UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Priscila Mendes Comassio

**Separação materna e enriquecimento ambiental: envolvimento de células da glia,
transportadores e receptores de glutamato no hipocampo de ratos jovens**

Ribeirão Preto

2017

Priscila Mendes Comassio

**Separação materna e enriquecimento ambiental: envolvimento de células da glia,
transportadores e receptores de glutamato no hipocampo de ratos jovens**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, para a obtenção de título de
Mestre em Neurociência.

Área de Concentração: Neurociência

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Moreira

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Comassio, Priscila Mendes

Separação materna e enriquecimento ambiental: envolvimento de células glia, transportadores e receptores de glutamato no hipocampo de ratos jovens. Ribeirão Preto, 2017.

110 f. : il.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Área de concentração: Neurociência.

Orientador: Moreira, Jorge Eduardo.

1. Astrócitos. 2. Transportadores de glutamato. 3. AMPA. 4. Separação materna. 5. Enriquecimento ambiental.

Nome: COMASSIO, Priscila Mendes

Título: Separação materna e enriquecimento ambiental: envolvimento de células da glia, transportadores e receptores de glutamato no hipocampo de ratos jovens.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção de título de Mestre em Neurociência.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

À minha Família

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste mestrado, em especial àqueles que ajudaram no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao meu professor e orientador, Prof. Dr. Jorge Eduardo Moreira, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, compartilhando sua experiência e competência. Pela amizade, carinho, compreensão e muita paciência. Você foi essencial para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A Ms. Carol Kobori, que me ensinou a prática e o trabalho diário do laboratório, como fazer pesquisa, como trabalhar na bancada e como concluir o trabalho. Obrigada, Carol, pela paciência, compreensão, toda dedicação comigo e conhecimento que construí com você, você é uma excelente professora.

A Dra. Suélen Merlo, pela coorientação do trabalho desenvolvido, pela possibilidade de trabalhar no laboratório e por todo apoio e dedicação.

A Ana Beatriz Sousa Nakayama, pela ajuda, apoio, convivência, experiências compartilhadas, pela amizade e paciência.

Ao Dr. José Inácio Lemos e ao biotério do Laboratório de Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA), pela colaboração com este trabalho, produzindo e preparando os animais para que os experimentos pudessem ser realizados com sucesso.

A Dra. Mariana Monteiro pela ajuda com a dissertação e pela nova amizade – foi no finalzinho, mas você me ajudou muito.

Aos Professores Munira Muhammad Abdel Baqui, Roy Edward Larson, Dr. Ricardo Guelerman Pinheiro Ramos, Dra. Maria Luisa Paçó Larson e Klaus Hartmann Hartfelder, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos por disponibilizarem seus laboratórios.

Aos técnicos Rubens Fernando de Melo e Deise Lúcia Chesca por terem me ensinado a trabalhar com o criostato e auxiliado na criosecção dos encéfalos dos animais.

A especialista de laboratório Tânia Paula Aquino Defina pela capacitação para a utilização do termociclador (ABI-PCR Systems 9700 - Applied) e pelo conhecimento compartilhado sobre biologia molecular.

Ao laboratório de patologia em pesquisa de Isquemia, Reperusão e Regeneração Hepática, em especial à técnica especialista Marlei Josieli Augusto, pela disponibilidade para utilização dos equipamentos: termociclador The StepOnePlus™ Real Time System (Invitrogen) e western blot Mini Trans-Blot® Cell (Bio Rad), além de compartilhar seus conhecimentos.

E especialmente a minha família, por apoiar minhas escolhas e decisões, por estarem ao meu lado sempre e por terem passado por este trabalho junto comigo nas horas em que mais precisei. Obrigada, Mãe, Pai, Patrícia e Rafael. Dedico todas as minhas conquistas a vocês.

Fontes financiadores: CAPES, CNPq, FAPESP, FMRP e FAEPA.

"Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!"

(Mário Quintana, 1951)

RESUMO

Separação materna e enriquecimento ambiental: envolvimento de células da glia, transportadores e receptores de glutamato no hipocampo de ratos jovens. 2017. 110f. Dissertação (Mestrado em Neurociência) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O desenvolvimento humano pode ser influenciado pelo ambiente. Estímulos recebidos ao longo da vida determinam seu progresso e sucesso. Estímulos positivos levam ao desenvolvimento de habilidades, melhorando funções cognitivas e da memória, enquanto estímulos negativos podem predispor a patologias como o estresse. Eventos estressantes durante a infância aumentam a predisposição para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos ao longo da vida. A separação materna, modelo animal de estresse pós-natal, promove diversas alterações comportamentais e encefálicas. Animais submetidos à separação materna apresentam comportamentos que mimetizam doenças psiquiátricas humanas. Por outro lado, diversos trabalhos sugerem que o enriquecimento ambiental pode ter efeito benéfico na reversão ou atenuação de modificações comportamentais e encefálicas promovidas por modelos animais de depressão, esquizofrenia, ansiedade e hiperatividade. Esses aspectos motivaram-nos a estudar se as alterações causadas por estresse podem ser revertidas ou atenuadas pelo enriquecimento do ambiente. Há evidências que sugerem um importante envolvimento de células gliais e de transportadores de glutamato presentes nessas células em modelos animais de transtornos psiquiátricos. Sendo assim, investigamos a expressão de mRNA e proteínas de dois transportadores de glutamato gliais e um neuronal, do receptor de glutamato AMPA, de marcadores gliais GFAP, S100 β , glutamina sintase (GS) e do marcador de neurônios maduros NeuN na camada molecular e granular do giro denteado do hipocampo de ratos de 60 dias. Observamos que a separação materna diminui a expressão das proteínas GLAST, GLT-1, GS e NeuN, reduz a expressão dos genes *Gria1* (AMPA) e S100 β , e aumenta a expressão da proteína EAAC1 no giro denteado. Nossos dados sugerem uma reversão das alterações causadas pela separação materna em relação ao gene *Gria1*/AMPA e às proteínas GLAST, GLT-1 e EAAC1 após o enriquecimento ambiental. Portanto, o enriquecimento ambiental pode reverter as modificações causadas pela separação

materna nas vias glutamatérgicas. Esses efeitos benéficos podem ser investigados para auxiliar no tratamento de transtornos psiquiátricos relacionados à separação materna.

Palavras-chave: Astrócitos. Transportadores de glutamato. AMPA. Separação materna. Enriquecimento ambiental.

ABSTRACT

Maternal separation and environmental enrichment: involvement of glial cells, glutamate transporters and glutamate receptors in the hippocampus of young rats. 2017. 110f.

Dissertação (Mestrado em Neurociência) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Human development can be influenced by the environment. Stimuli received throughout life determine its progress and success. Positive stimuli lead to development of skills, improving cognitive and memory functions, while negative stimuli may predispose to pathologies such as stress. Stressful events during childhood increase the predisposition to psychiatric disorders throughout life. Maternal separation, an animal model of postnatal stress, promotes several behavioral and encephalic changes. Animals submitted to maternal separation stage behaviors associated with psychiatric diseases in humans. On the other hand, some researches have suggested that environmental enrichment may have some beneficial effects on the reversal or attenuation of behavioral and encephalic modifications promoted by animal models of depression, schizophrenia, anxiety and hyperactivity, which motivates us to study if these changes, stirred by this kind of stress, can be reversed or mitigated by environmental enrichment. There are evidences suggesting the involvement of glial cells and glutamate transporters existent in these cells in psychiatric disorders and animal models of these disorders. Therefore, we investigated mRNA and protein expression of two glial and one neuronal glutamate transporters, AMPA glutamate receptor, glial markers GFAP, S100 β , glutamine synthase (GS), and the NeuN neuronal marker in the molecular and granular layer of the hippocampal gyrus in sixty-days-old rats. We observed that maternal separation decreases expression of GLAST, GLT-1, GS and NeuN proteins, reduces Gria1 (AMPA) and S100 β gene expression, and increases EAAC1 protein expression in the dentate gyrus. After environmental enrichment, our data suggests a reversal of the maternal separation changes in the Gria1/AMPA gene and the GLAST, GLT-1 and EAAC1 proteins. Therefore, environmental enrichment may reverse the maternal separation changes in the glutamatergic pathways. These beneficial effects may be investigated to aid in the treatment of psychiatric disorders related to maternal separation.

Key words: Astrocytes. Glutamate transporters. AMPA. Maternal separation. Environmental enrichment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - (A) Circuito hipocampal da via tradicional trissináptica excitatória, (córtex entorrinal (CE) -GD-CA3-CA1-CE) é representada pelas setas em amarelo. Os axônios dos neurônios da camada II no córtex entorrinal são projetados para o giro dentado através da via perforante (VP). O giro dentado projeta os axônios para as células piramidais de CA3. Os neurônios piramidais de CA3 fazem conexões com os neurônios piramidais de CA1. Os neurônios piramidais CA1 projetam de volta para o CE. (B) Diagrama de outras vias do hipocampo. CA3 também recebe projeções diretas dos neurônios da camada II do CE através da VP e recebe projeções dos próprios neurônios. CA1 recebe a entrada direta de neurônios da camada III do CE.....33

Figura 2 - (A) Ciclo glutamato/glutamina. No terminal pré-sináptico o glutamato é envolvido por vesículas sinápticas transportadoras de glutamato (vGluT), estas se ancoram a membrana plasmática pelas proteínas do complexo SNARE. Após a fusão da vesícula com a membrana plasmática ocorre a liberação do glutamato na fenda sináptica. Receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA) estão localizados na membrana de neurônios pós-sinápticos. Após a despolarização da membrana íons sódio (Na^+) permeiam AMPA, esse mecanismo faz com que o íon de magnésio (Mg^{2+}) desbloqueie NMDA onde permite que Ca^{2+} entre na célula e, em sequência, acontece o disparo da LTP. O glutamato é retirado da fenda sináptica através de transportadores excitatórios de aminoácidos (EAATs). Dentro do astrócito, o glutamato é metabolizado em glutamina pela enzima glutamina sintase, em seguida a glutamina é liberada dos astrócitos e absorvida pelos neurônios pré-sinápticos onde se reinicia o ciclo glutamato/glutamina (POPOLI et al., 2011, modificado). (B) A fusão da vesícula sináptica na membrana pré-sináptica. Sinaptotagmina, uma das proteínas vesiculares possuem os domínios, C2A e C2B. O domínio C2B é o sensor de cálcio; após um estímulo, o Ca^{2+} invade o citosol pré-terminal através de um canal específico na membrana pré-sináptica (*Calcium gated ion Chanel*) formando um fugaz micro domínio de Ca^{2+} perto do sítio de extrusão produzindo a ativação do domínio C2A (sensor que gatilha a fusão das membranas vesiculares e pré-sinápticas) e o glutamato é liberado por exocitose na fenda sináptica. Todo este processo mede-se em milissegundos.....39

Figura 3 - Experimento da separação materna. 49

Figura 4 - Caixas de polipropileno (41,00 x 34,00 x 16,00 cm) para enriquecimento ambiental, com brinquedos.	50
Figura 5 - Microdissecção da Camada molecular (a) e Camada granular(b) do hipocampo de ratos. Sequências das fotos: foto panorâmica do hipocampo (1,5x) (A,F), regiões antes da microdissecção (6,3x) (C,H) e depois da microdissecção (6,3x) (B,D,G,I) e amostras nos tubos coletores (20x) (E,J) no Sistema de Microdissecção a Laser Leica LMD6500.....	52
Figura 6 - Padronização dos anticorpos para <i>western blotting</i>	58
Figura 7 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene <i>Slc1a1</i> camada granular (CG) e molecular (CM) do hipocampo: caixa padrão (C) separação materna (SM), ambiente enriquecido (AE) e separação materna e ambiente enriquecido (SMAE) em animais de ± 60 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos na região da camada molecular (a) tampouco na região da camada granular (b) ($p > 0,05$). Houve diferença significativa entre as regiões (c) ($*p < 0,05$).	60
Figura 8 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene <i>Slc1a2</i> : Na camada molecular (a), nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos ($p > 0,05$). Na camada granular (b) houve diferença significativa do grupo EA em relação ao grupo SMEA ($*p < 0,05$). Entre as regiões houve diferença significativa (c) ($*p < 0,05$).	61
Figura 9 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene <i>Slc1a3</i> : na camada molecular (a), nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos ($p > 0,05$), porém, observou-se uma tendência à repressão da expressão do gene no grupo EA em relação aos grupos CP e SMEA. Na camada granular (b) nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos ($p > 0,05$). Entre as regiões houve diferença significativa (c) ($p < 0,05$), houve diferença significativa entre as regiões nos grupos SM e SMEA ($**p < 0,05$).	62
Figura 10 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene <i>Gfap</i> : na camada molecular (a), nenhuma diferença estatisticamente significante foi observada entre os grupos ($p > 0,05$). Na camada granular (b), nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos ($p > 0,05$). Já entre as regiões houve diferença significativa (c) ($*p < 0,05$).	63
Figura 11 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene <i>S100β</i> : Na camada molecular, observaram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SM e EA ($*p < 0,05$) e uma tendência entre CP e SM ($p = 0,057$). Na camada granular, a expressão do gene foi estatisticamente significante entre os grupos SM e EA ($*p < 0,05$). Entre as regiões houve	

diferença significativa (c) ($p < 0,05$) e houve diferença significativa entre as regiões em todos os grupos (** $p < 0,05$).	64
Figura 12 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene Rbfox3: na camada molecular (a), nenhuma diferença estatisticamente significante foi observada entre os grupos ($p > 0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene não foi estatisticamente significante em relação aos grupos ($p > 0,05$). Houve diferença nas regiões entre os grupos (c) (* $p < 0,05$).	65
Figura 13 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene Gria1: na camada molecular (a), nenhuma diferença estatisticamente significante foi observada entre os grupos ($p > 0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene no grupo SM foi estatisticamente significante em relação aos outros grupos (* $p < 0,05$). Entre as regiões não houve diferença significativa (c) ($p > 0,05$), porém, houve diferença significativa entre as regiões nos grupos CP e EA (** $p < 0,05$).	66
Figura 14 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene Gria2: na camada molecular (a), nenhuma diferença estatisticamente significante foi observada entre os grupos ($p > 0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene não foi estatisticamente significante em relação aos grupos ($p > 0,05$). Entre as regiões houve diferença significativa (c) (* $p < 0,05$).	67
Figura 15 - Expressão proteica de EAAT3: na camada molecular (a), nenhuma diferença estatisticamente significante foi observada entre os grupos ($p > 0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene foi estatisticamente significante em SM em relação aos outros grupos (* $p < 0,05$). Entre as regiões houve diferença significativa (c) ($p < 0,05$). Porém, observou-se maior expressão na camada molecular em relação a granular nos grupos EA e SMEA (** $p < 0,05$).	68
Figura 16 - Expressão proteica de EAAT2: na camada molecular (a), houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (* $p < 0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene não foi estatisticamente significante entre os grupos ($p > 0,05$). Entre as regiões não houve diferenças significativas (c) ($p > 0,05$).	69
Figura 17 - Expressão proteica de EAAT1: na camada molecular (a), houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene não foi estatisticamente significante entre os grupos ($p > 0,05$). Entre as regiões houve diferenças significativas (c) ($p < 0,05$).	70
Figura 18 - Expressão proteica de Gfap: na camada molecular (a), não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p > 0,05$). Na camada granular (b), a expressão	

do gene não foi estatisticamente significativo entre os grupos ($p > 0,05$). Entre as regiões houve diferenças significativas (c) ($p < 0,05$). 71

Figura 19 - Expressão proteica de GS: na camada molecular (a), houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($*p < 0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene não foi estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Entre as regiões não houve diferenças significativas (c) ($p > 0,05$). 72

Figura 20 - Expressão proteica de NeuN: na camada molecular (a), houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($*p < 0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene foi estatisticamente significativa entre os grupos ($*p < 0,05$). Entre as regiões houve diferenças significativas (c) ($*p < 0,05$). 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclatura, genes SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A6 e SLC1A7 e primeiros trabalhos de purificação das proteínas EAAT1, EAAT2, EAAT3, EAAT4 e EAAT5.	42
Tabela 2 - Genes utilizados no qRT-PCR.	55
Tabela 3 - Anticorpos utilizados no estudo da expressão proteica por Western Blotting.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE	Aminoácidos Excitatórios
ACTH	Adrenocorticotrofina
AE	Ambiente Enriquecido
AMPA	ácido-amino-3-hidroxi-5metil-isoxazol-4-propiónico
ATP	Adenosina Trifosfato
C	Caixa Padrão
CA	Corno de Amón
CA1	Corno de Amón 1
CA2	Corno de Amón 2
CA3	Corno de Amón 3
CETEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CPF	Córtex Pré-Frontal
CREB	fator de transcrição para a diferenciação neuronal, sobrevivência e plasticidade sináptica mediada por potencialização a longo prazo-LTP)
CRH	hormônio Liberador de Corticotrofina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	ácido desribonucleico
DS	Ratos Sprague-Dawley
DSM-5	American Psychiatric Association (Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais 5º edição)
EAAC1	carregador excitatório de aminoácido (transportador em roedores)
EAAT1	Transportadores de Aminoácidos Excitatórios 1
EAAT2	Transportadores de Aminoácidos Excitatórios 2
EAAT3	Transportadores de Aminoácidos Excitatórios 3
EAAT4	Transportadores de Aminoácidos Excitatórios 4
EAAT5	Transportadores de Aminoácidos Excitatórios 5
EAATs	Transportadores de Aminoácidos Excitatórios
EUA	Estados Unidos da América

GD	Giro Denteado
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GLAST	Transportador de Glutamato de Aspartato
GLT-1	Transportadores de Glutamato 1
GLT-1	Glutamato
GluR1/AMPA	Receptor de Glutamato Gria1
GR	Glicocorticoides
Gria2 (GluR2/AMPA)	Receptor de Glutamato Gria2
GS	Glutamina Sintase
GTN	glutamina
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
KA	Kainato
LTP	Potenciação de Longa Duração
MDD	mood depression disorder
MGluR1/ mGluR2	receptor de glutamato metabotrópico 1 e 2
MRNA	ácido ribonucleico mensageiro
MRS	Mineralocorticoide
NeuN	Marcador de neurônio
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NR1	subunidade 1 de NMDA
NR2 (NR2A-D)	subunidade 2 de NMDA
NR3 (NR3A-B)	subunidade 3 de NMDA
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPCs	oligodendrocyte progenitor cells (células progenitoras de oligodentrócitos)
Rbfox3 (NeuN)	gene presente nos neurônios
REH	Ratos Espontaneamente Hipertensos
RNA	ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
S100β	Proteína de ligante de cálcio
Slc1a1	Transportador neuronal EAAC1/EAAT3
Slc1a2	Transportador glial GLT-1/EAAT2

Slc1a3	Transportador glial GLAST/EAAT1
SM	Separação Materna
SMAE	Separação materna e Ambiente enriquecido
SNAP25	Proteína sinaptosomal associada de 25 kDa
SNARE (syntaxina-1 ou syntaxina-2)	Receptor de proteína de ligação de fator sensível a N-etilmaleimida solúvel
SNC	Sistema Nervoso Central
T.A.	Temperatura Ambiente
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
VGlut	Vesículas Sinápticas
WKY	Ratos Wistar-Kyoto

SUMÁRIO

1 Introdução	23
1.1 Transtornos psiquiátricos e estresse no início da vida	23
1.2 O modelo de estresse: separação materna.....	26
1.3 Enriquecimento ambiental	29
1.4 Hipocampo	32
1.5 Células da glia e neurônios	35
1.6 Sistema glutamatérgico.....	38
1.7 Estresse e o glutamato.....	44
2 Objetivos.....	47
2.1 Objetivo geral	47
2.2 Objetivos específicos	47
3 Materiais e métodos.....	48
3.1 Animais	48
3.2 Separação Materna.....	48
3.3 Enriquecimento ambiental	49
3.4 Microdissecção	50
3.5 Expressão de mRNA.....	53
3.6 Extração de RNA	53
3.7 Síntese de cDNA.....	54
3.8 Pré-amplificação do cDNA.....	54
3.9 PCR quantitativo em tempo real	55
3.10 Expressão proteica	56
3.11 Extração de proteínas.....	56
3.12 SDS-PAGE	56
3.13 Western blot.....	57
3.14 Estatística	58
4 Resultados	59
4.1 qRT-PCR	59

4.1.1 Gene <i>Slc1a1</i> (EAAC1/EAAT3) - transportador neuronal de glutamato	59
4.1.2 Gene <i>Slc1a2</i> (GLT1/EAAT2) - transportados glial de glutamato	60
4.1.3 Gene <i>Slc1a3</i> (GLAST/EAAT1) - transportados glial de glutamato	61
4.1.4 Gene <i>Gfap</i>	62
4.1.5 Gene <i>S100β</i>	63
4.1.6 Gene <i>Rbfox3</i> (NeuN)	64
4.1.7 Gene <i>Gria1</i>	65
4.1.8 Gene <i>Gria2</i>	66
4.2 Expressão proteica	67
4.2.1 EAAC1 (EAAT3) - Transportador neuronal	67
4.2.2 GLT1 (EAAT2) transportador de glutamato glial	68
4.2.3 GLAST (EAAT1) – transportador de glutamato glial	69
4.2.4 GFAP	70
4.2.5 Glutamina sintase	71
4.2.6 NeuN	72
5 Discussão	74
5.1 Os efeitos da separação materna	74
5.1.1 Transportadores gliais - GLAST e GLT-1	74
5.1.2 Transportador neuronal - EAAC1	77
5.1.3 Glutamina sintase	78
5.1.4 GFAP e S100 β	81
5.1.5 NeuN	82
5.1.6 Receptor de glutamato – Gria1 e Gria2 (AMPA)	84
5.2 Os efeitos do enriquecimento ambiental	85
6 Conclusões	89
REFERÊNCIAS	90
Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética	110

1 Introdução

1.1 Transtornos psiquiátricos e estresse no início da vida

Transtornos mentais são caracterizados por perturbação clinicamente significativa na cognição, na regulação emocional ou no comportamento de um indivíduo, que reflete uma disfunção nos processos psicológicos, biológicos ou de desenvolvimento subjacentes ao funcionamento mental. Estão frequentemente associados a sofrimento ou incapacidade significativos que afetam atividades sociais, profissionais ou outras atividades importantes (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA), 2013).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) mostra que abordagens quanto à validação dos critérios diagnósticos para transtornos mentais categóricos distintos incluíram os seguintes tipos de evidências: validadores de antecedentes (marcadores genéticos semelhantes, traços familiares, temperamento e exposição ambiental), validadores concorrentes (substratos neurais semelhantes, biomarcadores, processamento emocional e cognitivo e similaridade de sintomas) e validadores preditivos (curso clínico e resposta aos tratamentos semelhantes). É preciso destacar que houve um esforço considerável por parte da Força-tarefa da APA/ DSM-5 e da Organização Mundial da Saúde (OMS) para separar os conceitos de transtorno mental e incapacidade.

