

EFEITOS DO ESTRESSE DE SEPARAÇÃO NA INFÂNCIA E DO DESAMPARO NA VIDA ADULTA SOBRE A EXPRESSÃO DE NEUROPEPTÍDEOS NA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL

Fabíola Donato Rosa Chioato¹

Quézia Silva Anders²

1. RESUMO

Evidências mostram que o desenvolvimento do transtorno do pânico na vida adulta pode estar relacionado à presença da ansiedade de separação na infância (ASI). O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do isolamento social neonatal (ISN) de 20 dias e da privação materna (PM) sobre a expressão gênica de receptores serotoninérgicos e neuropeptídeos selecionados na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) de ratos adultos, além de avaliar os níveis de ansiedade e depressão em modelos de estudos psiquiátricos como labirinto em cruz elevado, campo aberto e teste para anedonia. Os grupos de dados foram comparados com análise de variância ANOVA. Os ratos submetidos ao ISN apresentaram redução significativa no peso quando adultos, além de traços de anedonia, sugerindo possível quadro de depressão. Não houveram alterações significativas no comportamento dos ratos adultos submetidos ao ISN e PM. A expressão gênica dos receptores 5-HT e neuropeptídeos avaliados se mostrou semelhante em ambos os protocolos aplicados, quando comparados ao grupo controle, entretanto houve uma discreta redução dos níveis de *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro) dos grupos controle de PM em relação ao grupo virgem. Os resultados mostraram que os modelos experimentais de ASI utilizados não promoveram alterações, em ratos adultos, na expressão gênica dos receptores 5-HT e neuropeptídeos avaliados.

Palavras-chave: Separação materna; Matéria cinzenta periaquedutal; 5-HT; BDNF; SP, Δ FosB.

2. ABSTRACT

Evidence shows that the development of panic disorder in adulthood may be related to the presence of childhood separation anxiety (CSA). The present study aimed to evaluate the effects of 20-day neonatal social isolation (ISN) and maternal deprivation (PM) on a gene expression of serotonergic receptors and neuropeptides selected in the dorsal periaqueductal gray matter (MCPD) of adult users, in addition to evaluating levels of anxiety and depression in models of psychiatric studies, such as elevated plus maze, open field and test for anhedonia. The data groups were compared with analysis of variance ANOVA. The rats submitted to NSI showed a significant reduction in weight as adults, in addition to traces of anhedonia, suggesting a depressive condition. There were no significant changes in the behavior of adult rats submitted to NSI and MD. The gene expression of the 5-HT receptors and neuropeptides evaluated was similar in both protocols when compared to the control group, however there was a discrete reduction in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels of the MD control groups in relation to the virgin group. The results showed that the experimental models of CSA used did not promote changes, in adult rats, in the expression expression of the 5-HT receptors and neuropeptides evaluated.

¹ Graduanda do Curso de Farmácia do Centro Universitário Salesiano. E-mail: fabiola_chioato@hotmail.com

² Graduada em Biomedicina e Doutora em Ciências Fisiológicas, atua na área de Genética Molecular. E-mail: qanders@ucv.edu.br

Keywords: Maternal separation; Periaqueductal gray matter; 5-HT; BDNF; SP, Δ FosB.

3. INTRODUÇÃO GERAL

Ansiedade de separação na infância (ASI) é uma condição associada à vivências infantis de estresse familiar (orfandade, divórcio, conflitos conjugais, etc.) e têm sido considerada como fator de risco para o desenvolvimento tanto do transtorno do pânico (TP), quanto para a depressão maior (DM) (DREYER E KOHN, 2017, PRETER *et al.*, 2011, 2008).

Embora condições normais de ansiedade sejam cruciais para a sobrevivência do organismo em situações de possíveis perigos ou desamparo, seja na infância ou na vida adulta (LENHARDT E CALVETTI, 2017), também pode se tornar patológica uma vez que, passa a interferir de maneira considerável e desproporcional em relação aos estímulos externos da vida do indivíduo (HENCKES E MACEDO, 2017).

O quadro patológico de ASI é um transtorno caracterizado pela separação da criança de sua figura de apego e geralmente é acompanhada de ansiedade excessiva, recusa escolar, além da demonstração de sinais claros de tristeza e déficit de concentração (DREYER E KOHN, 2017; ORGILÉS *et al.* 2018). Portanto, a ASI engloba sintomas e comportamentos que refletem a disfunção de um sistema de alarme para a proteção da criança contra rupturas reais, ou potenciais, de seus laços familiares (DREYER E KOHN, 2017).

Donald Klein (1964) propôs a hipótese de que a ASI facilita o desenvolvimento do TP em adultos, uma vez que metade dos pacientes agorafóbicos hospitalizados quando adultos havia passado por um forte quadro de ASI que os incapacitou de ter um convívio social normal. Esta hipótese pode ser corroborada por trabalhos que confirmam uma base genética relacionadas aos transtornos de ansiedade, através de revisão sobre a hereditariedade de traços ansiosos feita por Schiele *et al.* (2020) e trabalhos com epidemiologia psiquiátrica, desenvolvidos por Roberson-Nay *et al.* (2012). Além disso, Tenorio-Lopes *et al.* (2017) mostraram a influência da ASI na etiologia dos TP onde, ratos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN), um modelo de ASI, apresentaram respostas diferenciadas em relação ao sexo, o que pode apresentar diferentes incidências em homens e mulheres, possivelmente implicando em diferentes taxas de herdabilidade para os filhos.

Mangolini *et al.* (2019) observaram que, embora os transtornos de ansiedade, fobias, depressão e pânico sejam clinicamente distintos, eles apresentam alta comorbidade. Em particular, pacientes de TP queixam-se frequentemente de “ansiedade antecipatória”, ou seja, medo antecipado de falta de amparo na possibilidade de um ataque de pânico (AP), condição que pode agravar-se numa agorafobia incapacitante (PRADO, 2018).

Os transtornos de ansiedade em adultos podem ter relação com situações de estresse intenso durante a infância. Este fato pode ser observado em experimentos com ratos adultos submetidos à privação materna, durante o período de amamentação (QUINTINO-DOS-SANTOS *et al.*, 2014). Entretanto, também são encontrados estudos onde não houveram alterações significativas nos níveis de ansiedade em ratos adultos submetidos a protocolos de estresse neonatal (BORGES-AGUIAR *et al.*, 2018). Estes resultados contraditórios podem ter origem nas inúmeras formas e protocolos diferenciados aplicados em experimentos de privação

materna, bem como a duração do experimento, gerando importantes diferenças nas conclusões de cada estudo.

Atualmente, existem protocolos, dentre eles o de Quintino-dos-Santos *et al.* (2014) que mostraram que o ISN, ou seja, a separação do filhote de sua mãe e de seus irmãos por 3 horas diárias ao longo da amamentação (segundo dia pós natal (PN2) ao vigésimo primeiro dia pós natal (PN21)), facilitou o pânico experimental induzido por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD). Estudos mais recentes mostraram, no entanto, que as respostas de pânico somente são facilitadas nos ratos adultos que foram separados somente da mãe por 3 h diárias no “período hiporresponsivo ao estresse” (PN4-PN14) (BORGES-AGUIAR *et al.*, 2018). Portanto, a facilitação dos AP no estudo anterior (QUINTINO-DOS-SANTOS *et al.*, 2014) foi provavelmente devida à separação do filhote tanto da mãe quanto dos irmãos. Adicionalmente, Borges-Aguiar *et al.*, (2018) mostraram que, filhotes separados repetidamente de suas mães (mas não dos irmãos) tornaram-se até mesmo mais resilientes que os controles. Estes resultados justificam a adoção dos protocolos de privação materna (PM) de 24 horas em PN9 e de ISN de 3 horas diárias entre PN2 e PN21, como modelos de trauma infantil.

O desenvolvimento de fármacos eficazes nos transtornos de ansiedade depende do conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos. Neste sentido, Deakin e Graeff (1991) propuseram que, enquanto a ansiedade é produzida pela hiperatividade das projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (NDR) para regiões do córtex pré-frontal e da amígdala, que processam ameaças distantes ou potenciais, o pânico seria devido à hipofunção de projeções serotoninérgicas inibitórias do NDR às regiões da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD), que processam as respostas às ameaças próximas ou iminentes, medos inatos e hipóxia. Estes autores também sugeriram que a sub-regulação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} do hipocampo resultaria em desamparo e depressão. Embora o trabalho de Deakin e Graeff (1991) tenha fornecido um quadro unificado para o uso dos inibidores seletivos da recaptura de serotonina (ISRS) no transtorno da ansiedade generalizada (TAG), TP e DM, não há informações sobre as alterações dos receptores de serotonina (5-HT) na MCPD de ratos adultos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN).

Rosa (2012) mostrou que os níveis de serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) da MCPD foram igualmente aumentados, tanto nos controles quanto nos ratos adultos submetidos ao ISN. Como não houve alterações no principal metabólito da 5-HT, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), seus resultados indicaram que a manipulação diária dos filhotes ao longo da lactação foi suficiente para aumentar a síntese de 5-HT na MCPD quando adulto. No mesmo sentido, os níveis de 5-HT na matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral (MCPAvl) permaneceram inalterados. Apesar deste estudo não ter examinado as alterações na expressão dos receptores 5-HT, eles são um forte ensejo para a investigação de outros sistemas neuroquímicos da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA).

Por outro lado, em seu estudo pioneiro sobre a “neuroquímica da solidão”, BRODIN *et al.* (1994) mostraram que o isolamento de ratos adultos por 24 horas, ou sete dias, causa aumentos significativos nos níveis de substância P (SP) na MCPA. Este efeito foi prevenido pelo tratamento prévio com Diazepam, e pode estar associado aos efeitos pró-pânico da ASI. Similarmente, Berton *et al.* (2007) mostraram que a MCPA de camundongos resilientes a choques inescapáveis (menos depressivos) apresentam níveis reduzidos de SP. Ainda neste sentido, os últimos autores apresentaram evidências de que este efeito foi devido à expressão aumentada do peptídeo Δ FosB, o produto de um gene precoce imediato (*immediate early gene*)

que, no entanto, acumula-se no tecido cerebral. Estes estudos levantam a questão se os ratos submetidos ao estresse de separação na infância apresentam níveis reduzidos de SP na MCPD.

