

**GABRIELLY CRUVINEL FERNANDES**

**ESTRESSE NEONATAL RESULTA EM ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DURADOURAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr<sup>o</sup>. João Luciano de Quevedo  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gislaïne Zilli Réus

**CRICIÚMA  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F363e Fernandes, Gabrielly Cruvinel.  
Estresse neonatal resulta em alterações comportamentais e neuroquímicas duradouras / Gabrielly Cruvinel Fernandes. – 2017.  
91p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2017.  
Orientação: João Luciano de Quevedo.  
Coorientação: Gislaine Zilli Réus.

1. Transtorno depressivo maior. 2. Estresse oxidativo. 3. Neuroinflamação. 4. Privação materna. I. Título.

CDD. 22<sup>a</sup> ed. 616.8982



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

---

## PARECER

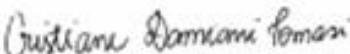
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **Gabrielly Cruvinel Fernandes** sob o título **“ESTRESSE NEONATAL RESULTA EM ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DURADOURAS”**, para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Dissertação.

Criciúma, SC, 27 de abril de 2017.

  
Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico  
Membro Relator

  
Prof.ª Dra. Alexandra Ioppi Zugno  
Membro Interno

  
Prof.ª Dra. Cristiane Damiani Tomasi  
Membro Externo



## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UNESC.

Os ensaios bioquímicos sobre o estresse oxidativo e níveis de citocinas pró-inflamatórias foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia do PPGCS da UNESC.



*“Aos meus filhos, que todos os dias me dão motivação de ser uma pessoa melhor, tanto pessoal e profissionalmente. Aos meus pais, que me ensinaram a questionar, ousar e lutar pelos meus objetivos. Ao meu marido, que nestes 18 anos juntos, me dedica apoio incondicional.”*



## AGRADECIMENTOS

A DEUS, que em sua infinita sabedoria, em vários momentos nebulosos de minha vida se fez presente. E essa presença com certeza manifestava através da minha garra, persistência e paciência para alcançar meus objetivos , da maneira mais justa e humana possível.

A minha família, especialmente Valentina (Tina) e Gabriel (Gabi), filhos maravilhosos, que me apoiam em todas os meus projetos. Vê-los crescerem e se transformando cada vez mais, em criança e pré- adolescente, sensíveis, carinhos e entendendo minha vida profissional, me torna a pessoa mais realizada do mundo. Com certeza , conduzi-los ao longo desse período e ainda muitos outros virão, tem sido a dissertação mais importante da minha vida.

A minha co-orientadora, um agradecimento carinhoso por todos os momentos de paciência, compreensão e competência.

Agradecer a todos os alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado que ajudaram na realização dos experimentos no laboratório.



*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.*

*Theodore Roosevelt*



## RESUMO

O transtorno depressivo maior (TDM) é conhecido por ter uma origem desenvolvimental. O trauma, por exemplo, pode modular profundamente o desenvolvimento dos circuitos neurais, resultando em mudanças comportamentais significativas, muitas vezes permanentes. Estudos mostram que o estresse oxidativo e a neuroinflamação têm um papel importante na fisiopatologia do TDM. Assim, este estudo teve como objetivo utilizar um modelo animal de depressão induzido pela privação dos cuidados maternos para investigar se o comportamento do tipo depressivo, a neuroinflamação e o estresse oxidativo estão relacionados a alterações desenvolvimentais após o estresse no início da vida. Para este fim, ratos Wistar machos foram submetidos ao modelo animal de privação materna. Durante o protocolo de privação materna, os filhotes machos foram separados de suas mães durante 3 horas por dia nos 10 primeiros dias de vida. Aos 20, 30, 40 e 60 dias após o nascimento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de natação forçada e teste do campo aberto. Após os testes comportamentais, os animais foram mortos por decaptação e as estruturas cerebrais: córtex pré-frontal e hipocampo, e o soro foram retirados para a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo e níveis de citocinas. Os resultados mostraram que o protocolo de privação materna não induziu alterações comportamentais nos animais com 30 e 40 dias após o nascimento. No entanto, os animais com 20 e 60 dias apresentaram comportamento depressivo no teste de natação forçada, sem alterações na atividade locomotora espontânea. No cérebro e no soro, os níveis das citocinas pró-inflamatórias tais como, interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) foram aumentados e a citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10) foi diminuída nos animais com 20, 30, 40 e 60 dias após o nascimento no cérebro e soro. Os níveis de carbonilação de proteínas foram aumentados, no cérebro, nos animais com 30, 40 e 60 dias após o nascimento. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) aumentou no cérebro dos animais com 30, 40 e 60 dias após o nascimento e a atividade da enzima catalase (CAT) diminuiu no cérebro dos animais com 20, 40 e 60 dias após o nascimento. Os resultados sugerem que a existência de eventos estressantes no início da vida pode induzir alterações comportamentais que persistem até a idade adulta além de, estimular a inflamação e danos oxidativos, nos sistemas nervoso central e periférico que iniciam logo a privação materna. Essas



alterações, podem estar relacionada a uma maior vulnerabilidade ao desenvolvimento de transtornos mentais na adolescência e vida adulta.

**Palavras-chaves:** Neurodesenvolvimento; inflamação; estresse oxidativo; privação dos cuidados maternos; transtorno depressivo maior.



## ABSTRACT

Major depressive disorder (MDD) is known to have a developmental origin. Trauma, for example, may profoundly modulate developing neural circuits, resulting in significant behavioral changes that are often permanent. Evidence have been also shown that oxidative stress and neuroinflammation have an important role in the pathophysiology of MDD. Thus, this study was aimed to use an animal model of depression induced by maternal care deprivation (MCD) to investigate if depressive behavior, neuroinflammation and oxidative stress were underlying the developmental programming after early life stress. For the MCD protocol Wistar male pups were separated from their mothers for 3 h/day during the first 10 postnatal days (PND). At 20, 30, 40, and 60 PND, individual subsets of animals were evaluated in behavioral tests and then euthanized to assess prefrontal cortex (PFC), hippocampus and serum for cytokines levels and oxidative stress parameters assessment. The results showed that MCD did not induce behavioral changes at 30 and 60 PND. However, at 30 and 60 PND rats displayed a depressive-like behavior in the forced swimming test, without changes on locomotor spontaneous activity. In the brain and serum the levels of pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were increased, and anti-inflammatory cytokine (interleukin-10) was reduced, throughout the developmental programming (20, 30, 40 and 60 PND). Lipid damage did not occur. Protein carbonyl levels increased in the brain at 30, 40 and 60 PND. Superoxide dismutase (SOD) activity decreased during all developmental programming phases evaluated into the brain. Catalase (CAT) activity was decreased on 20, 40 and 60 PND into the brain. Our results revealed that the existence of “critical episodes” for early life stressful events is able to induce behavioral alterations that persist through to adulthood and it can stimulate inflammation and oxidative damage on both central and peripheral systems, which are needed for distinct patterns of resilience against psychiatric disorders later in life.

**Keywords:** Developmental programming, inflammation, oxidative stress, maternal care deprivation, major depressive disorder.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1B: Efeitos da privação materna sobre o tempo de imobilidade, escalada e natação em ratos com 30 dias após o nascimento submetidos ao teste de natação forçada. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student. ....	48
Figura 1C: Efeitos da privação materna sobre o tempo de imobilidade, escalada e natação em ratos com 40 dias após o nascimento submetidos ao teste de natação forçada. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student. ....	49
Figura 1D: Efeitos da privação materna sobre o tempo de imobilidade, escalada e natação em ratos com 60 dias após o nascimento submetidos ao teste de natação forçada. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student. ....	49
Figura 2A: Efeitos da privação materna sobre o número de crossings e rearings no teste do campo aberto em animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student. ....	50
Figura 2B: Efeitos da privação materna sobre o número de crossings e rearings no teste do campo aberto em animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student. ....	51
Figura 2C: Efeitos da privação materna sobre o número de crossings e rearings no teste do campo aberto em animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student. ....	51
Figura 2D: Efeitos da privação materna sobre o número de crossings e rearings no teste do campo aberto em animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student. ....	52
Figura 3A: Efeitos da privação materna nos níveis de interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M.	



(N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	53
Figura 3B: Efeitos da privação materna nos níveis de interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	53
Figura 3C: Efeitos da privação materna nos níveis de interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	54
Figura 3D: Efeitos da privação materna nos níveis de interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	54
Figura 4A: Efeitos da privação materna nos níveis do fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	55
Figura 4B: Efeitos da privação materna nos níveis do fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	56
Figura 4C: Efeitos da privação materna nos níveis do fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	56
Figura 4D: Efeitos da privação materna nos níveis do fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	57
Figura 5A: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 6 (IL-6) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N =	



5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	58
Figura 5B: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 6 (IL-6) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	58
Figura 5C: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 6 (IL-6) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	59
Figura 5D: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 6 (IL-6) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	59
Figura 6A: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 10 (IL-10) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	60
Figura 6B: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 10 (IL-10) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	61
Figura 6C: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 10 (IL-10) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	61
Figura 6D: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 10 (IL-10) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	62
Figura 7A: Efeitos da privação materna nos níveis de malondealdeído (MDA) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N =	



5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	63
Figura 7B: Efeitos da privação materna nos níveis de malondealdeído (MDA) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	63
Figura 7C: Efeitos da privação materna nos níveis de malondealdeído (MDA) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	64
Figura 7D: Efeitos da privação materna nos níveis de malondealdeído (MDA) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	64
Figura 8A: Efeitos da privação materna nos níveis da carbonilação de proteínas no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	65
Figura 8B: Efeitos da privação materna nos níveis da carbonilação de proteínas no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	66
Figura 8C: Efeitos da privação materna nos níveis da carbonilação de proteínas no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	66
Figura 8D: Efeitos da privação materna nos níveis da carbonilação de proteínas no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	67
Figura 9A: Efeitos da privação materna sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$	



E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student. ....	68
Figura 9B: Efeitos da privação materna sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student. ....	68
Figura 9C: Efeitos da privação materna sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student. ....	69
Figura 9D: Efeitos da privação materna sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student. ....	69
Figura 10A: Efeitos da privação materna sobre a atividade da catalase (CAT) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	70
Figura 10B: Efeitos da privação materna sobre a atividade da catalase (CAT) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	71
Figura 10C: Efeitos da privação materna sobre a atividade da catalase (CAT) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	71
Figura 10D: Efeitos da privação materna sobre a atividade da catalase (CAT) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; * $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.....	72



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>31</b>
1.1 FISIOPATOLOGIA E TRATAMENTO DO TDM.....	32
1.2 SISTEMA IMUNE E TDM .....	33
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E TDM .....	34
1.4 ESTRESSE E TDM .....	38
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, .....	41
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>42</b>
3.1 ASPECTOS ÉTICOS .....	42
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	42
3.3 PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO MATERNA.....	42
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	43
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	43
<b>3.5.1 Teste do campo aberto</b> .....	<b>43</b>
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	44
<b>3.6.1 Preparação do tecido e homogenado</b> .....	<b>44</b>
<b>3.6.2 Procedimentos de análise de estresse oxidativo</b> .....	<b>44</b>
3.6.2.1 Formação de TBARS .....	44
3.6.2.2 Formação de proteínas carbonil .....	45
3.6.2.3 Atividade da enzima SOD.....	45
3.6.2.4 Atividade da enzima CAT.....	46
<b>3.6.2 Análises de citocinas</b> .....	<b>46</b>
3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	46
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
4.1 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA SOBRE O COMPORTAMENTO EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO .....	47
4.2 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA SOBRE OS NÍVEIS DE CITOCINAS NO CF, HIPOCAMPO E SORO EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO.....	52
4.3 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO CF E HIPOCAMPO EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO .....	62
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>73</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>90</b>
<b>ANEXO A: COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b> .....	<b>91</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS), alerta que cerca de 10% da população global, sofre com algum tipo de transtorno mental em todo o mundo, representando aproximadamente 700 milhões de pessoas. Destas, em torno de 350 milhões são afetadas pelo Transtorno Depressivo Maior (TDM), o que equivale, aproximadamente a mais de 7% da população mundial total. No Brasil, cerca de 20 a 30 milhões de pessoas, aproximadamente, apresentam, apresentaram ou virão a ter pelo menos um episódio depressivo ao longo da vida (Camargo et al., 2014). O TDM apresenta uma prevalência durante a vida de 2% a 15%, sendo um dos fatores de risco mais importantes para a incapacidade (OMS, 2012). Pacientes acometidos pelo TDM têm mais suscetibilidade a desenvolver comorbidades, como ansiedade, diabetes e doenças coronarianas (Knol et al., 2006).

Trata-se de um transtorno mental sério e grave, em que muitas vezes o suicídio resulta como consequência mais grave. O suicídio está entre as dez principais causas de morte em indivíduos de todas as idades e é a principal causa de morte na maioria dos países desenvolvidos para os indivíduos com idade inferior a 35 anos (OMS, 2006). Pelo menos 50% de todos os suicídios cometidos por adultos, tinham diagnóstico prévio para o TDM (Kim et al., 2003). Além disso, até 15% dos indivíduos com diagnóstico de TDM reconhecem ter tentado o suicídio em algum momento de suas vidas (Dilsaver et al., 1996). Dados da OMS registraram aumento de 60% no número de casos de suicídios nos últimos 50 anos e estima-se um aumento a cerca de 1,5 milhões de casos até o ano de 2020. Dados, no Brasil, também são bastante relevantes, compondo um panorama de 5,6 casos de suicídios a cada 100 mil habitantes (Brasil, 2008).

A etiologia do TDM ainda é desconhecida. Acredita-se em uma origem multifatorial, interação entre fatores genéticos, neurobiológicos e fatores ambientais (Jespersen et al., 2013). Além disso, a qualidade do ambiente de vida, como a exposição a eventos estressantes estão entre os fatores mais relevantes que determinam o aparecimento do TDM (Davidson e McEwen, 2012).

## 1.1 FISIOPATOLOGIA E TRATAMENTO DO TDM

Em 1965 foi proposto por Schild Krout, o envolvimento do sistema monoaminérgico no TDM (Schildkraut, 1965). Tal proposição é reforçada pelo conhecimento do mecanismo de ação dos antidepressivos, que se baseia, principalmente, no aumento da disponibilidade dos neurotransmissores monoaminérgicos (dopamina, serotonina (5-HT) e noradrenalina) na fenda sináptica, seja pela inibição (seletiva ou não) de sua recaptações, ou pela inibição da enzima responsável por suas degradações (inibidores da monoaminoxidase) (Stahl et al., 1997; Nishida et al., 2002). Coppen (1967) focando no papel do sistema serotoninérgico sugeriu que o déficit de 5-HT seria a principal causa da depressão. Com isso o tratamento farmacológico eficaz seria proporcionar o aumento na fenda sináptica de 5-HT. Contudo, devido a uma série de resultados conflitantes, essa teoria simplificada, tem sido bastante criticada (Lacasse e Leo, 2005; Holtzheimer e Mayberg, 2011).

Os principais antidepressivos utilizados na clínica para o tratamento do TDM são os inibidores da monoamina oxidase (ex. tranilcipromina e moclobemida), os inibidores não seletivos da recaptação de monoaminas (ex. tricíclicos, venlafaxina, duloxetina e bupropiona), os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ex. fluoxetina, paroxetina e citalopram) e os inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (ex. reboxetina e desipramina) (Mathew et al., 2008). Apesar da diversidade de fármacos para o tratamento do TDM, os tratamentos disponíveis estão aquém do ideal (Machado-Vieira, 2010). Isso está relacionado ao fato de que o período de resposta terapêutica para que se obtenham os primeiros benefícios clínicos é longo, sendo compreendido entre 3-5 semanas (Juli e Juli, 2014). Outras limitações relacionadas ao tratamento do TDM são os inúmeros efeitos colaterais, tais como, diminuição ou perda da libido, insônia, dor de cabeça e ganho ou perda de peso (Berton e Nestler, 2006; Holtzheimer e Nemeroff, 2006). Menos de 50% dos pacientes com TDM atingem a remissão completa após a terapia com um único antidepressivo, outros apresentam respostas parciais, refratárias ou intolerantes ao tratamento, enfatizando assim a necessidade de descobrir novos antidepressivos que possuam ação rápida, além de que sejam mais seguros e efetivos para o tratamento do TDM (Berton e Nestler, 2006; Juli e Juli, 2014).

## 1.2 SISTEMA IMUNE E TDM

A ativação do sistema de resposta inflamatória na depressão está bem documentada (Maes et al., 1992; Muller et al., 1993; Maes et al., 1994; Rothermundt et al., 2001; Myint et al., 2005). No entanto, poucos estudos têm investigado a inflamação no cérebro e/ou a associação entre a inflamação periférica e central.

Pacientes diagnosticados com o TDM, apresentam um aumento no número de leucócitos sanguíneos periféricos, elevação na concentração plasmática de proteínas de fase aguda, como a haptoglobina e a proteína C reativa, diminuição a resposta a mitógenos, redução do número de linfócitos, alteração na expressão de antígenos, além de um aumento nos níveis sanguíneos de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina-6 (IL-6) e interleucina-2 (IL-2) e também seus receptores (Nishida et al., 2002; Sublette et al., 2004). Este aumento significativo nas citocinas pró-inflamatórias e consequente desequilíbrio na resposta das células de defesa, poderiam desempenhar um importante papel na fisiopatologia do TDM (Vismari et al., 2008).

