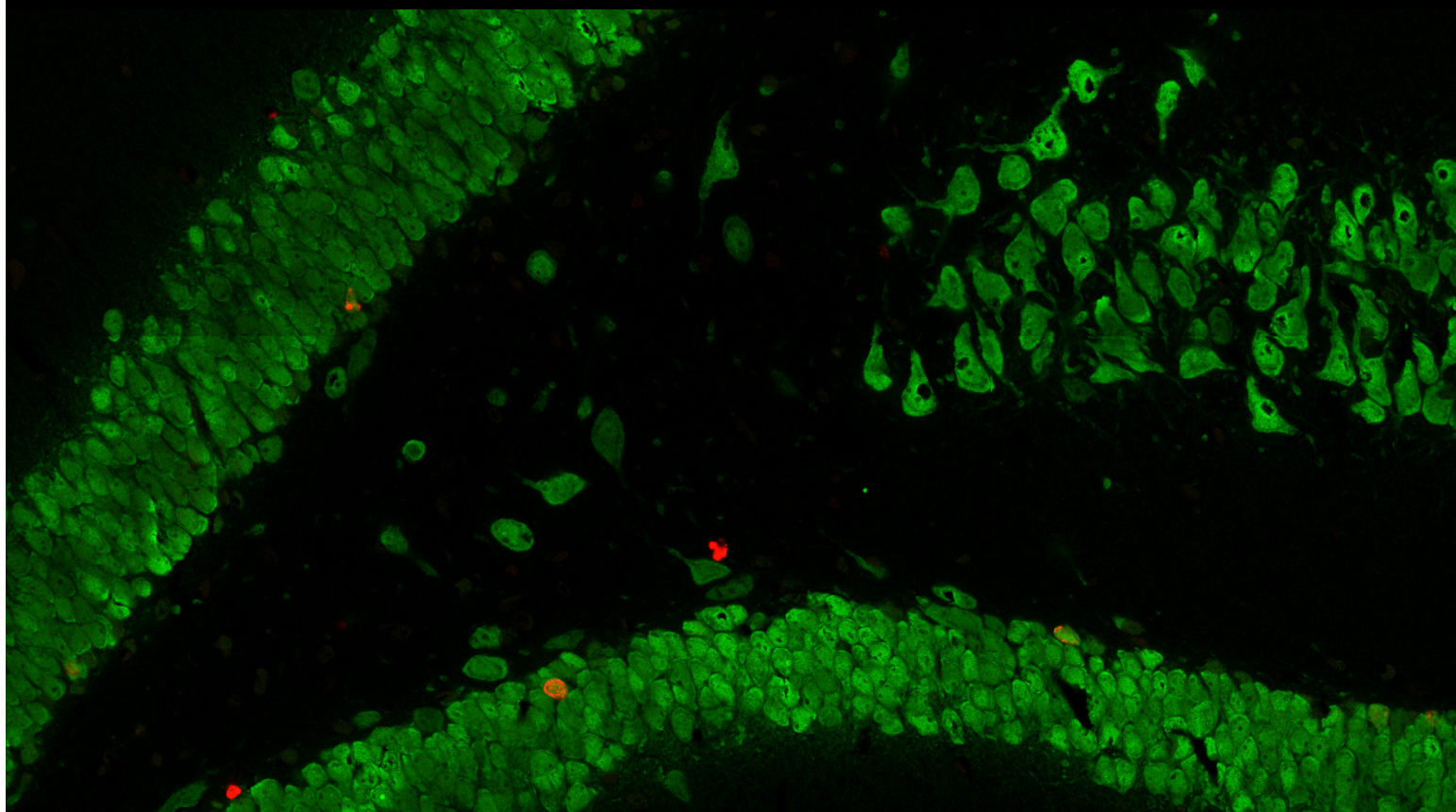


UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

SUÉLEN MERLO

Neurogênese e plasticidade sináptica no Hipocampo de ratos  
submetidos à separação materna e enriquecimento ambiental



RIBEIRÃO PRETO

2014

SUÉLEN MERLO

Neurogênese e plasticidade sináptica no Hipocampo de ratos submetidos  
à separação materna e enriquecimento ambiental

Tese apresentada ao Departamento de Neurociências e  
Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Neurologia

Subárea: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Moreira

RIBEIRÃO PRETO

2014

## FOLHA DE APROVAÇÃO

MERLO, Suélen

Neurogênese e plasticidade sináptica no Hipocampo de ratos submetidos à separação materna e enriquecimento ambiental.

Tese apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Neurologia

Subárea: Neurociências

Aprovado em: 23/10/2014

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. (orientador): Jorge Eduardo Moreira  
Instituição: FMRP-USP Assinatura:

Prof. Dr.: Luiz Eugênio Araújo de Moraes Mello  
Instituição: UNIFESP Assinatura:

Prof. Dr.: Aldo Bolten Lucion  
Instituição: UFRGS Assinatura:

Prof. Dr.: João Pereira Leite  
Instituição: FMRP USP Assinatura:

Prof. Dr.: Jaime Eduardo Cecilio Hallak  
Instituição: FMRP USP Assinatura:

*À Milenka, “minha pequena”.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço... Ao meu orientador, Jorge Eduardo Moreira, pela confiança, ensinamentos, liberdade e contribuição à minha formação científica e acadêmica. À Milenka Merlo Lemos, minha pequena, por resplandecer, com a simplicidade de um sorriso, a beleza das pequenas coisas. À José Inácio Lemos Monteiro Carvalho, pelo amor, companheirismo, visão crítica e paciência. Aos meus pais, Edemar Luiz Merlo e Marení Merlo, pelo carinho, educação e exemplo. Ao meu irmão, Oendel Merlo, pelo afeto, parceria e humor. Às colaboradoras, colegas de laboratório, mas principalmente amigas, Carol Kobori da Fonseca e Ana Beatriz Souza Nakayama, pela lealdade, ajuda e dedicação. Aos técnicos Roberta Ribeiro Costa Rosales, Rubens Fernando de Melo, Vani Maria Alves, Elizabete Rosa Mileni e Domingos Soares de Souza Filho, pelas dicas, auxílio e contribuição técnica. Aos animais utilizados neste trabalho que deram suas vidas em troca do conhecimento. Às fontes financiadoras, FAPESP e CNPq, que tornaram possível a execução desse projeto.*

***The brain is plastic:***

***“Use it or lose it”***

***(Marian C. Diamond)***

## ABREVIATURAS

**CG:** camada granular

**CSG:** camada subgranular

**HPA:** eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

**BrdU:** 5- bromo-2'-deoxiuridina

**BDNF:** fator neurotrófico derivado do encéfalo

**Bdnf:** brain-derived neurotrophic factor gene (*Rattus norvegicus*)

**5-HT:** serotonina

**5HT-1A:** receptor serotoninérgico 5HT-1A

**Htr1a:** 5-hydroxytryptamine (serotonina) receptor 1A gene (*Rattus norvegicus*)

**Nr3c1:** glucocorticoid nuclear receptor subfamily 3 gene (*Rattus norvegicus*)

**Hsd11b1:** hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1 gene (*Rattus norvegicus*)

**Rn45s:** 45S pre-ribossomal RNA gene (*Rattus norvegicus*)

**Gadph:** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*Rattus norvegicus*)

**Actb:** actin, beta gene (*Rattus norvegicus*)

**mRNA:** RNA mensageiro

**qRT-PCR:** reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real

**C:** grupo experimental controle

**SM:** grupo experimental submetido à separação materna

**EA:** grupo experimental mantido em enriquecimento ambiental

**SMEA:** grupo experimental submetido à separação materna e mantido em enriquecimento ambiental

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Sinapses excitatórias (E), com densidades pós sinápticas assimétricas e vesículas redondas uniformes em tamanho, e uma sinapse inibitória (I), simétrica e com vesículas pleomórficas. Sinapses sobre dendrito. Modificado de Uchizono (1965)..... 22
- Figura 2:** Sinapses simétricas imunopositivas para GABA, sinapses assimétricas imunonegativas para GABA. Modificado de Brusco *et al.*, 2014..... 22
- Figura 3:** Células em proliferação na camada subgranular do hipocampo. Conforme as células se diferenciam em neurônios as mesmas se incorporam a camada granular, estendendo seus dendritos para a camada molecular e os axônios para CA3. A marcação anti-doublecortina pode ser utilizada para quantificação de neurônios imaturos. Modificado de Ming e Song, 2005..... 26
- Figura 4:** Ninhada submetida ao procedimento de separação materna (os animais foram colocados sobre lençol térmico para reduzir a perda de calor)..... 50
- Figura 5:** Caixa de enriquecimento ambiental: oportunidade de aprendizado, atividade física e interação social. Ratos com cerca de 30 dias de idade no enriquecimento ambiental..... 52
- Figura 6:** Imagem confocal de neurônios imunopositivos para a BrdU (em vermelho) e NeuN (em verde). Observar neurônios jovens (imunocolocalização de BrdU e NeuN, em laranja). Reconstrução do giro denteado do hipocampo; 24 imagens (6 x 4) com a objetiva de 40x..... 57
- Figura 7:** Neurônios imunopositivos para BrdU (em vermelho) e NeuN (em verde). Neurônios jovens, colocalização de ambos os marcadores (em laranja). A: reconstrução de 6 imagens (3 x 2) com objetiva de 40x. B: reconstrução de 2 imagens (2 x 1)..... 58
- Figura 8:** Microcopia confocal de neurônios jovens na camada granular do giro denteado. Colocalização (em amarelo) da marcação anti-BrdU (excitação: 488) e anti-NeuN (excitação: 594, em vermelho)..... 59
- Figura 9:** Microscopia confocal de neurônios imunopositivos para doublecortina (vermelho) e NeuN (azul). No canto superior direito observar neuroblastos se integrando a camada granular do giro denteado e extendendo seus dendritos em direção a camada molecular interna da formação hipocampal..... 60
- Figura 10:** Imunofluorescência de neurônios imunopositivos para doublecortina. Observar neuroblastos se integrando a camada granular do giro denteado e extendendo seus dendritos em direção à molecular interna da formação hipocampal..... 61
- Figura 11:** Imunofluorescência de astrócitos (imunomarcados para a proteína GFAP) no hipocampo..... 61



**Figura 12:** Corte semi-fino (0,5  $\mu\text{m}$ ) do giro denteado do hipocampo corado com azul de toluidina. Neurônios imaturos situam-se na camada subgranular, mas se diferenciam e integram a camada granular e estendem seus dendritos para a camada molecular. No ângulo inferior direito, secção de um bloco aparado para corte fino. No ângulo superior esquerdo observa-se maior aumento da camada granular e da camada molecular interna do hipocampo..... 63

**Figura 13:** Micrografias eletrônicas de sinapse assimétrica excitatória (A) sobre espinho dendrítico (ausência de microtúbulos, mt) e simétrica inibitória (B) sobre processo dendrítico (presença de microtúbulos, mt)..... 64

**Figura 14:** Micrografia eletrônica de sinapses assimétricas ( $\rightarrow$ ) sobre espinhos dendríticos com formato “mushroom”. Observar microtúbulos (mt) e mitocôndrias (M) no ramo dendrítico. Camada molecular interna..... 65

**Figura 15:** Dissecção do giro denteado (\*) do hipocampo (20  $\mu\text{m}$ ) corada com azul de toluidina e colocada sobre lâmina Rnase free. No ângulo superior esquerdo observa-se a região removida do giro denteado por microdissecção. No ângulo inferior direito, cortes da camada granular dissecada sobre a tampa do tubo eppendorf. Para cada animal utilizaram-se 12 microdissecções bilaterais..... 67

**Figura 16:** Expressão relativa de mRNA dos genes de interesse em relação aos diferentes genes controle: Rn45s, Gadph e Actb, respectivamente..... 70

**Figura 17:** ct dos genes controle. Observe que o ct do gene GADPH variou entre os diferentes grupos experimentais..... 70

**Figura 18:** Peso dos filhotes das ninhadas controle e submetidas à separação materna no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia pós-natal (gráfico à esquerda) e dos machos controle e submetidos à separação materna no 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia pós-natal (gráfico à direita)..... 72

**Figura 19:** Ganho de peso dos animais. Os animais SMEA tiveram menor ganho de peso que os animais C e AE (2<sup>a</sup> semanas), C, SM e AE (3<sup>a</sup> semana) e C e SM (4<sup>a</sup> semana)..... 73

**Figura 20:** Não foram observadas diferenças significativas entre a glicemia dos animais nos diferentes grupos experimentais,  $p > 0,05$ ..... 74

**Figura 21:** Observou-se, de maneira geral, significância estatística ou tendência à redução nas células BrdU positivas nos animais submetidos à separação materna, mas o enriquecimento do ambiente atenuou esse efeito. Na camada granular (CG), bregma 2,56, foi observada redução nas células BrdU positivas nos animais SM em relação aos C e EA, bem como tendência de redução nos SMEA em relação aos C e EA. Em ambas as camadas (granular e subgranular; CG + CSG) foi observada redução nas células BrdU positivas nos animais SM em relação EA, e tendência de redução nos SM em relação aos C. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais no bregma 3,60. Em relação a somatória de células BrdU positivas em ambas as secções, na camada granular do hipocampo, foi observada tendência de redução das células BrdU positivas nos animais SM em relação aos C e EA, bem nos SMEA em relação aos C. Em ambas as camadas, foi observada redução nas células

BrdU positivas nos animais SM em relação aos C, e tendência de redução nos SM em relação aos EA..... 76

**Figura 22:** Observou-se, de maneira geral, tendência ou significância estatística, de redução nas células BrdU/NeuN positivas nos animais SM e SMEA em relação aos C e EA. Na camada granular, bregma 2,56, foi observada redução nas células BrdU/NeuN positivas nos animais SM e SMEA em relação aos EA, e tendência de redução nos SM em relação aos C. Em ambas as camadas, houve redução nas células BrdU/NeuN positivas no grupo SM em relação ao EA, e tendência de redução no SMEA em relação ao EA. No bregma 3,60, em ambas as camadas, houve tendência de redução nas células BrdU/NeuN positivas nos animais SMEA em relação C. Na somatória de células BrdU/NeuN positivas na camada granular, em ambas as secções, foi observada redução nas células BrdU/NeuN positivas nos animais SM e SMEA em relação aos EA, bem como tendência de redução nos SM e SMEA em relação aos C. Em ambas as camadas, foi observada redução nas células BrdU/NeuN positivas nos grupos SM e SMEA em relação ao EA, bem como tendência de redução do grupo SM e SMEA em relação ao C..... 79

**Figura 23:** Não foram observadas diferenças significativas na proporção entre as células BrdU/NeuN positivas e NeuN positivas entre os grupos experimentais,  $p > 0,05$ ..... 80

**Figura 24:** Imagens representativas dos grupos experimentais..... 80

**Figura 25:** Observou-se, de maneira geral, redução no número de células doublecortina positivas nos animais SMEA em relação aos C, bem como redução na área imunopositiva para doublecortina nos animais SM e SMEA em relação aos C. O número de células doublecortina positivas, bregma 2,60, sofreu redução nas células doublecortina positivas nos animais SMEA em relação aos C, e tendência de redução nos SM em relação aos C. Em ambas as camadas foi observada redução das células doublecortina positivas nos animais SMEA em relação aos C, bem como tendência à redução nos SMEA em relação aos EA. Na área imunopositiva para doublecortina, bregma 2,56, foi observada redução nos animais SM e SMEA em relação aos controles, e tendência à redução nos SMEA em relação aos EA. No bregma 3,60, foi observada redução da área imunopositiva nos animais SM em relação aos C. Em ambas as secções, os animais SM e SMEA apresentaram menor área positiva para doublecortina do que os animais controles, além disso, observou-se tendência à redução nos animais EA. .... 82

**Figura 26:** Imagens representativas dos grupos experimentais..... 83

**Figura 27:** Não foram observadas diferenças significativas em relação a razão entre a área imunopositiva para doublecortina e o número de células doublecortina positivas. Foi observada correlação entre o número de células positivas para doublecortina e a área imunopositiva para doublecortina,  $p < 0,01$ ..... 84

**Figura 28:** Foi observada correlação entre a área imunopositiva para doublecortina e o número de células BrdU ou BrdU/NeuN positivas ( $p < 0,05$ ). Não foi observada correlação entre o número de células doublecortina positivas e o número de células BrdU ou BrdU/NeuN positivas ( $p > 0,05$ )..... 84

- Figura 29:** Foi observada redução na área imunopositiva para GFAP, bregama 2,56, nos animais EA em relação aos C, e tendência de redução dos SMEA em relação aos EA. Nos outros bregmas e na somatória das secções, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos..... 85
- Figura 30:** Não foram observadas diferenças significativas quanto ao número de sinapses/ $\mu\text{m}^2$  e áreas pré-sinápticas entre os grupos experimentais..... 86
- Figura 31:** Não foram observadas diferenças significativas quanto a porcentagem de sinapses assimétricas ou simétricas e de sinapses sobre botões axonais multisinápticos..... 87
- Figura 32:** Múltiplas sinapses excitatórias a partir de um único botão axonal *en passant* (em laranja)..... 87
- Figura 33:** Ramo dendrítico com a projeção de espinhos dendríticos. Botão axonal multisináptico, sobre espinhos dendríticos, em laranja..... 88
- Figura 34:** Observou-se aumento na porcentagem de sinapses sobre espinhos dendríticos e redução sobre dendritos nos animais EA quando comparados aos C e SMEA..... 89
- Figura 35:** Sinapse excitatória sobre espinho dendrítico ( $\rightarrow$ ). No ramo dendrítico observe microtúbulos (mt) e mitocôndrias (M)..... 90
- Figura 36:** Sinapse excitatória sobre espinho dendrítico (\*). No ramo dendrítico observe microtúbulos (mt)..... 91
- Figura 37:** Sinapse excitatória sobre espinho dendrítico ( $\rightarrow$ ). Observe o *aparatus* (ap) do espinho dendrítico. No ramo dendrítico observe a presença de microtúbulos (mt)..... 92
- Figura 38:** Sinapse excitatória (em verde) sobre a cabeça do espinho dendrítico (em amarelo), e sinapse inibitória sobre o pescoço do espinho dendrítico (em azul). Ramo dendrítico (em amarelo) com microtúbulos (mt) e mitocôndrias (M)..... 93
- Figura 39:** Para o gene *Nr3c1* foi observada redução na expressão de mRNA no grupo SM em relação aos C e SMEA, bem como uma tendência ( $p < 0,01$ ) de redução no grupo EA em relação ao SMEA. Em relação ao gene *Hsd11b1* não foram observadas diferenças significativas quanto aos grupos experimentais. Para o gene *Htr1a*, foi observada redução na expressão de mRNA nos grupos SM, EA e SMEA em relação ao C. O gene *Bdnf* teve tendência à redução da expressão de mRNA dos animais SM em relação aos C e SMEA..... 95
- Figura 40:** Reconstruções tridimensionais de diferentes tipos de contato sináptico sobre espinhos dendríticos. Exemplo de espinho dendrítico contendo uma sinapse excitatória e duas sinapses inibitórias (Modificado de Landers *et al.*, 2011)..... 103

## SUMÁRIO

<b>Resumo.....</b>	<b>14</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1. Plasticidade neural.....</b>	<b>16</b>
1.1.1. Neurogênese.....	16
1.1.2. Integração sináptica dos novos neurônios e caracterização sináptica.....	19
<b>1.2. Plasticidade hipocampal e estresse.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3. Separação materna.....</b>	<b>33</b>
<b>1.4. Enriquecimento ambiental.....</b>	<b>38</b>
<b>2. Justificativa.....</b>	<b>47</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>48</b>
3.1. Objetivo geral.....	48
3.2. Objetivos específicos.....	48
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>49</b>
4.1. Manipulação dos animais.....	49
4.2. Separação materna.....	49
4.3. Enriquecimento ambiental.....	51
4.4. Microscopia de fluorescência e microscopia confocal.....	54
4.5. Microscopia eletrônica.....	62
4.6. Expressão de mRNA para receptores de glicocorticóides utilizando sistema de microdissecção a laser.....	66
4.6.1. Microdissecção.....	66
4.6.2. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	68
4.6.3. PCR quantitativo em tempo real.....	69
4.7. Análise estatística.....	71
<b>5. Resultados.....</b>	<b>72</b>
5.1. Peso e glicemia.....	72
5.2. Neurogênese.....	74
5.2.1. Células BrdU positivas.....	74
5.2.2. Células BrdU/NeuN positivas.....	77
5.3. Número de células e área imunopositivas para doublecortina.....	81
5.4. Área imunopositiva para GFAP.....	85

<b>5.5. Plasticidade sináptica.....</b>	<b>86</b>
<b>5.6. mRNA para Nr3c1, Hsd11b1, Htr1a e Bdnf.....</b>	<b>94</b>
<b>6. Discussão.....</b>	<b>96</b>
<b>7. Conclusões gerais.....</b>	<b>116</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>118</b>
<b>9. Anexos.....</b>	<b>135</b>
<b>9.1. Comissão de ética em experimentação animal.....</b>	<b>135</b>
<b>10. Artigo científico.....</b>	<b>136</b>

## Resumo

Eventos estressantes durante a infância promovem alterações comportamentais e encefálicas persistentes, aumentando a predisposição para transtornos psiquiátricos. A separação materna tem sido utilizada como modelo de estresse pós-natal. Animais submetidos à separação materna apresentam uma resposta exacerbada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ao estresse. Ao contrário, estudos sugerem que o ambiente enriquecido, por aumentar a neurogênese no giro denteado do hipocampo, pode ter efeitos benéficos sobre doenças de distúrbio comportamental. No presente projeto questionamos se o enriquecimento ambiental interfere com as alterações plásticas promovidas pela separação materna no hipocampo de ratos jovens. Utilizamos imunofluorescência, microscopia confocal, microscopia eletrônica e qRT-PCR de amostras coletadas por microdissecção a laser. A separação materna reduziu a neurogênese hipocampal, bem como a expressão de mRNA para os genes *Nr3c1*, codificador de receptores glicocorticóides, e *Htr1a*, codificador de receptores serotoninérgicos (5TH-1A). O enriquecimento ambiental reduziu a expressão de *Htr1a*. Além disso, aumentou a proporção de sinapses sobre espinhos dendríticos, sugerindo maior plasticidade sináptica. O enriquecimento ambiental, nos animais previamente submetidos à separação materna, aumentou a sobrevivência celular e a expressão de *Nr3c1*, mas não a diferenciação neuronal hipocampal. As alterações promovidas pela separação materna parecem ser persistentes, mas podem ser parcialmente revertidas pelo enriquecimento do ambiente.

**Palavras chave:** separação materna, enriquecimento ambiental, neurogênese, plasticidade sináptica.

### Abstract

Stressful events during childhood promote persistent behavioral and brain changes, increasing the predisposition to psychiatric disorders. The maternal separation has been used as postnatal stress model. Animals subjected to maternal separation exhibit an exaggerated response of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to stress. Instead, studies suggest that environmental enrichment, by increasing neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus, has beneficial effects on behavioral disorders. In this project, we discuss whether the environmental enrichment interferes with plastic changes promoted by maternal separation in the hippocampus of young rats. We used immunofluorescence, confocal microscopy, electron microscopy and qRT-PCR of samples collected by a laser microdissection system. The maternal separation reduced hippocampal neurogenesis, as well as the mRNA expression for the genes *Nr3c1*, that codify glucocorticoid receptors, and *Htr1a*, that codify serotonin receptors (5HT-1A). Environmental enrichment reduced the expression of *Htr1a*. Furthermore, increases the proportion of synapses on dendritic spines, suggesting greater synaptic plasticity. The environment enrichment of the animals subjected to maternal separation increased cell survival and the expression of *Nr3c1* mRNA, but not the neuronal differentiation in the hippocampus. The changes promoted by maternal separation are persistent, however may be partially reversed by the environmental enrichment.

**Keywords:** maternal separation, environmental enrichment, neurogenesis, synaptic plasticity.

## **1 Introdução**

### **1.1. Plasticidade neural**

#### **1.1.1. Neurogênese**

Um dogma que permaneceu na neurociência por muito tempo foi a proposta de Santiago Ramon y Cajal (1913) de que novos neurônios só poderiam ser originados durante a fase pré-natal do desenvolvimento (Ming e Song, 2005). No entanto, a partir da década de 60, estudos em aves e mamíferos começaram a quebrar esse dogma (Altman e Das, 1965; Gold *et al.*, 1999; Goldman, 1998).

Altman e Das (1965) relataram pela primeira vez a ocorrência de proliferação celular no giro denteado do hipocampo de ratos adultos, utilizando a técnica de autoradiografia com timidina tritiada que poderia ser incorporada pelas células em divisão. No entanto, as técnicas disponíveis na época não permitiam diferenciar se as células que incorporavam timidina marcada eram neurônios ou células gliais. Essa resposta veio com os trabalhos de Kaplan e Hinds (1977) que demonstraram, utilizando microscopia eletrônica, que as células do hipocampo marcadas com timidina tritiada exibiam características ultra-estruturais de neurônios. Kaplan e Hinds (1977) demonstraram ainda que a neurogênese ocorre não apenas na camada granular do giro denteado do hipocampo, mas, também, no bulbo olfatório de animais com três meses de idade. Além disso, os mesmos autores observaram que a neurogênese hipocampal poderia ocorrer em ratos com até nove meses de idade (Kaplan e Bell, 1983).

Na década de 1990 foi desenvolvido um análogo sintético da timidina, o BrdU (5- bromo-2'-deoxiuridina), o qual possibilitou avanços importantes nos estudos da neurogênese (Novakowski *et al.*, 1989), uma vez que permite estudar a neurogênese



nos diversos estágios: proliferação, sobrevivência e diferenciação celulares (Kempermann *et al.*, 1998; Malberg *et al.*, 2000). Estudos de proliferação utilizam injeção sistêmica única de BrdU duas horas antes da perfusão transcardíaca dos animais. Estudos de sobrevivência utilizam pelo menos três injeções de BrdU, e o sacrifício dos animais é realizado aproximadamente quatro semanas após a última injeção. Estudos de diferenciação utilizam a colocalização do BrdU com marcadores neurais ou gliais, sendo seu protocolo experimental similar aos estudos de sobrevivência (Kempermann *et al.*, 1998).

Recentemente, surgiu um marcador bastante similar ao BrdU, o EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), o qual possui uma vantagem em relação ao BrdU. A reação imuno-histoquímica anti-EdU não necessita de desnaturação do DNA como a reação anti-BrdU, sendo assim, outros anticorpos utilizados juntamente com esse marcador não sofrem interferência pela desnaturação (Buck *et al.*, 2008; Cavanagh *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2010). Ambos os marcadores, BrdU e EdU, possuem a desvantagem de não serem proteínas do tecido, e sim marcadores exógenos, que precisam ser administrados nos animais. Muitos estudos analisam a influência do estresse sobre a neurogênese, mas desconsideram que a dose e o número de injeções desses fármacos possam ter efeitos sobre os animais (Taupin, 2007; Zeng *et al.*, 2010). Outros marcadores têm sido utilizados nos estudos de neurogênese. Para neuroblastos os mais utilizados são doublecortina (proteína associada a microtúbulos), PSA-NCAM (poly-sialylated-neural cell-adhesion molecule) e Tuj1 (beta-tubulin isoform III) (Ming e Song, 2005).

Estima-se que cerca de 75% das células que proliferam expressam marcadores neuronais, 13% expressam marcadores gliais e 12% apresentam fenótipo

indeterminado (Malberg *et al.*, 2000). Estudos apontam que a maturação e integração funcional de um novo neurônio leva em torno de quatro semanas (Malberg *et al.*, 2000; Malberg *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). Sendo assim, pode-se descrever um “cronograma” das proteínas que são expressas ao longo deste período. Aproximadamente dois dias após a injeção de BrdU, as células precursoras de neurônios expressam nestina, marcador de progenitores neurais e de células tronco. Dois a dez dias após a injeção, as células expressam marcadores de células neuronais imaturas, como beta tubulina III (Tuj-1) e doublecortina. De sete a dez dias, as células da camada granular já expressam os marcadores NeuN e calbindina, presentes apenas em neurônios maduros (Taupin, 2007).

Em mamíferos, regiões específicas do encéfalo tem sido amplamente estudadas quanto à neurogênese em indivíduos adultos. Eriksson e colaboradores (1998) verificaram neurogênese no cérebro de humanos adultos, utilizando tecidos obtidos após a morte de pacientes por câncer nos quais se injetou BrdU sistemicamente para fins de diagnóstico. As células que incorporaram BrdU foram quantificadas na camada de células granulares e na zona subventricular do giro denteado, bem como no hilo. A utilização de marcadores neurais juntamente com anticorpos fluorescentes anti-BrdU revelou que novos neurônios são gerados, no giro denteado de humanos, a partir de células precursoras.

Em roedores, principalmente o hipocampo e o bulbo olfatório têm sido analisadas. No entanto, recentemente outras regiões, como o neocórtex, tem sido estudadas (Gould e colaboradores, 2001). Estudos quantitativos sugerem que cerca de 9000 novas células neuronais são geradas por dia no giro denteado de roedores adultos (Taupin, 2007). No presente trabalho, estudamos a neurogênese e plasticidade

sináptica hipocampal em animais submetidos à separação materna e ao enriquecimento ambiental.

### **1.1.2. Integração sináptica dos novos neurônios e caracterização sináptica**

Uma importante questão é definir se esses novos neurônios se integram à circuitaria cerebral. van Praag e colaboradores (2002) analisaram essa questão em neurônios hipocampais. Os autores marcaram células em divisão com um vetor retroviral que expressa a proteína verde fluorescente (GFP). Após 48 horas as células marcadas expressaram marcadores de neurônios imaturos, como Tuj1-beta, de precursores neurais, como NG2, ou glia, como GFAP. Após 4 semanas as células marcadas expressaram marcadores como NeuN ou calbindina. Após esse período os neurônios marcados apresentaram a expressão de GFP no citoplasma, em processos dendríticos que se estendem em direção a camada molecular e em axônios que se projetam em direção ao hilo.

Para analisar se esses neurônios recebiam contatos sinápticos, estudaram, com microscopia confocal, a colocalização de sinaptofisina com neurônios GFP positivos, e observaram a presença de espinhos dendríticos nos mesmos neurônios. Usando microscopia eletrônica, observaram que os neurônios GFP positivos possuíam contatos sinápticos com agrupamentos de vesículas sinápticas em correspondência com membranas pré-sinápticas e densidades pós-sinápticas. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que esses neurônios apresentavam respostas pós-sinápticas típicas de neurônios funcionais, recebendo informações principalmente da via perforante (van Praag *et al.*, 2002).

O tamanho do soma, comprimento dendrítico total, ramificação dendrítica e densidade de espinhos dendríticos, de células GFP positivas, é superior em neurônios

analisados com 4 meses quando comparados aos de 4 semanas, indicando maturação desses neurônios, ou seja, sugerindo que ocorre aumento da complexidade das conexões ao longo do tempo. Todos esses indícios indicam que esses novos neurônios se integram funcionalmente a circuitaria hipocampal, formando contatos sinápticos (van Praag *et al*, 2002; Vivar e van Praag, 2013).

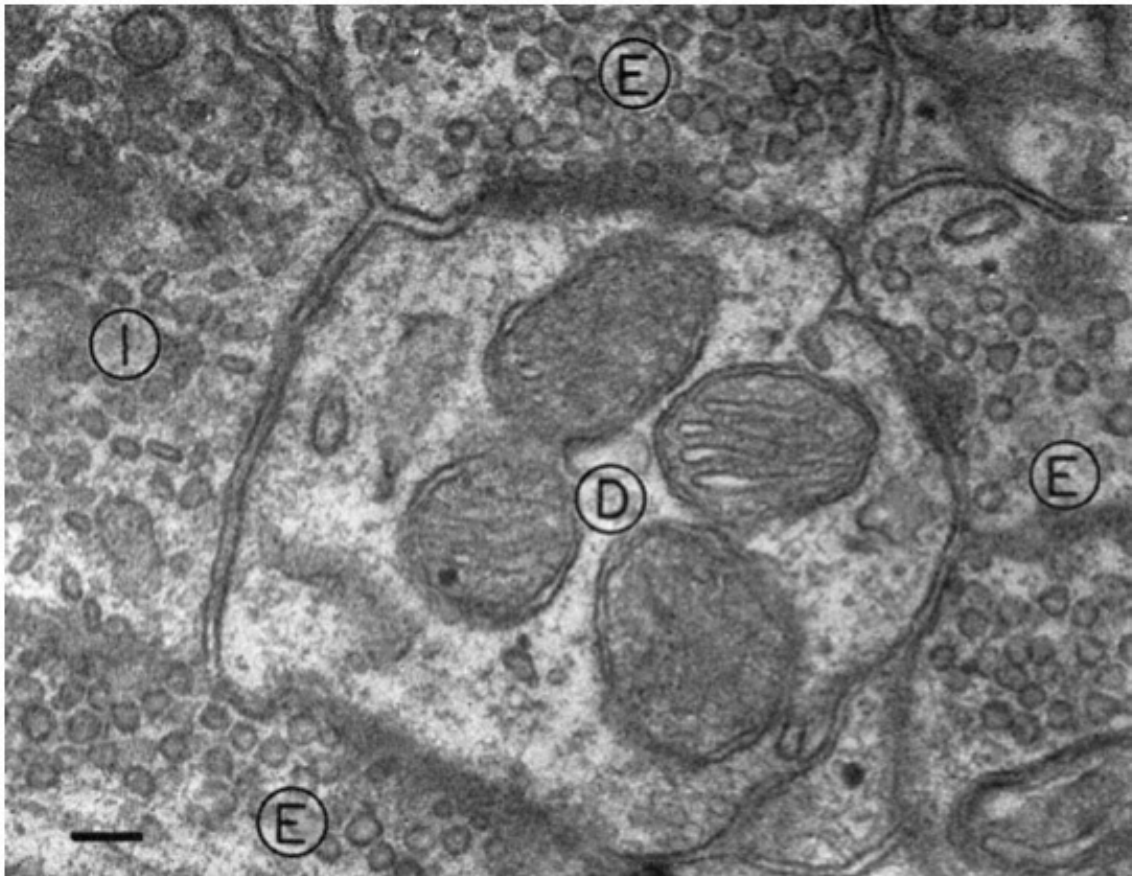
Dityatev e Rusakov (2011) propuseram uma classificação das sinapses químicas. As sinapses podem ser consideradas mecanismos de transmissão bipartido, levando em conta os elementos pré e pós sinápticos. No entanto, o papel das células gliais na manutenção adequada do ambiente extracelular e, conseqüentemente, na regulação da transmissão sináptica, formam um mecanismo tripartido. Recentemente surgiu o conceito de sinapse tetrapartida, o qual considera os elementos pré e pós-sinápticos, os astrócitos e a matriz extracelular como estruturas fundamentais das sinapses químicas (Dityatev e Rusakov, 2011). O neurópilo, que consiste dos processos neurais e contatos sinápticos, possui papel essencial nos circuitos encefálicos. A redução no neurópilo (“reduced neuropil hypothesis”) pode ser fundamental no desenvolvimento de doenças. Por exemplo, o aumento da densidade neuronal em regiões encefálicas de esquizofrênicos pode ser devida a atrofia de processos neuronais, sem perda neuronal (Selemon e Goldman-Rakic, 1999).

Os neurotransmissores mais abundantes do sistema nervoso central são o glutamato, excitatório, e o GABA, inibitório. O excesso de glutamato pode levar a excitotoxicidade, causando morte neuronal. Os astrócitos, através de transportadores gliais, como EAAT1 e EAAT2, retiram o excesso de glutamato da fenda sináptica, evitando esse processo. A matriz extracelular também possui importância na modulação da atividade neuronal e glial. Por exemplo, a agrina, molécula da matriz

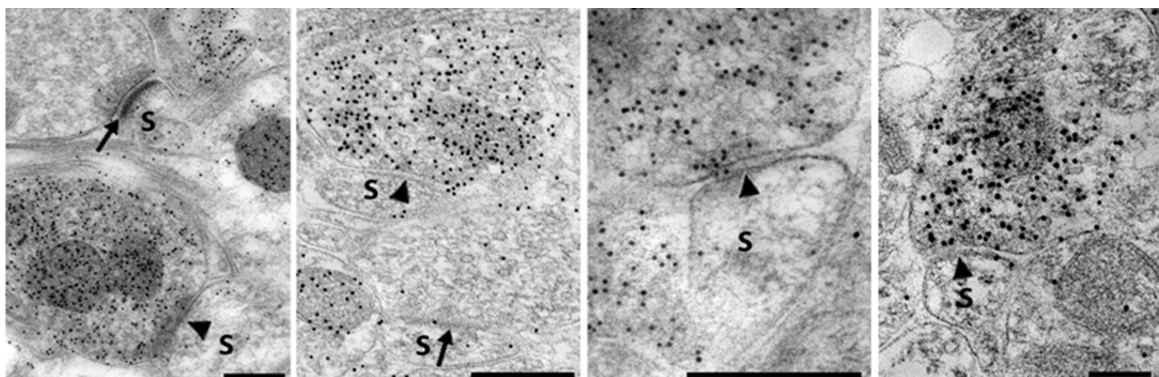
extracelular, pode ser clivada pela neurotripsina (protease liberada em terminais axonais) em fragmentos de 90 e 22 k-Da. Este último fragmento induz a formação de filopódios em dendritos, modulando a plasticidade sináptica (Dityatev e Rusakov, 2011).

A caracterização inicial das sinapses foi realizada por Gray (1959a), que analisou o córtex occipital de ratos adultos com microscopia eletrônica, descrevendo dois tipos de sinapses. As sinapses tipo 1 são caracterizadas pela larga fenda sináptica e densidade pós-sináptica exuberante, e as sinapses do tipo 2 são caracterizadas pela fenda sináptica mais estreita e simetria nas densidades pré e pós-sinápticas. Apesar das diferenças morfológicas, o autor não sugeriu diferenças funcionais entre os dois tipos de sinapses.

Uchizono (1965) sugeriu a classificação das sinapses como excitatórias ou inibitórias de acordo com o tamanho e a forma das vesículas sinápticas analisando, com microscopia eletrônica, a camada molecular e a camada de células de Purkinje do encéfalo de gatos. As sinapses excitatórias seriam caracterizadas por vesículas esféricas com diâmetro aproximado de 400 Å (40nm). As sinapses inibitórias seriam caracterizadas por vesículas pleomórficas de menor tamanho (figura 1). Com base nos estudos de eletrofisiologia, nos quais a superfície do soma das células de Purkinje é cercada por sinapses inibitórias, o autor sugere que as vesículas pleomórficas observadas nessa região seriam características das sinapses inibitórias tipo 2 de Gray. As sinapses do tipo 1, classificadas por Gray, corresponderiam às de vesículas redondas de tamanho uniforme associadas a sinapses excitatórias (Uchizono, 1965). Resultados de imunoeletromicroscopia confirmam estas observações (figura 2, Brusco *et al.*, 2014).



**Figura 1:** Sinapses excitatórias (E), com densidades pós sinápticas assimétricas e vesículas redondas uniformes em tamanho, e uma sinapse inibitória (I), simétrica e com vesículas pleomórficas. Sinapses sobre dendrito. Modificado de Uchizono (1965).



**Figura 2:** Sinapses simétricas imunopositivas para GABA, sinapses assimétricas imunonegativas para GABA. Modificado de Brusco *et al.*, 2014.

As vesículas elétron-lúcidas, como as observadas por Uchizono (1965), contêm neurotransmissores clássicos, geralmente aminoácidos, como glutamato, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, acetilcolina e glicina. O tamanho destas vesículas é de aproximadamente 50nm. As vesículas elétron densas, contêm aminas (como catecolaminas, serotonina e histamina) e neuropeptídeos (como vasopressina, substância P e  $\beta$ -endorfina). O tamanho das vesículas eletrondensas é de cerca de 100 a 300nm (Park e Kim, 2009).

Landis e Reese (1974), mediante congelamento e fratura, analisaram membranas pré e pós-sinápticas em sinapses excitatórias e inibitórias do córtex cerebelar de camundongos, chinchilas e ratos. As sinapses excitatórias seriam caracterizadas por pequenos agregados de partículas na metade citoplasmática da membrana pré-sináptica, fenda sináptica alargada e amplos agregados de partículas na metade externa da membrana pós-sináptica. As sinapses inibitórias não possuem comparáveis especializações na membrana pré nem pós-sináptica. Esses achados indicam diferenças na composição ou organização das proteínas integrais da membrana para a função sináptica. Landis e colaboradores (1974) observaram resultados similares no bulbo olfatório, nessa região os autores também observaram junções *gap*, que poderiam estar associadas à comunicação elétrica entre as células.

As estruturas neuronais foram descritas por Santiago Ramón y Cajal, utilizando a técnica de impregnação por prata desenvolvida por Camillo Golgi. Cajal, a partir da técnica de Golgi, observou a presença de projeções a partir dos dendritos, as quais foram denominadas espinhos dendríticos (Peters, 2007). Estudos posteriores com microscopia eletrônica demonstraram que os espinhos dendríticos, além dos dendritos, corpos celulares e axônios, são locais de contato sináptico (Gray, 1959b).

Os dendritos podem ser identificados por sua abundância em organelas, principalmente microtúbulos e neurofilamentos, retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e grupamentos de ribossomos livres. Os espinhos dendríticos não apresentam microtúbulos, neurofilamentos e outras organelas, mas possuem aparato de armazenamento de cálcio e material granular no citoplasma (Adams e Jones, 1982).

Os espinhos dendríticos possuem, aproximadamente, comprimento de 2  $\mu\text{m}$  e diâmetro de 1  $\mu\text{m}$ , na região próxima ao dendrito (aonde surge o espinho) observa-se uma haste medindo entre 0,1  $\mu\text{m}$  a 0,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro. No terminal pré-sináptico, o qual faz contato sináptico com a cabeça do espinho, observam-se mitocôndrias e numerosas vesículas sinápticas (Gray, 1959b).

Os espinhos dendríticos são alterações morfológicas associadas ao aumento de sinapses cerebrais, porém nem todos os espinhos são locais de contato sináptico. Alguns espinhos podem representar sítios imaturos, ou seja, que não estabeleceram sinapses definitivas (Arellano *et al.*, 2007; Knott *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 1992).

Os espinhos dendríticos podem ser agrupados a partir de sua morfologia: “thin”, “mushroom” e “stubby”. Espinhos do tipo “thin” (“filopodia”) apresentam comprimento bastante superior ao seu diâmetro, com diâmetro do pescoço e cabeça similares. Espinhos do tipo “mushroom” apresentam a cabeça com diâmetro bastante superior ao diâmetro do pescoço. Espinhos do tipo “stubby” são curtos, apresentam diâmetro similar da cabeça e pescoço (Peters e Aiserman-Abramof, 1970).

Espinhos com morfologia “thin” (com um pescoço mais longo e uma cabeça de pequeno volume) se mostram muito mais instáveis quanto a seu número e forma (Lin *et al.*, 2004; Matus, 2005), enquanto espinhos maiores e com formato de



cogumelo (“mushroom”) são mais estáveis e realizam atividades sinápticas mais duradouras (Nimchinsk *et al.*, 2002; London e Hausser, 2005). A maioria dos espinhos com idade superior a 4 dias são do tipo “mushroom”, enquanto os com idade inferior a 4 dias são do tipo “thin”, indicando que os espinhos dendríticos geralmente crescem como “thin”, amadurecendo para “mushroom” (Knott *et al.*, 2006). Sendo assim, a forma dos espinhos dendríticos representa sua funcionalidade, ou seja, sugere diferentes atividades sinápticas (Matus, 2000; Nimchinsky *et al.*, 2002; London e Hausser, 2005). Diversos fenômenos biológicos podem alterar o número de espinhos dendríticos de diversas regiões encefálicas, especialmente processos relacionados à aprendizagem e memória.

