do basal durante todo o experimento ( $P < 0,01$ ). Aos 5 minutos, a concentração de glicose no grupo separação materna foi menor que no grupo controle após a exposição ao éter ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 4). A área integrada sob a curva dos 20min de experimento da glicemia no grupo separação materna foi 32% menor que a área do grupo controle ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 6).

A secreção de insulina no grupo controle apresentou um aumento marcante, atingindo um pico aos 15 min. ( $P < 0,05$ ), e retornou aos valores basais aos 20 min. O grupo separação materna mostrou apenas um aumento discreto da insulina plasmática aos 5 min. ( $P < 0,05$ ) (Gráfico7). A área integrada sob a curva de insulina no grupo separação materna foi 76% menor que a área do grupo controle ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 9).

A exposição ao éter elevou os níveis de lactato plasmático em ambos os grupos aos 5 min. ( $P < 0,01$ ), e permaneceu elevada até os 20 min. ( $P < 0,01$ ). Entretanto o aumento na concentração do lactato plasmático no grupo separação materna foi menor que o grupo controle ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 10). A área integrada sob a curva do lactato no grupo separação materna foi 39% menor que a área do grupo controle ( $P < 0,05$ ) (Gráfico12).

A liberação de prolactina estava elevada aos 5 min. após a exposição ao éter, nos dois grupos ( $P < 0,01$ ). Porém, a concentração plasmática de prolactina no grupo controle permaneceu elevada durante todo o período experimental ( $P < 0,05$ ), enquanto o grupo separação materna retornou ao basal aos 15 min. O estresse por éter atenuou a resposta de secreção de prolactina no grupo separação materna aos 5, 15 e 20 min. ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 13). A área integrada sob a curva do grupo separação materna foi 60% menor que a do grupo controle ( $P < 0,05$ ) (Gráfico 15).

A separação materna não modificou os níveis plasmáticos de glucagon durante a exposição ao éter, como ilustrado nos gráficos 16 e 18.

### **Respostas metabólicas e hormonais ao estresse de contenção**

Nos experimentos com estresse de contenção, nem os parâmetros metabólicos ou os neuroendócrinos basais diferiram entre os grupos separação materna e controle.

A contenção gerou uma menor resposta glicêmica após 5 minutos tanto no grupo separação materna quanto no grupo controle quando comparados ao grupo submetido ao estresse por éter ( $P < 0,01$ ). Os animais apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de glicose já aos 5 minutos e este permaneceu elevado durante todo o período experimental (Gráfico 5), sem diferença entre os grupos.

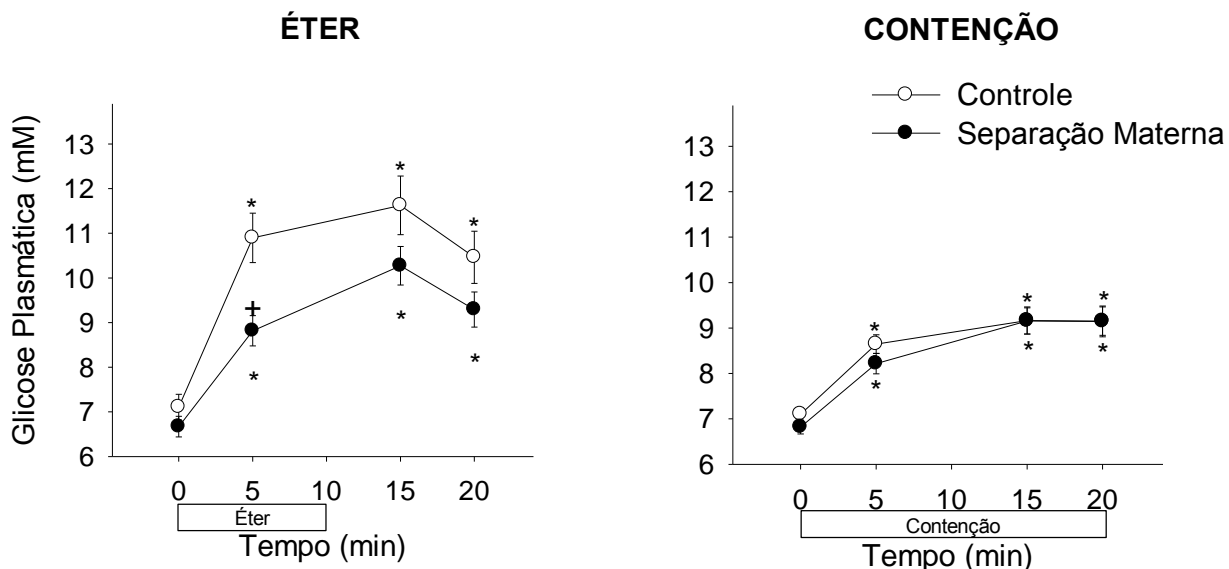
Ao contrário da resposta da insulina observada na exposição ao éter, a contenção física não produziu nenhuma modificação nos seus níveis plasmáticos em ambos os grupos com exceção de uma discreta elevação da insulinemia no grupo controle aos 15 min, mesmo ocorrendo um aumento nas concentrações de glicose no plasma. (Gráfico 8).

A concentração de lactato plasmática apresentou um aumento acentuado aos 5 minutos nos dois grupos experimentais ( $P < 0,01$ ), retornando aos níveis basais aos 20 minutos. Não havendo diferença entre os grupos (Gráfico11).

A liberação de prolactina em resposta à contenção foi 270% maior que a da exposição ao éter ( $P < 0,01$ ). A prolactina plasmática elevou-se aos 5 minutos e permaneceu alta até os 20 minutos ( $P < 0,01$ ). Entretanto ao contrário do observado na exposição ao éter, a separação materna não induziu qualquer mudança na resposta de prolactina durante a contenção (Gráfico 14).

Semelhante ao estresse por éter, a contenção não provocou nenhuma resposta em relação aos níveis de glucagon plasmático (Gráfico17 e 18).





Gráficos 4 e 5- Resposta da glicose plasmática à exposição ao éter (à esquerda) e ao estresse de contenção (à direita) no grupo controle e separação materna (180 min. diários entre o PND 2 -14). Exposição ao éter por 10 min. e contenção por 20 min. As amostras foram retiradas imediatamente antes do início do estresse, aos 5, 15 e 20 min. Os dados são representados em média± erro padrão (n=10-16 ratos). (\* p< 0,05 comparado ao basal. † p< 0,05 comparado ao grupo controle).

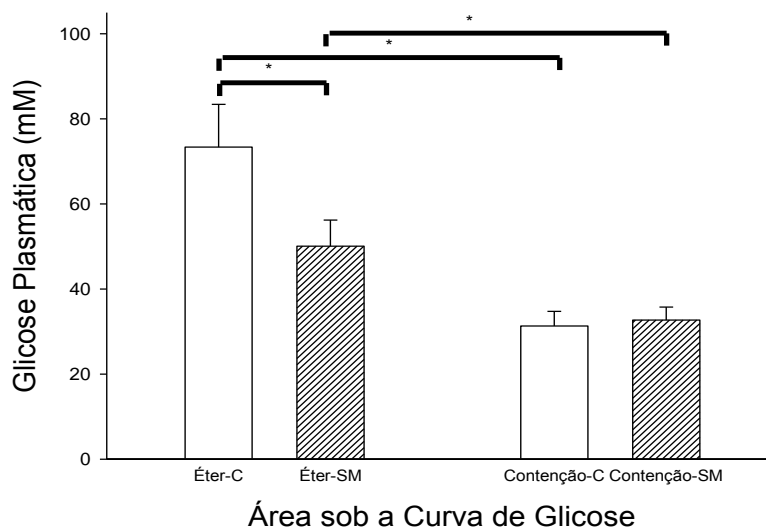
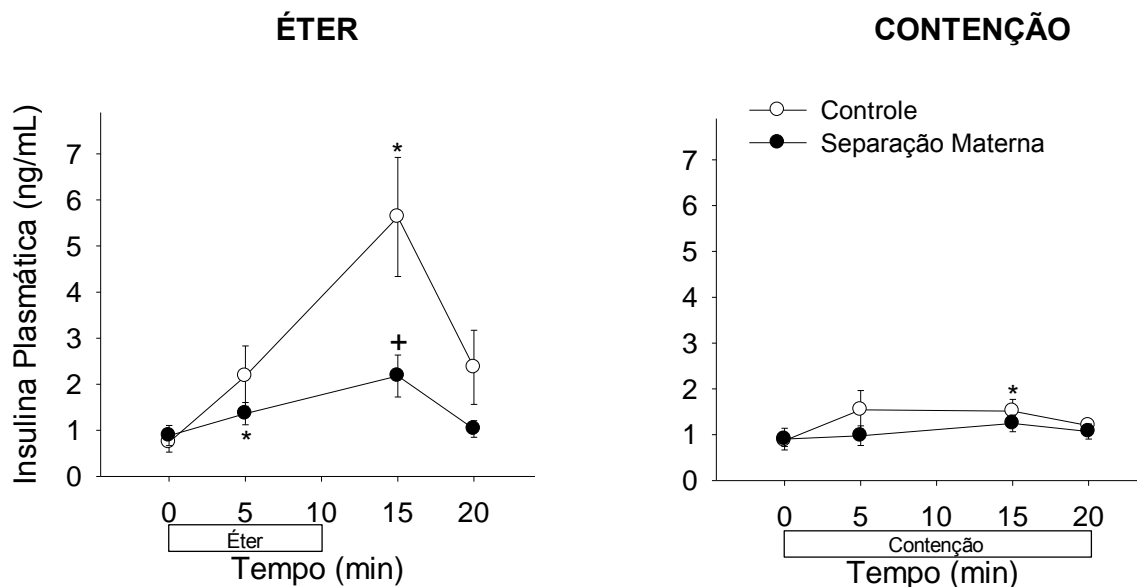


Gráfico 6- Área sob a curva da glicose. Os valores representam a média± erro padrão das áreas individuais. (\* p<0,01 comparado ao controle e † p<0,01 comparado ao grupo contenção)



Gráficos 7 e 8- Resposta secreção de insulina à exposição ao éter (à esquerda) e ao estresse de contenção (à direita) no grupo controle e separação materna (180 min. diários entre o PND 2 -14). Exposição ao éter por 10 min. e contenção por 20 min. As amostras foram retiradas imediatamente antes do início do estresse, aos 5, 15 e 20 min. Os dados são representados em média± erro padrão (n=10-16 ratos). (\* p< 0,05 comparado ao basal. + p< 0,05 comparado ao grupo controle)

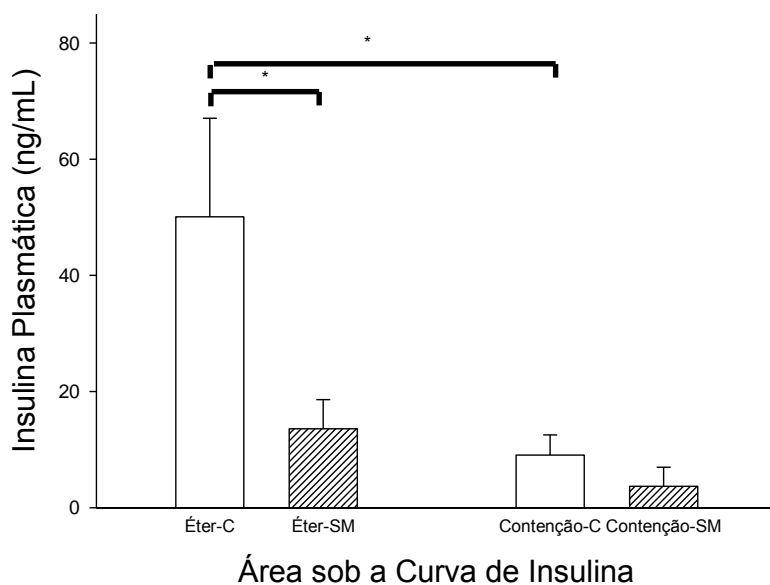
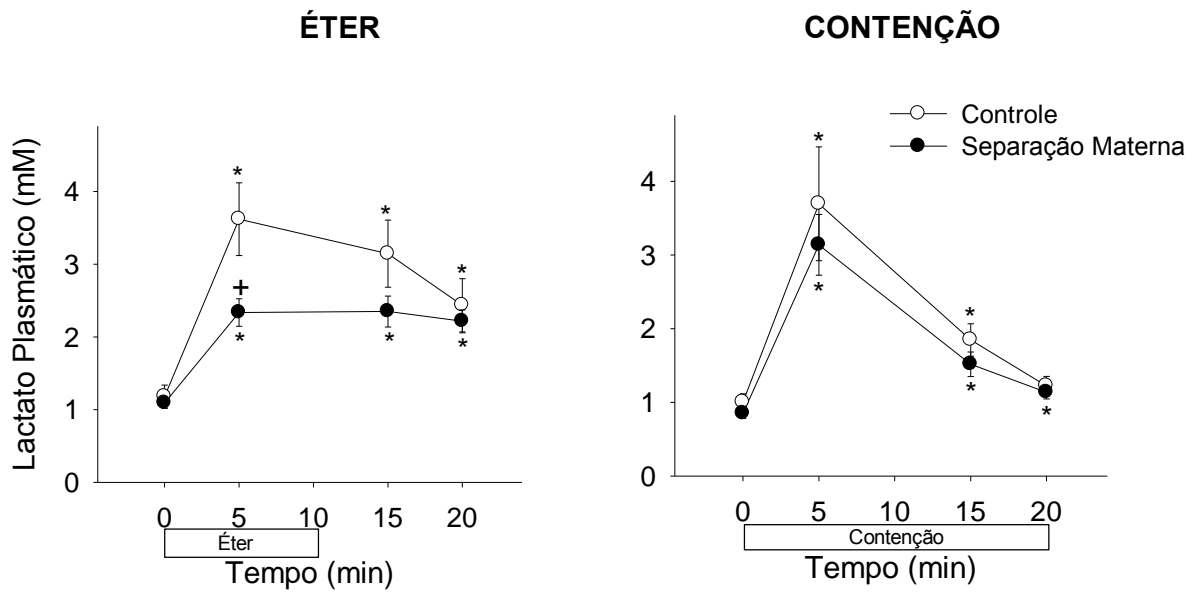