Estudos sugerem que o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias observada no TDM resultaria nos sintomas a ela relacionados, ou seja, as citocinas atuariam como neuromoduladores, mediando aspectos neuroquímicos, neuroendócrinos e comportamentais do TDM (Yirmiya et al., 2000; Leonard et al., 2001). As citocinas também seriam capazes de ativar células gliais, como astrócitos e microglia, que por sua vez, produziriam mais citocinas pró-inflamatórias por mecanismos de *feedback* (Muller et al., 1998).

As respostas imunológicas em nível central são reguladas por dois tipos celulares, a micróglia e os astrócitos, os quais desempenham papéis inflamatórios e anti-inflamatórios, respectivamente (Gao e Hong, 2008). Os astrócitos são os mais abundantes, compreendendo aproximadamente 80% das células cerebrais, enquanto as células microgliais representam aproximadamente 15% de células do cérebro. Os astrócitos, além de fazerem parte dos sistemas imunes e inflamatórios encontram-se com uma localização estratégica, em estreito contato com as células do sistema nervoso central (SNC) residentes (neurônios, microglia, oligodendrócitos e outros astrócitos). Apresentam como função o armazenamento, o transporte e a liberação de neurotransmissores (Gao e Hong, 2008), por exemplo, o glutamato, o qual é transportado ativamente pelos astrócitos (Aronica et al., 2003). Os principais ativadores dos astrócitos são mediadores inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ),

interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) (Farina et al., 2007). O número e função das microglias parecem ser controlados pelo microambiente local. Estas células do sistema imunológico dotadas de receptores podem detectar mudanças ambientais sobre uma escala de tempo de minutos e responder realizando diversas funções, que de acordo com o contexto, poderiam resultar como benéficos ou prejudiciais (Kierdorf e Prinz, 2013; Siskova e Tremblay, 2013) na interface de estímulos ambientais e consequentemente mudanças em sua função, sugerindo-se que as microglias poderiam estar por trás da interação entre estímulos ambientais e vulnerabilidade ao TDM.

### 1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E TDM

Até hoje, nenhum processo fisiopatológico específico tem sido associado às alterações morfológicas neuronais que acompanham o TDM (Michel et al., 2012). Constantemente, as reduções volumétricas no córtex pré-frontal (PFC) e no hipocampo foram relatadas a partir de estudos estruturais de imagem cerebral de pacientes com o transtorno (Campbell et al., 2004). Estudos *postmortem* realizados, mostraram reduções significativas no número e densidade de células gliais nestas regiões cerebrais, bem como alterações mais sutis na densidade e tamanho neuronal (Harrison et al., 2002; Bowley et al, 2002). Uma das causas mais plausíveis para estas alterações neuronais é o aumento do estresse oxidativo devido a uma elevação da produção de radicais livres. Na última década, a "hipótese de estresse oxidativo no TDM" tem sido apoiada por diversos estudos na literatura, não só em seres humanos, mas também nos achados pré-clínicos de modelos animais (Michel et al., 2007; Michel et al., 2010).

A definição mais comum de estresse oxidativo é um desequilíbrio no aumento de radicais livres e na resistência antioxidante, o que resulta em maior liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Halliwell et al., 1989). Estes radicais livres ou ânions são moléculas reativas contendo átomos de oxigênio tais como superóxido, o radical hidroxila e o peroxinitrito (Fridovich et al.,1986; Halliwell et al., 1989). As ERO desempenham um papel fundamental em vários mecanismos de sinalização celular. O aumento do estresse oxidativo resulta na inativação enzimática, na peroxidação lipídica e danos ao DNA (Michel et al., 2012). Portanto, uma maior liberação das ERO, muitas vezes em combinação com uma diminuição da defesa antioxidante, pode levar a ruptura celular e, finalmente a apoptose (Fridovich et al.,1986; Halliwell et al., 1989). Uma das mais importantes enzimas produtoras de ERO é a

xantina oxidase (XO) (Harrison et al., 2002; Hille et al., 2005). A XO catalisa a oxidação de hipoxantina em xantina e catalisa a oxidação de xantina em ácido úrico. Na reação citada, conseqüentemente ocorre a produção no mínimo de dois metabólitos de oxigênio reativos: os ânions superóxido e peróxido de hidrogênio (Brown et al., 1988; Terada et al., 1988). XO catalisa a redução de  $O_2$ , levando à formação de superóxido ( $O_2^-$ ) e do produto peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Harrison et al., 2002; McCord et al., 1985; Zweier et al., 1988). Enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) ou glutatona peroxidase (GPX) metabolizam as ERO em moléculas menos tóxicas. Por exemplo, a SOD catalisa a reação de superóxido  $H_2O_2$ , molécula menos tóxica (Winterbourn et al., 1993). A SOD é uma das mais importantes enzimas antioxidantes e interage com outras substâncias neuroprotetoras (Gsell et al., 1995). No entanto, o papel da SOD é um tanto ambíguo, pois é um antioxidante muito potente, mas também pode levar ao aumento do estresse oxidativo através da via de produção de  $H_2O_2$ , se as mesmas se encontrarem diminuídas (Michel et al., 2012). A SOD pode existir em várias isoformas contendo cobre e zinco (Cu/Zn-SOD) ou manganês (Mn-SOD). A distribuição celular destas enzimas varia de acordo com sua localização, a Cu/Zn-SOD está localizado principalmente em células gliais, enquanto Mn-SOD está localizado em neurônios e eritrócitos (Durany et al., 1999).

Como foi abordado anteriormente, os danos relacionados ao estresse oxidativo foram descritos no TDM (Fridovich et al., 1986; Halliwell et al., 1989; Michel et al., 2012). As ERO podem levar à destruição da integridade neuronal, induzida por danos diretos ao DNA ou pela peroxidação lipídica da membrana celular. Este último é iniciado por radicais livres, os quais quebram os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) de duplos ligamentos. Este processo leva mais frequentemente a uma reação em cadeia. Uma vez que o processo pode ser iniciado por apenas uma ERO, lipídios de membrana são extremamente vulneráveis. As "ligações duplas" são responsáveis pelas propriedades específicas da membrana celular, tais como, integridade e fluidez (Michel et al., 2012). Estas características podem ser interrompidas por ROS levando à destruição da célula. Os radicais peroxila induzem ainda destruições de proteínas de membrana, tais como receptores e enzimas (Halliwell et al., 1995). Estes processos, levando a células apoptóticas, foram observados em pacientes com TDM (Michel et al., 2010). Tem sido demonstrado no sangue de pacientes com TDM dano na membrana através da elevação dos ácidos graxos ômega 3 pelo aumento dos produtos de peroxidação lipídica

(Bilici et al., 2001; Peet et al., 1998; Sarandol et al., 2007; Selley et al., 2004). Nestes pacientes também têm sido associados o aumento dos níveis séricos de malondialdeído (MDA), um produto de degradação de lipoproteínas oxidadas apolipoproteína B (Bilici et al., 2001; Sarandol et al., 2006). Em pacientes com o transtorno, níveis elevados de MDA afetam negativamente a eficiência da memória visuo-espacial, auditivo-verbal e memória declarativa de curto e longo prazo (Talarowska et al., 2012). A maior concentração de MDA plasmática em pacientes com depressão recorrente está associada à gravidade dos sintomas depressivos, tanto no início da farmacoterapia antidepressiva como após 8 semanas de tratamento. Além disso, uma associação de estresse psicológico e estresse oxidativo têm sido descritas repetidamente, tanto em modelos animais como em seres humanos.

Sabe-se há algum tempo que o TDM pode ser desencadeado por eventos de vida que são acompanhados por estresse psicológico (Gidron et al., 2008). Como citado anteriormente, o TDM está associado a problemas cardiovasculares. Curiosamente, o estresse oxidativo é um fator de risco que liga ambos os distúrbios em um nível bioquímico (Milne et al., 2005). Maes e colaboradores (2010) encontraram um aumento de peróxidos plasmáticos e anticorpos de lipoproteína de baixa densidade oxidados em pacientes com TDM. Esses achados enfatizam o papel das vias de estresse oxidativo no TDM bem como em doenças coronarianas, o que pode explicar parcialmente as altas comorbidades dessas doenças (Maes et al., 2010).

Em pacientes com TDM, a expressão, atividade e concentração de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo no sangue e sistema nervoso estão alteradas (Michel et al., 2012). A literatura descreve os efeitos do estresse oxidativo relatado nestes pacientes observando as concentrações e atividades de enzimas pró e antioxidantes. Os resultados de níveis alterados de enzimas antioxidantes no sangue de pacientes com TDM têm sido um pouco conflitantes, alguns mostraram níveis aumentados de SOD (Sarandol et al., 2007; Bilici et al., 2001), GSH-Px e GR (Bilici et al., 2001), outros mostraram a atividade da SOD diminuída (Herken et al., 2007). Um estudo não encontrou nenhuma alteração (Srivastava et al., 2002). Pacientes com depressão parecem ter menores níveis de albumina, o que significa diminuição da atividade antioxidante (Van Hunsel et al., 1996). Foi encontrado, em pacientes depressivos não medicados, por menos 2 meses, diminuição no número total de antioxidantes e nos níveis de ácido úrico no plasma, bem como aumento do índice de peróxido no plasma total e índice de estresse oxidativo em relação aos indivíduos sem depressão (Yanik et al., 2004).

Analogamente, diferentes estudos também mostraram associações entre a gravidade do TDM e os índices de estresse oxidativo (Bilici et al., 2001; Forlenza et al., 2006; Sarandol et al., 2007).

Em suma, o achado mais replicado, no TDM foi a elevação de radicais livres e diminuição de enzimas antioxidantes (Forlenza et al., 2006; Sarandol et al., 2007). Além disso, pacientes com depressão mostram concentrações reduzidas das vitaminas antioxidantes E e C (Maes et al., 2000; Owen et al., 2005), estes resultados foram independentes do estado nutricional (Owen et al., 2005). Outro estudo em pacientes livres de medicação com TDM em relação a controles saudáveis mostrou menor potencial antioxidante total, concentração de ácido úrico, aumento dos marcadores de peroxidação lipídica e do índice de estresse oxidativo total no plasma desses pacientes (Yanik et al., 2004).

No córtex frontal, as concentrações de Cu/Zn-SOD estão aumentadas em pacientes com TDM em comparação com controles (Michel et al., 2007). Esse achado foi de interesse específico, uma vez que o Cu/Zn-SOD está localizado apenas parcialmente em neurônios, mas principalmente em células gliais, que são mais vulneráveis aos danos oxidativos (Fridovich et al., 1986; Papadopoulous et al., 1998). Em contraste com a Cu/Zn-SOD, a Mn-SOD é uma enzima mitocondrial, que pode ser encontrada principalmente em neurônios e em quantidades muito menores em células gliais. No TDM, as células gliais têm sido repetidamente descritas como alteradas, especialmente no córtex frontal (Lindenau et al., 2000; Rajkowska et al., 2000). Esses relatos de aumento de Cu/Zn-SOD, mas não de Mn-SOD no córtex frontal de pacientes com TDM, têm sido interpretados como importantes para explicar esses achados histopatológicos de lesão glial predominante nesta área cerebral (Michel et al., 2007). O aumento da oxidação das moléculas lipídicas na depressão pode ser devido à ativação da resposta imune (Babior et al., 2000), seguida pela indução de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- $\alpha$  e as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6 (Miller et al., 2002; Penninx et al., 2003; Lesperance et al., 2004; Ranjit et al., 2007).

Curiosamente, pacientes com o TDM também são mais vulneráveis a infecções (Miller et al., 2005). A oxidação dos lípidos parece ser parte da resposta do hospedeiro à infecção e inflamação, o que tem sido demonstrado em modelos animais *in vivo* (Memon et al., 2000). A resposta citotóxica do hospedeiro contra patógenos invasores leva a fagócitos ativados produzindo ROS como superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e peroxinitrito (Babior et al., 2000). Os leucócitos ativados segregam então a mieloperoxidase, gerando ainda

oxidantes reativos derivados do nitróxido que induzem a peroxidação lipídica (Zhang et al., 2002). Portanto, é possível que a depressão esteja ligada à oxidação lipídica por meio de inflamação relacionada ao estresse oxidativo.

#### 1.4 ESTRESSE E TDM

Mais de 30% dos transtornos mentais estão diretamente relacionados ao estresse precoce, incluindo transtornos de ansiedade e transtornos do humor (Afifi et al., 2008). A adversidade precoce, nos humanos, acelera o aparecimento de sintomas depressivos, que se manifestam durante a adolescência. Embora os efeitos precoces do estresse na psicopatologia do adulto possam depender do risco genético, pensa-se que a natureza da interação gênica e ambiental é um determinante crítico do resultado (Levine et al., 2012).

Este modelo de diátese de estresse para os principais distúrbios do humor baseia-se, pelo menos em parte, nos achados de que o estresse frequentemente precede o aparecimento de episódios afetivos em indivíduos geneticamente vulneráveis (Dunner et al., 1979; Anisman et al., 1982; Brown et al., 1987). Não só parece que há uma correlação significativa entre o estresse ambiental e o início subsequente de um episódio de um transtorno afetivo, mas há uma marcada semelhança entre as principais características da depressão em humanos e as consequentes respostas neuroendócrinas e comportamentais frente ao estresse em modelo animal (McKinney et al., 1984).

Com a ativação do sistema de estresse, por consequência ocorre a ativação do sistema nervoso simpático, diretamente relacionado a liberação de citocinas como a IL-6 (Nishida et al., 2002; Sublette et al., 2004). No qual, por sua vez, devido a desregulação entre o sistema de defesa e a produção de citocinas pro-inflamatórias poderiam induzir sintomas depressivos, já que parecem mediar a síndrome do comportamento doentio em humanos e animais, caracterizada com alterações do sono, do apetite, humor, atividade psicomotora e socialização. Em áreas cerebrais específicas de pacientes deprimidos, como hipocampo, pode ser encontrada perda neuronal, a qual parece correlacionar positivamente com alterações no balanço de citocinas inflamatórias na periferia (Miller et al., 1998; Nishida et al., 2002; Szelényi et al., 2007).

Estressores físicos, fisiológicos e psicológicos induzem alterações tanto nas vias de neurotransmissores, quanto alterações hormonais, que podem influenciar a função imune tanto *in vitro*

quanto *in vivo* (Zorrilla et al., 2001). Alves e colaboradores (2006) também verificaram, através de experimentos, a influência de estressores psicológicos sobre parâmetros imunológicos. O estresse tem sido um dos fatores que contribuem para o desencadeamento do TDM. Com isso, é possível verificar que o estresse ou separação no início da vida estão associados com um aumento de citocinas pró-inflamatórias, na qual conduzem a uma ativação do sistema imune e aumento de prostaglandinas pró-inflamatórias (Song et al., 1998).

O cérebro está constantemente sendo moldado pelos estímulos ambientais. O circuito neural, relacionado com o comportamento social e emocional parece ser fundamentalmente moldado pelas experiências. Estímulos precoces nessa via envolvem domínios diferentes entre os indivíduos, proporcionando vulnerabilidade ou resiliência frente às adversidades (Davidson e McEwen, 2012). A ocorrência de um trauma na infância, como separação materna, por exemplo, pode modular o desenvolvimento de circuitos neurais, resultando em mudanças comportamentais significativas que muitas vezes são permanentes, fortalecendo a ideia de que a origem do TDM pode ocorrer a partir do desenvolvimento. Neste sentido, estudos pré-clínicos demonstram que privação dos cuidados maternos durante os primeiros 10 dias pós-natal induz em ratos comportamento depressivo e alterações cerebrais como diminuição dos níveis de neurotrofinas e aumento dos níveis periféricos de IL-6 e TNF- $\alpha$  na idade adulta (Réus et al., 2011; Réus et al., 2015a). Um estudo pré-clínico realizado por Yirmiya e colaboradores (2011), confirmaram essa hipótese. Foi evidenciado alterações dinâmicas bidirecionais na microglia, frente à exposição ao estresse que por sua vez, produzem comportamento do tipo depressivo induzida por estresse em roedores. Estas células podem modificar suas características e funções de acordo com estímulos ambientais, que de acordo com o contexto poderiam resultar como benéficos ou prejudiciais (Kierdorf e Prinz, 2013; Siskova e Tremblay, 2013). Por exemplo, essas células respondem a experiências sensoriais e comportamentais (privação de estímulos visuais, enriquecimento ambiental), modulando suas interações com os circuitos neuronais (Ekdahl, 2012; Reshef et al., 2014). Ratos expostos ao estresse apresentaram modificações na microglia, principalmente no giro denteado do hipocampo (Muller, 2014). Foi demonstrado que em uma exposição de curto prazo (1-2 dias) houve uma proliferação e ativação da microglia, com aumento da ativação e expressão de marcadores, tais como IL-1/IL-1R (Muller, 2014). No entanto, após 3-4 dias, uma diminuição da microglia foi observada em animais estressados em comparação com controles,

evidenciado pelos elevados níveis de caspase-3 (uma protease que medeia a execução da fase de apoptose) e a fragmentação do DNA (uma característica chave de apoptose). Além disso, os autores descobriram que a exposição crônica ao estresse (5 semanas) leva a um número reduzido de células, diminuição da expressão de marcadores microgliciais como o Iba-1 e CD11b (Muller, 2014). Além disso, houve uma diminuição pela preferência por sacarose e exploração social nos roedores, indicando um comportamento do tipo depressivo (Muller, 2014).