Contudo, na ausência de marcadores biológicos evidentes ou de medidas de gravidade clinicamente úteis para vários transtornos mentais, não foi possível separar totalmente as expressões de sintomas normais e de sintomas patológicos inseridos nos critérios diagnósticos. Essa lacuna nas informações é problemática, sobretudo em situações clínicas nas quais a apresentação em si dos sintomas do paciente (em especial em formas leves) não é inerentemente patológica e pode ser encontrada em indivíduos para os quais um diagnóstico de “transtorno mental” seria inadequado (APA, 2013).

O desenvolvimento humano pode ser influenciado pelo ambiente. Estímulos recebidos ao longo da vida determinam seu progresso e sucesso. Estímulos positivos levam ao desenvolvimento de habilidades, melhorando funções cognitivas e da memória, enquanto estímulos negativos podem predispor a patologias (APA, 2013). Situações aversivas como perda parental, negligência emocional e física estão associadas ao desenvolvimento de

distúrbios psicológicos ao longo da vida (HEIM; NEMEROFF, 2001; ELLENBROEK et al., 2016).

Estima-se que 25% da população mundial seja afetada por algum tipo de transtorno mental ao longo da vida (GILLIES et al., 2015). Dado que é confirmado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a qual relata que aproximadamente 350 milhões de pessoas sofrem de depressão e 21 milhões de esquizofrenia. Estudos afirmam que a predisposição a transtornos psiquiátricos como depressão maior, esquizofrenia, déficit de atenção/hiperatividade e ansiedade podem estar associados a eventos estressantes pós-natais (POST et al., 1998; ANDERSON et al., 1999; ANAND; SCALZO, 2000; VAN DEN BUUSE; GARNER; KOCH, 2003; HOLMES et al., 2005; RACEKOVÁ et al., 2009; HULSHOF et al., 2011; ROQUE et al., 2014; ELLENBROEK et al., 2016).

A depressão é caracterizada por humor alterado, falta de interesse nas atividades diárias, distúrbios alimentares, perda ou ganho de peso, insônia ou hipersonia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga, sentimento de inutilidade ou culpa, dificuldade de concentração, pensamentos de morte, idealização ou tentativa de suicídio (APA, 2013). Portanto, o transtorno causa grande impacto na vida pessoal, familiar e social do indivíduo, além de promover alterações comportamentais e fisiológicas no Sistema Nervoso Central (SNC) (SANCHEZ et al., 2001; ARBORELIUS et al., 2004; ARBORELIUS; EKLUND, 2007; BAEK et al., 2011).

Esse é um problema de saúde pública. A pesquisa realizada por Bromet e colaboradores (BROMET et al., 2011) mostrou dados sobre a prevalência, deficiência e correlatos demográficos da depressão em 18 países de alta e baixa renda. Os autores constataram que a prevalência da depressão maior é mais significativa em países de alta renda, porém, o Brasil mostrou índices muito altos da prevalência da doença, sendo 10,4% da população da região metropolitana de São Paulo entre 18 e 34 anos. Nos Estados Unidos da América (EUA), o transtorno tem alta prevalência e está associado a elevados custos na saúde. (KESSLER et al., 2005; KESSLER et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2015). Dados da OMS apontam que mais de 800.000 pessoas suicidam-se todos os anos no mundo, sendo a segunda maior causa de morte entre os jovens de 15 e 29 anos (OMS, 2016).

Outro transtorno psiquiátrico relacionado ao estresse na infância é a esquizofrenia, a qual se caracteriza por sintomas positivos como alucinação, ilusão, discurso desconexo, comportamento desorganizado ou catatônico e sintomas negativos como avolição, diminuição

da expressão emocional, alogia, anedonia e associalidade (APA, 2013). Um estudo com modelo animal de esquizofrenia mostrou que filhotes separados da mãe por 24 horas sofrem alterações morfológicas dos neurônios no córtex pré-frontal (AKSIĆ et al., 2013; AKSIĆ et al., 2014). Alterações neuroquímicas também foram observadas em animais adultos separados das mães por 180 minutos durante duas semanas (ELLENBROEK et al., 2016).

O estresse no início da vida também está relacionado com transtornos de ansiedade, caracterizados pelos distúrbios relacionados ao medo e à ansiedade excessiva. O medo é uma resposta natural a uma ameaça real, enquanto a ansiedade é a uma antecipação de uma futura ameaça em potencial. Os distúrbios caracterizam-se pelos constantes estados de perigo, alerta, fuga, vigilância, tensão muscular e comportamentos cautelosos e de esquiva (APA, 2013). Estudos em animais mostraram que a separação materna (SM) resulta em comportamentos relacionados à depressão em humanos (CUI et al., 2006; ZHANG et al., 2013).

Já o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é uma doença relacionada ao neurodesenvolvimento, e também é estudada por modelos de estresse. Os sintomas aparecem na infância e adolescência, caracterizados pela dificuldade em habilidades específicas tais como atenção e concentração e podem apresentar um quadro de hiperatividade (APA, 2013). O TDAH causa dificuldades na escola e no meio social (APA, 2013) e sua origem é desconhecida, porém, existem indícios de que o estresse pós-natal pode colaborar para o seu desenvolvimento e evidências mostram que existe o envolvimento dos sistemas glutamatérgico e GABAérgico nesse distúrbio (STERLEY et al., 2016).

Aproximadamente 10-20% de crianças e adolescentes apresentam algum tipo de transtorno mental e metade tem início na adolescência por volta de 14 a 20 anos de idade (OMS, 2016). Transtornos psiquiátricos podem apresentar características similares, como déficits cognitivos, isolamento social, mudanças na responsividade a estímulos aversivos, entre outros (APA, 2013). O modelo de separação materna mostra-se eficiente nos estudos de doenças relacionadas a transtornos psiquiátricos e contribuem para melhor entendermos o funcionamento do estresse pós-natal e suas consequências no desenvolvimento.

Em animais que sofreram separação materna, e que foram submetidos ao estresse por meio de desmame precoce, mostraram importantes diferenças comportamentais, apresentaram também diferenças na expressão de receptores ionotrópicos de glutamato NMDA (MONTALVO-ORTIZ et al., 2016). A avaliação de todos os transportadores de glutamato e das vias de síntese / degradação de glutamato também poderia explicar os efeitos da separação

materna, particularmente se os dados de mRNA e proteína diferirem (PICKERING et al., 2006). O hipocampo é também muito sensível aos efeitos do estresse uma vez que esta estrutura contém muitos receptores de glicocorticoides. Alterações nesse sistema podem ser ativadas pela desregulação de glicocorticoides, conhecidos como hormônios do estresse e influenciar a expressão de glutamato (DANBOLT, 2001). Muitos estudos clínicos mostram uma redução no volume do hipocampo em adultos que foram vítimas de abusos sexuais e negligência na infância (ANDERSEN; TEICHER, 2004). O estresse promove alterações estruturais e funcionais em regiões do cérebro semelhantes às observadas em adultos com depressão (KAUFMAN et al., 2000). Alterações no sistema glutamatérgico do hipocampo podem ajudar a explicar essas observações clínicas. Isso também pode explicar algumas das diferenças comportamentais observadas após a separação materna. A separação materna é utilizada como modelo animal para estudos de diversas características observadas em transtornos psiquiátricos.

1.2 O modelo de estresse: separação materna

Eventos estressantes durante o início da vida causados por separação materna, negligência e abuso sexual podem levar ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na vida adulta (POST et al., 1998; ANDERSON et al., 1999; ANAND; SCALZO, 2000; VAN DEN BUUSE et al., 2003; HOLMES et al., 2005; RACEKOVÁ et al., 2009; HULSHOF et al., 2011; ROQUE et al., 2014; ELLENBROEK et al., 2016). Além disso, o estresse no período pós-natal promove modificações comportamentais e fisiológicas em diferentes áreas do SNC, similares às observadas em indivíduos com depressão maior (SANCHEZ et al., 2001; ARBORELIUS et al., 2004; ARBORELIUS; EKLUND, 2007; BAEK et al., 2011). Pacientes com esquizofrenia também apresentam modificações encefálicas que poderiam ser causadas por distúrbios no período perinatal, o que afetaria o desenvolvimento normal do SNC (ELLENBROEK et al., 1998). Estudos de Ellenbroek e colaboradores (1998) mostraram que, em modelos animais, após 24 horas de separação materna ratos demonstraram uma ruptura na inibição de pré-pulso (do inglês *prepulse inhibition* - PPI), comportamento associado aos distúrbios observados em pacientes com esquizofrenia.

Estudos *post-mortem* e de neuroimagem funcional em humanos mostraram que modificações como redução do volume hipocampal e baixa atividade do córtex pré-frontal

(hipofrontalidade) são frequentes em indivíduos com transtornos psiquiátricos. Além disso, como os sintomas da esquizofrenia muitas vezes têm seu início em resposta ao estresse, esses mecanismos de estresse podem ser fundamentais para o declínio da doença. A exposição ao estresse torna as redes do córtex pré-frontal (CPF) enfraquecidas devido à perda de espinhos dendríticos. Um número notável de elementos genéticos envolvidos com esquizofrenia aflige moléculas que normalmente servem para inibir a resposta ao estresse no CPF (LUCASSEN et al., 2006; CZÉH; LUCASSEN, 2007; FREY et al., 2007; WEBER et al., 2008; MCKINNON et al., 2009; HEDGES; WOON, 2010; MCINTYRE et al., 2010; WOON; SOOD; HEDGES, 2010; VOLK; LEWIS, 2010; ARNSTEN, 2011; BOCK; BRAUN, 2011; DIAMOND, 2011; FUSAR-POLI et al., 2011; HOFTMAN; LEWIS, 2011).

Diversos protocolos de separação materna mimetizam alterações comportamentais e neurofisiológicas relacionadas aos sintomas da esquizofrenia (ELLENBROEK et al., 1998; WEISS et al., 2001; VAN DEN BUUSE et al., 2003; MILLSTEIN et al., 2006; ANGLIN et al., 2008; CHEN et al., 2011; LLORENTE-BERZAL et al., 2012; NIWA et al., 2011) transtornos de ansiedade (MCINTOSH et al., 1999; WIGGER; NEUMANN, 1999; KALINICHEV et al., 2002; BARNA et al., 2003; DANIELS et al., 2004), déficit de atenção e hiperatividade (SPIVEY et al., 2009). A proposta desse modelo é estudar as bases neurobiológicas, bem como alvos terapêuticos para o tratamento de transtornos psiquiátricos.

Estudo de Pickering e colaboradores (PICKERING et al., 2006), observou alterações na expressão gênica das subunidades dos receptores de glutamato NR2B, GluR1, GluR2 e do transportador de glutamato GLAST no hipocampo de ratos submetidos à separação materna nos dias 1-21. Os autores mostraram que ratos MS360 (manipulação de 360 minutos) tinham menor expressão de NR2B e nenhuma alteração em NR2A em relação ao grupo MS15. Relataram ainda uma diminuição da expressão de mRNA de ambas as subunidades AMPA GluR1 e GluR2 e um aumento do transportador de glutamato GLAST em ratos MS360 em relação a MS15. Por fim, não houve diferenças na expressão entre os grupos MS15 e controle (sem manipulação) o que indica que as observações foram resultado de efeitos no grupo MS360 e não de manipulação ou diferenças no cuidado materno. A redução da expressão de genes e proteínas pode ser devido à morte celular, à causa da excitotoxicidade ou por apoptose, na densidade de neurônios no GD de animais submetidos à separação materna (ORELAND et al., 2009). O estresse pode ter ativado o aumento da corticosterona o que pode diminuir a neurogênese hipocampal (LAJUD et al., 2012). Aksić e colaboradores (AKSIĆ et

al., 2013) também observaram a diminuição da proteína NeuN no GD e CA1 em ratos jovens de 60 dias submetidos à privação materna de 24 horas.

Em outra análise sobre os cuidados maternos, Katsouli e colaboradores (KATSOULI et al., 2014) observaram por meio da separação materna de 15 minutos, que a expressão do gene GluR1 em machos foi maior que nos animais-controles, mostrando que os cuidados maternos são diretamente relacionados a regulações, manutenções e equilíbrio do sistema glutamatérgico.

Animais que sofrem separação materna por 24 horas mostram que esse evento estressante equivale aos distúrbios que ocorrem em pacientes com esquizofrenia (ELLENBROEK et al., 1998). Em animais submetidos ao mesmo protocolo de separação materna, foi observada diminuição na espessura do córtex pré-frontal, retrosplenial e motor em comparação com o grupo controle, redução do volume hipocampal, diminuição da proteína NeuN nas regiões de CA1 e giro denteado, revelando que o estresse precoce na vida tem um efeito a longo prazo sobre a morfologia das regiões cognitivas do cérebro (AKSIĆ et al., 2013).

Sterley e colaboradores (STERLEY et al., 2016) mostraram os efeitos da separação materna sobre o transportador GLT-1 em três linhagens diferentes de ratos, sendo uma linhagem de modelo animal de TDAH com ratos espontaneamente hipertensos (REH) e as outras linhagens com ratos Wistar-Kyoto (WKY), que são controle dos primeiros, e ratos Sprague-Dawley (SD). Concluíram que a separação materna aumentou os níveis de GLT-1 no hipocampo das três linhagens. No mesmo trabalho, também analisaram o efeito de GLT-1 apenas nos animais modelo para TDAH em relação ao controle e observaram a redução do transportador GLT-1 e o aumento de GLT1b no hipocampo desses animais, essas modulações dos transportadores podem ocorrer devido ao aumento do glutamato extracelular.

Em outro estudo, Musholt e colaboradores (MUSHOLT et al., 2009) investigaram o número de astrócitos imunorreativos para GFAP, S100 β e GFAP/pCREB (CREB é um fator de transcrição para a diferenciação neuronal, sobrevivência e plasticidade sináptica mediada por potencialização a longo prazo - LTP) em animais submetidos a separação materna de 1 e 6 horas comparados com o controle no hipocampo. Não observaram diferenças para GFAP e S100 β , mas a marcação para GFAP/pCREB mostrou uma redução nas células gliais em animais de 1 e 6 horas comparados ao grupo controle (MUSHOLT et al., 2009).

Em estudos de nosso Laboratório de Estrutura Sináptica ¹ analisamos animais submetidos à separação materna de 180 minutos por 14 dias e observamos redução na neurogênese do giro denteado do hipocampo de ratos jovens (MERLO et al., 2014, dados não publicados). Animais submetidos à separação materna apresentam redução do número de neurônios na camada granular do hipocampo na idade adulta, sugerindo diminuição da neurogênese hipocampal ou aumento da apoptose neuronal (FABRICIUS; WÖRTWEIN; PAKKENBERG, 2008). O período de maior neurogênese acontece junto com o período hiporresponsivo ao estresse, no pós-natal (SAPOLSKY; MEANEY, 1986). Portanto, o estresse precoce, como a separação materna, pode interferir com a maturação normal dos neurônios modulando negativamente as sinapses excitatórias no hipocampo, levando a um aumento da vulnerabilidade para doenças psiquiátricas.

Estudos mostram que os tratamentos com fármacos melhoram os sintomas de alguns transtornos psiquiátricos (MONROY et. al., 2010; RONG et al., 2010; CHEN et al., 2014). Por outro lado, estudos apresentam grandes benefícios do enriquecimento ambiental em relação a alguns sintomas de transtornos psiquiátricos (SÁENZ; VILLAGRA; TRÍAS, 2006).

1.3 Enriquecimento ambiental

O enriquecimento ambiental é um cenário experimental no qual os animais são expostos a diferentes estímulos. A interação social, exercícios físicos, exploração livre do espaço, a dinâmica dos alimentos que podem ser criados ao longo do período em que os animais estão na gaiola e os estímulos novos como brinquedos, escadas, túneis, materiais de assentamento entre outros são exemplos de como se pode criar um ambiente para novas experiências sensoriais e cognitivas, experiências que contribuem para a formação de novas informações (FOX; MERALI; HARRISON, 2006; DIAMOND, 2011).

Uma nova informação é adquirida pelo sistema nervoso por meio de experiências ambientais, provocando mudanças de comportamento perante os diferentes desafios, constituindo um processo de aprendizagem. Logo, é necessário um mecanismo de decodificação, armazenamento e evocação dessas informações, a memória. Os efeitos do ambiente enriquecido estão associados à plasticidade cerebral e podem causar modificações

---

¹ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).

morfológicas, comportamentais, anatômicas e fisiológicas (PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000; LARSSON; WINBLAD; MOHAMMED, 2002).

Estas modificações podem ter o efeito benéfico atenuando ou mesmo reverter comportamentos e alterações encefálicas promovidas por modelos animais de transtornos psiquiátricos como a depressão, esquizofrenia, ansiedade e hiperatividade (BRENES; RODRÍGUEZ; FORNAGUERA, 2008b; BRENES et al., 2008a; HENDRIKSEN et al., 2010; SCHLOESSER et al., 2010; WORKMAN et al., 2011; CHOURBAJI et al., 2012).

Animais submetidos ao enriquecimento ambiental apresentaram menor reatividade a estímulos estressantes (SEGOVIA et al., 2008). Ratas em período de lactação foram submetidas ao ambiente enriquecido e avaliadas no labirinto em cruz elevado, demonstraram maior exploração nos braços de campo aberto do labirinto e menores índices de comportamento de ansiedade e maior controle emocional. Outro achado foi que a prole desses animais mostrou o mesmo comportamento no labirinto sugerindo influências epigenéticas e também um efeito duradouro (LARSSON et al., 2002; FRISKE; GAMMIE, 2005; FOX et al., 2006). O enriquecimento ambiental mostrou efeitos antidepressivos e ansiolíticos em modelos animais de depressão e ansiedade (SÁENZ et al., 2006).