Portanto, o presente estudo objetivou avaliar as eventuais alterações neuroquímicas da MCPD em ratos adultos, submetidos à privação materna (PM) e ao isolamento social neonatal (ISN) e ao desamparo materno (mãe consciente e anestesiada) no momento da reunião dos filhotes. Também foram avaliados os efeitos no comportamento e na expressão do mRNA dos receptores 5-HT1A e 5-HT2C e dos neuropeptídeos SP, Δ FosB e BDNF na MCPD.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E PÂNICO

O termo ansiedade provém do latim “*anxius*” e significa sufocar ou estrangular, que notavelmente é um dos principais sintomas deste transtorno. A síndrome, ao qual este sentimento é pronunciado, comumente é descrita como uma condição de humor direcionado a uma possibilidade de que algo insatisfatório possa acontecer futuramente sendo o medo a resposta de alarme a ameaça iminente ou existente, onde o indivíduo se sente indefeso (ANDRADE *et al.*, 2019, PINTO *et al.*, 2015). No entanto a ansiedade também pode ser compreendida como um feedback do organismo através de alterações fisiológicas produzindo respostas comportamentais e também cognitivas, tornando-se indispensável para a sobrevivência, uma vez que, a ansiedade estimula recursos físicos e psicológicos que possibilita o indivíduo a enfrentar situações de ameaça e capacitando-o a tomada de decisões (LENHARDT E CALVETTI, 2017, PINTO *et al.*, 2015). Contudo, a ansiedade torna-se patológica quando deixa de ser adaptativa e passa a representar algum prejuízo, fisiológico ou social, ao indivíduo (PINHEIRO, 2018).

As características dos transtornos de humor vêm sendo descritas desde 1896, quando Sigmund Freud, em seu trabalho pioneiro “neuroses de ansiedade” (Angstneurose), descreveu as primeiras características destes transtornos. Freud também discerniu estes transtornos da depressão maior, à época denominada “melancolia”, de uma ampla gama de condições psiquiátricas denominadas “neurastenias”. Ainda segundo o autor, existem duas formas do transtorno da ansiedade, evidenciadas em “estudos selecionados sobre a histeria”, publicado em 1896, onde foram consideradas duas formas fundamentais, sendo elas a “apreensão” (Angstliche), condição predominante dentre os transtornos de ansiedade, e uma síndrome menos frequente, porém de igual importância, que ele denominou “ataque de ansiedade” (Angstanfall). Além disso, Freud segregou estes ataques das fobias, do transtorno obsessivo-compulsivo (neurose obsessiva) e do transtorno do estresse pós-traumático (neurose comum), dentre outras condições. Suas definições clínicas de “expectativa ansiosa” e “ataque de ansiedade” correspondem aos diagnósticos atuais do transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno do pânico (TP), respectivamente (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

De acordo com estudos clínicos e epidemiológicos, atualmente são distinguíveis dois tipos de pânico, sendo eles dos tipos respiratório e não-respiratório, dependendo da proeminência dos sintomas respiratórios (ROBERSON-NAY *et al.*, 2012). O pânico do tipo respiratório possui relação direta com a sensibilidade ao CO₂, além de apresentar sintomas como sensação de

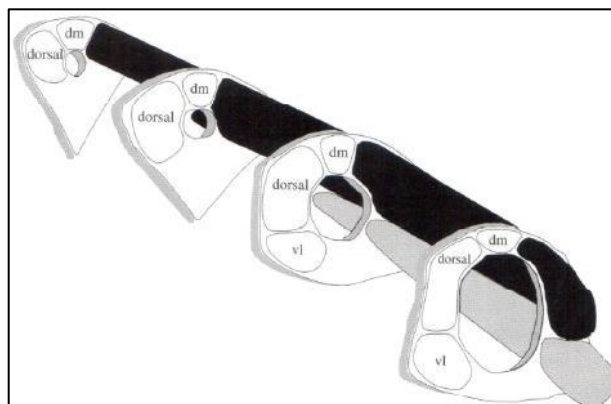
sufocamento, dor no peito, falta de ar e sensação de engasgamento, ao passo que o subtipo não respiratório pode não apresentar qualquer sintoma relacionado a respiração do paciente (BÉRIA, 2018).

Klein (1993), sugeriu que os ataques de pânico (AP) clínico são especificamente associados a um alarme falso de sufocamento (*false suffocation alarm*), uma vez que são induzidos por infusão de lactato de sódio (0,5 M) ou inalação de concentrações baixas (5-7%) de dióxido de carbono (CO₂) em pacientes com transtorno do pânico (TP), mas não em voluntários sadios ou pacientes com outros transtornos psiquiátricos. Klein (1993) argumentou que a teoria do “alarme falso de sufocamento” (AFS) é uma explicação consistente da redução dos AP durante a gravidez, parto e lactação e, contrariamente, do aumento da frequência destes ataques no transtorno disfórico da fase lútea tardia (tensão pré-menstrual), situações em que há aumentos ou diminuições da frequência respiratória paralelamente às alterações na secreção de progesterona. A teoria do AFS também é compatível com a alta comorbidade do pânico com doenças pulmonares destacando-se a asma (BATISTA, 2017; FONSECA *et al.* 2019). Por fim, Klein (1993) demonstrou que os AP induzidos por 7% de CO₂ e 0,5 M de lactato de sódio são, e permanecem até os dias atuais, o melhor modelo de pânico clínico, por não serem induzidos em sujeitos saudáveis, pacientes com transtorno obsessivo compulsivo (TOC) ou com fobia social (FREIRE E NARDI, 2012).

4.2. A MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NOS TRANSTORNOS DA ANSIEDADE E PÂNICO

Atualmente reconhece-se que a matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) (Figura 1) possui um papel central no desenvolvimento e regulação dos transtornos de ansiedade, principalmente no TP. As estimulações, elétricas ou químicas, na MCPA têm sido propostas como modelos confiáveis de indução de AP (CANTERAS E GRAEFF, 2014; SCHENBERG *et al.*, 2014). De fato, NASHOLD *et al.* (1969) mostraram que a estimulação da MCPA em voluntários produz sintomas que reproduzem os AP. O raio-X dos eletrodos mostrou que estes se situavam na metade dorsal da MCPA (MCPD), mas não em sua metade ventral (MCPV) ou no tegumento adjacente (NASHOLD *et al.*, 1969).

Figura 1 – Organização colunar rostro-caudal das regiões dorsal e ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). dm, coluna dorsomedial da MCPA; vl, coluna ventrolateral da MCPA.



Fonte: ROSA (2012).

Em ratos, a estimulação da MCPD produz reações de “congelamento” (imobilidade tensa e exoftalmia) e fuga (trote, galopes e saltos) acompanhadas por respostas cardiovasculares e respiratórias e, menos frequentemente, micção e defecação (PRADO, 2018). Contudo, os galopes, induzidos pela estimulação da MCPD, foram atenuados por panicolíticos (fluoxetina) em doses e regimes similares aos empregados na terapia do TP (SCHENBERG *et al.*, 2002, 2001, VARGAS *et al.*, 2001). Estes trabalhos sugerem que a MCPD seja o melhor candidato ao substrato neural dos AP.

Ainda que indiretamente, o envolvimento da MCPD nos AP também foi apoiado pela provocação de pânico pela exposição ao CO₂ de pacientes com doença de Urbach-Wiethe que não têm memória de experiências de medo devido à calcificação bilateral da amígdala (FEINSTEIN *et al.*, 2013). Estas observações indicam que os AP prescindem da amígdala a despeito do envolvimento reconhecido desta estrutura no processamento do medo e ansiedade de humanos e animais. Os ataques de pânico também se diferenciam do medo ordinário pela ausência de respostas dos “hormônios do estresse” (corticotrofina, glicocorticóides e prolactina) tanto em humanos quanto em ratos estimulados na MCPD (ARMINI *et al.*, 2015; PAUL *et al.*, 2014).

Embora a MCPD seja comumente associada ao pânico não-respiratório (CANTERAS E GRAEFF, 2014), resultados recentes de nosso laboratório mostraram que, a estimulação seletiva dos quimiorreceptores por doses baixas de cianeto de potássio (KCN), produz comportamentos defensivos similares àqueles eliciados pela estimulação da MCPD (SCHIMITEL *et al.*, 2012). Enquanto a infusão de KCN facilitou os comportamentos defensivos, do rato, eliciados pela estimulação da MCPD, lesões na MCPD foram capazes de diminuir ou até mesmo bloquear estes comportamentos defensivos induzidos pelo KCN (SCHIMITEL *et al.*, 2012). Por fim, foi evidenciado que as respostas ao KCN são bloqueadas por tratamentos agudos e crônicos com doses clínicas de clonazepam e fluoxetina, respectivamente (SCHIMITEL *et al.*, 2014). Estes resultados sugerem que a MCPD do rato abriga um sistema de alarme de sufocamento sensível à hipóxia, cuja ativação poderia tanto deflagrar AP “espontâneos” quanto tornar o indivíduo hipersensível ao CO₂ (SCHIMITEL *et al.*, 2012).

4.3. A SEROTONINA NOS TRANSTORNOS DA ANSIEDADE E PÂNICO

Em trabalhos envolvendo testes de conflitos em ratos, foram observadas as primeiras evidências da serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) nos transtornos de ansiedade. Estes testes consistiam na aplicação de choques elétricas, em ratos privados de alimento, toda vez que o mesmo pressionava o botão de dispensa de alimento. O choque representava uma repreensão, resultando em diminuição da frequência com o botão era pressionado (GRAFF, 2003). Graff (2003) também observou uma redução do reflexo inato de suspensão do comportamento de pressionar o botão, após a punição, em ratos tratados com fármacos ansiolíticos do tipo inibidores da serotonina. Há indícios de que o uso de antagonistas ou depletors da 5-HT também resultam na redução desta suspensão inata do comportamento punido, efeito similar aos de ansiolíticos sinérgicos do ácido gama aminobutírico (GABA), tais como etanol, barbitúricos e benzodiazepínicos (BDZ) (GRAEFF, 2003; LI *et al.*, 2017). Atualmente, os principais fármacos utilizados no tratamento de transtornos de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno do pânico (TP), além de outros transtornos de humos, são os do grupo dos inibidores seletivos da recaptura de serotonina, conhecidos com ISRSs (KALBOUNEH E ALZGHOUL, 2019). Estas evidências, além de tantas outras, embasaram as hipóteses formuladas por Deakin e Graeff (1991) sobre o papel da serotonina (5-HT) como neurotransmissor especializado no controle dos estados aversivos.

Ainda assim, o sistema serotoninérgico é extremamente complexo, possuindo cerca de 14 tipos de receptores (5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E, 5-HT1F, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5A, 5-HT5B, 5-HT6 e 5-HT7) localizados pré- e/ou pós-sinápticamente, o que dificulta trabalhos acerca do papel de cada um destes receptores nos transtornos de humor e ansiedade. Além disto, os efeitos opostos e pontuais, a partir da ativação destes receptores, torna ainda mais complexo o entendimento de cada um nestes transtornos (BATISTA, 2012; HOYER *et al.*, 2002).