Embora, muitos estudos tenham documentado o papel do sistema imune e do estresse oxidativo no TDM, essa associação ainda não foi investigada em diferentes períodos do desenvolvimento após o estresse no início da vida induzido pela privação dos cuidados maternos. Assim, esse estudo teve como objetivo investigar essas alterações ao longo do desenvolvimento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações comportamentais, parâmetros inflamatórios e parâmetros de estresse oxidativo em diferentes fases do desenvolvimento de ratos Wistar submetidos à privação dos cuidados maternos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS,

- a) Avaliar o comportamento do tipo depressivo através do tempo de imobilidade no teste do nado forçado em diferentes fases do desenvolvimento de ratos Wistar submetidos a privação dos cuidados maternos;
- b) Avaliar a atividade locomotora espontânea através do teste do campo aberto em diferentes fases do desenvolvimento de ratos Wistar submetidos a privação dos cuidados maternos;
- c) Avaliar os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 e da citocina anti-inflamatória IL-10 no córtex frontal (CF), hipocampo e soro de ratos Wistar em diferentes fases do desenvolvimento após a privação dos cuidados maternos;
- d) Avaliar os níveis de carbonilação de proteínas, de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase no CF e hipocampo de ratos Wistar em diferentes fases do desenvolvimento após a privação dos cuidados maternos.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento (SBNeC). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo 058/2016-1.

#### 3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para este estudo, foram obtidas ratas fêmeas Wistar (idade de 3 meses, peso de 250-280 g) da colônia de reprodução da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC, Criciúma, SC, Brasil) e permaneceram durante uma semana na presença de machos para fins de acasalamento. No final de 7 dias, as ratas grávidas foram alojadas individualmente com acesso *ad libitum* a alimento e água. As ratas grávidas foram alojadas individualmente para o nascimento dos filhotes e sua identificação. Todas as mães e filhotes foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e a uma temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### 3.3 PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO MATERNA

No primeiro dia pós-natal as ninhadas foram abatidas a oito filhotes (quatro machos e quatro fêmeas, quando possível). Os filhotes foram privados da mãe durante 3 horas por dia, durante os 10 primeiros dias. A privação consiste em retirar a mãe da caixa e manter os filhotes na caixa original, para ficarem na presença do odor materno. Os animais não privados permaneceram imperturbáveis na gaiola original com sua mãe. As caixas em ambos os grupos só foram trocadas no 11º dia após o período pré-natal. Os ratos foram desmamados apenas no 22º dia após o período pré-natal e apenas os machos foram utilizados para o estudo, as fêmeas foram doadas para outros grupos de pesquisa.

### 3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Após o protocolo de privação materna, diferentes grupos de animais (privados e não-privados) foram submetidos aos testes comportamentais de natação forçada e atividade locomotora e exploratória. Aos 20, 30, 40 e 60 dias após o nascimento (infância, adolescência, adultos jovens e adultos, respectivamente) diferentes grupos de animais foram submetidos aos testes comportamentais (n = 12 privados, n = 12 não-privados para cada fase, com um n total = 96 animais). Após os testes comportamentais os ratos foram mortos e, em seguida, o soro, CF e hipocampo foram retirados para avaliar os níveis de citocinas e parâmetros de estresse oxidativo.

### 3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 3.5.1 Teste do campo aberto

Nos dias 20, 30, 40 e 60 após o nascimento, os ratos foram submetidos ao teste do open field para avaliar possíveis efeitos na atividade locomotora espontânea (n=12 por grupo). Foi realizado em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto foi dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explora livremente o ambiente por 5 minutos. Foram contados pelo avaliador o número de cruzamentos e o número de levantamentos dos animais no período de 5 minutos (Réus et al., 2015).

#### 3.5.2 Teste do nado forçado

Após o teste do campo aberto, os mesmos animais foram submetidos ao teste do nado forçado (n=12 por grupo). Este teste consiste em dois dias de procedimentos no qual cada rato é posto em um cilindro com água a 23° C, a água deve ser suficiente para o animal não conseguir apoiar as patas no fundo. No período de treino, os animais foram forçados a nadar durante 15 minutos. No dia seguinte, (24 horas após o treino) no período de teste, cada animal foi novamente forçado a nadar durante 5 minutos. Foram avaliados os parâmetros de

imobilidade, nos quais incluem imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar, parâmetros de nado, que incluem movimentos horizontais através da superfície da água, e parâmetros de escalada, movimentos verticais contra as paredes (Porsolt et al., 1977).

### 3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

#### 3.6.1 Preparação do tecido e homogenado

Amostras de tecidos do CF, hipocampo foram homogeneizados (1:10, w/v) em tampão SETH, pH 7,4 (250 mM de sacarose, 2 mM de EDTA, 10 mM base Trizma, 50 UI/mL de heparina). Os homogenados foram centrifugados a 800 x g durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram mantidos a -80o C, até serem usados para a determinação da atividade enzimática. O intervalo máximo entre a preparação do homogenado e a análise enzimática foi sempre inferior a cinco dias. O teor de proteína foi determinado pelo método descrito por Lowry et al. (1951). A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

#### 3.6.2 Procedimentos de análise de estresse oxidativo

##### 3.6.2.1 Formação de TBARS

A peroxidação lipídica foi analisada através da formação de TBARS (Esterbauer e Cheeseman 1990). As amostras de tecido cerebral foram lavadas com PBS, colhidas e lisadas. As espécies reativas foram obtidas por hidrólise ácida de 1,1,3,3-tetra-etoxi-propano (TEP) e foram utilizadas como padrão para a quantificação de TBARS. A cada tubo foi adicionado TBA a 0,67% e em seguida foram agitados. A mistura da reação foi incubada a 90oC durante 20 minutos e posteriormente as amostras foram colocadas em gelo. A densidade óptica de cada solução foi medida em um espectrofotômetro a 535 nm. Os dados foram expressos como nmol de equivalente malondialdeído (MDA) por mg de proteína.

### 3.6.2.2 Formação de proteínas carbonil

O dano oxidativo em proteínas teciduais foi determinado pela medida de grupos carbonil. O conteúdo de proteínas carboniladas foi medido nas amostras homogeneizadas de cérebro utilizando 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) em um ensaio espectrofotométrico (Levine et al., 1990). Amostras de tecidos foram sonicadas em homogeneização gelada de tampão contendo inibidores de fosfatase e de protease (200 nM caliculina, 10 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de aprotinina, 1 mM de ortovanadato de sódio e 1 µM microcistina-LR) e centrifugadas a 1000 x g durante 15 minutos para sedimentar o material insolúvel. Trezentos microlitros de alíquotas do sobrenadante contendo 0,7-1,5 mg de proteína foram tratados com 300 µl de 10 mM de DNPH, dissolvido em HCl a 2M, e comparado com 2M de HCl sozinho (reagente branco). Em seguida as amostras foram incubadas no escuro sob agitação a cada 10 minutos, durante uma hora e à temperatura ambiente. As amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético (concentração final de 20%) e centrifugadas a 16,000 x g a 4°C, durante 15 minutos. O sedimento foi lavado por três vezes com 1 ml de etanol/acetato de etil (1:1 v/v). Os sedimentos foram seguidamente levemente agitados em vórtice e após, expostos à solução de lavagem durante 10 minutos antes da centrifugação (16,000 x g, durante 5 minutos). O sedimento final foi dissolvido em 1 ml de guanidina 6M e 10 mM de tampão fosfato trifluoroacético ácido, pH 2,3. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 16,000 x g, por 5 minutos. Absorbância foi registrada em um espectrofotômetro a 370 nm, tanto para as amostras tratadas com DNPH, quanto para o HCl sem DNPH. Os níveis de proteínas carboniladas foram expressos como nmol de carbonil por mg de proteína.

### 3.6.2.3 Atividade da enzima SOD

A estimativa da SOD foi realizada com base em sua capacidade para inibir espontaneamente a oxidação da adrenalina para adrenocromo (Bannister e Calabrese, 1987). Uma combinação de 2,78 ml de tampão carbonato de sódio (0,05 mM; pH 10,2), 100 µl de EDTA (1,0 mM), e 20 µl do sobrenadante ou sacarose (branco) foi incubada a 30°C, durante 45 minutos. Em seguida, a reação foi iniciada após adição de 100 µl de solução de adrenalina (9,0 mM). A variação na absorbância foi registrada a 480 nm, durante 8 minutos. Durante todo o procedimento do ensaio, a temperatura foi mantida a 30°C. Uma

unidade de SOD produziu aproximadamente 50% de auto-oxidação de adrenalina. Os resultados foram expressos em unidades/mg de proteína.

#### 3.6.2.4 Atividade da enzima CAT

A atividade da CAT foi medida através do método que utiliza o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para gerar H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (Aebi 1984). As amostras de tecido cerebral foram sonicadas em 50 mmol/l de tampão fosfato (pH 7,0). A suspensão resultante foi centrifugada a 3000 x g, durante 10 min. A alíquota de amostra (20 µl) foi adicionada a 980 µl da mistura de substrato. A mistura de substrato continha 0,3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 50 ml de tampão fosfato a 0,05 M (pH 7,0). As absorbâncias inicial e final foram registradas a 240 nm, após 1 e 6 minutos, respectivamente. Uma curva padrão foi estabelecida, utilizando-se catalase purificada (Sigma, MO, EUA) nas mesmas condições.

### 3.6.2 Análises de citocinas

Os níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF $\alpha$  (n = 5 por grupo) no córtex pré-forental, hipocampo e soro foram analisados por imunoenensaio (ELISA Sanduíche) através dos kits da Chemicon International e R&D Systems.

## 3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados pelo teste T de Student para dados não pareados e foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Valores  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram realizadas utilizando o software Statistical Package for the Social Science (SPSS) versão 21.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA SOBRE O COMPORTAMENTO EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO

A figura 1 ilustra os efeitos da privação materna sobre o comportamento depressivo no teste de natação forçada. Aos 20 dias após o nascimento o tempo de imobilidade e de escalada não se alterou nos ratos privados ( $F = 0,387$ ;  $p = 0,790$  e  $F = 11,569$ ;  $p = 0,155$ , respectivamente, Fig. 1A). No entanto, nos ratos privados observou-se uma diminuição no tempo de natação, em comparação com o grupo não-privado ( $F = 11,569$ ;  $p = 0,049$ , Fig. 1A). Aos 30 dias após o nascimento, não foi encontrada alteração no teste do nado forçado para os parâmetros analisados, tempo de imobilidade ( $F = 0,346$ ;  $p = 0,671$ , Fig. 1B), tempo de natação ( $F = 0,13$ ;  $p = 0,735$ , Fig. 1B) e tempo de escalada ( $F = 0,898$ ;  $p = 0,698$ , Fig. 1B). Além disso, aos 40 dias após o nascimento, também não foi encontrada diferença estatística para o tempo de imobilidade ( $F = 2,472$ ;  $p = 0,412$ , Figura 1C), natação ( $F = 2,382$ ;  $p = 0,368$ , Fig. 1C) e escalada ( $F = 0,112$ ;  $p = 0,917$ , Fig. 2C). Curiosamente, nos ratos adultos privados com 60 dias, houve um aumento no tempo de imobilidade ( $F = 7,541$ ;  $p = 0,003$ , Fig. 1D) e uma diminuição no tempo de escalada ( $F = 1,206$ ;  $p = 0,025$ ; 1D), indicando um comportamento do tipo depressivo. No tempo de natação, não houve diferença estatística para os animais com 60 dias após o nascimento ( $F = 0,17$ ;  $p = 0,182$ , Fig. 1D).

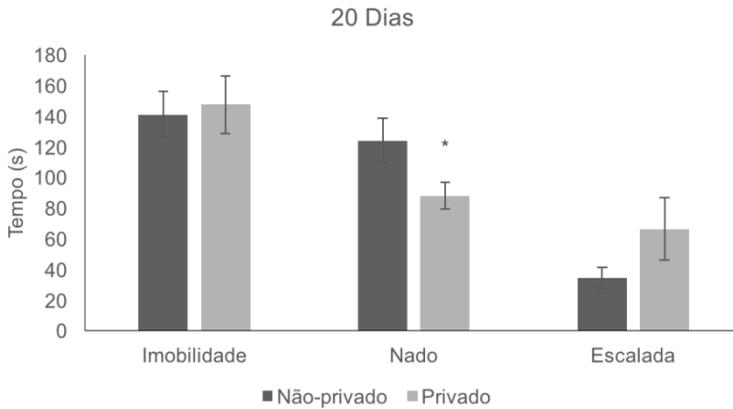


Figura 1A: Efeitos da privação materna sobre o tempo de imobilidade, escalada e natação em ratos com 20 dias após o nascimento submetidos ao teste de natação forçada. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

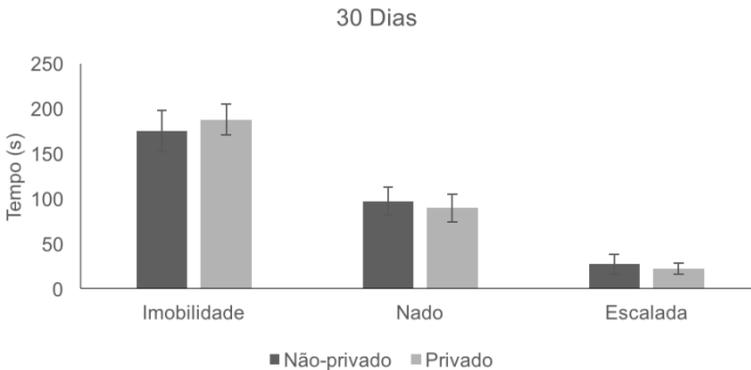


Figura 1B: Efeitos da privação materna sobre o tempo de imobilidade, escalada e natação em ratos com 30 dias após o nascimento submetidos ao teste de natação forçada. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

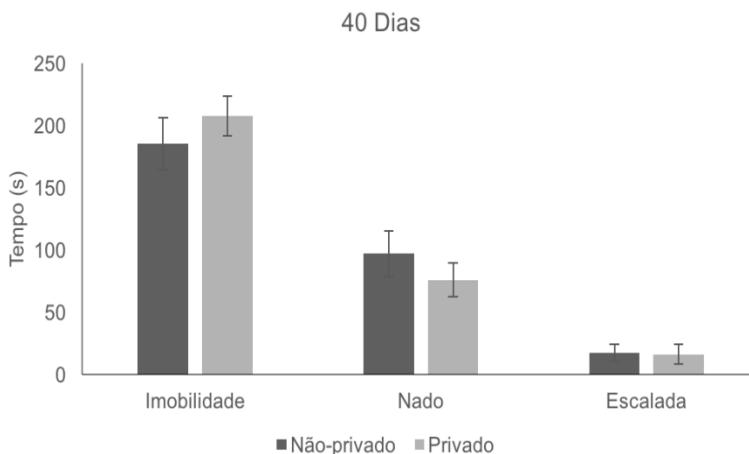


Figura 1C: Efeitos da privação materna sobre o tempo de imobilidade, escalada e natação em ratos com 40 dias após o nascimento submetidos ao teste de natação forçada. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

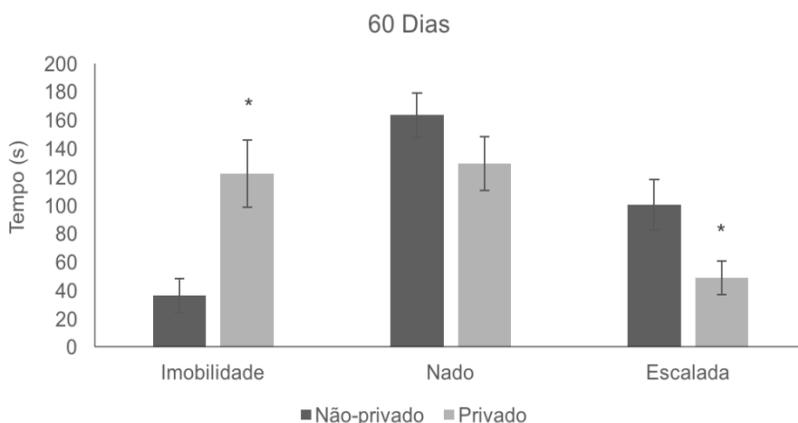


Figura 1D: Efeitos da privação materna sobre o tempo de imobilidade, escalada e natação em ratos com 60 dias após o nascimento submetidos ao teste de natação forçada. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

Os resultados da atividade locomotora espontânea estão representados na Figura 2. Não houve alteração estatística para os animais com 20 dias após o nascimento quanto ao número de crossings ( $F = 0,232$ ;  $p = 0,464$ , Fig. 2A) e rearings ( $F = 0,853$ ;  $p = 0,142$ , Fig. 2A). O número de crossings não foi alterado nos animais com 30 dias após o nascimento ( $F = 1,037$ ;  $p = 0,141$ , Fig. 2B), porém houve um aumento no número de rearings ( $F = 0,533$ ;  $p = 0,015$ , Figura 2B) nos ratos privados em comparação com os não-privados. Não houve diferença estatística tanto no número de crossings quanto rearings para os animais com 40 dias ( $F = 0,341$ ;  $p = 0,541$  e  $F = 1,110$ ;  $p = 0,348$ , Fig. 2C, respectivamente) e 60 dias após o nascimento ( $F = 0,000$ ;  $p = 0,271$ ; e  $F = 1,877$ ;  $p = 0,233$ , Fig. 2D).