Gráfico 9- Área sob a curva da insulina. Os valores representam a média± erro padrão das áreas individuais. (\* p<0,01 comparado ao controle e + p<0,01 comparado ao grupo contenção)



Gráficos 10 e 11- Resposta de lactato plasmático à exposição ao éter (à esquerda) e ao estresse de contenção (à direita) no grupo controle e separação materna (180 min. diários entre o PND 2 -14). Exposição ao éter por 10 min. e contenção por 20 min. As amostras foram retiradas imediatamente antes do início do estresse, aos 5, 15 e 20 min. Os dados são representados em média ± erro padrão (n=10-16 ratos). (\* p < 0,05 comparado ao basal. + p < 0,05 comparado ao grupo controle)

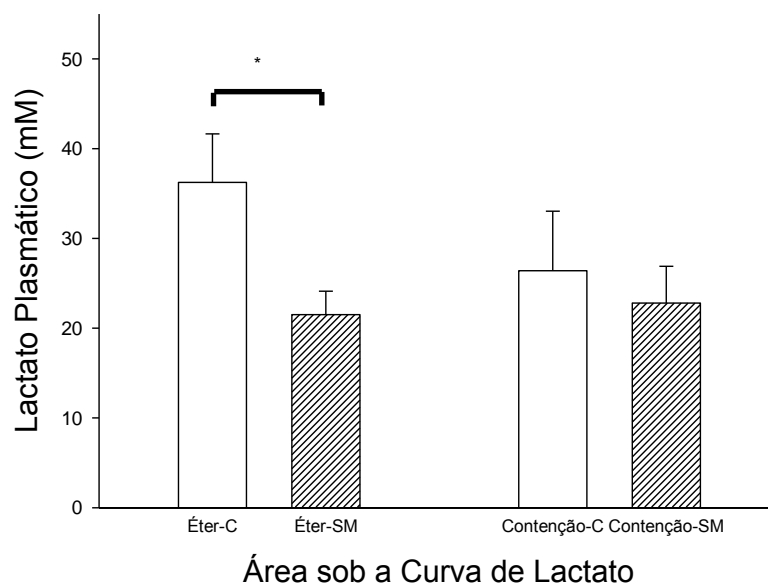
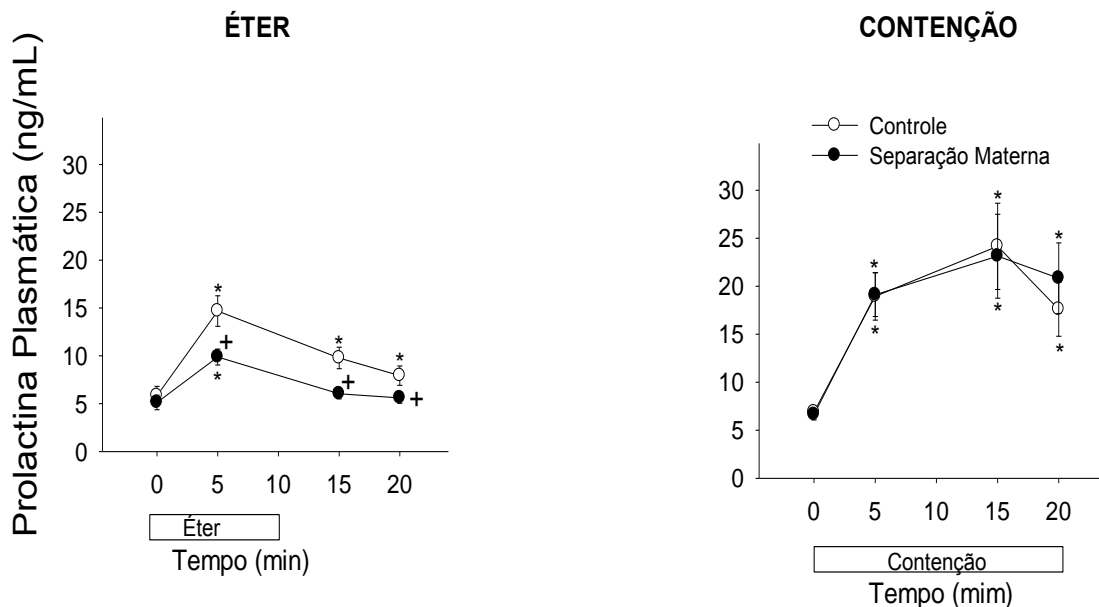


Gráfico 12- Área sob a curva do lactato. Os valores representam a média ± erro padrão das áreas individuais. (\* p < 0,01 comparado ao controle e + p < 0,01 comparado ao grupo contenção)



Gráficos 13 e 14- Resposta da secreção de prolactina à exposição ao éter (à esquerda) e ao estresse de contenção (à direita) no grupo controle e separação materna (180 min. diários entre o PND 2 -14). Exposição ao éter por 10 min. e contenção por 20 min. As amostras foram retiradas imediatamente antes do início do estresse, aos 5, 15 e 20 min. Os dados são representados em média ± erro padrão (n=10-16 ratos). (\*  $p < 0,05$  comparado ao basal. +  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle)

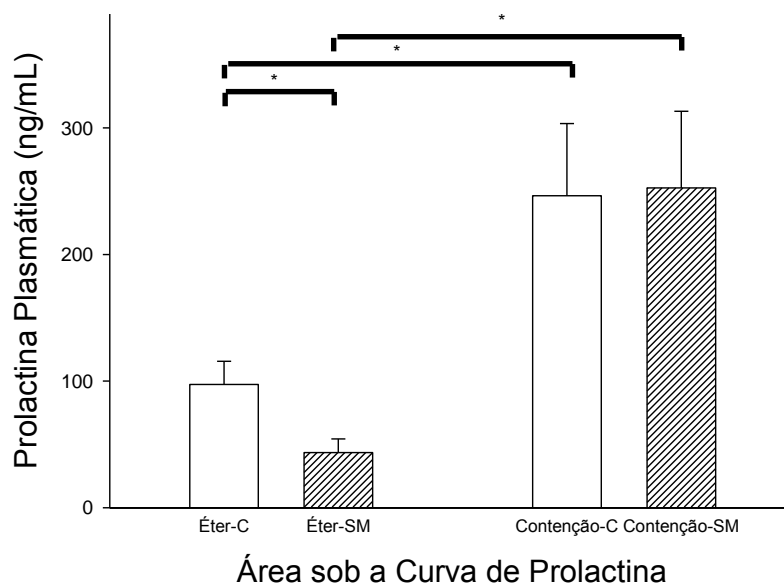
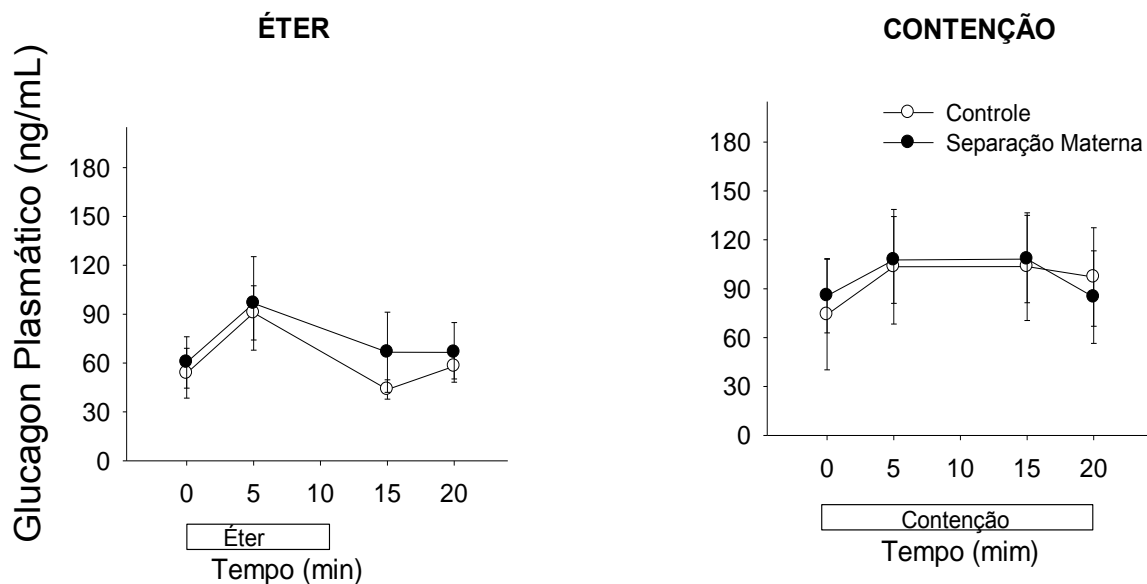


Gráfico 15- Área sob a curva da prolactina. Os valores representam a média ± erro padrão das áreas individuais. (\*  $p < 0,01$  comparado ao controle e +  $p < 0,01$  comparado ao grupo contenção).



Gráficos 16 e 17- Resposta da glucagon plasmático à exposição ao éter (à esquerda) e ao estresse de contenção (à direita) no grupo controle e separação materna (180 min. diários entre o PND 2 -14). Exposição ao éter por 10 min. e contenção por 20 min. As amostras foram retiradas imediatamente antes do início do estresse, aos 5, 15 e 20 min. Os dados são representados em média  $\pm$  erro padrão (n=10-16 ratos). (\*  $p < 0,05$  comparado ao basal. +  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle)

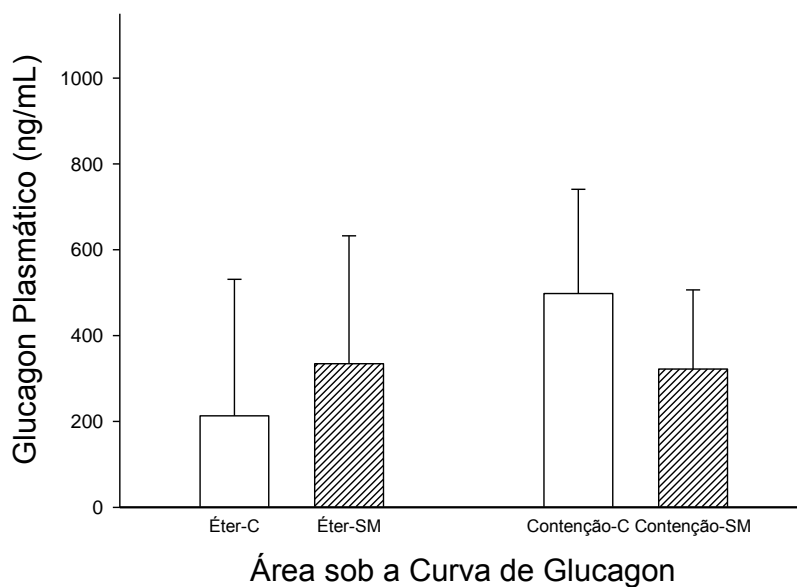


Gráfico 18- Área sob a curva de glucagon. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão das áreas individuais. (\*  $p < 0,01$  comparado ao controle e +  $p < 0,01$  comparado ao grupo contenção)

## **Avaliação dos circuitos neurais envolvidos**

Para a avaliação dos circuitos neurais envolvidos, foi contado o número de neurônios imunopositivos para c-Fos em 120  $\mu\text{m}$  de tecido cerebral, bilateralmente, ativados pela exposição ao estresse.

No grupo de neurônios catecolaminérgicos A1, no Núcleo do Trato Solitário não foram observadas diferença entre os grupos separação materna e controle; entre os diferentes protocolos de estresse, éter e contenção (Gráfico 19 e fig. 3). Na região A2 os animais submetidos ao estresse por éter não apresentaram diferenças na ativação neuronal entre os grupos controle e separados. Entretanto, na contenção, a separação materna reduziu em 69% o número de neurônios ativados ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 20 e fig. 4).