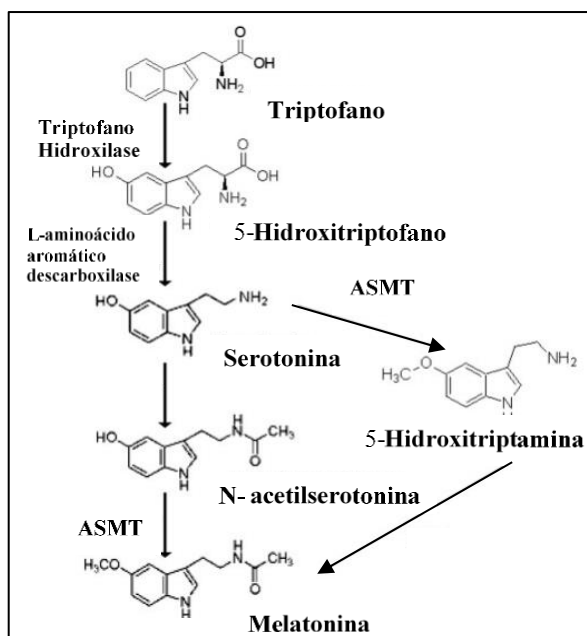
A 5-HT é um neurotransmissor e mediador de sinais periféricos modulatório amplamente distribuído no sistema nervoso central (LI *et al.*, 2017). Devido à sua característica hidrofílica, sabe-se que ela não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) sendo, portanto, sintetizada no sistema nervoso central a partir do aminoácido triptofano (PINHEIRO *et al.* 2017). A síntese da 5-HT ocorre principalmente nos neurônios serotoninérgicos do núcleo da rafe, ponte e bulbo, a partir do triptofano, um aminoácido essencial que é capturado do plasma por meio dos carreadores de aminoácidos neutros da BHE (PINHEIRO *et al.*, 2017). O triptofano uma vez capturado, é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP), pela ação da enzima triptofano-hidroxilase, que hidroxila o anel aromático na posição cinco. Esta enzima é preferencialmente expressa em neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe (PINHEIRO *et al.* 2017, SGHENDO E MIFSUD, 2012). O 5-HTP, mediante a descarboxilase do aminoácido L-aromático (AADC), é convertida em 5-hidroxitriptamina (5-HT) (PINHEIRO *et al.* 2017, SGHENDO E MIFSUD, 2012).

Uma vez sintetizada, a 5-HT é armazenada em vesículas através de um processo realizado por bombas de prótons. Ao ocorrer a despolarização do neurônio serotoninérgico e o consequente influxo de Ca^{2+} , a 5-HT é liberada na fenda sináptica, sendo esta liberação controlada por auto-receptores localizados nos neurônios pré-sinápticos (LI *et al.*, 2017). O aumento da

concentração extracelular de 5-HT ativa os auto-receptores pré-sinápticos, diminuindo a liberação deste neurotransmissor (RAYMOND *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2017).

O término da ação da 5-HT ocorre por dois processos, o primeiro é a remoção do neurotransmissor por um transportadores seletivos de 5-HT (5-HT transporter, 5-HTT), este transportador é uma proteína transmembrânica da família de transportadores de neurotransmissores dependentes de Na^+/Cl^- , responsáveis pela recaptura da 5-HT, regulando os níveis do neurotransmissor e sua ação na sinapse, mantendo a homeostasia do sistema (BOROWSKY E HOFFMAN, 1995; BLAKELY *et al.*, 1994,). O segundo processo é a degradação enzimática pela monoamina oxidase (MAO). Essa enzima encontra-se no terminal pré-sináptico e, principalmente, na membrana mitocondrial, e converte a 5-HT em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), seu principal metabólito (COOPER *et al.*, 1991) (Figura 2).

Figura 2 – Vias de síntese e degradação da serotonina.



Fonte: RODRIGUEZ-NARANJO *et al.* (2011), adaptado.

Na gestação, a placenta pode sintetizar e transportar serotonina usando um sistema complexo de conversão materna do triptofano em serotonina, transferindo-o à circulação fetal (PINHEIRO *et al.* 2017). Segundo Velasquez *et al.* (2013) fatores ambientais como o uso de drogas e estresse materno ou genéticos que alterem o metabolismo do triptofano na placenta, podem acarretar no desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos (ansiedade, depressão e autismo) na infância ou na idade adulta, por conta de alterações nas concentrações de 5-HT placentárias, molécula importante no processo de desenvolvimento neurológico do feto (ST-PIERRE *et al.* 2016).

4.4. NEUROPEPTÍDEOS Δ FOSB, SUBSTÂNCIA P E BDNF

A ΔFosB é uma proteína truncada pertencente à família de genes de ativação imediata Fos. É um peptídeo composto por uma cadeia de cerca de 237 aminoácidos formando uma estrutura bioquímica fortemente estável (NESTLER, 2015). Estudos mostraram a presença de ΔFosB em diferentes regiões do cérebro como, amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal, podendo apresentar níveis mais elevados em situações de estresse. Segundo Ruffle (2014), há diversos estudos demonstrando que, ao contrário do FosB e todas as proteínas Fos, a ΔFosB permanece no tecido cerebral por um longo período de tempo e acumula-se em altos níveis nos neurônios após estímulos contínuos, principalmente devido à sua alta estabilidade bioquímica.

Formada por cerca de 11 aminoácidos, a substância P (SP) é um dos neuropeptídios mais abundantes no sistema nervoso central e vem sendo relacionada à vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo processos de regulação do estresse, implicações em comportamentos afetivos e transtornos de ansiedade (EBNER E SINGEWALD, 2006; KATZUNG E TREVOR, 2017). Este neuropeptídeo regula principalmente a ativação de receptores da neurocinina-1 (NK1), estruturas comumente encontradas em regiões cerebrais amplamente conhecida por estarem envolvidas na regulação das respostas ao estresse e à ansiedade (ZIEGLGÄNSBERGER, 2019).

O *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro) é um dos principais fatores neurotróficos de suporte, principalmente, ao desenvolvimento e a sobrevivência de neurônios colinérgicos, dopaminérgicos e motores e é encontrada em altas concentrações no hipocampo e córtex cerebral, tendo papel fundamental na proliferação de neurônios, além de poder afetar comportamentos cognitivos e emocionais (FAMITAFRESHI, 2015). Estudos realizado em humanos e animais indicam que o estresse e a dor estão associados a uma redução nos níveis de BDNF (KATZUNG E TREVOR, 2017).

4.5. ANSIEDADE DE SEPARAÇÃO NA INFÂNCIA

Em jovens até a fase da adolescência, os transtornos de ansiedade estão entre os distúrbios psiquiátricos mais comuns, juntamente com os transtornos de déficit de atenção, hiperatividade e transtorno de conduta. No Brasil, estes transtornos acometem cerca de 10% dos jovens até 18 anos (FLEITLICH-BILYK E GOODMAN, 2004), sendo o transtorno de separação (aproximadamente 4%), transtorno de ansiedade generalizada (TAG) (entre 2,7 e 4,6%) e fobias específicas (entre 2,4 e 3,3%) os de maior prevalência. Há também, em menor prevalência, a fobia social (cerca de 1%) e transtorno de pânico (cerca de 0,6%) (CAÍRES E SHINOHARA, 2010). Além disso, cerca de 50% destes jovens ansiosos, apresentarão episódios depressivos ao longo da vida, como parte de seu transtorno ansioso (ASBAHR, 2004).

Nos transtornos de separação na infância, são comuns sintomas como dores de estômago e cabeça, além de náuseas (KOSSOWSKY *et al.*, 2013). Essas queixas somáticas podem não apenas representar um sintoma físico propriamente dito, mas também serem um reflexo de situações de separação, podendo representar uma estratégia de evasão, voltando a atenção para si em uma tentativa de reduzir o estresse das condições de separação (KOSSOWSKY *et al.*, 2013).

Estima-se que grande parte das crianças e adolescentes que apresentam transtornos de ASI podem apresentar déficit de aprendizado, tanto em curto quanto em longo prazo, por conta de reflexos indiretos de seus sintomas, que ocasionalmente gera exclusão entre colegas resultando em aversão escolar e convívio social (DREYER E KOHN, 2017, EHRENREICH *et al.*, 2008). Além disso, estes transtornos de ASI em jovens pode gerar prejuízos na alimentação e convívio familiar e social durante toda a vida adulta, incluindo instabilidade conjugal ((DREYER E KOHN, 2017, EHRENREICH *et al.*, 2008).

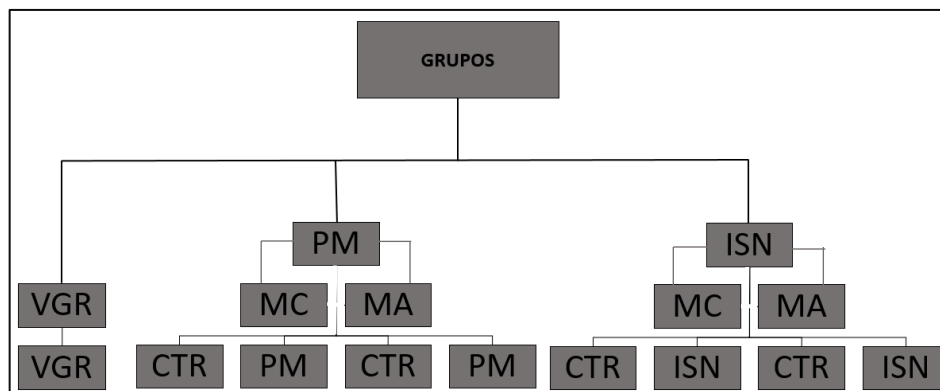
A presença da ASI é fortemente indicada como um dos fatores de risco para o desenvolvimento, na vida adulta, de diversos transtornos de ansiedade, sendo os principais o TP, além dos transtornos de humor (BORGES-AGUIAR *et al.*, 2018), existindo assim, uma possível relação direta entre os efeitos da ASI e um sistema de alarme de sufocamento, fortemente presente em indivíduos com TP, devido aos sintomas apresentados neste transtorno.