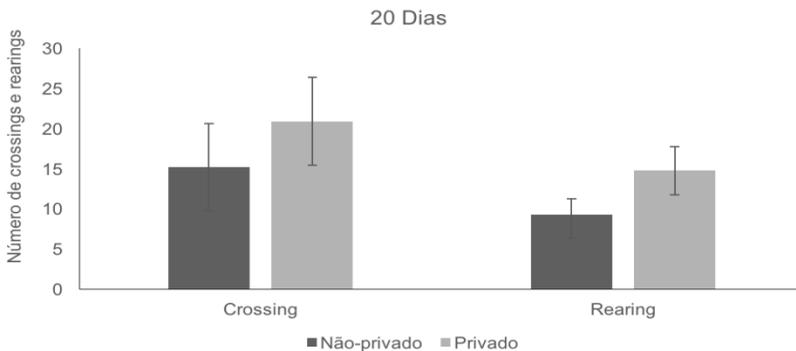


Figura 2A: Efeitos da privação materna sobre o número de crossings e rearings no teste do campo aberto em animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $N = 12$ ). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

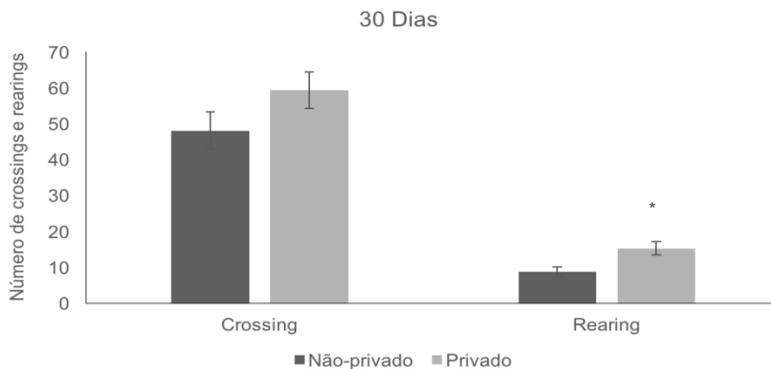


Figura 2B: Efeitos da privação materna sobre o número de crossings e rearings no teste do campo aberto em animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

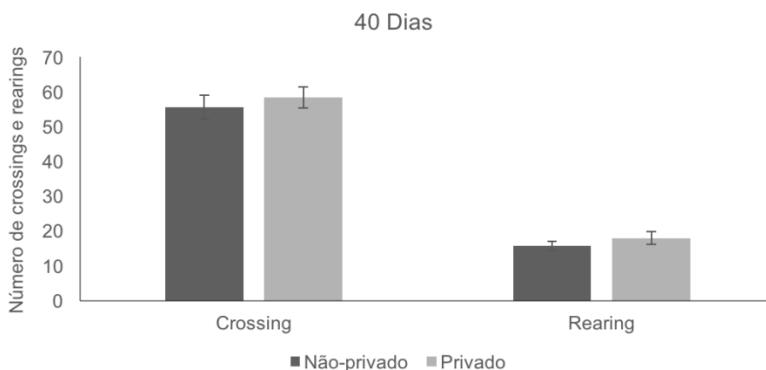


Figura 2C: Efeitos da privação materna sobre o número de crossings e rearings no teste do campo aberto em animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

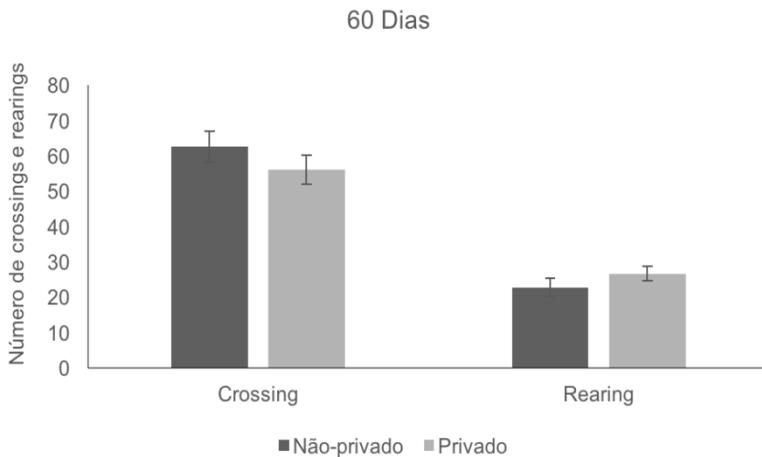


Figura 2D: Efeitos da privação materna sobre o número de crossings e rearings no teste do campo aberto em animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 12). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

#### 4.2 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA SOBRE OS NÍVEIS DE CITOCINAS NO CF, HIPOCAMPO E SORO EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO

Na figura 3 estão representados os resultados para os níveis de IL-1 $\beta$  no CF, hipocampo e soro. Nos ratos privados com 20 dias houve uma diminuição nos níveis de IL-1 $\beta$  no CF ( $F = 4,421$ ;  $p = 0,016$ , Fig. 3A) e um aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo ( $F = 0,778$ ;  $p = 0,049$ , Fig. 3A) em comparação com os ratos não-privados. Porém, no soro não houve diferença estatística ( $F = 23,750$ ;  $p = 0,049$ , Fig. 3A). Nos animais privados com 30 dias após o nascimento, houve um aumento nos níveis da IL-1 $\beta$  no CF ( $F = 5,614$ ;  $p = 0,004$ , Fig. 3B), no hipocampo ( $F = 7,053$ ;  $p = 0,036$ , Figura 3B) e no soro ( $F = 3,931$ ;  $p = 0,014$ , Fig. 3B) em comparação com os animais não-privados. Por outro lado, nos animais com 40 dias após o nascimento, os níveis da IL-1 $\beta$  não foram alterados no CF ( $F = 3,411$ ;  $p = 0,520$ , Fig. 3C), no hipocampo ( $F = 0,895$ ;  $p = 0,126$ , Fig. 3C) e no soro ( $F = 0,001$ ;  $p = 0,344$ , Fig. 3C). Já nos animais com 60 dias após o nascimento, houve uma diminuição dos níveis da IL-1 $\beta$  no hipocampo ( $F = 1,284$ ;  $p = 0,015$ , Fig. 3D), e um aumento no soro ( $F = 4,459$ ;  $p = 0,008$ , Fig. 3D)

em comparação com os animais não-privados. No CF os níveis da IL-1 $\beta$  não foram alterados nos animais com 60 dias após o nascimento ( $F = 3.857$ ;  $p = 0.015$ , Fig. 3D).

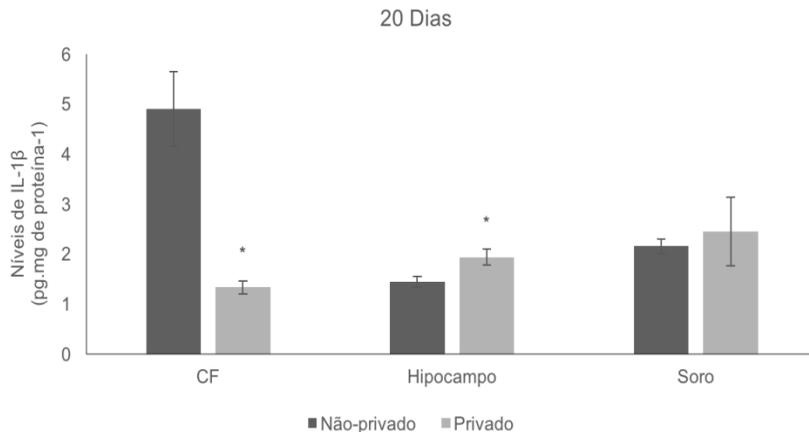


Figura 3A: Efeitos da privação materna nos níveis de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $N = 5$ ). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

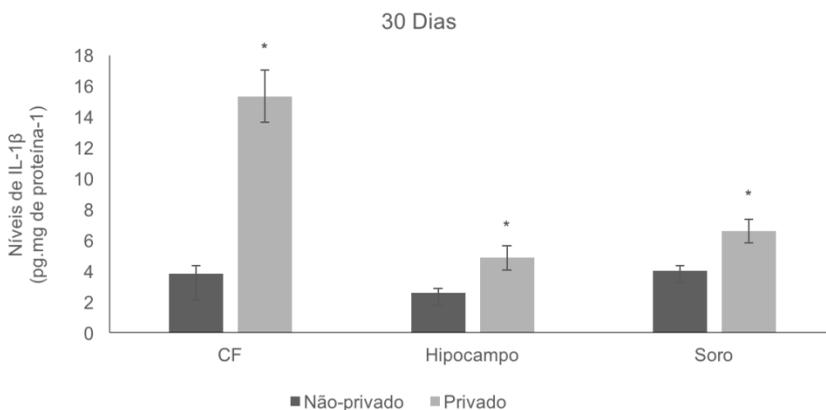


Figura 3B: Efeitos da privação materna nos níveis de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $N = 5$ ). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

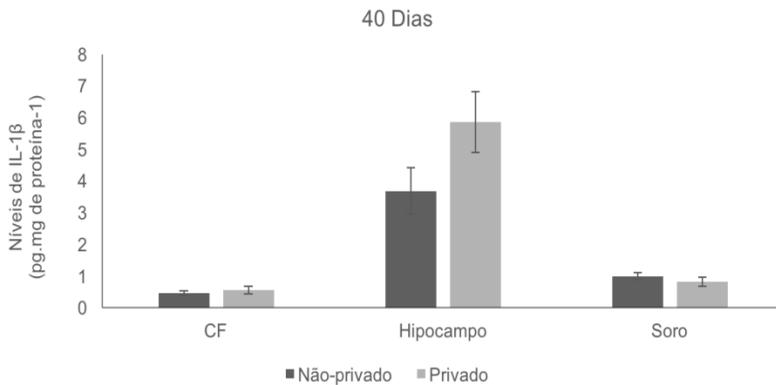


Figura 3C: Efeitos da privação materna nos níveis de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

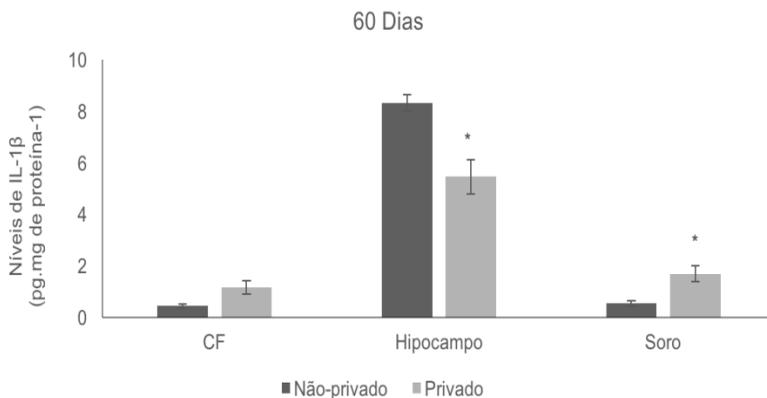


Figura 3D: Efeitos da privação materna nos níveis de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

Os níveis de TNF- $\alpha$  estão ilustrados na figura 4. Nos animais privados com 20 dias após o nascimento houve um aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  no CF ( $F = 1,115$ ;  $p = 0,002$ , Fig. 4A), hipocampo ( $F = 1,647$ ;  $p = 0,010$ , Fig. 4A) e soro ( $F = 0,662$ ;  $p = 0,004$ , Fig. 4A) em comparação com os ratos não-privados. Os níveis de TNF- $\alpha$  foram aumentados nos ratos com 30 dias após o nascimento no CF ( $F = 5,557$ ;  $p = 0,026$ , Figura 4B) e no hipocampo ( $F = 3,451$ ;  $p = 0,031$ , Figura 4B)

em comparação com os ratos não-privados, porém não foram alterados no soro ( $F = 1,246$ ;  $p = 0,252$ , Fig. 4B). Nos animais privados com 40 dias após o nascimento houve também um aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  no CF ( $F = 6,306$ ;  $p = 0,001$ , Fig 4C), no hipocampo ( $F = 9,578$ ;  $p = 0,018$ , Fig. 4C) e no soro ( $F = 13,179$ ;  $p = 0,048$ , Fig. 4C) em comparação com os ratos não-privados. No CF ( $F = 4,535$ ;  $p = 0,165$ , Fig. 4D) e no hipocampo ( $F = 11,449$ ;  $p = 0,156$ , Fig. 4D) não houve diferença estatística nos níveis de TNF- $\alpha$  para os animais com 60 dias após o nascimento.

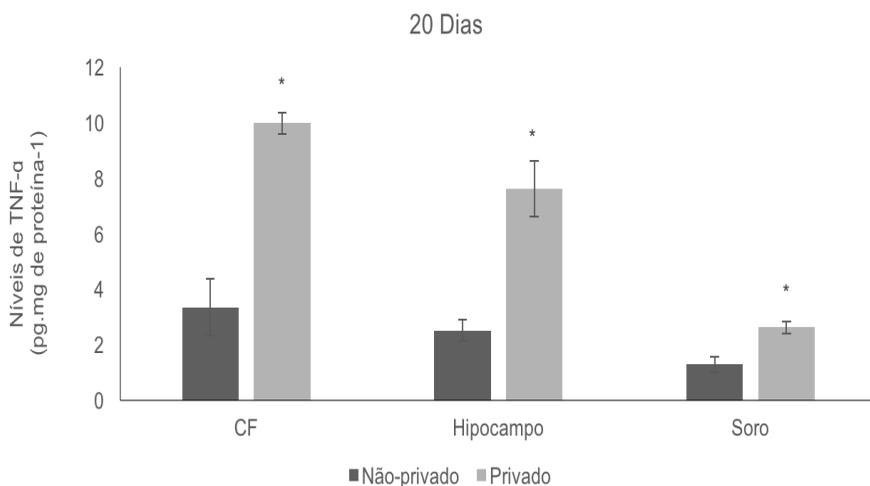


Figura 4A: Efeitos da privação materna nos níveis do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $N = 5$ ). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

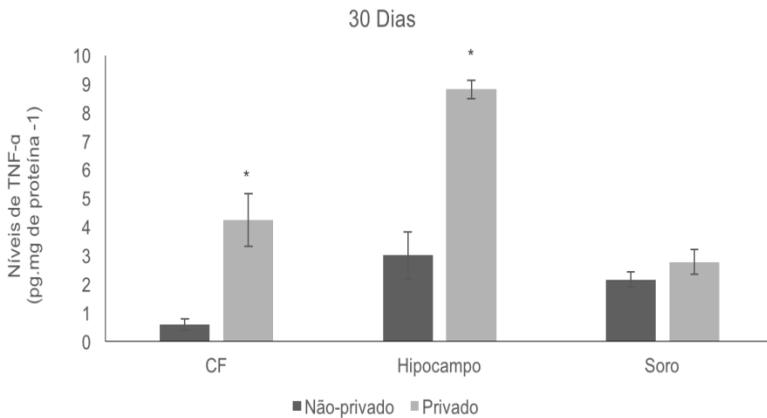


Figura 4B: Efeitos da privação materna nos níveis do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

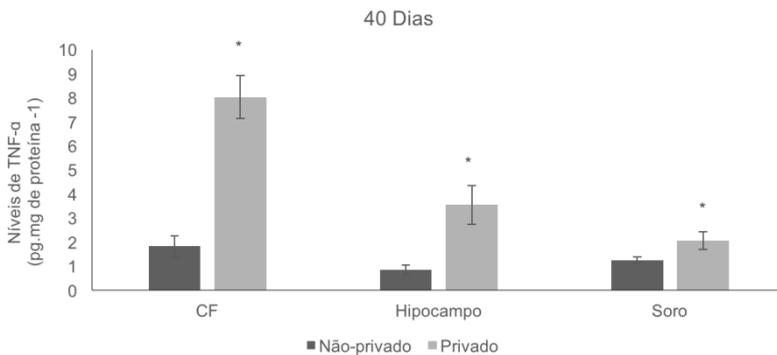


Figura 4C: Efeitos da privação materna nos níveis do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

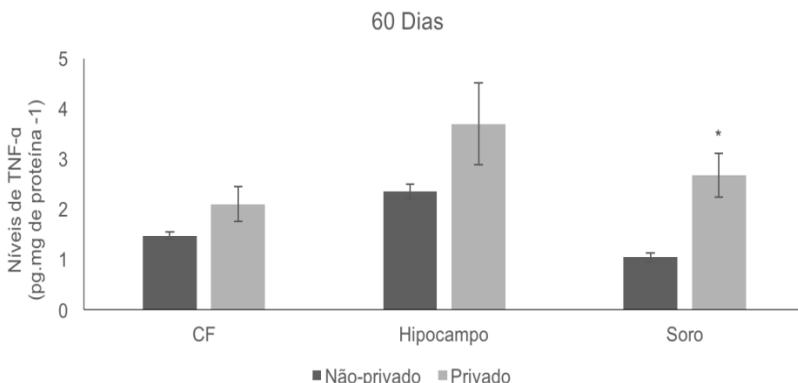


Figura 4D: Efeitos da privação materna nos níveis do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

Nos animais com 20 dias após o nascimento foi encontrado uma diminuição nos níveis de IL-6 no hipocampo ( $F = 8,330$ ;  $p = 0,004$ , Figura 5A), e nenhuma alteração foi encontrada no CF ( $F = 26,619$ ;  $p = 0,051$ ; Fig. 5A) e soro ( $F = 1,564$ ;  $p = 0,225$ , Fig. 6A). Nos animais privados com 30 dias após o nascimento, os níveis de IL-6 no CF não se alteraram ( $F = 2,800$ ;  $p = 0,063$ , Fig. 5B), porém no hipocampo, os níveis de IL-6 aumentaram ( $F = 3,673$ ;  $p = 0,023$ , Figura 5B) e diminuíram no soro ( $F = 14,605$ ;  $p = 0,002$ , Figura 6B) em comparação com os ratos não-privados. Os níveis de IL-6 foram elevados nos animais privados com 40 dias após o nascimento no CF ( $F = 0,626$ ;  $p = 0,001$ , Fig. 5C), no hipocampo ( $F = 0,25$ ;  $p = 0,002$ , Fig. 5C) e no soro ( $F = 0,738$ ;  $p < 0,001$ , Fig. 5C) em comparação com os animais não-privados. Já nos animais com 60 dias após o nascimento os níveis de IL-6 não foram alterados no soro ( $F = 0,230$ ;  $p = 0,208$ , Fig. 5D), mas foram aumentados no CF ( $F = 10,862$ ;  $p = 0,030$ , Fig. 5D) e no hipocampo ( $F = 24,483$ ;  $p = 0,006$ , Fig. 5D) em comparação com os animais não-privados.