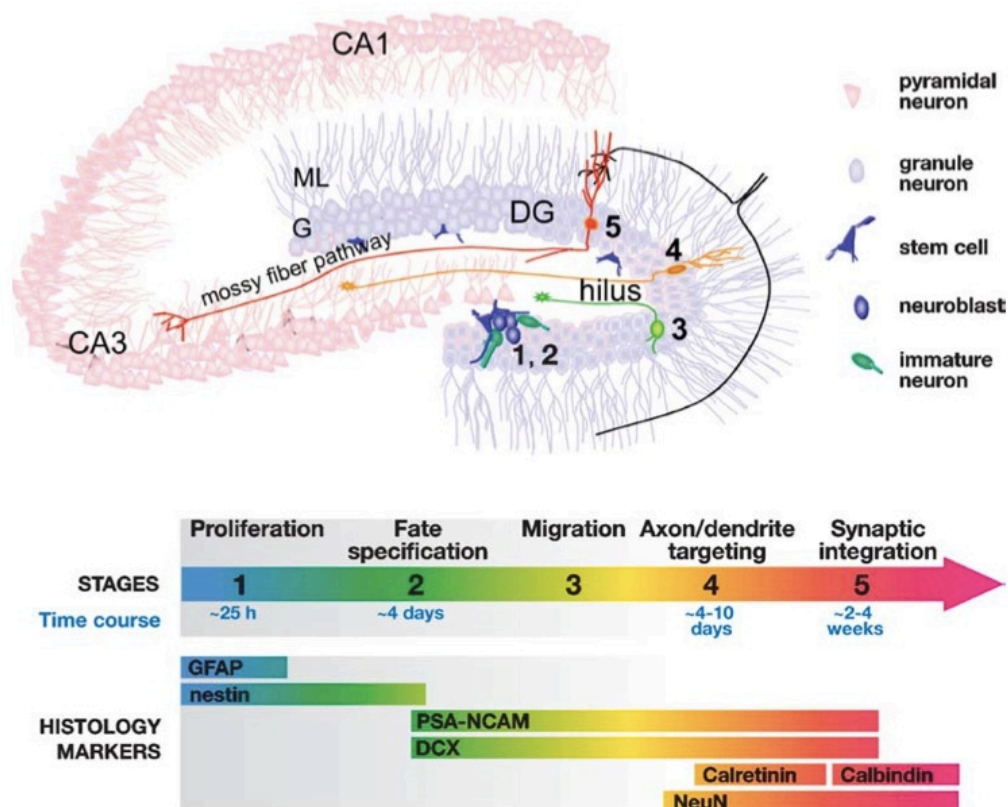
Sendo assim a densidade sináptica, o local de contato pós-sináptico (sobre dendritos ou espinhos dendríticos, por exemplo), e a morfologia dos espinhos dendríticos, podem ser utilizados como meios de estudar a plasticidade do sistema nervoso (Brusco *et al.*, 2008; Brusco *et al.*, 2010; Brusco *et al.*, 2013; Dall’oglio *et al.*, 2008; Rasia-Filho *et al.*, 2004; Rasia-Filho *et al.*, 2010; Rasia-Filho *et al.*, 2012). A produção de novos neurônios no encéfalo é um evento plástico modulado por diversos fatores ambientais, comportamentais e neuroquímicos (Gould *et al.*, 2000, Lledo *et al.*, 2006; Ming e Song, 2005).

## **1.2. Plasticidade hipocampal e estresse**

A formação hipocampal, estrutura localizada nos lobos temporais, é constituída por dois grandes agrupamentos neuronais divididos em duas camadas: a de células granulares, que forma o giro denteado, e a de células piramidais CA1, CA2, CA3 e CA4, denominada corno de Amon (Ming e Song, 2005). A capacidade adaptativa e plástica das células granulares ocorre em animais adultos de espécies de

roedores, primatas não humanos e humanos (Gould e Tanapat, 1997; Eriksson *et al.*, 1998).

As células tronco localizam-se na zona subgranular do giro denteado (CSG) situa-se no ponto de encontro da camada interna de células granulares do giro denteado com o hilo (CA4). Essas células progenitoras migram continuamente para a camada de células granulares do giro denteado, onde desenvolvem morfologia típica de células granulares, expressam marcadores de diferenciação neuronal e estendem axônios para a via de fibras musgosas que se projeta para a região CA3 do hipocampo. Nessa fase, ocorre a integração sináptica desses novos neurônios na circuitaria do sistema nervoso central (figura 3, Stanfield e Trice, 1988; Ming e Song, 2005; Kempermann, 2011).



**Figura 3:** Células em proliferação na camada subgranular do hipocampo. Conforme as células se diferenciam em neurônios as mesmas se incorporam a camada granular, estendendo seus dendritos para a camada molecular e os axônios para CA3. A marcação anti-doublecortina pode ser utilizada para quantificação de neurônios imaturos. Modificado de Ming e Song, 2005.

A formação hipocampal é uma das regiões cerebrais com capacidade para realizar neurogênese no adulto, porém é bastante sensível aos efeitos deletérios do estresse (Jacobs *et al.*, 2000). O estresse promove redução da neurogênese no giro denteado do hipocampo, bem como atrofia e morte de neurônios piramidais da região CA3 (Duman *et al.*, 2001; Banasr *et al.*, 2007).

Acredita-se que no hipocampo os novos neurônios desempenham funções no aprendizado e memória. Fatores estressantes, os quais aumentam os níveis de glicocorticóides e diminuem o aprendizado dependente do hipocampo, diminuem a neurogênese no giro denteado. De maneira inversa, fatores que aumentam a proliferação celular no hipocampo facilitam o aprendizado (Gross, 2000).

Tarefas de aprendizado dependentes ou independentes do hipocampo afetam diferentemente a neurogênese desta região. Há associação apenas entre o aprendizado dependente do hipocampo e a neurogênese no giro denteado. Tarefas de aprendizado que não requerem o hipocampo (ou seja, lesões no hipocampo não alteram significativamente o aprendizado) não alteram a proliferação celular nessa região cerebral (Gould *et al.*, 1999).

Outra função do hipocampo é sua ação inibitória sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA; Leonard, 2005; Gould e Tanapat, 1999). O fator de liberação de corticotrofina (CRF) é liberado via sistema porta pelos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo, e age sobre a pituitária anterior estimulando a síntese e a liberação de adrenocorticotrofina (ACTH). A ACTH estimula a liberação de cortisol em humanos, ou coricosterona em roedores, pelas glândulas supra-renais. Os glicocorticóides atuam sobre receptores, que podem ser mineralocorticóides ou glicocorticóides, em diversas regiões encefálicas. A ligação dos glicocorticóides aos

seus receptores no hipocampo, por exemplo, causa a inibição da síntese e liberação de CRF pela inibição da atividade do hipotálamo (Kappeler e Meaney, 2010).

Ratos expostos a estresse crônico, durante uma semana, apresentam aumento sustentado da secreção de corticosterona que resulta em diminuição do número de receptores para glicocorticóides no hipocampo, sem mudanças na afinidade do receptor por seus ligantes. Esta redução no número de receptores não é resultante da perda de neurônios hipocâmpais, mas da diminuição do número de receptores por neurônio. Uma semana após o estresse crônico o número de receptores assemelha-se aos valores controles (Sapolsky *et al.*, 1984).

Com a diminuição do número de receptores de glicocorticóides, o efeito inibitório do hipocampo sobre o eixo HPA é menos eficiente. Sapolsky e colaboradores (1984) observaram hipersecreção de corticosterona após a destruição de neurônios hipocâmpais com múltiplas injeções de ácido kaínico. Tanto a perda neuronal quanto a redução no número de receptores de glicocorticóides levam à hiperatividade do eixo HPA.

Recentemente tem-se avaliado também o efeito das influências ambientais sobre a epigenética, ou seja, da relação entre a estrutura da cromatina e da transcrição gênica (metilação do DNA). Proles provenientes de ninhadas com elevado cuidado materno, quando comparadas a proles de roedoras com baixo cuidado materno, apresentam aumento da expressão de receptores de glicocorticóides hipocâmpais, aumento da sensibilidade do feedback negativo aos glicocorticóides, reduzida expressão de CRF no hipotálamo e modesta resposta da pituitária-adrenal ao estresse. Sendo assim, as diferenças individuais, ou fenotípicas, observadas em protocolos

experimentais de estresse, por exemplo, podem ser devidas ao efeito das variações ambientais sobre a metilação e desmetilação do DNA (Kappeler e Meaney, 2010).

Námestková e colaboradores (2005) observaram diminuição da proliferação celular na camada de células granulares do hipocampo de ratos submetidos cronicamente (15 dias de exposição) ao labirinto aquático de Morris, essa diminuição foi inibida pelo tratamento prévio com o antidepressivo fluoxetina, um inibidor da recaptção do neurotransmissor serotonina. Os autores sugeriram que o efeito do estresse devido à exposição repetida dos animais ao labirinto aquático prevalece sobre o efeito da atividade física intensa, observando-se redução da proliferação celular. Assim, mesmo durante atividade física intensa, pode-se observar redução na proliferação celular em caso de exposição prolongada a experiências estressantes.

Malberg e colaboradores (2000) demonstraram que o tratamento crônico com o antidepressivo fluoxetina aumenta a neurogênese no giro denteado do hipocampo de ratos adultos. Os autores sugeriram com esses achados que o tempo de maturação e integração funcional dessas células poderia estar relacionado à latência necessária para o efeito terapêutico de drogas antidepressivas (Malberg, 2004; Ernst *et al.*, 2006).

O envelhecimento também interfere com a neurogênese, reduzindo as taxas de proliferação, sobrevivência e diferenciação das células no giro denteado do hipocampo (Kempermann *et al.*, 1998). A redução da proliferação e sobrevivência celulares em animais idosos pode ser devida a níveis elevados de glicocorticóides, uma vez que os animais sofrem eventos estressantes ao longo da vida (Montaron *et al.*, 2006).

Eventos estressantes causam aumento sustentado da liberação de corticosterona. Os glicocorticóides possuem maior afinidade pelos receptores mineralocorticóides (Lightman, 2008). Os receptores mineralocorticóides tem sido associados a regulação das variações circadianas dos glicocorticóides, enquanto os receptores glicocorticóides tem sido relacionados com a modulação dos efeitos estressantes sobre os níveis de corticosterona (Chourbaji e Gass, 2008). Estudos clínicos tem mostrado a hiperatividade do eixo HPA em pacientes com depressão (Chourbaji e Gass, 2008), e estudos em camundongos geneticamente modificados subexpressando ou superexpressando os receptores de glicocorticóides confirmam as observações dos estudos clínicos (Ridder *et al.*, 2005). Muitos trabalhos analisam os níveis de corticosterona após estresse, porém a corticosterona, além de liberada num ritmo diurno (maior liberação no início da fase ativa e menor liberação no início da fase de repouso), é liberada num ritmo ultradiurno (Chourbaji e Gass, 2008; Lightman, 2008). Sendo assim o estudo da expressão de receptores para glicocorticoides pode ser bastante útil para estudar o efeito de determinado estresse sobre uma região específica do encéfalo, neste caso, o hipocampo.

O gene *Nr3c1* é responsável por codificar os receptores de glicocorticóides. Já o gene o *Hsd11b1*, 11 $\beta$ - hydroxysteroid dehydrogenase type 1, possui papel na regulação do metabolismo intracelular dos glicocorticóides por codificar a enzima responsável por converter a cortisona ao hormônio ativo corticosterona, a qual ativa os receptores de glicocorticóides (Yau e Seckl, 2001).

Tafet e colaboradores (2001) estudaram os efeitos do cortisol sobre a receptação de serotonina em linfócitos e células neuronais em cultura de células humanas observando que as concentrações de cortisol estavam correlacionadas com a recaptação de serotonina. Os autores hipotetizaram que o aumento extracelular de

cortisol, após 24 a 48h, poderia levar ao aumento da recaptação de serotonina, reduzindo os níveis intersticiais de serotonina na fenda sináptica (Tafet *et al.*, 2001). Diversos estudos já apontavam a relação entre redução da neurogênese e diminuição dos níveis de serotonina e aumento de corticosterona, em ratos, ou cortisol, em humanos, após eventos estressantes, principalmente em relação ao estresse crônico, inclusive sugerindo uma hipótese para os transtornos depressivos (Chourbaji e Gass, 2008; Gould, 1999; Ming e Song, 2005; Ridder *et al.*, 2005).

O giro denteado do hipocampo possui alta densidade de receptores 5HT1A (5-hydroxitriptamina) e recebe inervação serotoninérgica do núcleo medial da rafe localizado no tronco encefálico (Gould, 1999). Brezun e Daszuta (1999) reduziram os níveis encefálicos de serotonina (5-HT) injetando a neurotoxina 5,7-di-hidroxitriptamina (5,7-DTH) diretamente nos núcleos da rafe, estrutura onde se localizam os neurônios produtores de 5HT. A lesão causada pela neurotoxina promoveu redução significativa do número de células positivas para BrdU nos neurônios granulares quinze a dezessete dias após a lesão, sugerindo que a 5-HT pode estar envolvida na proliferação de neurônios granulares do hipocampo de ratos adultos.

Estudos sobre o gene *Htr1a*, que codifica receptores serotoninérgicos 5-HT1A, sugerem que a 5-HT pode estimular a produção de novos neurônios no giro denteado. Condições associadas à diminuição da neurogênese nessa estrutura também diminuem a densidade de fibras serotoninérgicas, de receptores 5HT1A ou inibem a liberação de 5HT no giro denteado. Além disso, fatores que estimulam a neurogênese ativam os receptores 5TH-1A e aumentam a liberação de serotonina no giro denteado do hipocampo (Gould, 1999).

Além da serotonina, o BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo) regula a neurogênese, promovendo a formação e a sobrevivência de novos neurônios. A proteína BDNF é codificada pelo gene *Bdnf*. O BDNF está relacionado a sobrevivência, migração, diferenciação, crescimento dendrítico e axonal e formação sináptica (Gray, 2013; Suri e Vaidya, 2013). Os glicocorticóides podem atuar atenuando a expressão de BDNF, reduzindo a neurogênese e a plasticidade neural (Suri e Vaidya, 2013).

De forma geral, o BDNF e a serotonina, reguladas por diversas vias pelos níveis de glicocorticóides, parecem estimular a neurogênese e a plasticidade neural. Pode-se hipotetizar que elevados níveis de corticosterona levam a redução da neurogênese e plasticidade hipocampal reduzindo a expressão de BDNF e aumentando a recaptção de serotonina na fenda sináptica (Gray, 2013; Suri e Vaidya, 2013; Tafet *et al.*, 2001). Sendo assim, a expressão de mRNA para *Nr3c1*, *Hsd11b1*, *Htr1a* e *Bdnf* será analisada no presente estudo.

Como descrito, os níveis de glicocorticóides tem papel essencial sobre a regulação da neurogênese e da plasticidade neural ainda no período pré-natal do desenvolvimento (Lemaire *et al.*, 2006; Madhyastha *et al.*, 2013). Nas duas primeiras semanas de vida, os ratos não respondem bem ao estresse (período hiporresponsivo), apresentando baixos níveis de esteróides adrenais e alta taxa de produção de células granulares (Gould, 1999). Na idade adulta, os níveis basais de esteróides adrenais tornam-se mais altos e a taxa de produção de células granulares é relativamente baixa (Gould *et al.*, 1992). Experimentos que aumentam os níveis de esteróides adrenais promovem diminuição na proliferação de células granulares no período de desenvolvimento (Gould *et al.*, 1991) e na idade adulta (Cameron e Gould, 1994). A



remoção das adrenais ou a redução dos níveis de esteróides estimulam a proliferação de células granulares precursoras (Cameron e Gould, 1994).

Apesar de aumentar a proliferação de células precursoras, em animais adultos, a adrenalectomia resulta também em aumento da morte celular das células granulares do hipocampo. Em neonatos, a adrenalectomia também leva ao aumento da morte celular das células granulares. Injeções de corticosterona também resultam em aumento de células com núcleos picnóticos e morte celular nesta região (Gould et al, 1991). Durante o período hiporresponsivo ao estresse, o pico de proliferação celular no giro denteado de ratos coincide com o pico de morte celular (Gould and Mc Ewen, 1993).

### **1.3. Separação materna**

Diversos trabalhos demonstram que a exposição a eventos traumáticos durante a infância pode aumentar o risco de desenvolvimento de doenças psiquiátricas, como desordens de humor e ansiedade. As bases neurobiológicas dessas anormalidades ainda não estão completamente elucidadas, mas trabalhos apontam regiões encefálicas envolvidas com a mediação do comportamento emocional, como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal. Em ratos, muitos estudos descrevem os efeitos de estressores durante o período pós-natal que acarretam alterações comportamentais, neuroquímicas e morfológicas. Um dos modelos mais estudados para esses fins é a separação materna (Kuhn e Schamberg, 1998; McEwen, 2003).

Ratos separados precocemente da mãe apresentam comportamentos cognitivos e emocionais que foram relacionados a psicopatologias humanas como esquizofrenia, depressão e ansiedade (Aisa *et al.*, 2008; Daniels *et al.*, 2004; Ladd *et al.*, 2000; El Khoury *et al.*, 2006; Ellenbroek *et al.*, 2002; Kalinichev *et al.*, 2002; Macrí e Laviola,

2004; Newport *et al.*, 2002; Husum *et al.*, 2002; Sung *et al.*, 2010) e exagerada resposta ao estresse no eixo HPA de animais adultos. Curtos períodos de separação, denominados manipulação neonatal, parecem produzir efeitos contrários aos da separação materna (McEwen, 2003).

Os primeiros trabalhos que avaliaram os efeitos de manipulações ambientais pós-natais foram introduzidos por Levine em 1956, consistindo de separações diárias breves (15 minutos) dos filhotes de suas respectivas mães durante o desmame. Esse procedimento ficou conhecido como manipulação neonatal (Lehmann e Feldon, 2000). A manipulação neonatal promove mudanças na interação da mãe com seus filhotes. Mães de filhotes manipulados lambem e cuidam muito mais da prole que mães de ninhadas não manipuladas, sugerindo, assim, que o excesso de cuidado materno provoca aumento das vocalizações do filhote associadas à manipulação destes (Lee e Williams, 1974). Quando adultos, os filhotes que contaram com elevado cuidado materno apresentam níveis plasmáticos reduzidos de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e corticosterona após o estresse, não ocorrendo diferenças nos níveis basais desses hormônios. Portanto, a dedicação com que mães lambem e cuidam dos seus filhotes está inversamente relacionada com a resposta do eixo HPA ao estresse dos animais quando adultos (Liu *et al.*, 1997). Além disso, a manipulação materna parece induzir aumento da proliferação celular, do número de neurônios e da densidade de astrócitos no hipocampo de animais jovens (Winkelmann-Duarte *et al.*, 2011).

Na década de 70 surgiram os primeiros experimentos que utilizaram prolongados períodos de separação materna (Lehmann e Feldon, 2000). Existe uma variedade muito grande de protocolos experimentais que utilizam a separação

materna. Em linhas gerais, os protocolos mais comuns utilizam separações de 1h ou 3h durante os primeiros 14 dias de vida ou uma única separação por 24h geralmente no 9º dia após o nascimento (Kosten *et al.*, 2006; Kosten *et al.*, 2007; Raceková *et al.*, 2009; Seidel *et al.*, 2008).

Além disso, outras diferenças devem ser consideradas quando analisamos resultados divergentes de diferentes grupos de pesquisa. O horário da separação materna (diurno ou noturno), a duração da separação materna, a utilização ou não de controle de temperatura durante a separação dos filhotes, o sexo dos filhotes estudados, o grupo controle manipulado por curtos períodos de separação ou não manipulado, entre outros fatores (Lehmann e Feldon, 2000; Loi *et al.*, 2014; Oomen *et al.*, 2009; Ruedi-Beettschen *et al.*, 2004).

Lehmann e colaboradores (1999) sugeriram que ratos machos submetidos à separação materna são mais suscetíveis do que fêmeas em relação ao aumento do comportamento de medo e de ansiedade. Sendo assim, os diversos protocolos utilizados produzem efeitos comportamentais muito diferentes e algumas vezes até mesmo opostos em diversos modelos animais (Lehmann e Feldon, 2000).

Aisa e colaboradores (2008) estudaram os efeitos de 3 horas diárias de separação materna, entre 2º ao 21º dias pós-natais, na resposta ao estresse de ratas adultas. Esses animais apresentaram, na fase adulta, maior tempo de imobilidade no teste do nado forçado quando comparados com animais controles, sugerindo um comportamento associado à depressão. Além disso, os autores observaram elevação nos níveis sanguíneos de corticosterona e diminuição da densidade de receptores para glicocorticóides nesses animais quando comparados a controle, sugerindo que ratas submetidas à separação materna apresentam maior vulnerabilidade ao estresse na fase

adulta por possíveis alterações do eixo HPA. Instável relação entre mãe e filhotes parece alterar a resposta ao estresse dessa prole quando adulta, com possível elevação dos níveis de corticosterona (Faturi *et al.*, 2010; Levine, 2000).

Aisa e colaboradores (2009) também estudaram os efeitos de 3 horas diárias de separação materna, entre 2º ao 21º dias pós-natais, de animais adultos, com cerca de 60 a 75 dias de idade observando redução na expressão de mRNA para o fator neurotrófico derivado e encéfalo e sinaptofisina, bem como redução nas células BrdU positivas no giro denteado do hipocampo de animais separados das mães.

Mirescu e colaboradores (2004) verificaram redução na proliferação celular e no número de neurônios imaturos em ratos submetidos à 3 horas diárias de separação materna entre os 1º ao 14º dias pós-natais, no entanto, não observaram diferenças nos níveis basais de corticosterona quando comparados a animais controle ou com breves períodos diários de separação. O trabalho sugere que experiências estressantes em períodos precoces do desenvolvimento podem inibir a plasticidade neuronal devido à hipersensibilidade aos glicocorticóides e diminuída habilidade do hipocampo em responder ao estresse em animais adultos.

Kosten e colaboradores (2007) observaram que ratos submetidos ao isolamento neonatal, durante 1 hora do 2º ao 9º dias pós-natais, apresentam prejuízo na memória dependente do hipocampo, verificando redução do tempo de latência desses animais no teste da esQUIVA inibitória e maior tempo de exploração no teste de reconhecimento de objetos.

Fabricius e colaboradores (2008) observaram redução no número de neurônios no giro denteado do hipocampo de roedores adultos que foram submetidos à separação materna por 24 horas no 9º dia pós-natal, sugerindo que essa redução pode

ser devida à diminuição da neurogênese hipocampal ou ao aumento da apoptose neuronal. Racecová e colaboradores (2009) observaram redução na proliferação celular e aumento na quantidade de células em processo de morte celular na corrente migratória rostral em ratos com 28 dias de idade submetidos a três horas de separação materna, entre o 1º e 14º ou 1º e 21º dias pós natais.

Oreland e colaboradores (2010) analisaram o número de células granulares do hipocampo de ratos (com 22 dias de idade) submetidos a 360 minutos de separação materna entre o 1º ao 21º dias pós-natais. Os autores utilizaram como controles animais submetidos ao procedimento de manipulação neonatal (durante 15 minutos diários) ou sem qualquer manipulação. Não foram observadas diferenças significativas quanto ao volume hipocampal entre os grupos experimentais. A manipulação neonatal aumentou o número total de neurônios do giro denteado, enquanto a separação materna reduziu o número total de neurônios. As outras regiões hipocâmpais analisadas, CA1, CA2 e CA3 não foram afetadas pelos procedimentos.

Gos e colaboradores (2008) estudaram os efeitos da separação materna durante o período hiporresponsivo ao estresse e no período não considerado hiporresponsivo. O período hiporresponsivo ao estresse é caracterizado por níveis reduzidos de hormônios associados ao estresse agindo no eixo HPA e a relativa não resposta a estressores externos. Os ratos submetidos à separação materna (isolados individualmente 1 hora por dia), durante o período hiporresponsivo ao estresse, apresentam redução significativa na densidade de espinhos dendríticos na camada V do córtex cingulado anterior localizado no córtex pré-frontal (relacionado a desordens como depressão e esquizofrenia). No período não considerado hiporresponsivo ao estresse não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Bock e colaboradores (2005) não observaram diferenças significativas nas camadas II e III da mesma região na densidade de espinhos dendríticos de ratos submetidos à separação materna no período hiporresponsivo ao estresse. Ambos os autores sugeriram, que essas diferenças podem estar relacionadas à diferente fase de maturidade dos neurônios dessas regiões.

Estudos em primatas têm mostrado que privação materna e outras experiências estressantes nas fases iniciais de desenvolvimento reduzem os níveis encefálicos de serotonina (Giulian, 1974; McEwen, 2003). Além disso, a privação materna está associada ao aumento a preferência ao uso de álcool e a comportamento agressivo (McEwen, 2003). A expressão de receptores 5TH6 pode ser regulada pelos níveis circulantes de corticóides adrenais (Marcos *et al.*, 2007).

Experiências estressantes, como a relação instável entre mãe e prole após o nascimento, pode induzir desordens depressivas e danos às funções de memória. As alterações comportamentais, hormonais e morfológicas persistem até a vida adulta. O ambiente, tanto familiar como externo, pode modificar a circuitaria cerebral. Relações instáveis entre pais e filhos, assim como abuso infantil, aumentam os riscos de desenvolvimento de doenças físicas e mentais (McEwen, 2003). Alternativas ambientais para atenuação ou reversão das alterações causadas pelo estresse neonatal devem ser testadas, além das farmacológicas, uma vez que a utilização de fármacos durante o período neonatal pode ser bastante complexo.

#### **1.4. Enriquecimento ambiental**

O “enriquecimento ambiental” é um modelo experimental onde animais são criados com muitos estímulos, que podem ser explorados livremente e causam modificações comportamentais e morfofuncionais neurais dependentes dessa

experiência (Larsson *et al.*, 2002; Nithianantharajah *et al.*, 2004). Os animais são mantidos em caixas em cujo interior há diversos objetos (brinquedos), tais como: bolas, rampas, escadas, cubos e rodas que estão à disposição dos animais por períodos variáveis de tempo.

Em 1874 Charles Darwin acreditava que o encéfalo de animais selvagens era superior em volume ao de animais domésticos, devido às diferentes experiências ambientais a que estes animais estavam submetidos (Diamond, 2001). Em 1964 dois laboratórios de pesquisa (Bennett, Diamond, Krech e Rosenzweig e Hubel e Wisel), provaram que a experiência pode modificar o encéfalo (Diamond, 2001).

Diamond, Krech e Rosenzweig (1964) observaram aumento de peso do córtex cerebral de ratos submetidos a condições de enriquecimento ambiental quando comparados com animais submetidos a condições de empobrecimento ambiental, sem aumento de peso das regiões subcorticais (Diamond, Krech e Rosenzweig, 1964; Bennett, Rosenzweig e Diamond, 1969). Além disso, o peso corpóreo dos animais submetidos a condições de enriquecimento foi menor que o peso corpóreo dos animais isolados (Diamond, Krech e Rosenzweig, 1964). Interessantemente, o número de sinapses por área de neurópilo na camada IV do córtex occipital dorsomedial de ratos foi maior nos animais submetidos ao empobrecimento ambiental quando comparado com animais submetidos ao enriquecimento ambiental. Não foram observadas diferenças significativas em relação as sinapses dessa região de animais enriquecidos quando comparados com animais vivendo em condições de laboratório padrão (Diamond e colaboradores, 1975). Diamond e colaboradores (1966) observaram aumento no número de células gliais no córtex visual de ratos em condições de enriquecimento ambiental.

Diamond e colaboradores (1976) observaram diferenças na profundidade do córtex occipital em ratos expostos durante curtos períodos a condições de enriquecimento ou empobrecimento ambiental. Se os experimentos ambientais eram realizados no início do desmame, as modificações corticais, eram induzidas principalmente pelo empobrecimento ambiental, levando a redução da espessura cortical; no entanto, se os experimentos ambientais fossem realizados em animais adultos jovens (com cerca de 60 dias de idade), as modificações corticais eram devidas ao enriquecimento do ambiente, levando ao aumento da espessura cortical. No entanto, o hipocampo dos animais não foi afetado em nenhuma das condições experimentais (Diamond e colaboradores, 1976). Um dado bastante interessante é o efeito da lateralidade hipocampal em relação ao dimorfismo sexual. Ratos possuem o hipocampo direito mais espesso do que o esquerdo, enquanto ratas apresentam o hipocampo esquerdo mais espesso do que o direito. Essas características dependem da idade dos animais, sendo que nos machos existe um padrão melhor definido (Diamond e colaboradores, 1982; Diamond e colaboradores, 1983).

Diamond e colaboradores (1985) submeteram ratos Long-Evans (3 por caixa) de 766 dias de idade a condições de enriquecimento ambiental (10 animais em amplas caixas com brinquedos) ou não enriquecimento (2 animais por caixa). Aos 904 dias de idade os animais foram sacrificados para análise do espessamento do córtex cerebral e foi comprovado maior espessamento do córtex frontal e occipital dos animais submetidos ao enriquecimento ambiental quando comparados aos controles, mostrando que o córtex cerebral possui plasticidade ao longo de toda vida. Os autores não observaram diferenças significativas quanto ao número de células neuronais e gliais entre os grupos experimentais.



Diamond e colaboradores (1987) analisaram o espessamento do córtex occipital medial de ratos expostos as seguintes condições: condições laboratoriais padrão (3 animais por caixa), enriquecimento ambiental (12 animais em caixa ampla com brinquedos) e enriquecimento ambiental com superlotação (36 animais em caixa ampla com brinquedos). Os animais submetidos ao enriquecimento ambiental, independente da superlotação de animais por caixa, apresentaram maior espessamento do córtex occipital medial do que os animais em condições habituais de laboratório. Os autores discutem principalmente duas questões importantes, a primeira é a dificuldade para definir o número de animais necessários para que possamos considerar um ambiente superlotado, a área disponível para os animais no ambiente com superlotação foi reduzida em 1/3. O segundo ponto discutido foi que os brinquedos presentes na gaiola de enriquecimento parecem atenuar o stress da superlotação.

Carughi, Carpenter e Diamond (1989) analisaram o espessamento e a ramificação dendrítica do córtex occipital de ninhadas de mães bem alimentadas ou desnutridas durante a lactação. Após o desmame, os filhotes foram submetidos a condições laboratoriais padrão ou condições de enriquecimento ambiental. Animais submetidos ao enriquecimento ambiental, provenientes de mães desnutridas durante a lactação e que receberam uma dieta de reabilitação protéica, apresentaram maior espessamento e ramificação dendrítica do que animais submetidos as mesmas condições experimentais, porém mantidos em condições laboratoriais padrão.

Os trabalhos de Diamond e colaboradores analisaram principalmente o efeito do enriquecimento ambiental sobre o córtex cerebral de ratos. A partir de seus estudos outros pesquisadores começaram a estudar o efeito do enriquecimento ambiental

sobre outras regiões encefálicas, incluindo o hipocampo, estrutura alvo do presente estudo. Os estudos que começaram a analisar o efeito do enriquecimento ambiental sobre a neurogênese hipocampal foram realizados por Kempermann, Kuhn e Gage (1997).

Kempermann, Kuhn e Gage (1997) observaram que camundongos jovens (com 21 dias de vida) criados em ambiente enriquecido (ao longo de 40 dias) apresentaram maior sobrevivência e diferenciação neuronal na região do giro denteado do hipocampo comparados aos animais controle, criados em gaiolas de laboratório. Entretanto, não foi observada alteração significativa na proliferação celular entre os grupos experimentais. Além disso, observaram aumento do número de novas células gliais, GFAP positivas. O número de células granulares e o volume do giro denteado do hipocampo foram superiores nos animais submetidos ao enriquecimento ambiental quando comparados a animais mantidos em caixas padrão. Ou seja, apesar do número de células em proliferação celular ser similar entre os grupos, há menor morte celular, com diferenciação em células neuronais e gliais. Na tarefa de aprendizado espacial no labirinto aquático de Morris, camundongos submetidos ao enriquecimento ambiental encontraram a plataforma submersa num período de tempo menor que os animais controles.

O ambiente enriquecido consiste de vários componentes que incluem expansão das oportunidades de aprendizado, aumento da interação social e da atividade física, além de gaiola ampla (Kempermann *et al.*, 1998). Em 1999, van Praag e colaboradores, separaram a influência dos diferentes componentes que agem no ambiente enriquecido sobre a neurogênese hipocampal e verificaram que a atividade física aumenta a proliferação, sobrevivência e diferenciação celulares no giro

denteado do hipocampo. O ambiente enriquecido aumenta a sobrevivência e diferenciação celulares não alterando a proliferação, resultado similar ao observado por Kempermann e colaboradores (1997). Alguns estudos têm mostrado que fatores ambientais como ambiente enriquecido podem alterar o número e densidade de espinhos dendríticos (van Praag *et al.*, 2000; Kolb *et al.*, 2003).

Brown e colaboradores (2003) analisaram a neurogênese no hipocampo e bulbo olfatório de camundongos submetidos ao enriquecimento ambiental, exercício físico voluntário ou caixa padrão e observaram que apenas os animais expostos ao exercício físico voluntário apresentaram maior proliferação celular hipocampal que os animais controles. Observaram também que tanto os animais expostos ao exercício físico voluntário e ao enriquecimento ambiental apresentam maior densidade de neurônios jovens hipocampais que os animais controles. Não foram observadas diferenças significativas no bulbo olfatório. Os autores sugeriram que essas influências ambientais promovem sinais neurogênicos que são específicos para o giro denteado do hipocampo.

Piazza e colaboradores (2011) observaram que o enriquecimento ambiental previne o déficit de memória espacial em ratos Wistar diabéticos na tarefa de reconhecimento de objetos. No entanto, o enriquecimento ambiental não conseguiu prevenir a redução da proliferação celular na camada subgranular e granular do hipocampo observada em animais diabéticos.

Xu e colaboradores (2009) estudaram o efeito do ambiente enriquecido em ratos submetidos à isquemia cerebral focal transiente. Nesses animais foi observado aumento no desempenho da memória espacial no teste do labirinto aquático de Morris

e aumento da densidade sináptica do córtex parietal avaliada com microscopia eletrônica.

Ueda e colaboradores (2005) examinaram a influência da depleção de serotonina e do ambiente enriquecido sobre a neurogênese hipocampal e a memória espacial e verificaram acréscimo de células marcadas com BrdU no giro denteado dos ratos expostos a ambiente enriquecido. Em contrapartida, observaram um decréscimo de células marcadas com BrdU no hipocampo dos ratos submetidos à depleção de serotonina, neurotransmissor que influencia a aprendizagem, memória e neurogênese hipocampal no adulto.

Segovia e colaboradores (2008) demonstraram que o ambiente enriquecido reduz a liberação de acetilcolina no córtex pré-frontal após estresse agudo em ratos de 6, 15 e 24 meses sugerindo que animais jovens submetidos ao ambiente enriquecido possuem menor reatividade a estímulos estressantes.

Sifonios e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do ambiente enriquecido sobre o desamparo apreendido, método em que ocorre a exposição de roedores a um estresse inescapável, o qual induziu comportamento similar ao transtorno depressivo. Os autores observaram que o ambiente enriquecido reverteu o comportamento dos animais em relação ao aumento do tempo de latência de escape dos animais submetidos ao desamparo apreendido. Além disso, duas proteínas estruturais de neurônios hipocampais da região CA3, proteína pré-sináptica sinaptofisina e subunidade leve de neurofilamento, as quais estavam reduzidas em animais submetidos ao desamparo apreendido, foram observadas em valores similares a animais controle quando os animais foram submetidos ao ambiente enriquecido. No entanto, o ambiente enriquecido não elevou a neurogênese no giro denteado desses

animais. Os autores sugeriram que o ambiente enriquecido pode modificar o comportamento e as sinapses de animais expostos a modelos experimentais de depressão.

O ambiente enriquecido, por aumentar a proliferação e a sobrevivência de novos neurônios no hipocampo, pode ter efeito benéfico sobre doenças de distúrbio comportamental (Hattori *et al.*, 2007). Assim como Llorens-Martín e colaboradores (2007) demonstraram que o ambiente enriquecido teve efeito protetor sobre as células hipocâmpais, verificando maior diferenciação de neurônios imaturos no giro dentado do hipocampo, comparado com o grupo controle, quando posteriormente os ratos foram expostos ao teste de Porsolt de nado forçado, uma tentativa de modelo experimental de depressão.

Conforme mencionado acima, a separação neonatal promove diversas alterações comportamentais que podem ser decorrentes do prejuízo da função hipocâmpal e alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Considerando que a separação materna tem sido utilizada como modelo de estresse e que estudos têm demonstrado redução na neurogênese e alterações sinápticas no hipocampo de animais submetidos a esse procedimento, e que, ao contrário, o ambiente enriquecido parece apresentar efeitos opostos, como o aumento da neurogênese e dos espinhos dendríticos, é possível propor que a provável redução na plasticidade do giro dentado de ratos submetidos à separação materna possa estar relacionada à redução na concentração de serotonina e aumento de glicocorticóides no hipocampo desses animais e que o ambiente enriquecido possa ter efeitos benéficos na reversão dessas alterações morfológicas. Além disso, seria interessante investigar se a redução no número de neurônios no giro dentado do hipocampo de roedores jovens submetidos

à separação materna poderia ser decorrente, em parte, de aumento da apoptose (morte celular programada) nessa estrutura encefálica, conforme proposto por Fabricius e colaboradores (2008).

A nossa proposta com este trabalho é testar a hipótese de que “expor animais a enriquecimento ambiental pode atenuar alterações hipocâmpais decorrentes da separação materna”.

## 2. Justificativa

Eventos estressantes durante a infância podem aumentar o risco de desenvolvimento de doenças psiquiátricas. Apesar de diversos estudos terem sido realizados com a finalidade de entender as bases neurobiológicas relacionadas a essas modificações comportamentais e encefálicas, muitas questões ainda não foram respondidas. A formação hipocampal é muito sensível aos efeitos do estresse, sendo que age inibindo o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A região subgranular do giro dentado do hipocampo possui a capacidade de neurogênese em indivíduos adultos. A hiperestimulação do eixo HPA, com conseqüente liberação de corticosterona, tem sido relacionada à diminuição da neurogênese hipocampal. A separação materna é utilizada como modelo de depressão e de estresse pós-natal. Animais submetidos à separação materna apresentam uma resposta exacerbada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ao estresse e diminuição do número de espinhos dendríticos em diversas regiões encefálicas. Ao contrário, estudos sugerem que o ambiente enriquecido, por aumentar a neurogênese no giro dentado do hipocampo, tenha efeito benéfico sobre doenças comportamentais. Até o presente, os estudos sobre neurogênese, não analisaram a relação dos efeitos do ambiente enriquecido sobre a separação materna no giro dentado do hipocampo de ratos. Portanto, estudar fatores ambientais que possam ter efeito benéfico sobre os distúrbios comportamentais é de fundamental importância, tanto para entender as bases neurobiológicas desses fenômenos como para buscar alternativas ambientais de reversão aos danos causados por eventos estressantes pós-natais.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Verificar se o ambiente enriquecido pode atenuar ou suprimir alterações relacionadas à neurogênese e plasticidade sináptica no giro denteado do hipocampo de ratos adolescentes submetidos à separação materna.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Conferir se a separação materna e/ou enriquecimento ambiental interferem com:

3.2.1- Neurogênese no giro denteado do hipocampo;

3.2.2- Astrócitos no hipocampo;

3.2.3- Número de sinapses por área, locais de contato sináptico (dendritos ou espinhos dendríticos) e número de botões axonais multisinápticos na camada molecular interna do hipocampo;

3.2.4- Expressão de mRNA para os genes Nr3c1 (codificador de receptores de glicocorticoides), Hsd11b1 (codificador da enzima responsável por converter a cortisona ao hormônio ativo corticosterona), Hrt1a (codificador de receptores serotoninérgicos 5HT-1A) e Bdnf (codificador do fator neurotrófico derivado do encéfalo).



## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Manipulação dos animais**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo número 114/2010).

Os animais foram mantidos em condições padrão, com acesso a comida e água *ad libitum*, temperatura ambiente em cerca de 22°C e ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os animais foram manipulados de acordo com as leis nacionais e internacionais (Diretriz de Conselho da Comunidade Européia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC) que regem a execução de experimentos com animais de laboratório em condições éticas de trabalho.

Ratas wistar, com cerca de 100 dias de idade, foram alocadas para acasalamento de forma monogâmica (durante 1 semana), sendo posteriormente colocadas em caixas individuais. Após o 20º dia do acasalamento as fêmeas foram acompanhadas diariamente a fim de se observar o dia de nascimento dos filhotes. Foram realizados 3 experimentos, o primeiro para coleta de amostras para imunohistoquímica (grupo experimental 1), o segundo para coleta de amostras para microscopia eletrônica (grupo experimental 2) e o terceiro para coleta de amostras para qRT-PCR (grupo experimental 3).

### **4.2. Separação materna**

O dia de nascimento dos filhotes foi considerado P0, sendo padronizado para as 17 horas o horário diário de verificação do nascimento das ninhadas. No dia seguinte ao nascimento, P1, observava-se o número de filhotes por ninhada, sendo

incluídos no estudo apenas ninhadas entre 7 a 11 filhotes. As ninhadas, juntamente com suas respectivas mães, permaneceram em caixas padrão de polipropileno de dimensões 41,00 x 34,00 x 16,00 cm até o dia do desmame, P21. No P7, P14 e P21 os filhotes de cada ninhada foram pesados, neste momento era realizada a troca de maravalha das caixas, a fim de minimizar possível estresse pela manipulação humana.

Para o procedimento de separação materna os filhotes foram retirados da caixa padrão e levados a uma sala adjacente, diariamente entre às 09:00 e 12:00, ao longo dos dias pós-natais P1 a P14 (figura 4). Após esse período a ninhada era devolvida a sua respectiva mãe, a qual permanecia na caixa padrão. Durante o período de separação as ninhadas foram mantidas sobre lençol térmico, a fim de evitar perda de calor. As ninhadas controles permaneceram em seu ninho.



**Figura 4:** Ninhada submetida ao procedimento de separação materna (os animais foram colocados sobre lençol térmico para reduzir a perda de calor).

Após o desmame, os filhotes machos provenientes de uma mesma ninhada, de cada procedimento (controle x separação materna), foram subdivididos em grupos submetidos ou não ao enriquecimento ambiental. Portanto formaram-se os seguintes

grupos: (1) controle, (2) submetidos à separação materna, (3) mantidos no ambiente enriquecido, (4) submetidos à separação materna e mantidos no ambiente enriquecido.

### **4.3. Enriquecimento ambiental**

O enriquecimento ambiental está relacionado ao aumento das oportunidades de aprendizado, atividade física e interação social. No P24 os animais submetidos ao enriquecimento ambiental foram colocados em gaiolas de aço inox nas dimensões de 100,00 (comprimento) x 50,00 (largura) x 100,00 (altura) cm. No P22 e P23 foram realizadas as injeções intraperitoneais de BrdU, o marcador utilizado para estudos de neurogênese. Administraram-se 3 injeções diárias durante o período claro, com um intervalo de aproximadamente 4 horas entre as injeções (iniciando-se às 09:00, 13:00 e 17:00), durante 2 dias consecutivos, na dose de 100mg/Kg e concentração de 20mg/ml, sendo o BrdU diluído em solução fisiológica 0,9% a 37° C.

As caixas de ambiente enriquecido possuem 3 andares conectados por tubos (conhecidos comercialmente por habitrail, ou manualmente montados com PVC), escadas, rodas de correr, rolhas de cortiça e comedouros e bebedouros dispostos em diversas regiões da caixa (figura 5). Nas gaiolas padrão de polipropileno (41,00 x 34,00 x 16,00 cm) os animais foram mantidos em número de 4 por caixa e nas gaiolas de ambiente enriquecido em número de 8 a 10 por caixa.

Semanalmente foi realizada a limpeza das gaiolas e “brinquedos” com detergente neutro e água sanitária. Durante a limpeza, foi também realizada a troca dos “brinquedos” e do local dos comedouros e bebedouros, para que os animais pudessem sempre ter novas oportunidades de aprendizado. Procurou-se sempre adicionar “brinquedos” com diferentes texturas, como a diferença entre os habitrais (com ranhuras e transparentes) e tubos de PVC (lisos e escuros).



**Figura 5:** Caixa de enriquecimento ambiental: oportunidade de aprendizado, atividade física e interação social. Ratos com cerca de 30 dias de idade no enriquecimento ambiental.

No  $P51 \pm 2$  os animais do grupo experimental 1, utilizados para técnicas imunohistoquímicas, foram anestesiados e perfundidos com solução salina (0,9%), seguida de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH = 7,4). Os encéfalos foram mantidos durante 12 horas neste fixador, sendo armazenados em tampão fosfato 0,1M e crioprottegidos em trocas de sacarose 15% e sacarose 30%. Os animais do grupo experimental 2, utilizados para a técnica de microscopia eletrônica, foram perfundidos com solução salina (0,9%), para lavar o leito capilar, seguido da solução do fixador composto de paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Os encéfalos retirados permaneceram nesses fixadores durante a noite a 4°C, e posteriormente foram armazenados em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Os animais do grupo experimental 3, destinados a qRT-PCR, foram decapitados, e a glicemia medida com o aparelho Accu-chek Active utilizando-se

sangue do momento da decapitação. A glicemia dos animais foi medida para verificar possíveis diferenças metabólicas entre os animais.

As análises foram realizadas aproximadamente no  $P51 \pm 2$ , uma vez que nesta idade os ratos podem ser considerados adolescentes. A maturidade sexual de ratos ocorre em torno do P45 (Sengupta, 2011; Sengupta, 2013), enquanto que em humanos ocorre por volta dos 12 anos de idade. Aproximadamente no P49 os ratos podem ser considerados adolescentes, e do P70 adultos jovens (Sengupta, 2013). Influências ambientais pós-natais podem modular alterações no encéfalo e no comportamento durante a adolescência, dependendo do ambiente a que esses indivíduos forem submetidos (Paus, 2013). A responsividade ao estresse muda ao longo da puberdade e adolescência, período em que a maturação sexual e social estão sendo firmadas, bem como há alta plasticidade, e que o encéfalo está susceptível ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, tanto em humanos como em modelos animais para esses transtornos (Romeo e McEwen, 2006; Romeo, 2010; Klein e Romeo, 2013; Paus, 2013). Por exemplo, em humanos, o primeiro episódio de psicose surge em adolescente ou jovens (Holtzman *et al.*, 2013). Alterações neuroendócrinas neste período, incluindo no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, frente a estímulos ambientais, estão relacionadas a essa suscetibilidade (Romeo, 2010; Borges *et al.*, 2013; Klein e Romeo, 2013), bem como tem sido associadas a alterações nos processos de plasticidade (Eiland e Romeo, 2013). Assim, no rato, o  $P48 \pm 2$  coincide com o período o encéfalo encontra-se muito susceptível ao ambiente, e em que os eventos pós-natais podem ter extrema importância.