Além disso, Quintino-dos-Santos *et al.* (2014), em seu estudo utilizando modelo experimental de ASI, conhecido como isolamento social neonatal (ISN), mostraram que ratos isolados por cerca de três horas diárias, durante os primeiros 20 dias pós natal, apresentaram reduções acentuadas dos limiares dos comportamentos de defesa (imobilidade, exoftalmia, trote, galope e salto) produzidos pela estimulação elétrica da MCPD quando adultos se comparados aos irmãos da mesma ninhada que não passaram pelo isolamento.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. DELINEAMENTO ESPERIMENTAL

Figura 3. Fluxograma dos grupos experimentais



VGR- Virgem; CTR- Controle; INS- Isolamento social neonatal; PM-Privação materna.

5.2. ANINAIS

Ratos Wistar machos (n=15) e fêmeas (n=75) (primíparas), fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, foram mantidos em uma sala de circulação restrita. A sala era equipada com renovação periódica de ar e condições controladas de som, temperatura (23°C) e ciclo claro-escuro (12x12 horas, luzes acesas às 6h00min.), para acasalamento (PN60). As ratas grávidas eram alojadas individualmente em

caixas-ninho de polietileno (30x20x13cm) com água e comida *ad libitum*. As caixas foram limpas duas vezes por semana até o parto (PN0). Em PN1 foi realizada a sexagem e apenas os ratos machos foram utilizados para os seguintes protocolos abaixo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais em Pesquisa Científica (CEUA-UFES 34/2017).

5.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Experimento 1: Efeitos do ISN com reunião a mães anestesiadas (n=40) ou conscientes (n=42).

O momento de nascimento dos filhotes foi designado como PN0, ou seja, primeiro dia de vida da ninhada. Um dia após o nascimento da ninhada foi feita a sexagem, para a seleção apenas dos machos, este foi designado como PN1. O teste consistiu no isolamento de metade dos filhos de mãe, por três horas diárias entre PN2 e PN21.

Para o isolamento, foram utilizados metade dos filhotes da ninhada, sendo estes mantidos em “caixa de separação”, na qual alojou um filhote por caixa. Este grupo foi denominado grupo ISN. A outra metade da ninhada foi alocada, juntamente com a mãe, em uma “caixa separação” diferente da “caixa ninho”, com a finalidade de alteração do ambiente, assim como ocorreu para os filhotes separados. Este grupo de filhotes mais a mãe foi denominado grupo controle. Além disso, houve também um grupo de ratos que foram manuseados apenas para a limpeza de suas caixas ninhos, este foi denominado de grupo virgem (n=39).

Os filhotes isolados em caixas separadas (ISN) foram mantidos individualmente em caixas de polipropileno (30 x 20 x 13 cm) e transferidos para uma sala distinta do grupo controle. Esta sala possuía armário de separação com 24 compartimentos com renovação de ar e condições controladas de temperatura (23 – 26 °C) e luz (10 lux, com ciclo 12:12 horas e luzes acesas às 6h00min.). Este isolamento foi repetido diariamente, durante 20 dias (PN2 a PN21). Ao término de cada sessão de isolamento, o grupo ISN e o grupo controle eram novamente alocados para a caixa ninho.

O experimento foi conduzido em dois grupos de mães, sendo o primeiro com mães conscientes e o segundo grupo composto por mães anestesiadas. Neste último foi aplicada solução de cetamina (1.0 mL/kg, I.P) e xilazina (0.5 mL/kg, I.P) 20 minutos antes da reunião do grupo ISN com o grupo controle, com a finalidade de simulação de negligência materna. O grupo de ratos virgens não foi submetido ao experimento.

Quando adultos (PN60), as ninhadas do grupo ISN, controle e virgem foram submetidos à testes comportamentais de labirinto em cruz elevada (LCE), campo aberto (CA) e teste de preferência a sacarose (TPS). Após a realização dos testes comportamentais (PN61), os ratos foram sacrificados e a matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) foi coletada para análise de receptores e peptídeos de interesse.

Experimento 2: PM de 24 horas em PN9 com reunião a mães anestesiadas (n=48) ou conscientes (n=48).

O experimento de PM se deu de forma semelhante ao experimento de ISN, diferindo apenas na forma e tempo de separação entre a ninhada e a mãe. Neste experimento, os filhotes submetidos ao experimento foram mantidos juntos em uma única caixa de separação durante 24 horas em PN9.

Os ratos também foram separados em grupos controle, PM e virgens e as mães separadas em mães consciente e anestesiada.

5.4. TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes para a avaliação de ansiedade e depressão (LCE, CA e TPS) foram realizados nos ratos 40 dias após o término do ISN e da PM segundo os protocolos em uso no laboratório (BERNABÉ, 2013; BORGES-AGUIAR *et al.*, 2018; QUINTINO-DOS-SANTOS *et al.*, 2014).

Teste do labirinto-em-cruz-elevado (LCE): O nível basal de ansiedade do rato foi avaliado pelo LCE, baseando-se na aversão natural dos roedores aos espaços abertos. O equipamento é feito de madeira com revestimento de fórmica. O LCE é formado por 4 braços perpendiculares de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura situados a 70 cm do assoalho, dos quais 2 braços opostos apresentam paredes de 40 cm de altura (braços fechados) e 2 uma borda de apenas 1 cm de altura (braços abertos). Os braços se comunicam por uma plataforma central (10 x 10 cm). Os ratos eram colocados na plataforma central voltados para o braço fechado e observados durante 5 minutos, registrando-se os tempos de exploração no braço aberto (TBA) e no braço fechado (TBF) e tempo na plataforma central (TPC) e o número de entradas nos braços abertos (EBA) e braços fechados (EBF). A porcentagem de entradas no braço aberto (%EBA) e porcentagem de tempo no braço aberto (%TBA) foram calculados como $EBA/(EBA+EBF)$ e $TBA/(TBA+TBF)$, respectivamente. Os testes foram realizados numa sala com iluminação de 44 lux e filmados com uma câmera digital SONY (Modelo DSC-W70).

Teste do campo aberto (CA): Durante as sessões de CA o rato foi colocado no centro de um campo aberto com 1 m de aresta. O assoalho era dividido em 49 quadrados de 15 cm, dos quais nove compunham a região central e 40 a região periférica. Os testes eram realizados numa sala com luminosidade de 44 lux e filmados com uma câmera digital SONY (Modelo CM-910), por 5 minutos. Os comportamentos de defecação (número de bolos fecais), locomoção periférica (peritaxia) e central (centrotaxia) foram quantificados pela análise dos filmes.

$$\% \text{ entradas na área central} = (\text{Centrotaxia} \times 100) / (\text{Centrotaxia} + \text{peritaxia})$$

Teste de Preferência por Sacarose (TPS): Para realização deste teste, os ratos privados de água por 24 horas foram expostos a uma garrafa contendo solução de sacarose 1% e outra contendo água (WILLNER *et al.*, 1992) durante 24 horas. A preferência de sacarose foi avaliada através da pesagem das garrafas antes e depois do teste, usando-se a diferença para o cálculo, que foram feitos através da seguinte equação:

$$\% \text{ consumo de sacarose} = (\text{Consumo de sacarose} \times 100) / (\text{Consumo de água} + \text{sacarose})$$

5.5. AMOSTRA DE TECIDO E ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Coleta das amostras de tecido da MCPA: Aproximadamente um dia após os testes comportamentais, os animais eram pesados e sacrificados com guilhotina, removendo-se o cérebro rapidamente para preparação das amostras da MCPD. Foram feitas de 3 a 4 seções de 1 mm de espessura da MCPA. As fatias eram imediatamente estendidas sobre um papel de filtro umedecido com solução salina 0,9% sobre uma placa de Petri resfriada em gelo seco. As áreas identificadas como MCPD (colunas dorsomedial, dorsolateral e lateral da MCPA) eram

totalmente removidas com auxílio de perfurador de aço inoxidável. Em seguida as amostras eram congeladas à temperatura de -80°C até a realização das análises neuroquímicas.

Extração do RNA total: Os tecidos eram solubilizados em Trizol (1 ml) com o uso de um homogeneizador elétrico. Após a centrifugação do homogenato, o sobrenadante era adicionado ao clorofórmio (200 µL), agitado levemente, e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. A mistura era então centrifugada e a fase aquosa recuperada em isopropanol (500 µL) para precipitação do RNA. Após nova centrifugação, o precipitado era lavado com etanol 75% (1 mL) e novamente centrifugado. O RNA era então ressuscitado em 15 µL de água deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A concentração e a qualidade do RNA extraído foram verificadas por meio dos equipamentos NanoDrop™ e de eletroforese em gel de agarose, respectivamente.

Eletroforese em gel de Agarose: A qualidade do RNA foi analisada através de uma corrida em gel de agarose. O gel foi preparado a 1% em TAE (Tris-ácido acético EDTA), e a este foi adicionado 5 µL de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA). As amostras foram preparadas utilizando 1 µL de RNA, 2 µL de Loading Buffer e 9 µL de água DEPC. A corrida foi realizada a 80 V por 30 minutos, utilizando o TAE como tampão. As bandas foram observadas em um transluminador UV.

Síntese de cDNA: A síntese de cDNA foi realizada com o kit iScript[™] cDNA Synthesis (BioRad, EUA) usando o equipamento de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-rt) S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, EUA).

Reação de PCR em tempo real : Foram desenhados os iniciadores (primers) para analisar a expressão gênica de mRNA dos receptores 5-HT_{1A} e 5HT_{2C}, e dos peptídeos SP, ΔFosB e BDNF. As amostras de cDNA obtidas foram submetidas à reação de PCR em tempo real. Brevemente, as reações foram realizadas num volume total de 10 µL contendo 5 µL de SYBR Green Supermix 2x, 3,5 µL de água purificada, 0,5µL de cada iniciador a 10µM e 0,5 µL de cDNA. Foram realizados 45 ciclos após a desnaturação inicial de acordo com os seguintes parâmetros: 95°C (desnaturação); 60°C (anelamento) e 72°C (amplificação). Para garantir a qualidade da reação, as amostras eram preparadas em triplicata. A quantificação relativa da expressão gênica era feita pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando o gene da desidrogenase do gliceraldeído-3-fostato (GAPDH) para normalização dos dados.

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR): Amostragem DPAG - Estudos preliminares mostraram que os ensaios de RT-PCR exigiriam um pool de 5 a 6 ratos para compor cada dado de DPAG. Consequentemente, foram necessários 20 a 24 ratos para formar cada grupo de separação com 4 dados cada. O grupo denominado virgem utilizou-se um número maior de ratos. Consequentemente, cada dado correspondia a um conjunto de 5 a 6 ratos submetidos ao mesmo protocolo experimental.