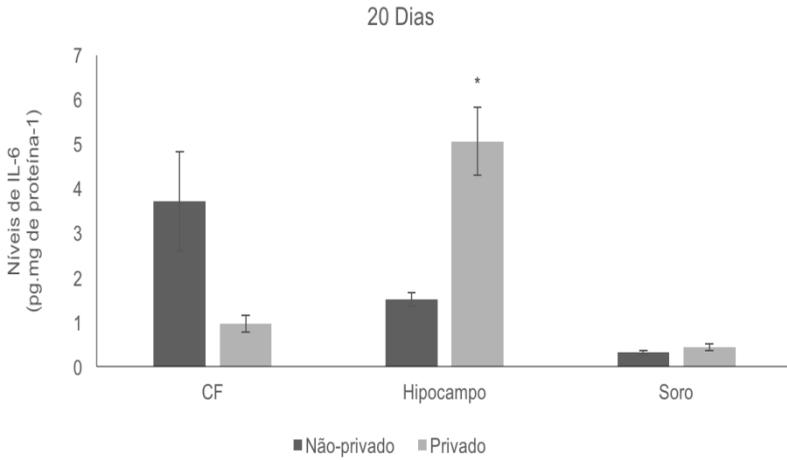


Figura 5A: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 6 (IL-6) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

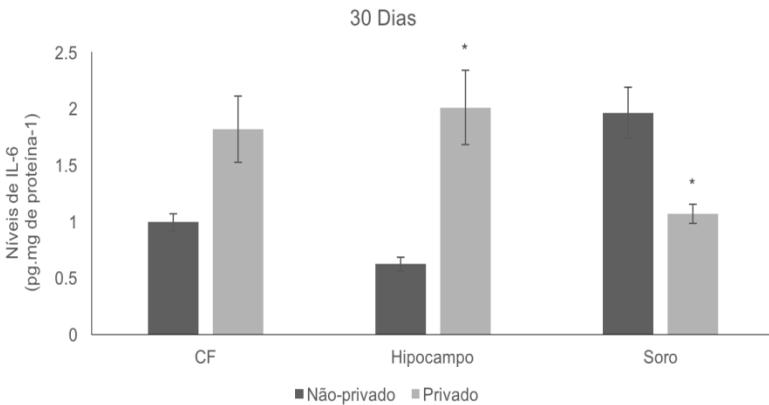


Figura 5B: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 6 (IL-6) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

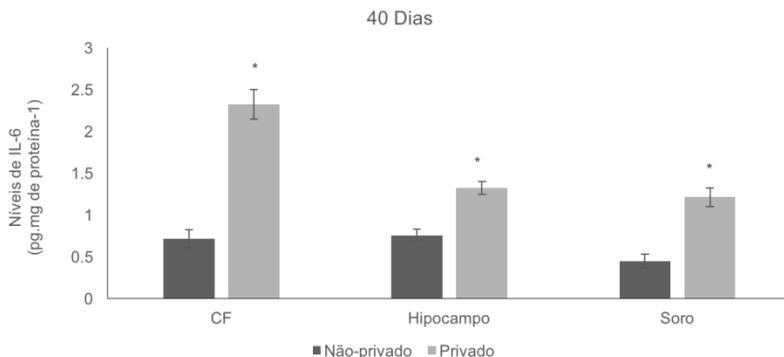


Figura 5C: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 6 (IL-6) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

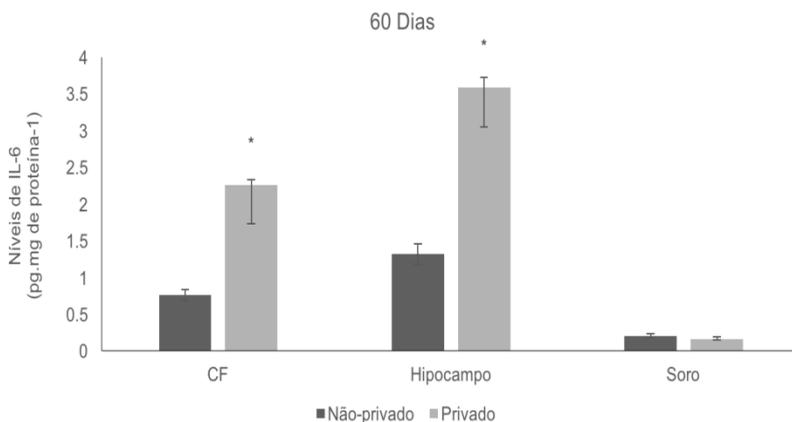


Figura 5D: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 6 (IL-6) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

Os níveis de IL-10 foram diminuídos nos animais privados com 20 dias após o nascimento no CF ( $F = 5,997$ ;  $p = 0,001$ , Figura 6A), no hipocampo ( $F = 8,728$ ;  $p = 0,001$ , Figura 6A) e no soro ( $F = 0,617$ ;  $p = 0,001$ , Fig. 6A) em comparação com os ratos não-privados. Nos ratos com 30 dias após o nascimento, os níveis de IL-10 também foram diminuídos no CF ( $F = 187.745$ ;  $p = 0.050$ , Fig. 6B), no hipocampo ( $F =$

1.947;  $p = 0.025$ , Fig. 6B) e no soro ( $F = 30.175$ ;  $p < 0,001$ , Fig. 6B). Nos animais com 40 e 60 dias após o nascimento, os níveis de IL-10 não se alteram no CF ( $F = 3.269$ ;  $p = 0.407$ , Fig. 6C e  $F = 2.983$ ;  $p = 0.778$ , Fig. 6D, respectivamente). Contudo, no hipocampo foi observado uma diminuição para os níveis de IL-10 para os animais privados com 40 dias ( $F = 17,539$ ;  $p = 0,001$ , Figura 6C) e 60 dias após o nascimento ( $F = 1,601$ ;  $p = 0,034$ , Figura 7D), assim como no soro para os animais com 40 ( $F = 0,000$ ;  $p = 0,001$ , Figura 6C) e 60 dias após o nascimento ( $F = 16,007$ ;  $p = 0,010$ , Fig. 6D) em comparação com os animais não-privados.

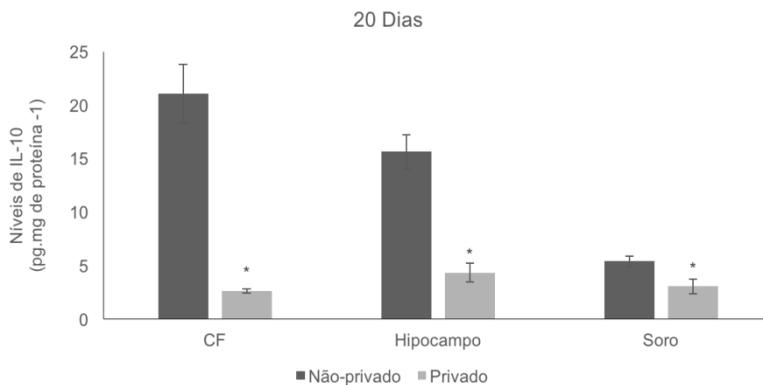


Figura 6A: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 10 (IL-10) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $N = 5$ ). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

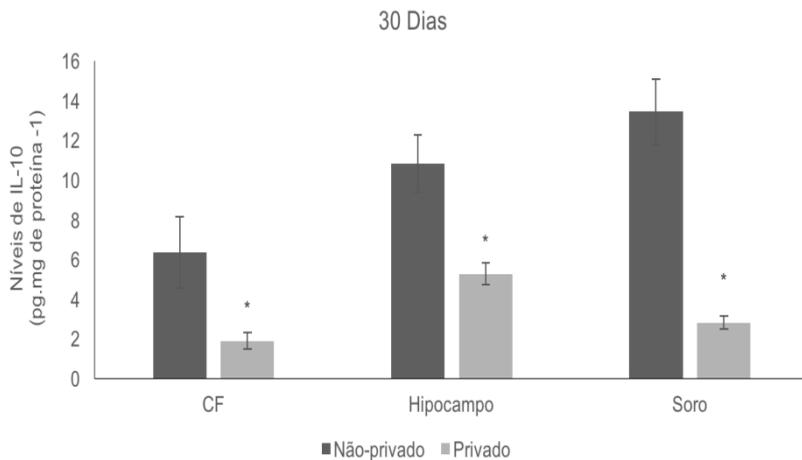


Figura 6B: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 10 (IL-10) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

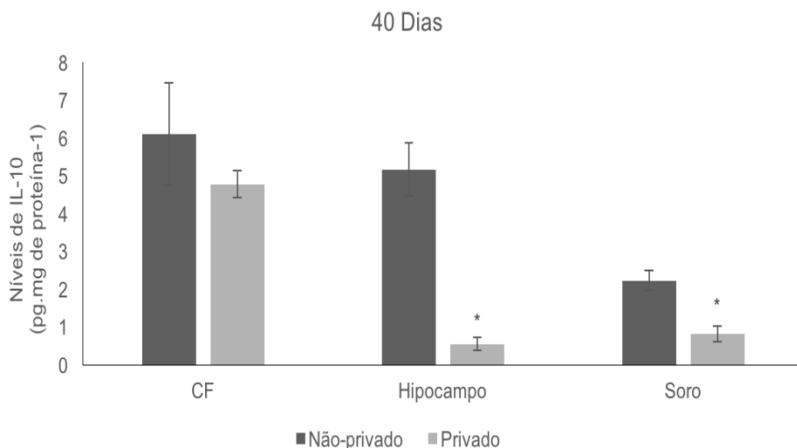


Figura 6C: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 10 (IL-10) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

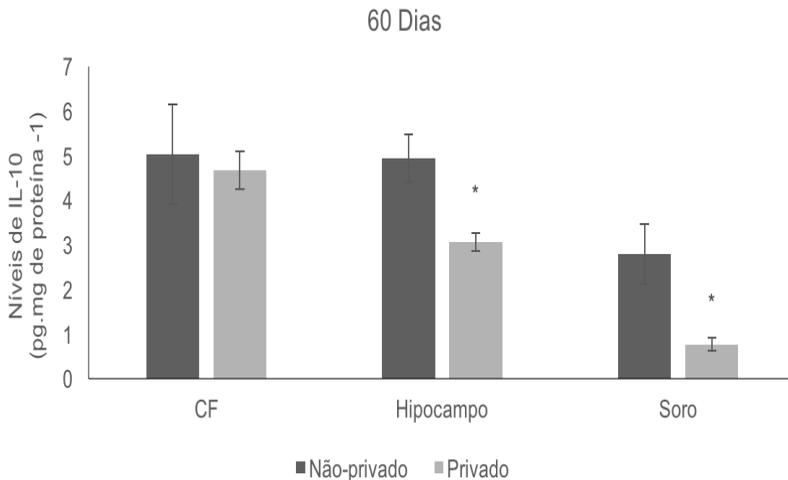


Figura 6D: Efeitos da privação materna nos níveis da interleucina 10 (IL-10) no córtex frontal (CF), hipocampo e soro nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

#### 4.3 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO CF E HIPOCAMPO EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO

Os níveis de MDA, que é um marcador para o dano lipídico, não foram alterados para os animais privados com 20 dias após o nascimento no CF ( $F = 1,890$ ;  $p = 0,408$ , Fig. 7A) e hipocampo ( $F = 0,179$ ;  $p = 0,843$ , Figura 7A), para os animais com 30 dias após o nascimento no CF ( $F = 0,001$ ;  $p = 0,601$ , Figura 7B) e hipocampo ( $F = 0,27$ ;  $p = 0,295$ , Figura 7B), e também para os animais com 40 dias após o nascimento no CF ( $F = 0,546$ ;  $p = 0,205$  Figura 7C) e hipocampo ( $F = 0,949$ ;  $p = 0,067$ , Figura 7C) e por fim nos animais com 60 dias após o nascimento no CF ( $F = 1,745$ ;  $p = 0,140$ , Figura 7D) e hipocampo ( $F = 1,831$ ;  $p = 0,889$ , Fig. 7D).

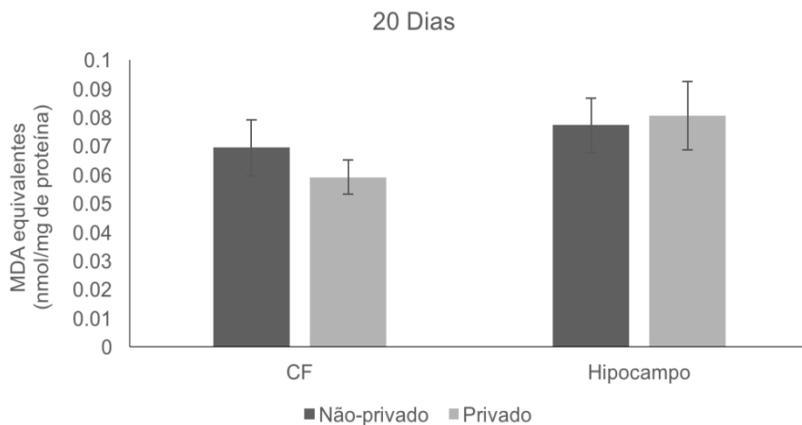


Figura 7A: Efeitos da privação materna nos níveis de malondealdeído (MDA) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

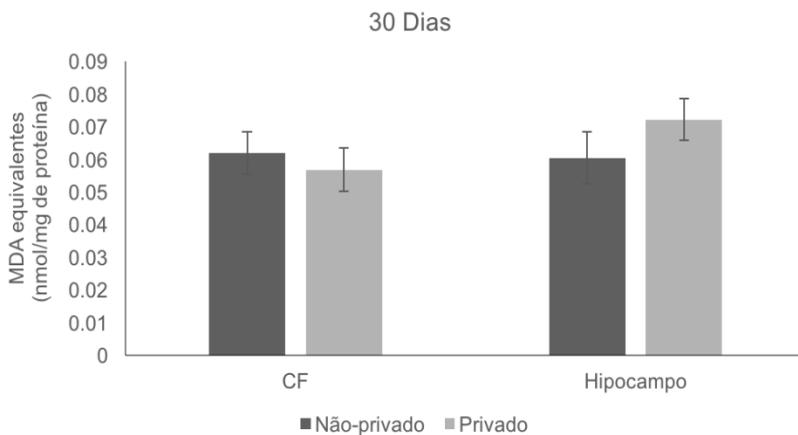


Figura 7B: Efeitos da privação materna nos níveis de malondealdeído (MDA) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

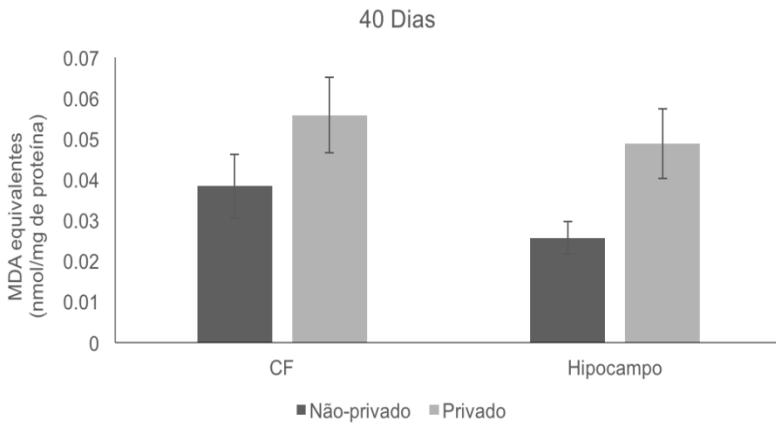


Figura 7C: Efeitos da privação materna nos níveis de malondealdeído (MDA) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

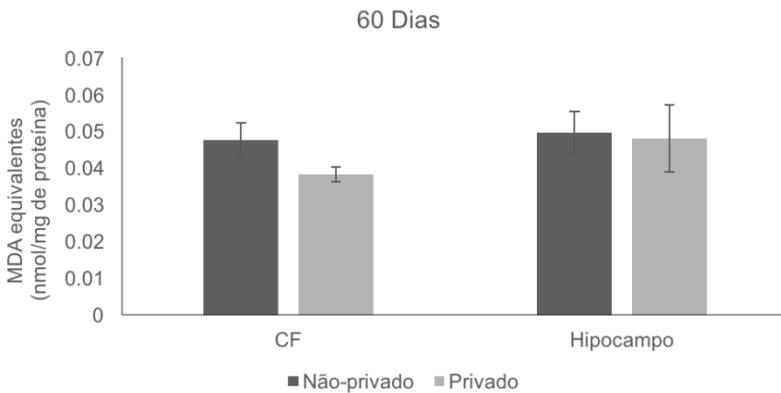


Figura 7D: Efeitos da privação materna nos níveis de malondealdeído (MDA) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

A Figura 8 demonstra os resultados relacionados a carbonilação de proteínas no CF e no hipocampo. Nos animais com 20 dias após o nascimento, os níveis da carbonilação de proteínas não foram alterados

no CF ( $F = 0,428$ ;  $p = 0,254$ , Fig. 8A) e no hipocampo ( $F = 4,601$ ;  $p = 0,905$ , Fig. 8A). Por outro lado, nos animais privados com 30 dias após o nascimento, houve um aumento na carbonilação de proteínas no CF ( $F = 6,133$ ;  $p = 0,008$ , Figura 8B) e no hipocampo ( $F = 2,007$ ;  $p = 0,008$ , Fig. 8B) em comparação com os animais não-privados. Nos animais privados com 40 dias após o nascimento, houve um aumento na carbonilação de proteínas no hipocampo ( $F = 36,193$ ;  $p = 0,021$ , Fig. 9C) em comparação com os ratos não-privados, e se manteve inalterada no CF ( $F = 8,404$ ;  $p = 0,673$ , Fig. 8C). Já nos animais privados com 60 dias após o nascimento, os níveis da carbonilação de proteínas foram aumentados tanto no CF ( $F = 9,231$ ;  $p = 0,003$ , Fig. 8D) quanto no hipocampo ( $F = 7,397$ ;  $p < 0,001$ , Fig. 8D) em comparação com os ratos não-privados.