#### 4.4. Microscopia de fluorescência e microscopia confocal

Após diversos testes de padronização imunohistoquímica seguiu-se o protocolo descrito. Secções de criostato de 20 micrômetros de espessura foram montadas sobre lâminas gelatinizadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento do uso. Para o processamento, as lâminas foram colocadas em temperatura ambiente e vácuo a  $-25$  in/Hg durante 1 hora; imersas em TBS Triton X-100 2%, 1 hora; bloqueadas com glicina 0,1 M diluída em TBS Triton X-100 a 1%, 1 hora; bloqueadas com BSA a 2% e soro normal da espécie animal em que foi feito o anticorpo secundário a 1% diluídos em TBS Triton X-100 a 1%, 1 hora; incubadas com os anticorpos primários policlonais (diluições: anti-Doublecortina = 1:500, “rabbit polyclonal to Doublecortin”, ab18723, ABCAM; ou anti-GFAP, “rabbit polyclonal to Glial Fibrillary Acidic Protein”, AB5804, = 1:500; Millipore), diluídos em BSA a 1% e soro normal a 0,5% diluídos em TBS Triton X-100 a 1%, durante a noite em temperatura ambiente. No dia seguinte as lâminas foram lavadas em TBS Triton X-100 1% com BSA 0,5% (2 x 10') e TBS Triton X-100 1% (4 x 10'), e incubadas com anticorpos secundários fluorescentes (Alexa Fluor 594 chicken anti-rabbit, A21442, ou Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit, A11010, diluição = 1:500, Invitrogen) durante 3 horas. Após lavados em TBS Triton X-100 1% com BSA 0,5% (2 x 10'), TBS Triton X-100 1% (4 x 10') e água destilada, as lamínulas foram montadas sobre as lâminas com Prolong Gold. A microscopia e aquisição de imagens foi feita com o Microscópio Laser Leica LMD 6500.

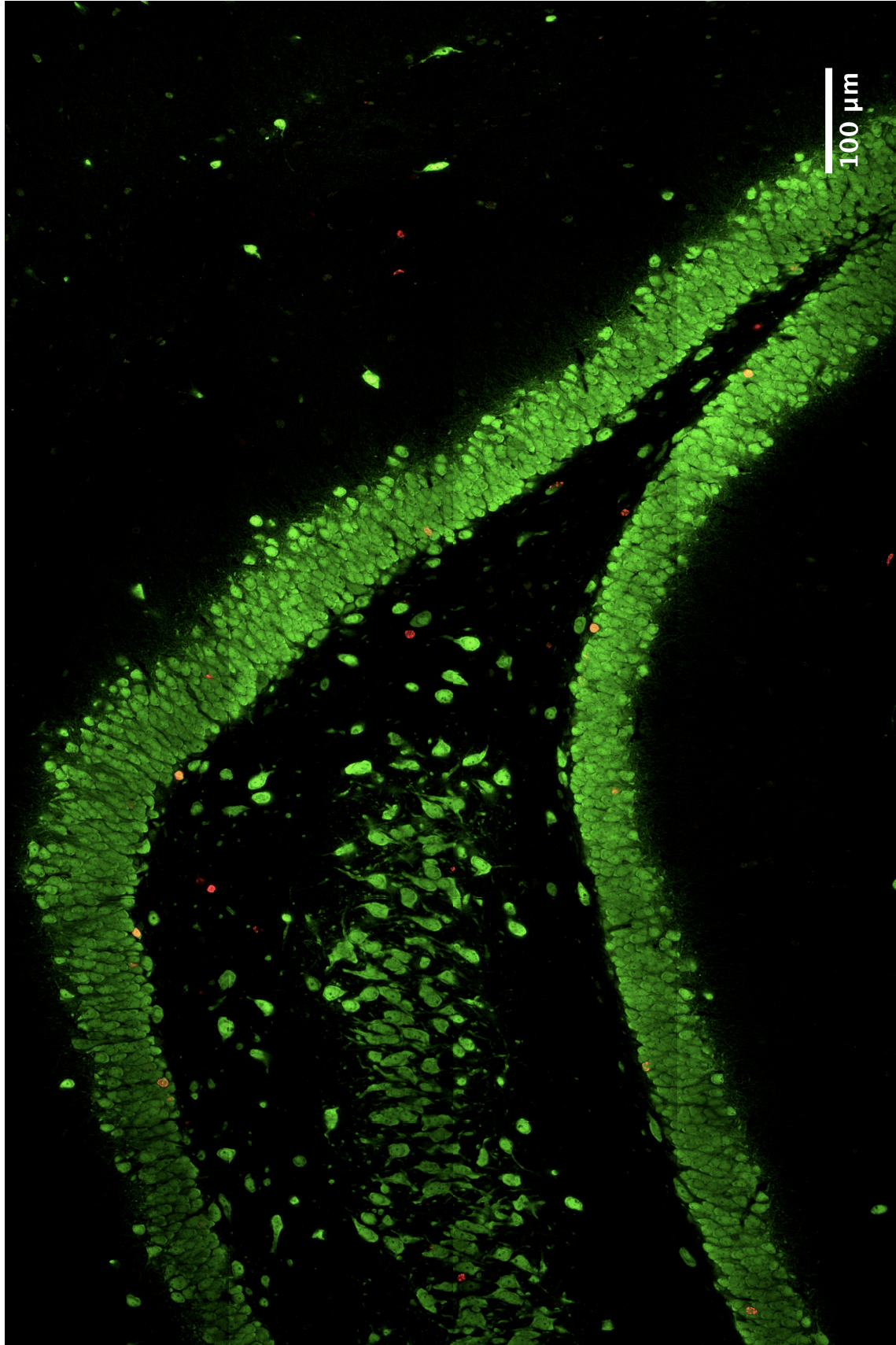
Para a incubação anti-BrdU/NeuN, modificada de Tang e colaboradores (2007) (diluições: anti-BrdU = 1:100, GE Healthcare; anti-NeuN = 1:500, Millipore), as lâminas foram colocadas em estufa a  $50^{\circ}\text{C}$  com vácuo a  $-25$  in/Hg durante 1 hora. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica em citrato de sódio 0,1 M, pH

6,00, a 96°C durante 30 minutos. Após esfriamento, as lâminas foram lavadas em TBS-Triton X-100 1% por 1 hora, TBS-Triton X-100 0,5% com glicina 0,1M por 1 hora, e em TBS (3x 15'). O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com BSA 2% e soro da espécie animal em que foi feito o anticorpo secundário, diluídos em TBS. Os anticorpos primários, anti- BrdU (diluição = 1:100, “mouse monoclonal to Bromodeoxyuridine”, RPN202, GE Healthcare) e NeuN (diluição = 1:500, “rabbit polyclonal to NeuN”, ABN78, Millipore) foram diluídos em DNase (GE Healthcare) com TBS durante a noite. No dia seguinte, realizaram-se lavagens em TBS Triton X-100 (4x 10') e incubaram-se com os anticorpos secundários, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (diluição = 1:500, A11001, Invitrogen) e Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit (diluição = 1:500, A21207, Invitrogen) durante 3 horas. Realizaram-se lavagens em TBS Triton X-100 (4x 10') e em água destilada (1 x 5'), incubação com DAPI (1:4.000, Sigma), e lavado em água destilada. As lâminas foram montadas com Prolong Gold (Invitrogen). As imagens foram adquiridas com o Microscópio Multifóton Zeiss: emissão 690, 488 e 594; absorção: 415 a 515, 498 a 598 e 604 a 704.

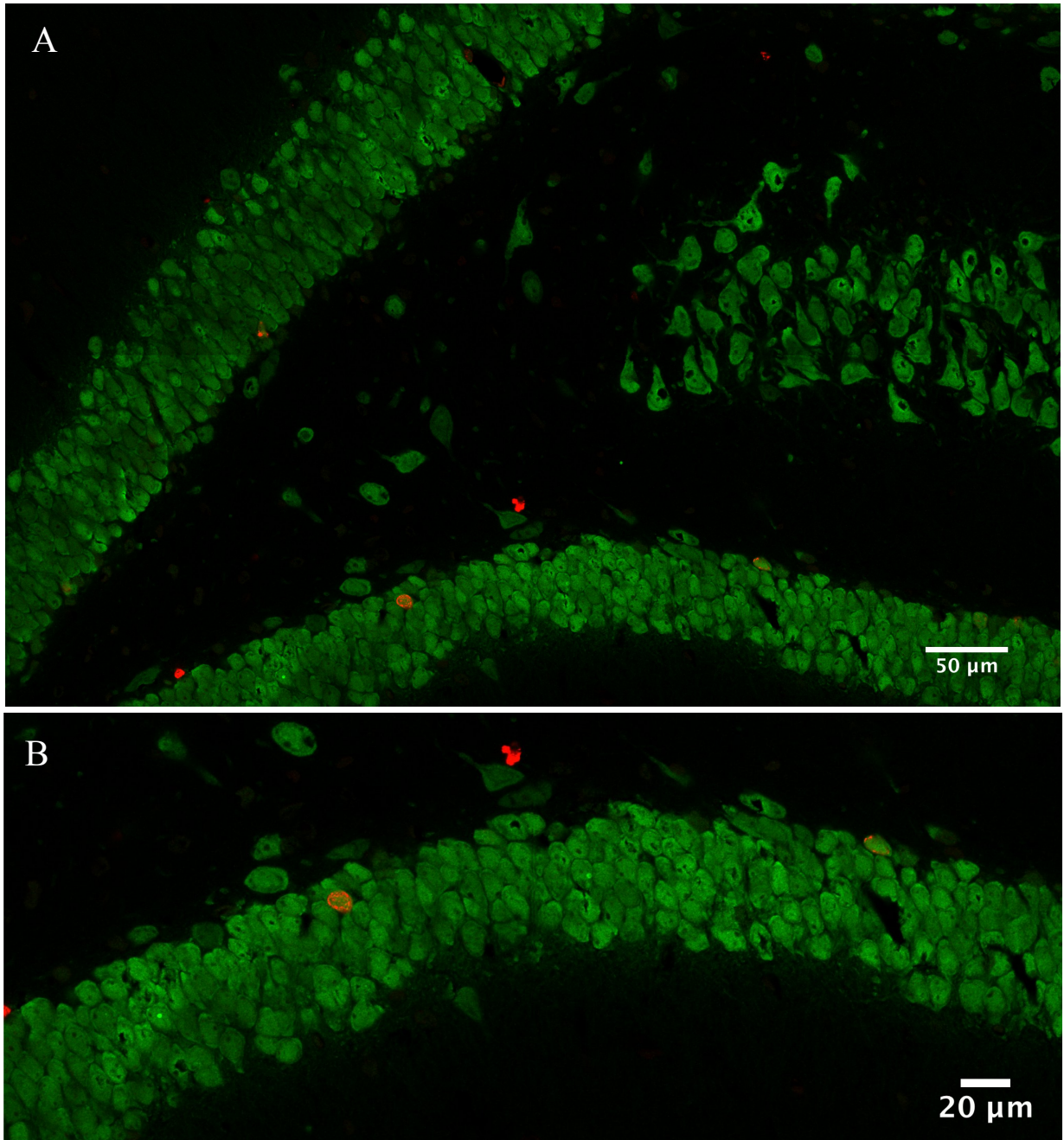
Para neurogênese no giro denteado do hipocampo analisaram-se: o número de células BrdU positivas, BrdU/NeuN positivas (figuras 6, 7 e 8), doublecortina positivas e a área imunopositiva para doublecortina (figuras 9 e 10). Também foi analisada a área imunopositiva para GFAP, marcador de astrócitos (figura 11). O programa Image J (NIH, BETHESDA, MD, USA) foi utilizado para a quantificação. Analisaram-se as seguintes secções antero-posteriores aproximadas ao bregma: ~2,56, 3,60 e 4,52, em ambos os lados do hipocampo. Para imunofluorescência em microscopia de luz analisaram-se 2 secções hipocâmpais para cada altura do bregma, em microscopia confocal analisou-se 1 secção hipocâmpal para cada altura do bregma

(antero-posterior: ~2,56 e 3,60, salienta-se que foram apenas analisados os animais com ambas as alturas do brega) reconstruindo-se cada hipocampo, bidimensionalmente, a partir 24 imagens (6 x 4) obtidas com a objetiva de 40x.

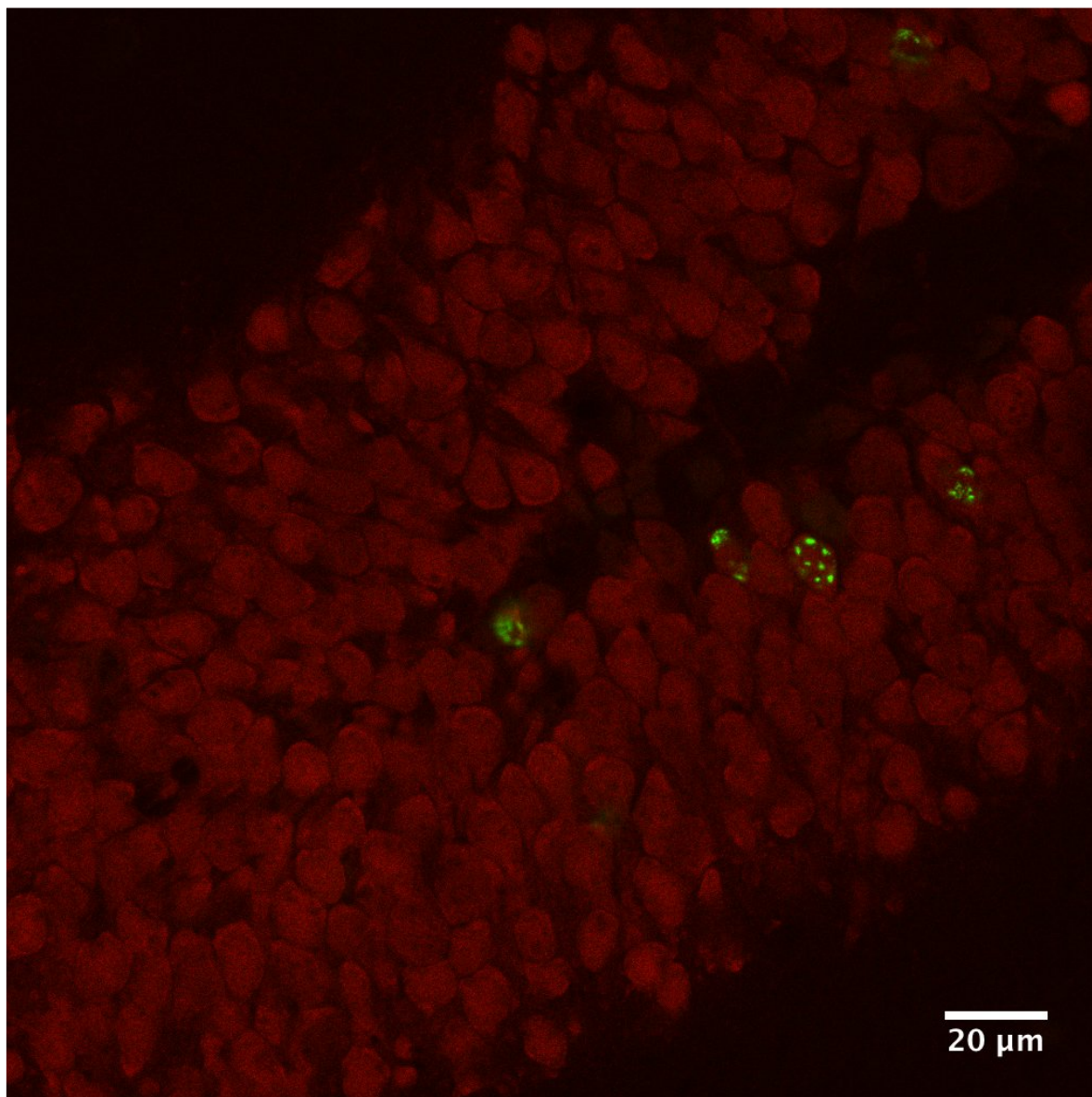




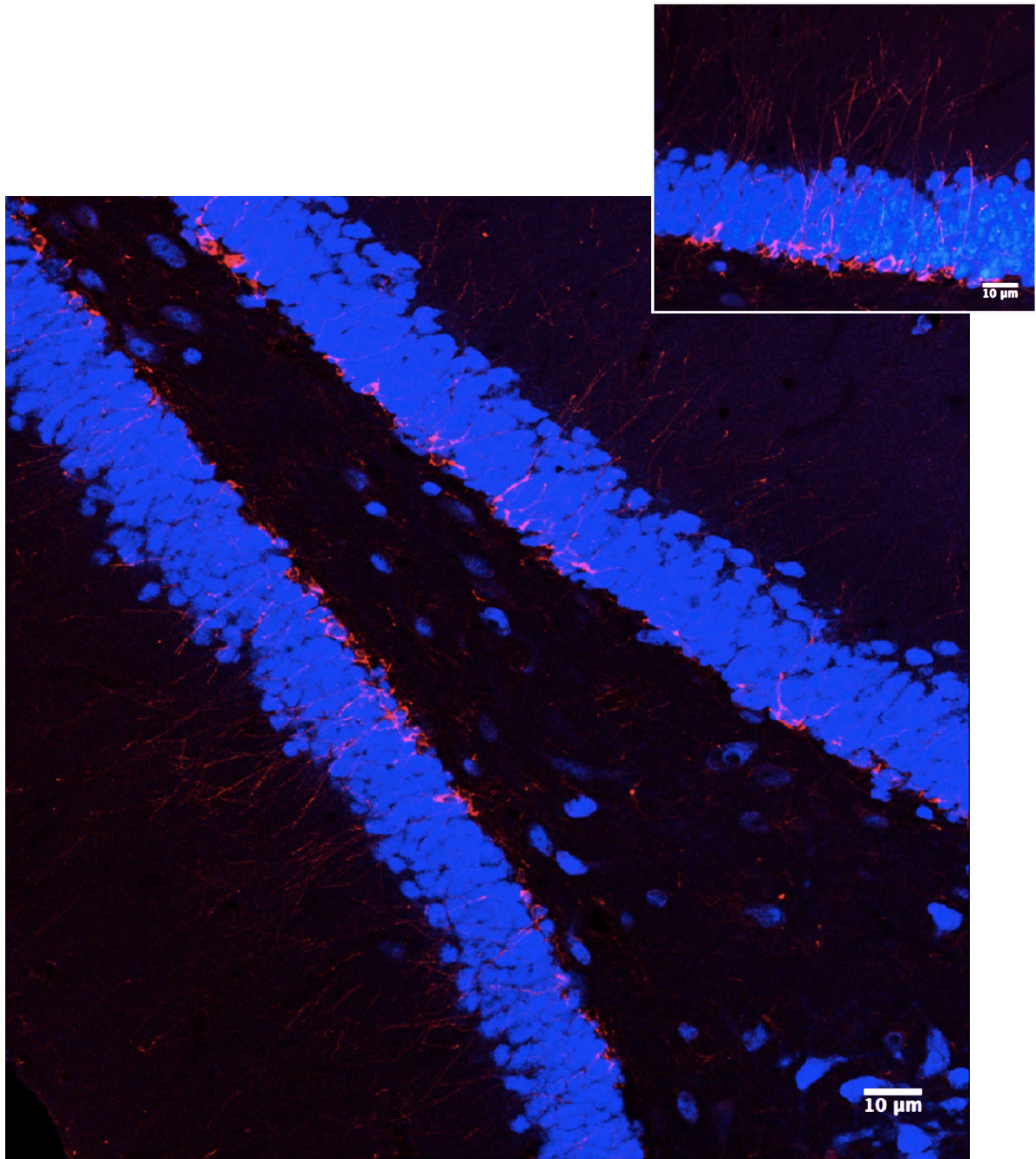
**Figura 6:** Imagem confocal de neurônios imunopositivos para a BrdU (em vermelho) e NeuN (em verde). Observar neurônios jovens (imunocolocalização de BrdU e NeuN, em laranja). Reconstrução do giro denteado do hipocampo; 24 imagens (6 x 4) com a objetiva de 40x.



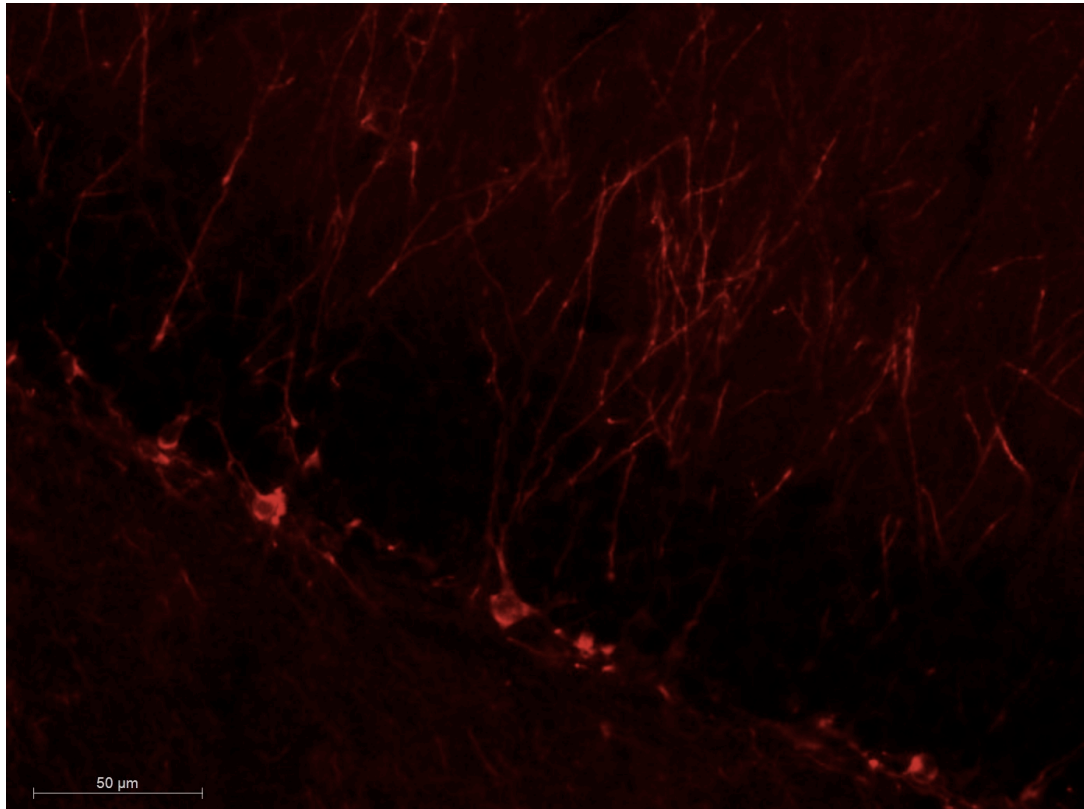
**Figura 7:** Neurônios imunopositivos para BrdU (em vermelho) e NeuN (em verde). Neurônios jovens, colocalização de ambos os marcadores (em laranja). A: reconstrução de 6 imagens (3 x 2) com objetiva de 40x. B: reconstrução de 2 imagens (2 x 1).



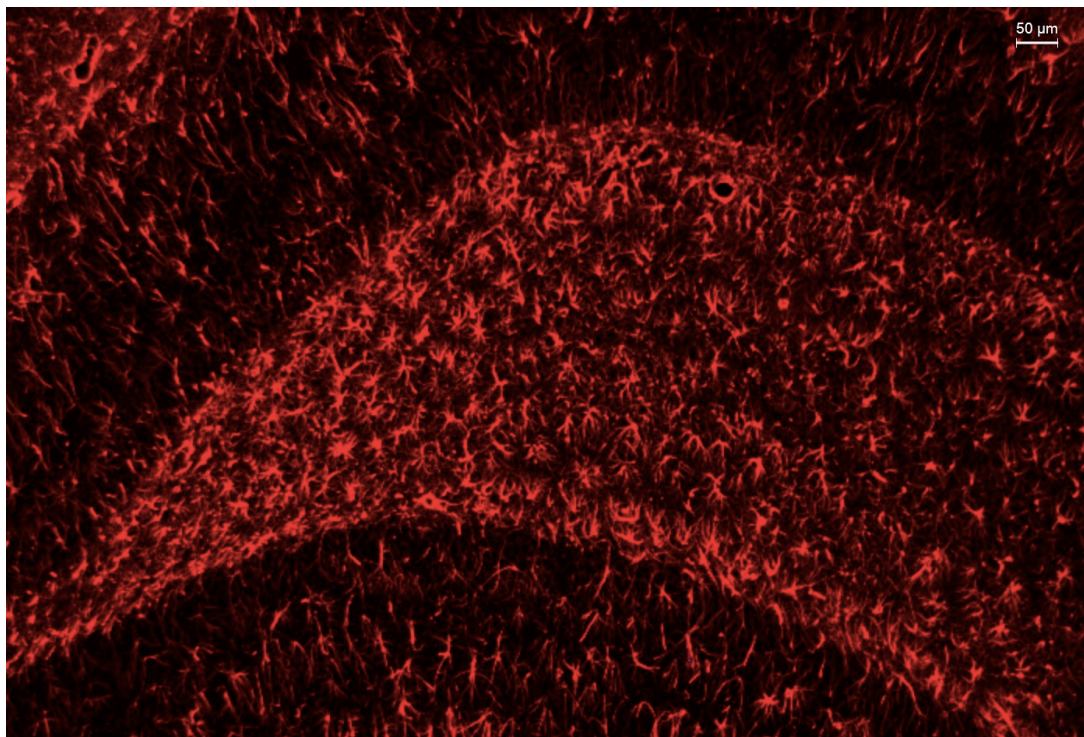
**Figura 8:** Microcopia confocal de neurônios jovens na camada granular do giro denteado. Colocalização (em amarelo) da marcação anti-BrdU (excitação: 488) e anti-NeuN (excitação: 594, em vermelho).



**Figura 9:** Microscopia confocal de neurônios imunopositivos para doublecortina (vermelho) e NeuN (azul). No canto superior direito observar neuroblastos se integrando a camada granular do giro denteado e estendendo seus dendritos em direção a camada molecular interna da formação hipocampal.



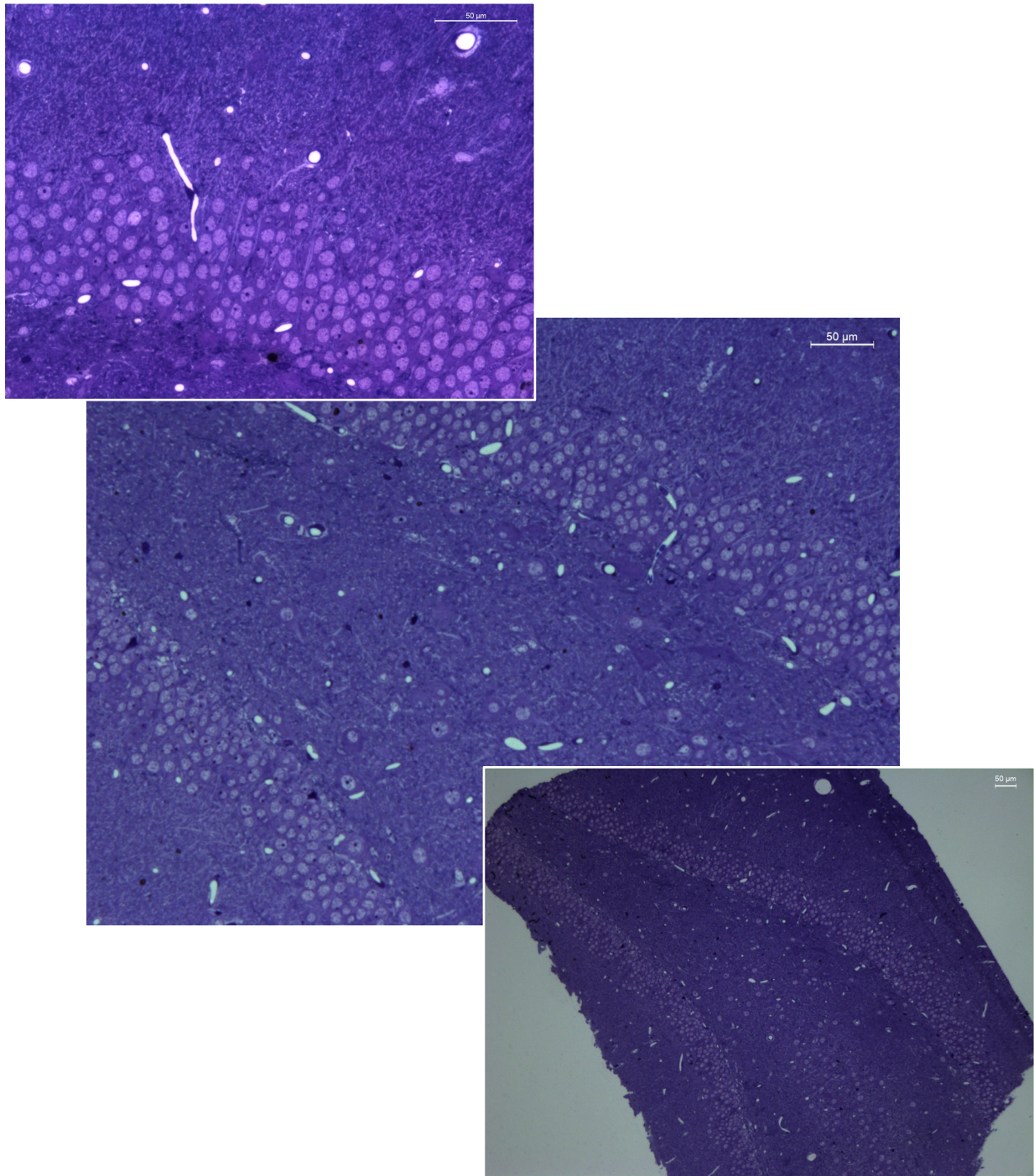
**Figura 10:** Imunofluorescência de neurônios imunopositivos para doublecortina. Observar neuroblastos se integrando a camada granular do giro dentado e estendendo seus dendritos em direção à molecular interna da formação hipocampal.



**Figura 11:** Imunofluorescência de astrócitos (imunomarcados para a proteína GFAP) no hipocampo.

#### 4.5. Microscopia eletrônica

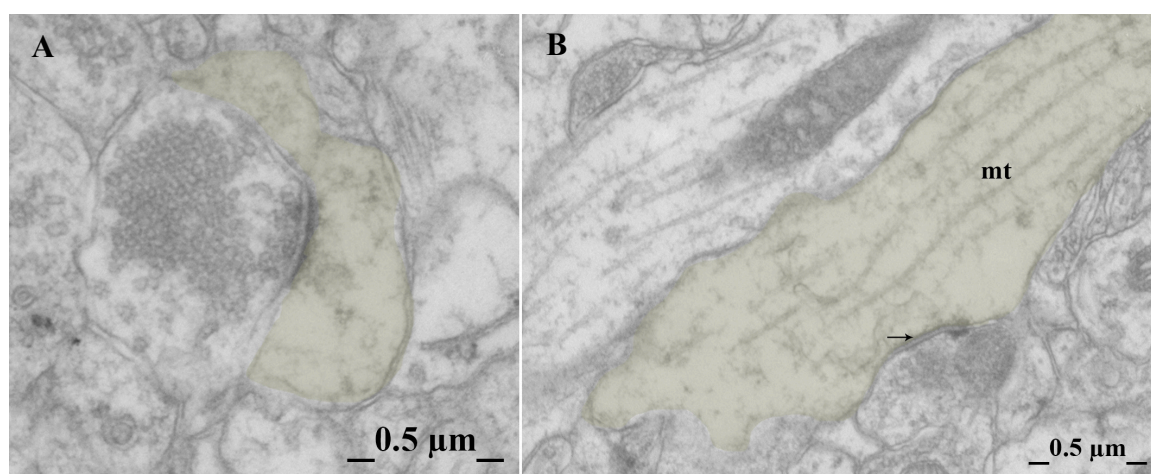
Os animais (n= 2 ou 3 por grupo experimental) foram anestesiados e perfundidos com paraformaldeído 2% + glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Após lavado, os encéfalos foram seccionados em vibrátomo, em cortes de 100 $\mu$ m de espessura (cortes coronais ~2.56 do bregma abrangendo o giro denteado de animais com aproximadamente 50  $\pm$  2 dias de idade), e armazenados em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Em seguida, realizou-se a preparação de rotina (cortes semi-finos e ultrafinos) para microscopia eletrônica (Moreira *et. al.*, 1996; Moreira *et. al.*, 1998): pós fixação: 1% OsO<sub>4</sub> em tampão cacodilato de sódio 0,1 M 2 hs à 4°C; lavado: em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, e tampão acetato de sódio pH=5,0; impregnação em bloco com acetato de uranila 2% em 0,1M de tampão acetato de sódio pH=5,0; desidratação: em alcóois (ETOH) crescentes, ETOH 50/75/85/95% (10 min cada), ETOH 100% 2 x 5 min, Óxido de Propileno (OP) 3 x 5min; infiltração: resina Embed-812:OP - 1:1 (2-4hs), 2:1 (4 hs), 3:1 (2-4hs); 100% resina (4 hs); inclusão: orientação do material em formas e polimerização em estufa 60°C por 72 horas. Os blocos de resina foram aparados e cortados no ultramicrótomo Leica Ultracut UCT em secções semi-finas (0,5  $\mu$ m) de ambos os lados do hipocampo, coradas com azul de toluidina e observadas com microscopia de luz, para delimitar a camada molecular interna do giro denteado (figura 12). Cortes ultrafinos (70nm) da camada molecular interna foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo para microscopia eletrônica. A camada molecular interna foi escolhida uma vez que durante a neurogênese hipocampal, as células tronco, provenientes da camada subgranular, se diferenciam e se integram a camada granular do giro denteado, enviando dendritos para a molecular interna e axônios para o hilo e CA3.



**Figura 12:** Corte semi-fino (0,5  $\mu\text{m}$ ) do giro denteado do hipocampo corado com azul de toluidina. Neurônios imaturos situam-se na camada subgranular, mas se diferenciam e integram a camada granular e estendem seus dendritos para a camada molecular. No ângulo inferior direito, secção de um bloco aparado para corte fino. No ângulo superior esquerdo observa-se maior aumento da camada granular e da camada molecular interna do hipocampo.

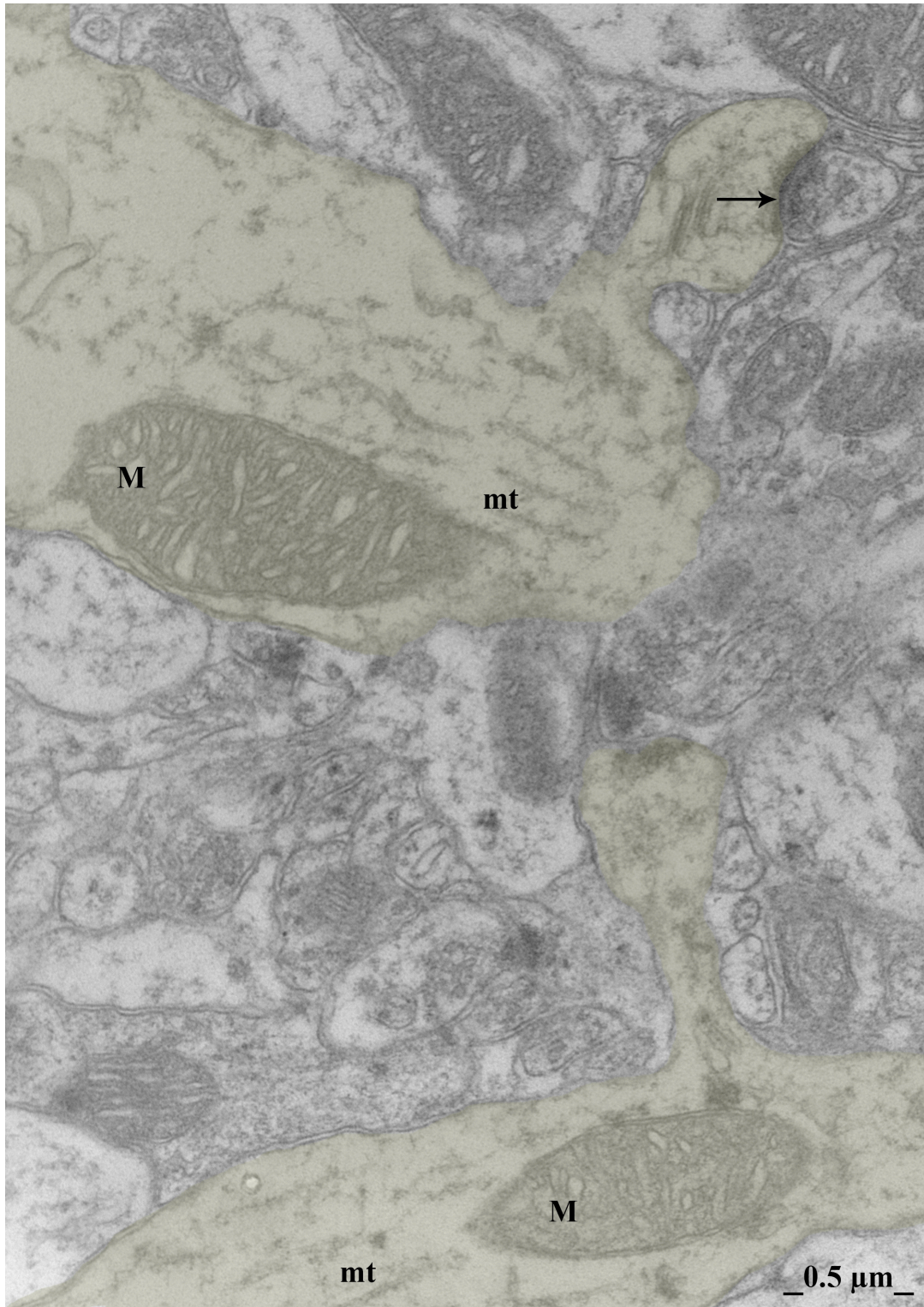
As imagens foram adquiridas no Microscópio de Transmissão Zeiss EM10, com Câmera Digital Veleta. Foram estudadas aproximadamente 300 sinapses por grupo experimental. Os parâmetros avaliados foram: número de sinapses por área, porcentagem de sinapses excitatórias e inibitórias, proporção de sinapses sobre dendritos ou espinhos dendríticos e porcentagem de espinhos dendríticos em botões axonais multisinápticos.

Sinapses assimétricas foram identificadas pelas espessas densidades pós-sinápticas, ou seja, evidente assimetria pré-pós sináptica. Sinapses simétricas apresentam delgadas densidades pré e pós sinápticas similares em densidade (figura 13). Imunoeletromicroscopia com anticorpos para glutamato e GABA confirmam estes dados morfológicos na amígdala cerebral de ratos (Brusco *et al.*, 2014). Ramos dendríticos foram identificados por sua abundância em organelas, como microtúbulos, neurofilamentos, mitocôndrias, retículo endoplasmático liso ou ribossomos livres. Espinhos dendríticos foram identificados pelo citoplasma flocular, presença de cisterna lisa ou *aparatus* do espinho e ausência de microtúbulos, neurofilamentos ou outras organelas (Adams e Jones, 1982, figura 14).



**Figura 13:** Micrografias eletrônicas de sinapse assimétrica excitatória (A) sobre espinho dendrítico (ausência de microtúbulos, mt) e simétrica inibitória (B) sobre processo dendrítico (presença de microtúbulos, mt).



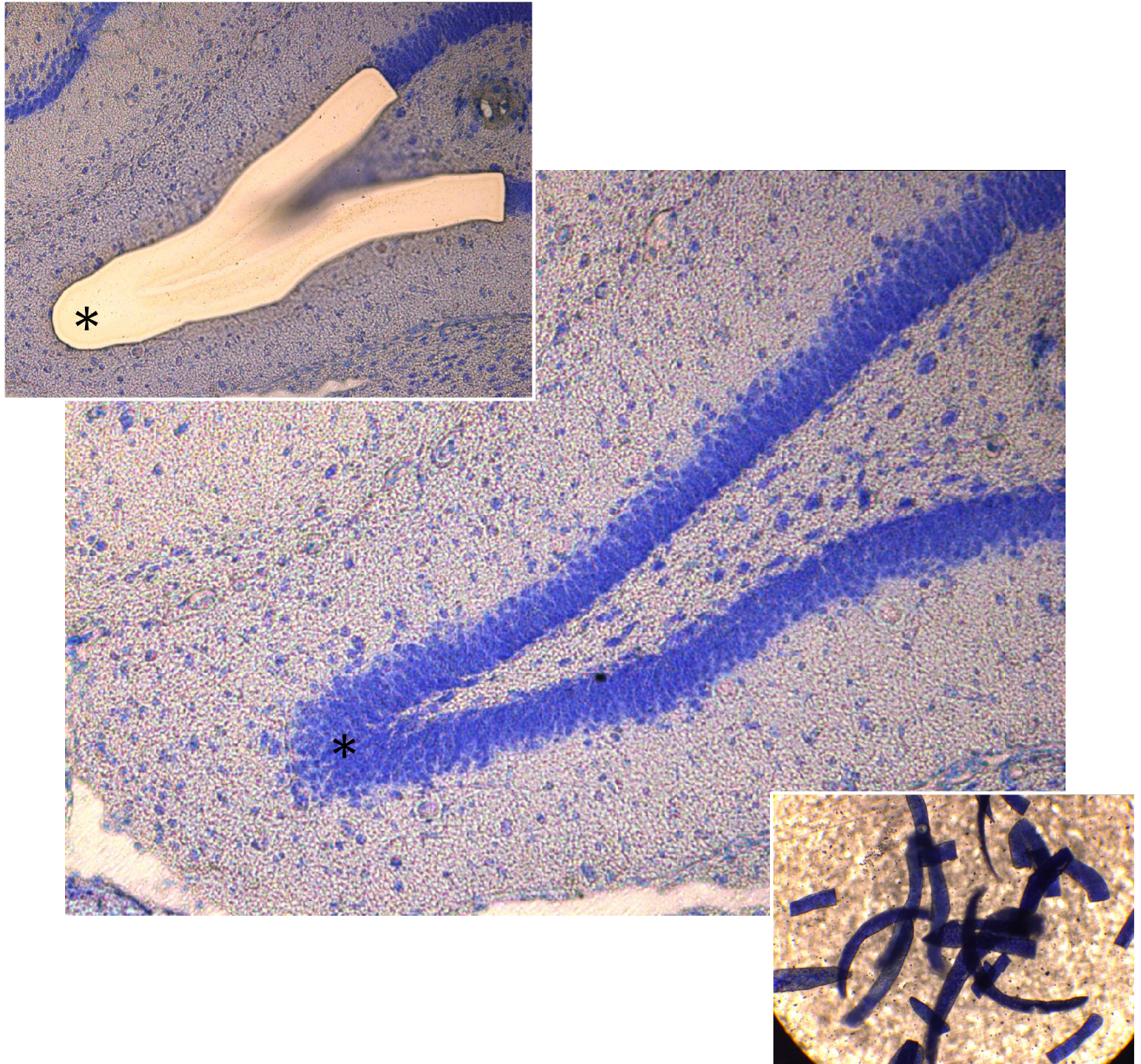


**Figura 14:** Micrografia eletrônica de sinapses assimétricas (→) sobre espinhos dendríticos com formato “mushroom”. Observar microtúbulos (mt) e mitocôndrias (M) no ramo dendrítico. Camada molecular interna.

## **4.6. Expressão de mRNA para receptores de glicocorticóides em amostras restritas da camada granulosa mediante o sistema de microdissecção a laser**

### **4.6.1. Microdissecção**

Os animais foram rapidamente anestesiados com isoflurano e decapitados. Os encéfalos foram retirados, congelados rapidamente e mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após limpeza com álcool 70% em água DEPC, foram realizados cortes de criostato de  $20\mu\text{m}$  de espessura e colocados sobre lâminas Pen-Membranas  $2,0\mu\text{m}$ , RNase e DNase livres (Leica #11505189). As secções foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para a microdissecção as lâminas foram gradualmente ambientadas (15 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  e temperatura ambiente). As secções foram coradas com azul de toluidina 1% em água DEPC (filtrado em filtro de seringa  $0,22\mu\text{m}$ ), lavadas 2 vezes em água DEPC por 30 segundos, imersas em etanol 75% em água DEPC por 3 minutos, secas em estufa a  $42^{\circ}\text{C}$  com vácuo a  $-25\text{ in./Hg}$  por 10 minutos e levadas ao sistema de microdissecção a laser Leica LMD6500 (modificado de Burbach *et al.*, 2003; Burbach *et al.*, 2004). Foram obtidas 12 secções (bilaterais) do giro denteado do hipocampo para cada extração de RNA (figura 15). As condições ideais para a coleta das amostras foram padronizadas, sendo utilizados os seguintes parâmetros de laser: poder 42, abertura 14, velocidade 10 e balaço do espécime 5.



**Figura 15:** Dissecção do giro dentado (\*) do hipocampo (20  $\mu\text{m}$ ) corada com azul de toluidina e colocada sobre lâmina Rnase free. No ângulo superior esquerdo observa-se a região removida do giro dentado por microdissecção. No ângulo inferior direito, cortes da camada granular dissecada sobre a tampa do tubo eppendorf. Para cada animal utilizaram-se 12 microdissecções bilaterais.

#### 4.6.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração do RNA total, foi utilizado o Kit PureLink™ RNA Micro (Invitrogen by Life technologies, cat #12183-016).