Extração de RNA: O material de cada pool foi solubilizado em Trizol (500 µL, Sigma-Aldrich, EUA) e homogeneizado por 30 segundos (Pellet Pestle Motor, Kontes). O homogenato foi então centrifugado por 10 min a 12.000 ge 4 ° C (Eppendorf 5415 R, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante foi adicionado a 200 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), agitado, incubado à temperatura ambiente por 5 minutos e sujeito a centrifugação adicional (15 min a 12.000 ge 4 ° C). Para prosseguir com a precipitação do RNA, a fase aquosa foi recuperada em 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich) e sujeita a centrifugação adicional (10 min a 12.000 ge 4 ° C). Depois disso, o precipitado foi lavado com etanol a 75% (1 mL) e

sujeito a uma centrifugação mais suave (8.000 g, 5 min e 4 ° C). Finalmente, o RNA foi ressuspensão em 15 µL de água desionizada por dietilpirocarbonato (0,1%, DEPC, Sigma-Aldrich). A concentração e a qualidade do RNA foram verificadas por espectrometria (260 / 280nm) em um NanoDrop TM (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e uma eletroforese em gel de agarose-80-V 30 min (Biorad, OF, EUA) em 3- [N tampão de ácido morfolino] - propanossulfônico (MOPS). As bandas foram observadas no transluminador UV (302 nm, Biorad ChemiDoc TM XRS +).

Síntese complementar de DNA (cDNA): a síntese de cDNA foi realizada com o kit de síntese de cDNA iScript (BioRad, Irvine, EUA) em um equipamento de PCR S1000 Thermal Cycler PCR (BioRad, Irvine, EUA). As amostras de RNA (1 µL com 2 µg de RNA) foram submetidas ao seguinte protocolo: 5 minutos a 25 ° C (recozimento), 30 minutos a 42 ° C (transcrição reversa) e 5 minutos a 85 ° C (inativação da transcriptase). **Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR):** As amostras de cDNA foram amplificadas por RT-PCR usando o kit iQSYBR Green Supermix (Biorad, Irvine, EUA) e o equipamento de PCR em tempo real CFX96 (Biorad, Irvine, EUA). As reações foram realizadas em um volume total de 10 µL contendo 0,5 µL de cDNA, 5 µL de SYBR Green Supermix 2x, 3,5 µL de água purificada e 0,5 µL de cada primer (10 µM). Foram realizados 40 ciclos após a desnaturação inicial, de acordo com os seguintes parâmetros: 95 ° C (desnaturação, 15 s); 60 ° C (anelamento, 30 s) e 72 ° C (amplificação, 30 s). Para garantir a qualidade da reação, as amostras foram preparadas em triplicado. A quantificação relativa da expressão genômica foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, usando o gene da gliceraldeídos-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, Exxtend, Paulinia, BR) para normalização dos dados (CAMPOS *et al.*, 2013). As sequências iniciadoras (5HT1A, 5HT2C, SP, BDNF e FosB) foram projetadas usando o site da Integrated DNA Technologies. Todos os produtos amplificados têm entre 70 e 200 pb.

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação dos tratamentos e identificação dos seus efeitos, foram aplicadas análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Os níveis de significância adotados foram de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

Os efeitos do isolamento social neonatal (ISN), privação materna (PM) e da atenção materna (MC – mãe consciente, MA - mãe anestesiada), no momento da reunião do filhote isolado à mãe, sobre o peso dos ratos adultos mostraram que os grupos submetidos ao protocolo de 20 dias (ISN) apresentaram pesos significativamente diferentes ($p < 0,01$), sendo que os ratos do grupo ISN apresentaram redução no peso quando comparados aos ratos virgem (VGR) (Figura 4). A redução do peso em relação ao grupo controle (CTR) foi observada apenas nos ratos ISN-MC ($p < 0,005$). Já para o protocolo de PM, houve diferença significativa apenas entre os ratos CTR-MA ($p < 0,01$) e PM-MA ($p < 0,05$) quando comparados aos ratos VRG, sendo os ratos submetidos ao tratamento com o peso menor (Figura 4).

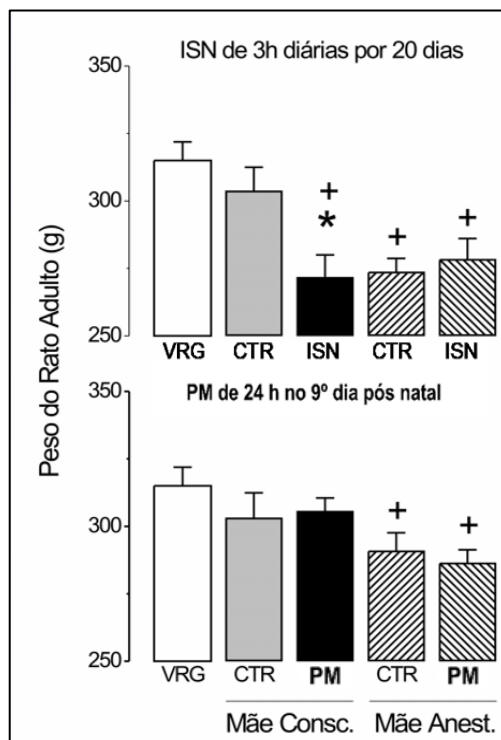
Já em relação aos testes comportamentais, não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das variáveis para o protocolo de PM (Figura 5). Entretanto, os ratos submetidos ao protocolo de ISN apresentaram aumentos significativos na exploração da área periférica

(Peritaxia - PTX) do CA ($p<0.02$) quando comparado ao grupo VGR. Para os testes com o labirinto em cruz elevado, foram observados aumentos significativos da entrada do braço fechado (EBF) para os grupos CTR-MC ($p<0,04$), ISN-MC ($p<0,02$) e CTR-MA ($p<0,001$) quando comparados ao grupo VGR (Figura 4). A porcentagem de tempo no braço aberto (TBA) apresentou aumento significativo apenas do grupo CTR-MA em relação aos ratos VRG ($p<0.007$) e a porcentagem da entrada do braço aberto (EBA) apresentou padrão semelhante à EBF, apresentando aumentos significativos para os grupos CTR-MC ($p<0,05$), ISN-MC ($p<0,001$) e CTR-MA ($p<0,001$) quando comparados ao grupo VGR (Figura 6).

Os efeitos dos tratamentos aplicados sobre os comportamentos dos ratos no TPS mostraram que, houve redução significativa na preferência por sacarose (%) ($p<0,05$) e diferença sacarose (sacarose-menos-açúcar) ($p<0,01$) apenas nos grupos CTR-MA em relação ao grupo VGR, em ambas as variáveis para o protocolo ISN (Figura 5). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos submetidos ao protocolo PM (Figura 7).

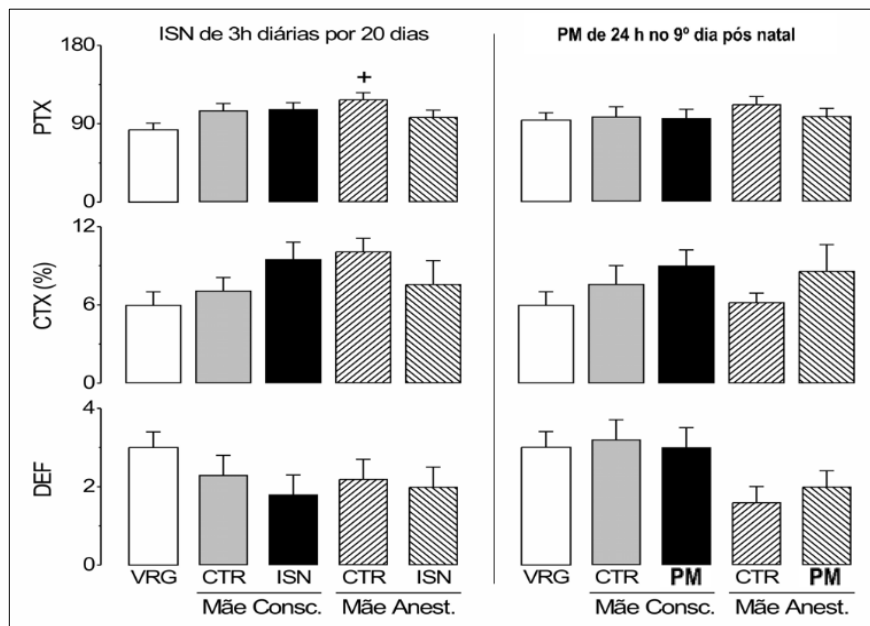
Em relação as análises bioquímicas, a expressão do mRNA dos receptores 5-HT1a e 5-HT2c e dos neuropeptídeos SP e Δ FosB na MCPD, não apresentaram nenhuma alteração significativa nos ratos submetidos ao ISN e PM. Também não foi observado efeito da falta de atenção materna (mãe anestesiada ou consciente) no momento da reunião (Figuras 8 e 9) para estas variáveis. Entretanto, os níveis de mRNA para BDNF nos grupos controle foram ligeiramente reduzidos quando comparados ao grupo VRG (Figura 9).

Figura 4 – Efeitos do isolamento social neonatal (ISN) de 3 h diárias e privação materna (PM) 24 h entre PN2 e PN21 sobre o peso dos ratos adultos.



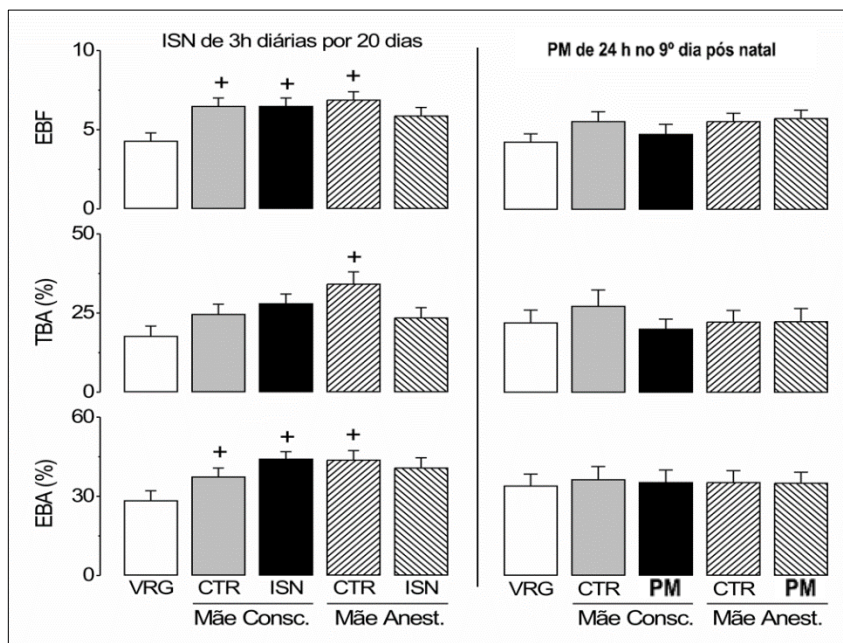
VGR – Virgem; CTR- Controle; INS- Isolamento social neonatal; PM-Privação materna. +P<0,05, diferente dos ratos VRG, * P<0.05, diferente dos ratos CTR do mesmo grupo materno.