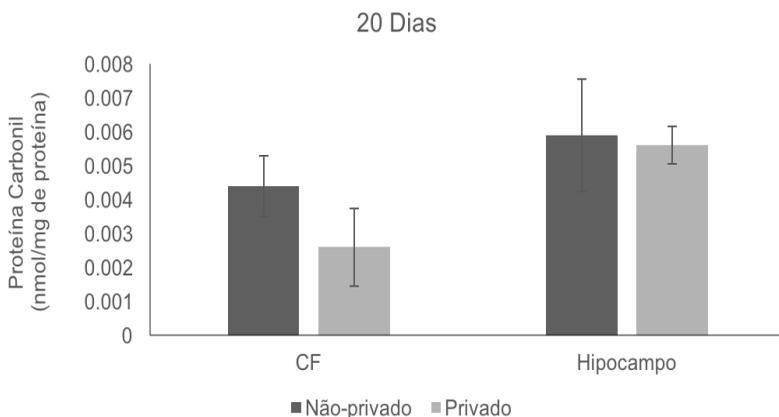


Figura 8A: Efeitos da privação materna nos níveis da carbonilação de proteínas no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $N = 5$ ). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

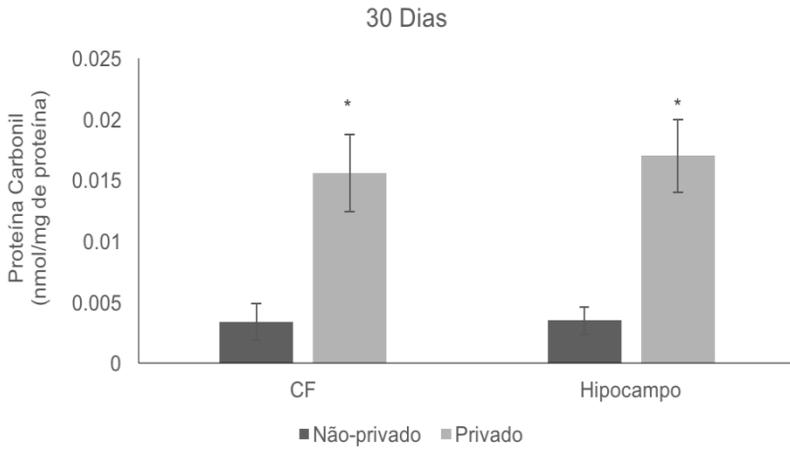


Figura 8B: Efeitos da privação materna nos níveis da carbonilação de proteínas no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

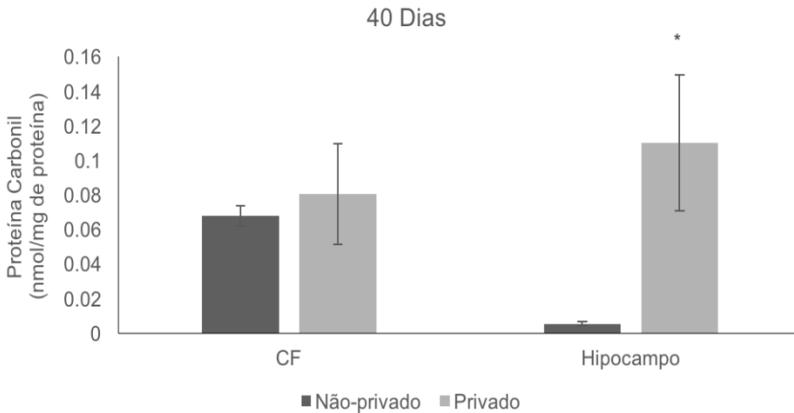


Figura 8C: Efeitos da privação materna nos níveis da carbonilação de proteínas no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

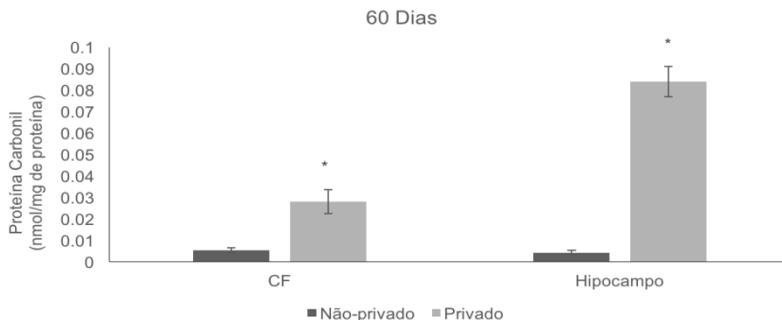


Figura 8D: Efeitos da privação materna nos níveis da carbonilação de proteínas no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

A atividade de SOD foi diminuída em todas as fases do desenvolvimento de ratos privados dos cuidados maternos. A privação materna levou a uma diminuição da atividade da enzima SOD nos animais privados com 20 dias após o nascimento no CF ( $F = 0,34$ ;  $p < 0,001$ , Fig. 9A) e no hipocampo ( $F = 8,180$ ;  $p < 0,001$ , Fig. 9A); nos animais com 30 dias após o nascimento no CF ( $F = 2,393$ ;  $p = 0,015$ , Fig. 9B) e no hipocampo ( $F = 7,076$ ;  $p < 0,001$ , Fig. 9B); nos animais com 40 dias após o nascimento no CF ( $F = 0,074$ ;  $p < 0,001$ , Fig. 9C) e no hipocampo ( $F = 3,678$ ;  $p < 0,001$ , Fig. 9C), e por fim, nos animais com 60 dias após o nascimento no CF ( $F = 0,819$ ;  $p < 0,001$ , Fig. 9D) e no hipocampo ( $F = 3,241$ ;  $p < 0,001$ , Fig. 9D) em comparação com os animais não-privados.

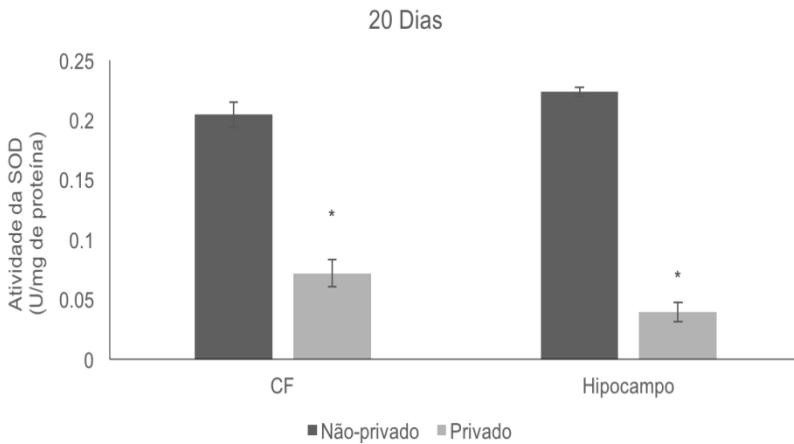


Figura 9A: Efeitos da privação materna sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

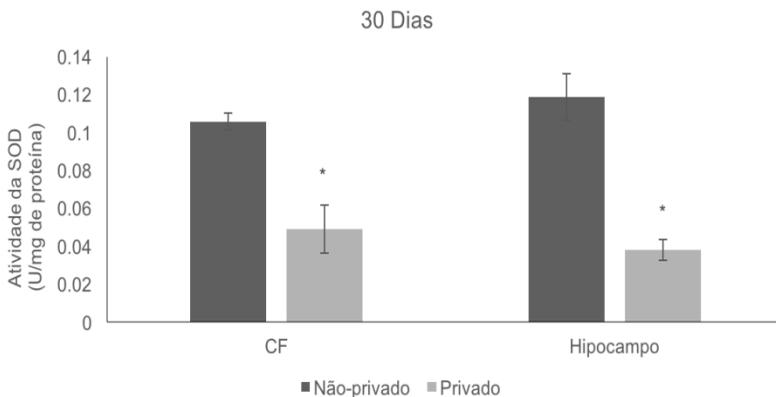


Figura 9B: Efeitos da privação materna sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

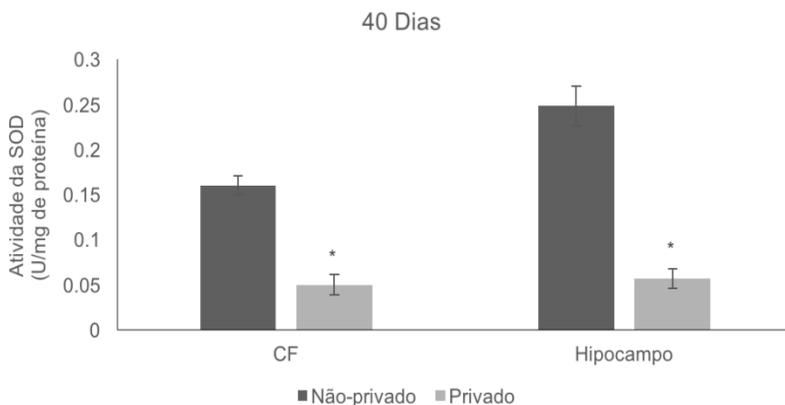


Figura 9C: Efeitos da privação materna sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

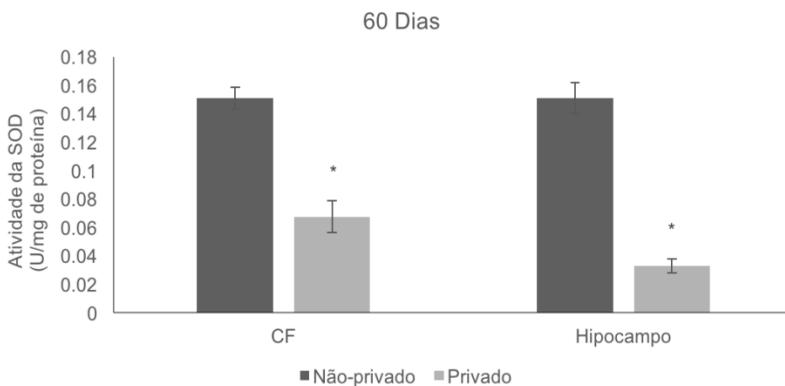


Figura 9D: Efeitos da privação materna sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

A privação materna induziu a uma diminuição da atividade da CAT nos animais privados com 20 dias após o nascimento no CF ( $F = 21,157$ ;  $p = 0,087$ , Fig. 10A) e no hipocampo ( $F = 11,746$ ;  $p = 0,001$ , Fig. 10A) em comparação com os animais não-privados. Nos animais com 30 dias após o nascimento a atividade da CAT foi diminuída no CF

( $F = 21,959$ ;  $p = 0,065$ , Figura 10B) em comparação com os ratos não-privados, e se manteve inalterada no hipocampo ( $F = 5,728$ ;  $p = 0,692$ , Fig. 10B). Nos animais com 40 dias após o nascimento, a atividade da CAT foi diminuída no CF ( $F = 4,911$ ;  $p = 0,001$ , Fig. 10C) e aumentada no hipocampo ( $F = 2,137$ ;  $p = 0,006$ , 10C) em comparação com os animais não-privados. Já nos animais privados com 60 dias após o nascimento a atividade da CAT foi diminuída no CF ( $F = 10,457$ ;  $p = 0,006$ , Fig. 10D) em comparação com os animais não-privados, porém no hipocampo a atividade da CAT se manteve inalterada ( $F = 0,785$ ;  $p = 0,666$ , Fig. 10D).

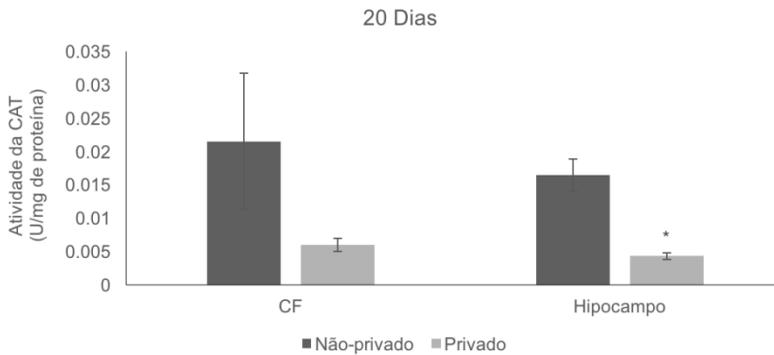


Figura 10A: Efeitos da privação materna sobre a atividade da catalase (CAT) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 20 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $N = 5$ ). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

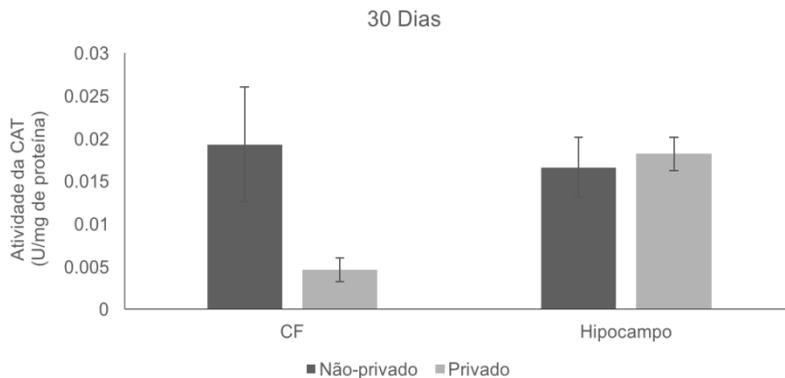


Figura 10B: Efeitos da privação materna sobre a atividade da catalase (CAT) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 30 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

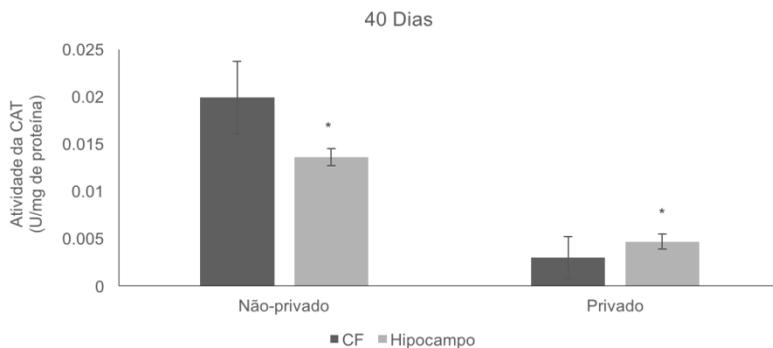


Figura 10C: Efeitos da privação materna sobre a atividade da catalase (CAT) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 40 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (N = 5). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

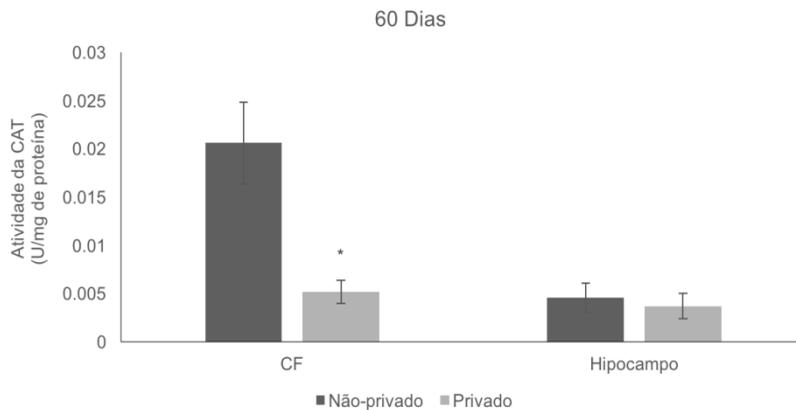


Figura 10D: Efeitos da privação materna sobre a atividade da catalase (CAT) no córtex frontal (CF) e hipocampo nos animais com 60 dias após o nascimento. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $N = 5$ ). Diferente de não-privado; \*  $p < 0,05$ , de acordo com o teste t de Student.