Ao material seccionado foram adicionados 350 µL de tampão de lise com 3,5 µl de β-mercaptoetanol, seguindo-se da adição de 5µl de PureLink Carrier RNA diluído. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 3 minutos para lise e homogeneização. Em seguida, as amostras foram transferidas para um novo tubo (RNase e DNase livre), sendo adicionados 350µl de etanol a 70% em água DEPC. Realizada a homogeneização, a amostra foi transferida para a coluna PureLink™ MicroKit, e centrifugada a 12.000x g por 1 minuto. À coluna, adicionaram-se 20µl da mistura de PureLink™DNase com buffer DNase, e incubou-se por 20 minutos em temperatura ambiente. As colunas foram lavadas duas vezes com 350 µl de *Wash Buffer I*, por centrifugação a 12000 x g por 15 segundos, e duas vezes com 500µl de *Wash Buffer II*, por centrifugação a 12000 x g por 15 segundos. A coluna foi seca por centrifugação a 12000 x g por 1 minuto, adicionaram-se 12µl de água DEPC e centrifugou-se a 12000 x g por 1 minuto para a eluição do RNA.

As amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue plus (Ge lifesciences), e a síntese do cDNA foi realizada a partir de 1µg de RNA total utilizando o *Kit SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis (Invitrogen by Life technologies, #11754)*. Para cada amostra adicionaram-se 4µl de VILO™ Reaction Mix 5X, 2 µl de SuperScript®Enzyme Mix, 1µg de RNA e água DEPC para volume final de 20µl. As amostras foram incubadas no termociclador PTC-200 (MJ Reserch) com o seguinte ciclo: 25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos, e a 85°C por 5 minutos. As amostras foram estocadas a -20°C até a realização do qRT-PCR.

### 4.6.3. PCR quantitativo em tempo real

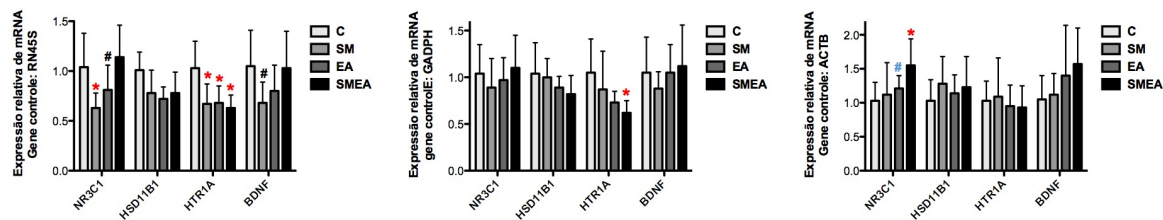
A reação de qRT-PCR foi realizada no aparelho 7500 Real Time PCR System segundo o protocolo do fabricante do TaqMan Master Mix (Applied Biosystem, EUA). Para corrigir diferenças de amplificação provocadas por variações na quantidade de RNA inicial ou por variações na eficiência de cada reação foi utilizada a amplificação do mRNA do Rnr5s,  $\beta$ -actina e Gadph como controle interno.

As reações para o estudo da expressão dos mRNAs alvo tiveram volume final de 15 $\mu$ L: 0,75 $\mu$ L TaqMan® Gene Expression Assay 20 $\times$  específico de cada gene, 7,5 $\mu$ L TaqMan® Gene Expression Master Mix 2 $\times$ , 1 $\mu$ L do cDNA diluído em 1:5 e água DEPC. Todas as reações foram repetidas 3 vezes e os experimentos validados com o uso de controles negativos com omissão da amostra.

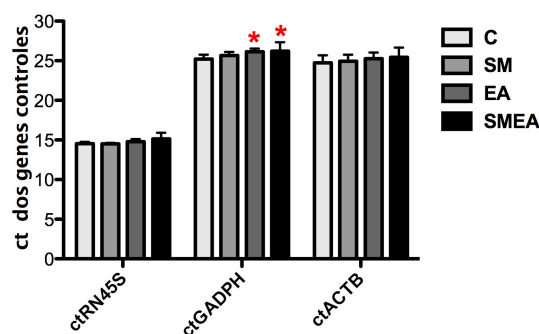
**Tabela 1:** Genes utilizados no qRT-PCR

TaqMan® Gene Expression Assay	Gene Interesse	Comprimento amplificado (pb)	Ref NCBI
Rn00561369_m1	Nr3c1	73	Rn.90070
Rn00567167_m1	Hsd11b1	80	Rn.185798
Rn00561409_s1	Htr1a	75	Rn.44486
Rn02531967_s1	Bdnf	142	Rn.11266
Rn00667869_m1	ActB	91	Rn.94978
Rn01775763_g1	Gadph	175	Rn.129558
Rn03928990_g1	Rn45s	61	-

Utilizamos três diferentes genes controle, os quais são amplamente utilizados nos estudos de qRT-PCR, mas obtivemos diferentes resultados ao compararmos a expressão dos mRNA alvos/mRNA controles (figura 16). Abaixo mostramos a expressão relativa dos diferentes genes estudados em relação aos diferentes genes controles, bem como a análise dos valores de ct nos diferentes grupos experimentais (figura 17):



**Figura 16:** Expressão relativa de mRNA dos genes de interesse em relação aos diferentes genes controle: Rn45s, Gadph e Actb, respectivamente.



**Figura 17:** ct dos genes controle. Observe que o ct do gene GADPH variou entre os diferentes grupos experimentais.

Os resultados mais similares foram relacionados ao uso dos genes Rn45s e Gadph como controles. No entanto, apesar do uso corriqueiro destes três genes como controles nas reações de qRT-PCR, Daniels *et al.* (2011) observou que a expressão das proteínas  $\beta$ -actina e Gadph encontram-se alteradas em animais submetidos à separação materna ou exercício físico. Além disso, trabalhos recentes apontam que o isoflurano, anestésico utilizado no presente estudo nos animais utilizados para os experimentos de qRT-PCR, desestabilizam os espinhos dendríticos por um mecanismo dependente de actina (Platholi *et al.*, 2014). Portanto, optamos por utilizar o gene Rn45s como controle mais apropriado.

#### 4.7. Análise estatística

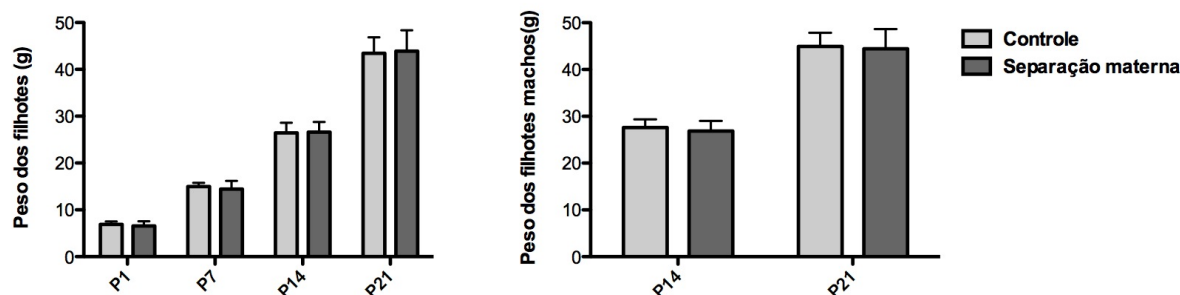
Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As variáveis quantitativas com homogeneidade de variâncias foram analisadas por ANOVA, quando comparados 2 grupos, ou ANOVA de duas vias, quando comparados 4 grupos (a fim de verificar interação entre os fatores), seguido pelo *post-hoc* de Fisher. As variáveis quantitativas com heterogeneidade de variâncias foram analisadas por Mann-Whitney U Test, quando comparados 2 grupos experimentais, ou ANOVA de duas vias não paramétrica, quando comparados 4 grupos (a fim de verificar interação entre os fatores). O teste de Levene foi utilizado para verificar a homogeneidade de variâncias (variáveis com homogeneidade de variâncias quando  $p > 0,05$ ). As análises de correlações foram analisadas através do teste da distribuição unilateral ('one-tailed test'). As análises estatísticas e gráficos foram obtidos utilizando-se o programa STATISTC 7.0 e PRISM 5.0.

## 5. Resultados

### 5.1. Peso e glicemia

O peso dos animais das ninhadas (incluindo machos e fêmeas), em gramas, do primeiro procedimento experimental, no 1º dia pós-natal ( $U(n_1 = n_2 = 2) = 370,00$ ,  $p > 0,05$ ), não apresentou diferenças significativas entre os filhotes que seriam submetidos à separação materna (SM:  $6,55 \pm 1,02$ ,  $n = 29$ ) e controles (C:  $6,90 \pm 0,60$ ,  $n = 31$ ). No 7º, 14º e 21º dia pós-natal os animais submetidos ao procedimento de separação materna (SM: 7º:  $14,45 \pm 1,72$ ; 14º:  $26,62 \pm 2,16$ ; 21º:  $43,90 \pm 4,47$ ,  $n = 29$ ) apresentaram pesos semelhantes aos animais controles (C: 7º:  $14,97 \pm 0,79$ ; 14º:  $26,42 \pm 2,17$ ; 21º:  $43,45 \pm 3,40$ ,  $n = 31$ );  $U(n_1 = n_2 = 2) = 357,50$ ,  $F(1,58) = 0,13$  e  $F(1,58) = 0,19$ , respectivamente ( $p > 0,05$  para todas as idades, figura 18).

O peso dos filhotes machos, nos dias 14º e 21º pós natal, tampouco diferiram significativamente entre animais submetidos a separação materna (14º:  $26,86 \pm 2,14$ ; 21º:  $44,43 \pm 4,22$ ,  $n = 14$ ) e controles (14º:  $27,60 \pm 1,76$ ; 21º:  $44,93 \pm 2,94$ ,  $n = 15$ );  $F(1, 27) = 1,04$  e  $F(1, 27) = 0,14$ , respectivamente ( $p > 0,05$  para todas as idades, figura 18).

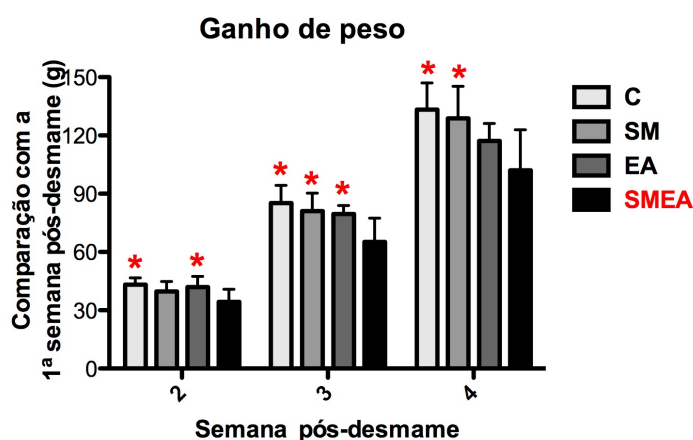


**Figura 18:** Peso dos filhotes das ninhadas controle e submetidas à separação materna no 1º, 7º, 14º e 21º dia pós-natal (gráfico à esquerda) e dos machos controle e submetidos à separação materna no 14º e 21º dia pós-natal (gráfico à direita).



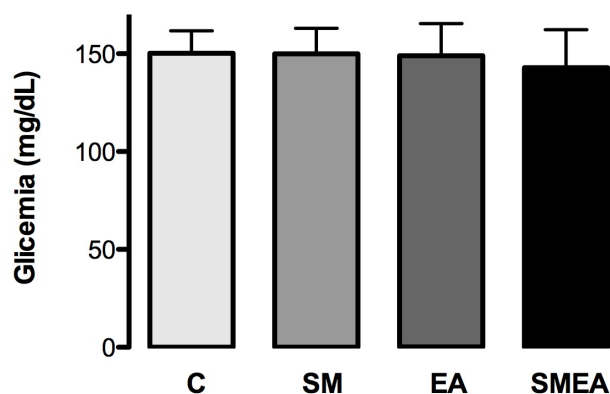
Os machos dos grupos submetidos ao enriquecimento ambiental permaneceram 4 semanas neste ambiente. Analisou-se o ganho de peso dos animais na 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, e 4<sup>o</sup> semana em comparação com a 1<sup>a</sup> na caixa padrão ou no ambiente enriquecido. No final da 2<sup>a</sup> semana observou-se efeito significativo da variável *manipulação* entre os grupos experimentais ( $F(1, 25) = 7,85, p < 0,01$ ). Os animais SMEA apresentam ganho de peso inferior aos C e EA (C:  $43,14 \pm 3,52, n = 7$ ; SM:  $39,71 \pm 5,06, n = 7$ ; EA:  $41,87 \pm 5,54, n = 8$ ; SMEA:  $34,28 \pm 6,52, n = 7$ ).

No final da 3<sup>a</sup> semana observou-se efeito significativo das variáveis *manipulação* ( $F(1, 25) = 7,46, p < 0,05$ ) e *gaiola* ( $F(1, 25) = 10,08, p < 0,01$ ), no entanto, não houve interação entre esses fatores ( $F(1, 25) = 2,27, p > 0,05$ ). Os animais SMAE apresentaram ganho de peso inferior aos animais C, EA e SM (C:  $85,14 \pm 9,15, n = 7$ ; SM:  $81,00 \pm 9,27, n = 7$ ; EA:  $79,50 \pm 4,44, n = 8$ ; SMEA:  $65,14 \pm 12,35, n = 7$ );  $F(1, 25) = 2,27, p < 0,05$ . No final da 4<sup>a</sup> semana houve efeito significativo da variável *gaiola* entre os grupos experimentais ( $F(1, 25) = 14,01, p < 0,01$ ). O ganho de peso dos animais SMEA foi inferior aos C e SM (C:  $133,28 \pm 13,74, n = 7$ ; SM:  $128,86 \pm 16,41, n = 7$ ; EA:  $117,12 \pm 9,05, n = 8$ ; SMEA:  $102,00 \pm 20,98, n = 7$ , figura 19).



**Figura 19:** Ganho de peso dos animais. Os animais SMEA tiveram menor ganho de peso que os animais C e AE (2<sup>a</sup> semanas), C, SM e AE (3<sup>a</sup> semana) e C e SM (4<sup>a</sup> semana).

Não foram observadas diferenças significativas quanto a glicemia dos animais ( $F(1, 29) = 0,59$ ,  $p > 0,05$ ,  $(1,29) = 0,34$ , *manipulação x gaiola*), do terceiro procedimento experimental, nos diferentes grupos experimentais: C:  $150,25 \pm 11,46$ ,  $n = 8$ ; SM:  $150,00 \pm 12,94$ ,  $n = 8$ ; EA:  $148,89 \pm 16,36$ ,  $n = 9$ ; SMEA:  $142,87 \pm 19,42$ ,  $n = 8$ , figura 20.



**Figura 20:** Não foram observadas diferenças significativas entre a glicemia dos animais nos diferentes grupos experimentais,  $p > 0,05$ .

## 5.2. Neurogênese

### 5.2.1. Células BrdU positivas

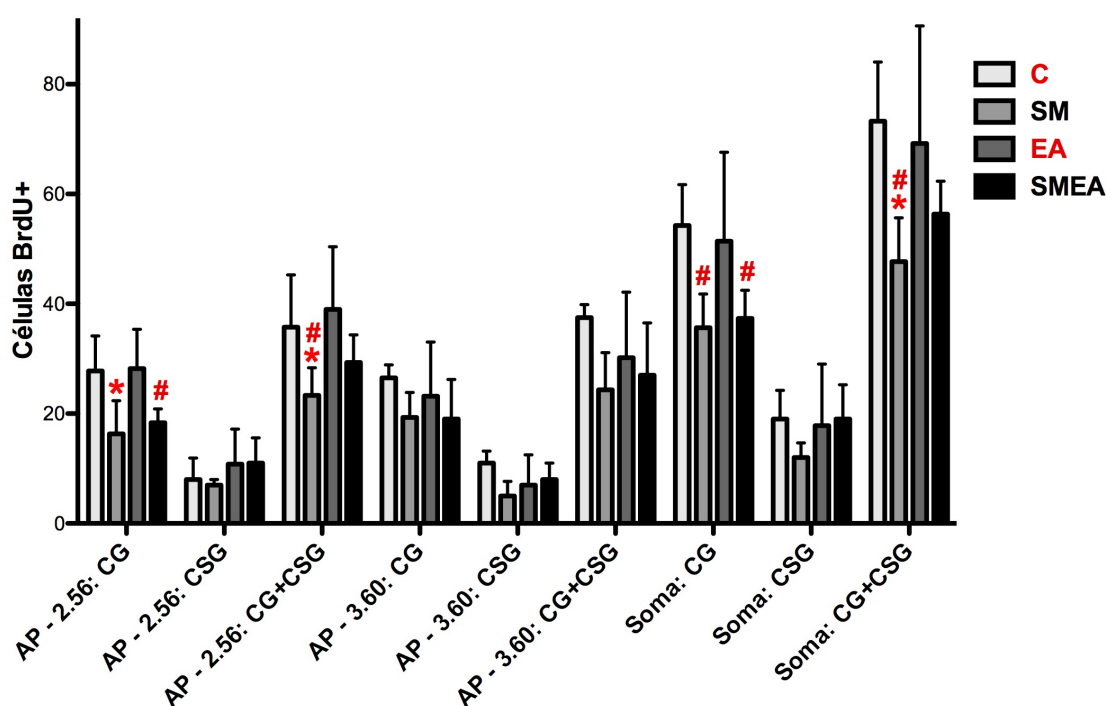
Foram observadas diferenças significativas no fator *manipulação*,  $F(1,11) = 10,50$ ,  $p < 0,01$ , no número de células BrdU positivas na camada granular (CG) do hipocampo, bregma 2,56. Foi observada redução no número de células BrdU positivas nos animais SM em relação aos C e EA, bem como tendência de redução nos SMEA em relação aos C e EA (C:  $27,75 \pm 6,40$ , SM:  $16,33 \pm 6,03$ ; EA:  $28,20 \pm 7,15$ , SMEA:  $18,33 \pm 3,51$ ),  $F(1, 11) = 0,06$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*. Em relação ao número de células BrdU positivas na camada subgranular do hipocampo, bregma 2,56, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (C:  $8,00 \pm 3,92$ , SM:  $7,00 \pm 1,00$ ; EA:  $10,80 \pm 6,38$ , SMEA:  $11,00 \pm 4,58$ ),  $F(1, 11) = 0,06$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*. Em relação ao número de células BrdU

positivas, em ambas as camadas, bregma 2,56, foram observadas diferenças significativas no fator *manipulação*,  $F(1,11) = 5,38$ ,  $p < 0,05$ , com redução nas células BrdU positivas nos animais SM em relação EA, e tendência de redução nos SM em relação aos C (C:  $35,75 \pm 9,53$ , SM:  $23,33 \pm 5,03$ ; EA:  $39,00 \pm 11,38$ , SMEA:  $29,33 \pm 5,03$ ).

No número de células BrdU positivas na camada granular do hipocampo, bregma 3,60, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (C:  $26,50 \pm 2,38$ , SM:  $19,33 \pm 4,51$ ; EA:  $23,20 \pm 9,83$ , SMEA:  $19,00 \pm 7,21$ ),  $F(1, 11) = 0,16$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*. Em relação ao número de células BrdU positivas na camada subgranular do hipocampo, bregma 3,60, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (C:  $11,00 \pm 2,16$ , SM:  $5,00 \pm 2,65$ ; EA:  $7,00 \pm 5,48$ , SMEA:  $8,00 \pm 3,00$ ),  $F(1, 11) = 2,91$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*. Em relação ao número de células BrdU positivas, em ambas as camadas, bregma 3,60, não foram observadas diferenças significativas (C:  $37,50 \pm 2,38$ , SM:  $24,33 \pm 6,80$ ; EA:  $30,20 \pm 11,92$ , SMEA:  $27,00 \pm 9,54$ ),  $F(1, 11) = 1,14$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*.

Em relação a somatória de células BrdU positivas em ambas as secções (ambas as alturas antero-posteriores do bregma), na camada granular do hipocampo, foram observadas diferenças significativas para o fator *manipulação*,  $F(1,11) = 7,79$ ,  $p < 0,05$ , com tendência de redução das células BrdU positivas nos animais SM em relação aos C e EA, e nos SMEA em relação aos C. (C:  $54,25 \pm 7,45$ , SM:  $35,67 \pm 6,11$ , EA:  $51,40 \pm 16,23$ , SMEA:  $37,33 \pm 5,13$ ),  $F(1, 11) = 0,15$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*. Na camada subgranular do hipocampo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (C:  $19,00 \pm 5,23$ , SM:  $12,00 \pm 2,65$ , EA:  $17,80 \pm 11,23$ , SMEA:  $19,00 \pm 6,24$ ),  $F(1,11) = 0,98$ ,  $p > 0,05$ . Em relação

a somatória de células BrdU positivas, em ambas as camadas (granular e subgranular), foram observadas diferenças significativas no fator *manipulação*,  $F(1,11) = 6,11$ ,  $p < 0,05$ . Foi observada redução nas células BrdU positivas nos animais SM em relação aos C, bem como tendência de redução nos SM em relação aos EA (C:  $73,25 \pm 10,78$ , SM:  $47,67 \pm 8,02$ , EA:  $69,20 \pm 21,41$ , SMEA:  $56,33 \pm 6,03$ , figura 21 e 24).



**Figura 21:** Observou-se, de maneira geral, significância estatística ou tendência à redução nas células BrdU positivas nos animais submetidos à separação materna, mas o enriquecimento do ambiente atenuou esse efeito. Na camada granular (CG), bregma 2,56, foi observada redução nas células BrdU positivas nos animais SM em relação aos C e EA, bem como tendência de redução nos SMEA em relação aos C e EA. Em ambas as camadas (granular e subgranular; CG + CSG) foi observada redução nas células BrdU positivas nos animais SM em relação EA, e tendência de redução nos SM em relação aos C. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais no bregma 3,60. Em relação a somatória de células BrdU positivas em ambas as secções, na camada granular do hipocampo, foi observada tendência de redução das células BrdU positivas nos animais SM em relação aos C e EA, bem nos SMEA em relação aos C. Em ambas as camadas, foi observada redução nas células BrdU positivas nos animais SM em relação aos C, e tendência de redução nos SM em relação aos EA.

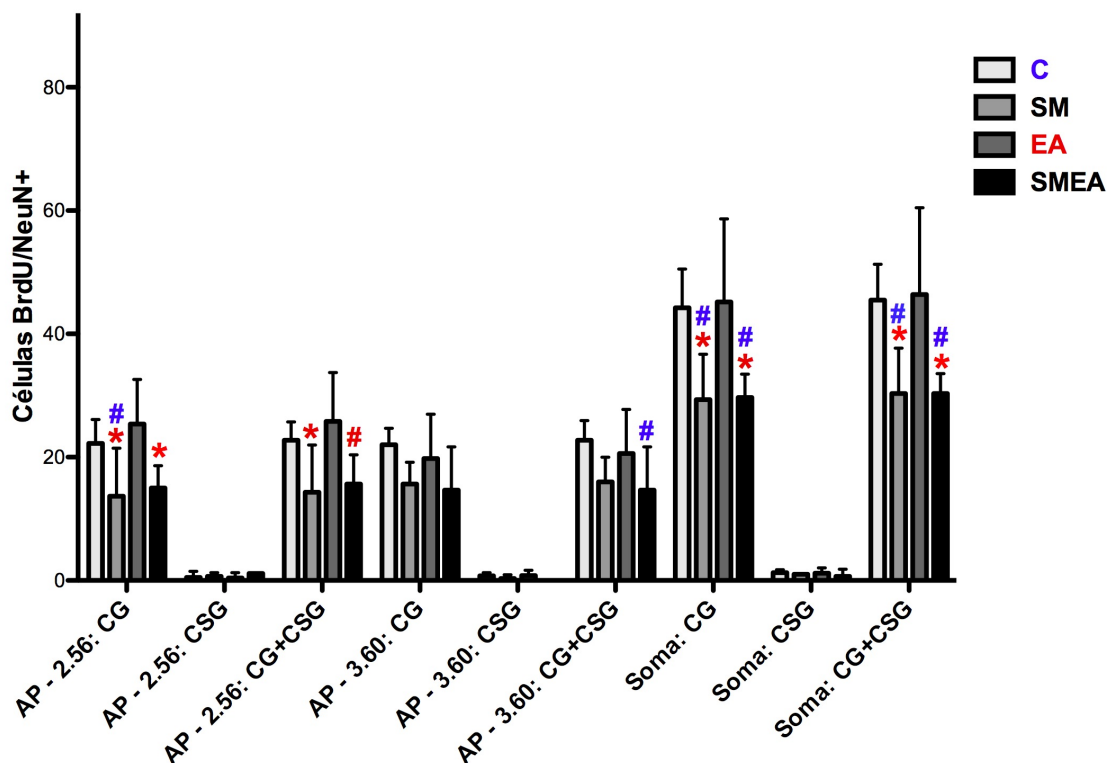
### 5.2.2. Células BrdU/NeuN positivas

No número de células BrdU/NeuN positivas na camada granular do hipocampo, bregma 2,56, foram observadas diferenças significativas no fator *manipulação*,  $F(1,11) = 8,86$ ,  $p < 0,05$ . Foi observada redução nas células BrdU/NeuN positivas nos animais SM e SMEA em relação aos EA, bem como tendência de redução nos SM em relação aos C (C:  $22,25 \pm 3,86$ , SM:  $13,67 \pm 7,77$ ; EA:  $25,40 \pm 7,23$ , SMEA:  $15,00 \pm 3,61$ ),  $F(1, 11) = 0,08$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*. Na camada subgranular do hipocampo, não foram observadas diferenças significativas (C:  $0,50 \pm 1,00$ , SM:  $0,67 \pm 0,58$ , EA:  $0,40 \pm 0,89$ , SMEA:  $0,67 \pm 1,15$ ). Em ambas as camadas, foram observadas diferenças significativas para o fator *manipulação*,  $F(1,11) = 7,72$ ,  $p < 0,05$ . Houve redução nas células BrdU/NeuN positivas no grupo SM em relação ao EA, bem como tendência de redução no SMEA em relação ao EA, (C:  $22,75 \pm 2,99$ , SM:  $14,33 \pm 7,64$ , EA:  $25,80 \pm 7,92$ , SMEA:  $15,67 \pm 4,73$ ),  $F(1, 11) = 0,07$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*.

No número de células BrdU/NeuN positivas na camada granular do hipocampo, bregma 3,60, houve tendência para o fator *manipulação*,  $F(1,11) = 3,68$ ,  $p < 0,10$ . A tendência não foi confirmada no teste post-hoc (C:  $22,00 \pm 2,71$ , SM:  $15,67 \pm 3,51$ , EA:  $19,80 \pm 7,19$ , SMEA:  $14,67 \pm 7,02$ ),  $F(1, 11) = 0,04$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*. Na camada subgranular foi observada tendência para o fator *manipulação*,  $F(1,11) = 3,46$ ,  $p < 0,10$ . A tendência não foi confirmada no teste post-hoc (C:  $0,75 \pm 0,50$ , SM:  $0,33 \pm 0,58$ , EA:  $0,80 \pm 0,84$ , SMEA:  $0,00 \pm 0,00$ ),  $F(1,11) = 0,34$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*. Em ambas as camadas, foi observada tendência para o fator *manipulação*,  $F(1,11) = 4,32$ ,  $p < 0,10$ . Foi observada

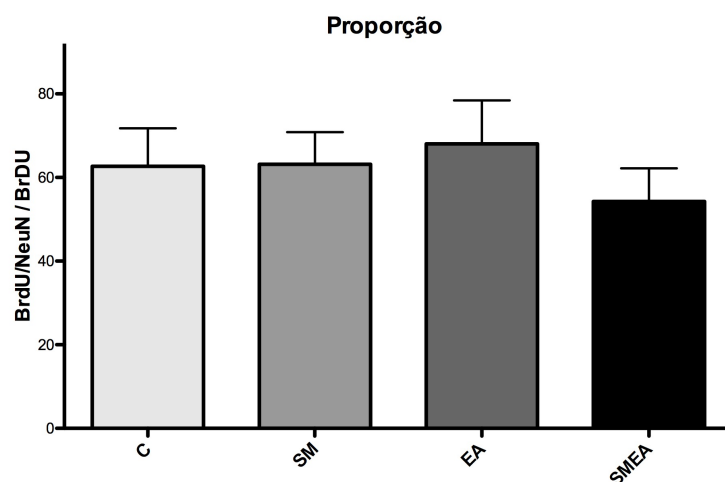
tendência de redução nas células BrdU/NeuN positivas nos animais SMEA em relação C (C:  $22,75 \pm 3,20$ , SM:  $16,00 \pm 4,00$ , EA:  $20,60 \pm 7,16$ , SMEA:  $14,67 \pm 7,02$ ),  $F(1,11) = 0,02$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*.

Na somatória de células BrdU/NeuN positivas na camada granular, em ambas as secções, houve diferenças para o fator *manipulação*,  $F(1,11) = 9,31$ ,  $p < 0,05$ ., com redução nas células BrdU/NeuN positivas nos animais SM e SMEA em relação aos EA, e tendência de redução nos SM e SMEA em relação aos C (C:  $44,25 \pm 6,29$ , SM:  $29,33 \pm 7,37$ , EA:  $45,20 \pm 13,46$ , SMEA:  $29,67 \pm 3,79$ ),  $F(1,11) = 0,004$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*. Na camada subgranular não observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (C:  $1,25 \pm 0,50$ , SM:  $1,00 \pm 0,00$ , EA:  $1,20 \pm 0,84$ , SMEA:  $0,67 \pm 1,15$ ),  $F(1,11) = 0,10$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*. Em ambas as camadas, foram observadas diferenças significativas para o fator *manipulação*,  $F(1,11) = 9,43$ ,  $p < 0,05$ , com redução nas células BrdU/NeuN positivas nos grupos SM e SMEA em relação ao EA, e tendência à redução do grupo SM e SMEA em relação ao C (C:  $45,50 \pm 5,80$ , SM:  $30,33 \pm 7,37$ , EA:  $46,40 \pm 14,05$ , SMEA:  $30,33 \pm 3,21$ , figura 22 e 24).

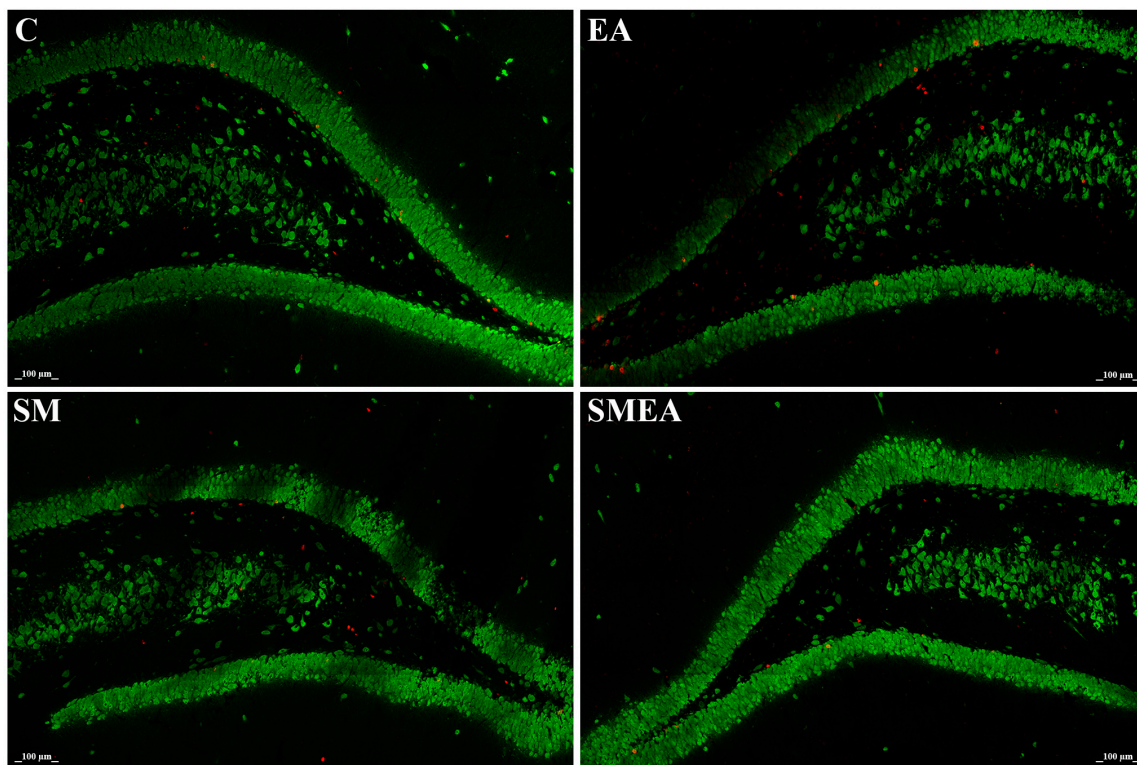


**Figura 22:** Observou-se, de maneira geral, tendência ou significância estatística, de redução nas células BrdU/NeuN positivas nos animais SM e SMEA em relação aos C e EA. Na camada granular, bregma 2,56, foi observada redução nas células BrdU/NeuN positivas nos animais SM e SMEA em relação aos EA, e tendência de redução nos SM em relação aos C. Em ambas as camadas, houve redução nas células BrdU/NeuN positivas no grupo SM em relação ao EA, e tendência de redução no SMEA em relação ao EA. No bregma 3,60, em ambas as camadas, houve tendência de redução nas células BrdU/NeuN positivas nos animais SMEA em relação C. Na somatória de células BrdU/NeuN positivas na camada granular, em ambas as secções, foi observada redução nas células BrdU/NeuN positivas nos animais SM e SMEA em relação aos EA, bem como tendência de redução nos SM e SMEA em relação aos C. Em ambas as camadas, foi observada redução nas células BrdU/NeuN positivas nos grupos SM e SMEA em relação ao EA, bem como tendência de redução do grupo SM e SMEA em relação ao C.

Na proporção de células BrdU/NeuN positivas em relação às células BrdU positivas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (C:  $62,66 \pm 9,09$ , SM:  $63,17 \pm 7,67$ , EA:  $68,06 \pm 10,37$ , SMEA:  $54,27 \pm 7,93$ ),  $F(1,11) = 2,18$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*, figura 23.



**Figura 23:** Não foram observadas diferenças significativas na proporção entre as células BrdU/NeuN positivas e NeuN positivas entre os grupos experimentais,  $p > 0,05$ .



**Figura 24:** Imagens representativas dos grupos experimentais.

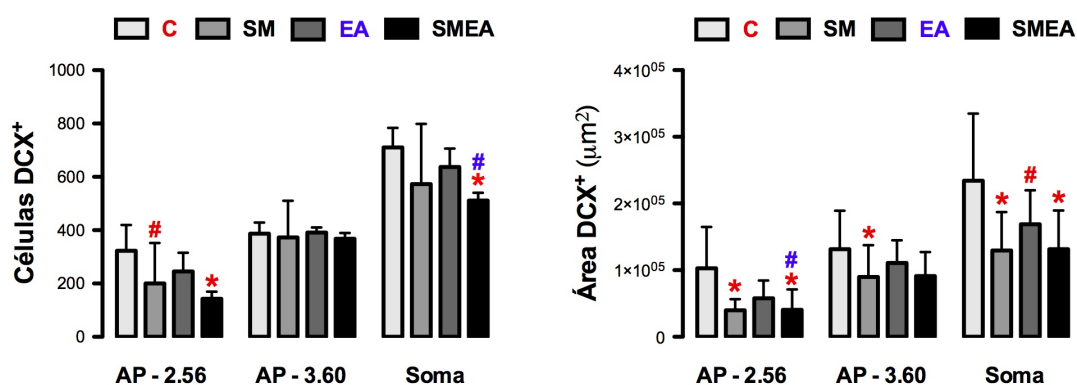


### 5.3. Número de células e área imunopositivas para doublecortina

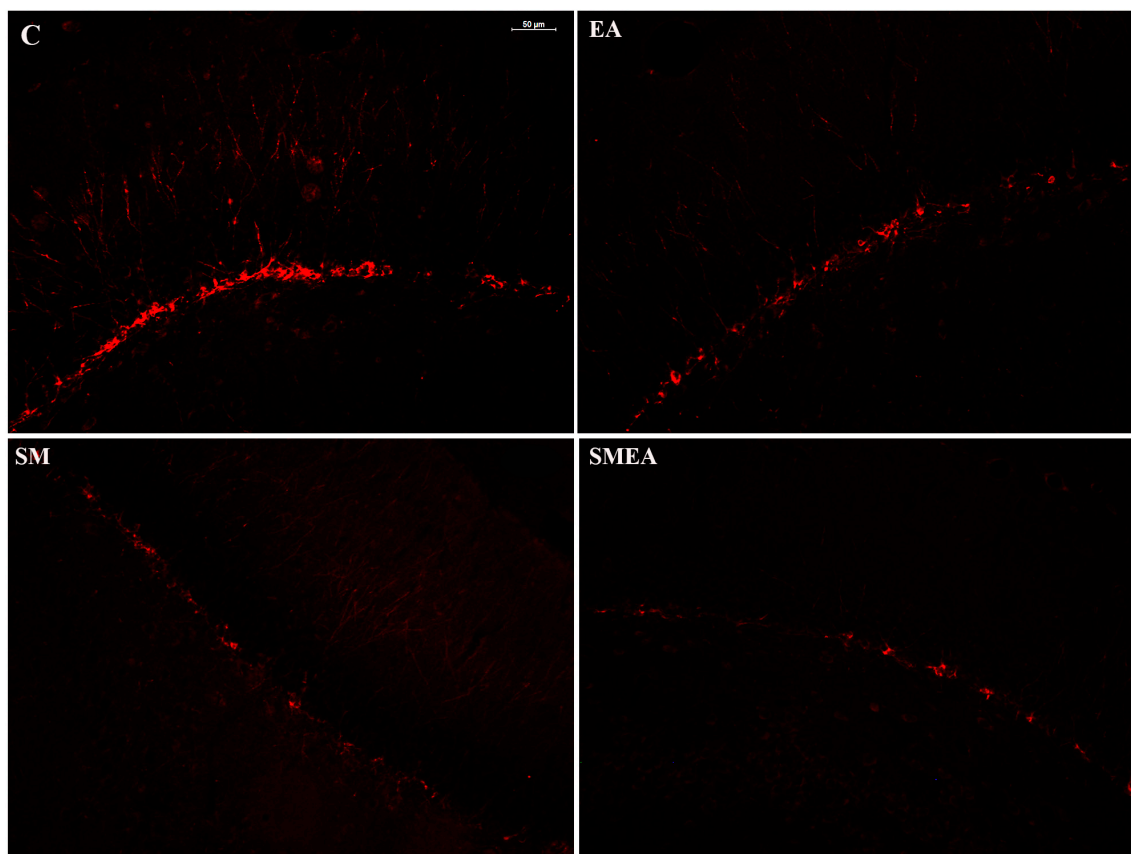
Em relação ao número de células imunopositivas para doublecortina, bregma 2,56, foram observadas diferenças significativas no fator *manipulação*,  $F(1,11) = 7,06$ ,  $p < 0,05$ . Foi observada redução nas células doublecortina positivas nos animais SMEA em relação aos C, bem como tendência de redução nos SM em relação aos C (C:  $323,50 \pm 96,59$ , SM:  $200,00 \pm 152,45$ , EA:  $245,80 \pm 69,58$ , SMEA:  $143,33 \pm 26,63$ ). Em relação ao número de células imunopositivas para doublecortina, bregma 3,60, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais,  $F(1,11) = 0,55$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola* (C:  $387,25 \pm 41,32$ , SM:  $372,67 \pm 138,02$ , EA:  $391,40 \pm 18,94$ , SMEA:  $368,00 \pm 21,93$ ). Em relação ao número de células para doublecortina, em ambas as secções, foram observadas diferenças significativas no fator *manipulação*,  $F(1,11) = 5,42$ ,  $p < 0,05$ . Foi observada redução nas células doublecortina positivas nos animais SMEA em relação aos C, bem como tendência de redução nos SMEA em relação aos EA (C:  $710,50 \pm 72,84$ , SM:  $572,67 \pm 226,08$ , EA:  $637,20 \pm 68,96$ , SMEA:  $511,33 \pm 29,30$ , figuras 25 e 26). A quantificação do número de células doublecortina positivas foi realizada apenas nos animais quantificados para o número de células BrdU e BrdU/NeuN positivas.

Em relação ao área imunopositiva para doublecortina, bregma 2,56, foram observadas diferenças significativas para o fator *manipulação*,  $F(1,11) = 9,44$ ,  $p < 0,01$ . Foi observada redução na área imunopositiva para doublecortina nos animais SM e SMEA em relação aos controles, bem como tendência de redução nos SMEA em relação aos EA (C:  $102730,70 \pm 61972,40$ , SM:  $39841,90 \pm 16537,52$ , EA:  $57738,00 \pm 26683,92$ , SMEA:  $40428,20 \pm 30788,05$ ). No bregma 3,60, foi observada redução da área imunopositiva nos animais SM em relação aos C,  $F(1,11) = 3,44$ ,  $p <$

0,01 (C: 131401,80  $\pm$  57840,70, SM: 89884,60  $\pm$  47632,17, EA: 110951,80  $\pm$  33748,44, SMEA: 91106,10  $\pm$  35908,31). No somatório de ambas as secções, foram observadas diferenças significativas para o fator *manipulação*,  $F(1,11) = 7,62$ ,  $p = 0,01$ . Os animais SM e SMEA apresentaram menor área positiva para doublecortina do que os animais controles, além disso, observou-se tendência de redução da área nos animais EA (C: 234132,50  $\pm$  100722,90, SM: 129366,40  $\pm$  57812,95, EA: 168689,80  $\pm$  51142,19, SMEA: 131534,30  $\pm$  57831,39; áreas medidas em  $\mu\text{m}^2$ , figuras 25 e 26).



**Figura 25:** Observou-se, de maneira geral, redução no número de células doublecortina positivas nos animais SMEA em relação aos C, bem como redução na área imunopositiva para doublecortina nos animais SM e SMEA em relação aos C. O número de células doublecortina positivas, bregma 2,60, sofreu redução nas células doublecortina positivas nos animais SMEA em relação aos C, e tendência de redução nos SM em relação aos C. Em ambas as camadas foi observada redução das células doublecortina positivas nos animais SMEA em relação aos C, bem como tendência à redução nos SMEA em relação aos EA. Na área imunopositiva para doublecortina, bregma 2,56, foi observada redução nos animais SM e SMEA em relação aos controles, e tendência à redução nos SMEA em relação aos EA. No bregma 3,60, foi observada redução da área imunopositiva nos animais SM em relação aos C. Em ambas as secções, os animais SM e SMEA apresentaram menor área positiva para doublecortina do que os animais controles, além disso, observou-se tendência à redução nos animais EA.

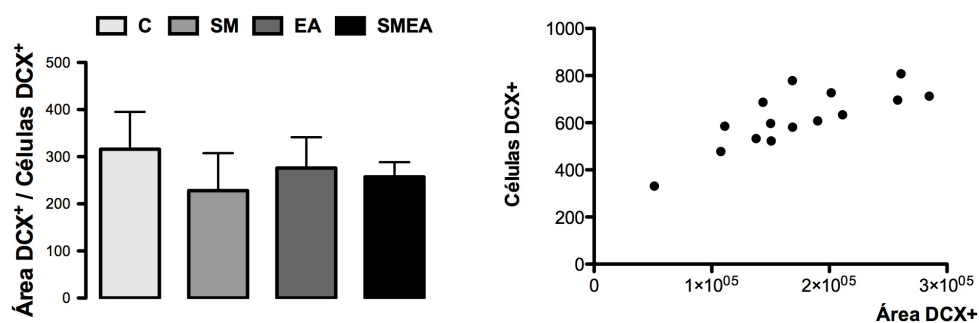


**Figura 26:** Imagens representativas dos grupos experimentais.

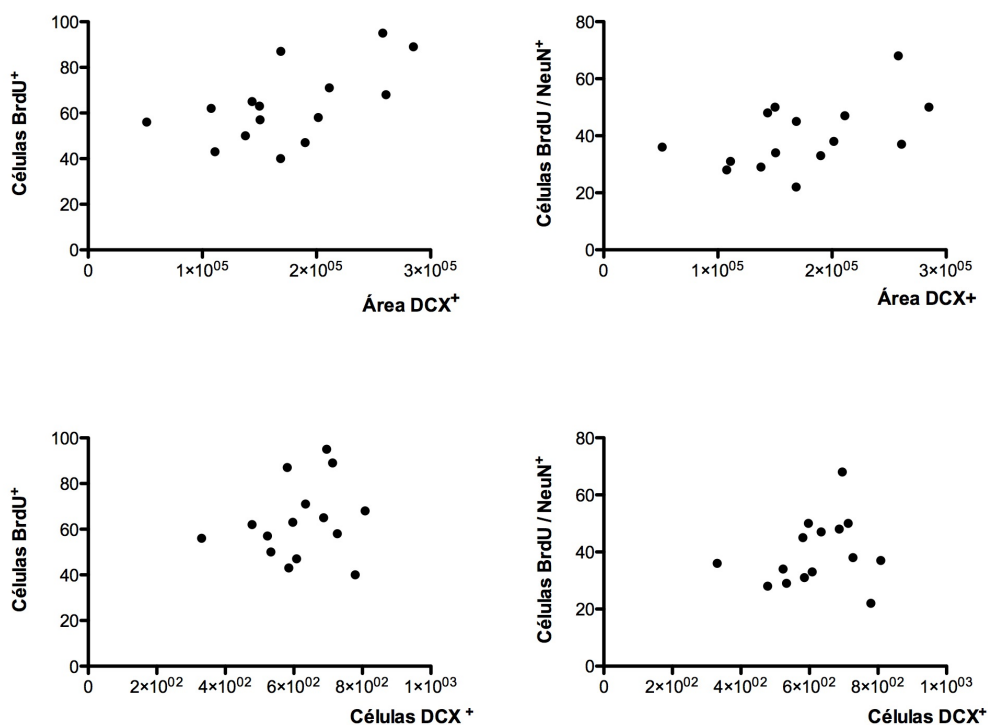
A razão entre a área imunopositiva para doublecortina e o número de células doublecortina positivas, avaliando-se a totalidade das secções, foi similar entre os grupos experimentais,  $F(1,11) = 0,94$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola* (C:  $316,19 \pm 79,12$ , SM:  $227,94 \pm 79,57$ , EA:  $275,92 \pm 65,68$ , SMEA:  $257,28 \pm 31,19$ ,  $\mu\text{m}^2$ , figura 27).