Figura 5 – Efeitos do ISN (3h/dia por 20 dias), PM (24h/PN9) e atenção materna, sobre o comportamento dos ratos adultos no campo-aberto (CA).



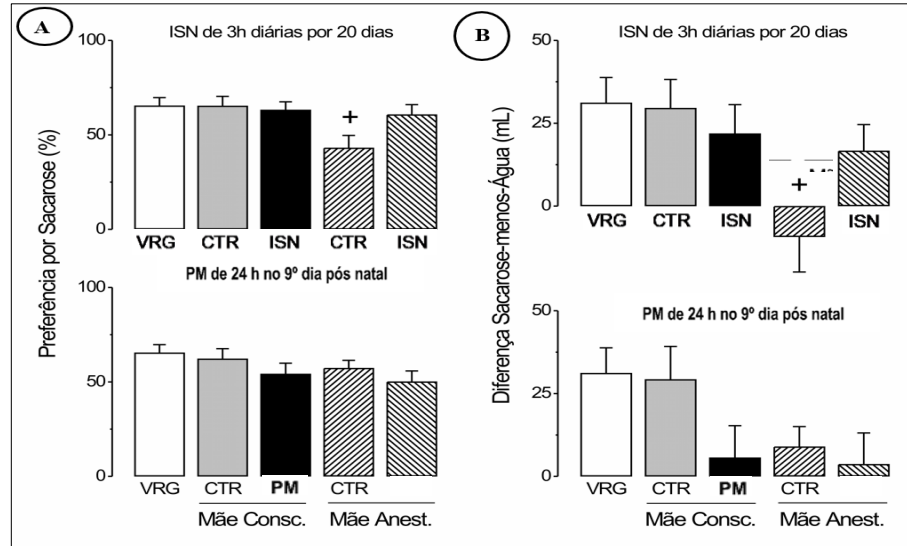
PTX – atividade na periferia do CA (peritaxia), CTX – atividade no centro do CA (centrotaxia), DEF – defecação (número de bolos fecais), VGR – Virgem; CTR- Controle; INS- Isolamento social neonatal; PM-Privação materna. +P<0,05, diferente dos ratos VRG.

Figura 6 – Efeitos do ISN (3h/dia por 20 dias), PM (24h/PN9) e atenção materna, sobre o comportamento dos ratos adultos no labirinto-em-cruz elevado (LCE).



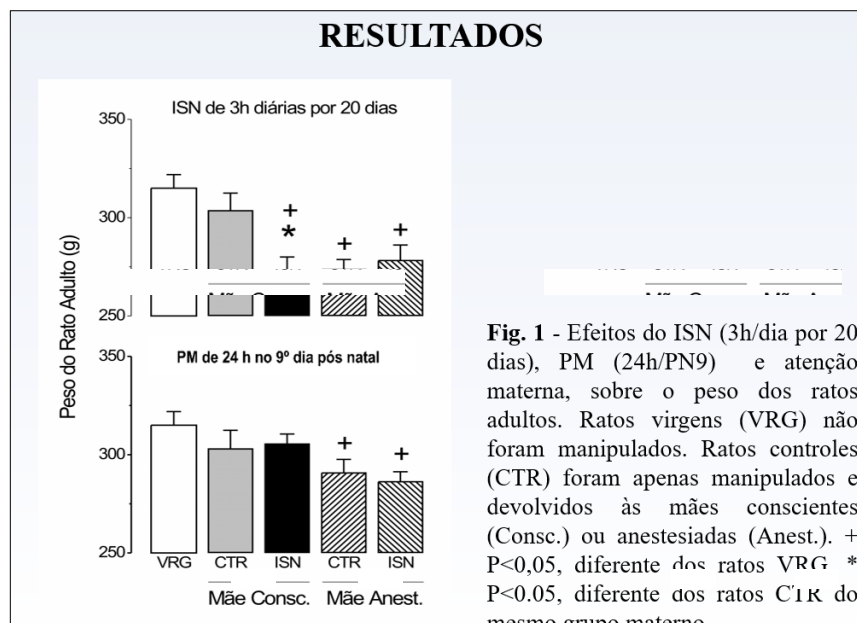
EBF – número de entradas nos braços fechados; TBA(%) –porcentagem do tempo nos braços abertos; EBA(%) - porcentagem das entradas nos braços abertos. VGR – Virgem; CTR- Controle; INS- Isolamento social neonatal; PM-Privação materna. +P<0,05, diferente dos ratos VRG.

Figura 7 – Efeitos do ISN (3h/dia entre PN2/PN21 e 24h/PN9) e atenção materna, sobre o teste de anedonia. A) preferência percentual por sacarose dos ratos adultos; B) Diferença entre consumo de sacarose e água.



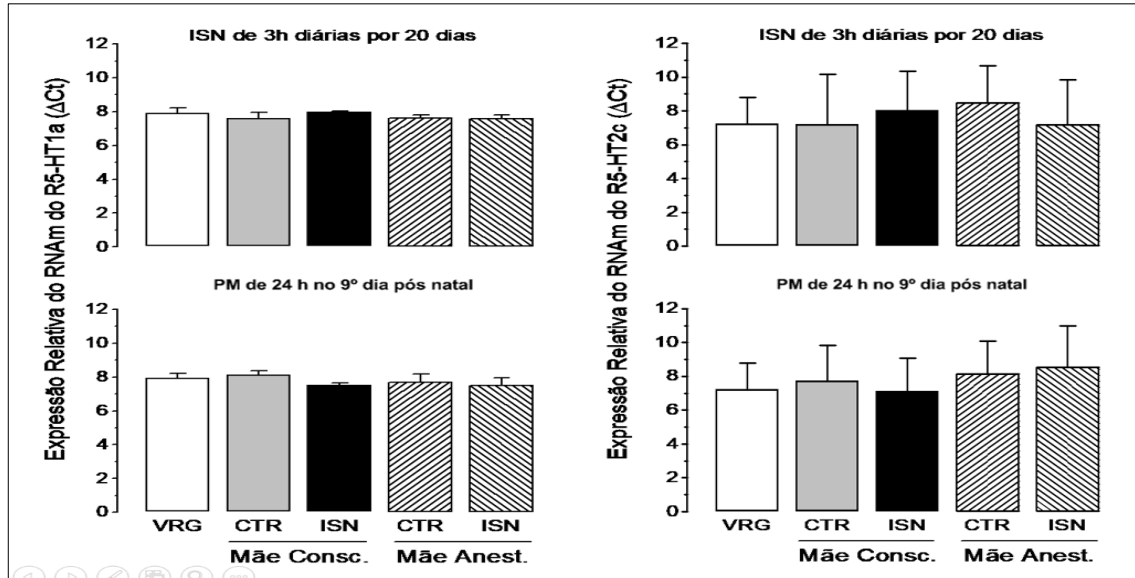
VRG – Virgem; CTR- Controle; INS- Isolamento social neonatal; PM-Privação materna. +P<0,05, diferente dos ratos VRG.

Figura 8 – Expressão relativa do mRNA dos receptores 5-HT1A (esquerda) e 5-HT2C (direita) de ratos submetidos ao ISN (3h/dia por 20 dias) ou PM (24h/PN9) e atenção materna.



VRG – Virgem; CTR- Controle; INS- Isolamento social neonatal; PM-Privação materna. As colunas indicam a diferença entre o número de ciclos necessários para a detecção do mRNA dos receptores serotoninérgicos em relação ao gene padrão da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Figura 9 – Expressão do mRNA do BDNF (A), DFos-B (B) e SP (C) da MCPD de ratos submetidos ao ISN (3h/dia por 20 dias) ou PM (24h/PN9), e reunidos a mães conscientes ou anestesiadas.



VGR – Virgem; CTR- Controle; INS- Isolamento social neonatal; PM-Privação materna. As colunas indicam a diferença entre o número de ciclos necessários para a detecção do mRNA do neuropeptídeo em relação ao gene padrão da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

7. DISCUSSÃO

A hipótese inicial busca evidenciar a relação entre os transtornos de ansiedade de separação na infância e a expressão de neuropeptídeos e receptores serotoninérgicos na matéria cinzenta periaquedutal de ratos adultos submetidos a modelos que induzem o desenvolvimento de ansiedade na vida adulta. Os testes comportamentais aplicados, são capazes de detectar traços ansiosos e depressivos nos grupos de ratos submetidos aos protocolos.

Os dados apresentados no presente estudo mostraram que ratos os adultos submetidos aos protocolos de isolamento social neonatal mãe consciente e mãe anestesiada e mãe anestesiada privação materna e controle apresentaram redução de peso em relação aos grupos virgens, sugerindo que a separação materna e/ou a baixa assistência materna mãe anestesiada, promoveram redução do apetite quando adultos.

Embora a ansiedade basal não tenha aumentado, em nenhum protocolo de separação, o teste de preferência a sacarose evidenciou uma queda no consumo de sacarose nos grupos privação materna (mãe consciente ou anestesiada) e controle mãe anestesiada (isolamento social neonatal ou privação materna), sugerindo o desenvolvimento de anedonia (falta de prazer) e um possível quadro depressivo. Estes resultados sugerem que ansiedade, anedonia e ganho de peso são governados por fatores relativamente independentes assim como observado por Borges-Aguiar *et al.* (2018).

O aumento na peritaxia (PTX) foi o único efeito significativo no comportamento dos ratos adultos isolamento social neonatal em campo aberto. Contudo, a PTX aumentou apenas em ratos controle mãe anestesiada e marginalmente em controle mãe consciente e isolamento social neonatal mãe consciente. Como a porcentagem não diferiu, os aumentos de PTX não parecem ser devidos a redução na ansiedade em um ambiente novo aberto. Em contraste, a privação materna não teve efeito algum no desempenho dos ratos no campo aberto. A ausência de resultados ansiogênicos corrobora com estudos anteriores de Borges-Aguiar *et al.*, 2018 e Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014.

Os dados do teste de labirinto em cruz elevado mostraram que os níveis de ansiedade dos grupos isolamento social neonatal mãe consciente, controle mãe consciente e controle mãe-anestesiada foram ligeiramente menor se comparado ao grupo virgem, conforme indicado pelo aumento da entrada do braço aberto, pode se observar também que os níveis de ansiedade não mudaram nos ratos com privação materna (mãe consciente-mãe anestesiada). A falta desses efeitos ansiogênicos corrobora com as observações feita por Borges-Aguiar *et al.* (2018) e Quintino-dos-Santos *et al.* (2014).