## 5 DISCUSSÃO

O estresse pré-natal, como a privação materna, principalmente durante períodos sensíveis no início da vida, pode levar à alterações no desenvolvimento cerebral e contribuir para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, incluindo a ansiedade e o TDM. Evidências mostram que as alterações imunes podem afetar o cérebro e levar a alterações comportamentais associadas com a vulnerabilidade ou a resiliência ao estresse (Ménard et al., 2016). O presente estudo mostrou que ratos submetidos à privação dos cuidados maternos não apresentaram alterações comportamentais aos 30 e 40 dias após o nascimento. Aos 20 dias após o nascimento (fase da infância) foi demonstrado uma diminuição no tempo de natação no teste do nado forçado nos animais privados. Aos 30 dias após o nascimento (período da adolescência) foi observado um aumento no número de rearings, mostrando uma alteração na atividade locomotora espontânea. Aos 60 dias após o nascimento (idade adulta), os ratos privados maternalmente apresentaram um comportamento depressivo no teste do nado forçado, evidenciado por um aumento no tempo de imobilidade e uma diminuição no tempo de escalada. Estes resultados sugerem que os eventos adversos ocorridos durante o período pós-natal podem alterar o curso normal do desenvolvimento, resultando em alterações nos animais adultos. Estudos anteriores também mostraram que a privação materna induziu a um aumento no tempo de imobilidade, uma diminuição no tempo de escalada e nenhuma alteração no tempo de natação nos animais com 60 dias após o nascimento (Réus et al., 2011). Em concordância, outros estudos também associaram a privação materna ao comportamento depressivo na idade adulta (Réus et al., 2013a, b) e a déficits cognitivos (Valvassori et al., 2014).

Embora as alterações comportamentais induzidas pela privação materna, tenham ocorrido somente na idade adulta, o presente estudo mostrou um estado inflamatório e oxidativo em diferentes fases do desenvolvimento. De fato, um aumento nas citocinas pró-inflamatórias e uma diminuição nas citocinas anti-inflamatórias foram encontrados tanto na periferia como no cérebro dos animais com 20, 30, 40 e 60 dias após o nascimento. Além disso, foi observado um aumento de dano em proteínas e uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes durante o desenvolvimento. Sabe-se que a neuroinflamação, em nível normal, é uma resposta do sistema imune inato do sistema nervoso central contra danos e patógenos (Song et al., 2017). Por outro lado, a neuroinflamação não controlada, pode levar a um comprometimento

importante das células residentes no cérebro (Choi et al., 2009; Abo-Ouf et al., 2013). Com isso, em resposta a inflamação, o organismo libera citocinas (Allan e Rothwell, 2001). As citocinas, no SNC, também são recrutadas sob condições fisiológicas, desempenhando um papel importante na neurogênese, plasticidade sináptica, memória e aprendizagem (Levin e Godukhin, 2017).

Alguns estudos tem descrito o TDM como uma doença inflamatória. Em modelo animal, foi relatado que a IL-1 induziu “comportamento de doença”, com sintomas semelhantes à depressão acompanhados de uma resposta infecciosa (Kent et al., 1992). Por outro lado, a administração de um antagonista do receptor de IL-1 foi capaz de reverter o “comportamento de doença” (Kent et al., 1992). A resposta inflamatória aguda é iniciada pelas citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Em pacientes com TDM, baixos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 foram encontrados (Dhabhar et al., 2009). Além disso, níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, foram associados com humor deprimido (Reichenberg et al., 2001, Wright et al., 2004). Um metanálise, Müller (2014) confirmou que os níveis de IL-6 estão elevados em pacientes com TDM.

No presente estudo demonstrou-se que o estresse precoce induziu um aumento nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 e uma diminuição nos níveis de IL-10 tanto no soro quanto no cérebro nas fases da infância, adolescência e idade adulta. É difícil concluir se o estresse na vida precoce induzido pela privação materna no presente estudo induziu um estado inflamatório em primeiro lugar na periferia ou no cérebro. O aumento dos níveis de mediadores inflamatórios na periferia pode aumentar a inflamação no SNC. As respostas imunes periféricas comunicam-se ao cérebro através de nervos vagais, atravessando a barreira hemato-encefálica (BHE) ligada a macrófagos e associada a receptores de IL-1 localizados em macrófagos perivasculares, e células endoteliais de vênulas cerebrais (Dantzer et al. 2008). Além disso, células da microglia ativadas em uma resposta inflamatória podem liberar o ligante de quimiocina 2 (CCL2) no sangue, que por sua vez pode se ligar ao seu receptor CCR2 nos monócitos, e atravessar a BHE e penetrar nas áreas do cérebro envolvidas com o estresse e com o TDM, aumentando os níveis das citocinas, tais como IL-1 $\beta$  (Brevet et al., 2010; Ménard et al., 2016). Assim, tanto a periferia como a inflamação cerebral podem contribuir para uma exacerbada inflamação. Estudos prévios também já demonstraram níveis elevados de TNF- e IL-1 no soro e líquido cefalorraquidiano e uma diminuição dos níveis de IL-10

no soro de ratos privados 60 dias após o nascimento (Réus et al., 2013, 2015c). Além disso, o tratamento com antidepressivo imipramina (Réus et al., 2013) e com cetamina, um antagonista do receptor N-metil-D-asparto (NMDA) (Réus et al., 2015c) reverteu as alterações nas citocinas periféricas induzidas pela privação materna. Avalio e colaboradores (2016) mostraram um aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  e NF-kB no hipocampo, amígdala e CF de hamsters submetidos ao estresse crônico

Os níveis de IL-10 também foram aumentados nas mesmas áreas do cérebro, mas os níveis elevados de IL-10 foram associados à resiliência (Avalio et al., 2016). Uma superprodução de IL-1 $\beta$  no PFC, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens de ratos foi associada com comprometimento da memória e comportamento depressivo em um modelo animal de dor neuropática (Gui et al., 2016). O presente estudo também mostrou que os níveis de IL-1 $\beta$  foram reduzidos no CF de ratos com 20 dias após o nascimento e no hipocampo de ratos com 60 dias após o nascimento, e os níveis de IL-6 diminuíram no soro de ratos com 30 dias após o nascimento, porém normalmente foi encontrado altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e redução de citocinas anti-inflamatórias. No cérebro, tanto a micróglia quanto os astrócitos, influenciados por estímulos estressantes, podem produzir altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e reduzir as citocinas anti-inflamatórias, essas deficiências no equilíbrio normal de citocinas podem afetar a neuroplasticidade em todo o cérebro (Levin e Godukhin, 2017). Sob condições crônicas, as células da microglia podem ser ativadas e elevar mediadores inflamatórios. Níveis reduzidos de IL-10 contribuíram para aumentar a expressão de IL-6 no cérebro de ratos idosos (Ye e Johnson, 2001). Em um estudo em humanos, demonstrou-se que o estresse materno pré-natal esteve associado a uma redução das proporções de linfócitos CD4 + e níveis mais elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no sangue de adolescentes, indicando que o estresse materno pré-natal é um fator de programação que leva a consequências duradouras sobre a imunidade (Veru et al., 2015). Em crianças, a metilação do DNA das citocinas Th1 também foi associada ao estresse materno pré-natal (Cao-Lei et al., 2016). Assim, sugere-se que estressores ambientais, como a privação materna, independente do gene, podem levar a respostas inflamatórias ao longo do desenvolvimento e culminar em um fenótipo depressivo na vida adulta. De fato, um ambiente neuroinflamatório pode levar a uma interrupção nas células cerebrais e alterar a trajetória do desenvolvimento cerebral (Jones e Friedman, 1982). Além disso, níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias podem resultar na diminuição

da função do receptor de NMDA e na produção elevada das ERO, podendo levar a morte de células neurais (Koriauli et al., 2015).

As células cerebrais são particularmente mais vulneráveis aos efeitos das ERO, uma vez que 20% do consumo total de oxigênio são usados para a atividade cerebral (Gandhi e Abramov, 2012). As ERO, no cérebro também podem ser produzidas pela atividade de monoamina oxidase que é requerida pela inativação das monoaminas, tais como a serotonina, a noradrenalina e a dopamina (Gandhi e Abramov, 2012), que estão envolvidos na fisiopatologia do TDM. O estresse oxidativo pode resultar em uma disfunção mitocondrial (Gandhi e Abramov, 2012) e levar a neuroinflamação (Bakunina et al., 2015). Após o estresse oxidativo, as proteínas podem ser danificadas e suas estruturas podem sofrer fragmentação e degradação. Assim, as alterações nas proteínas podem levar à atividade enzimática, e conseqüentemente, perder e/ou alterar funções fisiológicas (Kohen e Nyska, 2002). O presente estudo demonstrou um aumento nos níveis de carbonilação de proteínas nos animais com 30, 40 e 60 após o nascimento, sugerindo que danos protéicos no cérebro ocorreram na adolescência e na fase adulta decorrentes da privação materna. Níveis elevados de carbonilação de proteínas também foram demonstrados no CF, hipocampo, estriado e córtex de ratos submetidos ao estresse crônico moderado (Lucca et al., 2009b). Após a privação materna, em ratos adultos com 60 dias após o nascimento, foi demonstrado um aumento nos níveis da carbonilação de proteínas no hipocampo, amígdala e núcleo accumbens (Réus et al., 2015b). De forma interessante, uma única injeção de cetamina reduziu os níveis da carbonilação de proteínas em ratos privados 14 dias após a administração (Réus et al., 2015b). Embora muitos estudos tenham demonstrado um aumento nos níveis de MDA (um dos produtos de peroxidação lipídica) associados à depressão (Lopresti et al., 2014; Camkurt et al., 2016) no presente estudo, não foi encontrada alterações nos níveis de MDA nos diferentes estágios de desenvolvimento. Camkurt e colaboradores (2017) não revelaram diferenças nos níveis de MDA em sangue do cordão umbilical de mães deprimidas. Ratos adultos submetidos a estresse crônico moderado apresentaram níveis elevados de MDA no cerebelo e estriado, mas não no CF e no hipocampo (Lucca et al., 2009b). Ao contrário, ratos privados materno com 60 dias após o nascimento tiveram um aumento nos níveis de MDA no CF, amígdala, hipocampo e núcleo accumbens (Réus et al., 2015b). As ERO são neutralizados por enzimas antioxidantes, tais como SOD e CAT. No presente estudo foi demonstrado que a atividade da SOD foi diminuída em todos os estágios de desenvolvimento no CF e

no hipocampo. A atividade da CAT foi reduzida no hipocampo dos animais com 20 dias após o nascimento, e no CF dos animais com 40 e 60 após o nascimento. No entanto, com 40 dias após o nascimento a atividade da CAT foi aumentada no hipocampo. O desequilíbrio da razão SOD/CAT pode ser um indicador de aumento de ERO (Michel et al., 2004). Um aumento na atividade da CAT no hipocampo foi também relatado em ratos submetidos ao estresse crônico e diabéticos (Lucca et al., 2009b, Ceretta et al., 2012; Réus et al., 2016). Outros fatores estressores também podem levar a alterações antioxidantes durante o desenvolvimento, por exemplo, um desequilíbrio nos micronutrientes maternos também foi associado a uma redução nas enzimas antioxidantes, SOD e glutathiona peroxidase (GPx) no cérebro de filhotes (Roy et al. 2014). Além disso, Tsai e Huang (2016) demonstraram que pacientes com TDM em fase aguda apresentavam os níveis de SOD e CAT elevados no soro. Assim, o estresse oxidativo pode ser mediado de maneira diferente, dependendo da área cerebral, estressor e estágio de desenvolvimento.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As evidências deste estudo sugerem que o estresse precoce na vida induzido pela privação dos cuidados maternos tem efeitos negativos na programação do desenvolvimento da prole. Embora as alterações comportamentais tenham sido mais evidentes na vida adulta, a neuroinflamação e o estresse oxidativo começaram no início da adolescência. Outros estudos são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual essas alterações ocorrem. Além disso, o uso de potenciais intervenções antidepressivas para mudar a abordagem terapêutica da idade adulta para o início da vida, antes de sintomas depressivos aparecem, poderiam ser estratégias importantes.

## REFERÊNCIAS

- Abo-Ouf H, Hooper AW, White EJ, van Rensburg HJ, Trigatti BL, Igdoura SA. Deletion of tumor necrosis factor- $\alpha$  ameliorates neurodegeneration in Sandhoff disease mice. *Hum Mol Genet.* 2013;22(19):3960-75.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121–126.
- Afifi TO, Enns MW, Cox BJ, Asmundson GJG, Stein MB, Sareen J. Population attributable fractions of psychiatric disorders and suicide ideation and attempts associated with adverse childhood experiences. *Am J Public Health* 2008;98:946–52.
- Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(10):734-44. Review.
- Alves GJ, Vismari L, Florio JC, Palermo-Neto J. Cohabitation with a sick cage mate: effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. *Neurosci Res.* 2006; 56(2):172-9.
- Anisman H, Zacharko RM. Depression: the predisposing influence of stress. *Behav Brain Sci.* 1982; 89-137
- Aronica E, Gorter J A, Ijlst-Keizers H, Rozemuller AJ, Yankaya B, Leenstra S, Troost D. Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins. *Eur J Neurosci.* 2003;17:2106–2118.
- Avolio E, Fazzari G, Mele M, Alò R, Zizza M, Jiao W, Di Vito A, Barni T, Mandalà M, Canonaco M. Unpredictable Chronic Mild Stress Paradigm Established Effects of Pro- and Anti-inflammatory Cytokine on Neurodegeneration-Linked Depressive States in Hamsters with Brain Endothelial Damages. *Mol Neurobiol.* 2016.
- Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med* 2000; 109: 33-44.
- Bakunina N1, Pariante CM, Zunszain PA. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology.* 2015 Jan 10.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987; 32:279–312.
- Berton O, Nestler EJ. Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. *Nat. Rev Neurosci.* 2006;7:137-51.
- Bilici M, Efe H, Koroglu MA, Uyudu HA, Bekaroglu M, Deger O. Anti-oxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major

- depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affective Disorders* 2001; 64: 43-51.
- Bowley MP, Drevets WC, Ongur D, Price JL. Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biological Psychiatry* 2002; 52: 404-412.
- Brasil. Ministério da Saúde. Mortalidade por suicídio. 2008.
- Brevet M1, Kojima H, Asakawa A, Atsuchi K, Ushikai M, Ataka K, Inui A, Kimura H, Sevestre H, Fujimiya M. Chronic foot-shock stress potentiates the influx of bone marrow-derived microglia into hippocampus. *J Neurosci Res.* 2010;88(9):1890-7.
- Brown GW, Bifulco A, Harris TO: Life events, vulnerability and onset of depression. *Br J Psychiatry.* 1987; 150: 30-42.
- Brown JM, Terada LS, Grosso MA, *et al.* Xanthine oxidase produces hydrogen peroxide which contributes to reperfusion injury of ischemic, isolated, perfused, rat hearts. *J Clin Invest* 1988; 81:1297-301.
- Camargo RM, Sousa CO, Oliveira MLC. Prevalência de casos de depressão em acadêmicos de enfermagem em uma instituição de ensino de Brasília. *Rev Mineira Enferm.* 2014;18(2):392-403.
- Camkurt MA1, Fındıklı E2, Bakacak M3, Tolun Fİ4, Karaaslan MF2. Evaluation of Malondialdehyde, Superoxide Dismutase and Catalase Activity in Fetal Cord Blood of Depressed Mothers. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2017;15(1):35-39.
- Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 598-607.
- Cao-Lei L1, Veru F2, Elgbeili G2, Szyf M3, Laplante DP2, King S1. DNA methylation mediates the effect of exposure to prenatal maternal stress on cytokine production in children at age 13½ years: Project Ice Storm. *Clin Epigenetics.* 2016;8:54.
- Ceretta LB1, Réus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Zappellini G, Felisbino FF, Steckert AV, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:302682.
- Choi DY, Liu M, Hunter RL, Cass WA, Pandya JD, Sullivan PG. Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats. *PLoS One.* 2009;4(5):e5482.
- Coppen A. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry.* 1967;113(504):1237-64.
- Dantzer R1, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(1):46-56.