A ativação do *Locus Coeruleus* apresentou um padrão semelhante entre os tipos de estresse, com um maior número de neurônios Fos positivos no grupo separação materna, porém na exposição ao éter este aumento foi de aproximadamente 64%, enquanto que no grupo de contenção foi de 46%. (gráfico 21 e fig. 5)

O núcleo paraventricular do hipotálamo também apresentou um padrão semelhante de atividade neuronal entre os estresses. Os animais da separação materna demonstraram com uma ativação 2,5 vezes maior ( $p < 0,05$ ). A ativação observada no estresse por éter foi significativamente menor que no estresse de contenção tanto no grupo controle, quanto no grupo separação ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 22). A porção parvocelular medial parece ter sido mais ativada em

ambos os tipos de estresse, a porção magnocelular foi fracamente ativada conforme observado na figura 6.

Para confirmarmos a pequena ativação dos neurônios magnocelulares no PVN, avaliamos o núcleo supra-óptico, cuja estrutura histológica é também composta de neurônios magnocelulares ocitocinérgicos. Apesar deste estar fracamente ativado, foi observado que o estresse de contenção provocou uma resposta significativamente mais intensa quando comparado com o éter. E, que a separação materna somente influenciou a resposta no grupo de contenção, elevando em 40% o número de células Fos positivas ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 23 e fig. 7).

O núcleo medial da Amígdala foi ativado igualmente pelos tipos de estresse. A separação materna elevou o número de neurônios ativados em 60% ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 24 e fig. 8).

O núcleo pré-óptico medial apresentou uma ativação 25% menor no grupo submetido ao estresse por éter quando comparado ao grupo contenção ( $p < 0,05$ ). Porém a separação materna ampliou este efeito induzindo uma atividade neuronal 62% maior no grupo de éter e de 31% vezes maior no grupo contenção (Gráfico 25 e fig. 9).

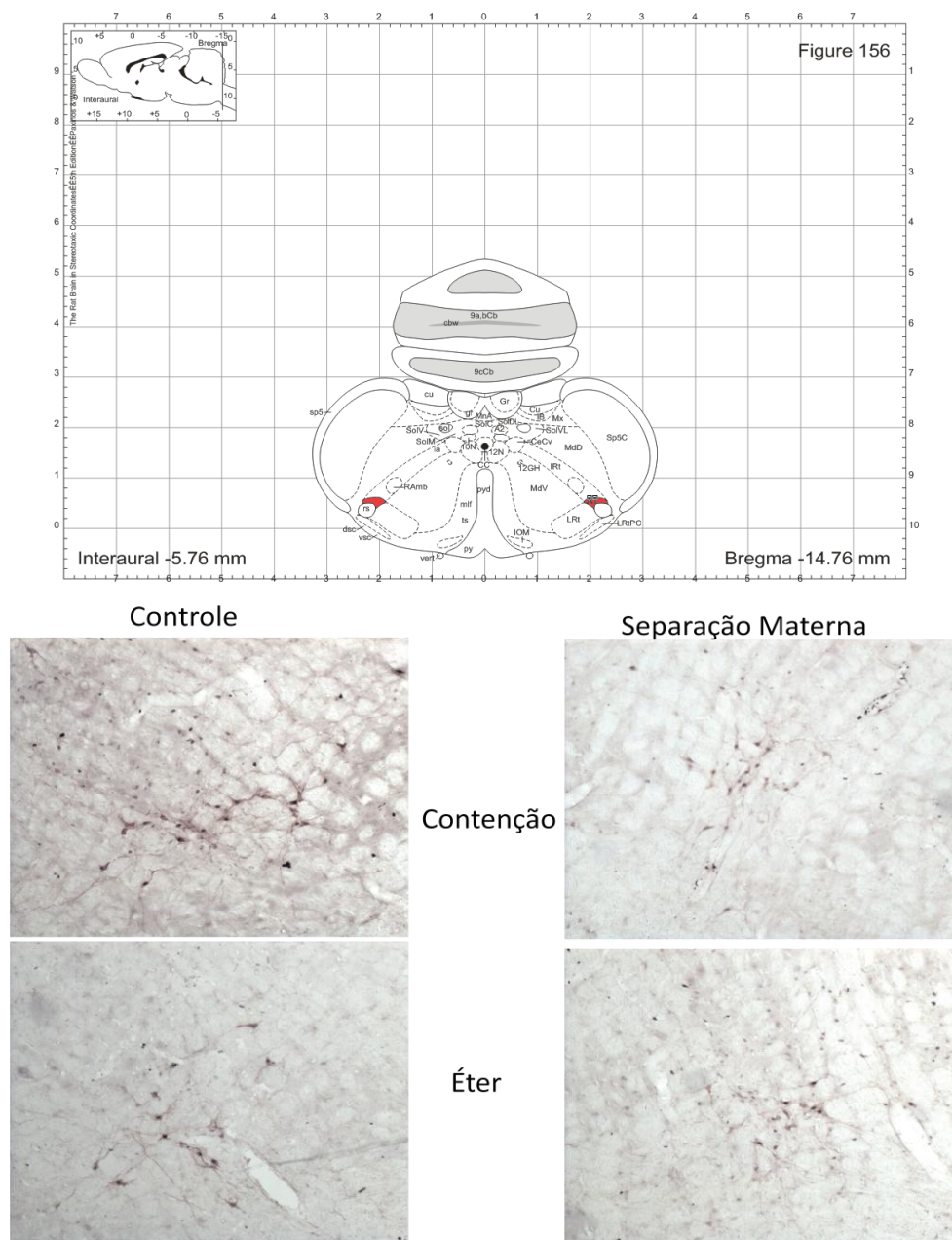


Figura 3- Fotomicrografias representativas mostrando imunorreatividade para c-Fos e Tiosina Hidroxilase na região A1 do NTS. Painéis superiores demonstram o grupo de exposição ao éter e os inferiores contenção, à esquerda controle e à direita separação materna (SM). (aumento 10x). O Fos detectado por imunohistoquímica em secções coronais são evidenciados como núcleos negros. A tiosina hidroxilase aparece como uma marcação marrom no citoplasma dos neurônios



## NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO-A1

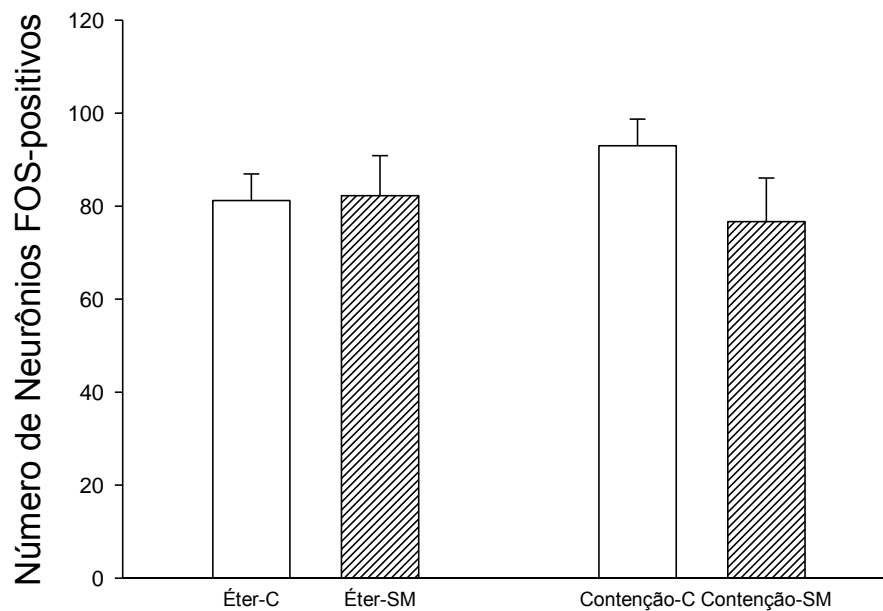


Gráfico19- Representação do número de neurônios imunopositivos para c-Fos na região A1 do Núcleo do Trato Solitário. Barras à esquerda exposição ao éter, à direita estresse de contenção. Barras brancas grupo controle, hachuradas separação materna (SM). (\*  $p < 0,05$ ,  $n=4$ )

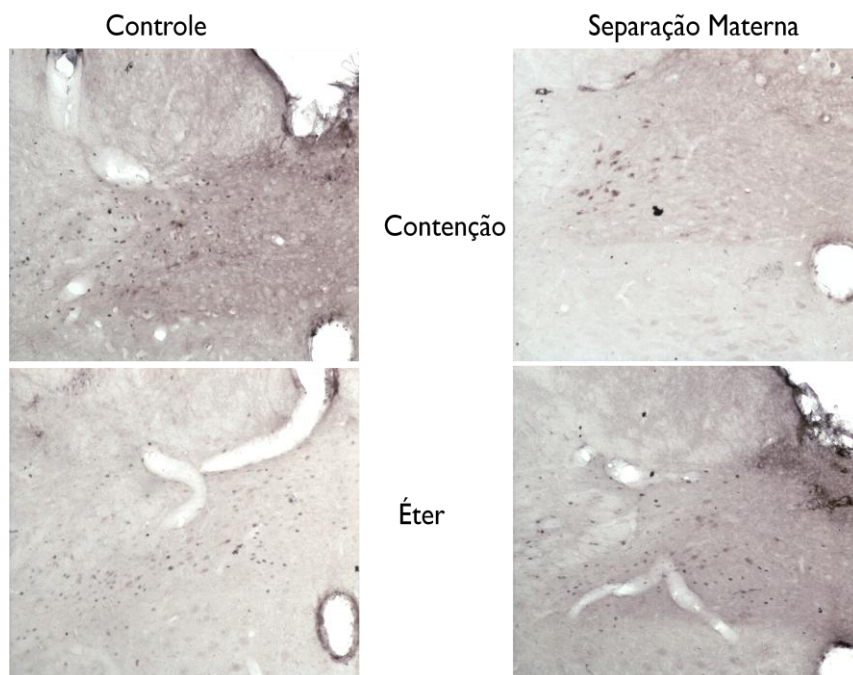
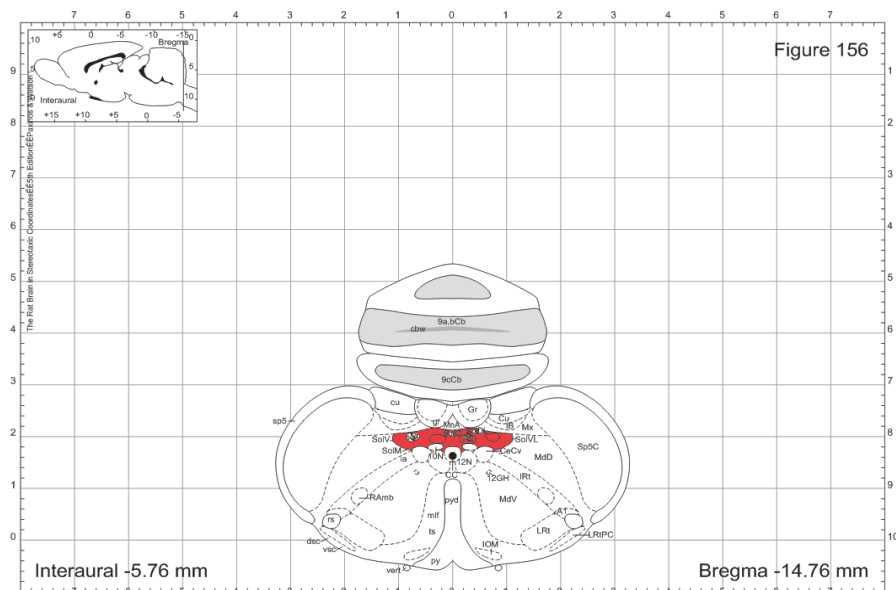


Figura 4- Fotomicrografias representativas mostrando imunorreatividade para c-Fos e Tirosina Hidroxilase na região A2 do NTS. Painéis superiores demonstram o grupo de exposição ao éter e os inferiores contenção, à esquerda controle e à direita separação materna (SM). (aumento 10x). O Fos detectado por imunohistoquímica em secções coronais são evidenciados como núcleos negros. A tirosina hidroxilase aparece como uma marcação marrom no citoplasma dos neurônios.

## NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO - A2

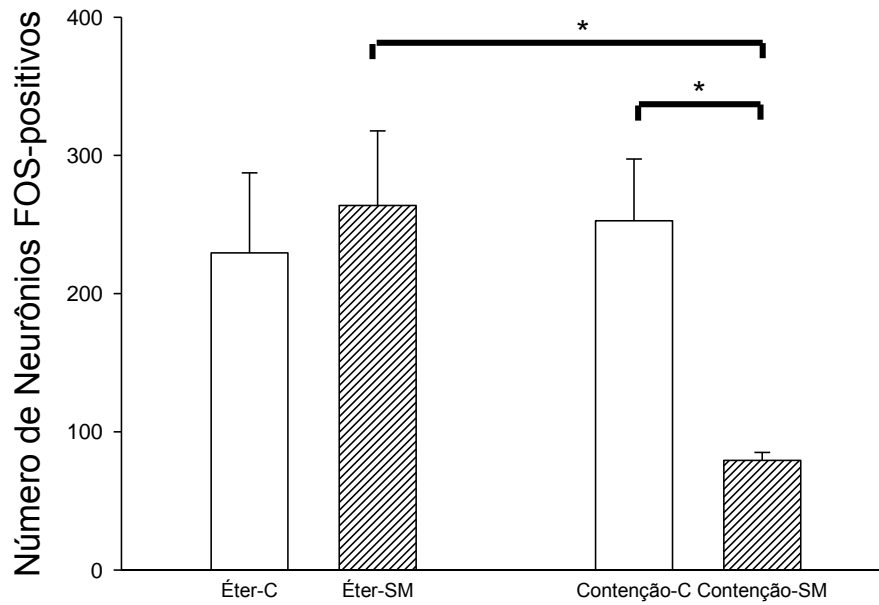
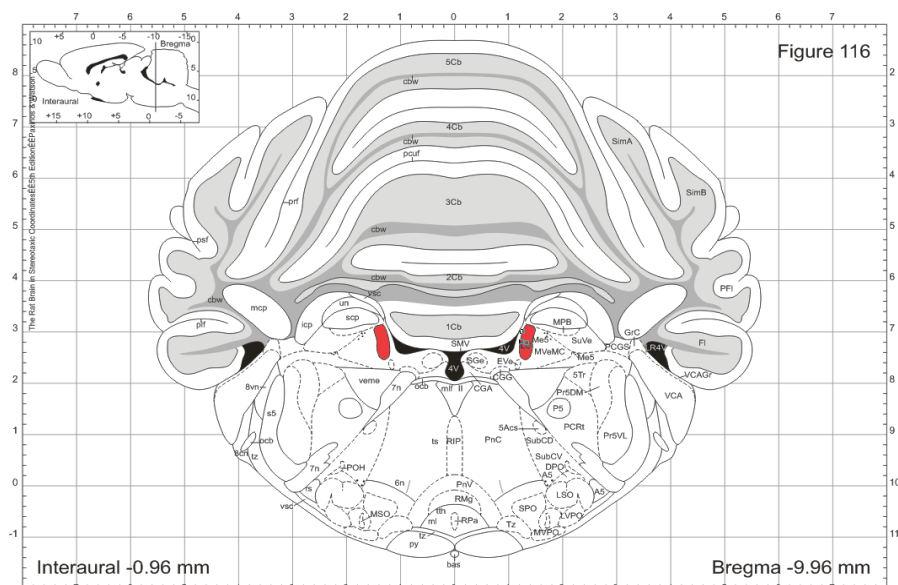
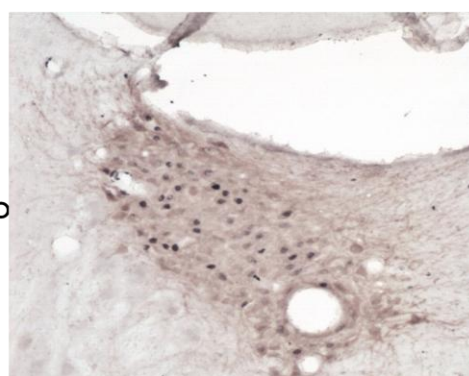
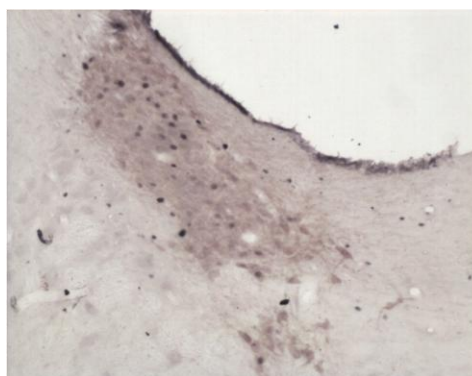


Gráfico 20- Representação do número de neurônios imunopositivos para c-Fos na região A2 do Núcleo do Trato Solitário. Barras à esquerda exposição ao éter, à direita estresse de contenção. Barras brancas grupo controle, hachuradas separação materna (SM). (\*  $p < 0,05$ ,  $n=4$ )

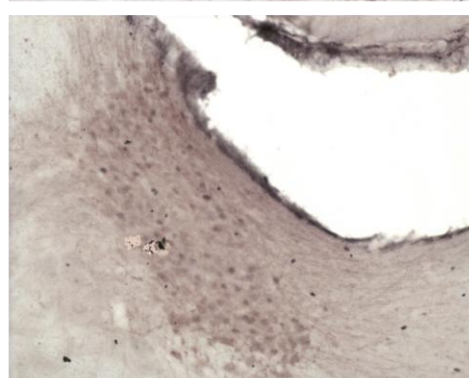
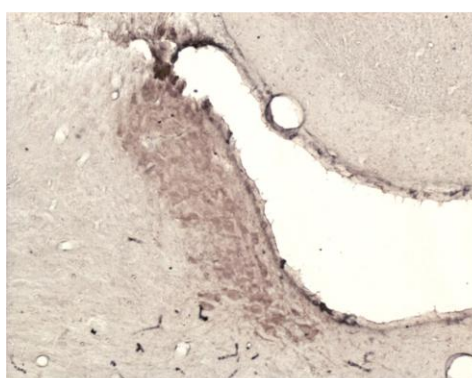


Controle

Separação Materna



Contenção



Éter

Figura 5- Fotomicrografias representativas mostrando imunorreatividade para c-Fos e Tirosina Hidroxilase no Locus Coeruleus. Painéis superiores demonstram o grupo de exposição ao éter e os inferiores contenção, à esquerda controle e à direita separação materna (SM). (aumento 10x). O Fos detectado por imunohistoquímica em secções coronais são evidenciados como núcleos negros. A tirosina hidroxilase aparece como uma marcação marrom no citoplasma dos neurônios.

## LOCUS COERULEUS

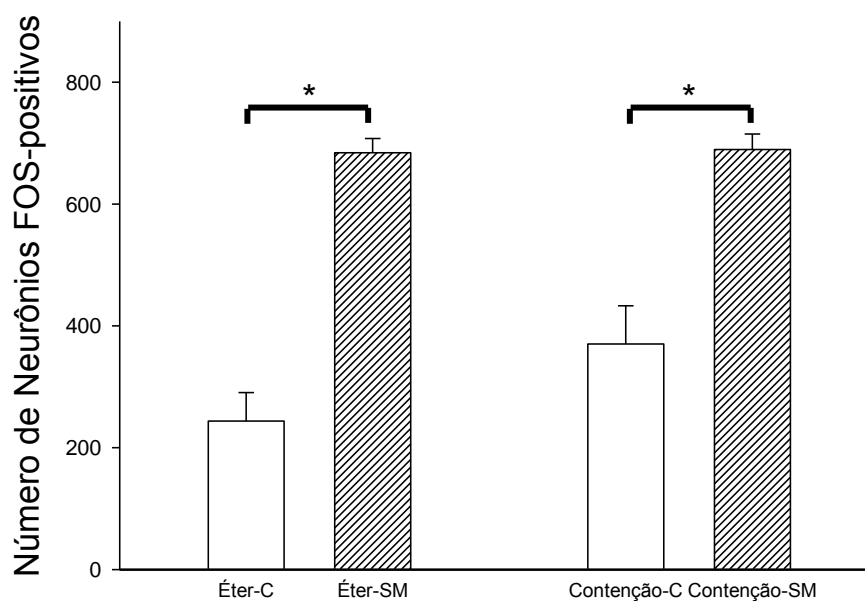
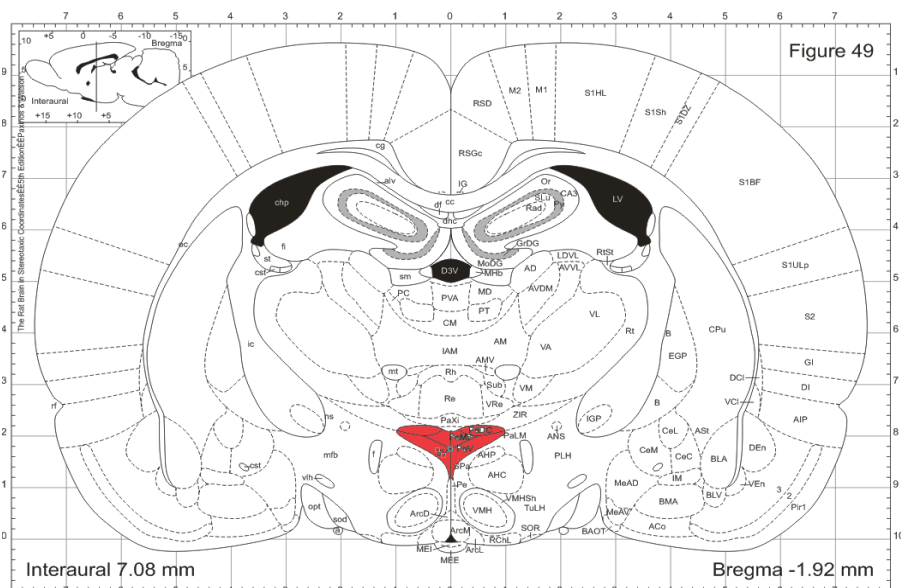
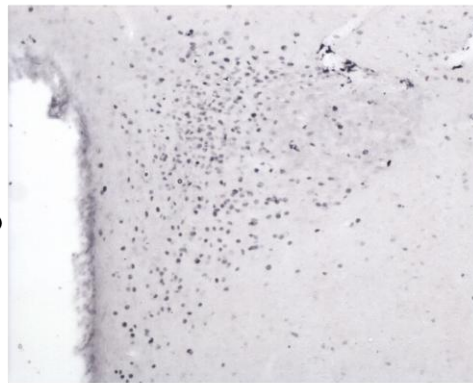


Gráfico 21- Representação do número de neurônios imunopositivos para c-Fos no Locus Coeruleus. Barras à esquerda exposição ao éter, à direita estresse de contenção. Barras brancas grupo controle, hachuradas separação materna (SM). (\*  $p < 0,05$ ,  $n=4$ )

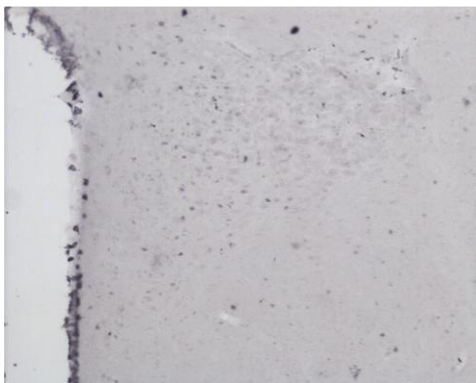


Controle

Separação Materna



Contenção



Éter

Figura 6- Fotomicrografias representativas mostrando imunorreatividade para c-Fos no PVN. Painéis superiores demonstram o grupo de exposição ao éter e os inferiores contenção, à esquerda controle e à direita separação materna (SM). (aumento 10x). O Fos detectado por imunohistoquímica em secções coronais são evidenciados como núcleos negros.