Francis e colaboradores (FRANCIS et al., 2002) investigaram os efeitos do enriquecimento ambiental sobre a separação materna e mostraram que os níveis de corticosterona no plasma de animais expostos à separação materna foi maior do que nos animais-controle. No grupo de animais expostos a separação materna e enriquecimento ambiental esses níveis foram revertidos a níveis similares aos do controle, o mesmo aconteceu nos testes comportamentais em que houve diminuição de exploração do ambiente no grupo da separação materna e maior exploração nos grupos controle e separação materna e ambiente enriquecido (FRANCIS et al., 2002). Também analisaram a expressão de mRNA do gene do Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH), constatando uma redução na separação materna, e o ambiente enriquecido não teve efeito sobre essa diminuição da expressão.

Animais submetidos a ambientes enriquecidos comparados a animais em ambientes empobrecidos apresentaram maior facilidade de aprendizagem e adaptação, o que pode estar relacionado ao fato de que animais provenientes de ambientes enriquecidos tiveram um aumento de receptores de glicocorticoides o que pode diminuir os níveis de corticosterona do plasma, diminuindo comportamentos relacionados a ansiedade (LARSSON et al., 2002).

Diamond e colaboradores (DIAMOND et al., 1966), foram os pioneiros no estudo dos efeitos do enriquecimento ambiental em alterações encefálicas. Observaram aumento no número de células gliais no córtex visual de ratos submetidos ao enriquecimento ambiental.

O exercício físico exerce um papel neuroprotetor, no entanto, os mecanismos sob essa relação ainda não são bem compreendidos. Um estudo realizado com ratos Sprague-Dawley mostrou que ratos submetidos ao treino de esteira antes de ter um acidente vascular cerebral isquêmico apresentaram aumento da expressão da proteína EAAT2 e menor volume de enfarte cerebral e déficits neurológicos em relação aos outros grupos que não foram submetidos aos exercícios previamente (WANG et al., 2015). O aumento da proteína sugere o papel neuroprotetor de EAAT2 na recaptação do glutamato extracelular (WANG et al., 2015).

Ratos submetidos ao estresse de restrição crônica de 6 horas por dia, durante 21 dias, mostraram diminuição da sobrevivência e da diferenciação das células progenitoras (VEENA et al., 2009). Porém, quando comparados aos submetidos ao enriquecimento ambiental (6 horas dia, por 10 dias) observou-se melhora dos resultados, os animais também foram submetidos a testes comportamentais e mostraram uma diminuição de sinais comportamentais relacionado à depressão (VEENA et al., 2009).

Cui e colaboradores (CUI et al., 2006) observaram que ratos submetidos ao estresse no início da vida tiveram déficits cognitivos e comportamentos nos testes de labirinto aquático de Morris e nado forçado relacionados à depressão em seres humanos, mas não houve reversão quando submetidos ao enriquecimento ambiental. No entanto, o estudo eletrofisiológico sobre a LTP em CA1 mostrou que os animais estressados apresentavam LTP prejudicada e que aconteceu a recuperação da LTP quando submetidos ao enriquecimento. Essas evidências mostram que os déficits cognitivos e o comportamento depressivo estão associados com a recuperação da LTP no hipocampo.

Os efeitos do enriquecimento ambiental sobre a separação materna podem contribuir para novas informações a respeito dos mecanismos de reversão ou atenuação para o tratamento de sintomas de transtornos psiquiátricos e desenvolvimento de novas abordagens clínicas e de prevenção (LAVIOLA et al., 2008). Como também os conhecimentos sobre como funcionam as bases moleculares no encéfalo de animais submetidos ao enriquecimento ambiental podem ser usados para desenvolver novos fármacos para tratamentos de doenças psiquiátricas (LAVIOLA et al., 2008).

1.4 Hipocampo

O hipocampo é uma região do cérebro vulnerável a eventos estressantes, alterações na plasticidade sináptica mediada pela LTP podem prejudicar o aprendizado e levar a déficits de memória, interferir na neurogênese, e alterar a neurotransmissão (ELLENBROEK; VAN DEN KROONENBERG; COOLS, 1998; CZÉH; LUCASSEN, 2007; ARNSTEN, 2011; BOCK; BRAUN, 2011).

No hipocampo ocorrem processos de aprendizagem e memória, é uma das regiões mais estudadas do cérebro, recebe terminais de diferentes áreas e tem alta plasticidade neuronal (AMARAL; WITTER, 1989; WITTER, 1989; MORA et al., 2012). Ao contrário do que os primeiros neurocientistas pensavam sobre o desenvolvimento cerebral, esta região continua em desenvolvimento após o nascimento e é uma região vulnerável ao estresse, havendo grandes desregulações funcionais, morfológicas, neuroanatômicas e comportamentais em modelos de animais submetidos ao estresse crônico (AMARAL; WITTER, 1989; WITTER, 1989; CZÉH; LUCASSEN, 2007; ARNSTEN, 2011; BOCK; BRAUN, 2011; POPOLI et al., 2011).

A formação hipocampal é constituída pelos Cornos de Amon (CA), giro denteado (GD), córtex entorrinal e subicular (AMARAL; WITTER, 1989; WITTER, 1989; AMARAL; SCHARFMAN; LAVENEX, 2007). Além disso, é composto por várias camadas de células altamente organizadas (AMARAL et al., 2007; DENG; AIMONE; GAGE, 2010). O hipocampo recebeu este nome devido à semelhança com um cavalo marinho (do grego *hippo* que significa “cavalo” e *Kampos* que significa “monstro marinho”) com início no septo rostral para o caudal do córtex temporal (AMARAL; WITTER, 1989; WITTER, 1989; AMARAL et al., 2007; DENG et al., 2010). As camadas são identificadas pelos tipos de células. A principal camada celular é formada pelas células piramidais que formam o CA, divididos em CA1, CA2 e CA3. O GD é formado por três camadas: a camada molecular, a camada granular e a camada polimórfica (AMARAL et al., 2007; DENG et al., 2010).

O giro denteado é a região onde se encontra o primeiro passo para o tratamento de informações sensoriais (YECKEL; BERGER, 1990; AMARAL et al., 2007; DENG et al., 2010). Devido a sua projeção unidirecional, é uma das regiões do hipocampo mais estudadas. As projeções são glutamatérgicas excitatórias, conhecidas como circuito trissináptico (AMARAL; WITTER, 1989; WITTER, 1989; YECKEL; BERGER, 1990; NAKAGAMI;

SAITO; MATSUKI, 1997). Este começa no córtex entorrinal faz projeções para o hipocampo pela via de entrada no giro denteado conhecido como via perfurante que, por sua vez, faz suas conexões com as vias de entrada de CA3.

Figura 1 - (A) Circuito hipocampal da via tradicional trissináptica excitatória, (córtex entorrinal (CE) -GD-CA3-CA1-CE) é representada pelas setas em amarelo. Os axônios dos neurônios da camada II no córtex entorrinal são projetados para o giro dentado através da via perfurante (VP). O giro dentado projeta os axônios para as células piramidais de CA3. Os neurônios piramidais de CA3 fazem conexões com os neurônios piramidais de CA1. Os neurônios piramidais CA1 projetam de volta para o CE. (B) Diagrama de outras vias do hipocampo. CA3 também recebe projeções diretas dos neurônios da camada II do CE através da VP e recebe projeções dos próprios neurônios. CA1 recebe a entrada direta de neurônios da camada III do CE.

Fonte: (DENG et al., 2010, modificado).

Existem outras vias intrínsecas dentro do hipocampo formadas pela via de projeções colaterais de Schaffer onde as projeções do córtex entorrinal são diretamente enviadas para CA1, CA2 e CA3 (AMARAL et al., 2007; DENG et al., 2010). CA3 envia seus axônios em CA3 e CA1. CA1 retorna suas projeções para o córtex entorrinal e também para o subículo que envia seus axônios para o córtex entorrinal novamente (AMARAL; WITTER, 1989; WITTER, 1989; AMARAL et al., 2007; DENG et al., 2010).

Outras estruturas de regiões subcortais também fazem conexões com o hipocampo como *locus ceruleus*, os núcleos da rafe e a formação reticular que conectam ao hipocampo por células do septo medial e o núcleo da banda diagonal de Broca, porém, essas estruturas

fazem sinapses colinérgicas e GABAérgicas (AMARAL et al., 2007). No entanto, a maior projeção do hipotálamo para o giro denteado vem do núcleo supramamilar, cujas projeções, são excitatórias glutamatérgicas e terminam, em grande maioria, na camada granular, outras na camada polimórfica e o restante na camada molecular (AMARAL et al., 2007).

A camada molecular é quase isenta de células, sendo composta por dendritos da camada granular, fibras da via perfurante, pequeno número de interneurônios, fibras de uma variedade de entradas intrínsecas e células gliais (AMARAL; WITTER, 1989; AMARAL et al., 2007). Amaral e colaboradores (AMARAL et al., 2007) descrevem pelo menos dois tipos de neurônios que podem ser encontrados na camada molecular. Os primeiros neurônios são localizados nas camadas mais profundas da molecular, seus corpos celulares são multipolares ou triangulares, e dão origem ao axônio que produz terminais que fazem sinapses com dois terços da camada molecular e são células associada à via perfurante da camada molecular. O outro tipo de neurônio é conhecido por célula axo-axônica, estes são semelhantes às células encontradas no neocórtex. O neurônio projeta seu axônio da camada molecular para a camada granular e termina fazendo contatos sinápticos simétricos, em axônios de segmentos de células granulares. Células que fazem sinapses entre axônios podem inervar em até 1000 células da camada granular (AMARAL; WITTER, 1989; AMARAL et al., 2007). É provável que estas forneçam um meio adicional de controle das sinapses inibitórias de células granulares (AMARAL et al., 2007). A camada molecular do giro denteado recebe as projeções do córtex entorrinal. Os terminais entorrinais são projetados aos exteriores da camada molecular, local onde se formam as sinapses assimétricas que respondem por quase 85% do total das terminações axo-espinhos dendríticos (axo-espinhosas) (AMARAL; WITTER; 1989; AMARAL et al., 2007). Na camada molecular se encontram os dendritos da camada granular e nesta região encontramos as sinapses tripartidas formadas por neurônios pós e pré-sinápticos e astrócito.

A camada granular é composta por uma camada de neurônios granulares densamente sobreposta (AMARAL; WITTER; 1989; AMARAL et al., 2007). Os neurônios do giro denteado projetam os dendritos para a camada molecular, o soma encontra-se na camada granular e os axônios, que não possuem mielina, são conhecidos por fibras musgosas, que fazem sinapses com neurônios da camada polimórfica e se projetam em direção de CA3 (AMARAL et al., 2007). A camada granular do giro denteado é formada por células granulares que têm formato elíptico e podem ter 10um de largura e 18um de altura

(AMARAL; WITTER; 1989). As células são sobrepostas e, na maioria das vezes, não existe bainha glial entre elas. As células da glia, como os astrócitos, são localizadas entre a camada molecular e granular ou a camada polimórfica. Os axônios das células da granular são peculiares por terem a formação de fibras musgosas, “botões” em que acontecem as sinapses com as células da camada polimórfica e com as células piramidais de CA3 do hipocampo (AMARAL; WITTER; 1989; AMARAL et al., 2007). O giro denteado também recebe conexões, além do córtex entorrinal, de regiões subcorticais e projeções do núcleo supramamilar do hipotálamo que são, em sua maioria, excitatórias (AMARAL et al., 2007).

A camada polimórfica é composta por uma variedade de neurônios. Os mais comuns são os neurônios piramidais, o corpo celular dessas células é grande e podem ter formato triangular ou multipolar, três ou mais dendritos originam-se do corpo celular, têm longas extensões pela camada polimórfica e são bem ramificados (AMARAL; WITTER; 1989). Alguns desses dendritos atravessam a camada granular e terminam na camada molecular. Os espinhos dendríticos proximais e distais são diferentes no neurônio, os proximais são densos e grandes já os distais diminuem a densidade e são menores, em ratos as células da camada polimórfica raramente fazem contatos com as células de CA3 e sim com as fibras musgosas do giro denteado (AMARAL; WITTER; 1989; AMARAL et al., 2007). Células fusiformes, multipolares e triangulares fazem conexões tanto na camada granular como na molecular. As células multipolares da camada polimórfica estão associadas a neurônios GABAérgicos e a neurônios glutamatérgicos na camada molecular (AMARAL et al., 2007).

O estresse no início da vida pode afetar a plasticidade hipocampal (DERKS et al., 2016). Funções cognitivas, memória e aprendizagem são dependentes das vias glutamatérgicas do hipocampo (TSIEN; HUERTA; TONEGAWA, 1996; ANDIN et al., 2007).

1.5 Células da glia e neurônios

Células da glia são células não neuronais que ocupam grande parte do volume do cérebro (BARRES, 2008; EROGLU; BARRES, 2010). São essenciais para o funcionamento e sobrevivência dos neurônios (BARRES, 2008; EROGLU; BARRES, 2010, POPOLI et al., 2011; PEREA; SUR; ARAQUE, 2014). No entanto, por muito tempo pensou-se que fossem apenas um suporte de sustentação no sistema nervoso, sendo consideradas como uma espécie

de tecido conjuntivo (SOMJEN, 1988; BOLTON; EROGLU, 2009). Hoje sabe-se que algumas de suas funções são primordiais para a neurotransmissão, porém, muitas delas ainda são desconhecidas (BARRES, 2008).

Existem diferentes tipos de células da glia, as principais são os astrócitos, oligodentrócitos, micróglia e células precursoras de oligodentrócitos (oligodendrocyte progenitor cells - OPCs), todas localizadas no SNC, enquanto as células de Schwann são encontradas no sistema nervoso periférico e têm a mesma função dos oligodentrócitos no SNC (BARRES, 2008; BOLTON; EROGLU, 2009; MADHUSUDANAN; READE; SHANKARAPPA, 2016). A origem de astrócitos e oligodentrócitos são de células estaminais de neurônios. Já a micróglia tem origem no sistema imunológico (EROGLU; BARRES, 2010).

As células da micróglia respondem a lesões inflamatórias do SNC, por meio da fagocitose e liberação de toxinas, afim de proteger o cérebro de danos (ALLEN; BARRES, 2009; BOLTON; EROGLU, 2009). Oligodentrócitos envolvem os axônios dos neurônios do SNC, formando uma camada rica em gordura chamada mielina. Essas células são responsáveis pela condução dos impulsos elétricos rápidos ao longo dos axônios mielínicos (ALLEN; BARRES, 2009; BOLTON; EROGLU, 2009).

Os astrócitos são as principais células da glia, presentes em maior quantidade no cérebro (BOLTON; EROGLU, 2009). Contribuem para a homeostase do cérebro conectando vasos sanguíneos e neurônios (unidade neurovascular), participam do equilíbrio das sinapses, fornecem energia para os neurônios e regulam os neurotransmissores (BARRES, 2008; ALLEN; BARRES, 2009; BOLTON; EROGLU, 2009; EROGLU; BARRES, 2010). São divididos em dois tipos: astrócitos protoplasmáticos e fibrosos. Os protoplasmáticos estão localizados na substância cinzenta, são muito ramificados, associados a corpos neuronais, fazendo conexões com vasos sanguíneos. Os fibrosos estão na substância branca em contato com axônios e fazem conexões com nódulos de Ranvier (BARRES, 2008; ALLEN; BARRES, 2009; BOLTON; EROGLU, 2009).

Um astrócito pode fazer conexões com aproximadamente 100 mil sinapses (BUSHONG et al., 2002; PEREA et al., 2014). Estão envolvidos em diferentes tipos de sinalizações fisiológicas nas funções cerebrais (PEREA et al., 2014). A excitabilidade da célula da glia, por meio da sinalização de íons cálcio (Ca^{2+}) pode influenciar a ação de neurônios, regular a liberação de neurotransmissores nas sinapses e induzir ou inibir o

desenvolvimento das mesmas (AGULHON et al., 2008; ALLEN; BARRES, 2009; BOLTON; EROGLU, 2009). Evidências apontam que o aumento de proteínas ligantes de Ca^{2+} associadas aos astrócitos alteraram a atividade neuronal de receptores de glutamato, ácido-amino-3-hidroxi-5metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e N-metil-D-Aspartato (NMDA) (SELIG et al., 1995; CUMMINGS et al., 1996; EROGLU; BARRES, 2010).

Astrócitos maduros expressam a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), principal filamento intermediário do citoesqueleto, que auxilia na forma e dá suporte mecânico para a membrana plasmática dessas células. A GFAP é uma importante marcadora de astrócitos, lesões ou doenças no SNC que modificam sua expressão (ENG; GHIRNIKAR; LEE, 2000; MIDDELDORP; HOL, 2011; RAJKOWSKA; STOCKMEIER, 2013; HOL; PEKNY, 2015). Alterações na expressão de GFAP são diferentes ao longo do desenvolvimento e envelhecimento do cérebro, o que mostra as diferentes funções dos astrócitos em diferentes períodos de tempo, assim como alterações na expressão de GFAP podem modificar sua morfologia e afetar outras células do cérebro (MIDDELDORP; HOL, 2011). A diminuição na expressão de GFAP em diferentes áreas do cérebro está relacionada com alguns transtornos psiquiátricos (RAJKOWSKA; STOCKMEIER, 2013). Hughes e colaboradores (HUGHES et al., 2004) mostraram em ratos com fenótipo nulo para GFAP, que a falta da proteína pode estar relacionada a importante função na modulação de astrócitos e neurônios na via glutamatérgica, como a menor expressão de EAAT1 e EAAT3 sinaptossomais, assim como a perda de GFAP mostrou uma inabilidade do tráfico de glutamato pelo transportador EAAT2.

Outro marcador de astrócitos é a proteína ligante de cálcio S100 β , a qual pode ser liberada por astrócitos protoplasmáticos e oligodentrócitos, regula a forma celular, metabolismo energético, contração, comunicação célula-a-célula, transdução de sinal intracelular e crescimento celular (ZIMMER et al., 1995; PINTO et al., 2000; HEIZMANN; FRITZ; SCHÄFER, 2002; BRAUN et al., 2009). Nos astrócitos, interage com o GFAP interferindo na regulação do citoesqueleto (ZIEGLER et al., 1998; GARBUGLIA et al., 1999a; GARBUGLIA et al., 1999b). Selinfreund e colaboradores (SELINFREUND et al., 1990), utilizando cultura de células gliais, mostraram que a inibição de S100 β resulta em modificação morfológica, afeta as estruturas do citoesqueleto e a regulação da proliferação de células da glia.

Miguel-Hidalgo e colaboradores (MIGUEL-HIDALGO et al., 2010), utilizando amostras humanas *post-mortem* de pacientes com depressão maior ou depressão associada ao

alcooolismo, detectaram menor imunorreatividade para os marcadores astrocíticos glutamina sintase (GS) e proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no córtex pré-frontal (CPF) de pacientes com depressão maior e menor imunorreatividade para os transportadores de glutamato gliais EAAT2 (GLT1) e EAAT1 (GLAST) também no CPF de pacientes com depressão maior ou depressão associada ao alcooolismo. Rajkowska e colaboradores (RAJKOWSKA et al., 2000) encontraram, em amostras *post-mortem* de pacientes com episódios depressivos maior, um número reduzido de células gliais.

Modelos animais de estresse crônico diminuíram significativamente os astrócitos corticais e hipocampais marcados com GFAP, assim como observaram déficits comportamentais e mostraram que poderia ser devido a lesões corticais em células da glia, especialmente astrócitos. Essas modificações observadas, na depressão maior, sugerem a importância dessas células como alvos para a ação dos medicamentos antidepressivos e mesmo tratamentos alternativos (RAJKOWSKA; STOCKMEIER, 2013).

Como podemos observar, vários estudos em humanos e modelos animais sugerem o importante envolvimento das células da glia bem como de transportadores de glutamato, sistema glutamatérgico, em transtornos psiquiátricos.

1.6 Sistema glutamatérgico

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no SNC (SCHOUSBOE 1981; ORREGO; VILLANUEVA, 1993). A interação com seus receptores e/ou proteínas de membrana celular dá-se na fenda sináptica no espaço extracelular, mantendo, assim, o equilíbrio no ciclo do glutamato essencial para a sobrevivência celular (BERG; GARFINKEL, 1971; DANBOLT, 2001; ZHANG et al., 2013; ZHOU; DANBOLT, 2014; SHINODA et al., 2016).