Observou-se correlação positiva entre o número de células doublecortina positivas e a área imunopositiva para doublecortina ( $\rho = 0,79$ ,  $r^2 = 0,62$ ,  $p < 0,01$ , figura 27). Também observou-se correlação positiva entre área imunopositiva para doublecortina e o número de células BrdU positivas ( $\rho = 0,01$ ,  $r^2 = 0,35$ ,  $p < 0,05$ ), bem como da área imunopositiva para doublecortina e o número de células BrdU/NeuN positivas ( $\rho = 0,03$ ,  $r^2 = 0,26$ ,  $p < 0,05$ ). Não foi observada correlação

entre o número de células doublecortina positivas e o número de células BrdU ou BrdU/NeuN positivas ( $\rho = 0,24$  e  $0,22$ ,  $r^2 = 0,04$  e  $0,05$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente, figura 28).



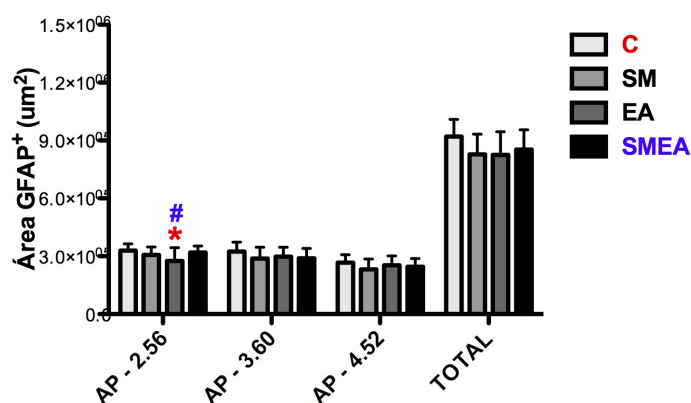
**Figura 27:** Não foram observadas diferenças significativas em relação a razão entre a área imunopositiva para doublecortina e o número de células doublecortina positivas. Foi observada correlação entre o número de células positivas para doublecortina e a área imunopositiva para doublecortina,  $p < 0,01$ .



**Figura 28:** Foi observada correlação entre a área imunopositiva para doublecortina e o número de células BrdU ou BrdU/NeuN positivas ( $p < 0,05$ ). Não foi observada correlação entre o número de células doublecortina positivas e o número de células BrdU ou BrdU/NeuN positivas ( $p > 0,05$ ).

#### 5.4. Área imunopositiva para GFAP

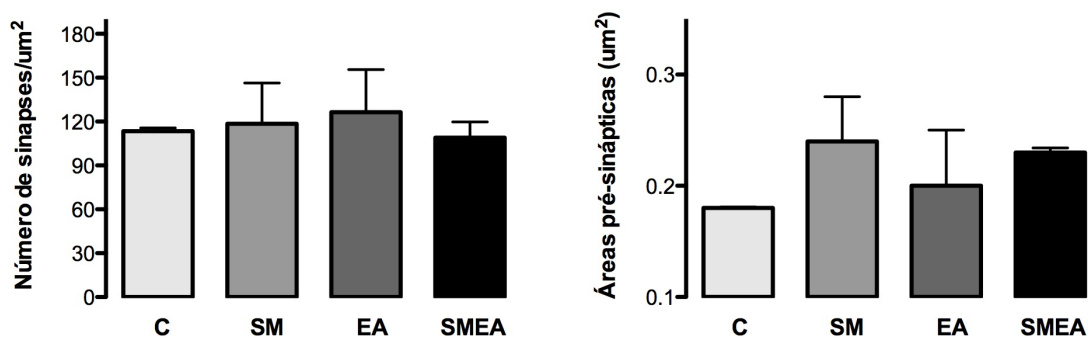
A área imunopositiva para GFAP, bregma 2,56, teve tendência para interação entre os fatores *manipulação x gaiola*,  $F(1, 25) = 3,46$ ,  $p < 0,1$ . No *post-hoc* foi observada redução da área imunopositiva para GFAP nos animais EA em relação aos C, bem como tendência de redução dos SMEA em relação aos EA (C:  $329207,30 \pm 35451,28$ , SM:  $306465,00 \pm 41216,90$ , EA:  $275583,10 \pm 68719,30$ , SMEA:  $319231,50 \pm 33515,60$ ). No bregma 3,60, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos experimentais (C:  $324505,10 \pm 48283,59$ , SM:  $288731,30 \pm 58625,40$ , EA:  $297535,50 \pm 49576,10$ , SMEA:  $288857,70 \pm 52366,70$ ),  $F = 0,49$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*. No bregma 4,52, tampouco foram observadas diferenças entre os grupos experimentais (C:  $266632,80 \pm 41773,63$ , SM:  $232321,00 \pm 52951,80$ , EA:  $245330,70 \pm 42150,60$ ),  $F = 0,60$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*. Na somatória de todas as secções, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (C:  $920345,20 \pm 88992,63$ , SM:  $827517,0 \pm 105670,40$ , EA:  $825808,50 \pm 119569,00$ , SMEA:  $853439,90 \pm 101654,20$ ),  $F = 2,37$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola*, figura 29.



**Figura 29:** Foi observada redução na área imunopositiva para GFAP, bregma 2,56, nos animais EA em relação aos C, e tendência de redução dos SMEA em relação aos EA. Nos outros bregmas e na somatória das secções, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

### 5.5. Plasticidade sináptica

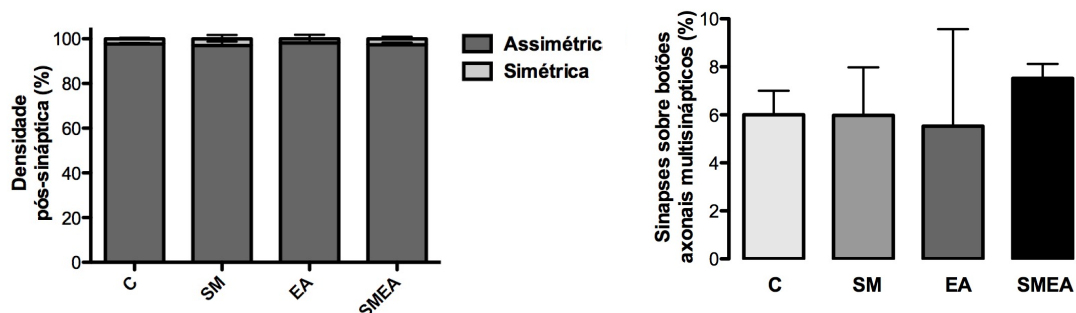
Nãa houve diferenças significantes no número de sinapses/ $\mu\text{m}^2$  entre os diferentes grupos experimentais (C:  $113,44 \pm 2,28$ , SM:  $118,59 \pm 27,78$ , EA:  $126,46 \pm 29,04$ , SMEA:  $109,07 \pm 10,64$ ,  $n = 2/3$ );  $F(1,6) = 0,55$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola* (figura 30). Em relação a área pré-sináptica (área envolvendo as vesículas sinápticas) não foram observadas diferenças significantes entre animais dos diferentes grupos experimentais (C:  $0,18 \pm 0,001$ , SM:  $0,24 \pm 0,04$ , EA:  $0,20 \pm 0,05$ , SMEA:  $0,23 \pm 0,004$ ; áreas medidas em  $\mu\text{m}^2$ );  $F(1,6) = 0,32$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola* (figura 30).



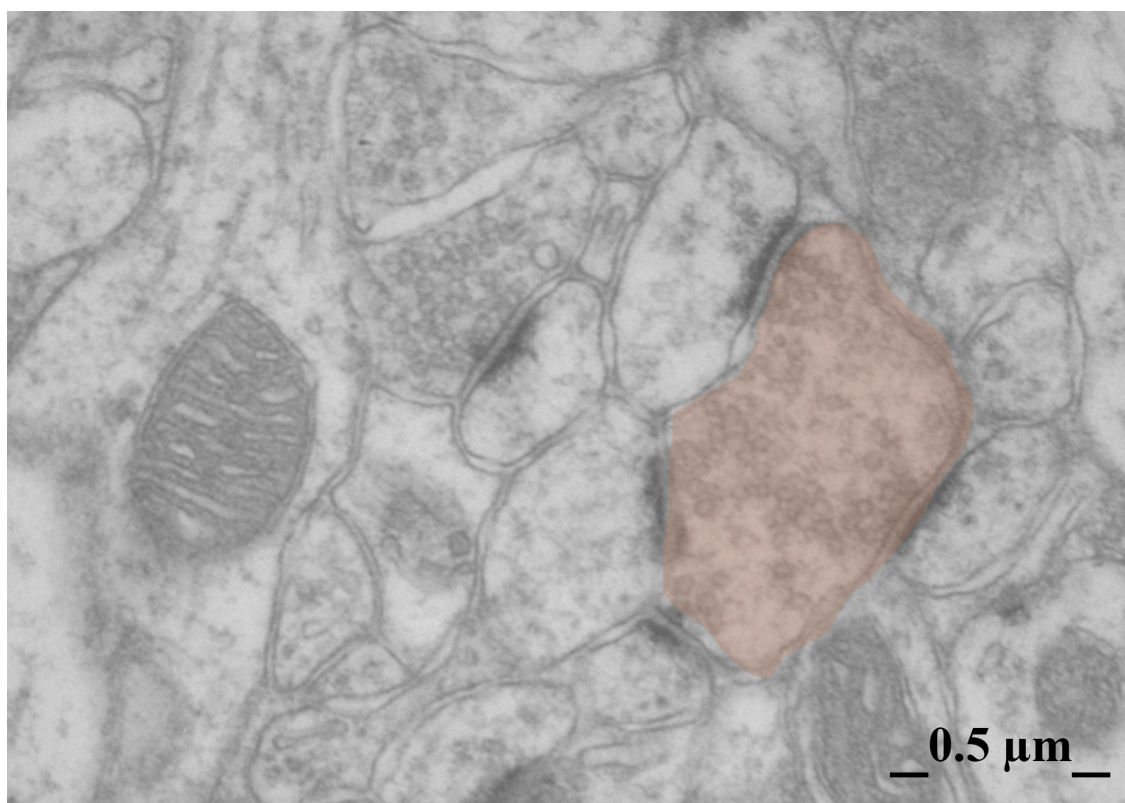
**Figura 30:** Não foram observadas diferenças significantes quanto ao número de sinapses/ $\mu\text{m}^2$  e áreas pré-sinápticas entre os grupos experimentais.

Em relação a porcentagem de sinapses assimétricas (C:  $97,66 \pm 0,46$ , SM:  $97,01 \pm 1,72$ , EA:  $98,17 \pm 1,80$ , SMEA:  $97,38 \pm 0,97$ ) e simétricas (C:  $2,34 \pm 0,46$ , SM:  $2,99 \pm 1,72$ , EA:  $1,83 \pm 1,80$ , SMEA:  $2,62 \pm 0,97$ ) não há diferenças significantes entre os diversos grupos;  $F(1,6) = 0,006$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola* (figura 31). Observaram-se botões axonais contendo múltiplas sinapses (multisinápticos), com até 4 sinapses/botão axonal. Em relação à porcentagem de sinapses sobre esses botões multisinápticos não foram observadas diferenças

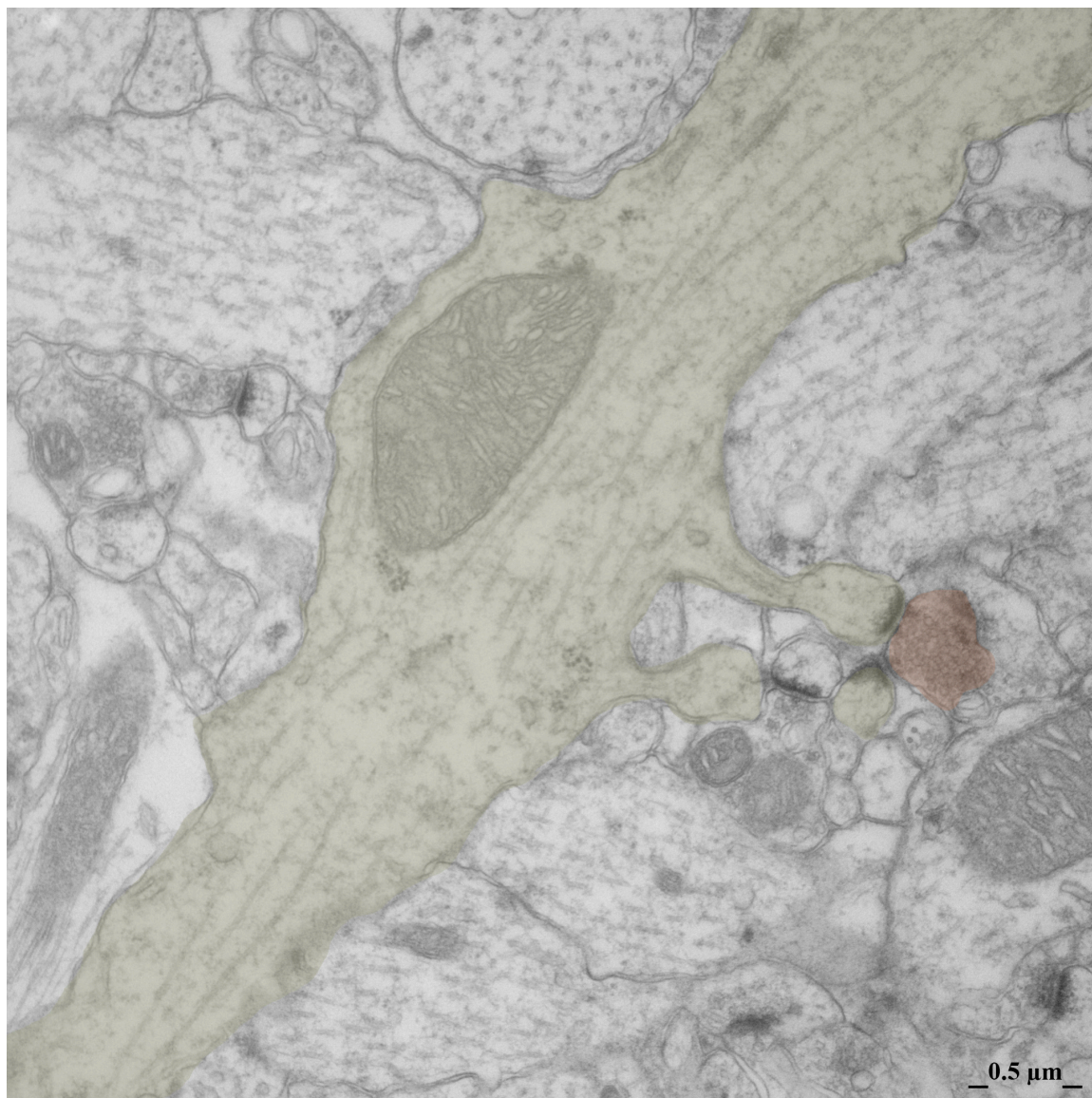
significativas entre os diversos grupos experimentais (C:  $6,00 \pm 1,00$ , SM:  $5,98 \pm 2,00$ , EA:  $5,53 \pm 4,04$ , SMEA:  $7,52 \pm 0,60$ );  $F(1,6) = 0,35$ ,  $p > 0,05$ , *manipulação x gaiola* (figuras 31, 32 e 33).



**Figura 31:** Não foram observadas diferenças significativas quanto a porcentagem de sinapses assimétricas ou simétricas e de sinapses sobre botões axonais multisinápticos.



**Figura 32:** Múltiplas sinapses excitatórias a partir de um único botão axonal *en passant* (em laranja).

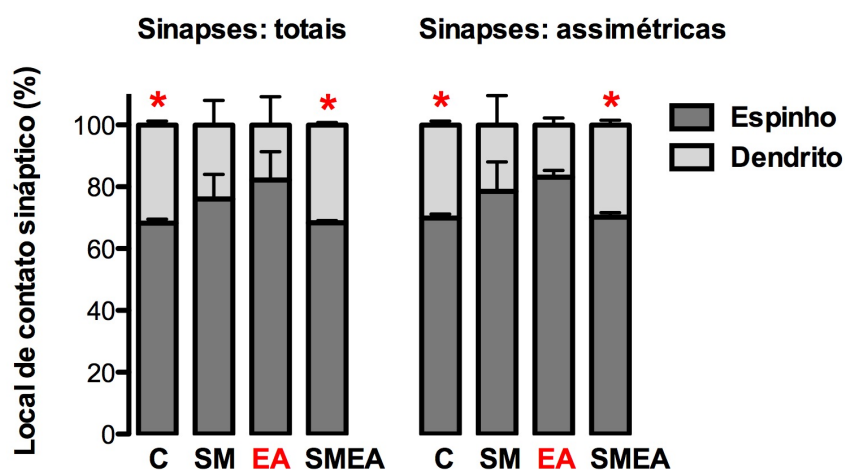


**Figura 33:** Ramo dendrítico com a projeção de espinhos dendríticos. Botão axonal multisináptico, sobre espinhos dendríticos, em laranja.

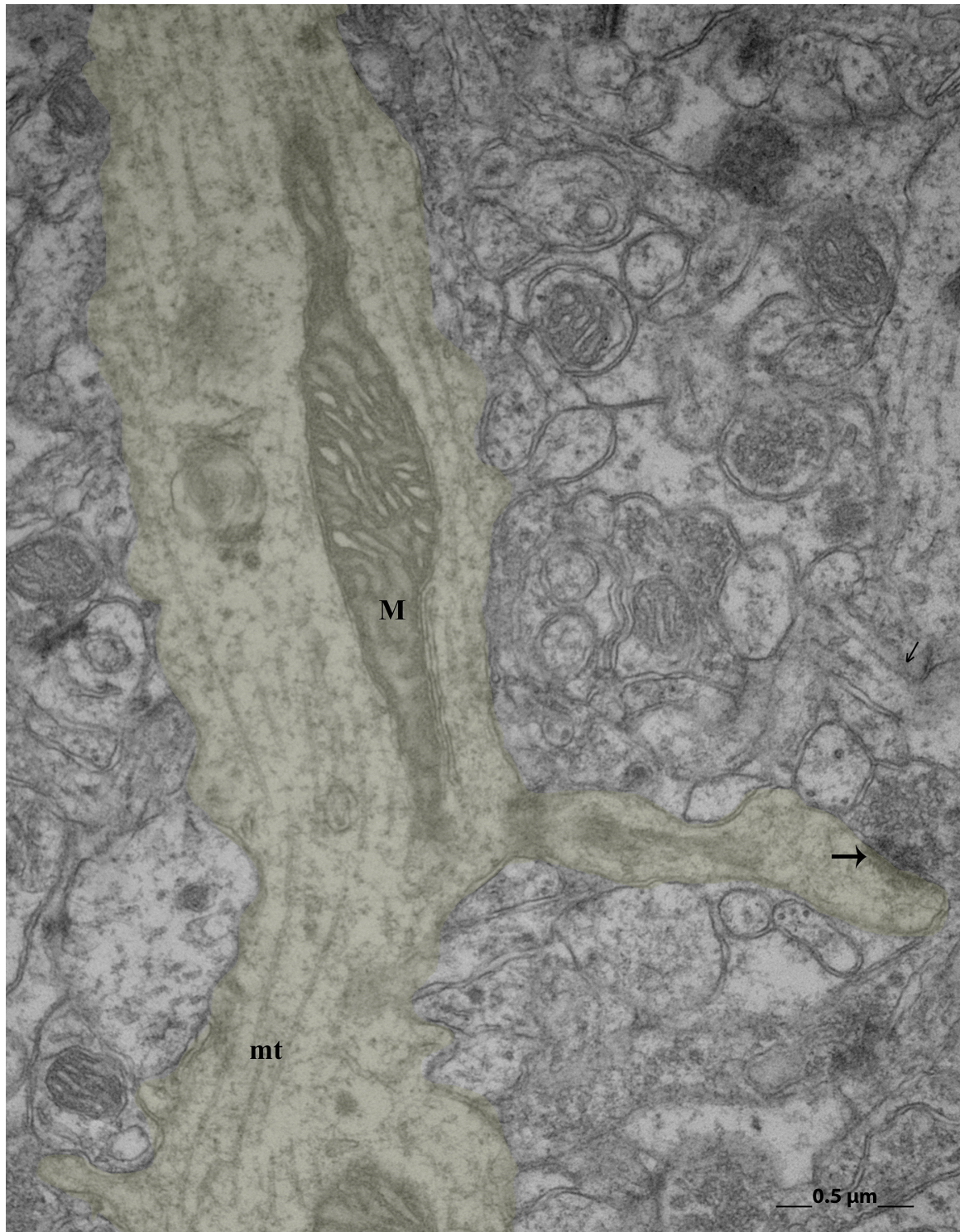
Na proporção de sinapses sobre dendritos ou espinhos dendríticos foram observadas diferenças significativas na interação entre as variáveis *manipulação* e *gaiola*;  $F(1,6) = 11,47$ ,  $p < 0,05$ . A porcentagem de sinapses sobre espinhos dendríticos foi superior nos animais EA quando comparados aos C e SMEA (C:  $31,77 \pm 1,27$ , SM:  $23,93 \pm 7,98$ , EA:  $17,83 \pm 3,03$ , SMEA:  $31,69 \pm 0,80$ ) e, conseqüentemente, a porcentagem de sinapses sobre dendritos foi inferior nos animais EA quando comparados aos C e SMEA (C:  $68,23 \pm 1,27$ , SM:  $76,07 \pm 7,98$ , EA:



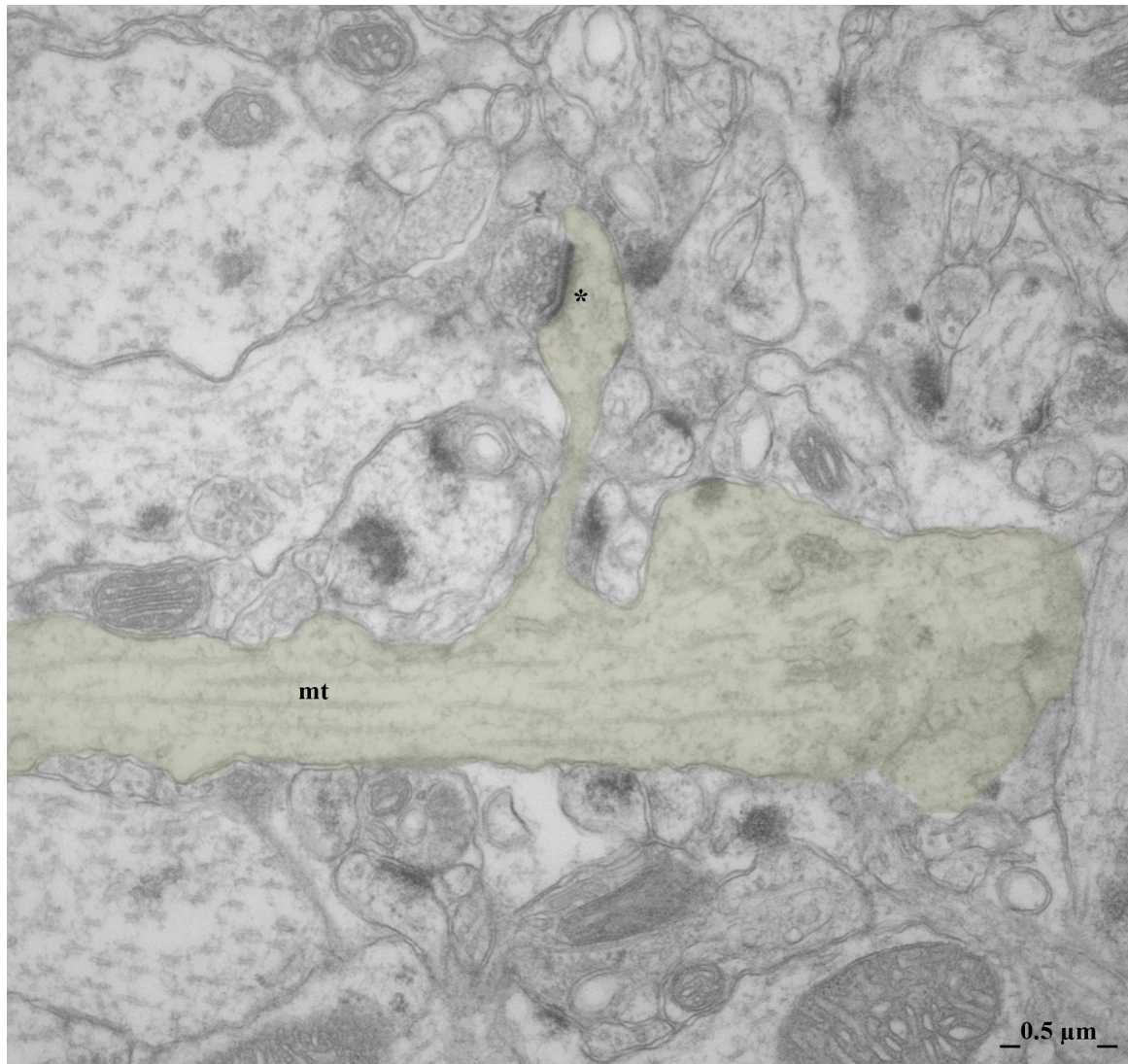
82,17 ± 3,03, SMEA: 68,31 ± 0,80). Na porcentagem de sinapses sobre dendritos ou espinhos dendríticos, foram observadas diferenças significativas na interação entre as variáveis manipulação e gaiola;  $F(1, 6) = 8,64, p < 0,05$ . Houve aumento na porcentagem de sinapses sobre espinhos dendríticos (C: 69,87 ± 1,27, SM: 78,52 ± 9,51, EA: 83,08 ± 2,26; SMEA: 70,16 ± 1,52) e redução sobre dendritos (C: 30,13 ± 1,27, SM: 21,48 ± 9,51, EA: 16,92 ± 2,26; SMEA: 29,84 ± 1,52) nos animais EA quando comparados aos C e SMEA (figuras 34, 35, 36 e 37). Em relação a sinapses simétricas sobre espinhos dendríticos, as mesmas foram observadas apenas em 2 sinapses, sobre o pescoço do espinho, nos animais do grupo EA (figura 38).



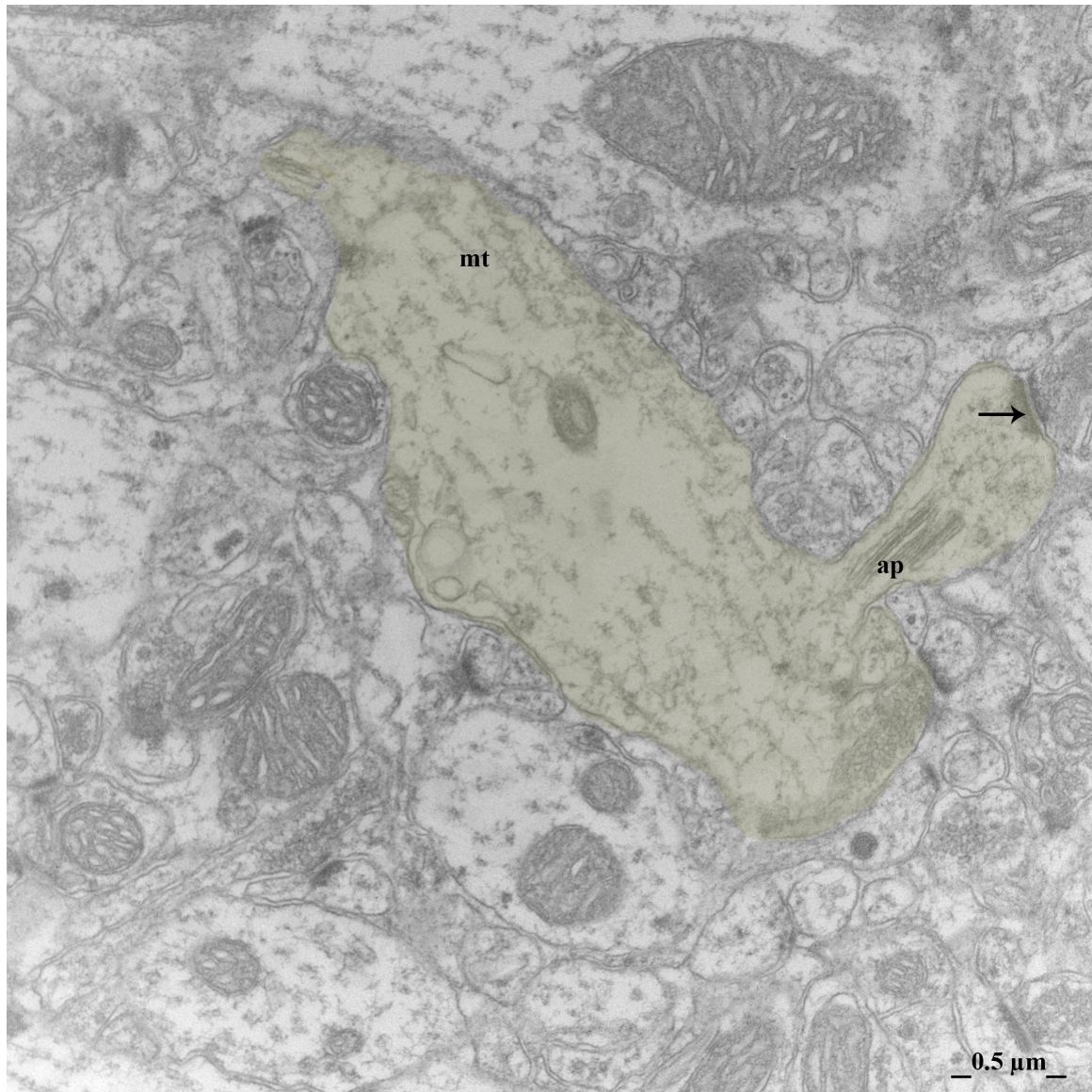
**Figura 34:** Observou-se aumento na porcentagem de sinapses sobre espinhos dendríticos e redução sobre dendritos nos animais EA quando comparados aos C e SMEA.



**Figura 35:** Sinapse excitatória sobre espinho dendrítico (→). No ramo dendrítico observe microtúbulos (mt) e mitocôndrias (M).

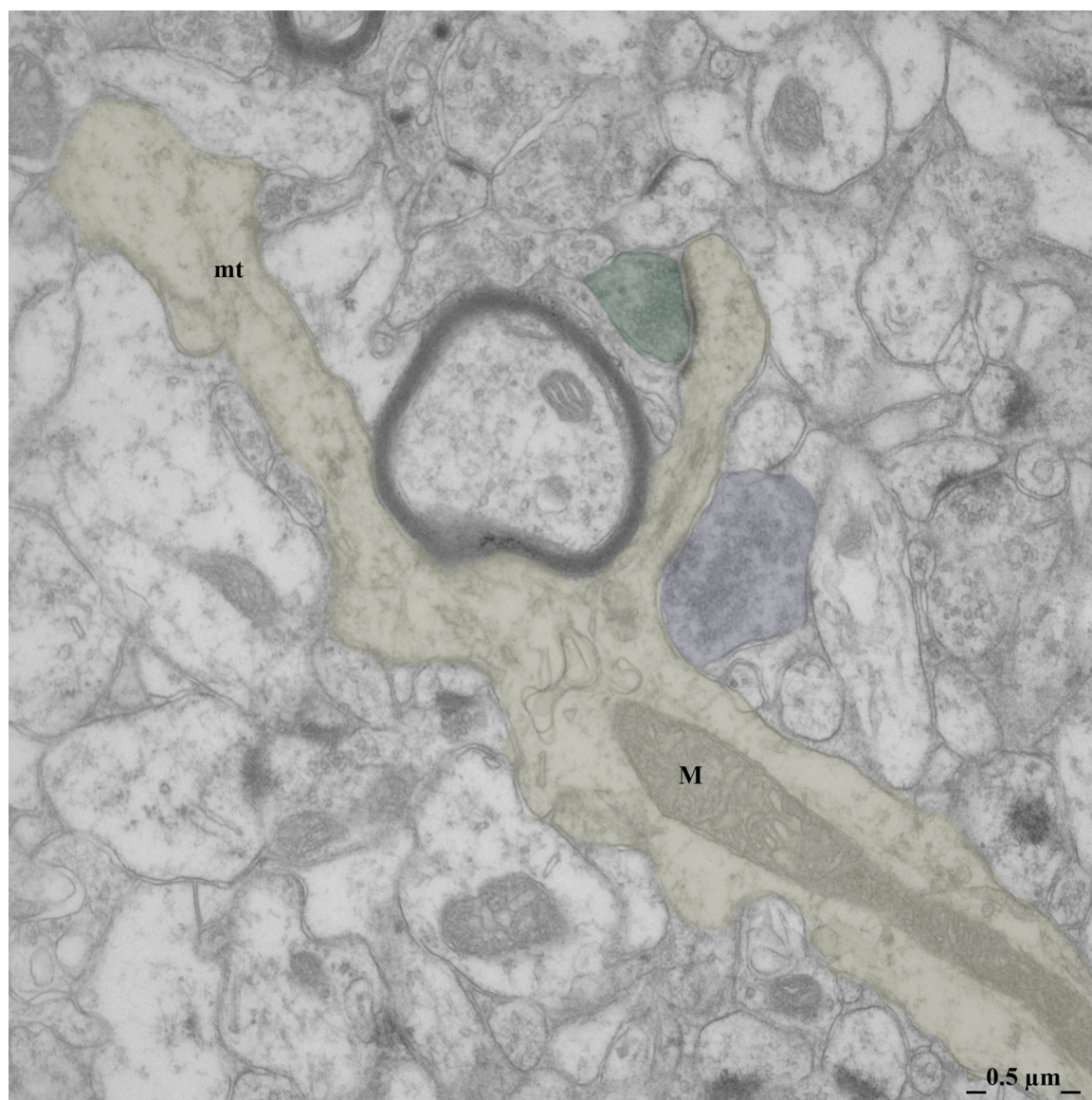


**Figura 36:** Sinapse excitatória sobre espinho dendrítico (\*). No ramo dendrítico observe microtúbulos (mt).



**Figura 37:** Sinapse excitatória sobre espinho dendrítico (→). Observe o *aparatus* (ap) do espinho dendrítico. No ramo dendrítico observe a presença de microtúbulos (mt).

Apenas no grupo EA, foram encontradas duas sinapses inibitórias sobre o pescoço do espinho dendrítico.

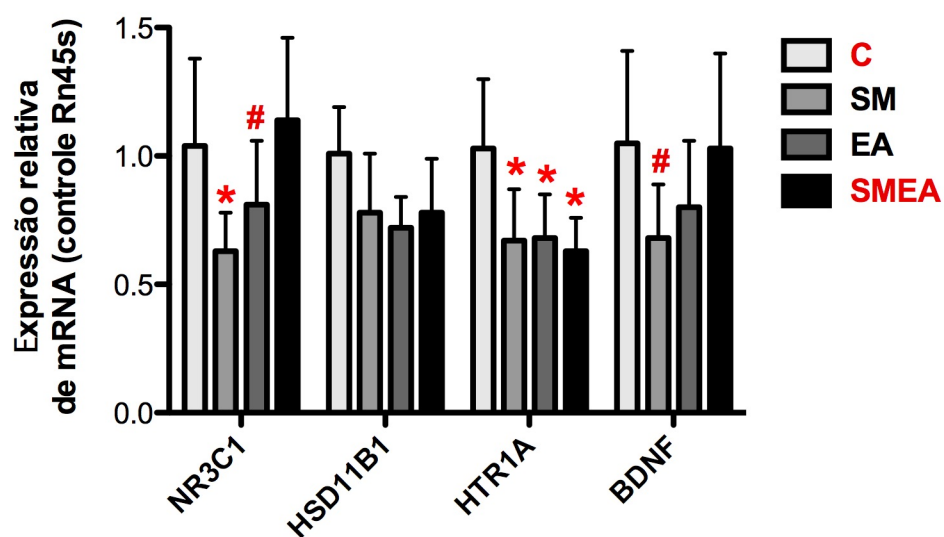


**Figura 38:** Sinapse excitatória (em verde) sobre a cabeça do espinho dendrítico (em amarelo), e sinapse inibitória sobre o pescoço do espinho dendrítico (em azul). Ramo dendrítico (em amarelo) com microtúbulos (mt) e mitocôndrias (M).

## 5.6. mRNA para Nr3c1, Hsd11b1, Htr1a e Bdnf

O gene Nr3c1, que codifica receptores de glicocorticóides, mostrou efeito significativo na interação das variáveis *manipulação* e *gaiola* ( $F(1, 16) = 9,07$ ,  $p < 0,01$ ). O grupo SM teve menor expressão de mRNA para Nr3c1 do que os grupos C e SMEA, bem como uma tendência ( $p < 0,01$ ) de redução no grupo EA em relação ao SMEA (C:  $1,04 \pm 0,34$ , SM:  $0,63 \pm 0,15$ , EA:  $0,81 \pm 0,25$ , SMEA:  $1,14 \pm 0,32$ ,  $n = 5$ ). Em relação ao gene Hsd11b1, associado ao metabolismo dos glicocorticóides, não foram observadas diferenças significativas quanto aos grupos experimentais (C:  $1,01 \pm 0,18$ , SM:  $0,78 \pm 0,23$ , EA:  $0,72 \pm 0,12$ , SMEA:  $0,78 \pm 0,23$ ,  $n = 5$ );  $F(1,16) = 2,87$ ,  $p > 0,05$  (figura 39).

O gene Htr1a, que codifica receptores serotoninérgicos 5HT-1A, apresenta diferenças significativas dos fatores *manipulação* ( $F(1,16) = 5,10$ ,  $p < 0,05$ ) e *gaiola* ( $F(1,16) = 5,05$ ,  $p < 0,05$ ), mas não da interação entre os fatores *manipulação* e *gaiola* ( $F(1,16) = 2,88$ ,  $p > 0,05$ ). Os grupos SM, EA e SMEA tiveram menor expressão de mRNA para Htr1a do que o grupo C (C:  $1,03 \pm 0,27$ , SM:  $0,67 \pm 0,20$ , EA:  $0,68 \pm 0,17$ , SMEA:  $0,63 \pm 0,13$ ). O gene Bdnf, que codifica o fator neurotrófico derivado do encéfalo, demonstra diferença significativa na interação *manipulação* x *gaiola* ( $F(1,16) = 4,76$ ,  $p < 0,05$ ). No teste *post-hoc* observou-se uma tendência ( $p < 0,01$ ) de redução no mRNA para Bdnf nos animais SM em relação aos C e SMEA (C:  $1,05 \pm 0,36$ ; SM:  $0,68 \pm 0,21$ , EA:  $0,80 \pm 0,26$ ; SMEA:  $1,03 \pm 0,37$  (figura 39).



**Figura 39:** Para o gene Nr3c1 foi observada redução na expressão de mRNA no grupo SM em relação aos C e SMEA, bem como uma tendência ( $p < 0,01$ ) de redução no grupo EA em relação ao SMEA. Em relação ao gene Hsd11b1 não foram observadas diferenças significativas quanto aos grupos experimentais. Para o gene Htr1a, foi observada redução na expressão de mRNA nos grupos SM, EA e SMEA em relação ao C. O gene Bdnf teve tendência à redução da expressão de mRNA dos animais SM em relação aos C e SMEA.

## 6. Discussão

O presente estudo analisou a plasticidade hipocampal de ratos submetidos à separação materna e enriquecimento ambiental. Analisaram-se marcadores de neurogênese, modificações na plasticidade sináptica, bem como alterações na expressão de mRNA de genes envolvidos com plasticidade neural.

Observou-se redução da neurogênese dos animais submetidos à separação materna. De maneira geral, o número de células BrdU positivas (indicador de sobrevivência celular), o número de células BrdU/NeuN positivas (indicador de diferenciação neuronal), e a área imunopositiva para doublecortina (proteína expressa em neuroblastos que correlacionou-se positivamente com o número de células doublecortina positivas), encontram-se reduzidas nos animais submetidos à separação materna. O enriquecimento ambiental atenuou a redução na sobrevivência celular, mas não na diferenciação neuronal.

Lajud e colaboradores (2012) observaram redução da neurogênese hipocampal (analisada pelo número de células BrdU positivas e co-localização de BrdU com NeuN ou BrdU com doublecortina) em animais submetidos a 3 horas diárias de separação materna entre o 1º ao 14º dias pós-natais, avaliados no 15º dia pós-natal. Raceková e colaboradores (2009) observaram redução da proliferação celular, pela imunomarcagem com BrdU, de animais com 28 dias submetidos à separação materna entre o 1º ao 14º dias pós-natais. Fabricius e colaboradores (2009) observaram redução do número de neurônios no giro denteado do hipocampo de camundongos adultos submetidos a 24 horas de separação materna no 9º dia pós-natal. Aksic e colaboradores (2013) observaram redução do volume total do hipocampo, assim como nas regiões CA1 e giro denteado, e na expressão da proteína NeuN, de ratos *Wistar* jovens, 60 dias de idade, submetidos à separação materna no 9º dia pós-natal, por um



período de 24 horas, quando comparados a animais controle (separados de suas respectivas mães por um período de 3 minutos). Sung e colaboradores (2010) observaram redução da proliferação celular e aumento da apoptose no hipocampo de animais submetidos à separação materna ao longo do 1º ao 14º dias pós-natais, 6 horas por dia. Também observaram redução no número de células positivas para triptofano hidroxilase e serotonina no núcleo dorsal da raphe, bem como na densidade óptica positiva para as fibras serotoninérgicas no giro denteado. Apesar das diferenças nos protocolos experimentais e na idade de eutanásia dos animais, que no presente estudo foram animais jovens com 50 dias de idade, os trabalhos corroboram com a redução na neurogênese de animais submetidos à separação materna. Portanto, as alterações causadas pelo estresse neonatal da neurogênese hipocampal são persistentes.

Em relação ao efeito do enriquecimento do ambiente sobre a neurogênese hipocampal, Kempermann e colaboradores (1997) observaram aumento do volume do giro denteado, do número de neurônios hipocampais e do número de células BrdU positivas em camundongos que vivem em ambiente enriquecido, ao longo de 4 semanas, quando comparados com animais controle. Por outro lado, Diamond e colaboradores (1976) não observaram diferenças do espessamento cortical do hipocampo de animais submetidos ao enriquecimento quando comparado com animais vivendo em ambiente empobrecido. Piazza e colaboradores (2011, 2014) observaram que o enriquecimento ambiental não reverteu a redução da proliferação celular observada nos animais submetidos a indução de diabetes por estreptozotocina, apesar de ter efeito benéfico sobre déficits cognitivos observados nos animais diabéticos. Monteiro e colaboradores (2013) observaram que o enriquecimento ambiental reverteu a redução da neurogênese observada em animais submetidos à

isolamento. Sendo assim, o enriquecimento ambiental parece ter diferentes efeitos sobre diversos eventos estressantes.

Não encontramos diferenças significativas entre os animais controle ou mantidos em enriquecimento ambiental, ao contrário do observado em estudos (Kempermann *et al.*, 1997). No entanto, outros autores tampouco observaram efeito do enriquecimento ambiental “per se” no número de células BrdU positivas (Beauquis *et al.*, 2010; Piazza *et al.*, 2011; 2014; Williamson *et al.*, 2012). Uma questão a ser discutida é a idade da exposição dos animais ao enriquecimento ambiental e a duração da exposição neste ambiente. No presente estudo, assim como no de Piazza e colaboradores (2011), os animais foram submetidos ao enriquecimento ambiental com 21 dias de idade. Nesta idade os índices de neurogênese basal são elevados. Portanto, podemos sugerir que nesta fase o enriquecimento do ambiente não seja eficaz para aumentar a neurogênese hipocampal. Hosseiny e colaboradores (2014) observaram que o aumento da neurogênese hipocampal em animais expostos ao enriquecimento ambiental depende do tempo de permanência no ambiente, bem como da idade de exposição dos animais ao enriquecimento.

Akers e colaboradores (2014) discutem que a neurogênese hipocampal em indivíduos jovens pode induzir esquecimento. Em indivíduos jovens, que possuem elevados níveis de neurogênese, as memórias são rapidamente esquecidas. O exercício voluntário, em camundongos, aumenta o número de células Ki-67 e doublecortina positivas, mas induz a menor retenção de memórias na tarefa do medo condicionado contextual. Esse estudo mostra a importância da neurogênese em diferentes fases da vida (Akers *et al.*, 2014; Mongiat e Schinder, 2014).