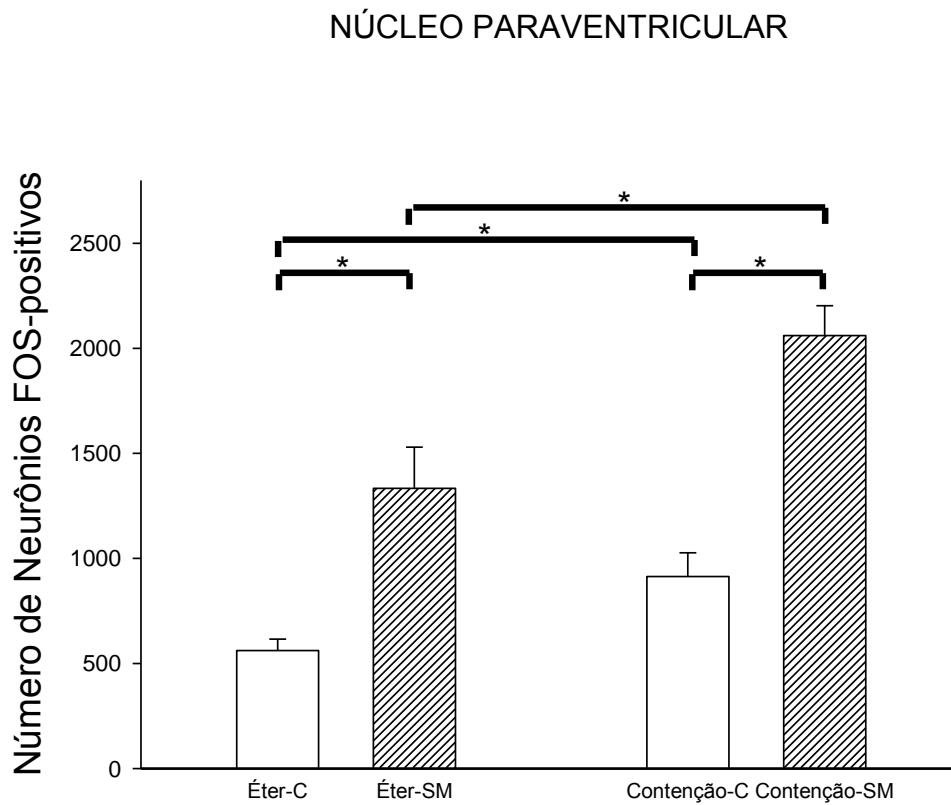


Gráfico 22- Representação do número de neurônios imunopositivos para c-Fos no Núcleo Paraventricular do hipotálamo. Barras à esquerda exposição ao éter, à direita estresse de contenção. Barras brancas grupo controle, hachuradas separação materna (SM). (\* p<0,05, n=4)

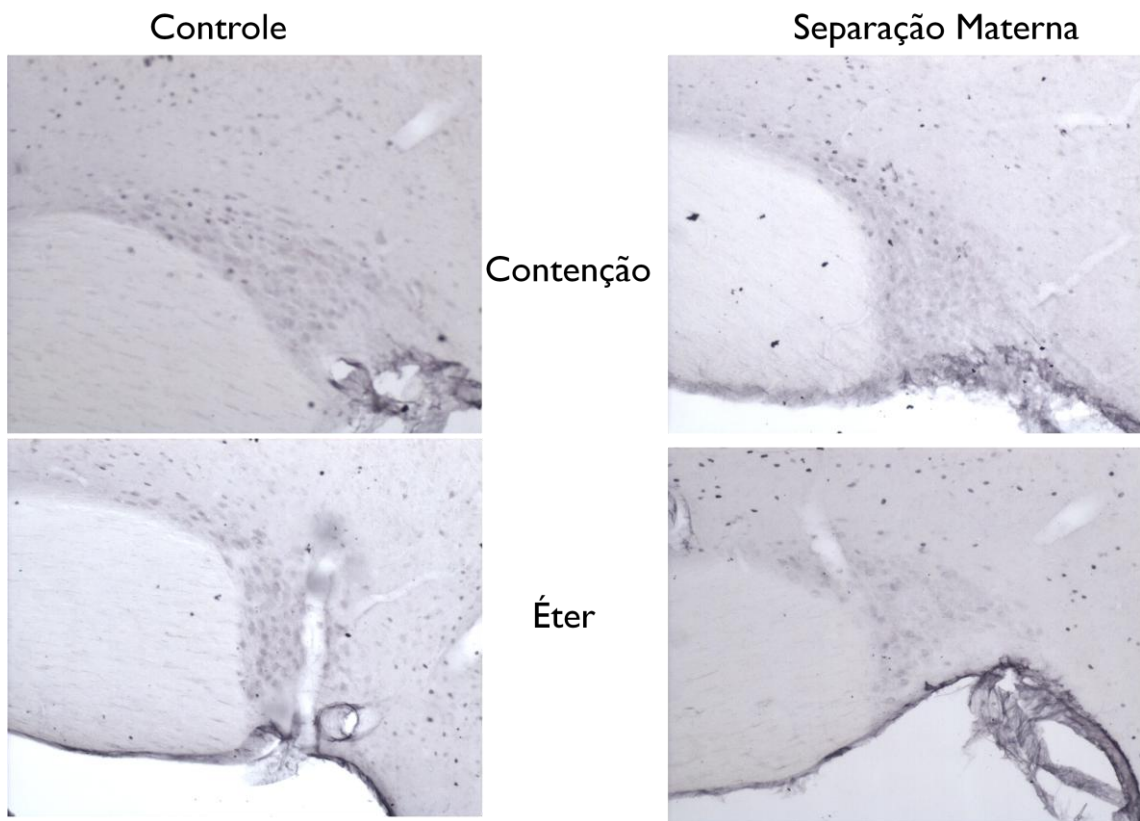
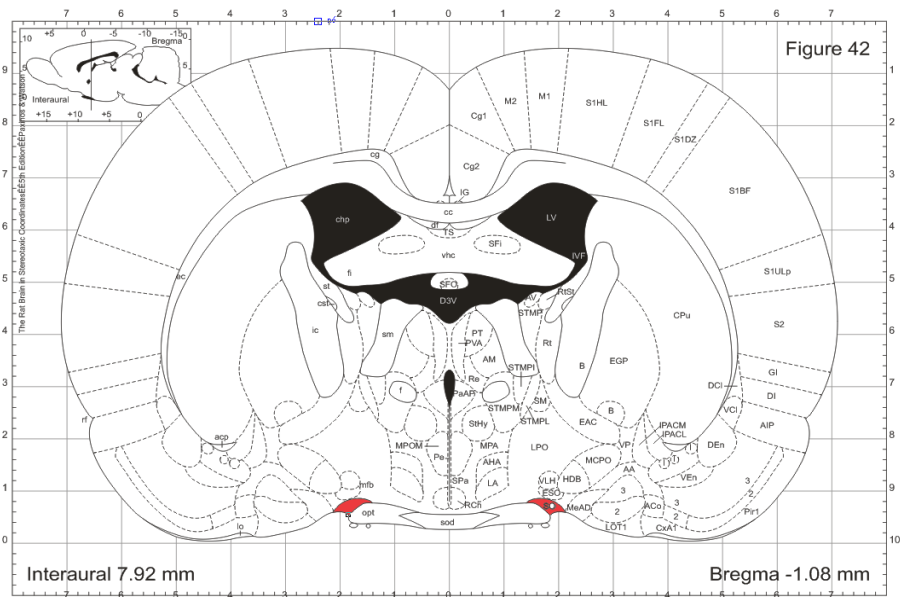


Figura 7- Fotomicrografias representativas mostrando imunorreatividade para c-Fos no Núcleo Supra-óptico. Painéis superiores demonstram o grupo de exposição ao éter e os inferiores contenção, à esquerda controle e à direita separação materna (SM). (aumento 10x). O Fos detectado por imunohistoquímica em seções coronais são evidenciados como núcleos negros.



## NÚCLEO SUPRA-ÓPTICO

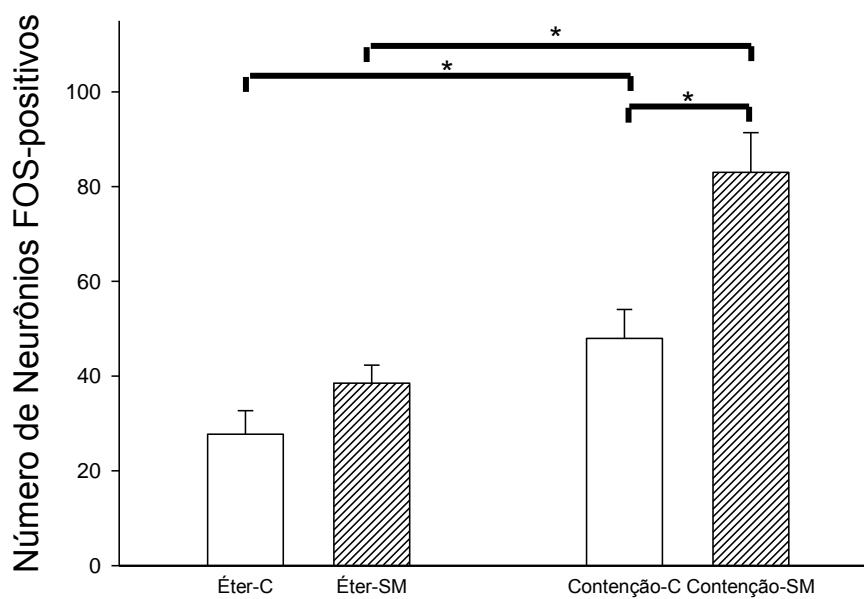


Gráfico 23- Representação do número de neurônios imunopositivos para c-Fos no Núcleo Supra-óptico. Barras à esquerda exposição ao éter, à direita estresse de contenção. Barras brancas grupo controle, hachuradas separação materna (SM). (\*  $p < 0,05$ ,  $n=4$ )



## AMÍGDALA MEDIAL

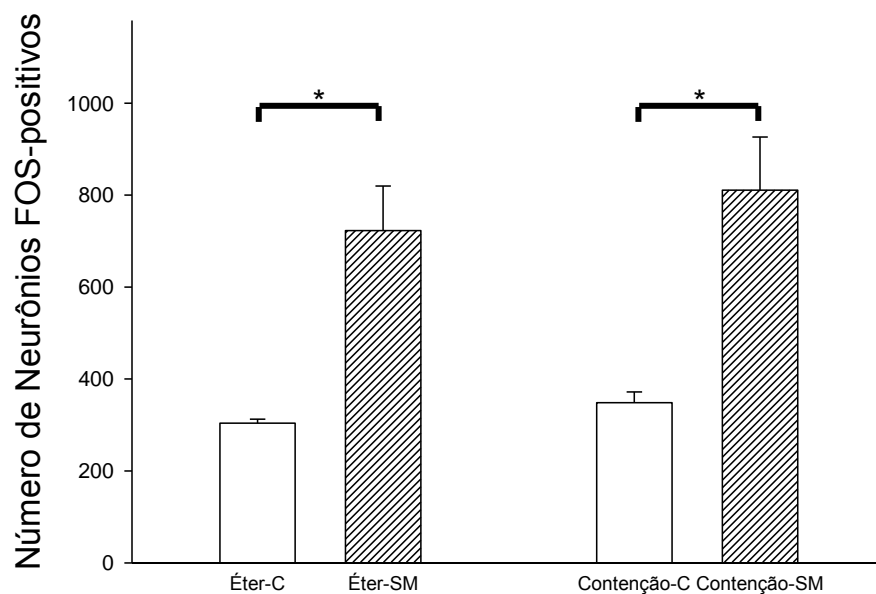


Gráfico 24- Representação do número de neurônios imunopositivos para c-Fos no Núcleo medial da Amígdala. Barras à esquerda exposição ao éter, à direita estresse de contenção. Barras brancas grupo controle, hachuradas separação materna (SM). (\*  $p < 0,05$ ,  $n=4$ )

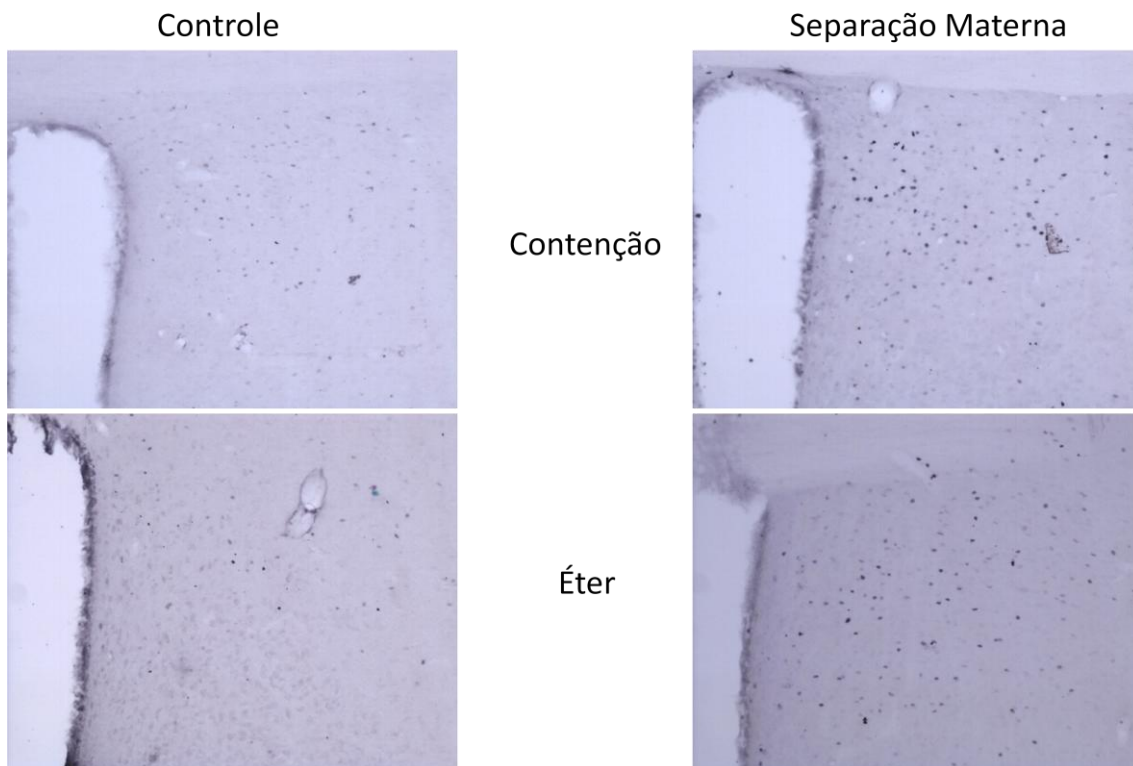
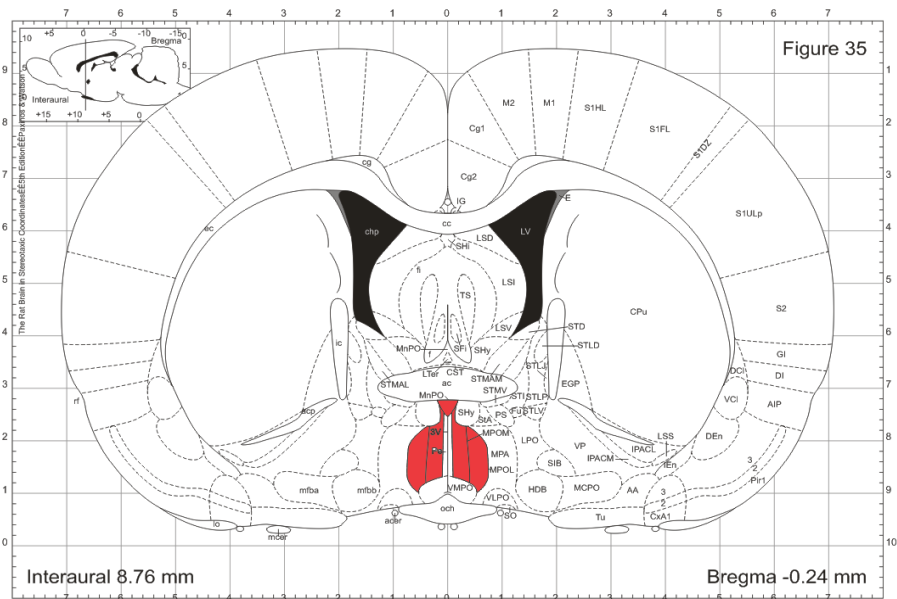