O ciclo glutamato-glutamina ocorre nas sinapses tripartidas, nas quais estão localizados os terminais pré e pós-sinápticos e um astrócito (EROGLU; BARRES, 2010). O glutamato pode ser metabolizado através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) em que o alto metabolismo oxidativo do glutamato promoverá a produção de adenosina trifosfato (ATP) dentro dos astrócitos ou, então, convertido em glutamina e liberado para o meio extracelular (ZHOU; DANBOLT, 2014; MCKENNA et al., 2016).

Figura 2 - (A) Ciclo glutamato/glutamina. No terminal pré-sináptico o glutamato é transportado por vesículas sinápticas (VS), estas se ancoram a membrana plasmática pelas proteínas do complexo SNARE. Após a fusão da vesícula com a membrana plasmática ocorre a liberação do glutamato na fenda sináptica. Receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA) estão localizados na membrana de neurônios pós-sinápticos. Após a despolarização da membrana íons sódio (Na^+) permeiam AMPA, esse mecanismo faz com que o íon de magnésio (Mg^{2+}) desbloqueie NMDA onde permite que Ca^{2+} entre na célula e, em sequência, acontece o disparo da LTP. O glutamato é retirado da fenda sináptica através de transportadores excitatórios de aminoácidos (EAATs). Dentro do astrócito, o glutamato é metabolizado em glutamina pela enzima glutamina sintase, em seguida a glutamina é liberada dos astrócitos e absorvida pelos neurônios pré-sinápticos onde se reinicia o ciclo glutamato/glutamina (POPOLI et al., 2011, modificado). (B) A fusão da vesícula sináptica na membrana pré-sináptica. Sinaptotagmina, uma das proteínas vesiculares possuem os domínios, C2A e C2B. O domínio C2B é o sensor de cálcio; após um estímulo, o Ca^{2+} invade o citosol pré-terminal através de um canal específico na membrana pré-sináptica (*Calcium gated ion Chanel*) formando um fugaz micro domínio de Ca^{2+} perto do sítio de extrusão produzindo a ativação do domínio C2A (sensor que gatilha a fusão das membranas vesiculares e pré-sinápticas) e o glutamato é liberado por exocitose na fenda sináptica. Todo este processo mede-se em milissegundos.

Fonte: (POPOLI et al., 2011, modificado, MIKOSHIBA et al., 1995, modificado).

Nos terminais pré-sinápticos, a enzima glutaminase hidrolisa a glutamina, em seguida as vesículas sinápticas (VGlut) envolvem o glutamato (ZHOUE; DANBOLTT, 2014). Quando um potencial de ação ativa o terminal pré-sináptico, as vesículas migram até ancorarem na membrana plasmática (SÖLLNER, 1995; HONG, 2005; JAHN; SCHELLER, 2006; SÜDHOF; ROTHMAN, 2009). As proteínas do complexo SNARE (syntaxina-1 ou

sintaxina-2) e SNAP25 da membrana plasmática e as proteínas vesiculares (sinaptobrevina-1 ou sinaptobrevina-2) (HONG, 2005; JAHN; SCHELLER, 2006; SHIN et al., 2009; SÜDHOF; ROTHMAN, 2009; ZHOU; DANBOLT, 2014). A fusão da vesícula sináptica e da membrana plasmática ocorrem através da proteína sinaptotagmina que possui dois domínios C2A e C2B, o processo é dependente de Ca^{2+} , esta proteína é capaz de se ligar ao complexo SNARE na ausência de Ca^{2+} , porém, para a fusão com a membrana plasmática, o Ca^{2+} tem que estar presente, depois da fusão ocorre a liberação do glutamato por exocitose na fenda sináptica (FUKUDA et al., 1995a; FUKUDA et al., 1995b; MIKOSHIBA et al., 1995; LLINÁS et al., 2004).

Nos terminais pós-sinápticos, existem dois tipos de receptores de glutamato: ionotrópicos e metabotrópicos (DINGLELINE et al., 1999; DODD et al., 2000; POPOLI et al., 2011). Os receptores de glutamato ionotrópicos são N-metil-D-Aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e Kainato (KA), estes participam de uma neurotransmissão rápida. Os receptores metabotrópicos são acoplados às proteínas G (mGluR1 e mGluR2) e participam de respostas mais lentas nas membranas pós-sinápticas (DINGLELINE et al., 1999; DODD et al., 2000). Os receptores ionotrópicos e metabotrópicos estão diretamente ligados à eficácia da sinapse excitatória, transmissão sináptica, plasticidade, funções de memória e aprendizagem (ANDIN et al., 2007; POPOLI et al., 2011).

Os receptores de glutamato têm importantes funções para manter a homeostase intracelular. Receptores NMDA são compostos de subunidades sendo: NR1 e NR2 (NR2A-D) e NR3 (NR3A-B), estão localizados na membrana plasmática de neurônios pós-sinápticos e são permeáveis ao Ca^{2+} (CHEN; LUO; RAYMOND, 1999). O glutamato se liga aos receptores, no entanto, quando a membrana plasmática está em potencial de repouso, os canais dos receptores de NMDA estão bloqueados pelo íon magnésio (Mg^{2+}). A despolarização da membrana ocorre quando os receptores AMPA são ativados permitindo o influxo de sódio (Na^{+}). O influxo de Na^{+} expulsa o íon Mg^{2+} dos receptores NMDA que, juntamente com um rápido influxo de Ca^{2+} pelo canal, induzem a LTP (CHEN et al., 1999).

AMPA é outro receptor de glutamato chave para a manutenção da plasticidade sináptica (KATSOULI et al., 2014). Estão localizados em baixos níveis nas mitocôndrias e altamente concentrados em membranas plasmáticas sinápticas e no citoplasma de neurônios pós-sinápticos (HAMPSON et al., 1992). Receptores de AMPA estão envolvidos na formação

de memória durante a LTP, e na ativação direta dos receptores de NMDA (SAKIMURA et al., 1995). A diminuição na regulação dos dois receptores causam diminuição da LTP e consequentemente perda de plasticidade sináptica e déficits na aprendizagem espacial e de memória (SAKIMURA et al., 1995). Os receptores NMDA e AMPA estão envolvidos tanto na plasticidade sináptica como na excitotoxicidade dos neurônios (PICKERING et al., 2006).

O glutamato em altas concentrações extracelulares é também uma potente neurotoxina. (SHINODA et al., 2016). O neurotransmissor estimula os receptores de glutamato que podem aumentar o influxo de Ca^{2+} nos terminais pós-sinápticos, o excesso de Ca^{2+} desregula a homeostase celular, o que leva à excitotoxicidade e, consequentemente, à morte celular (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003). Quando liberado na fenda sináptica, a recaptação do glutamato excedente ocorre através dos transportadores de glutamato (EAATs) nas membranas de astrócitos e neurônios. Nos astrócitos, a enzima glutamina sintase (GS) metaboliza o glutamato em glutamina (GTN) (Mckenna et al., 2016). A glutamina é liberada pelos astrócitos e transportada para os terminais pré-sinápticos, onde o ciclo recomeça, portanto, o ciclo glutamato-glutamina exerce um efeito neuroprotetor (ZHOU; DANBOLT, 2014).

Os transportadores de glutamato são responsáveis pelo *clearance* (limpeza do glutamato excedente na fenda sináptica), após a sua liberação pelo terminal pré-sináptico (DANBOLT, 2001). Os transportadores de glutamato são dependentes de Na^+ e codificados pelos genes da família SLC1 (DANBOLT, 2001). Os transportadores de glutamato são divididos em 5 subtipos de proteínas: EAAT1 (transportador de glutamato de Aspartato - GLAST/Slc1a3) e EAAT2 (transportador de glutamato 1 - GLT-1/Slc1a2) específicos de células da glia, porém, existem outros estudos que mostram a presença destes transportadores em neurônios (RIMMELE; ROSENBERG, 2016). As proteínas EAAT3 (EAAC1/Slc1a1), EAAT4 e EAAT5 estão presentes em neurônios, sendo EAAT3 localizadas principalmente em neurônios do hipocampo, EAAT4 e EAAT5 no cerebelo e retina, respectivamente (DANBOLT, 2001). Ver tabela 1.

Tabela 1 - Nomenclatura, genes SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC1A6 e SLC1A7 e primeiros trabalhos de purificação das proteínas EAAT1, EAAT2, EAAT3, EAAT4 e EAAT5.

Nomenclatura EAAT	Nome do gene	Nome em ratos	Nome de clonagem original
EAAT1	SLC1A3	GLAST	GLAST (Storck et al. 1992)
EAAT2	SLC1A2	GLT-1	GLT-1 (Pines et al. 1992)
EAAT3	SLC1A1	EAAC1	EAAC1(Kanai and Hediger 1992)
EAAT4	SLC2A6		EAAT4 (Fairman et al. 1995)
EAAT5	SLC1A7		EAAT5 (Arriza et al. 1997)

Para evitar o excesso de glutamato na fenda sináptica, o transportador tem que ser altamente expresso na membrana plasmática e tem que estar adjacente às sinapses (CHOLET et al., 2002; O'SHEA, 2002; ROBERTS; ROCHE; MCCULLUMSMITH, 2014). O GLT1 (EAAT2) é o transportador mais abundante das células gliais, representa 80% de proteínas no hipocampo e 95% da recaptação do glutamato da fenda sináptica (HOLMSETH et al., 2012; ZHANG et al., 2013). GLAST (EAAT1) representa 20% das proteínas do hipocampo de um rato jovem e é seis vezes mais lento na recaptação de glutamato do que GLT-1 (HOLMSETH et al., 2012). A quantidade de cada transportador varia durante o desenvolvimento. O GLAST é predominante durante o desenvolvimento pós-natal e é encontrado em astrócitos imaturos e células radiais da glia, enquanto o GLT-1 é abundante em astrócitos maduros (FURUTA; ROTHSTEIN; MARTIN, 1997; SCHREINER et al., 2014; HANSON et al., 2015). Os transportadores de glutamato podem prevenir excitotoxicidade, liberar glutamina para os neurônios, modular a transmissão de glutamato e produzir energia (TAKAHASHI; FOSTER; LIN, 2015). São localizados no hipocampo em CA1, CA2, CA3 e no GD. Rothstein e colaboradores (ROTHSTEIN et al., 1994) observaram no giro denteado que GLT1 foi mais intenso do que os outros transportadores e GLAST tinha uma expressão mais uniforme em todo hipocampo. Em cortes de microscopia eletrônica do hipocampo, GLT-1 e GLAST foram localizados dentro das membranas de fibras astrogliais em todo o neurópilo (CHAUDHRY et al., 1995). A localização dos transportadores de glutamato destacam sua importância nas sinapses. GLAST pode ser localizado nos astrócitos, no soma, no axônio, nos espinhos

dendríticos de neurônios pré-sinápticos, na densidade pós-sináptica (PSD) e em células endoteliais (TORP et al., 1994; CHAUDHRY et al., 1995; SCHMITT et al., 1996; TORP et al., 1997). GLT1 é encontrado nas membranas plasmática dos astrócitos, associados a mitocôndrias especialmente dos astrócitos, ocasionalmente em neurônios e sendo mais marcante na PSD (GENDA et al., 2011; ROBERTS et al., 2014). GLAST E GLT-1 são encontrados em terminais pós-sinápticos de sinapses assimétricas (excitatórias) normalmente, mas não se restringem somente a estas, sendo encontrados em sinapses GABAérgicas (MINELLI et al., 2001; ROBERTS et al., 2014).

O EAAC1 (EAAT3) é expresso em todos os neurônios do prosencéfalo, nos corpos celulares e dendritos, em especial no pescoço de espinhos dendríticos. No hipocampo é extremamente expresso em CA1, CA2 e CA3, porém, sua expressão é menos intensa no giro denteado (ROTHSTEIN et al., 1994). EAAT3 / EAAC1 também é expresso em células de origem glial, em subconjuntos de oligodentrócitos e não estão presentes nos axônios ou astrócitos. Sua prevalência maior é intracelular, representa 1% das proteínas no hipocampo e é 1,5 vez mais lento na depuração do glutamato do que GLT-1 (DANBOLT, 2001; HOLMSETH et al., 2012; ZHANG et al., 2013). A função de EAAT3 / EAAC1 está relacionada com a regulação da transmissão glutamatérgica, quando a expressão inicial sugere um papel para EAAT3 na neuroproteção de células do SNC durante o desenvolvimento do cérebro (BIANCHI et al., 2014). EAAT3 também é expresso em células de Schwann, células do intestino e nos rins, onde é responsável pela absorção/reabsorção de aminoácidos dicarboxílicos. Em muitos outros tecidos, no sistema nervoso central, é expresso em neurônios glutamatérgicos, neurônios GABAérgicos e neurônios dopaminérgicos. A modulação de EAAT3 é feita por mecanismos pós-traducionais em que podem modificar rapidamente o tráfico e quantidade na membrana plasmática (BIANCHI et al., 2014). O transportador de glutamato neuronal também transporta cisteína, e melhora o fluxo do aminoácido para os neurônios e, assim, por meio da absorção de cisteína EAAT3, contribui para a síntese de glutathione, um dos antioxidantes intracelulares mais importantes (CHEN; SWANSON, 2003).

Os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) são importantes para a redução da concentração de glutamato na fenda sináptica, pois não existem evidências de qualquer enzima que degrade o glutamato extracelular (TAKAHASHI et al., 2015). A maior

parte do glutamato liberado nas sinapses é absorvido pelos EAATs de tipo glial, EAAT2 (GLT-1) e EAAT1 (GLAST) (DANBOLT, 2001; BIANCHI et al. 2014).

Os transportadores agem rapidamente para captar o glutamato liberado na fenda sináptica, para evitar o início da excitotoxicidade, efeito que leva à morte celular (BEURRIER et al., 2010; VERMA et al., 2010; QIAN et al. 2011). Sendo assim, as células gliais, astrócitos principalmente, e os transportadores de glutamato possuem papel neuroprotetor, anti-apoptótico e facilitador da migração e a sobrevivência neuronal (KOEBERLE; BÄHR, 2008).

1.7 Estresse e o glutamato

Estresse é a resposta do organismo a um fator estimulante (estressor) do ambiente ou interno. De forma tênue, pode promover resposta adaptativa e melhoras no desempenho da memória, cognição e aprendizagem, porém, quando crônico ou excessivo pode gerar patologias como distúrbios psiquiátricos, por exemplo, depressão, esquizofrenia e transtorno de ansiedade (POPOLI et al., 2011; GROENEWEG et al., 2011).

Respostas exacerbadas ao estresse sugerem uma hiperfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (BIAGINI et al., 1998; MCINTOSH; ANISMAN; MERALI, 1999; WIGGER; NEUMANN, 1999; HUOT et al., 2001; KALINICHEV et al., 2002; NISHI; HORII-HAYASHI; SASAGAWA, 2014). O aumento de glicocorticoides pode levar a uma desregulação nos sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos, disfunções nesses sistemas estão relacionadas a fatores estressantes (POPOLI et al., 2011; MORA et al., 2012). Um evento estressor ativa o núcleo paraventricular, fazendo-o liberar o hormônio corticotrofina (CRF). Em seguida, ocorre a estimulação da hipófise para liberar adrenocorticotrofina (ACTH), sendo assim, os corticosteroides são liberados pelas glândulas suprarrenais (GROENEWEG et al., 2011).

Os glicocorticoides são tipos de corticosteroides liberados pelas glândulas suprarrenais. A corticosterona e o cortisol são glicocorticoides presentes em roedores e humanos, respectivamente. O aumento do hormônio corticosterona está relacionado à resposta ao estresse pela ativação e regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), este pode mudar a concentração de neurotransmissores no hipocampo, córtex pré-frontal, hipotálamo, amígdala e modificar funções e estruturas encefálicas (MCINTOSH et al., 1999; WIGGER;

NEUMANN, 1999; KALINICHEV et al., 2002; BARNA et al., 2003; DANIELS et al., 2004; MORA et al., 2012).

Dois tipos de receptores são responsáveis pelo acesso dos glicocorticoides nas células nervosas, mineralocorticoide (MR) e glicocorticoides (GR) (MEIJER et al., 2005). No hipocampo, quando administradas doses de corticosterona para produzir o efeito do estresse, observa-se rápido aumento na liberação de glutamato e maiores níveis de aminoácidos excitatórios (AAE) na fenda sináptica. O excesso de corticosterona no hipocampo leva uma alta excitabilidade de neurônios do giro denteado que, por sua vez, causa a excitotoxicidade nas células de CA3 (LOWY; GAULT; YAMAMOTO 1993; VENERO; BORRELL, 1999; SAPOLSKY, 1999).

Compreender o efeito do sistema dos transportadores de glutamato é importante para a aplicação de novos tratamentos. Observou-se, no hipocampo e no córtex frontal de animais submetidos ao estresse pós-natal crônico, um aumento nos níveis de expressão de GLAST e diminuição nos níveis de expressão GLT1 e EAAT3 opostos pela ativação de um mecanismo compensatório para prevenir a excitotoxicidade (ODEON et al., 2015).

Zhang e colaboradores (ZHANG et al., 2013) mostraram que o estresse gestacional tem efeito sobre os transportadores e receptores de glutamato nos filhotes, que apresentaram um comportamento depressivo nos testes e uma baixa regulação de EAAT2, EAAT3 além de uma variação na subunidade de AMPA (GluR1/ Gria1) no hipocampo de ratos adolescentes.

Em modelos animais que promovem hiperatividade e déficit cognitivos associados à hipoatividade do córtex pré-frontal (CPF) relataram aumento nos níveis de transportadores gliais de glutamato (MURAI et al., 2007) sugerindo menor atividade pré-frontal uma vez que os transportadores gliais são altamente eficientes na remoção desse neurotransmissor excitatório da fenda sináptica em diversas estruturas encefálicas (DANBOLT, 2001; HUANG; BERGLES, 2004; MURAI et al., 2007; VERKHRATSKY; KIRCHHOFF, 2007; LEE; POW, 2010; JIANG; AMARAL, 2011).

Karlsson e colaboradores (KARLSSON et al., 2009) mostraram que camundongos nulos para o transportador GLAST (EAAT1) apresentam hiperatividade locomotora. Lu e colaboradores (2011) mostraram que os déficits cognitivos promovidos pelo tratamento pré-natal com fenilciclidina (antigo agente anestésico relacionado a efeitos alucinógenos e de neurotoxicidade) são revertidos pelo bloqueio farmacológico do transportador GLAST cuja expressão está aumentada nesses animais. A desregulação do sistema glutamatérgico pode

---

estar envolvida em sintomas de doenças psiquiátricas (ZHANG et al., 2013; ODEON et al., 2015).

Este trabalho investigou os efeitos da separação materna e enriquecimento ambiental, a fim de observar as alterações na expressão de genes e proteínas das vias glutamatérgicas no giro denteado do hipocampo de ratos de 60 dias.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar a interferência da separação materna e enriquecimento ambiental sobre a expressão de genes e proteínas das células da glia, transportadores e receptores de glutamato no hipocampo de ratos jovens.

2.2 Objetivos específicos

a) Verificar se a separação materna e o enriquecimento ambiental interferem na expressão de mRNA para os genes de transportadores de glutamato Slc1a3 (transportador glial GLAST/EAAT1), Slc1a2 (transportador glial GLT-1/EAAT2), Slc1a1 (transportador neuronal EAAC1/EAAT3), receptor de glutamato Gria1 (GluR1/AMPA), Gria2 (GluR2/AMPA), Rbfox3 (NeuN), S100 β (Proteína ligante de cálcio) e Gfap (codificador da proteína ácida fibrilar da glia, presente em astrócitos) na camada granular e camada molecular do giro denteado do hipocampo de ratos jovens.

b) Analisar a expressão de proteínas EAAT2 (GLT-1), EAAT1 (GLAST), EAAT3 (EAAC1), NeuN, GFAP, Glutamina Sintase (GS) na camada granular e camada molecular do giro denteado do hipocampo de ratos submetidos ou não à separação materna e enriquecimento ambiental.

3 Materiais e métodos

3.1 Animais

Os animais utilizados nos experimentos foram manipulados de acordo com as leis nacionais e internacionais (Diretriz de Conselho da Comunidade Europeia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC) e as normas éticas adotadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O projeto obteve a aprovação do CETEA processo nº 121/2014.