Estudos recentes mostraram que, ratos adultos submetidos a privação materna, com mãe consciente, durante a lactação (3 horas, PN2-PN21) apresentam pesos significativamente maiores que os ratos controles (BORGES-AGUIAR *et al.*, 2018). Entretanto, no presente estudo, o peso dos ratos adultos do grupo isolamento social neonatal mãe consciente e isolamento social neonatal mãe anestesiada apresentou redução quando comparado aos ratos virgens (VGR) e não foi observado alterações para o peso dos ratos adultos submetidos ao protocolo PM em relação aos ratos VGR.

Vale ressaltar que, os ratos do grupo isolamento social neonatal, do presente estudo, foram submetidos a separações maternas com a mesma duração (3 h) e período (período pós- natal 2-21 (PN2-PN21)) dos ratos PM do estudo de citado anteriormente. Dessa forma, os resultados opostos podem ser atribuídos às separações individuais e coletiva desses estudos, respectivamente.

Essas observações estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que ratos submetidos a períodos repetidos de privação materna durante a lactação apresentaram ganhos de peso significativamente maiores do que os de ratos controle (ALCÁNTARA-ALONSO, 2017). No presente estudo, também houve maior ganho de peso nos ratos pertencentes ao grupo privação materna, corroborando os dados de Borges-Aguiar *et al.* (2018).

Schanberg *et al.* (2003) mostraram que, quando separados da mãe, os filhotes apresentavam níveis reduzidos de hormônio do crescimento, prolactina e ornitina descarboxilase (ODC), entretanto, apresentavam um aumento “compensatório” de ODC após a reunião com mãe. Esses dados sugerem que, apenas a falta de alimentação durante a separação não foi suficiente para a redução do peso, sendo a presença dos irmãos o fator que desempenhou o papel mais importante no ganho de peso e nos efeitos comportamentais de ratos adultos.

Notavelmente, também, os ratos adultos virgem apresentaram pesos significativamente maiores que os ratos controle -mã anestesiada nos protocolos isolamento social neonatal e privação materna. Como os ratos controle- mãe anestesiada não foram separados o menos ganho de peso deve ser atribuído à falta de cuidados maternos (mã anestesiada). Por outro lado, embora o peso do adulto tenha sido marcadamente reduzido no isolamento social neonatal (mãe consciente e mãe anestesiada) e no respectivo grupo controle- mãe anestesiada a anedonia foi

observada apenas no último grupo. Por outro lado, os ratos adultos PM-MC apresentaram ganho de peso normal, apesar de terem sido observados traços de anedonia, sintoma presente no transtorno depressivo maior (KENDLER, 2017).

Embora haja trabalhos mostrando redução significativa da expressão de receptores serotoninérgicos em regiões do córtex pré-frontal de ratos submetidos à privação materna (OHTA *et al.*, 2014), sugerindo efeitos diferentes em comparação ao isolamento social neonatal, os resultados mostraram não haver diferença significativas na expressão do mRNA dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C}, para nenhum dos protocolos aplicados. Apesar de haver diferentes protocolos para PM e ISN, o que acaba dificultando as comparações entre resultados, o fato de o período utilizado para os testes (período hiporresponsivo ao estresse) serem comuns a muitos estudos faz com que comparações sejam possíveis, dadas as limitações.

Contradizendo a hipótese inicial que o isolamento social neonatal e a privação materna, causariam um aumento da expressão gênica dos receptores serotoninérgicos e uma regulação inversamente proporcional dos neuropeptídeos Substância P e Δ FosB, o presente estudo não observou efeitos significativos para os receptores 5-HT tanto para a PM quanto para o isolamento social neonatal, e também para atenção materna no momento de reunião dos filhotes. Esta falta de alteração significativa pode corroborar os trabalhos de Ohta *et al.* (2014) e Rebello *et al.* (2014) que mostraram que a expressão de mRNA dos receptores 5-HT também são dependentes da idade dos ratos e não apenas do período de separação dos filhotes com a mãe.

Assim como observado por Borges-Aguiar *et al.* (2018) e Quintino-dos-Santos *et al.* (2014), que sugeriram a falta de participação de BDNF e receptores serotoninérgicos nos efeitos anteriores de pânico e depressão, em seus trabalhos com separação materna, os resultados também sugerem essa falta de relação. Apesar de ter sido observado uma discreta redução dos níveis de BDNF e receptores serotoninérgicos, os tratamentos aplicados não influenciaram fortemente a expressão de mRNA dos neuropeptídeos avaliados na (matéria cinzenta periaquedutal dorsal) MCPD. Este fato pode ser corroborado pela falta de relação entre os níveis de BDNF e o número de ataques de pânico induzidos, conforme também foi observado no trabalho de Maron *et al.* (2009).

Embora a proteína Δ FosB consiga permanecer em tecido neural por bastante tempo, seu mRNA é bastante instável e de fácil degradação (RUFFLE, 2014) o que o tornaria bom indicador de efeitos imediatos a respeito dos protocolos privação materna e isolamento social neonatal. De fato, a não alteração nos níveis de expressão de Δ FosB, assim como evidências apresentadas (LIPPMANN *et al.*, 2007; RUFFLER, 2014), mostram que a separação na infância não reflete nas alterações deste neuropeptídeo na vida adulta.

Berton *et al.* (2007) mostraram que há uma relação inversa entre os níveis de Δ FosB e SP, porém este fato não foi observado no presente estudo, uma vez que ambas as substâncias permaneceram sem grandes variações entre os grupos de ratos submetidos ao isolamento social neonatal ou privação materna em comparação aos ratos controle e virgem. Estes resultados corroboram os dados obtidos por Teng *et al.* (2016), que mostraram não haver alterações significativas na expressão de SP no tronco cerebral de ratos adultos submetidos à privação materna de 3 horas diárias entre PN2 e PN21.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalhos que buscam relacionar modelos de ansiedade e depressão com os níveis de neurotransmissores e seus receptores são de fundamental importância para o entendimento da fisiologia e neuroquímica destes transtornos e, a partir daí, buscar desenvolver novos tratamentos. Os resultados refutaram a hipótese inicial, uma vez que não houveram alterações significativas na expressão gênica de receptores serotoninérgicos, em ratos adultos, submetidos aos protocolos isolamento social neonatal e privação materna, além de não ter sido observado relação significativa entre os neuropeptídeos substância P e Δ FosB. Entretanto, foi evidenciada uma tendência dos ratos à depressão na vida adulta, fato corroborado pela perda de peso e presença de anedonia. O presente estudo cria base para trabalhos futuros com o intuito de desenvolver novas hipóteses afim de desvendar as bases bioquímicas que possam controlar o aumento de serotonina em indivíduos ansiosos.

9. REFERÊNCIAS

HENCKES, A. C. C.; MACEDO, M. L. W. S. Ansiedade e gestalt-terapia. **Boletim Entre SIS, Santa Cruz do Sul**, v. 2, p. 44-51, n. 1, jul. 2017.

ALCÁNTARA-ALONSO, V. Altered functionality of the corticotrophin-releasing hormone receptor-2 in the hypothalamic paraventricular nucleus of hyperphagic maternally separated rats. **Neuropeptides**, v.63, p.75-82, 2017.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th Edition, American Psychiatric Association, Washington, 2013.

ANDRADE, J.V. *et al.* Ansiedade, um dos problemas do século XXI. **Revista de saúde da reAGES. Paripiranga**, v.2, n.4, p.34-39, jan/jun. 2019.

ARMINI, R. DE S. *et al.* In a rat model of panic, corticotropin responses to dorsal periaqueductal gray stimulation depend on physical exertion. **Psychoneuroendocrinology**, v.53, p.136–14, 2015.

ASBAHR, F.R. Transtornos ansiosos na infância e adolescência: aspectos clínicos e neurobiológicos. **Jornal de Pediatria**. v. 80, n.2, p.8-34, 2004.

PRADO, M.B. **Desenvolvimento de um modelo experimental de pânico situacional**. 2018. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

BATISTA, A.S. **Papel dos receptores do tipo 5-HT₃ na área septal medial sobre o controle da pressão sanguínea, do apetite por sódio e da ingestão hídrica**. 2012. 63f. Dissertação. (Mestrado em Patologia Humana). Curso de pós graduação em patologia humana, Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

BATISTA, L.A.C.S.B. **Neurociências Papel do sistema endocanabinoide em modelos animais de ataque de pânico**. 2017. 109f. Tese. (Neurociências) - Programa de pós-graduação em neurociências, Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de ciências biológicas, Belo Horizonte, 2017.

BÉRIA, P.L. **Subtipo respiratório do transtorno do pânico: fosfato sérico como preditor de resposta à terapia cognitivo-comportamental**. 2018. 66f. Dissertação (Mestrado em psiquiatria e ciências do comportamento) – Faculdade de medicina, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2018.

BERNABÉ, C.S. **Efeitos agudos e crônicos da fluoxetina em modelos experimentais de pânico, ansiedade e depressão em ratos adultos submetidos ao isolamento social neonatal**. 2013. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade do Espírito Santo, Vitória. 2013.

BERTON, O. *et al.* Induction of deltaFosB in the periaqueductal gray by stress promotes active coping responses. **Neuron**, v.55, n.2, p.289-300, 2007.

BLAKELY, R.D. *et al.* Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. **The Journal of Experimental Biology**, v.196, p.263-81, 1994.

BORGES-AGUIAR, A.C., *et al.* Daily maternal separations during stress hyporesponsive period decrease the thresholds of panic-like behaviors to electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray of the adult rat. **Behavioural Brain Research**, v.344, p.132–144, 2018.

BOROWSKY, B.; HOFFMAN, B.J. Neurotransmitter Transporters: Molecular Biology, Function, and Regulation. **International Review of Neurobiology**, v. 38, p.139–199, 1995.

BRODIN, E., *et al.* Effects of sequential removal of rats from a group cage, and of individual housing of rats, on substance P, cholecystokinin and somatostatin levels in the periaqueductal grey and limbic regions. **Neuropeptides**, v.26, n.4, p. 253-260, 1994.

CAÍRES, M.C.; SHINOHARA, H. Transtornos de Ansiedade na Criança: Um olhar nas comunidades. **Revista brasileira de terapias cognitivas**, v.6, n.1, p.62-84, 2010.

CANTERAS, N. S.; GAEFF, F. G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: Implications for panic disorder. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.46, p.352–364, 2014.