Figura 9- Fotomicrografias representativas mostrando imunorreatividade para c-Fos no Núcleo Pré-óptico Medial. Painéis superiores demonstram o grupo de exposição ao éter e os inferiores contenção, à esquerda controle e à direita separação materna (SM). (aumento 10x). O Fos detectado por imunohistoquímica em secções coronais são evidenciados como núcleos negros

## NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO MEDIAL

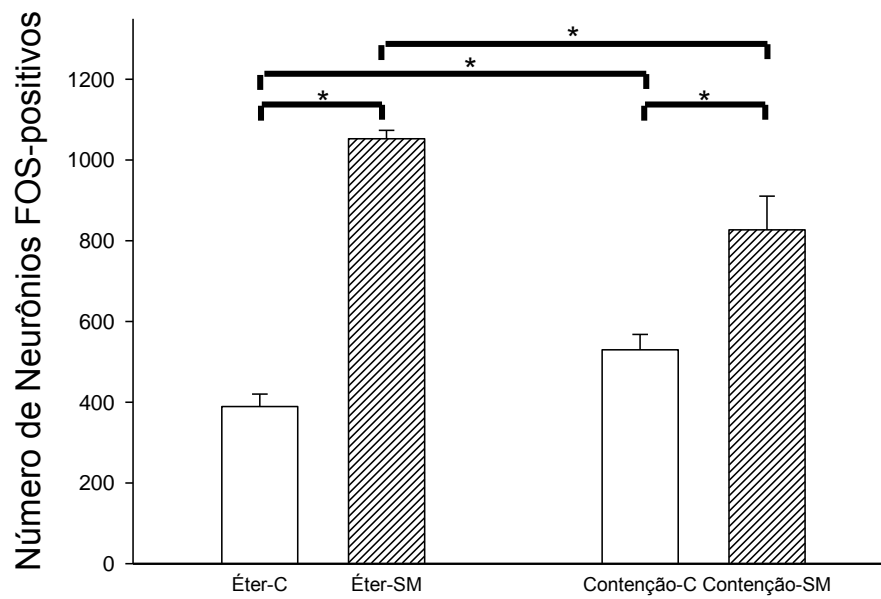


Gráfico 25- Representação do número de neurônios imunopositivos para c-Fos no Núcleo Pré-óptico medial. Barras à esquerda exposição ao éter, à direita estresse de contenção. Barras brancas grupo controle, hachuradas separação materna (SM). (\*  $p < 0,05$ ,  $n=4$ )

## DISCUSSÃO

---

Nossos experimentos indicaram que os eventos adversos precoces, como os cuidados maternos interferem no crescimento e no ganho de peso dos animais, diminuindo ambos os parâmetros. Os dados da literatura sobre o desenvolvimento somático, especialmente o ganho de peso, dos grupos submetidos à separação materna ainda são controversos, pois há uma grande diversidade de protocolos utilizados, com tempos de separação diferentes, tamanho das ninhadas, temperatura ambiente (uso ou não de incubadoras), fatores genéticos, gênero dos animais, horário da separação<sup>26;39;45;51;81-83</sup>. Em relação ao crescimento linear, mostramos claramente que a separação materna causa uma diminuição no tamanho dos animais.

Além da modificação no crescimento somático, por nós observado, há evidências que os animais separados das mães apresentam uma diferença na aquisição dos marcos desenvolvimentais, como abertura ocular, erupção dos incisivos, reflexos posturais, de maneiras sexo dependentes<sup>37</sup>, além de alterações nos padrões alimentares, principalmente em machos<sup>53;84</sup>.

A separação materna provoca uma importante alteração na resposta endócrina e metabólica ao estresse na idade adulta, especialmente à exposição aos vapores de éter. Há uma atenuação generalizada da resposta com diminuição da secreção de insulina e prolactina e também da glicemia e concentração de lactato plasmático. Não foi observada nenhuma influência da separação materna nas respostas ao estresse de contenção.

Estes dados trazem novas evidências sobre a especificidade da resposta endócrina e metabólica ao estresse. E, corroboram com o conceito de

heterogeneidade neuroendócrina da resposta ao estresse, confirmando que cada estressor possui vias neurais e mecanismos centrais distintos.

Contudo, não é possível dissociar a ativação destes circuitos e, provavelmente, a especificidade da resposta está relacionada com a intensidade da ativação de um circuito em detrimento a outro. Estudos associando o sistema límbico com o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal sugerem que a resposta ao estresse pode ser parcialmente entendida pela participação deste circuito, denominado 'sistema límbico-hipotalâmico-pituitária-adrenal'.

Este eixo além de ter uma atividade rítmica e circadiana, pode ser ativado diretamente por estressores psicológicos e físicos, funcionando como um mecanismo de controle integrado entre a função fisiológica do cérebro e a demanda do ambiente. Exposição repetida a situações estressoras ou alterações ambientais parece afetar de maneira cumulativa o organismo, em especial o eixo cortico-límbico; bem como situações adversas nas fases iniciais da vida <sup>15</sup>.

Este trabalho corrobora com os nossos dados onde o núcleo medial da amígdala apesar de ter sido influenciado pela separação materna, mostrando uma maior ativação, não apresentou diferença entre os tipos de estresse, contrariando os dados prévios da literatura que sugeriam que a amígdala, mais especificamente os núcleos mediais e centrais, seria mais fortemente ativada nos estresses com componentes psicológicos fortes <sup>13;21;28;30;36;85</sup>. Aparentemente a participação destes núcleos no estresse de contenção está relacionada com a ativação de estruturas corticais como córtex pré-frontal medial. <sup>27</sup>



Nossos experimentos sugerem que não houve nenhuma alteração na capacidade de resposta dos órgãos efetores, como pâncreas, fígado, hipófise, adrenais e na inervação simpática, mas uma atenuação na intensidade de ativação. Esta afirmação é baseada no fato que não foi observado diferenças entre os grupos controle e separação materna nos animais submetidos ao estresse de contenção. Ou seja, os circuitos periféricos não parecem ser modificados pela separação materna.

Nossos resultados também demonstraram que a separação materna afeta outras vias de resposta ao estresse além do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, confirmando dados da literatura de modificações na resposta o sistema mesolímbico dopaminérgico e dos circuitos noradrenérgicos, indicando um mecanismo extremamente complexo respondendo por alterações ambientais precoces <sup>50</sup>.

Há evidências que os efeitos da separação materna são provocados, pelo menos parcialmente, pela alteração na densidade dos glicocorticóides nas regiões cerebrais que mediam a regulação do feedback negativo dos glicocorticóides. A separação materna está associada com uma diminuição dos níveis de glicorreceptores no hipotálamo, hipocampo e córtex frontal <sup>33;35;51;62;77</sup> e a uma redução na ligação  $\alpha$ -2-adrenorreceptores em regiões ricas em corpos celulares noradrenérgicos (locus coeruleus e núcleo do trato solitário) <sup>43</sup>. Estudos anteriores demonstraram que  $\alpha$ -2-adrenorreceptores na área pré-optica que recebem projeções deste núcleo estão envolvidos no controle neural da secreção de insulina e nos níveis plasmáticos de glicose <sup>86</sup>.

A secreção de insulina foi reduzida mesmo com a presença da resposta hiperglicêmica que é fortemente ativada no estresse físico, conforme demonstrado em estudos anteriores do nosso laboratório <sup>24;25</sup>. A inibição da secreção de insulina e a maior ativação destes centros, observados em nossos experimentos, indicam que a separação materna pode ter induzido uma modificação da atividade destes centros.

O ambiente dos filhotes no período pós-natal é determinado primariamente pela mãe, que serve como fonte primária de nutrição, cuidado e calor necessário para a sobrevivência imediata, bem como regula o desenvolvimento dos principais sistemas de regulação do comportamento e desenvolvimento <sup>82</sup>.

Os mecanismos pelos quais as alterações produzidas pela separação materna são transmitidas para os filhotes permanecem desconhecidos. <sup>39</sup>. Inicialmente postulou-se a “hipótese da mediação materna” <sup>64</sup>, diferenças no cuidado materno após a reunião da nutriz com seu filhote pode ser responsável por uma grande parcela das diferenças na responsividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na vida adulta. Desde então inúmeros estudos vem confirmando esta hipótese.

A separação materna altera o meio interno dos filhotes através da diminuição da temperatura corporal, restrição alimentar e redução das funções excretoras <sup>80</sup> e a ausência da mãe por períodos prolongados interrompe a distribuição diária normal dos cuidados e estimulação neonatais <sup>45</sup>. Além disto, ocorre também uma privação sensorial. Para comprovar tal hipótese, Francis ET AL em 2002, propôs que a exposição dos animais a um ambiente

enriquecido após o desmame provocaria uma atenuação da reatividade ao estresse na idade adulta, revertendo parcialmente os efeitos da separação materna <sup>38</sup>. Estes dados apóiam o conceito que as diferenças comportamentais e neuroendócrinas individuais da resposta ao estresse podem ser influenciadas por eventos em múltiplos estágios do desenvolvimento, seja no período neonatal ou pós-desmame e que estas são multifatoriais, físicas ou comportamentais. Contudo, foi confirmado que nos primeiros 30 dias de vida pós-natal estes efeitos são mais marcantes e capazes de produzir mudanças morfológicas e bioquímicas no Sistema Nervoso Central <sup>33;41;58;73;76;85;87</sup>

Com o intuito de estudarmos estas modificações do sistema nervoso central utilizamos a imunohistoquímica para c-Fos. Este é um proto-oncogene com alta capacidade de ativar seu fator de transcrição e de sinalizar ou atuar como marcador funcional de neurônios ativados por diversos estímulos. Inicialmente acreditava-se que o Fos refletia atividade neuronal, porém a expressão do Fos depende de uma participação temporal nos padrões dos potenciais de ação, ou seja, estímulos usuais aferentes, com intensidade usual, não são capazes de desencadear indução do Fos. Existem inúmeros desafios que induzem a expressão do c-Fos: fatores neurotróficos, neurotransmissores, despolarização e aumento do influxo de cálcio e/ou de sua concentração intracelular/intranuclear. Uma das melhores formas de utilização da técnica é o mapeamento de circuitos neurais relacionados com as resposta neuroendócrinas, autonômicas e comportamentais induzidas pelo estresse. Outra excelente característica é que em condições basais os níveis da proteína c-Fos ou do RNAm são muito baixos <sup>88</sup>.

Para compararmos os circuitos ativados nos dois tipos diferentes de estresse utilizamos a contagem total de neurônios c-Fos em cada núcleo central envolvido preferencialmente no estresse de contenção e no estresse de éter e, avaliamos também a influência da separação materna neonatal nestes circuitos.