A espécie *Rattus norvegicus*, conhecidos como Ratos Wistar, foram mantidos à temperatura de 22°C em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso à comida e à água *ad libitum*. Os acasalamentos monogâmicos aconteceram por uma semana. Fêmeas, com 100 dias de idade, foram observadas em caixas individuais diariamente para determinar o dia do nascimento dos filhotes. O dia do nascimento ficou considerado como P0, o horário diário de verificação do nascimento das ninhadas, foi às 17 horas. No primeiro dia após o nascimento (P1) as ninhadas foram padronizadas para que todos os filhotes tivessem as mesmas condições de desenvolvimento. O experimento iniciou-se com a divisão dos animais em dois grupos: Separação Materna e Controle.

3.2 Separação Materna

No primeiro dia pós-natal (P1), observou-se o número de filhotes por ninhada, e foram utilizadas apenas ninhadas que continham de 7 a 11 filhotes. Os filhotes foram submetidos à separação materna por 180 minutos no período das 9 horas às 12 horas da manhã, entre os dias P1 e P14, diariamente foram retirados da caixa padrão e levados para à sala anexa. A fim de evitar a perda de calor dos filhotes, foram mantidos em lençóis térmicos. Após a separação, os filhotes eram devolvidos às suas mães. Até o desmame, P21, as ninhadas permaneceram em caixas padrão de polipropileno de dimensões 41,00 x 34,00 x 16,00 cm. A pesagem dos animais aconteceu nos dias P7, P14 e P21 e juntamente foi realizada a troca de maravalha. Os controles (caixa padrão) foram manipulados apenas para pesagem e troca de maravalha. No P21, juntamente com a identificação do sexo dos filhotes, os grupos experimentais, separação

materna e controle, foram subdivididos em: 1) Controle (C), 2) Separação Materna (SM), 3) Ambiente Enriquecido (AE) e 4) Separação materna e Ambiente enriquecido (SMAE).

Figura 3 - Experimento da separação materna.

3.3 Enriquecimento ambiental

Os animais foram submetidos ao ambiente enriquecido no P24. Alojados em gaiolas de aço inox nas dimensões de 100,00 (comprimento) x 50,00 (largura) x 100,00 cm (altura). As gaiolas 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, comedouros e bebedouros dispostos em diversas regiões da caixa. Os animais foram mantidos em número de 8 a 10 por gaiola. Nas caixas padrão de polipropileno (41,00 x 34,00 x 16,00 cm) os animais foram mantidos em número de 4. Semanalmente, realizou-se a limpeza das gaiolas e “brinquedos” com detergente neutro e água sanitária. Em diferentes períodos, foi realizada a troca dos “brinquedos” e adicionaram-se outros com diferentes texturas, como a diferença entre os habitrais (com ranhuras e transparentes) e tubos de PVC (lisos e escuros), para que os animais pudessem ter novas oportunidades de aprendizado. Figura 4.

Figura 4 - Caixas de polipropileno (41,00 x 34,00 x 16,00 cm) para enriquecimento ambiental, com brinquedos.

3.4 Microdissecção

Os animais foram anestesiados por inalação com isoflurano e decapitados. Os encéfalos foram imediatamente congelados e armazenados em *freezer* -80°C . No dia seguinte, os encéfalos foram seccionados no criostato em $20\mu\text{m}$ de espessura e montados em lâminas Pen-Membranas $2,0\mu\text{m}$, livres de RNase e DNase (Leica #11505189), as lâminas foram armazenadas em *freezer* -80°C , até o dia da microdissecção.

As lâminas armazenadas em *freezer* -80°C foram retiradas gradualmente e ambientadas progressivamente a -20°C por 15 minutos, 4°C por 15 minutos até chegar à temperatura ambiente. Em seguida, foram transferidas para um suporte de vidro tratado com água DEPC, coradas com Azul de Toluidina 1% por 1 minuto (o corante diluído em água DEPC, e filtrado em filtro de seringa de $0,22\mu\text{m}$), lavadas duas vezes com água DEPC por 30 segundos e uma vez com etanol 75% em água DEPC por 3 minutos e secadas em estufa a 42°C em vácuo -25 in.Hg por 10 minutos. Utilizou-se o Microdissector a Laser LMD6500

(Leica), e padronizando as condições ideais para a coleta das amostras com os parâmetros: poder 54, abertura 19, velocidade 22 e balanço do espécime 4 (Figura5).

Figura 5 - Microdissecção da Camada molecular (a) e Camada granular(b) do hipocampo de ratos. Sequências das fotos: foto panorâmica do hipocampo (1,5x) (A,F), regiões antes da microdissecção (6,3x) (C,H) e depois da microdissecção (20x) (E,I) e amostras nos tubos coletores (E,I) no Sistema de Microdissecção a Laser Leica LMD6500.

3.5 Expressão de mRNA

A expressão de mRNA para Slc1a3, Slc1a2, Slc1a1, Gfap, S100 β e Rbfox3 foi estudada nas regiões da camada granular e camada molecular do hipocampo. Foram 30 secções bilaterais, analisadas para cada animal separadamente, não utilizamos *pool* de amostras para a extração de RNA, totalizando 16 animais divididos em 4 grupos de 4 animais cada.

3.6 Extração de RNA

O RNA total foi extraído segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do *Kit PureLink™ RNA Micro (Invitrogen by Life technologies, # cat. 12183-016)*. Às amostras foram adicionadas 350 μ L de tampão de lise com 3,5 μ l β -mercaptoetanol e 5 μ l de *PureLink Carrier RNA* diluído, homogeneizadas em vórtex por 2 minutos para a lise e transferidas para um novo tubo de 1,5ml (livre de RNase e DNase). Em seguida, adicionaram-se 350 μ l de etanol 70% em água DEPC (ou igual ao volume da lise). Homogeneizou-se em vórtex até não mostrar nenhum precipitado. As amostras foram transferidas para a coluna *PureLink™ MicroKit*, com tubo coletor, por duas vezes e centrifugadas a 12000x *g* por 1 minuto T.A. Para lavagem, adicionaram-se 350 μ l de *Wash Buffer I* e centrifugaram-se a 12000x *g* por 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo tubo, previamente foram preparados 20 μ l de solução para o tratamento com DNase (10 μ l de *PureLink™ DNase* e 10 μ l de *buffer DNase* (restituído), homogeneizados suavemente e adicionados no centro da coluna incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, seguida por duas lavagens com 350 μ l de *Wash Buffer I* e centrifugadas a 12000 x *g* por 1 minuto. Adicionaram-se 500 μ l de *Wash Buffer II*, com etanol na coluna e centrifugadas a 12000 x *g* por 1 minuto. O processo foi repetido trocando o *Wash Buffer II*. Novamente, as amostras foram centrifugadas a 12000 x *g* por 1 minuto, para secar a coluna. Para eluição do RNA, foram adicionados à coluna 30 μ l de água ultrapura RNase *free* (15 μ l de cada vez), incubando-os por 1 minuto à T.A e finalmente, centrifugou-se a 12000x *g* por 2 minutos.

O RNA eluído foi adicionado à reação de 1µl de DNase I (2U), 5µl de *buffer* DNase I 10X e água RNase *free* para 50µl finais, suavemente misturados e incubados em banho-maria a 37°C por 3 horas. Para a extração do RNA e retirada da DNase I, foram adicionados 100µl de fenol tamponado, 100µl de clorofórmio puro e 150µl de água RNase *free*. Homogeneizados por 15 segundos e incubados por 3 minutos a T.A., as amostras foram centrifugadas a 12.000g a 4°C por 18 minutos. Foi retirada a fase aquosa, adicionados 500µl de Isopropanol 100% e 2,5µl de glicogênio (cat. N°10814-010, Invitrogen). As amostras permaneceram no *freezer* -80°C *overnight*.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12.000g a 4°C por 18 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500µl de Etanol 75% gelado e centrifugado a 12.000g a 4°C por 8 minutos. O álcool residual foi retirado com pipeta e o *pellet* seco a T.A. por 10 minutos. Ao *pellet* foram adicionados 14µl de água livre de RNase a 37°C e incubado por 10 minutos em gelo. As amostras foram ressuspensas com pipeta, homogeneizadas e rapidamente centrifugadas para a quantificação em espectrofotômetro *NanoVue plus* (Ge Lifesciences).

3.7 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 0,5µg de RNA total utilizando o *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®- Lot 1410200). Às amostras foram acrescidas 2µl de 10X *Reverse Transcription Buffer*, 0,8µl de 25X dNTPs, 2µl 10X de *random primers*, 1µl de *MultiScribe TM Reverse Transcriptase* 50U/ µl para os 20µl finais. A reação foi misturada e incubada no termociclador PTC-200 (*MJ Research*) com o ciclo: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos. As amostras foram armazenadas a - 20°C até a pré-amplificação do cDNA.

3.8 Pré-amplificação do cDNA

Para a pré-amplificação do cDNA foi utilizado o *TaqMan® PreAmp Master Mix Kit*. Diluíram-se 10µl do *pool* de todas as sondas dos genes analisados com 40µl de água livre de RNase. Para a reação de pré-amplificação foram misturados 10µl de *TaqMan® PreAmp 2x*, 5

μL do *pool* de sondas diluído e $5\mu\text{L}$ de cDNA. As reações foram incubadas no termociclador com o seguinte ciclo: 95°C por 10 min, 95°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.9 PCR quantitativo em tempo real

A reação de qRT-PCR foi realizada no aparelho *StepOne™ Real-Time PCR System* segundo o protocolo do fabricante do *TaqMan Master Mix* (Applied Biosystem, EUA). Para normalizar e corrigir as diferenças de amplificação provocadas por variações nas quantidades de mRNA iniciais ou por variações na eficiência de cada reação foi utilizada a amplificação do mRNA de Actina e Gapdh como controles endógenos (tabela 2). As reações para o estudo da expressão dos mRNAs de interesse tiveram volume final de $16,5\mu\text{L}$: $0,83\mu\text{L}$ *TaqMan® Gene Expression Assay* 20 $\times$ específico de cada gene, $8,25\mu\text{L}$ *TaqMan® Gene Expression Master Mix* 2 $\times$, $1\mu\text{L}$ do cDNA diluído $1\mu\text{L}$ em $90\mu\text{L}$ e $6,42\mu\text{L}$ de água RNase free. Todas as reações foram repetidas 3 vezes e os experimentos validados com o uso de controles negativos e omitindo as amostras.

Tabela 2 - Genes utilizados no qRT-PCR.

TaqMan® Gene	Gene	Comprimento	Ref. NCBI
Rn00564705_m1	<i>Slc1a1</i>	92	25550
Rn00691548_m1	<i>Slc1a2</i>	60	29482
Rn00570130_m1	<i>Slc1a3</i>	88	29483
Rn00566603_m1	<i>Gfap</i>	76	24387
Rn04219408_m1	<i>S100β</i>	67	25742
Rn01464214_m1	<i>Rbfox3</i>	81	287847
Rn00709588_m1	<i>Gria1</i>	85	50592
Rn00568514_m1	<i>Gria2</i>	122	29627
Rn00667869_m1	<i>Actb</i>	91	81822
Rn01775763_g1	<i>Gapdh</i>	174	24383

3.10 Expressão proteica

A expressão proteica para EAAT3/EAAC1, EAAT2/GLT1, EAAT1/GLAST, GFAP, glutamina sintase e NeuN foi padronizada nas regiões da camada granular e camada molecular do hipocampo. Foram 18 secções bilaterais de microdissecção, analisadas para cada animal separadamente, não utilizamos *pool* de amostras para a extração proteica, totalizando 16 animais divididos nos 4 grupos de 4 animais cada. Os animais nos quais a proteína estava muito degradada utilizamos 3 animais por grupo. A proteína endógena para normalização foi Actina.

3.11 Extração de proteínas

As regiões de microdissecção foram armazenadas a -80°C . No momento da extração proteica, as amostras foram colocadas em gelo. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10000g a 4°C , adicionaram-se às amostras 100 μl de tampão de lise RIPA (0,05M de Tris-HCL pH 8,0, 0,150M NaCl, 0,001M EDTA, 0,1% SDS) e inibidores de fosfatases e proteases (0,001M PMSF, 0,001M Benzamidina, 0,001M Na_3VO_4 , 0,005M Pirofosfato), depois foram rapidamente homogeneizados no vórtex e adicionados Bides de zircônio, para descolar o tecido da membrana de microdissecção. Em seguida, foram homogeneizados por 2 minutos em vórtex, centrifugados por 5 minutos a 10000g a 4°C e colocados em banho maria a 37°C por 30 minutos. Os tubos foram novamente homogeneizados em vórtex por 2 minutos, centrifugados por 5 minutos a 10000g a 4°C e colocados em banho maria a 37°C por mais 30 minutos. Finalmente, foram centrifugados por 5 minutos a 10000g a 4°C , e a parte solúvel foi separada da insolúvel, esta foi armazenada a -20°C . O sobrenadante foi transferido para novos tubos e as proteínas foram quantificadas no *BioPhotometro Plus* (Eppendorf, Alemanha).

3.12 SDS-PAGE

Após a quantificação, 50 μg de cada amostra foi desnaturada a 95°C por 10 min e submetidas à eletroforese em gel vertical de poli(acrilamida de 1 mm de espessura formado por um gel de empilhamento (12% de acrilamida; 30% de bis-acrilamida; 1,5 M do tampão tris-HCl, pH 8,8; 10% de SDS; 10% de persulfato de amônia e 0,04% de temed) e por um gel

de separação (5% de acrilamida; 30% de bis-acrilamida; 1 M do tampão tris-HCl, pH 6,8; 10% de SDS, 10% de persulfato de amônia e 0,1% de temed). A polimerização se fez em placas componentes do sistema de eletroforese BIO-RAD *Mini-protean tetra Cell* (#1658004).

A eletroforese de 2 géis foi realizada em tampão Tris-glicina 1 X sob corrente constante de 70mA por tempo médio de 45min. Os géis contendo as proteínas foram montados no sistema de transferência para a membrana de nitrocelulose (*Hybond-p*, *Amersham Pharmacia Biotech*, EUA) com tampão de transferência. A transferência aconteceu por 3 horas à baixa temperatura, sob corrente constante de 400mA. Ao término, o sistema foi desmontado, a membrana corada com solução de Ponceau 0,5%, lavada com água ultrapura, secada e armazenada a 4°C (TOWBIN et al., 1979).

3.13 Western blot

As membranas de nitrocelulose contendo as bandas proteicas já transferidas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% com 3% de BSA em tampão tris e 10% de *Tween* 20 (TBT) durante 2h, a TA e sob agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários (Tabela 3; figura 6), lavadas em TBT 4 vezes de 5 minutos e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário anti-coelho ou anti-camundongo - peroxidase diluída a 1:1000 (GE). Depois, as membranas foram lavadas novamente em TBT 4 vezes de 5 minutos. A ligação dos anticorpos foi descoberta pela revelação da peroxidase por quimiluminescência (ECL *Western Blotting kit*, GE, EUA) e as membranas expostas ao QUIMIDOC. Para quantificação da expressão proteica, as bandas foram digitalizadas e as densidades ópticas (DO) medidas com o uso do *Software Image J* (NIH, EUA). O sinal dos diferentes anticorpos em estudo foi normalizado com os valores encontrados para o calibrador interno β -actina.

Tabela 3 - Anticorpos utilizados no estudo da expressão proteica por Western Blotting.

Anticorpos Primários	Fabricante/Referência	Diluição
Anti-EAAT1/Glast	Santa Cruz, catálogo sc-15316	1:250
Anti-EAAT2/GLT1	Abcam, catálogo ab41621	1:1000
Anti-EAAT3/EAAC1	Santa Cruz, catálogo sc-25	1:250
Anti- GFAP	Abcam, catálogo ab7260	1:500
Anti-glutamina sintase	Abcam, catálogo ab73593	1:1000
Anti- NeuN	Millipore, catálogo ABN78	1:1000
Anti- β -actina	Abcam, catálogo ab8224	1:500

Figura 6 - Padronização dos anticorpos para *western blotting*.

Proteína	Camada molecular	Camada granular	Diluições dos anticorpos primários
EAAT1			1:250
EAAT2			1:1000
EAAT3			1:250
GFAP			1:500
GS			1:1000
NEUN			1:1000
ACTINA			1:500

3.14 Estatística

As variáveis quantitativas para os efeitos dos tratamentos dados aos diferentes grupos foram analisados por ANOVA de uma via, afim de verificar a diferença entre os grupos, seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey. Para a análise quantitativa entre as regiões, quando comparados os quatro grupos foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas modelo misto, seguido do teste *post-hoc* de Tukey e quando significativo foi aplicado um teste T para cada grupo, a fim de verificar em qual grupo houve a diferença. Os valores foram representados pela média $\pm$ desvio padrão.

4 Resultados

4.1 qRT-PCR

Pelo qRT-PCR foram analisadas a camada granular (CG) e a camada molecular (CM) do hipocampo, a expressão dos transcritos de mRNA para os genes Slc1a1, Slc1a2, Slc1a3, Gfap, S100 β , Gria1, Gria2 e Rbfox3. A extração foi realizada por animal, com 4 animais em cada grupo. Utilizamos os genes endógenos Actina e Gapdh, para validação dos dados. Os valores abaixo são apresentados como média $\pm$ SD, dos 2- Δ CT Slc1a1/Actina.

4.1.1 Gene Slc1a1 (EAAC1/EAAT3) - transportador neuronal de glutamato

Na análise de expressão de mRNA do gene Slc1a1 (EAAC1/EAAT3) na camada molecular (CM), não se observaram diferenças entre os grupos experimentais ($F=1,764$ e $p=0,207$). Tampouco na camada granular (CG) não se encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais ($F=0,515$ e $p=0,680$). A análise do gene entre as regiões da camada granular e camada molecular mostrou uma diferença significativa ($*p=0,005$); a expressão do gene foi maior na camada granular em relação à camada molecular e a diferença se manteve entre os grupos ($p=0,376$). Figura 7.

Figura 7 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene *Slc1a1* camada granular (CG) e molecular (CM) do hipocampo: caixa padrão (C) separação materna (SM), ambiente enriquecido (AE) e separação materna e ambiente enriquecido (SMAE) em animais de ± 60 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos na região da camada molecular (a) tampouco na região da camada granular (b) ($p > 0,05$). Houve diferença significativa entre as regiões (c) ($*p < 0,05$).

4.1.2 Gene *Slc1a2* (GLT1/EAAT2) - transportados glial de glutamato

Na expressão de mRNA para *Slc1a2* (GLT1/EAAT2) na camada molecular não houve diferenças entre os grupos experimentais ($F=0,176$ e $p=0,910$). A camada granular mostrou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais ($F=3,591$ e $p=0,046$); o teste *post-hoc* de Tukey mostrou haver repressão do gene no grupo EA (*) em relação ao grupo SMEA ($p=0,039$). A expressão do gene entre as regiões mostrou uma diferença significativa ($*p=0$). A expressão foi maior na camada molecular em relação à camada granular e a diferença manteve-se entre os grupos ($p=0,933$). Figura 8.

Figura 8 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene *Slc1a2*: Na camada molecular (a), nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos ($p>0,05$). Na camada granular (b) houve diferença significativa do grupo EA em relação ao grupo SMEA ($*p<0,05$). Entre as regiões houve diferença significativa (c) ($*p<0,05$).

4.1.3 Gene *Slc1a3* (GLAST/EAAT1) - transportados glial de glutamato

Na expressão de mRNA para *Slc1a3* (GLAST/EAAT1) na camada molecular foram observadas tendências à repressão do gene entre os grupos experimentais ($F= 3,485$ e $p= 0,05$), o teste *post-hoc* de Tukey mostrou tendência à repressão do gene do grupo EA em relação ao grupo CP ($p=0,07$) e ao grupo SMEA ($p=0,068$). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais na camada granular ($F=0,964$ e $p=0,441$). A observação feita entre as regiões foi estatisticamente significativa ($p=0$), no entanto, houve uma diferença significativa entre os grupos ($p=0,042$). O teste T mostrou que a diferença nos grupos SM ($**p=0,019$) e SMEA ($**p=0,002$) a maior expressão do gene foi na camada molecular do que na camada granular nos dois grupos.

Figura 9 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene *Slc1a3*: na camada molecular (a), nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos ($p>0,05$), porém, observou-se uma tendência à repressão da expressão do gene no grupo EA em relação aos grupos CP e SMEA. Na camada granular (b) nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos ($p>0,05$). Entre as regiões houve diferença significativa (c) ($p<0,05$), houve diferença significativa entre as regiões nos grupos SM e SMEA (** $p<0,05$).