Leger e colaboradores (2014) mostraram que a duração do enriquecimento ambiental afeta diferenciadamente a neurogênese e o comportamento. Em

camundongos, o autor observou que o volume da camada granular e a proliferação celular não são afetadas pelo enriquecimento (exposição dos animais a 1, 3 e 5 semanas de enriquecimento ambiental). A sobrevivência celular aumentou nos animais mantidos em enriquecimento ao longo de 5 semanas, e a porcentagem de células que se diferenciaram em neurônios aumentou nos grupos submetidos com 3 e 5 semanas de enriquecimento.

No presente estudo não observamos correlação entre as células BrdU e BrdU/NeuN positivas com o número de células doublecortina positivas, contudo verificamos correlação com a área imunopositiva para doublecortina. A proteína doublecortina, possui papel fundamental na migração neuronal (regula a estabilidade dos microtúbulos) e crescimento dendrítico e axonal (Gleeson *et al.*, 1999; Deuel *et al.*, 2006; Feng e Walsh, 2001; Rosenzweig e Wojtowicz, 2011), ou seja, não é um marcador diretamente correlacionado com neurogênese (von Bohlen und Halbach O, 2007; Paolone *et al.*, 2014).

No presente estudo a separação materna reduziu as células BrdU e BrdU/NeuN positivas. O enriquecimento do ambiente, nestes animais, atenuou a redução das células BrdU positivas, mas não das células BrdU/NeuN positivas. Além disso, nos animais submetidos a ambos os procedimentos, observou-se redução no número de células e na área imunopositivas para doublecortina. Diferentes expressões no número de células doublecortina positivas em animais submetidos à separação materna no hipocampo podem ocorrer ao longo do tempo (Suri *et al.*, 2013). Suri e colaboradores (2013) observaram aos 21 dias aumento, aos 2 meses semelhança e aos 3 meses redução das células doublecortina positivas em animais submetidos à separação materna. Estudos sugerem que o pico da expressão de marcadores neuronais maduros, como o NeuN, coincide com a redução na expressão de

doublecortina (Brown *et al.*, 2003; von Bhlen e Halbach, 2007). Tampouco foram observadas células doublecortina positivas colocalizadas com células positivas para TUNEL, marcador de células em apoptose (Rao e Shetty, 2004). Sendo assim podemos formular duas hipóteses: 1) que aumento do número de células BrdU positivas e redução na expressão de doublecortina, como tentativa de restabelecimento da circuitaria (a fim de aumentar a diferenciação neuronal), contudo esses neurônios não conseguem se integrar a circuitaria cerebral; 2) que redução do número de neuroblastos e da diferenciação neuronal, com aumento do número de células gliais (analisamos apenas a área imunopositiva para GFAP). O enriquecimento ambiental aumentou o número de novas células gliais em camundongos jovens criados em ambiente enriquecido (Kempermann, Kuhn e Gage, 1997), além disso, reverteu a redução da área imunopositiva para GFAP na retina de ratos diabéticos (Dorfman *et al.*, 2014).

A tendência de redução na área imunopositiva para doublecortina, mas não no número de células positivas para a proteína, nos animais submetidos ao enriquecimento ambiental poderia ser explicada por um amadurecimento neuronal precoce, levando-se em conta a hipótese de “dowregulation” de doublecortina e “upregulation” de NeuN. Já a redução da área imunopositiva para doublecortina nos animais submetidos à separação materna, sem alteração no número de células imunopositivas para essa proteína, poderia ser devido à redução no crescimento e estabilização dos processos neurais (Friocourt *et al.*, 2003; Koizumi *et al.*, 2006), reduzindo a integração sináptica. Há coincidência no período de expressão de doublecortina e de integração sináptica (Song *et al.*, 2005). Plumpe e colaboradores (2006) dividiram as células doublecortina positivas conforme sua morfologia. As células com curtos processos dendríticos estariam associadas ao estágio proliferativo,

as células com processos dendríticos médios alcançando a camada molecular estariam associadas a estágios intermediários, e as células com ramificação dendrítica na camada molecular estariam relacionadas a estágios pós-mitóticos. Qualitativamente (figura 26), parece ocorrer redução na arborização dendrítica nos animais submetidos a ambos os procedimentos.

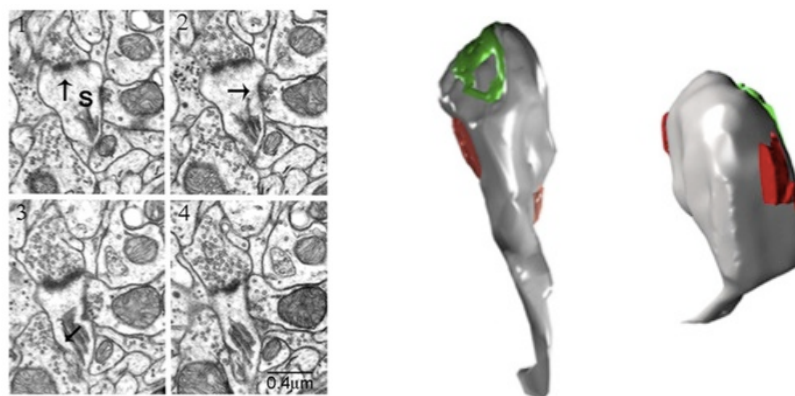
Neste trabalho, a plasticidade sináptica foi analisada na camada molecular interna do hipocampo, uma vez que os novos neurônios enviam seus dendritos para esta região. Observou-se que animais mantidos em enriquecimento ambiental tiveram maior proporção de sinapses sobre espinhos dendríticos, e, conseqüentemente, menor sobre dendritos, quando comparados a animais controle ou submetidos à separação materna e mantidos em enriquecimento ambiental, ou seja, houve remodelação do local de contato sináptico. Estes resultados foram similares quando analisamos apenas as sinapses assimétricas. Apenas no grupo mantido em enriquecimento ambiental foram observadas sinapses simétricas sobre espinhos dendríticos, as quais se localizaram sobre o pescoço dos mesmos. Portanto, apesar do enriquecimento ambiental não ter afetado a neurogênese hipocampal, no presente estudo, pode ter afetado a sinaptogênese hipocampal.

Como já descrito, o enriquecimento ambiental afetou a sobrevivência, mas não a diferenciação neuronal no giro denteado do hipocampo. No presente estudo não analisamos alterações na arborização dendrítica, nem a densidade e morfologia dos espinhos dendríticos nos diferentes grupos experimentais. Diversos trabalhos apontam aumento do comprimento e arborização dendríticos, bem como na densidade de espinhos no hipocampo de animais mantidos em ambientes enriquecidos (Kozorovitskiy *et al.*, 2005).

Diferenças na maturação, ou seja, na arborização dendrítica, de neurônios doublecortina positivos também podem ocorrer dependendo do ambiente (Plumpe *et al.*, 2006). Foi relatado aumento no comprimento dendrítico de neurônios doublecortina positivos em animais mantidos em enriquecimento ambiental quando comparados a controles, embora não haver efeito do enriquecimento sobre a neurogênese hipocampal (Beauquis *et al.*, 2010). Em nosso trabalho, levando em consideração que a neurogênese não foi afetada pelo enriquecimento do ambiente, mas que a proporção de sinapses sobre espinhos dendríticos aumentou em relação aos controles ou submetidos à separação materna e mantidos em enriquecimento ambiental, podemos hipotetizar que nos animais mantidos em enriquecimento ambiental há aumento da densidade de espinhos dendríticos e remodelamento das conexões sinápticas. Neste caso, a densidade sináptica poderia se manter constante, como observado no presente estudo. No entanto, nos animais mantidos em enriquecimento, mas submetidos previamente à separação materna, o efeito da separação materna é drástico a ponto de inibir o remodelamento das conexões sinápticas causadas pelo enriquecimento do ambiente.

Landers e colaboradores (2011) observaram aumento da densidade de sinapses excitatórias sobre espinhos dendríticos e ramos dendríticos, e da densidade de sinapses inibitórias sobre espinhos dendríticos (mas não sobre ramos dendríticos) no córtex somatossensorial de camundongos expostos, durante 2 meses, em enriquecimento ambiental. Resalta-se que neste estudo os autores utilizaram enriquecimento ambiental natural, ou seja, os animais eram mantidos em um ambiente de dimensões controladas, ao abrigo de predadores, mas em uma floresta. Os autores discutem que sinapses inibitórias em espinhos dendríticos sempre ocorrem em

conjunto com sinapses excitatórias, podendo bloquear ou intensificar a entrada cortical excitatória, selecionando a entrada e transmissão da informação.



**Figura 40:** Reconstruções tridimensionais de diferentes tipos de contato sináptico sobre espinhos dendríticos. Exemplo de espinho dendrítico contendo uma sinapse excitatória e duas sinapses inibitórias (Modificado de Landers *et al.*, 2011).

Knott e colaboradores (2002) observaram aumento da densidade de sinapses corticais, devido ao aumento da densidade de sinapses em espinhos dendríticos, após 24 h da estimulação das vibrissas de camundongos. A densidade de sinapses gabaérgicas em espinhos dendríticos é aumentada após 24 horas e 4 dias da estimulação. Nos animais controle menos de 2% das sinapses sobre espinhos dendríticos são inibitórias. A estimulação das vibrissas aumenta essa porcentagem para aproximadamente 6%.

Os espinhos dendríticos são locais de contato sináptico altamente plásticos, portanto, o aumento na proporção de sinapses sobre espinhos nos animais mantidos em ambiente enriquecido sugere maior plasticidade das conexões sinápticas. A visualização de duas sinapses inibitórias sobre o pescoço de espinhos dendríticos sustenta essa hipótese. Sinapses simétricas sobre espinhos dendríticos já foram observadas em regiões encefálicas como a amígdala (Brusco *et al.*, 2014; Cooke e Woolley, 2005), hipocampo (Harris, Jensen e Tsao, 1992) e neocórtex (Kubota *et al.*,

2007; Chen *et al.*, 2012). Estudos sugerem que a plasticidade dependente da experiência é um processo organizado, e que a integração de novos contatos excitatórios, principalmente sobre espinhos dendríticos, está relacionada à eliminação e formação de sinapses inibitórias, inclusive sobre espinhos dendríticos (Chen *et al.*, 2012).

Botões axonais multisinápticos também são indicadores de plasticidade. No presente estudo não encontramos diferenças importantes em relação a porcentagem de sinapses sobre botões axonais multisinápticos. Knott e colaboradores (2006) analisaram, em diferentes períodos de tempo, através de microscopia multifóton, a formação de sinapses sobre espinhos dendríticos de neurônios piramidais neocorticais de camundongos, através de reconstrução tridimensional desses espinhos dendríticos usando microscopia eletrônica. Espinhos mais antigos apresentavam contatos sinápticos numa proporção maior que espinhos mais jovens, ou seja, concluíram que o crescimento dos espinhos dendríticos precede a formação de sinapses. Além disso, observaram que os novos espinhos formam preferencialmente sinapses em botões axonais multisinápticos. Outro dado interessante do autor, foi a observação de duas sinapses simétricas em espinhos jovens.

Popov e Stewart (2009) observaram a complexidade dos contatos sinápticos nas camadas moleculares do hipocampo de ratos Wistar, mediante reconstrução tridimensional com microscopia eletrônica, e concluíram que os botões axonais dessa região podem se conectar com até três espinhos dendríticos, originados de diferentes ramos dendríticos. Encontraram unicamente sinapses assimétricas sobre esses botões axonais. Estes autores estimaram que em  $1\text{mm}^3$  de tecido estariam contidas  $3.26 \times 10^9$  sinapses, destas  $1.50 \times 10^7$  seriam em botões multisinápticos (0,46% da população total de sinapses). Apesar desse valor parecer pequeno, representa milhões de contatos



por milímetro cúbico de tecido. Como já citado, no presente trabalho não foram observadas diferenças significativas quanto a formação de botões multisinápticos entre os diferentes grupos experimentais, e menos de 5% das sinapses estudadas foram sobre botões multisinápticos.

Sugerimos que o aumento na proporção de sinapses sobre espinhos dendríticos nos animais submetidos ao enriquecimento do ambiente possa estar relacionado ao aumento na densidade de espinhos dendríticos destes animais, bem como ao remodelamento de conexões sinápticas. O desenvolvimento de espinhos dendríticos também é afetado pelos glicocorticóides, por um mecanismo dependente de caldesmon, o qual regula a estabilidade do filamento de actina (Tanokashira *et al.*, 2012). Os filamentos de actina são componentes fundamentais dos espinhos dendríticos, regulando sua morfologia e dinâmica (Caceres *et al.*, 1983; Hotulainen e Hoogenraad, 2010).

Observamos redução na expressão de mRNA para Nr3c1, codificador dos receptores de glicocorticóides, nos animais submetidos à separação materna. O enriquecimento do ambiente reverteu essa redução nos animais separados da mãe. Não foram observadas diferenças significantes na expressão de mRNA para Hsd11b1, o qual codifica a enzima responsável por converter a cortisona ao hormônio ativo corticosterona. Já em relação a expressão de mRNA para Htr1a, observamos redução nos animais submetidos à separação materna, mantidos em enriquecimento ambiental, ou submetidos a ambos os procedimentos, em relação aos controles. Já para o Bdnf observamos tendência à redução da expressão de mRNA nos animais submetidos à separação materna comparados aos controle ou submetidos à separação materna e mantidos em enriquecimento ambiental.

O fator neurotrófico do encéfalo (BDNF) e o neurotransmissor serotonina são substâncias endógenas que estimulam a neurogênese hipocampal. A tendência à redução de mRNA para *Bdnf* nos animais submetidos a separação materna pode estar relacionada a redução na neurogênese nestes animais. Estudos coincidem com a redução de BDNF no hipocampo de ratos submetidos à separação materna (Dimatelis *et al.*, 2014; Maniam e Morris, 2010). Maniam e Morris (2010) observaram que o exercício físico reverte a redução na expressão de mRNA para *Bdnf* em animais submetidos à separação materna. O enriquecimento ambiental, que consiste de interação social, atividade física e oportunidades de aprendizado, parece ter o mesmo efeito. Porém, o aumento de mRNA para *Bdnf* nestes animais não foi suficiente para aumentar a neurogênese a níveis similares aos controles.

A expressão de mRNA para receptores de serotonina (5HT1A) também é reduzida no hipocampo de animais submetidos à separação materna (Maniam e Morris, 2010). Em outras estruturas, como o núcleo dorsal da raphe, onde se encontram os neurônios serotoninérgicos, a separação materna também reduz a expressão de mRNA para o transportador de serotonina (Bravo *et al.*, 2014; Own *et al.*, 2013). Por outra parte, na amígdala há aumento na expressão de mRNA para os receptores 5HT1A (Bravo *et al.*, 2014). Bravo e colaboradores (2014) não observaram diferenças quanto a expressão de mRNA para os receptores 5HT1A no giro denteado, CA1 e CA3, mediante de hibridização *in situ* em animais com 3 meses de idade, utilizando um protocolo similar ao nosso. Ohta e colaboradores (2014), com um protocolo de separação neonatal de 3 horas diárias ao longo do 2º ao 20º dias pós-natais, observaram redução na expressão de mRNA para os receptores 5HT1A no hipocampo nos 7º e 14º dias pós-natais. Após o término do procedimento de separação materna, nos 21º e 28º dias pós-natal, os valores observados foram

similares aos dos controles. Li et al (2013) observaram que o número de células positivas para 5TH1A diminui no hipocampo de animais submetidos à separação materna. Lee e colaboradores (2007), utilizando um protocolo de separação materna similar ao nosso, observaram redução nos níveis de serotonina hipocampais de animais submetidos à separação materna, sem alteração dos níveis no núcleo dorsal da raphe. A ligação dos receptores 5TH1A agonista 8-OH-DPAT encontra-se reduzida na região CA1 e giro denteado do hipocampo de 2 gerações subsequentes de camundongos expostos a um modelo composto de estresse materno (estresse de restrição ou nado forçado em água gelada) e separação materna (Franklin et al., 2011). O exercício físico reverte a redução na expressão de mRNA para os receptores serotoninérgicos 5TH-1A no hipocampo de animais submetidos à separação materna (Maniam e Morris, 2010).

Em nosso estudo, o enriquecimento ambiental também reduziu a expressão de mRNA para *Htr1a*, bem como ambas as manipulações. Leger e colaboradores (2014) observaram que a manutenção de camundongos no enriquecimento ambiental, ao longo de 3 semanas, aumenta a concentração de serotonina no córtex pré-frontal, sem modificações no hipocampo e na amígdala. Brenes e colaboradores (2009) observaram que a concentração de serotonina no hipocampo de ratos com 70 dias de idade, mantidos em enriquecimento ambiental, é maior que a de animais mantidos em caixa padrão ou mantidos em condição de isolamento. Podemos sugerir que os maiores níveis de serotonina no hipocampo de animais mantidos em enriquecimento ambiental ao longo dos dias pós natais 28 a 60, pode levar a “downregulation” dos receptores serotoninérgicos. Lesemann e colaboradores (2012) observaram que o tratamento com fluoxetina “per se”, antidepressivo conhecido por estimular a neurogênese hipocampal (Duman *et al.*, 2001; Encinas *et al.*, 2006), reduz a expressão

de mRNA para 5TH1A no hipocampo de camundongos, sem afetar a neurogênese no giro denteado. Por outro lado, estudos sugerem que os inibidores seletivos da recaptção de serotonina aumentam os níveis de serotonina na fenda sináptica reduzindo a expressão do transportador de serotonina e dos auto-receptores 5TH1A no neurônio pré-sináptico do núcleo dorsal da raphe. A longo prazo, estimulam a neurogênese hipocampal. A ativação dos receptores 5HT1A pós sinápticos no giro denteado também estimula a neurogênese (Alenina e Klempin, 2014).

Podemos sugerir que a redução na expressão de mRNA nos animais submetidos à separação materna ou enriquecimento ambiental seja causada por diferentes motivos. Se os níveis de serotonina encontram-se reduzidos na separação materna (Lee *et al.*, 2007), bem como a expressão dos receptores 5HT1A (Maniam e Morris, 2010), o número de células positivas para 5TH1A (Li *et al.*, 2013) e a projeção serotoninérgica para o hipocampo (Sung *et al.*, 2010), poderia haver redução na projeção serotoninérgica nessa estrutura encefálica. Porém, no enriquecimento ambiental, se os níveis de serotonina encontram-se aumentados (Brenes *et al.*, 2009), mas a expressão de receptores 5HT1A é reduzida, o fenômeno pode ser devido a “dowregulation” dos receptores.

A expressão de mRNA para Nr3c1 também encontra-se reduzida no hipocampo de animais submetidos à separação materna (Francis *et al.*, 2002; Maniam e Morris, 2010; Own *et al.*, 2013). Neste trabalho observamos que a expressão de mRNA para o gene Nr3c1 na camada granular do giro denteado, que codifica receptores de glicocorticóides, também é reduzida nos animais submetidos a separação materna, mas o enriquecimento ambiental atenuou esse efeito. Maniam e Morris (2010) observaram que o exercício físico reverteu a redução na expressão de mRNA no hipocampo de animais submetidos previamente à separação materna.

Francis e colaboradores (2002) avaliaram respostas comportamentais ao estresse (teste de supressão de consumo alimentar induzido por novidade, aonde animais privados de alimento são expostos a um novo ambiente com ração disponível, e teste do campo aberto, utilizado para medir a exploração de animais em uma arena circular), níveis de corticosterona, expressão do fator de liberação de corticotrofina hipotalâmico e expressão de receptores para glicocorticóides no giro dentado, CA1 e CA3 do hipocampo de ratos Long-Evans, de 110 dias de idade, submetidos previamente à separação materna e ao enriquecimento ambiental (através da técnica de hibridização *in situ*). Aos 70 dias todos os animais foram submetidos a estresse de restrição. Os autores observaram que as respostas plasmáticas (maiores níveis de corticosterona) e comportamentais (redução na exploração no teste do campo aberto e maior latência no teste de supressão de consumo alimentar induzido por novidade) ao estresse foram maiores em animais submetidos à separação materna quando comparado a controles (os controles utilizados pelo estudo foram animais submetidos a períodos diários curtos de separação, de 15 minutos). No entanto, nos animais submetidos tanto à separação materna como ao enriquecimento ambiental essas diferenças foram eliminadas. Na expressão do fator de liberação de corticotrofina hipotalâmico e expressão de receptores glicocorticóides no hipocampo as diferenças entre os grupos separado e controle foram mantidas, mesmo nos animais submetidos ao enriquecimento ambiental. Parecem ocorrer efeitos benéficos comportamentais compensatórios provocados pelo enriquecimento ambiental, mas os efeitos da separação materna sobre os sistemas neurais parecem ser persistentes, já que não se observou reversão em relação aos níveis de expressão do fator de liberação de corticotrofina e de receptores glicocorticóides em regiões do sistema nervoso.

Em nosso estudo, analisamos a expressão de diferentes genes no giro denteado do hipocampo por qRT-PCR, em amostras restritas a neurônios da camada granular por microdissecção a laser. Nossos resultados são divergentes dos de Francis e colaboradores (2002). No presente estudo, o enriquecimento ambiental reverteu a redução na expressão de mRNA para Nr3c1. As diferenças observadas entre os estudos podem ser devidas a maior acurácia da técnica de qRT-PCR acoplada a microdissecção a laser, diferenças na idade de estagnação dos animais, nos controles utilizados, e na submissão dos animais a diferentes estressores.

Resultados divergentes podem originar-se de diferentes protocolos de separação materna e enriquecimento ambiental, como relatado. Alguns autores realizam separação única ao longo de um único dia pós-natal, outros realizam separações repetidas diariamente ou ocasionalmente, de 1 a 8 horas diárias, ao longo de diferentes fases do período pós-natal até o desmame (Lehmann e Feldon, 2000). Além disso, outros fatores como a separação de toda ninhada ou dos filhotes individualmente, o controle da temperatura durante o procedimento de separação materna, a frequência e a idade dos animais durante o procedimento e teste, assim como o próprio comportamento materno. O horário em que o procedimento é realizado também é importante. Separação dos filhotes no período diurno parece ter implicações mais drásticas nas respostas endócrinas do que separações no período noturno. Uma possível explicação é que o cuidado materno cai drasticamente no início do período noturno, aumentando com a chegada do dia, com um pico máximo de 3 a 6 horas (Grota e Ader, 1974).

Autores usam animais não manipulados ou manipulados por um período curto de tempo como controles experimentais (Lehmann e Feldon, 2000). No presente trabalho optamos por utilizar controles não manipulados. Animais submetidos ao

procedimento de manipulação neonatal podem apresentar efeitos endócrinos, comportamentais e morfológicos opostos aos animais submetidos à separação materna (Lehmann e Feldon, 2000). Sendo assim, utilizando-se como controle animais manipulados podem ser visualizadas diferenças significativas entre os grupos experimentais não simplesmente devidas ao procedimento de separação materna “*per se*” (Lehmann e Feldon, 2000). Outra questão a ser discutida é a redução da ninhada. No presente trabalho optamos por não reduzir as ninhadas dos grupos experimental e controle, mas equalizar, o máximo possível, as ninhadas quanto ao número de filhotes entre os diferentes grupos experimentais. Pequenas alterações entre as ninhadas, como o número de filhotes e a composição de machos e fêmeas, pode afetar o comportamento materno (Lehmann e Feldon, 2000). Em relação ao enriquecimento ambiental, diferentes gaiolas, brinquedos e tempo de permanência neste modelo tem sido utilizados.

Analizamos a neurogênese e plasticidade sináptica hipocampal, mas devemos salientar o papel das células gliais, principalmente astrócitos, na regulação do meio extracelular, bem como no processo de excitotoxicidade. Não foram observadas diferenças significativas em relação a imunoreatividade para a proteína GFAP entre os diversos grupos experimentais. Musholt e colaboradores (2008) observaram que a separação materna durante 1 ou 6 horas (filhotes alocados individualmente) no 14<sup>o</sup> dia pós-natal reduz a imunoreatividade para as proteínas GFAP e S100 $\beta$ , marcadoras de astrócitos, no córtex pré-central medial, quando os encéfalos foram analisados no 15<sup>o</sup> dia pós-natal. Não foram encontradas diferenças significativas quanto a imunoreatividade para as proteínas citadas na região CA1 do hipocampo. A redução de células gliais ou da interação neurônio-glia é uma das hipóteses associadas a desordens de humor (Mitterauer, 2004; Schroeter *et al.*, 2013).

Danils e colaboradores (2011) analisaram a expressão de proteínas citosólicas envolvidas em processos estruturais, estresse oxidativo, sobrevivência neuronal e plasticidade, apoptose, sinalização de cálcio e metabolismo de proteínas no hipocampo ventral de ratos Sprague-Dawley de 83 dias de idade, os quais foram submetidos à separação materna ao longo dos dias pós-natais 2 a 14, 3 horas por dia, das 09:00 às 12:00. Posteriormente, a partir do dia pós-natal 40, aos animais foram permitidos exercícios físicos voluntários por 6 semanas. A expressão da proteína alfa-enolase, relacionada a sobrevivência neuronal, estava reduzida nos animais submetidos à separação materna; mas nos que foram posteriormente submetidos ao exercício físico voluntário, os valores na expressão da proteína foram equivalentes aos valores controles. A proteína acidic (leuninerich) nuclear phosphoprotein 32 family member, a qual protege os neurônios da apoptose por inibir a caspase-3, estava aumentada nos animais submetidos à separação materna, com valores equivalentes aos controles nos animais também submetidos ao exercício físico voluntário. A proteína Hmgb1 (high mobility group lox 1), a qual é secretada por células dendríticas favorecendo o crescimento dos neuritos, tem expressão aumentada nos animais submetidos à separação materna, com valores equivalentes aos valores controles nos animais também submetidos ao exercício físico voluntário. Os autores discutem se o aumento dessa proteína nos animais submetidos à separação materna estaria relacionada a indução de plasticidade neuronal em resposta ao estresse. Sendo assim, mesmo sem efeito sobre a neurogênese ou expressão de mRNA, outras manipulações ambientais podem ter efeito sobre a separação materna em diferentes análises, por exemplo, influenciando a apoptose neuronal. Portanto, podemos hipotetizar que a separação materna, além de reduzir a neurogênese, cause aumento da morte celular. O



enriquecimento ambiental, o qual não afetou a neurogênese, poderia atuar reduzindo a apoptose.

Tamém podemos destacar que o peso dos animais controle e submetidos à separação materna foi equivalente até o desmame. Porém, os animais submetidos à separação materna e ao enriquecimento ambiental apresentaram menor peso que animais controle ou separados mantidos em caixa padrão. Marmental e colaboradores (2005) observaram, em relação a respostas comportamentais, que animais submetidos à separação materna apresentam maior atividade locomotora que os controles, o que justifica a perda de peso. Além disso, não foram observadas diferenças significativas quanto a glicemia dos animais.

Fóscolo e colaboradores (2008) não observaram diferenças significativas entre o peso de animais expostos ou não à separação materna no 3<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias pós-natais. No 34<sup>o</sup> e 45<sup>o</sup> dias pós-natais o peso dos animais submetidos à separação materna foi inferior aos controle. A glicemia basal nos ratos adultos foi similar nos grupos experimentais. Contudo, o estresse de exposição ao éter induziu menor elevação na glicemia dos animais submetidos à separação materna, já o estresse de restrição induziu elevação glicêmica similar nos grupos experimentais. Portanto, os níveis glicêmicos basais parecem ser similares, e os diferentes tipos de estresse podem estimular divergentes respostas neuroendócrinas ao estresse.

Marmental e colaboradores (2006) compararam ratos *Wistar* submetidos a 3 horas diárias de privação materna, durante os dias pós-natais 1 a 15, com animais controle. Os animais submetidos a privação materna foram isolados, podendo manter apenas contato acústico e olfativo com seus irmãos, mantidos a 30°C ou 22°C. Os controles foram manipulados diariamente durante 3 min pelo experimentador, a fim de minimizar o possível efeito da manipulação. Os animais foram mantidos, quando

possível, em 8 por ninhada. Não foram observadas diferenças significativas no peso dos animais, peso das glândulas adrenais, níveis de corticosterona e níveis de monoaminas (como dopamina, noradrenalina, serotonina, entre outras) entre os grupos. Os animais submetidos à privação materna apresentaram maior atividade locomotora e exploratória quando comparados aos controles, sendo o efeito mais evidente nos animais mantidos a 22°C. Sendo assim, a redução de peso nos animais submetidos a separação materna e enriquecimento ambiental poderia estar associada a alterações comportamentais.

Vivinetto e colaboradores (2013) analisaram diferentes comportamentos em animais submetidos à separação materna e mantidos em enriquecimento ambiental. No teste de esquia inibitória, que é um indicador de memórias aversivas, os ratos submetidos à separação materna apresentaram menor desempenho. No teste de reconhecimento de objetos, que representa memórias espaciais não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais. O enriquecimento do ambiente atenuou os prejuízos comportamentais observados nos animais submetidos à separação materna. A densidade de células positivas para os receptores de glicocorticóides não foi alterada pela separação materna, mas encontrou-se aumentada nos animais submetidos ao enriquecimento ambiental. O valor observado em animais submetidos a ambos os procedimentos foram similares aos controles.

Apesar do enriquecimento ambiental agir beneficemente na reversão de alterações comportamentais causadas pela separação materna, as alterações neurais causadas pelo estresse neonatal muitas vezes são permanentes, ou mais drásticas do que as promovidas pelo enriquecimento do ambiente. A separação materna reduziu a neurogênese hipocampal, bem como a expressão de mRNA para Nr3c1, Htr1a, e tendeu a reduzir a expressão de Bdnf. O enriquecimento ambiental não afetou a

diferenciação neuronal hipocampal, mas atenou a redução da sobrevivência celular e da expressão de mRNA para Nr3c1 nos animais submetidos à separação materna, bem como, “per se” reduziu a expressão de Htr1a. Além disso, aumentou a proporção de sinapses sobre espinhos dendríticos, sugerindo maior plasticidade sináptica.

Podemos concluir que o ambiente, seja através de eventos estressores ou estimulação por atividade física, interação social e oportunidades de aprendizado, afeta os sistemas neurais. As alterações neurais, induzidas pela separação materna são persistentes, mas podem ser parcialmente atenuadas pelo enriquecimento do ambiente. Tentar compreender como o ambiente afeta a neurobiologia do encéfalo é uma tarefa árdua, mas necessária para descobrir mecanismos ambientais e farmacológicos para reversão e/ou atenuação de eventos estressores nas fases iniciais do desenvolvimento, que na maior parte dos casos complica o desempenho na vida futura.

## 6. Conclusões gerais

Conclusões gerais:

O peso dos animais controle e dos submetidos a separação materna não apresentou diferenças significativas, antes da exposição dos animais ao ambiente enriquecido. Contudo, os animais submetidos à separação materna e mantidos em enriquecimento ambiental apresentam menor ganho de peso. Uma explicação plausível é que animais submetidos à separação materna apresentam hiperatividade locomotora e exploratória;

Não foram observadas diferenças na glicemia basal dos animais dos diferentes grupos experimentais. Hiperglicemia ou hipoglicemia podem ser induzidos por diferentes tipos de estresse;

A separação materna reduz o número de células BrdU positivas, BrdU/NeuN positivas, bem como a área imunopositiva para doublecortina. O enriquecimento ambiental atenua a redução da sobrevivência celular, produzida pela separação materna, mas não da diferenciação neuronal ou da área imunopositiva para doublecortina (que foi correlacionada com o número de células BrdU e BrdU/NeuN positivas). A separação materna pode induzir hiperatividade do eixo HPA, levando a redução na neurogênese hipocampal.

Não foram observadas diferenças na área imunopositiva para GFAP entre os diferentes grupos experimentais, contudo a análise do número de células GFAP positivas poderia gerar resultados mais consistentes a respeito da interferência das células gliais na manutenção da atividade neuronal frente aos protocolos experimentais estudados;

Não foram observadas diferenças do número de sinapses/ $\mu\text{m}^2$ , área pré-sináptica (área contendo vesículas sinápticas), proporção de contatos sinápticos simétricos ou assimétricos, nem porcentagem de botões axonais multisinápticos. Contudo, os animais mantidos em enriquecimento ambiental apresentaram aumento da proporção de sinapses sobre espinhos dendríticos em relação aos controle ou submetidos a ambos os procedimentos. Resultados similares foram observados para as sinapses assimétricas. Além disso, no grupo mantido em enriquecimento ambiental observaram-se sinapses simétricas sobre espinhos dendríticos. Estes resultados coincidem com indução de plasticidade pelo enriquecimento ambiental.

Houve redução da expressão de Nr3c1 mRNA e tendência à redução do Bdnf mRNA nos animais submetidos à separação materna em relação aos controles ou submetidos a ambos os procedimentos (separação materna e enriquecimento ambiental). A hiperatividade do eixo HPA induzida pela separação materna pode levar a *dowregulation* dos receptores de glicocorticoides e redução dos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo, o que pode estar associado à redução da neurogênese hipocampal nos animais submetidos à separação materna. O enriquecimento do ambiente reverte parcialmente esses efeitos .

Houve redução da expressão de Htr1a mRNA nos animais submetidos à separação materna, mantidos em enriquecimento ambiental ou submetidos a ambos os procedimentos, em relação aos controles. Esses efeitos, embora similares, podem ser causados por efeitos divergentes da separação materna e do enriquecimento ambiental em vias encefálicas.

Os efeitos do estresse pós-natal causados pela separação materna são persistentes, ou seja, são mantidos até a adolescência dos animais. Contudo, podem ser atenuados pelo enriquecimento do ambiente.

## 8. Referências Bibliográficas

Adams I and Jones DG. Quantitative ultrastructural changes in rat cortical synapses during early, mid and late adulthood. *Brain Research* 239: 349-363, 1982.

Aisa B, Tortera R, Lasheras B, Del Río J and Ramírez MJ. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience* 153: 1218-1226, 2008.

Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus*: 19(12): 1222-1231, 2009.

Akers KG, Martinez-Canabal A, Restivo L, Yiu AP, De Cristofaro A, Hsiang HL, Wheeler AL, Guskjolen A, Niibori Y, Shoji H, Ohira K, Richards BA, Miyakawa T, Josselyn SA, Frankland PW. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science* 344: 598-602, 2014.

Aksic M, Radonjic NV, Aleksic D, Jevtic G, Markovic B, Petronijevic N, Radonjic V, Filipovic B. Long-term effects of the maternal separation deprivation on the volume and number of neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Acta Neurobiol. Exp.* 73: 394-403, 2013.

Alenina N, Klempin F. The role of serotonin in adult hippocampal neurogenesis. *Behav. Brain Res.* S0166-4328(14)00487-2, 2014.

Altmann J and Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neur.* 124: 319-336, 1965.

Arellano JI, Benavides-Piccione R, Defelipe J, Yuste R. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci.* 1(1): 131-143, 2007.

Bennett EL, Rosenzweig MR, Diamond MC. Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. *Science* 163(3869): 825-826, 1969.

Bock J, Gruss M, Becker S and Braun K. Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: correlation with developmental time windows. *Cereb. Cortex* 15(6): 802-808, 2005.

Borges S, Gayer-Anderson C, Mondelli V. A systematic review of the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in first episode psychosis. *Psychoneuroendocrinology* 38: 603-611, 2013.

Banasr M, Duman RS. Regulation of neurogenesis and gliogenesis by stress and antidepressant treatment. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 6(5): 311-320, 2007.

Beauquis J, Roig P, De Nicola AF, Saravia F. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of Type 1 Diabetic mice. *PLoS One*, 2010.

Bravo JA, Dinan TG, Cryan JF. Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT1A receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7:24, 2014.

Brenes JC, Fornaguera J. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. *Behav Brain Res.* 198(1): 199-205, 2009.

Brezun LM, Daszuta A. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89: 999-1002, 1999.

Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *European Journal of Neuroscience* 17: 2042-2046, 2003.

Brown PJ, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology* 476: 1-10, 2003.

Brusco J, Merlo S, Ikeda ÉT, Petralia RS, Kachar B, Rasia-Filho AA, Moreira JE. Inhibitory and multisynaptic spines, and hemispherical synaptic specialization in the posterodorsal medial amygdala of male and female rats. *The Journal of Comparative Neurology* 522(9): 2075-2088, 2014.

Brusco J, Dall'Oglio A, Rocha LB, Rossi MA, Moreira JE, Rasia-Filho AA. Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala. *Neuroscience Letters* 483(2):152-156, 2010.

Brusco J, Wittmann R, de Azevedo MS, Lucion AB, Franci CR, Giovenardi M, Rasia-Filho AA. Plasma hormonal profiles and dendritic spine density and morphology in the hippocampal CA1 stratum radiatum, evidenced by light microscopy, of virgin and postpartum female rats. *Neurosci Lett.* 438(3): 346-350, 2008.

Buck SB, Bradford J, Gee KR, Agnew BJ, Clarke ST, Salic A. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques* 44(7): 927-929, 2008.

Burbach GJ, Dehn D, Nagel B, Turco DD, Deller T. Quantification of layer-specific gene expression in the hippocampus: effective use of laser microdissection in combination with quantitative RT-PCR. *Journal of Neuroscience Methods* 131: 83-91, 2003.

Burbach GJ, Dehn D, Nagel B, Turco DD, Deller T. Laser microdissection of immunolabeled astrocytes allows quantification of astrocytic gene expression. *Journal of Neuroscience Methods* 138: 141-148, 2004.

Caceres A, Payne MR, Binder LI, Steward O. Immunocytochemical localization of actin and microtubule-associated protein MAP2 in dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 80: 1738-1742, 1983.

Cameron HA and Gould E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61: 2003-209, 1994.

Carughi A, Carpenter KJ, Diamond MC. Effect of environmental enrichment during nutritional rehabilitation on body growth, blood parameters and cerebral cortical development of rats. *J. Nutr.* 119(2): 2005-2016, 1989.

Cavanagh BL, Walker T, Norazit A, Meedeniya ACB. Thymine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules* 16: 7980-7993, 2011.

Chen Q, Zhou Z, Zhang L, Wang Y, Zhang YW, Zhong M, Xu SC, Chen CH, Li L, Yu ZP. Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochemistry International* 60(3): 233-242, 2012.

Chourbaji S and Gass P. Glucocorticoid receptor transgenic mice as models for depression. *Brain Research Reviews* 57: 554-560, 2008.

Cooke BM, Woolley CS. Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *The Journal of Neuroscience* 25(46): 10759-10767, 2005.

Dall'oglio A, Gehlen G, Achaval M, Rasia-Filho AA. Dendritic branching features of posterodorsal medial amygdala neurons of adult male and female rats: further data based on the Golgi method. *Neurosci. Lett.* 430(2): 151-156, 2008.

Daniels WM, Marais L, Stein DJ, Russell VA. Exercise normalizes altered expression of proteins in the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation. *Exp. Physiol.* 92(2): 239-247, 2011.

Daniels WM, Pietersen CY, Carstens ME, Stein DJ. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab. Brain. Dis.* 19(1-2): 3-14, 2004.

Deuel TAS, Liu JS, Corbo JC, Yoo S-Y, Rorke-Adams LB, Walsh CA. Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron* 49: 41-53, 2006.

Diamond MC. Response of the brain to enrichment. *An Acad Bras Cienc.* 73(2): 211-220, 2001.



Diamond MC, Johson RE, Young D, Singh SS. Age-related morphologic differences in the rat cerebral cortex and hippocampus: male-female; right-left. *Exp. Neurol.* 81(1): 1-13, 1983.

Diamond MC, Greer ER, York A, Lewis D, Barton T, Lin J. Rat cortical morphology following crowded-enriched living conditions. *Exp Neurol.* 96(2): 241-247, 1987.

Diamond MC, Johnson RE, Protti AM, Ott C, Kajisa L. Plasticity in the 904-day-old male rat cerebral cortex. *Exp Neurol.* 87(2): 309-317, 1985.

Diamond MC, Murphy GM Jr, Akiyama K, Johson RE. Morphologic hippocampal asymmetry in male and female rats. *Exp. Neurol.* 76(3): 553-565, 1982.

Diamond MC, Ingham CA, Johnson RE, Bennett EL, Rosenzweig MR. Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus. *J Neurobiol.* 7(1): 75-85, 1976.

Diamond MC, Lindner B, Johson R, Bennett EL, Rosenzweig MR. Differences in occipital cortical synapses from environmental enriched, impoverished, and standard colony rats. *J. Neurosci. Res.* 1(2): 109-119, 1975.

Diamond MC, Law F, Rhodes H, Lindner B, Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL. Increases in cortical depth and glial numbers in rats subjected to enriched environment. *Journal of Comparative Neurology* 128(1): 117-125, 1966.

Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR. The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology* 123(1): 111-119, 1964.

Dimatelis JJ, Russell VA, Stein DJ, Daniels WM. Methamphetamine reversed maternal separation-induced decrease in nerve growth factor in the ventral hippocampus. *Metab. Brain. Dis.* 29(2): 433-439, 2014.

Dityatev A, Rusakov, DA. Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Current Opinion in Neurobiology* 21: 353-359, 2011.

Dorfman D, Aranda ML, Fleitas MFG, Chianelli MS, Fernandez DC, Sande PH, Rosenstein RE. Environmental enrichment protects the retina from early diabetic damage in adult rats. *PLoS One*, 2014.

Duman RS, Malberg J and Nakagawa S. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299: 401-407, 2001.

Eiland L, Romeo RD. Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience* 249: 162-171, 2013.

El Khoury A, Gruber SH, Mørk A, Mathé AA. Adult life behavioral consequences of early materna separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 535-540, 2006.

Ellenbroek, B.A., Cools, A.R Early materna deprivation and prepulse inhibition: the role of the postdeprivation environment. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 7: 177–184, 2002.

Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *PNAS* 103(21): 8233-8238, 2006.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn, AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 4: 1313-1317, 1998.

Ernst C1, Olson AK, Pinel JP, Lam RW, Christie BR. Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis? *J Psychiatry Neurosci.* 31(2): 84-92, 2006.

Fabricius K, Wörtwein G, Pakkenberg B. The impact of materna separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus. *Brain Struct Funct.* 212(5): 403-416, 2008.

Faturi CB, Tiba PA, Kawakami SE, Catallani B, Kerstens M and Suchecki D. Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 34: 821-834, 2010.

Feng Y, Walsh CA. Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2(6): 408-416, 2001.

Fóscolo DRC, Fóscolo RB, Marubayashi U, Reis AM, Coimbra CC. Neonatal materna separation affects endocrine and metabolic stress responses to ether exposure but not to restraint exposure in adult rats. *Metab. Brain Dis.* 23: 375-385, 2008.

Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ. Environmental enrichment reverses the effects of materna separation on stress reactivity. *The Journal of Neuroscience* 22(18): 7840-7843, 2002.

Franklin TB, Linder N, Russig H, Thony B, Mansuy IM. Influence of early stress on social abilities and serotonergic functions across generations in mice. *PLoS One*, 2011.

Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J, Francis F. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cerebral Cortex* 13: 620-626, 2003.

Giulian D, McEwen BS and Pohorecky LA. Altered development of the rat brain serotonergic system after disruptive neonatal experience. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 4106-4110, 1974.

Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23(2): 257-271, 1999.

Goldman SA. Adult neurogenesis: from canaries to the clinic. *J. Neurobiol.* 36(2): 267-286, 1998.

Gos T, Bock J, Poeggel G, Braun K. Stress-induced synaptic changes in the rat anterior cingulate cortex are dependent on endocrine developmental time windows. *Synapse* 62(3): 229-32, 2008.

Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10910-10917, 2001.

Gould E, Tanapat P, Rydel T and Hastings N. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol. Psychiatry* 48: 715-720, 2000.

Gould E. Serotonin and Hippocampal Neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 21(2 Suppl): 46S-51S, 1999.

Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience* 2: 260-265, 1999.

Gould E, Tanapat P. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 46(11): 1472-1479, 1999.

Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Nat. Neurosci.* 2(3): 260-265, 1999.

Gould E and Tanapat P. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80: 427-436, 1997.

Gould E, McEwen BS. Neuronal birth and death. *Current Opinion in Neurobiology*; 3(5): 676-682, 1993.

Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS and McEwen BS. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience* 12: 3642-3650, 1992.

Gould E, Woolley CS and McEwen BS. Naturally occurring cell death in the developing dentate gyrus of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 304: 408-418, 1991.

Gray JD, Milner TA, McEwen BS. Dynamic plasticity: the role of glucocorticoids, brain-derived neurotrophic factor and other trophic factors. *Neuroscience* 239: 214-227, 2013.

Gray EG. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscopy study. *Journal of Anatomy*, 93: 420-433, 1959a.

Gray EG. Electron microscopy of synaptic contacts on dendritic spines of the cerebral cortex. *Nature*, 183: 1592-1593, 1959b.

Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience* 1: 67-73, 2000.

Grota LJ, Ader R. Behavior of lactating rats in a dual-chambered maternity cage. *Horm Behav.* 5(4): 275-82, 1974.

Harris KM, Jensen FE, Tsao B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience* 12(7): 2685-2705, 1992.

Hosseiny S, Pietri M, Petit-Paitel A, Zarif H, Heurteaux C, Chabry J, Guyon A. Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development. *Brain Struct. Funct.*, 2014.

Hattori S, Hashimoto R, Miyakawa T, Yamanaka H, Maeno H, Wada K, Kunugi H. Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. *Behav. Brain. Res.* 180: 69-76, 2007.