O estresse por éter ativa preferencialmente vias ascendentes, no tronco encefálico e bulbo, demonstrando uma participação das vias respiratórias nesta resposta <sup>28</sup>. Os dados da literatura que comparam este tipo de estresse com outros de componentes mais psicológicos sugerem que as vias mais inferiores são fracamente ativadas. Foram avaliadas as regiões de células catecolaminérgicas do núcleo do trato solitário A1 e A2. Não observamos nenhuma diferença na resposta da região A1 entre os estresses, bem como entre o grupo separação e controle, demonstrando que este núcleo não tem uma participação específica nestes tipos de desafios. Por outro lado, o A2 também não demonstrou diferenças na ativação no grupo de exposição ao éter e contenção, porém a separação parece influenciar fortemente a ativação deste núcleo no estresse de contenção, causando uma forte atenuação na resposta deste núcleo.

Historicamente o sistema locus coeruleus-noradrenalina tem sido descrito como relacionado com um padrão de excitação, sendo ativado fortemente por diversos tipos de estímulos <sup>89;90</sup>. Estímulos exteroceptivos, também chamados de estressores psicogênicos, de maneira geral elicitam uma ativação robusta deste núcleo. Devido a esta característica ele tem sido usado como uma comparação entre este modelo e os interoceptivos ou físicos. <sup>90</sup>.

O padrão de ativação observado nos nossos resultados mostra o *Locus Coeruleus* como um centro de ativação comum em ambos os modelos, não havendo diferença entre eles. A separação materna, por sua vez influencia fortemente a resposta induzindo uma maior ativação neuronal em ambos os grupos, demonstrando que os animais submetidos à separação materna seriam mais responsivos ao estresse na idade adulta. Este resultado está em concordância com os dados de literatura que mostraram uma hiperatividade do eixo hipotálamo-pituitária- adrenal <sup>41;44;45;75;85;90</sup>. Ao compararmos a intensidade de ativação (porcentagem de neurônios ativados no grupo separação maternos comparado ao grupo controle) observamos que o éter induz uma resposta mais intensa quando comparada à contenção (64% VS 46%), talvez esta diferença no padrão de ativação central seja a chave para a diferença na resposta metabólica encontrada, pois, apesar de haver um maior número de neurônios Fos ativados, provavelmente há uma alteração na capacidade de ligação dos receptores  $\alpha_2$  nesta região <sup>43</sup>

O núcleo paraventricular do hipotálamo é denominado um centro integrador das funções endócrinas, autonômicas e comportamentais sob uma variedade de situações fisiológicas. Ele recebe informações sensoriais provenientes dos centros regulatórios do tronco encefálico e do sistema límbico do telencéfalo através do núcleo de origem da estria terminal <sup>17</sup>. Projeções aferentes da maioria dos centros de integração do hipotálamo também foram identificadas como: órgão subfornicial, núcleo pré-óptico mediano, núcleo supraquiasmático. Além de projeções para a ponte e para o tronco (núcleo do trato solitário, núcleo dorsal do vago)

No início dos anos 80 estudos anatômicos descreveram o paraventricular como um núcleo complexo do sistema nervoso central que potencialmente seria capaz de controlar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, eixo tireoidiano, reprodutor, de crescimento e desenvolvimento, da regulação do balanço hídrico e também funções cardiovasculares e gastrointestinais <sup>91</sup>.

No presente experimento, o núcleo paraventricular apresentou padrões de ativação neuronal semelhantes em ambos os estresses testados, sofrendo uma influência semelhante da separação materna que induziu uma ativação 2,5 vezes maior em ambos os grupos. Contudo, o estresse por éter provoca uma ativação menor quando comparado ao estresse de contenção.

O éter pode influenciar diretamente a secreção hormônio adrenocorticotrófico por ação direta na hipófise, bem como no sistema nervoso central, parcialmente fazendo uma conexão com o núcleo paraventricular. Existem evidências que a secreção de prolactina está relacionada com a ativação e resposta do eixo hipotálamo- pituitária adrenal <sup>71;72</sup>, portanto a atenuação da secreção de prolactina observada pode ser parcialmente devida à alteração no padrão de ativação neuronal.

Apesar de não termos avaliado quantitativamente as sub-regiões do núcleo paraventricular, a análise qualitativa dos cortes demonstrou que a porção parvocelular mediana parece ser mais ativada em comparação com a porção periventricular e magnocelular. Este padrão não difere entre os grupos e nem parece ser influenciado pela separação materna. Esta região parece receber inputs provenientes da medula e do complexo dorsal do vago <sup>92</sup>, sugerindo que o estresse por éter ativaria mais fortemente esta região, ao

contrário do que foi observado: maior número de neurônios Fos+ no estresse de contenção. No entanto Briski e Gillen, em 2001 demonstraram este mesmo padrão de ativação em ratos submetidos à contenção, quando comparados a outros modelos de estresse como imobilização.

O fato de a porção magnocelular ter sido fracamente ativada nos levou a investigar a ativação do núcleo supra-óptico, que possui uma alta densidade deste tipo neuronal. Sabe-se que a contenção provoca uma elevação da imunorreatividade dos neurônios ocitocinérgicos tanto do paraventricular quanto do núcleo supra-óptico <sup>17</sup>. Nossos dados confirmaram os achados da literatura com uma maior ativação nestes núcleos na contenção e a separação materna induz uma ativação ainda maior comparada com o controle e com o estresse por éter

Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram a participação da área pré-óptica no controle central da glicose e da insulina, mais especificamente dos receptores  $\alpha 2$  <sup>86</sup>. Além disso, esta área participa significativamente dos estresses com componentes psicológicos <sup>18;19;28;36</sup>. De maneira geral, toda a área pré-óptica é fortemente ativada pela contenção, sendo os núcleos pré-óptico mediano e o pré-óptico lateral os mais ativados <sup>18</sup>. Baseados nas respostas metabólicas encontradas optou-se por avaliar o núcleo pré-óptico medial. Nossos resultados confirmaram os achados da literatura e demonstraram pela primeira vez uma resposta menor no estresse por éter. A separação materna por sua vez induz uma ativação aproximadamente três vezes mais intensa nesta região quando comparada com a contenção. Estes dados sugerem que a chave da resposta metabólica

ao estresse seja a ativação da área pré-óptica, especialmente o núcleo medial e que a atenuação observada no éter seja devido a uma grande influência dos eventos neonatais.

Foram identificados neurônios glicossensíveis no hipotálamo, e estes também possuem receptores para insulina, leptina, monoaminas e outros neurotransmissores e peptídeos envolvidos na homeostase da energia. E, parece que estes neurônios são capazes de monitorizar mais que os níveis de glicose <sup>93</sup>. A ação hipotalâmica na regulação do metabolismo hepático de glicose está classicamente relacionada com um fluxo simpático central que estimula uma série de núcleos no hipotálamo, especialmente e ao redor do terceiro ventrículo. Os núcleos mais estudados que participam deste controle são: o hipotálamo ventromedial e lateral, o hipotálamo paraventricular e a área pré-óptica <sup>94;95</sup>. Estes núcleos recebem projeções ascendentes noradrenérgicas provenientes do bulbo. Estas regiões do bulbo contêm neurônios glicossensores, onde também estão co-localizados neurônios noradrenérgicos e adrenérgicos relacionados com o comportamento alimentar desencadeados pela restrição de glicose e com respostas contra-regulatórias à glicoprivação <sup>96</sup>. Nossos experimentos sugerem que o aumento da atividade neuronal dos centros noradrenérgicos ascendentes podem ter alterado a modulação destes glicossensores hipotalâmicos, gerando o padrão de resposta metabólica observada.

Sumarizando:



Nossos experimentos demonstraram que os diferentes tipos de estresse geram um padrão de ativação neuronal no hipotálamo diferente entre eles, confirmando a hipótese da especificidade e heterogeneidade do estresse. A separação provoca uma maior ativação de todos os núcleos ativados em especial no estresse de contenção, contrariando a nossa hipótese inicial onde os núcleos relacionados com o estresse por exposição ao éter seriam os mais afetados.

Verificamos também que os núcleos hipotalâmicos são mais fortemente afetados pela separação materna, quando comparados aos núcleos localizados em centros mais inferiores e que podemos classificar a contenção como um estímulo mais intenso, quando comparado ao éter, apesar de sua classificação como estresse físico que por si só induziria uma alteração na homeostase. Sugerindo que os centros superiores relacionados com o comportamento e resposta ansiosa seriam os mais afetados pelos eventos na vida neonatal.

Os núcleos classificados como de integração, paraventricular e *locus coeruleus*, são ativados diferentemente. A ativação do locus sugere uma ação inespecífica do sistema nervoso simpático. Embora mais neurônios tenham sido estimulados pelo éter no grupo de separação materna, este fato pode ser explicado pelas aferências do *locus coeruleus*, sendo necessários mais estudos sobre a via de ativação simpática. Por outro lado, ativação do paraventricular ocorre de maneira específica para cada tipo de estressor, já a influência da separação materna se dá de maneira semelhante. Mostrando que a reprogramação neuroendócrina ocorre de maneira heterogênea no sistema nervoso central.

Mais estudos são necessários a fim de se identificar claramente as vias do circuito metabólico e, se as alterações observadas são causadas diretamente por modificações estruturais nestes núcleos, seja nos neurônios, receptores, no padrão de ativação ou, indiretamente através das conexões entre eles.

## CONCLUSÃO

---

### Conclusões gerais:

1. A separação materna é um evento intenso o suficiente para gerar mudanças significativas na resposta endócrino-metabólica ao estresse durante a vida adulta e na ativação neuronal.

### Conclusões específicas

1. A resposta ao estresse na vida adulta segue um padrão de especificidade e heterogeneidade, ou seja, os animais responderam diferentemente aos dois tipos de desafios.

1.1. A resposta glicêmica foi mais intensa no estresse por éter

1.2. A resposta de lactato foi discretamente maior no estresse por éter.

1.3. A secreção de insulina também foi significativamente maior no grupo de éter.

Os três achados acima confirmam uma maior participação do sistema nervoso simpático periférico na resposta ao estresse por éter.

1.4. A secreção de prolactina foi 270% mais intensa na contenção, indicando uma maior participação do sistema nervoso central neste tipo de estresse.

1.4.1. A resposta de secreção de prolactina pode refletir a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

1.5. O glucagon apesar de participar do balanço energético, não é um bom preditor da resposta ao estresse

2. A separação materna alterou a resposta neuroendócrina e metabólica somente na exposição ao éter, mostrando sua capacidade de reprogramação em circuitos neurais específicos e, que a resposta periférica não foi afetada como ficou demonstrado no grupo de contenção.
3. Os núcleos centrais que participam da resposta ao estresse são ativados diferentemente pelos dois modelos
  - 3.1. Os núcleos hipotalâmicos são mais heterogêneos no padrão de resposta, sendo ativados mais fortemente pelo estresse de contenção, com exceção do núcleo medial da amígdala que não demonstrou diferença.
  - 3.2. Os núcleos do tronco encefálico e bulbo, portanto os mais inferiores, respondem de maneira inespecífica. Indicando a resposta ao estresse pode estar mais relacionado com circuitos superiores.
4. A hipótese que a separação materna seria capaz de alterar a circuitaria neural foi confirmada por uma maior ativação neuronal (confirmada pelo número absoluto de neurônios Fos +) na maioria dos núcleos avaliados.
  - 4.1. A contenção parece ser um estímulo mais intenso para o Sistema Nervoso Central
  - 4.2. O núcleo pré-óptico mediano participa da resposta glicêmica e insulinêmica ao estresse e é fortemente alterado pela separação materna, principalmente no grupo de exposição ao éter. Podendo ser a chave para reprogramação neuroendócrina e metabólica



## REFERÊNCIAS

---

## Reference List

- (1) Gonzales MAA. Stress: generalidades. *Stress Temas de Psiconeuroendocrinologia*. São Paulo: Robe Editorial; 2001;17-48.
- (2) Habib KE, Gold PW, Chrousos GP. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:695-728.
- (3) Pacak K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 2001;22:502-548.
- (4) Goldstein DS. Catecholamines and stress. *Endocr Regul* 2003;37:69-80.
- (5) Lightman SL. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J Neuroendocrinol* 2008;20:880-884.
- (6) Selye H. Stress and holistic medicine. *Fam Community Health* 1980;3:85-88.
- (7) Levi L. Stress and distress in response to psychosocial stimuli. Laboratory and real life studies on sympathoadrenomedullary and related reactions. *Acta Med Scand Suppl* 1972;528:1-166.
- (8) McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med* 1998;338:171-179.
- (9) Chrousos GP. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormone perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992;21:833-858.
- (10) Buhler HU, da PM, Haefely W, Picotti GB. Plasma adrenaline, noradrenaline and dopamine in man and different animal species. *J Physiol* 1978;276:311-320.
- (11) de HM, van HH, Tolboom JB, Beynen AC, Remie R. Endocrine stress response in jugular-vein cannulated rats upon multiple exposure to either diethyl-ether, halothane/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O or sham anaesthesia. *Lab Anim* 2002;36:105-114.
- (12) Dunn AJ, Swiergiel AH. The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems. *Eur J Pharmacol* 2008;583:186-193.