4.1.4 Gene *Gfap*

A expressão de mRNA para *Gfap* não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais na camada molecular ($F=1,020$ e $p=0,418$) e na camada granular ($F=0,307$ e $p=0,820$). A expressão do gene entre as regiões mostrou uma diferença significativa (* $p=0$). A expressão foi maior na camada molecular em relação à camada granular e a diferença manteve-se entre os grupos ($p=0,413$). Figura 10.

Figura 10 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene Gfap: na camada molecular (a), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos ($p>0,05$). Na camada granular (b), nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos ($p>0,05$). Já entre as regiões houve diferença significativa (c) ($*p<0,05$).

4.1.5 Gene S100β

A expressão de mRNA para S100β na camada molecular mostrou diferenças estatisticamente significantes ($F=5,728$ e $p=0,011$), o teste *post-hoc* Tukey mostrou uma tendência na repressão do gene do grupo SM (*) em relação grupo CP ($p=0,057$) e a repressão do gene em SM (*) em relação ao grupo EA ($p=0,008$). Na camada granular existem diferenças estatisticamente significantes ($F=3,487$ $p=0,05$) o teste *post-hoc* Tukey mostrou a menor expressão do gene no grupo SM (*) em relação ao grupo EA ($p=0,042$). Os resultados da análise entre as regiões para o gene foi estatisticamente relevante ($p=0$) a camada molecular expressou significativamente mais do que o giro denteado, e a diferença foi significativa entre os grupos também ($p=0,013$), o teste T mostrou que houve diferença em todos os grupos onde a expressão de S100β foi maior na camada molecular em relação a camada granular CP (** $p=0$), SM (** $p=0,047$), EA (** $p=0,024$) e SMEA (** $p=0,004$).

Figura 11.

Figura 11 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene *S100β*: Na camada molecular, observaram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SM e EA (* $p < 0,05$) e uma tendência entre CP e SM ($p = 0,057$). Na camada granular, a expressão do gene foi estatisticamente significativa entre os grupos SM e EA (* $p < 0,05$). Entre as regiões houve diferença significativa (c) ($p < 0,05$) e houve diferença significativa entre as regiões em todos os grupos (** $p < 0,05$).

4.1.6 Gene *Rbfox3* (*NeuN*)

Na expressão de mRNA para *Rbfox3* (*NeuN*) não se observaram diferenças estatisticamente significantes na camada molecular ($F = 0,739$ e $p = 0,549$) nem na camada granular ($F = 0,945$ e $p = 0,450$). A análise entre as regiões mostrou uma diferença significativa entre as regiões (* $p = 0,012$) no qual o gene foi mais expresso na camada granular do que na camada molecular, e essa diferença manteve-se entre os grupos ($p = 0,316$). Figura 12.

Figura 12 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene Rbfox3: na camada molecular (a), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos ($p>0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene não foi estatisticamente significativa em relação aos grupos ($p>0,05$). Houve diferença nas regiões entre os grupos (c) ($*p<0,05$).

4.1.7 Gene Gria1

A expressão de mRNA para Gria1 (AMPA/GluR1) não mostrou diferenças estatisticamente significantes ($F=0,410$ e $p=0,749$) na camada molecular. A camada granular mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais ($F=7,311$ e $p=0,005$), o teste *post-hoc* Tukey mostrou que o gene foi reprimido no grupo SM (*) em relação ao grupo CP ($p=0,036$), EA ($p=0,004$) e SMEA ($p=0,019$). A análise do gene Gria 1 não mostrou diferenças estatísticas entre as regiões ($p=0,241$), mas apontou que existe uma diferença entre as regiões em alguns dos grupos ($p=0,049$). O teste T mostrou que no grupo CP (** $p=0,028$) e no grupo EA (** $p=0,022$), a expressão da proteína foi maior na camada granular do que na camada molecular. Figura 13.

Figura 13 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene *Gria1*: na camada molecular (a), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos ($p>0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene no grupo SM foi estatisticamente significativa em relação aos outros grupos ($*p<0,05$). Entre as regiões não houve diferença significativa (c) ($p>0,05$), porém, houve diferença significativa entre as regiões nos grupos CP e EA ($**p<0,05$).

4.1.8 Gene *Gria2*

Na expressão de mRNA para *Gria2* (AMPA/GluR2) não se constataram diferenças estatisticamente significantes na camada molecular ($F=0,747$ e $p=0,544$) e na camada granular ($F=1,331$ $p=0,310$). A diferença entre as regiões foi estatisticamente relevante ($*p=0$), e a diferença foi igual para todos os grupos ($p=0,406$). Figura 14.

Figura 14 - Análise da expressão gênica (mRNA) do gene *Gria2*: na camada molecular (a), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos ($p>0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene não foi estatisticamente significativa em relação aos grupos ($p>0,05$). Entre as regiões houve diferença significativa (c) ($*p<0,05$).

4.2 Expressão proteica

A expressão proteica para EAAT3/EAAC1, EAAT2/GLT1, EAAT1/Glast, GFAP, glutamina sintase e NeuN foi analisada por *western blotting*. Os valores são apresentados como média $\pm$ SD da densidade óptica da proteína/pelo gene controle (Actina). Os animais foram analisados separadamente por grupo.

4.2.1 EAAC1 (EAAT3) - Transportador neuronal

Na expressão da proteína EAAT3 (EAAC1) não se observaram diferenças significativas entre os grupos na camada molecular ($F=1,083$, $p=0,393$). A camada granular mostrou uma diferença estatisticamente relevante ($F=8,850$, $p=0,002$), o teste *post-hoc* Tukey foi aplicado e observamos que no grupo SM (*) a expressão da proteína foi maior do que nos grupos CP ($p=0,008$), EA ($p=0,002$) e SMEA ($p=0,081$). A análise entre as regiões resultou na diferença estatisticamente relevante ($p=0,009$) e uma tendência entre os grupos ($p=0,077$). Como o N amostral é pequeno, todos os resultados no qual o “p” é menor que 0,20 o teste T foi aplicado. No teste T encontramos a diferença entre os grupos EA (** $p=0,015$) e SMEA

(** $p=0,023$), os quais mostraram maior expressão da proteína na camada molecular do que na camada granular.

Figura 15 - Expressão proteica de EAAT3: na camada molecular (a), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos ($p>0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene foi estatisticamente significativa em SM em relação aos outros grupos (* $p<0,05$). Entre as regiões houve diferença significativa (c) ($p<0,05$). Porém, observou-se maior expressão na camada molecular em relação a granular nos grupos EA e SMEA (** $p<0,05$).

4.2.2 GLT1 (EAAT2) transportador de glutamato glial

Na proteína EAAT2 (GLT1) houve diferença estatística entre os grupos ($F=4,027$, $p=0,034$) na camada molecular, o teste *post-hoc* Tukey foi realizado e em SM (*) a proteína mostrou uma tendência a menor expressão comparado aos grupos CP ($p=0,58$), EA ($p=0,079$) e SMEA ($p=0,056$). A expressão de EAAT2 não foi estatisticamente relevante entre os grupos na camada granular ($F=0,614$, $p=0,625$), devido à degradação do material de alguns animais

na camada granular, foram usados apenas 3 animais por grupo. Entre as regiões a proteína não mostrou diferenças significativas em sua expressão ($p=0,337$, $p=0,784$).

Figura 16 - Expressão proteica de EAAT2: na camada molecular (a), houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($*p<0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene não foi estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$). Entre as regiões não houve diferenças significativas (c) ($p>0,05$).

4.2.3 GLAST (EAAT1) – transportador de glutamato glial

Na análise da proteína EAAT1 (GLAST) existem diferenças significativas entre os grupos ($F=7,889$, $p=0,004$) na camada molecular, o teste *post-hoc Tukey* mostrou que o no grupo SM a expressão da proteína foi menor do que nos grupos CP ($p=0,007$), EA ($p=0,009$) e SMEA ($p=0,011$). A camada granular não apresentou diferenças significativas ($F=0,953$, $p=0,446$). A análise entre as regiões mostrou que a proteína teve menor expressão na camada molecular do que na camada granular ($p=0,031$) e essa diferença manteve-se entre os grupos ($p=0,426$).

Figura 17 - Expressão proteica de EAAT1: na camada molecular (a), houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene não foi estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Entre as regiões houve diferenças significativas (c) ($p < 0,05$).

4.2.4 GFAP

A proteína GFAP não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos na camada molecular ($F=0,240$, $p=0,887$) e tampouco na camada granular ($F=0,224$, $p=0,877$). Na camada granular fizemos a análise com 3 animais por grupo devido à degradação da proteína em alguns animais. A análise entre as regiões mostrou que a proteína de GFAP foi significativamente mais expressa na camada granular do que na camada molecular ($p^*=0,005$), e entre os grupos a diferença manteve-se ($p=0,799$).

Figura 18 - Expressão proteica de Gfap: na camada molecular (a), não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p>0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene não foi estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$). Entre as regiões houve diferenças significativas (c) ($p<0,05$).

4.2.5 Glutamina sintase

A proteína glutamina sintase (GS) na camada molecular mostrou diferenças entre os grupos ($F=4,622$, $p=0,037$), no qual o teste *post-hoc Tukey* foi aplicado e o grupo SM (*) mostrou que a proteína foi menos expressa em relação ao grupo CP ($p=0,038$). A camada granular não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($F=2,737$, $p=0,152$). O resultado da análise entre as regiões não mostrou diferenças ($p=0,1$, $p=0,184$).

Figura 19 - Expressão proteica de GS: na camada molecular (a), houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (* $p < 0,05$). Na camada granular (b), a expressão do gene não foi estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Entre as regiões não houve diferenças significativas (c) ($p > 0,05$).

4.2.6 NeuN

O resultado da proteína NeuN na camada molecular foi estatisticamente relevante ($F=4,134$, $p=0,032$), o teste *post-hoc Tukey* foi aplicado e o grupo SM (*) apresentou menor expressão da proteína do que do grupo CP ($p=0,027$). Na camada granular houve diferenças significativas entre os grupos ($F=4,134$, $p=0,032$), o teste *post-hoc Tukey* foi aplicado e o grupo SM (*) apresentou menor expressão da proteína do que do grupo CP ($p=0,027$). Entre essas regiões a proteína foi mais expressa na camada granular do que na camada molecular ($p=0,007$), mas a diferença não foi estatisticamente relevante ($p=0,114$).

Figura 20 - Expressão proteica de NeuN: na camada molecular (a), houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (*p<0,05). Na camada granular (b), a expressão do gene foi estatisticamente significativa entre os grupos (*p<0,05). Entre as regiões houve diferenças significativas (c) (*p<0,05).

5 Discussão

Nosso trabalho analisou a expressão de genes e proteínas do sistema glutamatérgico em células da glia e neurônios no giro denteado das camadas molecular e granular do hipocampo de ratos de 60 dias submetidos a separação materna (SM) de 180 minutos por 14 dias (P0-P14) e, após o P21, mantiveram-se os animais nas gaiolas de enriquecimento ambiental até o P60. Nosso trabalho mostrou que os genes que codificam as proteínas GLT-1, GLAST, EAAC1, GFAP e S100b foram mais expressas na camada molecular do que na camada granular. A camada molecular é onde acontecem as sinapses tripartidas. Nessa região estão localizados os astrócitos e os terminais pré e pós-sinápticos onde estão localizados os astrócitos que contêm transportadores de glutamato (AMARAL; WITTER, 1989; YECKEL; BERGER, 1990; NAKAGAMI; SAITO; MATSUKI, 1997).

No entanto, com algumas proteínas como GLT-1 e GFAP houve maior expressão na camada granular do que na camada molecular, e com outras proteínas como GLAST e GS não verificamos diferenças entre as regiões. Podemos atribuir as diferenças entre as regiões para genes e proteínas tanto por desregulação pós-transcricional quanto em relação à degradação do material. Para melhor esclarecer a localização entre as regiões, principalmente dos transportadores, em trabalhos futuros realizaremos a imunocitoquímica e imunogold dessas proteínas, no presente trabalho analisamos apenas as expressões de genes e proteínas.

5.1 Os efeitos da separação materna

5.1.1 Transportadores gliais - GLAST e GLT-1

O modelo de SM gera modificações comportamentais e no SNC similares a características observadas em alguns transtornos psiquiátricos em humanos (BUUSE et al., 2003; ROQUE et al., 2014). As vias glutamatérgicas sofrem influências do estresse pós-natal (PICKERING et al., 2006). Alguns resultados observados no presente trabalho estão de acordo com dados observados na literatura, porém, existem divergências entre os trabalhos sobre separação materna (PICKERING et al., 2006; ZINK et al., 2010).

Observamos que a separação materna reduziu a expressão proteica dos transportadores gliais GLT-1 e GLAST na camada molecular do giro denteado em relação a todos os grupos experimentais e controle. Observamos que o grupo SMEA (separação materna e enriquecimento ambiental) mostrou reverter a diminuição causada pela separação materna.

Nosso experimento não apresentou diferenças na expressão dos genes GLT-1 e GLAST na separação materna, em relação ao controle. Pickering e colaboradores (PICKERING et al., 2006) mostraram que a exposição a SM no início da vida provocou alterações na expressão genética das subunidades do receptor de glutamato NR2B, GluR1 e GluR2 e do transportador de glutamato GLAST no hipocampo de ratos em relação ao grupo MS15. Esses achados são semelhantes a Roceri e colaboradores (ROCERI et al., 2002) que relatam uma diminuição na expressão de NR2A e NR2B no hipocampo após um único período de MS de 24h em P9. Porém, ao observarem ratos de 175 dias separados por 360 minutos em relação aos separados por 15 minutos, notou-se um aumento na expressão do gene GLAST. Resultados divergentes podem se originar devido a diferentes protocolos tanto na separação materna quanto na idade dos animais. Podemos inferir que aos 60 dias a expressão do gene nos animais não foi modificada, porém, isso pode acontecer na idade adulta, quando o gene aumenta sua expressão a fim de evitar um excesso extracelular de glutamato gerado pelo estresse (POPOLI et al., 2011).

Alguns trabalhos mostram o aumento dos transportadores em animais estressados, associando o aumento a uma resposta adaptativa dos transportadores ao excesso de glutamato extracelular, outros mostram que houve diminuição e pode ser ocasionada pela perda de células ou ao *feedback* negativo dos transportadores ao excesso de glutamato (PICKERING et al., 2006; POPOLI et al., 2011; ODEON et al., 2015).

Martisova e colaboradores (MARTISOVA et al., 2012) mostraram aumento da expressão proteica em animais jovens (60-75 dias) e idosos (18 meses) submetidos à separação materna durante 3 horas diárias por um período de 21 dias. Contudo, os autores analisaram o hipocampo total, e não camadas específicas por microdissecção a laser do giro denteado, como em nosso trabalho.

Sendo o hipocampo uma estrutura com populações de neurônios diferentes e, portanto, com células gliais de diferentes funções, é factível que enquanto ocorra redução da expressão dos transportadores gliais no giro denteado pela separação materna, possa ocorrer aumento em outras regiões hipocâmpais, devido a maior excitabilidade decorrente do aumento de

glutamato nas fendas sinápticas, isso poderia levar a uma resposta adaptativa dos neurônios de CA3 (ROTHSTEIN et al., 1994), porém, não verificamos esses dados neste trabalho. No entanto, a idade dos animais deve ser considerada.

Rao e colaboradores (RAO et al., 2000) observaram que gerbilos submetidos a isquemia cerebral, seguida de reperfusão, apresentam redução de proteína dos transportadores GLT-1 e EAAC1 dependendo do tempo em que foi realizada a reperfusão, ou seja, a idade do animal após o procedimento de SM pode levar primeiramente à redução, seguida de posterior aumento dos transportadores gliais do glutamato.

Assim como os efeitos apresentados pela separação materna, Zink e colaboradores (ZINK et al., 2010) avaliaram os efeitos do estresse no modelo animal de *learned helplessness*, fenômeno produzido por uma inadequada resposta a uma situação já aprendida. Os autores observaram redução na expressão dos transportadores de glutamato GLT-1. No estudo com bloqueadores do transportador glial GLT-1 mostraram a indução de alterações comportamentais consistentes com sintomas de transtornos de humor, semelhantes em humanos, nos animais previamente estressados (LEE et al., 2007).

Estudos em humanos com transtornos psiquiátricos também relatam a redução do transportador. Em estudos *post-mortem* de pacientes com depressão maior, esquizofrenia e transtornos de humor (CHOUDARY et al., 2005; BAUER et al., 2008; MIGUEL-HIDALGO et al., 2010). Choudary e colaboradores (2005) encontraram menor expressão de SLC1A3 e SLC1A2 no córtex pré-frontal *post-mortem* de pacientes com depressão maior. Miguel-Hidalgo e colaboradores (2010), utilizando amostras humanas *post-mortem* detectaram menor imunorreatividade para os transportadores de glutamato gliais EAAT2 (GLT1) e EAAT1 (GLAST) também no CPF de pacientes com depressão maior ou depressão associada ao alcoolismo. Assim como Bauer e colaboradores (2008) encontraram menor expressão da proteína EAAT1 (GLAST) em pacientes com esquizofrenia.

O tratamento com antidepressivos aumentou a expressão da proteína EAAT2 (ZINK et al., 2011). Nosso grupo experimental SMEA mostrou-se capaz de reverter os níveis de expressão proteica a níveis do controle, que tinham sido diminuídos pelo estresse pós-natal. Em um estudo com animais expostos a estresse crônico imprevisível, foi observado que os ratos apresentaram diminuição do consumo de sacarose e diminuição de exploração no teste de campo aberto, esses comportamentos nos animais são sintomas semelhantes aos da depressão em humanos. Em níveis moleculares, os animais estressados exibiram uma

diminuição significativa na expressão da proteína de GLT-1 no hipocampo. O tratamento crônico com fluoxetina reverteu os déficits comportamentais e a diminuição de GLT-1 induzida pelo estresse (CHEN et al., 2014).

Nos experimentos de Odeon e colaboradores (ODEON et al., 2015) observou-se em animais submetidos ao estresse pós-natal crônico aumento de GLAST e diminuição de GLT1 e EAAC1. Os autores sugeriram que o aumento de GLAST poderia ser uma compensação das desregulações das proteínas de GLT-1 e EAAC1 para manter o equilíbrio da transmissão glutamatérgica. Tal fato é importante pois, a redução dos transportadores de glutamato apresenta funções essenciais para a patologia de transtornos psiquiátricos, as reduções dos transportadores de glutamato, neste trabalho, mostraram que a separação materna tem o efeito similar ao que ocorre em pacientes com transtornos psiquiátricos e em alguns modelos de estresse.

5.1.2 Transportador neuronal - EAAC1

Nossos resultados mostraram que animais submetidos à separação materna apresentaram aumento na expressão proteica do transportador neuronal do glutamato EAAC1 na camada granular do giro denteado. O enriquecimento ambiental (EA) por si não modificou a expressão dessas proteínas. Contudo, em animais submetidos previamente à separação materna e ao enriquecimento ambiental (SMEA) conseguiram reverter os efeitos observados pelo estresse pós-natal.

Durante o desenvolvimento, o aumento do transportador neuronal poderia ser uma resposta compensatória à menor receptação do glutamato pelos transportadores gliais, porém, na idade adulta ocorre redução da expressão de EAAC1 (DANBOLT, 2001; NIEOULLON et al., 2006). No entanto, em animais de 60 dias seria pouco provável que a EAAC1 poderia ter um importante papel na regulação dos níveis de glutamato extracelular. Podemos sugerir que animais submetidos à separação materna possuam um atraso em seu desenvolvimento, e, assim, os níveis de EAAT3 (os quais são mais elevados durante o desenvolvimento) podem demorar a regular sua expressão em menores níveis de expressão, como acontece no desenvolvimento normal. Por outro lado, o enriquecimento ambiental, apesar de não fazer efeito per se, conseguiu reverter os efeitos observados pela SM.