Holtzman CW, Trotman HD, Goulding SM, Ryan AT, Macdonald AN, Shapiro DI, Brasfield JL, Walker EF. *Neuroscience* 249: 172-191, 2013.

Hotulainen P, Hoogenraad CC. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol* 189: 619-629, 2010.

Husum, H., Termeer, E., Mathe, A.A., Bolwig, T.G., Ellenbroek, B.A. Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats. *Neuropharmacology* 42: 798-806, 2002.

Jacobs BL, van Praag H, Gage FH. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Molecular* 5: 262-269, 2000.

Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 73: 131-140, 2002.

Kaplan MS and Bell DH. Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent: radioautographic study of granule cells in the hippocampus. *Exp. Brain. Res.* 52: 1-5, 1983.

Kaplan MS and Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197: 1092-1096, 1977.

Kappeler L and Meaney, MJ. Epigenetics and parental effects. *Bicessays* 32: 818-827, 2010.

Kempermann G. *Adult Neurogenesis 2*. Oxford University Press, 2 ed., 2011.

Kempermann G, Kuhn H, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493-495, 1997.

Kempermann G, Kuhn HG and Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience* 18: 3206-3212, 1998.

Klein ZA, Romeo RD. Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal stress responsiveness before and after puberty in rats. *Hormones and Behavior* 64: 357-363, 2013.

Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron* 34: 265-273, 2002.

Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K. Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nature Neuroscience* 9: 1117-1124; 2006.

Koch C, Zador A, Brown TH. Dendritic spines: convergence of theory and experiment. *Science* 256(5059): 973-974, 1992.

Koizumi H, Tanaka T, Gleeson JG. *doublecortin-like kinase* functions with *doublecortin* to mediate fiber tract decussation and neuronal migration. *Neuron* 49: 55-66, 2006.

Kolb B, Gorry G, Li Y, Samaha AN and Robinson TE. Amphetamine or cocaine limits the ability of later experience to promote structural plasticity in the neocortex and nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(18):10523-10528, 2003.

Kozorovitskiy Y, Gross CG, Kopil C, Battaglia L, Mcbreen M, Stranahan AM, Gould E. Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17478-17482, 2005.

Kosten TA, Karanian DA, Yeh J, Haile CN, Kim JJ, Kehoe P and Bahr BA. Memory impairments and hippocampal modifications in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Neurobiology of Learning and Memory* 88: 167-176, 2007.

Kosten TA, Lee HJ, Kim JJ. Early life stress impairs fear conditioning in adult male and female rats. *Brain Res.* 1087: 142-150, 2006.

Kubota Y, Hatada S, Kondo S, Karube F, Kawaguchi Y. Neocortical inhibitory terminals innervate dendritic spines targeted by thalamocortical afferents. *The Journal of Neuroscience*; 27 (5): 1139-1150, 2007.

Kuhn CM, Schamberg SM. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *Int. J. Devl. Neuroscience* 16: 261-270, 1998.

Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res.* 122: 81-103, 2000.

Lajud N, Roque A, Cajero M, Gutiérrez-Ospina G, Torner L. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology* 37: 410-420, 2012.

Landers MS, Knott GW, Lipp HP, Poletaeva I, Welker E. Synapse formation in adult barrel cortex following naturalistic environmental enrichment. *Neuroscience* 199: 143-152, 2011.

Landis DM, Reese TS. Differences in membrane structure between excitatory and inhibitory synapses in the cerebellar cortex. *The Journal Comparative of Neurology* 155(1): 93-125, 1974.

Landis DM, Reese TS, Raviola E. Differences in membrane structure between excitatory and inhibitory components of the reciprocal synapse in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 155(1): 67-91, 1974.

Larsson F, Winblad B, Mohammed A H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 73: 193-207, 2002.

Lee J-H, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim B-T, Kang D-W, Jahng JW. Depressive behaviours and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuroscience Research* 58: 32-39, 2007.

Lee MHS and Williams DI. Changes in licking behaviour of rat mother following handling of young. *Anim. Behav.* 22: 679-681, 1974.

Leger M, Paizanis E, Dzahini K, Quiedeville A, Bouet V, Cassel JC, Freret T, Schumann-Bard P, Boulouard M. Enriched environment duration differentially affects behavior and neuroplasticity in adult mice. *Cereb. Cortex.*, 2014.

Lehmann J, Feldon J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Reviews in the Neuroscience* 11: 383-408, 2000.

Lehmann J, Pryce CR, Bettschen D and Feldon J. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 64(4): 705-715, 1999.

Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 59(9): 786-792, 2006.

Leonard BE. The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. *European Psychiatry* 20: 302-306, 2005.

Lesemann A, Reinel C, Hühnchen P, Pilhatsch M, Hellweg R, Klaissle P, Winter C, Steiner B. MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain Research* 1457: 51-69, 2012.

Levine S. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *European Journal of Pharmacology* 405: 149-160, 2000.

Li M, Xue X, Shao S, Shao F, Wang W. Cognitive, emotional and neurochemical effects of repeated maternal separation in adolescent rats. *Brain Research* 1518: 82-90, 2013.

Lightman SL. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *Journal of Endocrinology* 20: 880-884, 2008.

Lin H, Huganir R, Liao D. Temporal dynamics of NMDA receptor-induced changes in spine morphology and AMPA receptor recruitment to spines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316: 501-511, 2004.

Liu D, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM and Meaney MJ. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277: 1659-1662, 1997.

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 179-193, 2006.

Llorens-Martín, MV, Rueda N, Martínez-Cué C, Alemán T, Flórez J and Trejo JL. Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. *Neuroscience* 147: 631-638, 2007.

Loi M, Koricka S, Lucassen PJ, Joels M. Age- and sex-dependent effects of early life stress on hippocampal neurogenesis. *Front. Endocrinol (Lausanne)* 5: 1-11, 2014.

London M, Hausser M. Dendritic computation. *Annu. Rev. Neurosci.* 28: 503-532, 2005.

Madhyastha S, Sekhar S, Rao G. Resveratrol improves postnatal hippocampal neurogenesis and brain derived neurotrophic factor in prenatally stressed rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 31(7): 580-585, 2013.

Marmental M, Eriksson CJP, Fahlke C. Early deprivation increases exploration and locomotion in adult male Wistar offspring. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 85: 535-544, 2006.

Macrí, S., Laviola, G. Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: interaction with cannabinoid exposure during adolescence. *Behav. Brain Res.* 154: 231–238, 2004.

Malberg JE. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *Rev. Psychiatr. Neurosci.* 29: 196-205, 2004.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler, EJ and Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 20: 9104-9119, 2000.

Maniam J, Morris MJ. Voluntary exercise and portable high-fat diet both improve behavioural profile and stress responses in male rats exposed to early life stress: role of hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* 35(10): 1553 – 1564, 2010.

Marcos S, Aisa B and Ramírez MJ. Functional interaction between 5-HT<sub>6</sub> receptors and hypothalamic-pituitary-adrenal axis: cognitive implications. *Neuropharmacology* 54: 708-714, 2007.

Matus A. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 290(5492): 754-758, 2000.

Matus A. Growth of dendritic spines: a continuing story. *Curr Opin Neurobiol.* 15(1): 67-72, 2005.

McEwen BS. Early life influences on life-long patterns of behavior and health. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 9: 149-154, 2003.

Ming G and Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 28: 223-250, 2005.

Mirescu C, Peters JD and Gould E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nature Neuroscience* 7: 841-846, 2004.

Mitterauer B. Imbalance of glia-neuronal interactions in synapses: a possible mechanism of the pathophysiology of bipolar disorder. *Neuroscientist* 10(3): 199-206, 2004.

Mongiat LA, Schinder AF. A price to pay for adult neurogenesis. *Science* 344: 594-595, 2014.



Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Aurousseau C, Moal M Le, Piazza PV and Abrous DN. Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiology of Aging* 27: 645-654, 2006.

Monteiro BM, Moreira FA, Massensini AR, Moraes MF, Pereira GS. Enriched environment increases neurogenesis and improved social memory persistence in socially isolated adult mice. *Hippocampus* 24(2): 239-248, 2014.

Moreira JE, Dodane V, Reese TS. Immunoelectronmicroscopy of soluble proteins and membrane proteins with a sensitive post embedding method. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 847-854, 1998.

Moreira JE, Reese TS, Kachar B. Free-substitution as a preparative technique for immunoelectronmicroscopy: evaluation by atomic force microscopy. *Microscopy Res. Tech.* 33: 251-261, 1996.

Musholt K, Cirillo G, Cavaliere C, Rosaria Bianco M, Bock J, Helmeke C, Braun K, Papa M. Neonatal separation stress reduces glial fibrillary acidic protein- and S100beta-immunoreactive astrocytes in the rat medial precentral cortex. *Developmental Neurobiology* 69(4): 203-211, 2009.

Námestková K, Simonová Z and Syková E. Decreased proliferation in the adult rat hippocampus after exposure to the Morris water maze and its reversal by fluoxetine. *Behavioural Brain Research* 163: 26-32, 2005.

Newport J, Stowe ZN and Nemeroff CB. Parental depression: animal models of an adverse life event. *Am. J. Psychiatry* 159(8): 1265-1283, 2002.

Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 313-353, 2002.

Nithianantharajah J, Levis H, Murphy M. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiology of Learning and Memory* 81: 200–210, 2004.

Nowakowski RS, Lewin SB and Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cycle and the DNA synthetic phase for an anatomically defined population. *Journal of Neurocytology* 18: 311-318, 1989.

Ohta K, Miki T, Warita K, Suzuki S, Kusaka T, Yakura T, Liu JQ, Tamai M, Takeuchi Y. Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development. *Int J Dev Neurosci.* 33: 15-21, 2014.

Oomen CA, Girardi CE, Cahyadi R, Verbeek EC, Krugers H, Joels M, Lucassen PJ. Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. *PLoS One*, 2009.

Oreland S, Nylander I, Pickering C. Prolonged maternal separation decreases granule cells number in the dentate gyrus of 3-week-old male rats. *Int J Dev Neurosci*; 28(2): 139-144, 2010

Own LS, Iqbal R, Patel PD. Maternal separation alters serotonergic and HPA axis gene expression independent of separation duration in mice. *Brain Res*. 1515: 29-38, 2013.

Paolone N, Manohar S, Hayes SH, Wong KM, Salvi RJ, Baizer JS. Dissociation of doublecortin expression and neurogenesis in unipolar brush cells in the vestibulocerebellum and dorsal cochlear nucleus of the adult rat. *Neuroscience* 265: 323-331, 2014.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press, 1998.

Park Y, Kim K-T. Short-term plasticity of small synaptic vesicle (SSV) and large dense-core vesicle (LDCV) exocytosis. *Cellular Signalling* 21: 1465-1470, 2009.

Paus T. How environment and genes shape the adolescent brain. *Hormones and Behavior* 64: 195-202, 2013.

Peters A. Golgi, Cajal, and the fine structure of the nervous system. *Brain Res. Rev.* 55(2): 256-263, 2007.

Peters A, Kaiserman-Abramof. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* 127: 321-356, 1970.

Piazza FV, Pinto GV, Trott G, Marcuzzo S, Gomez R, Fernandes MC. Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behavioural Brain Research* 217: 16-20, 2011.

Piazza FV, Segabinazi E, Centenaro LA, do Nascimento PS, Achaval M, Marcuzzo S. Enriched environment induces beneficial effects on memory deficits and microglial activation in the hippocampus of type 1 diabetic rats. *Metab Brain Dis.* 29(1): 93-104, 2014.

Platholi J, Herold KF, Hemmings HC Jr, Halpain S. Isoflurane reversibly destabilizes hippocampal dendritic spines by an actin-dependent mechanism. *PLoS One*, 2014.

Plumpe T, Ehninger D, Steiner B, Klemoin F, Jessberger S, Brandt M, Romer B, Rodrigues GR, Kronenberg G, Kempermann G. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neuroscience* 7(77): 1-14, 2006.

Popov VI, Stewart MG. Complexity of contacts between synaptic boutons and dendritic spines in adult rat hippocampus: three-dimensional reconstructions from serial ultrathin sections in vivo. *Synapse* 63: 369-377, 2009.

Raceková E, Lievajová K, Danko J, Martoncíková M, Flesárová S, Almasiová V, Orendáčová J. Maternal separation induced alterations of neurogenesis in the rat rostral migratory stream. *Cell Mol Neurobiol.* 29(6-7): 811-819, 2009.

Ramón y Cajal, S. *Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del Sistema Nervioso.* 2 vols. Moya: Madrid, 1913, 1914.

Rao MS, Shetty AK. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience* 19: 234-246, 2004.

Rasia-Filho AA, Brusco J, Rocha L, Moreira JE. Dendritic spines observed by extracellular DiI dye and immunolabeling under confocal microscopy. *Nature Protocols Exchange*, doi:10.1038/nprot.2010.153, 2010.

Rasia-Filho AA, Dalpian F, Menezes IC, Brusco J, Moreira JE, Cohen RS. Dendritic spines of the medial amygdala: plasticity, density, shape, and subcellular modulation by sex steroids. *Histol. Histop.*, 2012.

Rasia-Filho AA, Fabian C, Rigoti KM, Achaval M. Influence of Sex, estrous cycles and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the golgi method. *Neuroscience* 126: 839-847, 2004.

Ridder s, chourbaji S, Hellweg R, Urani A, Zacher C, Schmid W, Zink M, Hortnagl H, Flor H, Henn FA, Schutz G, Gass P. Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *The Journal of Neuroscience* 25(26): 6243-6250, 2005.

Romeo RD. Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31: 232-240, 2010.

Romeo RD, McEwen BS. Stress and the adolescent brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1094: 202-214, 2006.

Rosenzweig S e Wojtowicz JM. Analyzing dendritic growth in a population of immature neurons in the adult dentate gyrus using laminar quantification of disjointed dendrites. *Frontiers in Neuroscience* doi: 10.3389/fnins.2011.00034, 2011.

Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 57: 925-935, 2000.

Ruedi-Bettschen D, Feldon J, Pryce CR. Circadian- and temperature-specific effects of early deprivation on rat maternal care and pup development: short-term markers for long-term effects? *Dev. Psychobiol.* 45(2): 59-71, 2004.

Sapolsky RM, Krey LC and McEwen BS. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6174-6177, 1984.

Schroeter ML, Sacher J, Steiner J, Schoenknecht P, Mueller K. Serum S100B represents a new biomarker for mood disorders. *Curr. Drug Targets* 14(11): 1237-1248, 2013.

Segovia G, Del Arco A, Garrido P, de Blas M and Mora F. Environmental enrichment reduces the response to stress of the cholinergic system in the prefrontal cortex during aging. *Neurochemistry International* 52: 1198-1203, 2008.

Seidel K, Helmeke C, Poeggel G and Braun K. Repeated neonatal separation stress alters the composition of neurochemically characterized interneuron subpopulations in the rodent dentate gyrus and basolateral amygdala. *Develop. Neurobiol.* 68: 1137-1152, 2008.

Selemon LD, Goldman-Rakic PS. The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 45: 17-25, 1999.

Sengupta P. A scientific review of age determination for a laboratory rat: how old is it in comparison with human age? *Biomedicine International* 2: 81-89, 2011.

Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med.* 4(6): 624-630, 2013.

Sifonios L, Trincherro M, Cereseto M, Ferrero A, Cladouchos ML, Macedo GF, Reinés A and Wikinski S. Na enriched environment restores normal behavior while providing cytoskeletal restoration and synaptic changes in the hippocampus of rats exposed to an experimental model of depression. *Neuroscience* 164: 929-940, 2009.

Song H, Kempermann G, Wadiche LO, Zhao C, Schinder AF, Bischofberger J. New neurons in the adult mammalian brain: synaptogenesis and functional integration. *The Journal of Neuroscience* 25(45): 10366-10368, 2005.

Stanfield BB and Trice JE. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp. Brain. Res.* 72: 399-406, 1988.

Sung YE, Shin MS, Cho S, Baik HH, Jin BK, Chang HK, Lee EK and Kim CJ. Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus. *Neuroscience letters* 470: 86-90, 2010.

Suri D, Vaidya VA. Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. *Neuroscience* 239: 196-213, 2013.

Suri D, Veenit V, Sarkar A, Thiagarajan D, Kumar A, Nestler EJ, Galande S, Vaidya VA. Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition. *Biol Psychiatry* 73(7): 658-666, 2013.

Tafet, G.E., Idoyaga-Vargas, V.P., Abulafia, D.P., Calandria, J.M., Roffman, S.S., Chiovetta, A. and Shinitzky, M. Correlation between cortisol level and serotonin uptake in patients with chronic stress and depression. *Cognitive, Affective and Behavioural Neuroscience* 1(4), 388-393, 2001.

Tang X, Falls DL, Li X, Lane T, Luskin MB. Antigen-retrieval procedure for bromo deoxyuridine immunolabeling with concurrent labeling of nuclear DNA and antigens damaged by HCl pretreatment. *J. Neurosci.* 27(22): 5837-5844, 2007.

Tanokashira D, Morita T, Hayashi K, Mayanagi T, Fukumoto K, Kubota Y, Yamashita T, Sobue K. Glucocorticoid suppresses dendritic spine development mediated by down-regulation of caldesmon expression. *The Journal of Neuroscience* 32:14583–14591, 2012.

Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews* 53: 198-214, 2007.

van Praag H, Kempermann G and Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience* 2: 266-279, 1999.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci.* 1(3): 191-198, 2000.

van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415: 1030-1034, 2002.

Vivar C, van Praag H. Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Front. Neural Circuits* 7:15, doi: 10.3389/fncir.2013.00015, 2013.

Vivinetto AL, Suárez MM, Rivarola MA. Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behav Brain Res.* 240:110-118, 2013.

von Bohlen und Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 329(3): 409-420, 2007.

Uchizono K. Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature*, 207: 642-643, 1965.

Ueda S, Sakakibara S and Yoshimoto K. Effect of long-lasting serotonin depletion on environmental enrichment-induced neurogenesis in adult rat hippocampus and spacial learning. *Neuroscience* 135, 395-402, 2005.

Xu X, Ye L and Ruan Q. Environmental enrichment induces synaptic structural modification after transient focal cerebral ischemia in rats. *Exp. Biol. Med.* 234: 296-305, 2009.

Zeng C, Pan F, Jones LA, Lim MM, Griffin EA, Sheline YI, Mintum MA, Holtzman DM, March RH. Evaluation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine staining as a sensitive method for studying cell proliferation in the adult nervous system. *Brain Res.* 1319: 21-32, 2010.

Williamson TP, Johnson DA, Johnson JA. Activation of the Nrf2-ARE pathway by siRNA knockdown of Keap1 reduces oxidative stress and provides partial protection from MPTP-mediated neurotoxicity. *Neurotoxicology* 33: 272–279, 2012.

Winkelmann-Duarte EC, Padilha-Hoffmann CB, Martins DF, Schuh AF, Fernandes MC, Santin R, Merlo S, Sanvitto GL, Lucion AB. Early-life environmental intervention may increase the number of neurons, astrocytes, and cellular proliferation in the hippocampus of rats. *Exp Brain Res.* 215(2): 163-172, 2011.

Yau JL, Seckl JR. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I in the brain; thickening the glucocorticoid soup. *Mol. Psychiatry* 6(6): 611-614, 2001.

## 9. Anexos

### 9.1. Comissão de ética em experimentação animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 114/2010, sobre o projeto intitulado “*Estudo da neurogênese e da plasticidade sináptica em ratos submetidos à separação materna e ao ambiente enriquecido*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Jorge Eduardo Moreira** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 26 de julho de 2010.

(We certify that the protocol nº 114/2010, about “*Study of neurogenesis and synaptic plasticity in rats subjected to maternal separation and enriched environment*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 07/26/2010.

Ribeirão Preto, 26 de julho de 2010.

**Prof. Dr. Márcio Dantas**  
Presidente da Comissão de Ética em  
Experimentação Animal

**10. Artigo científico****Title:**

**Hippocampus of adolescent rats in maternal separation differs  
when exposed to enriched environment**

**Abbreviated title: Effects of MS and EE on the hippocampus of adolescent rats.**

Authors: Suélen Merlo<sup>1,2\*</sup>, José Inácio Lemos<sup>3\*</sup>, Carol Kobori da Fonseca<sup>1</sup>, Ana Beatriz Souza Nakayama<sup>1,2</sup>, Jorge Eduardo Moreira<sup>1,2\*</sup>.

- 1- Laboratory of Synaptic Structure, Department of Cellular Biology and Patogenic Bioagents, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo, Brazil.
- 2- Neuroscience Graduate Program, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo, Brazil.
- 3- Laboratory of Biochemistry, Physiology and Pharmacology, Veterinary Medical School, Federal University of Para, Brazil.

\*Corresponding authors:

Jorge Eduardo Moreira: Mail Adress: cello@fmrp.usp.br



### Abstract

Stressful events during childhood promotes persistent behavioral and brain changes, increasing the predisposition to psychiatric disorders. The maternal separation has been used as a postnatal stress model. Animals subjected to maternal separation exhibit an exaggerated response of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to stress. Instead, studies suggest that environmental enrichment, by increasing neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus, has beneficial effects on behavioral disorders. In this work, we try to find out whether the environmental enrichment interferes with plastic changes promoted by maternal separation in the hippocampus of adolescent rats. We used immunofluorescence, confocal, single and multiphoton microscopy, electron microscopy, and qRT-PCR of restricted areas of the granulos layer obtained with a laser microdissection system. The maternal separation reduced hippocampal neurogenesis, as well as the expression of *Nr3c1* and *Htr1a* mRNA. Environmental enrichment did not affect hippocampal neurogenesis, but reduced the expression of *Htr1a*. Furthermore, increases in the proportion of synapses on dendritic spines, suggest greater synaptic plasticity. The environment enrichment of animals subjected to maternal separation reversed the reduction of the *Nr3c1* expression. Despite the environmental enrichment reverse changes caused by maternal separation, many of the neural changes are permanent.

**Keywords:** maternal separation, environmental enrichment, neurogenesis, synaptic plasticity.

## 1. Introduction

In 1874, Charles Darwin proposed that the wild animals had larger brain volume than the domestic ones, because of their different environmental experiences. In the 1960's, two groups of researchers (Bennett, Diamond, Krech and Rosenzweig, and Hubel and Wisel) confirmed that experience can modify the morphology of the brain (Diamond, 2001).

Several brain structures may be modified by environmental factors, among which stands out the hippocampal formation (Gould and Tanapat, 1997, Eriksson *et al.*, 1998), a brain site where occurs neurogenesis, even in adult animals (Gould, 1999; Tanapat and Gould, 1999; Jacobs *et al.*, 2000; Duman *et al.*, 2001; McEwen, 2001; Jacobs, 2002; Zaben and Gray, 2013; Loi *et al.*, 2014).

Among the many functions of the hippocampus, the inhibitory effect on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis should be highlighted. The activation of glucocorticoid receptors (GR) in the hippocampus inhibits sustained release of glucocorticoids through the reduction of hypothalamic activity (Leonard, 2005; Kappeler and Meaney, 2010). Stressful events cause sustained corticosterone release (Sapolsky *et al.*, 1984). The neuronal loss and GR reduction in the hippocampus promote hyperactivity of the HPA axis (Sapolsky *et al.*, 1984).

The stressful maternal separation (MS) stress promotes behavioral changes that may be consequence, at least in part, of impaired hippocampal function (Hays *et al.*, 2012; Hulshof *et al.*, 2011; Piubelli *et al.*, 2011; Lajud *et al.*, 2012; Suri *et al.*, 2013; Loi *et al.*, 2014) and hyperactivity of the HPA axis (Meaney *et al.*, 1996; Nishi *et al.*, 2013; 2014). It is well known that dysfunction of the serotonin 1A receptor (5-HT<sub>1A</sub>) may play a role in the genesis of major depressive disorders (Savitz *et al.*,

2009). In contrast, it has been suggested that environmental enrichment (EE), by increasing proliferation, survival and differentiation of newborn neurons in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus, may have beneficial effect on behavioral disorders (Hattori et al., 2007; Llorens-Martín et al, 2007).

The DG has also a high density of the serotonin 5HT1A receptors and receives serotonergic innervation from the medial raphe nucleus located in the brainstem (Gould, 1999). Neurotoxin injury in the raphe nuclei reduces the number of BrdU positive cells in the granular layer of the hippocampus (Brezun and Daszuta, 1999), suggesting that 5-HT regulates the proliferation of granule neurons in the hippocampus of adult rats. Moreover, it has been reported that 5-HT-1A activation increases hippocampal neurogenesis (Gould 1999; Banasr *et al.*, 2004; Alenina and Klempin, 2014).

The concentrations of serotonin and BDNF, both regulated by glucocorticoids (Schaaf *et al.*, 2000; Tafet *et al.*, 2001), interfere with neural plasticity and hippocampal neurogenesis. It may be hypothesized that different types of stress increase corticosterone levels by promoting reduction of hippocampal neurogenesis and plasticity due, at least in part, to the downregulation of BDNF and glucocorticoid and 5-HT1A receptors in the hippocampus (Gray *et al.*, 2013; Suri and Vaidya, 2013; Tafet *et al.*, 2001). Thus, the expression of mRNA for *Nr3c1*, *Hsd11b1*, *Htr1a* and *Bdnf* were examined in the present study.

Whereas animals subjected to MS exhibit reduced neurogenesis and synaptic plasticity in the hippocampus (Hays *et al.*, 2011; Hulshof *et al.*, 2011; Piubelli *et al.*, 2011; Lajud *et al.*, 2012; Suri *et al.*, 2013; Loi *et al.*, 2014), and that instead the EE may promote the opposite effects, as increased neurogenesis and higher number of

dendritic spines, it is possible to propose that the likely reduction in the DG plasticity of the MS rats could be related to reduction in the concentration of serotonin and/or BDNF, and/or higher glucocorticoids levels in the hippocampus of these animals. The EE could mitigate morphological and neurochemical changes in the hippocampus of animals subjected to MS. Therefore, this study was conducted to test the hypothesis that EE could attenuate morphological and/or neurochemical changes in the hippocampus of animals subjected to MS.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Animal Manipulations**

The project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Brazil (protocol number 114/2010).

The animals were kept in standard conditions (ambient temperature 22° C, 12 hour light/dark cycle) with free access to food and water.

Wistar rats, with approximately 100 days old, were placed to form monogamous mating (for 1 week). After this period, the males were removed and the females were monitored daily (from 20<sup>th</sup> day) in order to observe the birth day of the puppies. Three experiments were conducted in the DG and internal molecular layer of the hippocampus: immunohistochemistry, electron microscopy, and qRT-PCR.

### **2.2. Maternal Separation Procedure**

The birth day of the litters (mothers were observed daily until 5:00 pm) was called P0. The maternal separation procedure consisted of daily withdrawal of puppies from maternal contact for 3 hours (9:00 am to 12: 00 p.m) on an adjacent

room, from P1 to P14 day. During the separation period pups were maintained on the insulating sheet in order to avoid heat loss. The control pups remained with their mothers, in standard polypropylene boxes of dimensions 41.00 x 34.00 x 16.00 cm until the day of weaning, P21. In the study only litters containing 7-11 pups were used. On days P7, P14 and P21, during the cages changes, the pups were weighed.

After weaning, male pups control and maternal separation, were separated to to have another group to be exposed at the environmental enrichment. Thus, following groups were formed: 1- controls (C), 2- animals subjected to maternal separation (MS), 3- animals kept in an enriched environment (EE), and 4- animals subject to maternal separation and exposed to enriched environment (MSEE).

### **2.3. Enriched Environment**

The Environmental Enrichment (EE) enables increased learning opportunities, physical activity and social interaction. At P22 and P23 days, three intraperitoneal injections of 100 mg/Kg of BrdU in 0,9% saline solution (20 mg/ml) at 37° C were done for two days study hippocampal neurogenesis after 4 weeks. The rats received three injections of BrdU administered daily during the light period, with an interval of about 4 hours between injections (09:00, 13:00 and 17:00).

At P24 , the rats were subjected to environmental enrichment (EE and MSEE groups) or remained in the control cages (C and MS groups). The EE cages, made of stainless steel, had the following dimensions: 100 cm (H), 50 cm (W) and 100 cm (L). The EE boxes had 3 floors (connected by pipes and ladders), running wheels, corks and feeders. The “toys”, water, and food supply were exchanged once a week in order to provide new learning opportunities to the animals. Four animals were kept in each standard polypropylene (41.00 (L) x 34.00 (H) x 16.00 (W) cage, while 8-10 rats were

allocated in each EE cage. At the age of  $48 \pm 2$  days old the rats were anesthetized with ketamine and xylazine solution and transcardially perfused with 0.9% saline, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1M sodium phosphate buffer (pH = 7.4) and their brains removed and kept in the same fixative for 12 hours, stored in 0.1 M phosphate buffer and transferred to 30% sucrose for cryoprotection.

#### **2.4. Fluorescent and Confocal Microscopy**

The brains were cut at 20  $\mu$ m sections, mounted on gelatinized slides and stored at  $-20^{\circ}$  C. Before the immunohistochemistry assay, the slices were placed at room temperature and at  $-25$  in/Hg vacuum for 1 hour, immersed in TBS Triton X-100 2% over 1 hour, and in 0.1 M glycine solution diluted in TBS-Triton X-100 1% for 1 hour. The blocking step was done with 1 % BSA and 2% normal serum from the animal species in which the secondary antibody was made (both diluted in TBS-Triton X-100 1%) for 1 hour. The primary antibodies, anti-Doublecortin (Abcam), and anti-GFAP (Millipore), were diluted at 1:500 in TBS containing 1% of Triton X-100, 1% BSA, and 0.5% normal serum, were incubated overnight at room temperature. The following day, the slides were washed with TBS solution plus Triton X-100 1% and 0.5% BSA (2 x 10 min) and in TBS plus Triton X-100 1% (no BSA, 4 x 10 min). After washes, the slides were incubated with the fluorescent secondary antibodies (Alexa Fluor anti-rabbit 594) for 3 hours. After washing in TBS-Triton X-100 1% plus 0.5% BSA (2 x 10min), followed by Triton X-100 TBS 1% (4 x 10 min) and finishing with distilled water, the slides were mounted with coverslips with Prolong Gold. The images were acquired in a Laser Microscope Leica LMD 6500.

For anti-BrdU/NeuN labeling (dilution: anti-BrdU - 1:100 - GE Healthcare, anti-NeuN – 1:500 - Millipore), the slides were placed in a vacuum oven at 50°C and 25 in/Hg for 1 hour. Denaturation of DNA was done in 0.1 M sodium citrate, pH = 6.00, at 96°C for 30 minutes (modified from Tang *et al.*, 2007). After cooling, the sections were washed in TBS-Triton X-100 1% (for 1 hour), in TBS-Triton X-100 0.5% with 0.1 M glycine for 1 hour, and in TBS alone (3x 15 min). The blocking of non-specific binding was done with 1% BSA and 2% normal serum of the same species in which the secondary antibody was done diluted in TBS. The primary antibodies, anti-BrdU (GE Healthcare) diluted at 1:100, and anti-NeuN diluted at 1:500 (Millipore) in TBS containing DNase (GE Healthcare), were incubated overnight. The next day, after washing in TBS-Triton X-100 (4x 10 min), the incubation with secondary antibodies (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse 1: 500, Invitrogen and Alexa Fluor donkey anti-rabbit 1: 500, Invitrogen) were carried out for 3 hours. After washes with TBS-Triton X-100 (4x 10 min) and distilled water (1 x 5min), the sections were stained with DAPI (1: 4000, Sigma) and then washed in distilled water. The slides were mounted with Prolong Gold (Invitrogen). The images were acquired in a multiphoton Zeiss microscope, the capture emission laser used was 488 nm and 594 nm wavelengths.

To study the neurogenesis in the dentate gyrus, the number of BrdU-positive cells, BrdU/NeuN, and doublecortin immunopositive areas were analysed. The immunopositive areas for GFAP labeling (astrocyte marker) were also analyzed. The Image J program (Rasband, NIH, Bethesda, Mariland, USA) was used for quantification. Two sections of each hippocampus according the coordinates from bregma 2.56 and 3.60 were analyzed.

## 2.5. Electron Microscopy

The animals (n = 3 per group) were anesthetized with ketamine and xylazine and perfused with 2% paraformaldehyde + 2% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer. The brains were sectioned into pieces of 100  $\mu\text{m}$  thick at bregma 2:56 using a vibratome. The sections were stored in 0.1M sodium cacodylate buffer until the routine preparation for electron microscopy (Moreira *et al.*, 1996; Moreira *et al.*, 1998). Briefly, the samples were post fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 2 hours, washed in 0.1 M sodium cacodylate buffer and 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, and placed in 2% uranyl acetate in sodium acetate buffer under gentle agitation overnight at 4°C. After rinsing and dehydrating in graded series of ethanol solutions, and propylene oxide, the samples were infiltrated in Embed 812 resin (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA), and polymerized at 60°C for 36 hours.

Semithin sections (0.5  $\mu\text{m}$ -thick) were stained on glass slides with Toluidine blue to visualize and trim the the inner molecular layer under light microscopy. Ultrathin 70 nm-thick serial-sections were mounted on single-slot grids (SynapTek™-NOTCH IN Grids, 1 x 2 mm slot, Beryllium-Copper, Ted Pella, CA) coated with Pyoloform (Ted Pella, CA), contrasted with uranyl acetate, and lead citrate, and photographed with an electron microscope Zeiss EM-108, Germany. Approximately 300 synapses were studied from each experimental group. The asymmetric synapses were identified by the thick postsynaptic densities, and the symmetric synapses by the thin and similar pre and post synaptic densities (Gray, 1959; Uchizono, 1965; Landis e Reese, 1974; Brusco *et al.*, 2014). The dendritic branches were identified by the presence of microtubules and mitochondria, absent in dendritic spines (Adams and Jones, 1982).



## **2.6. mRNAs expression in the granular layer**

### **2.6.1. Microdissection**

After inhalatory anesthesia with isoflurane the animals were decapitated and the brains rapidly removed and frozen, were kept at -80°C. Sections 20µm-thick were done with a cryostat and placed on Pen-Membrane slides 2,0µm, RNase and DNase free (Leica # 11,505,189). The sections were stored at -80°C. For microdissection the slides were gradually warmed up (15 min at -20° C, 15 min at 4° C and 15 min at room temperature). The sections were stained with 1% toluidine blue in DEPC water and washed twice in DEPC water for 30 seconds, immersed in 75% ethanol in DEPC water for 3 minutes, and dried under vacuum -25 in./Hg at 42 ° C for 10 minutes, and taken to the laser microdissection system Leica LMD6500. Twelve bilateral sections from the dentate gyrus of the hippocampus for each RNA extraction were obtained. The ideal conditions for the collection of samples were standardized, the laser parameters used were: power 42, opening 14, speed 10, and swing specimen 5.

### **2.6.2. RNA extraction and cDNA synthesis**

To the extraction of total RNA, we used the PureLink™ RNA Micro Kit (Invitrogen by Life Technologies, cat # 12183-016). After section of the material, it was added 350 µl of lysis buffer with 3.5 µl of β-mercaptoethanol, followed by the addition of 5µl of diluted RNA PureLink carrier. The samples were homogenized in vortex for 3 minutes for lysis and homogenization. Then the samples were transferred to a new tube (RNase and DNase free), and added 350µl of 70% ethanol in DEPC water. When the homogenization was performed, the samples were transferred to the PureLink™ MICROKIT column, and centrifuged at 12.000xg for 1 minute. To the column was added 20µl of the mixture of PureLink™ DNase buffer with DNase and

incubated for 20 minutes at room temperature. The columns were washed twice with 350  $\mu$ l of Wash Buffer I by centrifugation at 12,000 xg for 15 seconds, and twice with 500 $\mu$ l of Wash Buffer II by centrifugation at 12,000 xg for 15 seconds. The column was dried by centrifugation at 12,000 xg for 1 minute, added 12 $\mu$ l of DEPC water and centrifuged at 12,000 xg for 1 minute to elute the RNA.

RNA samples were quantified with the spectrophotometer NanoVue plus (GE lifesciences), and cDNA synthesis was done from 1  $\mu$ g total RNA using the Kit <sup>TM</sup> cDNA Synthesis SuperScript® VILO (Invitrogen by Life Technologies, # 11754). To each sample 4 $\mu$ l of VILO<sup>TM</sup> Reaction Mix 5X, 2  $\mu$ l of SuperScript®Enzyme Mix, 1mg of RNA, and DEPC water, were added to a final volume of 20 $\mu$ l. The samples were incubated in the thermal cycler PTC-200 (MJ Reserch) with the following cycle: 25° C for 10 minutes, 42° C for 60 minutes and 85 °C for 5 minutes. The samples were stored at -20 ° C until completion of the qRT-PCR.

### **2.6.3. Real time quantitative PCR**

The qRT-PCR reaction was performed in the 7500 Real Time PCR System according to the protocol of TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, USA) manufacturer. To correct experimental errors caused by variations in the amount of initial RNA or by changes in the efficiency of each reaction amplification of mRNA, Rnr5s,  $\beta$ -actin and GAPDH as internal controls were used.

The reactions for the study of the expression of target mRNAs had a final volume of 15 $\mu$ L: 0,75 $\mu$ L TaqMan Gene Expression Assay for each gene specific 20 $\times$ , 7,5 $\mu$ L TaqMan Gene Expression Master Mix 2 $\times$ , 1 $\mu$ L of cDNA diluted 1: 5 and DEPC water. All reactions were repeated 3 times and the experiments validated with

the use of negative controls. The table 1 illustrates the mRNAs investigated in this study.

We use three different control genes, which are widely used in studies of qRT-PCR, but we got different results when comparing the expression of target mRNA/mRNA controls. The most similar results were obtained using Rn45s and GAPDH genes as controls. However, despite the common use of these three genes as controls in qRT-PCR reactions, Daniels *et al.* (2011) observed that the expression of  $\beta$ -actin and GAPDH proteins are altered in animals subjected to maternal separation or exercise. Furthermore, recent studies indicate that isoflurane anesthetic (used in this study for the experiments qRT-PCR) destabilize dendritic spines by a mechanism actin dependent (Platholi *et al.*, 2014). Therefore, we decided to use the Rn45s gene as most appropriated control.

## **2.7. Statistical Analysis**

The data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The quantitative variables with homogeneity were analyzed by ANOVA, for comparing two groups or two-way ANOVA for comparing 4 groups (in order to verify the interaction between factors), both followed by Fisher post-hoc test. The Levene's test was used to verify the homogeneity of variances (variables were considered homogeneous when  $p > 0.05$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Maternal Separation Reduces Hippocampal Neurogenesis

The analysis of BrdU/NeuN double labelling revealed that MS and MSEE had lower hippocampal neurogenesis than C and EE animals. The neonatal stress reduced the number of BrdU<sup>+</sup> (F (1,11) = 6.11, p = 0.03; C: 73.25 ± 10.78, MS: 47.67 ± 8.02, EE: 69.20 ± 21.41, MSEE: 56.33 ± 6.03) and BrdU/NeuN double positive cells (F (1,11) = 9.43, p = 0.01; C: 45.50 ± 5.80, MS: 30.33 ± 7.37, EE: 46.40 ± 14.05, MSEE: 30.33 ± 3.21). The EE was only able to attenuate the effect of MS in the number of BrdU<sup>+</sup> cells without effect on the number of new neurons (figures 1 and 2). On the other hand, the number of doublecortin (DCX) positive neurons was reduced only in the MSEE animals (F (1,11) = 5.42, p = 0.039; C: 710.50 ± 72.84, MS: 572.67 ± 226.08, EE: 637.20 ± 68.96, MSEE: 511.33 ± 29.30) suggesting that the MS protocol was not able to reduce the number of immature neurons in animals of 48±2 days old (figure 4 A). Additionally, the analysis of DCX positive area showed that MS and MSEE animals had less immunoreactivity anti-DCX than C animals. Unespectedly, there was a tendency to lower DCX<sup>+</sup> area in EE compared to C animals (figure 4 B) (F (1,11) = 7.62, p = 0.01; C: 23,4132.50 ± 100,722.90, MS: 129,366.40 ± 57812.95, EE: 168,689.80 ± 51,142.19, MSEE: 131,534.30 ± 57831.39; μm<sup>2</sup>). The Pearson's analysis revealed positive correlations between DCX<sup>+</sup> cells and DCX<sup>+</sup> area (fig. 4 C, p=0.0002, r square= 0.6215), DCX<sup>+</sup> area and BrdU<sup>+</sup> cells (fig. 4 D, p=0.010, r square=0.3481), and DCX<sup>+</sup> area and BrdU/NeuN<sup>+</sup> cells (fig. 4 E, p=0.026, r square=0.259). We did not find any correlations between the number of DCX<sup>+</sup> cells and BrdU<sup>+</sup> cells (p=0.24, r square=0.04, data not shown) or between DCX<sup>+</sup> cells and BrdU/NeuN<sup>+</sup> cells (p=0.2183, r square=0.05, data not shown).

### 3.2. Synaptic Plasticity analysed by electron microscopy.

The results of electron microscopy analysis are depicted in the figure 5. The postsynaptic density was similar between animals of different experimental groups (figure 5 A, C:  $113.44 \pm 2.28$ , MS:  $118.59 \pm 27.78$ , EE:  $126.46 \pm 29.04$ , MSEE:  $109.07 \pm 10.64$ ,  $n = 2-3$ );  $F(1,6) = 0.55$ ,  $p = 0,49$ , manipulation x cage).

The proportion of asymmetric (C:  $97.66 \pm 0.46$ , MS:  $97.01 \pm 1.72$ , EE:  $98.17 \pm 1.80$ , MSEE:  $97.38 \pm 0.97$ ) or symmetric synapses (C:  $2.34 \pm 0.46$ , MS:  $2.99 \pm 1.72$ , EE:  $1.83 \pm 1.80$ , MSEE:  $2.62 \pm 0.97$ ) are showed in the figure 5 B. No significant differences were observed among the various experimental groups ( $F(1,6) = 0.01$ ,  $p = 0.94$ , manipulation x cage).

The percentage of synapses on dendrites and dendritic spines (showed in figure 5 C) was significantly influenced by experimental manipulations. There was an interaction between handling and cage variables ( $F(1,6) = 11.47$ ,  $p = 0.01$ ). The ratio of synapses on dendritic spines was higher in EE animals compared to C and MSEE (C:  $68.23 \pm 1.27$ , MS:  $76.07 \pm 7$ , 98 EE:  $82.17 \pm 3.03$ , MSEE:  $68.31 \pm 0.80$ ), and consequently the proportion of synapses on the dendrites was lower in EE animals compared to C and MSEE (C:  $31.77 \pm 1.27$ , MS:  $23.93 \pm 7.98$ , EE:  $17.83 \pm 3.03$ , MSEE :  $31.69 \pm 0.80$ ). Regarding the proportion of asymmetric synapses on dendrites and dendritic spines, an interaction between the variables handling and cage was observed ( $F(1,6) = 8.64$ ,  $p = 0.0259$ ). There was an increase in the proportion of synapses on dendritic spines (C:  $69.87 \pm 1.27$ , MS:  $78.52 \pm 9.51$ , EE:  $83.08 \pm 2.26$ ; MSEE:  $70.16 \pm 1.52$ ) and reduction of synapses on dendrites (C:  $30.13 \pm 1.27$ , MS:  $21.48 \pm 9.51$ , EE:  $16.92 \pm 2.26$ ; MSEE:  $29.84 \pm 1.52$ ) in EE when compared to C and MSEE animals. Moreover, it was found two symmetric synapses on the neck of a dendritic spine of an animal submitted only to EE (figure 5 G, blue).

### **3.3. The mRNA expression of Nr3c1, Htr1a, and Bdnf are modified by maternal separation or enriched environment.**

The mRNA expression of the Nr3c1 (a gene encoding glucocorticoid receptors), was significantly influenced by handling and cage ( $F(1, 16) = 9.07$ ,  $p = 0.008$ ) variables. The MS group had a lower expression of Nr3c1 mRNA than MSEE and C groups. In the EE group, there was a tendency ( $p = 0.08$ , Fisher post-hoc test) to lower Nr3c1 mRNA compared to MSEE (C:  $1.04 \pm 0.34$ , MS:  $0.63 \pm 0.15$ , EE:  $0.81 \pm 0.25$ , MSEE:  $1.14 \pm 0.32$ ;  $n = 5$ ). Regarding Hsd11b1 mRNA, a gene associated with the metabolism of glucocorticoids, no significant differences in the experimental groups were observed (C:  $1.01 \pm 0.18$ , MS:  $0.78 \pm 0.23$ , EA:  $0.72 \pm 0.12$ , MSEE:  $0.78 \pm 0.23$ ,  $n = 5$ ;  $F(1,16) = 2.87$ ,  $p = 0.109$ ).

Regarding Htr1a mRNA, a gene encoding 5HT-1A serotonin receptors, significant effects of handling ( $F(1,16) = 5.099$ ,  $p = 0.038$ ) and cage ( $F(1,16) = 5.05$ ,  $p = 0.039$ ) factors were observed, but there was no interaction between these factors ( $F(1,16) = 2.88$ ,  $p = 0.108$ ). MS, EE and MSEE animals had lower Htr1a mRNA expression than group C (C:  $1.03 \pm 0.27$ , SM:  $0.67 \pm 0.20$ , EA:  $0.68 \pm 0.17$ , SMEA:  $0.63 \pm 0.13$ ). Comparing the Bdnf (a gene encoding brain-derived neurotrophic factor) mRNA expression, a significant interaction between factors (cage x handling) was observed ( $F(1,16) = 4.76$ ,  $p = 0.044$ ). The Fisher post-hoc test revealed a trend to lower Bdnf mRNA in MS animals compared to MSEE ( $p = 0.096$ ) and C ( $p = 0.076$ ; C:  $1.05 \pm 0.36$ , MS:  $0.68 \pm 0.21$ , EA:  $0.80 \pm 0.26$ ; SMEA:  $1.03 \pm 0.37$ ).