- Davidson RJ, McEwen BS. Social influences on neuroplasticity: stress and interventions to promote well-being. *Nat Neurosci.* 2012;15(5):689-95.
- Dhabhar FS, Burke HM, Epel ES, Mellon SH, Rosser R, Reus VI, Wolkowitz OM. Low serum IL-10 concentrations and loss of regulatory association between IL-6 and IL-10 in adults with major depression. *J Psychiatr Res.* 2009;43(11):962–969.
- Dilsaver SC1, Swann SC, Chen YW, Shoaib A, Joe B, Krajewski KJ, Gruber N, Tsai Y. Treatment of bipolar depression with carbamazepine: results of an open study. *Biol Psychiatry.* 1996; 40(9):935-7.
- Dunner D, Patrick V, Fieve RR. Life events at the onset of bipolar affective illness. 1979; 136: 508-511.
- Durany N, Münch G, Michel TM, Riederer P. Investigations on oxidative stress and therapeutical implications in dementia. *Euro- pean Archives of Psychiatry and Neurological Sciences* 1999; 249: 68-73 (Suppl).
- Ekdahl CT. Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Front Pharmacol.* 2012;3:41-10.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186:407–421.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 2007;28:138-145.
- Forlenza MJ, Miller GE. Increased serum levels of 8- hydroxy-20- deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosom. Med* 2006; 68: 1-7
- Fridovich, I. Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1986; 247: 1-11
- Gandhi S1, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:428010.
- Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol.* 2008;29:357–365.
- Gidron Y, Ronson A. Psychosocial factors, biological mediators, and cancer prognosis: a new look at an old story. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 386-92.
- Gsell W, Conrad R, Hickethier M, *et al.* Decreased catalase activity but unchanged superoxide dismutase activity in brains of patients with dementia of Alzheimer type. *J. Neurochem* 1995; 64, 1216- 1223.
- Gui WS1, Wei X1, Mai CL1, Murugan M2, Wu LJ2, Xin WJ1, Zhou LJ3, Liu XG. Interleukin-1 $\beta$  overproduction is a common cause for

- neuropathic pain, memory deficit, and depression following peripheral nerve injury in rodents. *Mol Pain*. 2016;12.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 125-6.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, ed 2. Oxford: Clarendon Press 1989.
- Harrison PJ. The neuropathology of primary mood disorder. *Brain* 2002; 125: 1428-1449.
- Herken H, Gurel A, Selek S, *et al*. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression : impact of antidepressant treatment. *Arch Med Res* 2007 ; 38 : 247-52
- Hille R. Molybdenum-containing hydroxylases. *Archives of biochemistry and biophysics* 2005; 433: 107-116.
- Holtzheimer PE, Nemeroff CB. Microglial dysfunction. *NeuroRx*. 2006;3:42-56.
- Holtzheimer PE1, Mayberg HS. Deep brain stimulation for psychiatric disorders. *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:289-307.
- Jespersen L1, Abildstrøm SZ, Hvelplund A, Prescott E. Persistent angina: highly prevalent and associated with long-term anxiety, depression, low physical functioning, and quality of life in stable angina pectoris. *The IGF system and depression*. 2013;102(8):571-81.
- Jones AP, Friedman MI. Obesity and adipocyte abnormalities in offspring of rats undernourished during pregnancy. *Science*. 1982;215:1518–1519.
- Juli A, Juli L. Cytokine levels in depressed and non-depressed subjects, and masking effects of obesity. *Psychiatr Danub*. 2014;1:115-6.
- Kent S, Bluthé RM, Kelley KW, Dantzer R. Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol. Sci*. 1992;13(1):24–28.
- Kierdorf K1, Prinz M. Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci*. 2013 Apr 23;7:44.
- Knol MJ1, Twisk JW, Beekman AT, Heine RJ, Snoek FJ, Pouwer F. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis. *Diabetologia*. 2006;49:837-845.
- Kohen R, Nyska A. Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002; 30:620–50.
- Koriauli S1, Natsvlishvili N2,3, Barbakadze T4,5, Mikeladze D6,7. Knockdown of interleukin-10 induces the redistribution of sigma1-

- receptor and increases the glutamate-dependent NADPH-oxidase activity in mouse brain neurons. *Biol Res.* 2015;48:55.
- Lacasse JR1, Leo J. Serotonin and depression: a disconnect between the advertisements and the scientific literature. *PLoS Med.* 2005;2(12):e392.
- Leonard BE. The immune system, depression and the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2001; 25(4): 767-80.
- Lesperance F, Frasare-Smith N, Throux P, Irwin M. The association between major depression and levels of soluble inter-cellular adhesion molecule-1, interleukin-6, and C-reactive protein in patients with recent acute coronary syndromes. *Am. J. Psychiatry* 2004; 161: 271-7.
- Levin SG1, Godukhin OV. Modulating Effect of Cytokines on Mechanisms of Synaptic Plasticity in the Brain. *Biochemistry (Mosc).* 2017;82(3):264-274.
- Levine A, Worrell TR, Zimnisky R, Schmauss C. Early life stress triggers sustained changes in histone deacetylase expression and histone H4 modifications that alter responsiveness to adolescent antidepressant treatment. *Neurobiol Dis* 2012;45:488–98.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shalziel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186:464–478.
- Lindenau J, Noack H, Possel H, Asayama K, Wolf G. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia* 2000; 29: 25-34.
- Lopresti AL1, Maker GL, Hood SD, Drummond PD. A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014;48:102-11
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.
- Lucca G1, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Gavioli EC, Quevedo J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int.* 2009;54(5-6):358-62.
- Machado-Vieira R1, Salvatore G, DiazGranados N, Ibrahim L, Latov D, Wheeler Castillo C, Baumann J, Henter ID, Zarate CA Jr. New Therapeutic Targets for Mood Disorders. *Scientific WorldJournal.* 2010;10:713-26.

- Maes M, De Vos N, Pioli R, *et al.* Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defences in that illness. *J Affective Disorders* 2000; 58: 241-6.
- Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Increased plasma peroxides and serum oxidized low density lipoprotein antibodies in major depression: markers that further explain the higher incidence of neurodegeneration and coronary artery disease. *J Affect Disord* 2010; 125: 287-94.
- Maes M, Stevens W, DeClerck L, Bridts C, Peeters D, Schotte C, Cosyns P. Immune disorders in depression: higher T helper/T suppressor- cytotoxic cell ratio. *Acta Psychiatr Scand* 1992;86:423-431.
- Maes M. Cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*. 1994;36:498-499.
- Mathew SJ1, Manji HK, Charney DS. Novel Drugs and Therapeutic Targets for Severe Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:2080-92.
- McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:159-163.
- McKinneywt, Moran E, Kraemer GW. Separation in non human primates as a model for human depression: neurobiological implications. In: Post R, Ballenger J (eds) *Neurobiology of Mood Disorders*.1984; 393-406
- Memon RA, Staprans I, Noor M, *et al.* Infection and inflammation induce LDL oxidation *in vivo*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2000; 20: 1536-1542.
- Ménard C, Pfau ML, Hodes GE, Russo SJ. Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(1):62-80.
- Michel TM, Camara S, Tatschner T, *et al.* Increased xanthine oxidase in the thalamus and putamen in depression. *World J Biol Psychiatry* 2010; 11: 314-20.
- Michel TM, Frangou S, Thiemeyer D, *et al.* Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder - a post-mortem study. *Psychiatry Research* 2007; 151: 145- 50.
- Michel TM1, Pülschen D, Thome J. The role of oxidative stress in depressive disorders. *Curr Pharm Des*. 2012;18(36):5890-9.
- Miller AM. Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. *Psychiatr Clin North Am*.1998;21(2):443-63
- Miller GE, Freedland KE, Duntley S, Carney RM. Relation of depressive symptoms to C-reactive protein and pathogen burden

- (cytomegalovirus, herpes simplex virus, Epstein-Barr virus) in patients with earlier acute coronary syndromes. *Am. J. Cardiol* 2005; 95: 317-21.
- Miller GE, Stetler CA, Carney RM, Freedland KE, Banks WA. Clinical depression and inflammatory risk markers for coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2002; 90: 1279-83
- Milne GL, Musiek ES, Morrow JD. F2-isoprostanes as markers of oxidative stress *in vivo*: an overview. *Biomarkers* 2005; 10 Suppl 1: 10-23.
- Muller N, Ackenheil M. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1998;22(1):-33.
- Muller N, Hofschuster E, Ackenheil M, Mempel W, Eckstein R. Investigations of the cellular immunity during depression and the free interval: evidence for an immune activation in affective psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1993;17:713-730.
- Müller N. Immunology of major depression. *Neuroimmunomodulation*. 2014;21(2-3):123–130.
- Myint AM, Kim YK. Cytokine interaction throughIDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. *Med Hypotheses*. 2003;61(5-6):519-25.
- Myint AM, Leonard BE, Steinbusch HW, Kim YK: Th1, Th2, and Th3 cytokine alterations in major depression. *J Affect Disord*. 2005;88:167-173.
- Nishida A, Hisaoka K, Zensho H, Uchitomi Y, Morinobu S, Yamawaki S. Antidepressant drugs and cytokines in mood disorders *Int immunopharmacol*. 2002;2 (12):1619-26.
- OMS. Organização mundial da saúde. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/about/es/>>.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. Suicídio – prevenção e controle. 2006.
- Owen AJ, Batterham MJ, Probst YC, Grenyer BF, Tapsell LC. Low plasma vitamin E levels in major depression: diet or disease? *European J Clinical Nutrition* 2005; 59: 304-6.
- Papadopoulos MC, Koumenis IL, Yuan TY, Giffard RG. Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defences. *Neuroscience* 1998; 82: 915-25.
- Peet M, Murphy B, Shay J, Horrobin D. Depletion of omega 3-fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biological psychiatry* 1998; 43: 315-319.

- Penninx BW, Kritchevsky SB, Yaffe K, *et al.* Inflammatory markers and depressed mood in older persons: results from the health, aging and body composition study. *Biol. Psychiatry* 2003; 54: 566-72.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther Archives.* 1977; 229: 327-336.
- Rajkowska, G. Post-mortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biological Psychiatry* 2000; 48: 766-77.
- Ranjit N, Diez-Roux A V , Shea S, *et al.* Psychosocial factors and inflammation in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Arch. Intern. Med* 2007; 167: 174-81.
- Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A, Pollmächer T. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry.* 2001;58(5):445–452.
- Reshef R, Kreisel T, Beroukhim Kay D, Yirmiya R. Microglia and their CX3CR1 signaling are involved in hippocampal- but not olfactory bulb-related memory and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2014;41:239-250.
- Réus GZ1, Stringari RB, Ribeiro KF, Cipriano AL, Panizzutti BS, Stertz L, Lersch C, Kapczinski F, Quevedo J. Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. *Neurochem Res.* 2011;36:460-66.
- Réus GZ, Dos Santos MA, Abelaira HM, Ribeiro KF, Petronilho F, Vuolo F, Colpo GD, Pfaffenseller B, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Imipramine reverses alterations in cytokines and BDNF levels induced by maternal deprivation in adult rats. *Behav Brain Res.* 2013a;242:40-6.
- Réus GZ, Abelaira HM, dos Santos MA, Carlessi AS, Tomaz DB, Neotti MV, Lirano JL, Gubert C, Barth M, Kapczinski F, Quevedo J. Ketamine and imipramine in the nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. *Behav Brain Res.* 2013b;256:451-6.
- Réus GZ1, Fries GR2, Stertz L2, Badawy M3, Passos IC2, Barichello T4, Kapczinski F2, Quevedo J5. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neurosci Lett.* 2015a;584:83-87.
- Réus GZ1, Nacif MP2, Abelaira HM2, Tomaz DB2, dos Santos MA2, Carlessi AS2, da Luz JR3, Gonçalves RC4, Vuolo F4, Dal-Pizzol F4, Carvalho AF5, Quevedo J6. Ketamine ameliorates depressive-like

- behaviors and immune alterations in adult rats following maternal deprivation. *Neurosci Lett.* 2015b;584:83-7.
- Réus GZ1,2, Carlessi AS1, Titus SE2, Abelaira HM1, Ignácio ZM1, da Luz JR1, Matias B11, Bruchchen L1, Florentino D3, Vieira A3, Petronilho F2,3, Quevedo J1,2. A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. *Dev Neurobiol.* 2015c;75(11):1268-81.
- Réus GZ1,2, Dos Santos MA1, Abelaira HM1, Titus SE2, Carlessi AS1, Matias B11, Bruchchen L1, Florentino D3, Vieira A3, Petronilho F3, Ceretta LB4, Zugno A11, Quevedo J1,2. Antioxidant treatment ameliorates experimental diabetes-induced depressive-like behaviour and reduces oxidative stress in brain and pancreas. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016;32(3):278-88
- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 519-529.
- Rothermundt M, Arolt V, Peters M, Gutbrodt H, Fenker J, Kersting A, Kirchner H. Inflammatory markers in major depression and melancholia. *J Affect Disord.* 2001;63:93-102.
- Roy S1, Sable P1, Khaire A1, Randhir K1, Kale A1, Joshi S2. Effect of maternal micronutrients (folic acid and vitamin B12) and omega 3 fatty acids on indices of brain oxidative stress in the offspring. *Brain Dev.* 2014;36(3):219-27.
- Sarandol A, Sarandol E, Eker SS, Erdinc S, Vatansever E, Kirli S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress : short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-anti-oxidative systems. *Human Psychopharmacology* 2007; 22: 67-73.
- Sarandol A, Sarandol E, Eker SS, *et al.* Oxidation of apolipoprotein B-containing lipoproteins and serum paraoxonase/ arylesterase activities in major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych* 2006; 30: 1103-108.
- Schildkraut JJ, Gordon EK, Durell J. Catecholamine metabolism in affective disorders. I. Normetanephrine and VMA excretion in depressed patients treated with imipramine. *J Psychiatr Res.* 1965;3(4):213-28.
- Selley ML. Increased (E)-4-hydroxy-2-nonenal and asymmetric dimethylarginine concentrations and decreased nitric oxide concentrations in the plasma of patients with major depression. *J Affect Disord* 2004; 80: 249-256.
- Šišková Z1, Tremblay MÈ2. Microglia and synapse: interactions in health and neurodegeneration. *Neural Plast.* 2013;2013:425845.

- Song C, Lin A, Bonaccorso S, Heide C, Verkerk R, Kenis G, Bosmans E, Scharpe S, Whelan A, Cosyns P, De Jongh R, Maes M: The inflammatory response system and the availability of plasma tryptophan in patients with primary sleep disorders and major depression. *J Affect Disord.* 1998;49:211-219.
- Song L1, Pei L2, Yao S1, Wu Y3, Shang Y4. NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases, from Functions to Therapies. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:63.
- Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK, *et al.* A study on nitric oxide, beta-adrenergic receptors and antioxidant status in the polymorphonuclear leukocytes from the patients of depression. *J Affective Disorders* 2002; 72: 45-52.
- Stahl SM. *Psychopharmacology of antidepressants.* London: Martin Dunitz; 1997.114p.
- Sublette ME, Russ MJ, Smith GS. Evidence for a role of the arachidonic acid cascade in affective disorders: a review. *Bipolar Disord.* 2004;6(2):95-105.
- Szelényi J, Vizi ES. The catecholamine-cytokine balance: interaction between the brain and the immune system. *Ann N Y Acad Sci.*2007;1113:311-24.
- Talarowska M, Galecki P, Maes M, *et al.* Malondialdehyde plasma concentration correlates with declarative and working memory in patients with recurrent depressive disorder. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 5359-5366.
- Terada LS, Beehler CJ, Banerjee A, *et al.* Peroxide and self-or neutrophil-generated O<sub>2</sub> metabolites inactivate xanthine oxidase. *J Appl Physiol* 1988; 65: 2349-53.
- Tsai MC1, Huang TL2. Increased activities of both superoxide dismutase and catalase were indicators of acute depressive episodes in patients with major depressive disorder. *Psychiatry Res.* 2016;235:38-42.
- Valvassori SS, Varela RB, Arent CO, Dal-Pont GC, Bobsin TS, Budni J, Reus GZ, Quevedo J. Sodium butyrate functions as an antidepressant and improves cognition with enhanced neurotrophic expression in models of maternal deprivation and chronic mild stress. *Curr Neurovasc Res.* 2014;11(4):359-66.
- Van Hunsel F1, Wauters A, Vandoolaeghe E, Neels H, Demedts P, Maes M. Lower total serum protein, albumin, and beta- and gamma-globulin in major and treatment-resistant depression: effects of antidepressant treatments. *Psychiatry Res.* 1996;65(3):159-69.

- Veru F1, Dancause K1, Laplante DP2, King S3, Luheshi G1. Prenatal maternal stress predicts reductions in CD4+ lymphocytes, increases in innate-derived cytokines, and a Th2 shift in adolescents: Project Ice Storm. *Physiol Behav.* 2015;144:137-45.
- Vismari et al. Depression, antidepressants and immune system: a new look to an old problem. *Rev Psiq Clin.* 2008;35 (5):196-204.
- Winterbourn CC. Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radical Biology & Medicine* 1993; 14: 85-90.
- Wright CE, Strike PC, Brydon L, Steptoe A. Acute inflammation and negative mood: mediation by cytokine activation. *Brain Behav Immun.* 2005;19(4):345–350.
- Yanik M, Erel O, Kati M. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. *Acta Neuropsychiatrica* 2004; 16: 200-3.
- Ye SM1, Johnson RW. An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice. *Neuroimmunomodulation.* 2001;9(4):183-92.
- Yirmiya R, Pollak Y, Morag M, Reichenberg A, Barak O, Avitsur R, et al. Illness, cytokines, and depression. *Ann NY Acad Sci.* 2000;917:478-87.
- Zhang R, Brennan ML, Zhongshou S, *et al.* Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J. Biol. Chem* 2002; 277: 46116-22.
- Zorrilla EP, Luborsky L, McKay JR, Rosenthal R, Houldin A, Tax A, et al. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta analytic review. *Brain Behav Immun.* 2001;15(3):199-226.
- Zweier JL, Kuppusamy P, Lutty GA. Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4046-4050.

**ANEXO**

## ANEXO A: COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação das interações neuroimunes no transtorno depressivo maior durante o desenvolvimento", registrada com o protocolo nº 058/2016-1, sob a responsabilidade de Josiane Budni, junto à equipe: Gislaïne Z. Réus, Helena M. Abelaira, Gabrielly Cruvinel Fernandes, Amanda Luiz Maciel, Zuleide Maria Ignácio, Danyela Matos, Julia Possamai Demo, Julia Bardini, Airam Barbosa de Moura - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 31/05/2016.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2016 a 01/12/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	120
Peso/Idade	50-350g / 1 a 60 dias
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "The neuroimmune basis underlying the developmental programming of depressive-like behavior induced by experimental maternal care deprivation".

Protocol number: 058/2016-1

Principal Investigator: Josiane Budni

Researchers: Gislaïne Z. Réus, Helena M. Abelaira, Gabrielly Cruvinel Fernandes, Amanda Luiz Maciel, Zuleide Maria Ignácio, Danyela Matos, Julia Possamai Demo, Julia Bardini, Airam Barbosa de Moura.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 31 de maio de 2016.

  
Jairo José Zooche