O glutamato pode desempenhar outras funções no SNC, além do seu papel como neurotransmissor como, por exemplo, pode ser o precursor de GABA, ser precursor de vários outros aminoácidos e intermediários do ciclo de TCA e na síntese de glutathione (SHASHIDHARAN et al., 1997). Outros estudos mostram que a proteína EAAC1 está envolvida em outros processos de regulação no SNC (ESCARTIN et al., 2011). O principal sistema de captação de cisteína neuronal que atua como fator limitante para a síntese de glutathione, um potente antioxidante em neurônios, faz-se pela captação de EAAC1 (CHOI et al., 2016). Os astrócitos liberam glutathione que tem ação antioxidante nos neurônios, a glutathione é clivada em cisteína no espaço extracelular, sendo este um fator limitante para a síntese de glutathione (ESCARTIN et al., 2011). A absorção da cisteína depende da atividade de EAAT3 / EAAC1. Escartin e colaboradores (2011) mostraram que níveis aumentados de EAAT3 facilitam a captação neuronal de cisteína, facilitando, assim, a produção de glutathione em neurônios. Nrf2 (Fator nuclear eritroide 2 - relacionado fator de 2 é um fator de transcrição que regula a expressão de várias enzimas antioxidantes) liga-se ao elemento de resposta antioxidante (ARE) e forma a via Nrf2-ARE que coordena as respostas celulares ao estresse oxidativo no cérebro, a ativação dessa via pode reduzir lesões cerebrais. A via Nrf2-ARE pode coordenar astrócitos e respostas neuronais ao estresse oxidativo por meio da clivagem de cisteína extracelular no cérebro a partir de glutathione. A glutathione é liberada pelos astrócitos, depois da clivagem, a cisteína é absorvida pelos receptores neuronais EAAT3, que produzem glutathione pela via Nrf2-ARE. Sendo assim, o aumento de EAAT3 na camada granular de animais submetidos a SM pode estar relacionada a uma ação compensatória anti-oxidativa causada pelo excesso de glutamato gerado pelo estresse.

5.1.3 Glutamina sintase

A redução na recaptação de glutamato pode levar à redução na expressão proteica de glutamina sintase (GS), proteína envolvida com a conversão de glutamato em glutamina nos astrócitos. A glutamina, então, é reutilizada pelos neurônios para síntese de glutamato (POPOLI et al., 2011). Os astrócitos recaptam o glutamato liberado na fenda sináptica, através dos transportadores gliais específicos, como GLT-1 e GLAST (DANBOLT, 2001).

Nosso trabalho mostrou que, além da redução da expressão de proteínas dos transportadores gliais, também houve uma redução da expressão da proteína glutamina sintase

nos animais da separação materna. A redução dos transportadores e GS são similares aos relatos sobre a teoria da glia na depressão, os quais sugerem que a recaptação do glutamato pelos transportadores gliais é reduzida (CHOUDARY et al., 2005; ZINK et al., 2010).

A diminuição do fluxo no ciclo glutamato/glutamina devido à possível redução de GS, diminuição das funções dos receptores de glutamato NMDA e AMPA, como também pode diminuir a energia gerada pelos astrócitos pelo ciclo TCA, interferindo no metabolismo neuronal e em sinapses tripartidas, além de diminuir a síntese de outros neurotransmissores dependentes da síntese de glutamato, como o GABA (CHOUDARY et al., 2005; ZINK et al., 2010; SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012).

A baixa regulação de glutamina sintase pode promover elevações das concentrações residuais de glutamato e inibir a síntese de transporte de glutamato, gerando o aumento de glutamato extracelular o que pode levar à excitotoxicidade (CHOUDARY et al., 2005). Essa diminuição da GS foi observada em pacientes com depressão maior/suicidas. Em contrapartida, pacientes bipolares tratados com lítio mostraram aumento na expressão de glutamina sintase e em vítimas de suicídio as expressões de GS foram baixas (KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1998).

Nossos resultados mostram que a separação materna interfere negativamente na expressão das proteínas dos transportadores gliais de glutamato (GLT-1 e GLAST) e glutamina sintase no hipocampo de ratos de 60 dias. O estresse causado pela separação materna pode ter aumentado a liberação do glutamato na fenda sináptica e diminuído a depuração do glutamato pelas células da glia. Evidências sugerem que o aumento de glicocorticoides, devido ao estresse, aumentem a liberação de glutamato na fenda sináptica e causem a desregulação dos transportadores (POPOLI et al., 2011).

Francis e colaboradores (FRANCIS et al., 2002) analisaram os níveis de corticosterona no plasma de ratos submetidos à separação materna por 180 minutos e enriquecimento ambiental e constataram um aumento dos níveis de corticosterona plasmática nos animais separados, também mostraram a redução na expressão de mRNA do receptor de glicocorticoide nesses animais.

O aumento da corticosterona plasmática pode estar relacionado ao *feedback* negativo dos receptores de glicocorticoides na separação materna. O interessante é que também mostraram que quando os animais submetidos à separação materna foram expostos ao enriquecimento ambiental, os níveis de corticosterona no plasma foram revertidos, mas não a

expressão dos receptores, que continuou reduzida nesses animais. Observaram que a expressão gênica quando modificada pela separação materna pode ser resistente a modificações ambientais.

Nossos resultados mostraram diferenças entre as expressões de genes e proteínas. Resultados em pacientes *post-mortem* mostraram diferentes modulações entre mRNA e proteínas dos transportadores, receptores e células da glia (TAKAHASHI et al., 2015). Estudos mostram que em determinadas doenças como, por exemplo, na esclerose lateral amiotrófica (ELA), que a proteína EAAT2 pode ser reduzida, sem modificação na expressão de mRNA (TAKAHASHI et al., 2015).

Rothstein e colaboradores (ROTHSTEIN et al., 1995) mostraram que a proteína para GLT1 (EAAT2) estava reduzida no córtex motor de pacientes com ELA. No entanto, Bristol e Rothstein (BRISTOL; ROTHSTEIN, 1996) mostraram que os níveis de mRNA de GLT1 (EAAT2) não foram alterados nos pacientes com ELA, sugerindo um defeito pós-transcricional da doença. A expressão de mRNA inalterada com expressão alterada da proteína pode ser devido a uma série de fatores incluindo tradução e dobragem anormais, modificações pós-traducionais anormais ou aumento do *turnover* de proteínas (BAUER et al., 2008).

Nossos resultados não apresentaram diferenças na expressão dos genes de transportadores de glutamato na separação materna, porém, Zhang e colaboradores (ZHANG, et al., 2013) mostraram que o estresse gestacional causa alterações sobre os transportadores e receptores de glutamato nos filhotes. Os filhotes apresentaram um comportamento de imobilização no teste de suspensão da cauda, redução na expressão de mRNA de EAAT2 e EAAT3. No entanto, observamos reduções nas proteínas dos transportadores de glutamato. Podemos observar que o estresse no início da vida pode gerar uma desregulação pós-transcricional entre genes e proteínas das vias glutamatérgicas envolvidos na separação materna.

Esses estudos apontam a importante função do glutamato na fisiopatologia do estresse e transtornos psiquiátricos. Evidências mostram a vulnerabilidade das funções astrocitárias, principalmente das sinapses glutamatérgicas tripartidas em transtornos psiquiátricos. Nossos resultados mostram que o estresse no início da vida pode interferir nas vias, especificamente as relacionadas a depuração do glutamato nos astrócitos (GILAD et al., 1990). A interrupção da absorção de glutamato pelos astrócitos pode ter influência em sintomas específicos de

transtornos psiquiátricos e a regeneração ou o aumento de células da glia podem representar alvo de tratamento para alguns sintomas de transtornos psiquiátricos (LAVIOLA et al., 2008).

5.1.4 GFAP e S100 β

Nossos dados mostraram que as expressões de mRNA e da proteína GFAP não foram modificadas entre os grupos experimentais. GFAP um importante marcador expresso por astrócitos maduros, o qual modula a forma e dá suporte mecânico para a membrana plasmática dessas células (ENG et al., 2000; MIDDELDORP; HOL, 2011; RAJKOWSKA; STOCKMEIER, 2013; HOL; PEKNY, 2015). Alterações na expressão de GFAP podem modificar a morfologia do astrócito e afetar outras células do cérebro (MIDDELDORP; HOL, 2011). A diminuição na expressão de GFAP em diferentes áreas do cérebro está relacionada com alguns transtornos psiquiátricos e desregulações na via glutamatérgica (HUGHES et al., 2004; RAJKOWSKA; STOCKMEIER, 2013).

Estudos mostram que a proteína GFAP está envolvida na regulação da formação de sinapses, eficiência e interação com neurônios (WEINSTEIN; SHELANSKI; LIEM, 1991; HUGHES et al., 2004). Nossos dados estão de acordo com o estudo de Gondré-Lewis e colaboradores (GONDRÉ-LEWIS et al., 2016) que analisaram a separação materna e a dependência de álcool, o qual a análise estereológica do número de astrócitos e do comprimento das fibras de astrócito no giro dentado do hipocampo não foi estatisticamente significativa no grupo da separação materna comparado ao controle. O modelo de privação materna de 24 horas não mostrou diferença na expressão da proteína GFAP no neocórtex em ratos Wistar em comparação com o grupo controle (AKSIĆ et al., 2014).

Porém, outros trabalhos mostram que a separação materna pode diminuir a expressão de GFAP. Leventopoulos e colaboradores (LEVENTOPOULOS et al., 2007) mostraram em ratos *fischer* do P1-14 que a separação materna e o isolamento social por 4 horas diárias diminuíram a imunorreatividade/GFAP e a densidade de astrócitos reativos a GFAP no hipocampo.

A expressão de mRNA para S100 β foi menor no grupo SM em relação ao grupo EA na camada granular. Na camada molecular mostrou uma tendência na repressão do gene do grupo SM em relação ao grupo CP e a repressão do gene em SM em relação ao grupo EA. S100 β é uma proteína ligante de cálcio, que pode ser liberada por astrócitos protoplasmáticos

e oligodentrócitos, e que regula a forma celular, o metabolismo energético, a contração, a comunicação célula-a-célula, a transdução de sinal intracelular e o crescimento celular (ZIMMER et al., 1995; PINTO et al., 2000; HEIZMANN et al., 2002; BRAUN et al., 2009).

Selinfreund e colaboradores (SELINFREUND et al., 1990) utilizando cultura de células gliais mostraram que a inibição de S100 β resulta em modificação morfológica, afeta as estruturas do citoesqueleto e a regulação da proliferação de células da glia. Assim como os níveis de expressão da proteína S100B foram diminuídos no hipocampo de ratos após estresse crônico quando comparados com os controles normais, revertido pelo tratamento com fluoxetina (RONG et al., 2010).

Musholt e colaboradores (MUSHOLT et al., 2009) investigaram o número de astrócitos imunorreativos para GFAP, S100 β e GFAP/pCREB (CREB é um fator de transcrição para a diferenciação neuronal, sobrevivência e plasticidade sináptica mediada por LTP) em animais submetidos à separação materna de 1 e 6 horas comparados com controles no hipocampo. Os autores não observaram diferenças para GFAP e S100 β , mas verificaram redução de GFAP/pCREB gliais em animais de 1 e 6 horas comparados ao grupo controle.

Estudos em humanos apontam uma menor densidade e números de células gliais e diminuição da expressão de marcadores gliais em indivíduos com depressão maior (ONGÜR; DREVETS; PRICE, 1998; COTTER et al., 2001; MIGUEL-HIDALGO et al., 2010). Achados *post-mortem* mostram a redução no número de células gliais em pacientes com episódio de depressão maior (RAJKOWSKA, 2000). Redução das células gliais está envolvida na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos.

5.1.5 NeuN

Analizamos expressão de genes e proteínas de neurônios maduros pela expressão do gene Rbfox3 pra NeuN e a expressão da proteína NeuN. Não encontramos diferenças na expressão de Rbfox3, porém, houve redução na expressão da proteína NeuN, em ambas as camadas do giro dentado (molecular e granular), possivelmente associada à redução do número de neurônios na separação materna. A menor expressão da proteína pode ocorrer devido ao aumento da morte neuronal causada por apoptose ou excitotoxicidade ou a diminuição da neurogênese, atrofia ou retração dendrítica e perda de espinhos dendríticos

causadas pelo estresse (ORELAND et al., 2009; MONROY; HERNÁNDEZ-TORRES; FLORES, 2010; POPOLI et al., 2011; LAJUD et al., 2012; AKSIĆ et al., 2013).

Monroy e colaboradores (MONROY et al., 2010) observaram a diminuição no comprimento dendrítico e ramificação nos neurônios piramidais de CA1 no hipocampo ventral em animais na idade de 60 dias submetidos a separação materna. Lee e colaboradores (LEE et al., 2001) mostraram que a separação materna por 7 dias depois do P14 ainda influencia a neurogênese nos filhotes. No estudo, os filhotes de ratos foram separados das suas mães e socialmente isolados no dia 14 pós-natal e foram tratados com fluoxetina e 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante 7 dias, após o qual, imuno-histoquímica para NeuN e TUNEL foram realizadas. No entanto, nos filhotes submetidos à separação materna e tratados com fluoxetina, o número de células positivas para BrdU foram maiores e o número de células TUNEL positivas foram menores no giro dentado quando comparados com filhotes da separação materna que não foram tratados com fluoxetina. O trabalho mostra que a separação materna diminuiu o número de neurônios no giro dentado devido à diminuição da neurogênese e a apoptose causada pelo estresse.

Depois do tratamento com fluoxetina, houve reversão dos danos causados pela separação materna. Os efeitos da exposição pré-natal à nicotina e separação materna de 180min do P2 ao P14 e a combinação de ambos os estressores foram avaliados em ratos Sprague-Dawley para determinar se o desenvolvimento dos neurônios do hipocampo era modulado pela exposição a ao abuso de drogas e/ou ao estresse. Wang e Gondre-Lewis (2013) avaliaram a densidade neuronal no giro dentado e observaram redução no número de neurônios dos animais separados e do grupo nicotina /separação materna.

Outros modelos de estresse no início da vida também mostraram resultados similares aos nossos tanto no hipocampo como em outras regiões do cérebro. Os ratos expostos à privação materna por 24 horas apresentaram somas neuronais menores nas regiões do córtex pré-frontal, córtex retrosplenial e no córtex motor em comparação com os controles (AKSIĆ et al., 2014). Como observado ratos jovens de 60 dias demonstram diminuição da proteína NeuN no GD e CA1 quando submetidos à privação materna (AKSIĆ et al., 2013). Também foi mostrado que animais com 24 horas de privação materna apresentaram em P12 um aumento de apoptose no giro dentado (ZHANG et al., 2002).

O aumento da corticosterona plasmática, pelo estresse, pode diminuir a neurogênese hipocampal (LAJUD et al., 2012; MERLO et al., 2014, dados não publicados). Aksić e

colaboradores (2013) observaram em ratos jovens de 60 dias submetidos à privação materna diminuição da proteína NeuN no GD e CA1. Fabricius e colaboradores (2008) observaram a redução no número de neurônios na camada granular do hipocampo na idade adulta em animais submetidos à separação materna, sugerindo diminuição da neurogênese hipocampal ou aumento da apoptose neuronal. Nossos resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura e indicam uma influência reguladora do glutamato sobre a neurogênese adulta e sobrevivência neuronal (KEMPERMANN et al., 1998).

5.1.6 Receptor de glutamato – Gria1 e Gria2 (AMPA)

A expressão gênica de Gria1 (AMPA/GluR1) na camada granular foi reprimida no grupo da separação materna (SM) em relação aos demais grupos. Nossos resultados mostraram que a diminuição de receptores de glutamato e do marcador de neurônios maduros NeuN poderia ser devido à morte celular ou a diminuição da neurogênese devido ao estresse (MERLO et al., 2014, dados não publicados).

Nosso trabalho está de acordo com Pickering e colaboradores (2006), no qual ratos separados por 360 minutos mostraram menor expressão de GluR1 em comparação aos animais separados por 15 minutos. Esses experimentos sugerem que a separação materna de longa duração afeta diretamente os receptores AMPA no hipocampo, interferindo na memória e aprendizagem, mecanismos que ocorrem no hipocampo. Em outro trabalho, do mesmo grupo de pesquisa, os autores observaram a diminuição da densidade do número de neurônios no giro denteado do hipocampo de ratos submetidos à separação materna (ORELAND et al., 2009). Pode-se sugerir que a diminuição da expressão do mRNA para receptores AMPA do hipocampo, no estudo anterior e em nosso trabalho, foi devido em parte a uma diminuição no número de neurônios no hipocampo de animais submetidos à separação materna (ORELAND et al., 2009).

Nossos resultados não mostraram diferença na expressão do gene NeuN em nenhum dos grupos, no entanto, a expressão da proteína NeuN foi menor nos animais submetidos à SM em relação ao controle. Vários fatores podem interferir na regulação dos genes de receptores glutamatérgicos, como: o aumento da morte neuronal causada por apoptose ou excitotoxicidade, diminuição da neurogênese, atrofia ou retração dendrítica ou perda de espinhos dendríticos. Todas essas modificações estão associadas ao estresse crônico (POPOLI

et al., 2011; AKSIC et al., 2013). As diminuições dos receptores de glutamato podem contribuir para a perda de transmissão glutamatérgica no hipocampo de animais do grupo separação materna.

Pesquisas em seres humanos com transtornos psiquiátricos mostram a mesma relação da diminuição da expressão de genes de receptores AMPA, como mostrado em nosso experimento, relacionada à diminuição da densidade neuronal e também à menor plasticidade sináptica.

Meador-Woodruff e colaboradores (2001) observaram no estriado de pessoas com esquizofrenia, depressão maior e transtorno bipolar, a redução da expressão do gene para AMPA. Eastwood e colaboradores (1995) mostraram uma diminuição na expressão de GluR1 e GluR2 no hipocampo de humanos com esquizofrenia em comparação a controles.

Katsouli e colaboradores (2014) observaram menor expressão do gene GluR2 em ratos machos submetidos à separação materna de 15 minutos. Nossos resultados mostram uma diminuição do gene GluR1 nos ratos SM, porém, isso não ocorre no gene GluR2. As variações na expressão dos genes podem causar danos aos neurônios, principalmente em relação a LTP e LTD, prejudicando a plasticidade sináptica, devido à manutenção dessas vias serem dependentes dos receptores AMPA.

No córtex pré-frontal e hipocampo são encontradas grande densidade de receptores AMPA, estas são áreas responsáveis pela regulação do humor e desempenham importante função no desenvolvimento e manutenção da depressão maior. A subunidade GluR1, codificada por Gria1 tem importante papel na função cognitiva, tal como memória de trabalho e aprendizagem. Estudos têm sugerido que as regiões que medem o Gria2 mostraram associação com transtornos psiquiátricos, como transtorno bipolar e esquizofrenia. (SCHMITT et al., 2005; BLACK, 2005). Portanto, a diminuição dos receptores AMPA pode prejudicar a homeostase dos neurônios interferindo na indução da LTP e à morte celular.

5.2 Os efeitos do enriquecimento ambiental

Nosso modelo de enriquecimento ambiental mostrou que pode haver uma reversão nos efeitos da separação materna sobre as proteínas GLAST, GLT-1 e EAAC1 e no gene Gria1/AMPA. Nosso trabalho sugere que os benefícios do enriquecimento ambiental se mostraram eficientes para reverter alguns danos causados pelo estresse da separação materna.

Pois, os animais são expostos a diferentes estímulos como interação social, exercícios físicos, exploração livre do espaço, dinâmica alimentar, novos brinquedos, escadas, túneis materiais de assentamento entre outros (PRAAG et al., 2000). Tais estímulos podem criar um ambiente que proporciona novas experiências sensoriais e cognitivas, que contribuem para a formação de novas informações e levam à aprendizagem, melhorando a LTP e ativando a recaptação do glutamato pelos astrócitos (DIAMOND, 2001; FOX et al., 2006).

O exercício físico exerce um papel neuroprotetor, no entanto, os mecanismos ainda não são bem compreendidos, mas este pode ser definido como uma forma de estresse fisiológico. E juntamente com os outros estímulos melhorar a função cognitiva, memória e ter efeito ansiolítico em casos de estresse crônico (SÁENZ et al., 2006). O estresse agudo pode ser benéfico para aumentar a aprendizagem e memória, o enriquecimento ambiental pode ser considerado um tipo de estresse que traz melhorias para danos causados pelo estresse crônico (POPOLI et al., 2011).

Os dados entre os genes e proteínas também tiveram uma grande divergência nos grupos do enriquecimento ambiental. A expressão de mRNA para Slc1a2 (GLT1/EAAT2) mostrou haver repressão do gene no grupo EA em relação ao grupo SMEA na camada granular, assim como a expressão de mRNA para Slc1a3 (GLAST/EAAT1) na camada molecular mostrou tendência na repressão do gene do grupo EA em relação ao grupo CP. Repressão dos genes de transportadores gliais no grupo do enriquecimento ambiental pode estar relacionada à aprendizagem e à atividade física que ocorrem durante o enriquecimento ambiental, no qual o transportar do glutamato diminui a fim de ativar receptores de NMDA para aumentar a LTP (FRATICELLI-TORRES; MATOS-OCASIO; THOMPSON, 2010).