- (13) Hand GA, Hewitt CB, Fulk LJ et al. Differential release of corticotropin-releasing hormone (CRH) in the amygdala during different types of stressors. *Brain Res* 2002;949:122-130.
- (14) Harbuz MS, Lightman SL. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J Endocrinol* 1992;134:327-339.
- (15) King AP, Liberzon I. Assessing the neuroendocrine stress response in the functional neuroimaging context. *Neuroimage* 2009.
- (16) Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R, Yadid G, Kopin IJ, Goldstein DS. Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Ann N Y Acad Sci* 1995;771:115-130.
- (17) Van De Kar LD, Blair ML. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 1999;20:1-48.
- (18) Briski K, Gillen E. Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress. *Brain Res Bull* 2001;55:401-408.
- (19) Bhatnagar S, Dallman M. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* 1998;84:1025-1039.
- (20) Minamitani N, Minamitani T, Lechan RM, Bollinger-Gruber J, Reichlin S. Paraventricular nucleus mediates prolactin secretory responses to restraint stress, ether stress, and 5-hydroxy-L-tryptophan injection in the rat. *Endocrinology* 1987;120:860-867.
- (21) Day HE, Nebel S, Sasse S, Campeau S. Inhibition of the central extended amygdala by loud noise and restraint stress. *Eur J Neurosci* 2005;21:441-454.
- (22) Chen X, Herbert J. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. *Neuroscience* 1995;64:675-685.
- (23) De PD, Steiner AA, Branco LG. The nitric oxide pathway is an important modulator of stress-induced fever in rats. *Physiol Behav* 2000;70:505-511.

- (24) Reis FM, Ribeiro-de-Oliveira A, Jr., Guerra RM, Reis AM, Coimbra CC. Blood glucose and prolactin in hyperprolactinemic rats exposed to restraint and surgical stress. *Life Sci* 1996;58:155-161.
- (25) Reis FM, Ribeiro-de-Oliveira JA, Machado LJ, Guerra RM, Reis AM, Coimbra CC. Plasma prolactin and glucose alterations induced by surgical stress: a single or dual response? *Exp Physiol* 1998;83:1-10.
- (26) Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R. Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *J Physiol* 2004;554:543-557.
- (27) Figueiredo HF, Bruestle A, Bodie B, Dolgas CM, Herman JP. The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *Eur J Neurosci* 2003;18:2357-2364.
- (28) Emmert MH, Herman JP. Differential forebrain c-fos mRNA induction by ether inhalation and novelty: evidence for distinctive stress pathways. *Brain Res* 1999;845:60-67.
- (29) Gonzales MAA. Stress: generalidades. *Stress Temas de Psiconeuroendocrinologia*. São Paulo: Robe Editorial; 2001;17-48.
- (30) Seggie J. Differential responsivity of corticosterone and prolactin to stress following lesions of the septum or amygdala: implications for psychoneuroendocrinology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1987;11:315-324.
- (31) Tohei A, Tomabechi T, Mamada M, Akai M, Watanabe G, Taya K. Effects of repeated ether stress on the hypothalamic-pituitary-testes axis in adult rats with special reference to inhibin secretion. *J Vet Med Sci* 1997;59:329-334.
- (32) Caldeira JC, Franci CR. Prolactin and corticosterone secretion in response to acute stress after paraventricular nucleus lesion by ibotenic acid. *Brain Res Bull* 2000;52:483-489.
- (33) Abraham IM, Kovacs KJ. Postnatal handling alters the activation of stress-related neuronal circuitries. *Eur J Neurosci* 2000;12:3003-3014.
- (34) Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L. New insights in the etiology and pathophysiology of irritable bowel syndrome: contribution of neonatal stress models. *Pediatr Res* 2007;62:240-245.

- (35) Biagini G, Pich EM. Corticosterone administration to rat pups, but not maternal separation, affects sexual maturation and glucocorticoid receptor immunoreactivity in the testis. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73:95-103.
- (36) Card JP, Levitt P, Gluhovsky M, Rinaman L. Early experience modifies the postnatal assembly of autonomic emotional motor circuits in rats. *J Neurosci* 2005;25:9102-9111.
- (37) Farkas J, Reglodi D, Gaszner B et al. Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain Res Bull* 2009;79:208-214.
- (38) Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J Neurosci* 2002;22:7840-7843.
- (39) Huot RL, Gonzalez ME, Ladd CO, Thirivikraman KV, Plotsky PM. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology* 2004;29:279-289.
- (40) Jurcovicova J, Dobrakovova M. Repeated Maternal Deprivation Alters Behavioral Pattern and Attenuates Prolactin Response to Mild Stressor in Adult Male Wistar Rats. *Endocr Regul* 1998;32:161-165.
- (41) Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73:131-140.
- (42) Kim MJ, Kim YO, Chang UJ et al. Melatonin enhances NADPH-diaphorase activities in the hypothalamus of maternally-separated rats. *Neurosci Lett* 2006;394:111-116.
- (43) Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 2000;12:5-12.
- (44) Maciag CM, Dent G, Gilligan P et al. Effects of a non-peptide CRF antagonist (DMP696) on the behavioral and endocrine sequelae of maternal separation. *Neuropsychopharmacology* 2002;26:574-582.
- (45) Macri S, Chiarotti F, Wurbel H. Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav Brain Res* 2008;191:227-234.

- (46) Mann DR, Fraser HM. The neonatal period: a critical interval in male primate development. *J Endocrinol* 1996;149:191-197.
- (47) McIntosh J, Anisman H, Merali Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res* 1999;113:97-106.
- (48) Meerlo P, Horvath KM, Nagy GM, Bohus B, Koolhaas JM. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J Neuroendocrinol* 1999;11:925-933.
- (49) Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;18:195-200.
- (50) Renard GM, Rivarola MA, Suarez MM. Sexual dimorphism in rats: effects of early maternal separation and variable chronic stress on pituitary-adrenal axis and behavior. *Int J Dev Neurosci* 2007;25:373-379.
- (51) Rhees RW, Lephart ED, Eliason D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behav Brain Res* 2001;123:1-10.
- (52) Rivarola MA, Suarez MM. Early maternal separation and chronic variable stress in adulthood changes the neural activity and the expression of glucocorticoid receptor in limbic structures. *Int J Dev Neurosci* 2009.
- (53) Ryu V, Lee JH, Yoo SB, Gu XF, Moon YW, Jahng JW. Sustained hyperphagia in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1355-1362.
- (54) Sanders BJ, Anticevic A. Maternal separation enhances neuronal activation and cardiovascular responses to acute stress in borderline hypertensive rats. *Behav Brain Res* 2007;183:25-30.
- (55) Schmidt MV, Levine S, Alam S et al. Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. *J Neuroendocrinol* 2006;18:865-874.
- (56) Shalev U, Kafkafi N. Repeated maternal separation does not alter sucrose-reinforced and open-field behaviors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73:115-122.

- (57) Spencer SJ, Tilbrook A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology* 2009.
- (58) Vazquez DM, Lopez JF, Van HH, Watson SJ, Levine S. Maternal deprivation regulates serotonin 1A and 2A receptors in the infant rat. *Brain Res* 2000;855:76-82.
- (59) Veenema AH, Neumann ID. Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:463-467.
- (60) Walker CD, Deschamps S, Proulx K et al. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *J Psychiatry Neurosci* 2004;29:364-382.
- (61) Wang Y, Holmes E, Tang H et al. Experimental metabonomic model of dietary variation and stress interactions. *J Proteome Res* 2006;5:1535-1542.
- (62) Wigger A, Neumann ID. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* 1999;66:293-302.
- (63) Levine S. A further study of infantile handling and adult avoidance learning. *J Pers* 1956;25:70-80.
- (64) DENENBERG VH, OTTINGER DR, STEPHENS MW. Effects of maternal factors upon growth and behavior of the rat. *Child Dev* 1962;33:65-71.
- (65) Lucion AB, de Almeida RM, De Marques AA. Influence of the mother on development of aggressive behavior in male rats. *Physiol Behav* 1994;55:685-689.
- (66) Levine S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 2005;30:939-946.
- (67) Pryce CR, Ruedi-Bettschen D, Dettling AC, Feldon J. Early life stress: long-term physiological impact in rodents and primates. *News Physiol Sci* 2002;17:150-155.
- (68) Valentino RJ, Van BE. Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol* 2008;583:194-203.

- (69) Jorgensen H, Knigge U, Kjaer A, Vadsholt T, Warberg J. Serotonergic involvement in stress-induced ACTH release. *Brain Res* 1998;811:10-20.
- (70) Yamada F, Inoue S, Saitoh T, Tanaka K, Satoh S, Takamura Y. Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinology* 1993;132:2199-2205.
- (71) Jaroenporn S, Nagaoka K, Kasahara C, Ohta R, Watanabe G, Taya K. Physiological roles of prolactin in the adrenocortical response to acute restraint stress. *Endocr J* 2007;54:703-711.
- (72) Kusakawa S, Tohei A, Jaroenporn S, Watanabe G, Taya K. Inhibition of stress-induced adrenocorticotropin and prolactin secretion mediating hypophysiotropic factors by antagonist of AMPA type glutamate receptor. *J Reprod Dev* 2007;53:545-554.
- (73) Dent GW, Smith MA, Levine S. Stress-induced alterations in locus coeruleus gene expression during ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res* 2001;127:23-30.
- (74) Cook CJ. Patterns of weaning and adult response to stress. *Physiol Behav* 1999;67:803-808.
- (75) Foster MT, Warne JP, Ginsberg AB et al. Palatable foods, stress, and energy stores sculpt corticotropin-releasing factor, adrenocorticotropin, and corticosterone concentrations after restraint. *Endocrinology* 2009;150:2325-2333.
- (76) Muchimapura S, Fulford AJ, Mason R, Marsden CA. Isolation rearing in the rat disrupts the hippocampal response to stress. *Neuroscience* 2002;112:697-705.
- (77) van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S. Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;111:245-252.
- (78) Korosi A, Baram TZ. The central corticotropin releasing factor system during development and adulthood. *Eur J Pharmacol* 2008;583:204-214.
- (79) Lucion AB, de Almeida RM, De Marques AA. Influence of the mother on development of aggressive behavior in male rats. *Physiol Behav* 1994;55:685-689.

- (80) Hofer MA, Brunelli SA, Shair HN. Potentiation of isolation-induced vocalization by brief exposure of rat pups to maternal cues. *Dev Psychobiol* 1994;27:503-517.
- (81) Burton CL, Chatterjee D, Chatterjee-Chakraborty M et al. Prenatal restraint stress and motherless rearing disrupts expression of plasticity markers and stress-induced corticosterone release in adult female Sprague-Dawley rats. *Brain Res* 2007;1158:28-38.
- (82) Hofer MA. Early relationships as regulators of infant physiology and behavior. *Acta Paediatr Suppl* 1994;397:9-18.
- (83) Miyata S, Ishiyama M, Shibata M, Nakashima T, Kiyohara T. Infant cold exposure changes Fos expression to acute cold stimulation in adult hypothalamic brain regions. *Neurosci Res* 1998;31:219-225.
- (84) Ryu V, Yoo SB, Kang DW, Lee JH, Jahng JW. Post-weaning isolation promotes food intake and body weight gain in rats that experienced neonatal maternal separation. *Brain Res* 2009.
- (85) Daniels WM, Pietersen CY, Carstens ME, Stein DJ. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab Brain Dis* 2004;19:3-14.
- (86) Foscolo RB, de Castro MG, Marubayashi U, dos Reis AM, Coimbra CC. Medial preoptic area adrenergic receptors modulate glycemia and insulinemia in freely moving rats. *Brain Res* 2003;985:56-64.
- (87) Faure J, Uys JD, Marais L, Stein DJ, Daniels WM. Early maternal separation alters the response to traumatization: resulting in increased levels of hippocampal neurotrophic factors. *Metab Brain Dis* 2007;22:183-195.
- (88) Kovacs KJ. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 1998;33:287-297.
- (89) Aston-Jones G, Cohen JD. An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci* 2005;28:403-450.
- (90) Sved AF, Cano G, Passerin AM, Rabin BS. The locus coeruleus, Barrington's nucleus, and neural circuits of stress. *Physiol Behav* 2002;77:737-742.

- (91) Ferguson AV, Latchford KJ, Samson WK. The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12:717-727.
- (92) Swanson LW, Kuypers HG. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 1980;194:555-570.
- (93) Levin BE. Glucosensing neurons do more than just sense glucose. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25 Suppl 5:S68-S72.
- (94) Shimazu T, Fukuda A, Ban T. Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. *Nature* 1966;210:1178-1179.
- (95) Chafetz MD, Parko K, Diaz S, Leibowitz SF. Relationships between medial hypothalamic alpha 2-receptor binding, norepinephrine, and circulating glucose. *Brain Res* 1986;384:404-408.
- (96) Ritter S, Dinh TT, Zhang Y. Localization of hindbrain glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose. *Brain Res* 2000;856:37-47.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)