COOPER, J.; BLOOM, F.; ROTH R. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. 6 edition. 1991.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v.5, n.4, p.305–315, 1991.

DREYER, B.; KOHN,P.A. Transtorno de ansiedade infantil na terceira infância: uma revisão bibliográfica. **Anuário Pesquisa E Extensão Unoesc São Miguel Do Oeste**. v. 2, p.1-13, 2017.

DUMONT, F. S.; BIANCARDI, V.; KINKEAD, R. Hypercapnic ventilatory response of anesthetized female rats subjected to neonatal maternal separation: Insight into the origins of panic attacks? **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v.175, n. 2, p. 288–295, 2011.

EBNER, K.; SINGEWALD, N. **The role of substance P in stress and anxiety responses.** *Amino Acids*, v.31, n.3, p.251–272, 2006.

EHRENREICH, J. T.; SANTUCCI, L. C.; WEINER, C. L. Separation Anxiety Disorder in Youth: Phenomenology, Assessment, and Treatment. **Psicol Conductual**. v.16, n.3, p.389–412, 2008.

KARIMIAN, M. *et al.* **Social isolation is associated with reduced neurogenesis, impaired spatial working memory performance, and altered anxiety levels in male rats.** *Open Access Animal Physiology*, p.87 – 95, 2015.

FEINSTEIN, J. S. *et al.* Fear and panic in humans with bilateral amygdala damage. **Nature Neuroscience**, v.16, n.3, p.270–272, 2013.

FLEITLICH-BILYK, B.; GOODMAN, R. Prevalence of Child and Adolescent Psychiatric Disorders in Southeast Brazil. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v.43, n.6, p.727–734. 2004.

FONSECA, A. A. C. *et al.* Asma e transtornos psiquiátricos: uma revisão da literatura. **Diversitates International Journal**. v.11, n.1, p.74-89, 2019.

FREIRE, R.C.; NARDI, A.E. Panic disorder and the respiratory system: clinical subtype and challenge tests. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. São Paulo, v. 34, n.1, p. 32-41, Jun. 2012.

FREUD, S. On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as “anxiety neurosis” (Angstneurose) 1896. In: The major works of Sigmund Freud, great books of western world Encyclopedia Britannica, London, 1978.

GRAEFF, F.G. Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 25, n 2, p.42-45, dez. 2003.

HOYER, D.; HANNON, J.P.; MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.71, n.4, p.533–554, 2002.

KATZUNG, B. G.; TREVOR. A. J. Farmacologia básica e clínica, 13º ed. McGraw. Porto Alegre, 2017.

KALBOUNEH, H.M; ALZGHOUL, L.A. Neonatal Exposure to Citalopram Increases Pyramidal and Granular Cell Density in Dorsal Hippocampus of Male but not Female Adult Rats: A Quantitative Nissl Study. **International Journal of Morphology**, v.37, n.2, p.576-583, jun. 2019.

KENDLER, K. S. The genealogy of major depression: symptoms and signs of melancholia from 1880 to 1900. **Molecular Psychiatry**, v.22, n.11, p.1539–1553. 2017.

KLEIN, D. F. False Suffocation Alarms, Spontaneous Panics, and Related Conditions. **Archives of General Psychiatry**, v.50, n.4, p.306-317, 1993.

KLEIN, D. F. Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. **Psychopharmacologia**. New York, v.5, n.6, p.397–408, 1964.

KOSSOWSKY, J. *et al.* The Separation Anxiety Hypothesis of Panic Disorder Revisited: A MetaAnalysis. **The American Journal of Psychiatry**, v. 170, n.7, p. 768-81, 2013.

LENHARDTK, G.; CALVETTI, P.Ü. Quando a ansiedade vira doença? Como tratar transtornos ansiosos sob a perspectiva cognitivo-comportamental. **Aletheia**. v.50, n.1-2, p.111-122, jan/dez. 2017.

LI, M. *et al.* The role of brain-gut peptides in mood disorders. **Biomedical Research**. v.28, n.13, maio, 2017. <<https://www.biomedres.info/biomedical-research/the-role-of-braingut-peptides-in-mood-disorders-7822.html>> Acesso em: 16 mar. 2020.

LIPPMANN M. *et al.* Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. **European Journal of Neuroscience**. v.25, p.3091-3098, 2007.

MANGOLINI, V. I.; Andrade, L. H.; Wang, Y. P. Epidemiologia dos transtornos de ansiedade em regiões do Brasil. **Revista de Medicina**. São Paulo, v.98, n.6, p.415–422, nov/dez. 2019.

MARON, E. *et al.* CCK-4- induced anxiety but not panic is associated with serum brain-derived neurotrophic factor in healthy subjects. **Journal Psychopharmacol.** v.23, p.460-464. 2009.

NASHOLD, B.S.; WILSON, W.P.; SLAUGHTER, D.G. Sensations Evoked by Stimulation in the Midbrain of Man. **Journal of Neurosurgery**, v.30, n.1, p.14–24, 1969.

NESTLER, E. J. Δ FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. **European Journal of Pharmacology**. V.15, p. 66-72, apr. 2015.

OHTA, K. Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v.33, p.15-21, out. 2014.

ORGILÉS, M. *et al.* Maternal Anxiety and Separation Anxiety in Children Aged Between 3 and 6 Years. **Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics**. v.39, n.1, p 1-8, jun. 2018

PAUL, E.D., JOHNSON, P.L.; SHEKHAR, A.; LOWRY, C. A. The Deakin/Graeff hypothesis: Focus on serotonergic inhibition of panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. Colorado, v.46, p.379–396, 2014.

PINHEIRO, I. L.*et al.* Atividade serotoninérgica perinatal: um fator decisivo para o controle da ingestão alimentar. **Revista Nutrição**. Campinas, v. 30, n. 4, p. 535-544, ago. 2017.

PINHEIRO, A.L.P. **Intervenções não-farmacológicas na redução da ansiedade em enfermagem de saúde mental**. 2018. 171f. Dissertação (Mestrado em enfermagem) - Área de Especialização de Enfermagem de Saúde Mental e Psiquiatria, Escola superior de enfermagem de Lisboa, Lisboa, 2018.

PINTO, J. C. *et al.* Ansiedade, depressão e stresse: um estudo com jovens adultos e adultos portugueses. **Psicologia, Saúde & Doenças**, Lisboa, v. 16, n. 2, p.148-163, set. 2015.

PRETER, M. *et al.* Controlled cross-over study in normal subjects of naloxone-preceding-lactate infusions; respiratory and subjective responses: relationship to endogenous opioid system, suffocation false alarm theory and childhood parental loss. **Psychological Medicine**. Cambridg, v.41, n.2, p.385–393, 2011.

PRETER, M.; KLEIN, D. F. Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v.32, n.3, p. 603–612, 2008.

QUINTINO-DOS-SANTOS, J.W., *et al.* Evidence That the Periaqueductal Gray Matter Mediates the Facilitation of Panic-Like Reactions in Neonatally-Isolated Adult Rats. **PLoS ONE**, v.9, n.3, p. 1-9, mar. 2014.

RAYMOND, J.R. *et al.* Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacology & Therapeutics**, v.92 n.2-3, p.179–212, 2001.

REBELLO, T.J. *et al.* Postnatal day 2 to 11 constitutes a 5-HT-sensitive period impacting adult mPFC function. **Journal of Neuroscience**. v. 34, n.17, p.12379-12393, 2014.

ROBERSON-NAY, R.; LATENDRESSE, S. J.; KENDLER, K. S. A latent class approach to the external validation of respiratory and non-respiratory panic subtypes. **Psychological Medicine**. Cambridg, v.42, n.3, p.461–474, 2012.

RODRIGUEZ-NARANJO,M.I. *et al.* Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. **Food chemistry**, v. 126, p. 1608-1613, 2011.

ROSA, C.A. **Efeitos tardios do isolamento social neonatal e do desamparo aprendido sobre os níveis tissulares e taxa de renovação da serotonina das regiões dorsal e ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal de ratos**. 2012. 121f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade do Espírito Santo, Vitória. 2012.

RUFFLER, J.K. Molecular neurobiology of addiction: what's all the (Δ)FosB about?. **The American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, v.40, n.6, 2014.

SCHANBERG, S. M. *et al.* PKC α Mediates Maternal Touch Regulation of Growth-Related Gene Expression in Infant Rats. **Neuropsychopharmacology**, v.28, n.6, p.1026–1030. 2003.

SCHENBERG, L.C. *et al.* Modeling panic attacks. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v.25, p.647-659, 2001.

SCHENBERG, L.C. *et al.* Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. **Psychopharmacology**. v.159, p.138-144, 2002.

SCHENBERG, L. C. *et al.* Translational approach to studying panic disorder in rats: Hits and misses. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.46, p.472–496, 2014.

SCHIELE, M.A., *et al.* A neurobiological framework of separation anxiety and related phenotypes. **European Neuropsychopharmacology**. v.000, p. 1-13, fev. 2020.

SCHIMITEL, F.G. *et al.* Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. **Neuroscience**, v.200, p.59–73, 2012.

SCHIMITEL, F.G. *et al.* Evidence of a suffocation alarm system sensitive to clinically-effective treatments with the panicolytics clonazepam and fluoxetine. **Journal of Psychopharmacology**, v.28, n.12, p.1184-1188, 2014.

SGHENDO, L.; MIFSUD, J. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.64, n.3, p.317–325, 2012.

ST-PIERRE, J. *et al.* Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. **Placenta**. v.48, p. 66–71, 2016.

TENG, W. *et al.* Expression and distribution of SP and its NK1 receptor in the brain-gut axis in neonatal maternally separated rat model with visceral hypersensitivity. **Genetics and Molecular Research**. v.15, n.3, 2016.

TENORIO-LOPES, L. *et al.* Neonatal maternal separation opposes the facilitatory effect of castration on the respiratory response to hypercapnia of the adult male rat: Evidence for the involvement of the medial amygdala. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 29, n. 12, p. 1-37. out. 2017.

Vargas, L.C. & Schenberg, L.C. Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. **Psychopharmacology**. v.155, p.260-268, 2001.

VELASQUEZ, J.C.; GOEDEN, N.; BONNIN, A. Placental serotonin: implications for the developmental effects of SSRIs and maternal depression. **Frontiers in cellular neuroscience**. V.7, n. 47, p. 1-7, abr. 2013.

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic Mild-Stress- Induced Anhedonia: A realistic animal model of depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.16, p.525-534, 1992.

ZIEGLGÄNSBERGER, W. Substance P and pain chronicity. **Cell and Tissue Research**. v.375, p.227–241, 2019.