#### 4. Discussion

The present study examined the hippocampal plasticity of rats subjected to maternal separation and environmental enrichment. We analyzed neurogenesis, ultrastructural morphology of hippocampal neurons, as well as mRNA expression of genes involved in neuronal plasticity.

We observed decreased neurogenesis in animals subjected to maternal separation. In general, the number of BrdU-positive (indicating cell survival), and the number of BrdU/NeuN double positive cells (neuronal differentiation labeling) were reduced in animals submitted to maternal separation. The enriched environment protocol used in this study had no effect on neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus. The number of DCX<sup>+</sup> cells was reduced in the MSEE animals, however we did not find any significant effect of MS procedure alone. It has been reported that the effects of MS on the DG neurogenesis depends on the animal's age (Suri *et al.*, 2013; Loi *et al.*, 2014). Suri *et al.* (2013) verified that the number of DCX<sup>+</sup> cells are differently modified by MS procedure according to the animal's age. MS animals of 21 days old had more DCX<sup>+</sup> cells and animals with fifteen months old had less DCX<sup>+</sup> cells than control animals, suggesting that early life stress may have biphasic effects on the hippocampal neurogenesis depending on animal's age. In our study, we did not find any effects of the MS in the number of DCX<sup>+</sup> cells, but the MSEE animals had lower DCX<sup>+</sup> cells than controls. The neurogenesis is a complex phenomenon that involves different stages (proliferation, survival, and differentiation), therefore it is possible that the higher number of DCX<sup>+</sup> cells in MS animal's of 21 days old could not indicate higher DG neurogenesis levels as suggested by the Suri *et al.* (2013), instead our interpretation is that the higher DCX<sup>+</sup> cells could be a compensatory

encephalic change promoted by MS procedure to try minimize the lower survival and cell differentiation levels in neurons. Supporting this hypothesis, we found that the BrdU/NeuN double positive cells were reduced in MS or MSEE animals. On the other hand, the DCX<sup>+</sup> area was decreased in MS or MSEE animals and, it was verified a tendency of EE animals had lower DCX<sup>+</sup> area than C group (figure 4B). In addition, it were found positive correlations between DCX<sup>+</sup> area and DCX<sup>+</sup> cells, DCX<sup>+</sup> area and BrdU<sup>+</sup> cells, and DCX<sup>+</sup> area and BrdU/NeuN double positive cells (figures 4 C, D, and E), indicating that the higher DCX expression on neurons could facilitate survival or differentiation of cells in neurons.

Lajud *et al.* (2012) observed a reduction on hippocampal neurogenesis at the 15th postnatal day (analyzed by the number of BrdU positive cells and co-localization of BrdU with NeuN or BrdU with doublecortin) in brains of animals subjected to 3 hours of maternal separation between the 1st to the 14th post natal day. Raceková *et al.* (2009), using immunostaining anti- BrdU, found a reduction in cell proliferation in animals of 28 days old previously submitted to maternal separation between the 1st to the 14th postnatal day. Fabricius *et al.* (2009) reported a reduction in the number of neurons in the dentate gyrus of the hippocampus of adult mice subjected to 24 hours of maternal separation on the 9th postnatal day. Aksic *et al.* (2013) verified a reduction in the total volume of the hippocampus as well as in the dentate gyrus and CA1 regions of this structure, as well as the lower protein expression of NeuN in the hippocampus of young Wistar rats (60 days old) subjected to maternal separation on the 9th post natal day, for a period of 24 hours. Despite the differences in experimental protocols and at the age of euthanasia (50 days in this study), this work corroborate the reduction on hippocampal neurogenesis in animals subjected to



maternal separation. Therefore, the effects of neonatal stress on hippocampal neurogenesis appear to be consistent.

Regarding the effect of environmental enrichment on hippocampal neurogenesis, Kempermann *et al.* (1997) observed increases in the volume of the dentate gyrus, in the number of hippocampal neurons and in the number of BrdU positive cells in mice maintained at enriched environment for 4 weeks. Moreover, Diamond *et al.* (1976) found no differences in cortical thickness in the hippocampus of animals subjected to enrichment compared with animals living in impoverished environment. Piazza *et al.* (2011, 2014) reported that environmental enrichment did not reverse the reduction on hippocampal cell proliferation observed in diabetic animals, despite of the improvement of cognitive deficits observed in diabetic animals. Monteiro *et al.* (2014) found that environmental enrichment reversed the neurogenesis reduction observed in animals subjected to isolation. Thus, environmental enrichment appears to have different effects on various stressful events.

In this study, unlike that observed in other studies (Kempermann *et al.*, 1997), no significant differences between control animals and maintained in an environmental enrichment were observed. However, other authors also reported no effect of environmental enrichment "per se" in the number of BrdU positive cells (Beauquis *et al.*, 2010; Piazza *et al.*, 2011; 2014; Williamson *et al.*, 2012). Many factors could contribute to explain the different results reported in the scientific literature, such as the age of animals exposure to environmental enrichment, the duration of exposure to this environment, the age of animals when the brains were removed for experimental analysis and so on. In this study, as well as in Piazza *et al.* (2011), animals were subjected to environmental enrichment when they were 21 days

old. At this age the basal levels of hippocampal neurogenesis are high. Therefore, it is possible to suggest that, in this period of life, the environmental enrichment is not effective to increase hippocampal neurogenesis. Hosseiny *et al.* (2014) found that increased hippocampal neurogenesis in animals exposed to environmental enrichment depends on the time remaining in the environment as well as the age of the animals exposed to enrichment.

Leger *et al.* (2014) showed that the time of exposure to environmental enrichment differentially affects hippocampal neurogenesis and behavior of mice. The authors reported that the rate of cell proliferation and the volume of the granular layer were not affected by enrichment when the exposures times to EE were one, three or five weeks. In contrast, the cell survival was higher in the animals maintained in enrichment over 5 weeks, and the percentage of cells that differentiate into neurons has increased in the animals submitted to EE for three or five weeks.

The present study also evaluated the ultrastructural morphology in the inner molecular layer of the hippocampus, because new neurons send their dendrites to this region. It was observed that animals maintained at environmental enrichment had more synapses on dendritic spines (and therefore less synapses on dendrites) when compared to animals subjected to MS or MSEE animals suggesting remodeling of the synaptic contact site. These results were similar when we analyzed only asymmetric synapses. The symmetrical synapses on dendritic spines, which were located on the neck, were found only in samples from animals exposed to EE. Therefore, despite the environmental enrichment did not affect hippocampal neurogenesis in this study it may have affected the hippocampal synaptogenesis.

As already described, environmental enrichment did not affect survival and neuronal differentiation in the dentate gyrus of the hippocampus. In the present study,

we did not analyse the dendritic branching, neither the density and morphology of dendritic spines between the different experimental groups. Kozorovitskiy *et al.*, 2005 reported higher dendritic length and arborization as well as increased in the density of spines on the hippocampus of animals kept in enriched environments.

Differences in the dendritic arborization and in the doublecortin labeling may also occur depending on the environment (Plumpe *et al.*, 2006). Beauquis *et al.*, 2010 reported that the animals maintained in an environmental enrichment had higher dendritic length and doublecortin positive neurons, although there was no wealth effect on hippocampal neurogenesis. In our work, the hippocampal neurogenesis was not affected by environmental enrichment, but the proportion of synapses on dendritic spines increased compared to C or MSEE groups.

It has been known that the dendritic spines are sites of synaptic contact highly plastic, therefore the higher proportion of synapses on dendritic spines in animals of EE group suggests greater plasticity of synaptic connections on the hippocampus of these animals. The presence of two inhibitory synapses on the neck of dendritic spines supports this hypothesis. Although controversial, symmetrical synapses on dendritic spines have been observed in several brain regions such as the amygdala (Brusco *et al.*, 2014; Cooke and Woolley, 2005), the hippocampus (Harris *et al.*, 1992) and in neocortex (Kubota *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012). Moreover, it has been reported that whisker stimulation or naturalistic EE increase the number of symmetric synapses on dendritic spines in the somatosensory cortex (Landers *et al.*, 2011), then it is possible to suggest that the EE animals could have more symmetric synapses due to more whisker stimulation, and in the MSEE animal the sensorial process could be impaired.

It is possible to suggest that the higher proportion of synapses on dendritic spines in animals subjected to EE may be related to a higher density of dendritic spines in the hippocampus of these animals, as well as the remodeling of synaptic connections.

In this study, a reduction in the expression of mRNA for *Nr3c1*, encoder glucocorticoid receptors in MS animals was observed. The EE reversed this effect in animals separated from their mothers. No significant differences were observed in the expression of mRNA for *Hsd11b1*, which encodes an enzyme that converts cortisone to the active hormone corticosterone. The expression of mRNA for *Htr1a*, was reduced in MS, EE and MSEE animals compared to C animals. In addition, it was observed a trend of reduction in *Bdnf* mRNA expression on the hippocampus of MS animals compared to C or MSEE groups.

The Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the neurotransmitter serotonin are endogenous substances that stimulate hippocampal neurogenesis. The trend of reduced *Bdnf* mRNA in animals subjected to maternal separation may be related to reduced neurogenesis verified in these animals. Corroborating this result, other studies reported a reduction of BDNF in the hippocampus of rats subjected to maternal separation (Dimatelis *et al.*, 2014; Maniam and Morris, 2010). Maniam and Morris (2010) observed that physical exercise reversed the *Bdnf* mRNA reduction of MS animals. The EE seems to have a similar effect of physical activity. However, the increase of *Bdnf* mRNA does not seem to be sufficient to increase neurogenesis on the hippocampus of animals subjected to maternal separation to levels similar to controls.

The expression of mRNA for the serotonin 5HT1A receptors was also reduced in the hippocampus of animals subjected to maternal separation (Maniam and Morris,

2010). Bravo *et al.* (2014), using a similar MS protocol, reported (using the technique of in situ hybridization) that this type of neonatal stress increased the expression of mRNA for 5HT1A receptors in the amygdala without modify the expression of this receptor in the dentate gyrus, CA1 and CA3 hippocampal regions of animals with three months old. On the other hand, Ohta *et al.* (2014), using a similar MS protocol, found a reduction in the expression of mRNA for 5HT1A in the hippocampus in the 7th or 14th postnatal day, but after the maternal separation procedure, the values were similar to those controls. Corroborating our results, Li *et al.* (2013) reported that the number of 5TH1A positive cells decreased in the hippocampus of animals subjected to maternal separation. The exercise appears to reverse the lower mRNA expression in the hippocampus of animals subjected to maternal separation (Maniam and Morris, 2010).

In our study, the EE unexpectedly also reduced the expression of Htr1a mRNA. Leger *et al.* (2014) found that mice submitted to EE over 3 weeks had higher levels of serotonin in the prefrontal cortex, but normal levels of this neurotransmitter in the hippocampus and amygdala. Brenes *et al.* (2009) observed that the concentration of serotonin in rat hippocampus at 70 days of age, kept under environmental enrichment was greater than that of animals kept in standard housing or isolated conditions. It may be suggested that higher levels of serotonin in the hippocampus of animals kept in environmental enrichment over the postnatal days 28-60, could cause "downregulation" of 5-HT1A receptors. Corroborating this hypothesis, Lesemann *et al.* (2012) observed that treatment with the antidepressant fluoxetine (known to increase extracellular levels of serotonin and to stimulate hippocampal neurogenesis, Duman *et al.*, 2001; Encinas *et al.*, 2006), reduced mRNA expression for 5TH1A in the hippocampus of mice, without affecting neurogenesis

levels in the dentate gyrus. Gould (1999) suggested that serotonin stimulates neurogenesis via activation of 5TH1A hippocampal receptors, however, the explanation of this effect can be more complex.

The expression of mRNA for NR3C1 was also reduced in the hippocampus of animals subjected to MS (Francis *et al.*, 2002; Maniam and Morris, 2010; Own *et al.*, 2013). It was found that Nr3c1mRNA expression was reduced in animals subjected to MS, and this effect was attenuated by EE.

Francis *et al.* (2002) evaluated behavioral responses to stress, levels of corticosterone, the expression of hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) and the expression of glucocorticoid receptor (using the in situ hybridization technique) in the dentate gyrus, CA1 and CA3 regions of the hippocampus of Long-Evans rats with 110 days old, previously subjected to MS and EE. In this study, the animals were subjected to restraint stress at the age of 70 days. The authors reported that the endocrine (measured by corticosterone plasmatic levels) and behavioral (reduction in exploration in the open field test and higher latency in the suppression of food intake induced by novelty test) responses were higher in animals subjected to MS stress (animals subjected to short daily periods of separation, 15 minutes), these effects were reversed by EE. Moreover, the authors did not find any differences in mRNA of hypothalamic CRF or mRNA of glucocorticoid receptors in the hippocampus between experimental groups. The authors suggested that environmental enrichment promotes behavioral effects without interfering with the effects of maternal separation on neural systems.

In this study, we analyzed the expression of different genes in granular layer of the of dentate gyrus of the hippocampus samples using the laser microdissection followed by qRT-PCR techniques. In contrast with the results reported by Francis *et*

*al.* (2002), it was found that environmental enrichment reversed the reduction in mRNA expression for *Nr3c1* (gene that encodes glucocorticoid receptors). The differences between two studies may be due to greater accuracy of the qRT-PCR technique, to differences in animal age at euthanasia, the use of different control group, and to the absence of stressful procedures in the present study.

Divergent results may be originate from different MS and EE protocols. Some authors perform only a single separation event lasted 24 hours, while other MS protocols consisted in daily or occasionally episodes of separations repeated, with duration ranging from 1 to 8 hours over the course of different stages of post-natal period until weaning (Lehmann and Feldon, 2000). In addition, other factors such as the separation of pups alone (neonatal isolation) or together (maternal deprivation), the temperature control during the maternal separation procedure, the animal's age at the moment of experimental analysis, as well as maternal behavior itself may interfere with results. The timing of maternal separation is also important. The separation of the pups during the light phase of the light-dark cycle seems to have more drastic implications for endocrine responses than separations at night (Ruedi-Bettschen *et al.*, 2004). One possible explanation is that maternal care drops dramatically at the beginning of the night period, increasing with the arrival of the day (Grota and Ader, 1974).

Moreover, the authors use unmanipulated animals or manipulated for a short period of time as experimental controls (Lehmann and Feldon, 2000). In this study, we chose to use unmanipulated controls because animals subjected to neonatal handling procedure may have endocrine, behavioral and morphological changes opposite to the changes observed in animals subjected to maternal separation (Lehmann and Feldon, 2000). Thus, the use of such engineered animal experimental

control can promote significant differences between experimental groups not only due to maternal separation procedure "per se" (Lehmann and Feldon, 2000). Another issue to be discussed is the reduction of litter. In the present work we chose not to reduce litters of experimental and control groups, but offset, as much as possible, the litters on the number of pups among the different experimental groups. Studies indicate that small changes between litters, as the number of offspring and the proportion of males and females, may affect maternal behavior (Lehmann and Feldon, 2000). In relation to environmental enrichment, differences in age and time spent on this model has been reported (Hosseiny *et al.*, 2014).

Vivinetto *et al.* (2013) found that environmental enrichment attenuated the behavioral impairments observed in animals subjected to maternal separation. The density of positive cells for the glucocorticoid receptors was not altered by maternal separation, but was increased in animals subjected to environmental enrichment. Despite EE reverse behavioral changes caused by MS, the neural changes induced by neonatal stress appear to be resistant and difficult to reverse by environmental enrichment. MS reduced hippocampal neurogenesis, as well as the expression of mRNA for Nr3c1, Htr1a and tended to decrease BDNF mRNA expression. The EE did not affect hippocampal neurogenesis, but reduced the expression of Htr1a and increased the proportion of synapses on dendritic spines, suggesting increased synaptic plasticity. The EE attenuated the reduced expression of mRNA for NR3C1 in MS animals.

It has been reported that environmental factors such as stressful events, physical activity, social interaction and learning opportunities, affect the neural systems. Some neural changes occurred in the neonatal period appear to be persistent and difficult to reverse. To understand how the environment affects the neurobiology



of the brain is an arduous, but necessary, task if we wish to find environmental strategies to reverse and/or attenuate effects of stressful events, especially in the early stages of development.

## 5. References

Adams I and Jones DG. Quantitative ultrastructural changes in rat cortical synapses during early, mid and late adulthood. *Brain Research* 239: 349-363, 1982.

Aksic M, Radonjic NV, Aleksic D, Jevtic G, Markovic B, Petronijevic N, Radonjic V, Filipovic B. Long-term effects of the maternal separation deprivation on the volume and number of neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Acta Neurobiol. Exp.* 73: 394-403, 2013.

Alenina N, Klempin F. The role of serotonin in adult hippocampal neurogenesis. *Behav. Brain Res.* S0166-4328(14)00487-2, 2014.

Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology* 29(3): 450-460, 2004.

Beauquis J, Roig P, De Nicola AF, Saravia F. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of Type 1 Diabetic mice. *PLoS One*, 2010.

Bravo JA, Dinan TG, Cryan JF. Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT1A receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7:24, 2014.

Brenes JC, Fornaguera J. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. *Behav Brain Res.* 198(1): 199-205, 2009.

Brezun LM, Daszuta A. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89: 999-1002, 1999.

Brusco J, Merlo S, Ikeda ÉT, Petralia RS, Kachar B, Rasia-Filho AA, Moreira JE. Inhibitory and multisynaptic spines, and hemispherical synaptic specialization in the posterodorsal medial amygdala of male and female rats. *The Journal of Comparative Neurology* 522(9): 2075-2088, 2014

Chen Q, Zhou Z, Zhang L, Wang Y, Zhang YW, Zhong M, Xu SC, Chen CH, Li L, Yu ZP. Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochemistry International* 60(3): 233-242, 2012.

Cooke BM, Woolley CS. Sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *The Journal of Neuroscience* 25(46): 10759-10767, 2005.

Daniels WM, Marais L, Stein DJ, Russell VA. Exercise normalizes altered expression of proteins in the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation. *Exp. Physiol.* 92(2): 239-247, 2011.

Diamond MC. Response of the brain to enrichment. *An Acad Bras Cienc.* 73(2): 211-220, 2001.

Diamond MC, Ingham CA, Johnson RE, Bennett EL, Rosenzweig MR. Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus. *J Neurobiol.* 7(1): 75-85, 1976.

Dimatelis JJ, Russell VA, Stein DJ, Daniels WM. Methamphetamine reversed maternal separation-induced decrease in nerve growth factor in the ventral hippocampus. *Metab. Brain. Dis.* 29(2): 433-439, 2014.

Duman RS, Malberg J and Nakagawa S. Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299: 401-407, 2001.

Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *PNAS* 103(21): 8233-8238, 2006.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 4: 1313-1317, 1998.

Fabricius K, Wörtwein G, Pakkenberg B. The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus. *Brain Struct Funct.* 212(5): 403-416, 2008.

Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *The Journal of Neuroscience* 22(18): 7840-7843, 2002.

Gould E. Serotonin and Hippocampal Neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 21(2 Suppl): 46S-51S, 1999.

Gould E and Tanapat P. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80: 427-436, 1997.

Gray EG. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscopy study. *Journal of Anatomy*, 93: 420-433, 1959a.

Gray JD, Milner TA, McEwen BS. Dynamic plasticity: the role of glucocorticoids, brain-derived neurotrophic factor and other trophic factors. *Neuroscience* 239: 214-227, 2013.

Grota LJ, Ader R. Behavior of lactating rats in a dual-chambered maternity cage. *Horm Behav.* 5(4): 275-82, 1974.

Hays SL, McPherson RJ, Juul SE, Wallace G, Schindler AG, Chavkin C, Gleason CA. Long-term effects of neonatal stress on adult conditioned place preference (CPP) and hippocampal neurogenesis. *Behav. Brain Res.* 227(1): 7-11, 2012.

Harris KM, Jensen FE, Tsao B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience* 12(7): 2685-2705, 1992.

Hattori S, Hashimoto R, Miyakawa T, Yamanaka H, Maeno H, Wada K, Kunugi H. Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. *Behav. Brain Res.* 180: 69-76, 2007.

Hosseiny S, Pietri M, Petit-Paitel A, Zarif H, Heurteaux C, Chabry J, Guyon A. Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development. *Brain Struct. Funct.*, 2014.

Hulshof HJ, Novati A, Sgoifo A, Luiten PG, den Boer JA, Meerlo P. Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behav. Brain Res.* 216(2): 552-560, 2011.

BL. Adult brain neurogenesis and depression. *Brain Behav. Immun.* 16(5): 602-609, 2002.

Jacobs BL, van Praag H, Gage FH. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Molecular* 5: 262-269, 2000.

Kappeler L and Meaney, MJ. Epigenetics and parental effects. *Bicessays* 32: 818-827, 2010.

Kempermann G, Kuhn H, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493-495, 1997.

Kozorovitskiy Y, Gross CG, Kopil C, Battaglia L, Mcbreen M, Stranahan AM, Gould E. Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17478–17482, 2005.

Kubota Y, Hatada S, Kondo S, Karube F, Kawaguchi Y. Neocortical inhibitory terminals innervate dendritic spines targeted by thalamocortical afferents. *The Journal of Neuroscience*; 27 (5): 1139-1150, 2007.

Lajud N, Roque A, Cajero M, Gutiérrez-Ospina G, Torner L. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology* 37: 410-420, 2012.

Landers MS, Knott GW, Lipp HP, Poletaeva I, Welker E. Synapse formation in adult barrel cortex following naturalistic environmental enrichment. *Neuroscience* 199: 143-152, 2011.

Landis DM, Reese TS. Differences in membrane structure between excitatory and inhibitory synapses in the cerebellar cortex. *The Journal Comparative of Neurology* 155(1): 93-125, 1974.

Leger M, Paizanis E, Dzahini K, Quiedeville A, Bouet V, Cassel JC, Freret T, Schumann-Bard P, Boulouard M. Enriched environment duration differentially affects behavior and neuroplasticity in adult mice. *Cereb. Cortex.*, 2014.

Lehmann J, Feldon J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Reviews in the Neuroscience* 11: 383-408, 2000

Leonard BE. The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. *European Psychiatry* 20: 302-306, 2005.

Lesemann A, Reinel C, Hühnchen P, Pilhatsch M, Hellweg R, Klaisle P, Winter C, Steiner B. MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain Research* 1457: 51-69, 2012.

Li M, Xue X, Shao S, Shao F, Wang W. Cognitive, emotional and neurochemical effects of repeated maternal separation in adolescent rats. *Brain Research* 1518: 82-90, 2013.

Llorens-Martín, MV, Rueda N, Martínez-Cué C, Alemán T, Flórez J and Trejo JL. Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. *Neuroscience* 147: 631-638, 2007.

Loi M, Koricka S, Lucassen PJ, Joels M. Age- and sex-dependent effects of early life stress on hippocampal neurogenesis. *Front. Endocrinol (Lausanne)* 5: 1-11, 2014.

Ohta K, Miki T, Warita K, Suzuki S, Kusaka T, Yakura T, Liu JQ, Tamai M, Takeuchi Y. Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development. *Int J Dev Neurosci.* 33: 15-21, 2014.

Own LS, Iqbal R, Patel PD. Maternal separation alters serotonergic and HPA axis gene expression independent of separation duration in mice. *Brain Res.* 1515: 29-38, 2013.

Maniam J, Morris MJ. Voluntary exercise and portable high-fat diet both improve behavioural profile and stress responses in male rats exposed to early life stress: role of hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* 35(10): 1553 – 1564, 2010.

McEwen BS. Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 933: 265-277, 2001.

Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev. Neurosci.* 18(1-2): 49-72, 1996.

Monteiro BM, Moreira FA, Massensini AR, Moraes MF, Pereira GS. Enriched environment increases neurogenesis and improved social memory persistence in socially isolated adult mice. *Hippocampus* 24(2): 239-248, 2014.

Moreira JE, Dodane V, Reese TS. Immunoelectronmicroscopy of soluble proteins and membrane proteins with a sensitive post embedding method. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 847-854, 1998.

Moreira JE, Reese TS, Kachar B. Free-substitution as a preparative technique for immunoelectronmicroscopy: evaluation by atomic force microscopy. *Microscopy Res. Tech.* 33: 251-261, 1996.

Nishi M, Hori-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rats. *Front. Neurosci.* 8:166, 2014.

Nishi M, Hori-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W. Effects of early life stress on brain activity: implications from maternal separation model in rodents. *Gen. Comp. Endocrinol.* 181: 306-309, 2013.

Piazza FV, Pinto GV, Trott G, Marcuzzo S, Gomez R, Fernandes MC. Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behavioural Brain Research* 217: 16-20, 2011.

Piazza FV, Segabinazi E, Centenaro LA, do Nascimento PS, Achaval M, Marcuzzo S. Enriched environment induces beneficial effects on memory deficits and microglial activation in the hippocampus of type 1 diabetic rats. *Metab Brain Dis.* 29(1): 93-104, 2014.

Piubelli C, Carboni L, Becchi S, Mathê AA, Domenici E. Regulation of cytoskeleton machinery, neurogenesis, and energy metabolism pathways in a rat gene-environment model of depression revealed by proteomics analysis. *Neuroscience* 176: 349-380, 2011.

Platholi J, Herold KF, Hemmings HC Jr, Halpain S. Isoflurane reversibly destabilizes hippocampal dendritic spines by an actin-dependent mechanism. *PLoS One*, 2014.

Plumpe T, Ehninger D, Steiner B, Klemoin F, Jessberger S, Brandt M, Romer B, Rodrigues GR, Kronenberg G, Kempermann G. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neuroscience* 7(77): 1-14, 2006.

Raceková E, Lievajová K, Danko J, Martončíková M, Flesárová S, Almasiová V, Orendáčová J. Materna separation induced alterations of neurogenesis in the rat rostral migratory stream. *Cell Mol Neurobiol.* 29(6-7): 811-819, 2009.

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.

Ruedi-Bettschen D, Feldon J, Pryce CR. Circadian- and temperature-specific effects of early deprivation on rat maternal care and pup development: short-term markers for long-term effects? *Dev. Psychobiol.* 45(2): 59-71, 2004.

Sapolsky RM, Krey LC and McEwen BS. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6174-6177, 1984.

Savitz J, Lucki I, Drevets WC. 5-TH(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog. Neurobiol.* 88(1): 17-31, 2009.

Schaaf MJ, De Kloet ER, Vreugdenhill E. Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress* 3(3): 201-208, 2000.

Suri D, Vaidya VA. Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. *Neuroscience* 239: 196-213, 2013.

Suri D, Veenit V, Sarkar A, Thiagarajan D, Kumar A, Nestler EJ, Galande S, Vaidya VA. Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition. *Biol Psychiatry* 73(7): 658-666, 2013.

Tang X, Falls DL, Li X, Lane T, Luskin MB. Antigen-retrieval procedure for bromo deoxyuridine immunolabeling with concurrent labeling of nuclear DNA and antigens damaged by HCl pretreatment. *J. Neurosci.* 27(22): 5837-5844, 2007.

Tafet GE, Toister-Achituv M, Shinitzky M. Enhancement of serotonin uptake by cortisol: a possible link between stress and depression. *Cogn. Affect. Behav. Neurosc.* 1(1): 96-104, 2001.

Uchizono K. Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature*, 207: 642-643, 1965.

Vivinetto AL, Suárez MM, Rivarola MA. Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behav Brain Res.* 240:110-118, 2013.

Williamson TP, Johnson DA, Johnson JA. Activation of the Nrf2-ARE pathway by siRNA knockdown of Keap1 reduces oxidative stress and provides partial protection from MPTP-mediated neurotoxicity. *Neurotoxicology* 33: 272–279, 2012.

Zaben MJ, Gray WP. Neuropeptides and hippocampal neurogenesis. *Neuropeptides* 47(6): 431-438, 2013.

### Table and figures:

**Table 1:** Genes Investigated by qRT-PCR assay.

<b>TaqMan® Gene Expression Assay</b>	<b>Gene</b>	<b>Amplified Length (pb)</b>	<b>Ref NCBI</b>
<b>Rn00561369_m1</b>	Nr3c1	73	Rn.90070
<b>Rn00567167_m1</b>	Hsd11b1	80	Rn.185798
<b>Rn00561409_s1</b>	Htr1a	75	Rn.44486
<b>Rn02531967_s1</b>	Bdnf	142	Rn.11266
<b>Rn00667869_m1</b>	ActB	91	Rn.94978
<b>Rn01775763_g1</b>	Gadph	175	Rn.129558
<b>Rn03928990_g1</b>	Rn45s	61	-

Figure 1

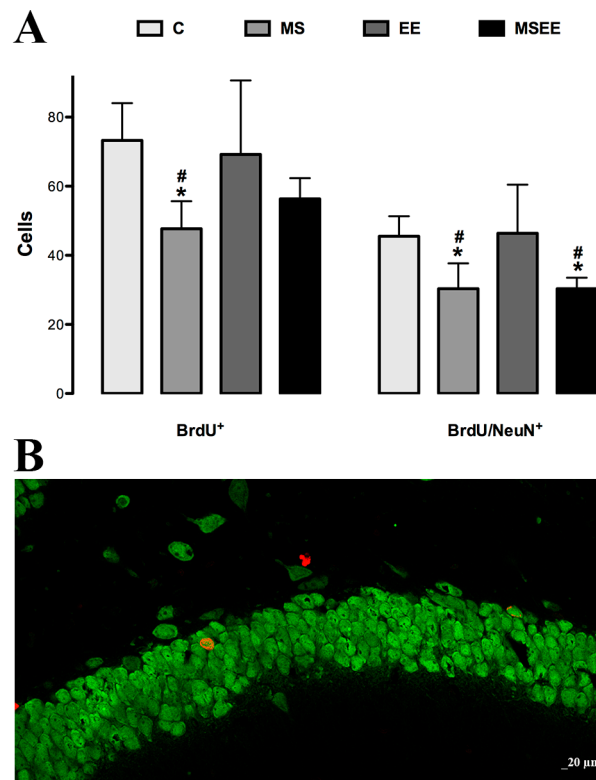


Figure 2

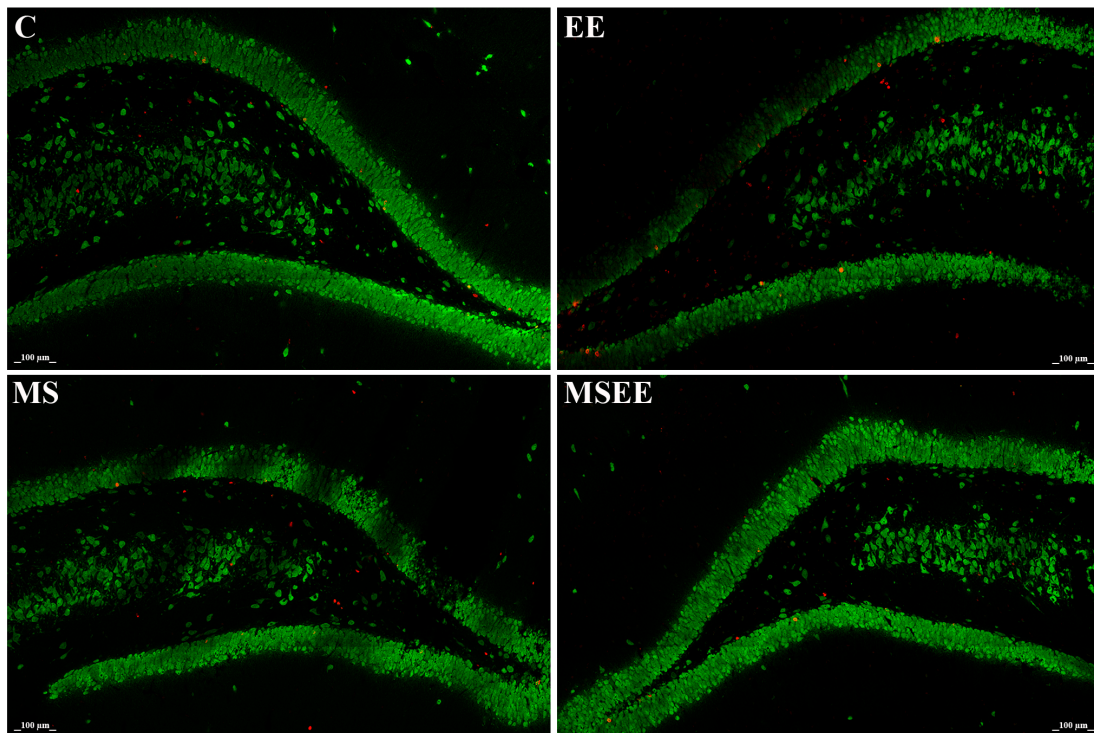




Figure 3

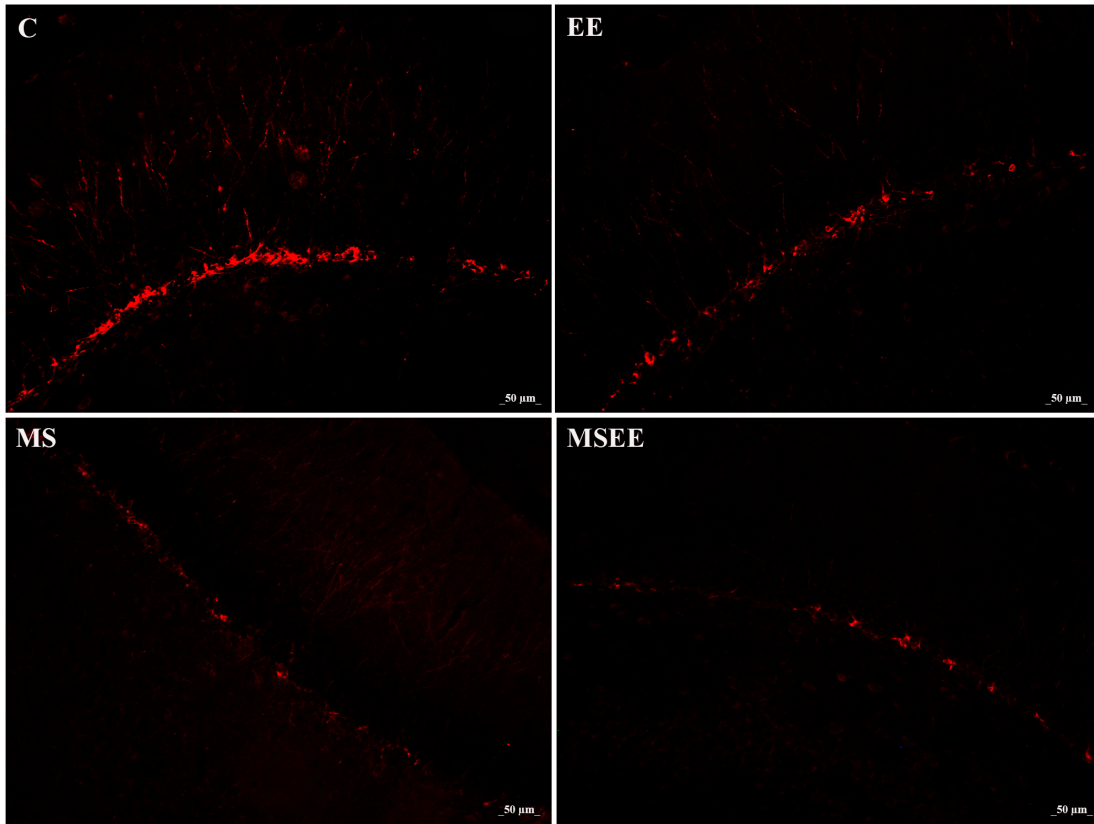
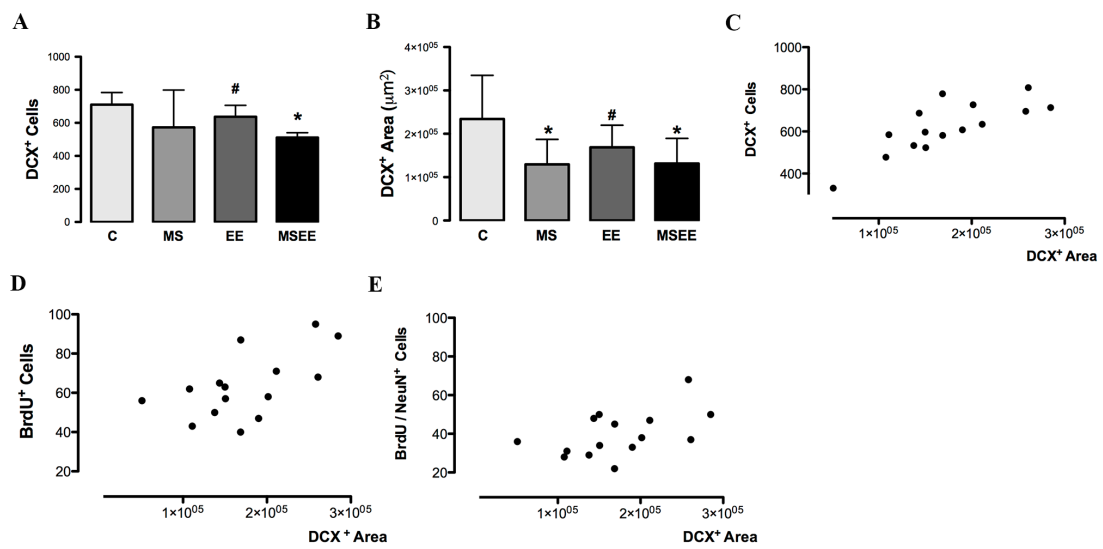
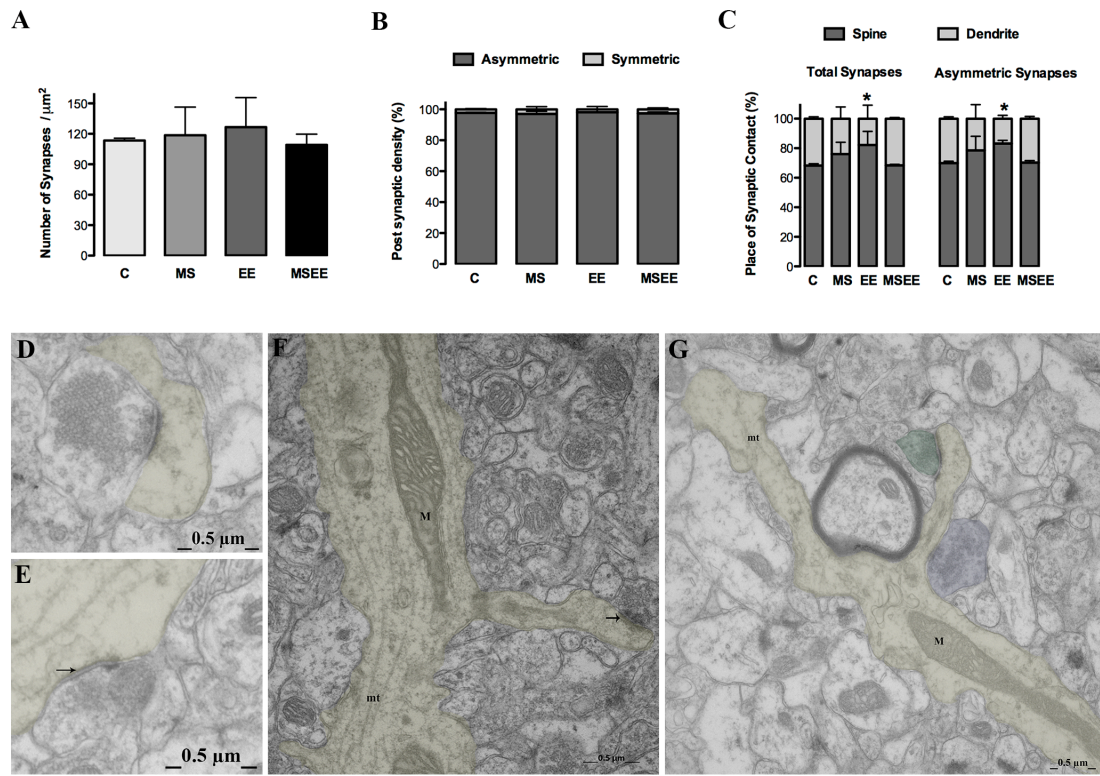


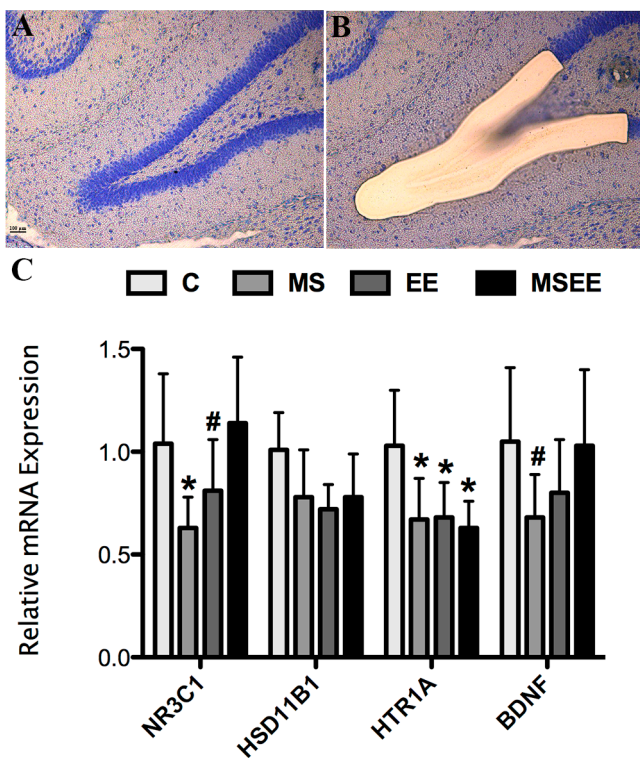
Figure 4



**Figure 5**



**Figure 6**



### Figures Legend:

**Figure 1.** Hippocampal Neurogenesis revealed by BrdU/NeuN double immunohistochemistry. **A.** Number of BrdU<sup>+</sup> cells (left) or BrdU/NeuN double positive cells (right). **B.** A representative picture of BrdU/NeuN double immunohistochemistry. In the A left panel: \*  $p < 0.05$  compared to C group, #  $p < 0.10$  compared to EE group. In the A right panel: \*  $p < 0.05$  compared to EE, #  $p < 0.10$  compared to C group.

**Figure 2.** Representative pictures of BrdU/NeuN double immunohistochemistry from the different experimental groups. **C.** control animals, **EE.** animals submitted only to the enriched environment, **MS.** animals submitted only to maternal separation procedure, **MSEE.** animals submitted to both maternal separation and enriched environment procedures.

**Figure 3.** Representative pictures of Doublecortin immunohistochemistry from the different experimental groups. **C.** control animals, **EE.** animals submitted only to the enriched environment, **MS.** animals submitted only to maternal separation procedure, **MSEE.** animals submitted to both maternal separation and enriched environment procedures.

**Figure 4.** Doublecortin (DCX) immunohistochemistry analysis. The number of the DCX<sup>+</sup> cells or DCX<sup>+</sup> area are depicted in **A** and **B** panels, respectively. Positive correlations between DCX<sup>+</sup> cells and DCX<sup>+</sup> area (**fig. C**), DCX<sup>+</sup> area and BrdU<sup>+</sup> cells (**fig. D**) or DCX<sup>+</sup> area and BrdU/NeuN double positive cells (**fig. E**). **C.** control animals, **EE.** animals submitted only to the enriched environment, **MS.** animals submitted only to maternal separation procedure, **MSEE.** animals submitted to both maternal separation and enriched environment procedures. \*  $p < 0.05$  compared to C group, #  $p < 0.10$  compared to MSEE group (fig. A), #  $p < 0.10$  compared to C group (fig. B).

**Figure 5.** Synaptic plasticity visualized by electron microscopy. **A.** Synaptic density, **B.** Proportion of symmetric or asymmetric synapses. **C.** Proportion of synapses on dendrites or dendritic spines, **D.** Excitatory synapse (in yellow) characterized by spherical vesicles and asymmetric postsynaptic density, **E.** Inhibitory synapse (in yellow) characterized by ellipsoidal vesicles and similar pre and postsynaptic density, **F.** Dendrite (in yellow) showing microtubules (mt) and mitochondria (M) evidencing an excitatory synapse on the dendritic spine (arrow), **G.** Dendritic spine making excitatory (in green) and inhibitory (in blue) synaptic contacts. \*  $p < 0.05$  compared to C and MSEE groups.

**Figure 6.** mRNA expression in the Dentate Gyrus of the Hippocampus. Illustrative images of microdissection technique showing the dissection of DG (**A** e **B**). **C.** Relative expression of mRNA of Nr3c1, Hsd11b1, Htr1a, and Bdnf. In the Nr3c1 graph, \*  $p < 0.05$  compared to C and MSEE groups, #  $p < 0.10$  compared to MSEE group. In the Htr1a graph, \*  $p < 0.05$  compared to C group. In the Bdnf graph, #  $p < 0.10$  compared to C and MSEE groups. **C.** control animals, **EE.** animals submitted only to the enriched environment, **MS.** animals submitted only to maternal separation procedure, **MSEE.** animals submitted to both maternal separation and enriched environment procedure