Um estudo realizado com ratos Sprague-Dawley mostrou que ratos submetidos ao treino de esteira antes de ter um acidente vascular cerebral isquêmico apresentaram aumento da expressão da proteína EAAT2 e menor volume de enfarte cerebral e déficits neurológicos em relação aos outros grupos que não foram submetidos aos exercícios previamente. O aumento da proteína sugere o papel neuroprotetor de EAAT2 na recaptação do glutamato extracelular (WANG et al., 2015).

Por outro lado, Francis e colaboradores (2002) não encontraram reversibilidade na expressão de genes de glicocorticoides de animais submetidos à separação materna e enriquecimento ambiental.

Diferentes estudos sobre o enriquecimento ambiental mostram os benefícios que ele pode apresentar em animais previamente estressados. O estudo com animais submetidos ao isolamento social e comparados com ratos controle e ratos submetidos ao enriquecimento ambiental mostrou que o enriquecimento ambiental teve efeitos antidepressivos e ansiolíticos nesses animais que são modelos de depressão e ansiedade (SÁENZ et al., 2006). Koe e colaboradores (2016) mostraram em um protocolo de separação materna e enriquecimento ambiental, similar ao utilizado neste trabalho, que o enriquecimento ambiental reduziu o comportamento de ansiedade em ratos submetidos à separação materna. Podemos sugerir que isso pode acontecer devido à regulação positiva do enriquecimento ambiental em relação às vias glutamatérgicas. Neste trabalho mostramos que há um aumento dos transportadores de glutamato e seu receptor nos grupos SMEA.

Animais submetidos à separação materna e enriquecimento ambiental (SMEA) apresentaram níveis de expressão do gene *Gria1* nos mesmos níveis dos animais submetidos ao enriquecimento ambiental (EA). Estudos mostram o papel essencial de receptores de glutamato na aprendizagem dependente do hipocampo e sua interferência na LTP (SAKIMURA et al., 1995). Cui e colaboradores (2006), por meio de eletrofisiologia, mostraram que animais submetidos ao estresse no início da vida têm indução prejudicada da LTP em comparação aos controles. No entanto, quando os animais estressados foram submetidos ao enriquecimento ambiental conseguiram a recuperação da LTP na área de CA1 do hipocampo.

Bredy e colaboradores (BREDY et al., 2004) mostram que o enriquecimento ambiental reverteu completamente os efeitos da redução dos cuidados maternos na expressão de sinaptofisina e na expressão do mRNA de subunidades de NMDA e AMPA no hipocampo de ratos. A baixa regulação do gene pode interferir negativamente na LTP visto que a manutenção da mesma é dependente de receptores AMPA e que nos grupos de enriquecimento ambiental o processo é o oposto. Desta forma, nosso trabalho está de acordo com estudos na literatura que mostram que o enriquecimento ambiental tem efeitos positivos sobre o estresse da separação materna nos receptores de AMPA no giro dentado do hipocampo.

Baek e colaboradores (2012) mostraram em ratos separados do P14 ao dia P30, que na separação materna o número de células TUNEL-positivas e caspase-3 positivas no giro dentado do hipocampo aumentou significativamente, indicando que a separação materna

induziu à morte neuronal apoptótica no giro denteado do hipocampo. Eles também analisaram o efeito do exercício na esteira e o tratamento com fluoxetina após o estresse da separação materna e mostraram que a apoptose foi reduzida significativamente no giro denteado do hipocampo. Observaram que exercício físico atenua os danos causados pelo estresse e isso pode ser devido à supressão da apoptose. Assim como Praag e colaboradores (2000) já haviam mostrado que o enriquecimento ambiental, principalmente o que dá oportunidade para o exercício físico, resulta no aumento da proliferação celular, sobrevivência e diferenciação neuronal no giro denteado do hipocampo de ratos adultos.

No nosso estudo, a expressão do gene S100 β e as proteínas GS e NeuN, os danos da separação materna não foram revertidos pelos efeitos do enriquecimento ambiental mostrando ser persistentes nesses genes e proteínas. No entanto, o enriquecimento ambiental pode melhorar as vias glutamatérgicas da transmissão sináptica excitatória em animais de 60 dias, aumentando os transportadores e receptores de glutamato, o que mostra um efeito neuroprotetor. Podemos inferir que, mesmo com menores expressões de marcadores de células da glia e neurônios, o enriquecimento ambiental proporciona maior eficiência nas vias glutamatérgicas de ratos previamente estressados.

Nosso trabalho mostrou que a separação maternal modifica as vias glutamatérgicas do hipocampo. O estresse pode desregular a recaptação de glutamato diminuindo os transportadores gliais e interferir na eficiência da depuração de glutamato na fenda sináptica. O estresse no início da vida está relacionado ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos em humanos (ANDERSON et al., 1999). No entanto, o enriquecimento ambiental mostrou reverter os danos causados pela separação materna.

6 Conclusões

A investigação empreendida traz conclusões que podemos enumerar:

- A separação materna interfere na expressão de genes e proteínas de células da glia, transportadores e receptores de glutamato no hipocampo de ratos jovens;
- O enriquecimento ambiental conseguiu reverter os danos da separação materna no gene *Gria1*/AMPA e nas proteínas GLAST, GLT-1 e EAAC1;
- Não houve reversão dos efeitos da separação materna pelo enriquecimento ambiental na expressão do gene *S100 β* e tampouco nas proteínas GS e NeuN;
- Na camada molecular observamos a maior expressão dos genes em relação à camada granular de *Slc1a2*, *Slc1a3*, *Gfap*, *S100 β* e *Gria2* e maior expressão de proteína EAAC1 somente nos grupos EA e SMEA;
- Na camada granular a maior expressão dos genes em relação a camada molecular foram *Slc1a1*, *Rbfox3* e *Gria1* e maior expressão de proteínas GLAST, GFAP e NeuN;

O sistema glutamatérgico é essencial para o funcionamento normal do cérebro. Sua desregulação pode levar ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos. Concluimos que a perda de expressão de genes e proteínas relacionada a células da glia e neurônios são resistentes aos danos causados pela separação materna. Já as vias glutamatérgicas modificadas pela separação materna são revertidas pelo enriquecimento ambiental no nosso modelo experimental. Os efeitos da separação materna e do enriquecimento ambiental podem ser investigados em relação tanto para marcadores biológicos, afim de auxiliar em informações para diagnósticos com maior precisão, como nos tratamentos de transtornos psiquiátricos.

REFERÊNCIAS

AGULHON, C. et al. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? **Neuron**, n.59, p.932-46, 2008.

AKSIĆ, M. et al. Long-term effects of the maternal deprivation on the volume and number of neurons in the rat neocortex and hippocampus. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, n.73, p.394-403, 2013.

_____. Long-term effects of maternal deprivation on the neuronal soma area in the rat neocortex. **Biomed Res Int**, 2014, 235238.

ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. Neuroscience: glia - more than just brain glue. **Nature**, n.457, p.675-7, 2009.

AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Prog Brain Res**, n.163, p.3-22, 2007.

AMARAL, D. G.; WITTER, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, n.31, p.571-91, 1989.

APA. American Psychiatric Association. **DSM-5**: diagnostic and statistical manual of mental disorders, fifth edition. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013.

ANDERSON, S. W. et al. Impairment of social and moral behavior related to early damage in human prefrontal cortex. **Nat Neurosci**, n.2, p.1032-7, 1999.

ANDIN, J. et al. Influence of environmental enrichment on steady-state mRNA levels for EAAC1, AMPA1 and NMDA2A receptor subunits in rat hippocampus. **Brain Res**, n.1174, p.18-27, 2007.

ANAND, K. J.; SCALZO, F. M. Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? **Biol Neonate**, n.77, p.69-82, 2000.

ANDERSEN, S. L.; TEICHER, M. H. Delayed effects of early stress on hippocampal development. **Neuropsychopharmacology**, n.29, p.1988-93, 2004.

ANGLIN, D. M.; COHEN, P. R.; CHEN, H. Duration of early maternal separation and prediction of schizotypal symptoms from early adolescence to midlife. **Schizophr Res**, n.103, p.143-50, 2008.

ARBORELIUS, L.; EKLUND, M. B. Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. **Neuroscience**, n.145, p.738-50, 2007.

ARBORELIUS, L. et al. Increased responsiveness of presumed 5-HT cells to citalopram in adult rats subjected to prolonged maternal separation relative to brief separation. **Psychopharmacology (Berl)**, n.176, p.248-55, 2004.

ARNSTEN, A. F. Prefrontal cortical network connections: key site of vulnerability in stress and schizophrenia. **Int J Dev Neurosci**, n.29, p.215-23, 2011.

ARRIZA, J. L. et al. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n.94, p.4155-60, 1997.

ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**, n.34, p.325-37, 2003.

BAEK, S. S. et al. Effects of postnatal treadmill exercise on apoptotic neuronal cell death and cell proliferation of maternal-separated rat pups. **Brain Dev**, n.34, p.45-56, 2012.

BAEK, S. B. et al. The phosphodiesterase type-5 inhibitor, tadalafil, improves depressive symptoms, ameliorates memory impairment, as well as suppresses apoptosis and enhances cell proliferation in the hippocampus of maternal-separated rat pups. **Neurosci Lett**, n.488, p.26-30, 2011.

BARNA, I. et al. Gender-specific effect of maternal deprivation on anxiety and corticotropin-releasing hormone mRNA expression in rats. **Brain Res Bull**, n.62, p.85-91, 2003.

BARRES, B. A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. **Neuron**, n.60, p.430-40, 2008.

BAUER, D. et al. Abnormal expression of glutamate transporter and transporter interacting molecules in prefrontal cortex in elderly patients with schizophrenia. **Schizophr Res**, n.104, p.108-20, 2008.

BEURRIER, C. et al. Ciliary neurotrophic factor protects striatal neurons against excitotoxicity by enhancing glial glutamate uptake. **PLoS One**, n.5, e8550, 2010.

BIAGINI, G. et al. Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. **Int J Dev Neurosci**, n.16, p.187-97, 1998.

BIANCHI, M. G. et al. Changes in the expression of the glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease. **Cell Mol Life Sci**, n.71, p.2001-15, 2014.

BLACK, M. D. Therapeutic potential of positive AMPA modulators and their relationship to AMPA receptor subunits. A review of preclinical data. **Psychopharmacology (Berl)**, n.179, p.154-63, 2005.

BOCK, J.; BRAUN, K. The impact of perinatal stress on the functional maturation of prefronto-cortical synaptic circuits: implications for the pathophysiology of ADHD? **Prog Brain Res**, n.189, p.155-69, 2011.

BOLTON, M. M.; EROGLU, C. Look who is weaving the neural web: glial control of synapse formation. **Curr Opin Neurobiol**, n.19, p.491-7, 2009.

BRAUN, K. et al. Juvenile separation stress induces rapid region- and layer-specific changes in S100ss- and glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in astrocytes of the rodent medial prefrontal cortex. **Neuroscience**, n.160, p.629-38, 2009.

BREDY, T. W. et al. Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. **Eur J Neurosci**, n.20, p.1355-62, 2004.

BRENES, G. A. et al. Anxiety, depression and disability across the lifespan. **Aging Ment Health**, n.12, p.158-63, 2008a.

BRENES, J. C.; RODRÍGUEZ, O.; FORNAGUERA, J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. **Pharmacol Biochem Behav**, n.89, p.85-93, 2008b.

BRISTOL, L. A.; ROTHSTEIN, J. D. Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. **Ann Neurol**, n.39, p.676-9, 1996.

BROMET, E. et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. **BMC Med**, n.9, p.90, 2011.

BUSHONG, E. A. et al. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. **J Neurosci**, n.22, p.183-92, 2002.

CHAUDHRY, F. A. et al. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. **Neuron**, n.15, p.711-20, 1995.

CHEN, J. X. et al. Glutamate transporter 1-mediated antidepressant-like effect in a rat model of chronic unpredictable stress. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, n.34, p.838-44, 2014.

CHEN, J.; WANG, Z.; LI, M. Multiple 'hits' during postnatal and early adulthood periods disrupt the normal development of sensorimotor gating ability in rats. **J Psychopharmacol**, n.25, p.379-92, 2011.

CHEN, N., LUO, T.; RAYMOND, L. A. Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. **J Neurosci**, n.19, p.6844-54, 1999.

CHEN, Y.; SWANSON, R. A. The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. **J Neurochem**, n.84, p.1332-9, 2003.

CHOI, B. Y. et al. Decreased cysteine uptake by EAAC1 gene deletion exacerbates neuronal oxidative stress and neuronal death after traumatic brain injury. **Amino Acids**, n.48, p.1619-29, 2016.

CHOLET, N. et al. Similar perisynaptic glial localization for the Na⁺,K⁺-ATPase alpha 2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. **Cereb Cortex**, n.12, p.515-25, 2012.

CHOUDARY, P. V. et al. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n.102, p.15653-8, 2005.

CHOURBAJI, S. et al. The impact of environmental enrichment on sex-specific neurochemical circuitries - effects on brain-derived neurotrophic factor and the serotonergic system. **Neuroscience**, n.220, p.267-76, 2012.

COTTER, D. et al. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. **Arch Gen Psychiatry**, n.58, p.545-53, 2001.

CUI, M. et al. Enriched environment experience overcomes the memory deficits and depressive-like behavior induced by early life stress. **Neurosci Lett**, n.404, p.208-12, 2006.

CUMMINGS, J. A. Ca²⁺ signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. **Neuron**, n.16, p.825-33, 1996.

CZÉH, B.; LUCASSEN, P. J. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, n.257, p.250-60, 2007.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, n.65, p.1-105, 2001.

DANIELS, W. M. et al. 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**, n.19, p.3-14, 2004.

DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nat Rev Neurosci**, n.11, p.339-50, 2010.

DERKS, N. A. et al. Effects of early life stress on synaptic plasticity in the developing hippocampus of male and female rats. **PLoS One**, n.11, e0164551, 2016.

DIAMOND, A. Biological and social influences on cognitive control processes dependent on prefrontal cortex. **Prog Brain Res**, n.189, p.319-39, 2011.

DIAMOND, M. C. Response of the brain to enrichment. **An Acad Bras Cienc**, n.73, p.211-20, 2001.

DIAMOND, M. C. et al. Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. **J Comp Neurol**, n.128, p.117-26, 1966.

DINGLELINE, R. et al. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev**, n.51, p.7-61, 1999.

Diretriz de conselho da comunidade europeia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC.
Directiva 86/609/EEC do Conselho de 24 de novembro de 1986, **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, nº 1985/1026/CNS, 1986.

DODD, P. R. et al. Glutamate-mediated transmission, alcohol, and alcoholism. **Neurochem Int**, n.37, p.509-33, 2000.

EASTWOOD, S. L. et al. Decreased expression of mRNAs encoding non-NMDA glutamate receptors GluR1 and GluR2 in medial temporal lobe neurons in schizophrenia. **Brain Res Mol Brain Res**, n.29, p.211-23, 1995.

ELLENBROEK, B. A. et al. Gene-environment interactions in a rat model of depression. Maternal separation affects neurotensin in selected brain regions. **Neuropeptides**, n.59, p.83-88, 2016.

ELLENBROEK, B. A.; KROONENBERG, P. T. van den; COOLS, A. R. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. **Schizophr Res**, n.30, p.251-60, 1998.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem Res**, n.25, p.1439-51, 2000.

EROGLU, C.; BARRES, B. A. Regulation of synaptic connectivity by glia. **Nature**, n.468, p.223-31, 2010.

ESCARTIN, C. et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 facilitates neuronal glutathione synthesis by upregulating neuronal excitatory amino acid transporter 3 expression. **J Neurosci**, n.31, p.7392-401, 2011.

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**, n.212, p.403-16, 2008.

FAIRMAN, W. A. et al. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. **Nature**, n.375, p.599-603, 1995.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behav Brain Res**, n.175, p.1-8, 2006.

FRANCIS, D. D. et al. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. **J Neurosci**, n.22, p.7840-3, 2002.

FRATICELLI-TORRES, A. I.; MATOS-OCASIO, F.; THOMPSON, K. J. Glutamate transporters are differentially expressed in the hippocampus during the early stages of one-day spatial learning task. **Ethn Dis**, n.20, p.28-32, 2010.

FREY, B. N. et al. The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder. **Behav Pharmacol**, n.18, p.419-30, 2007.

FRISKE, J. E.; GAMMIE, S. C. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. **Physiol Behav**, n.85, p.187-94, 2005.

FUKUDA, M. et al. Functional diversity of C2 domains of synaptotagmin family. Mutational analysis of inositol high polyphosphate binding domain. **J Biol Chem**, n.270, p.26523-7, 1995a.

_____. Role of the C2B domain of synaptotagmin in vesicular release and recycling as determined by specific antibody injection into the squid giant synapse preterminal. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n.92, p.10708-12, 1995b.

FURUTA, A.; ROTHSTEIN, J. D.; MARTIN, L. J. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. **J Neurosci**, n.17, p.8363-75, 1997.

FUSAR-POLI, P. et al. Neuroanatomy of vulnerability to psychosis: a voxel-based meta-analysis. **Neurosci Biobehav Rev**, n.35, p.1175-85, 2011.

GARBUGLIA, M. et al. Role of the C-terminal extension in the interaction of S100A1 with GFAP, tubulin, the S100A1- and S100B-inhibitory peptide, TRTK-12, and a peptide derived from p53, and the S100A1 inhibitory effect on GFAP polymerization. **Biochem Biophys Res Commun**, n.254, p.36-41, 1999a.

_____. The calcium-modulated proteins, S100A1 and S100B, as potential regulators of the dynamics of type III intermediate filaments. **Braz J Med Biol Res**, n.32, p.1177-85, 1999b.

GENDA, E. N. et al. Co-compartmentalization of the astroglial glutamate transporter, GLT-1, with glycolytic enzymes and mitochondria. **J Neurosci**, n.31, p.18275-88, 2011.

GILAD, G. M. et al. Region-selective stress-induced increase of glutamate uptake and release in rat forebrain. **Brain Res**, n.525, p.335-8, 1990.

GILLIES, D. et al. Consultation liaison in primary care for people with mental disorders. **Cochrane Database Syst Rev**, CD007193, 2015.

GONDRÉ-LEWIS, M. C. et al. Early life stress is a risk factor for excessive alcohol drinking and impulsivity in adults and is mediated via a CRF/GABA(A) mechanism. **Stress**, n.19, p.235-47, 2016.

GROENEWEG, F. L. et al. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. **J Endocrinol**, n.209, p.153-67, 2011.

HAMPSON, D. R. et al. Localization of AMPA receptors in the hippocampus and cerebellum of the rat using an anti-receptor monoclonal antibody. **Neuroscience**, n.50, p.11-22, 1992.

HANSON, E. et al. Astrocytic glutamate uptake is slow and does not limit neuronal NMDA receptor activation in the neonatal neocortex. **Glia**, n.63, p.1784-96, 2015.

HEDGES, D. W.; WOON, F. L. Alcohol use and hippocampal volume deficits in adults with posttraumatic stress disorder: A meta-analysis. **Biol Psychol**, n.84, p.163-8, 2010.

HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biol Psychiatry**, 49, 1023-39, 2001.

HEIZMANN, C. W.; FRITZ, G.; SCHÄFER, B. W. S100 proteins: structure, functions and pathology. **Front Biosci**, n.7, p.1356-68, 2002.

HENDRIKSEN, H. et al. Environmental enrichment induces behavioral recovery and enhanced hippocampal cell proliferation in an antidepressant-resistant animal model for PTSD. **PLoS One**, n.5, e11943, 2010.

HOFTMAN, G. D.; LEWIS, D. A. Postnatal developmental trajectories of neural circuits in the primate prefrontal cortex: identifying sensitive periods for vulnerability to schizophrenia. **Schizophr Bull**, n.37, p.493-503, 2011.

- HOL, E. M.; PEKNY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Curr Opin Cell Biol**, n.32, p.121-30, 2015.
- HOLMES, A. et al. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. **Neurosci Biobehav Rev**, n.29, p.1335-46, 2005.
- HOLMSETH, S. et al. The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. **J Neurosci**, n.32, p.6000-13, 2012.
- HONG, W. SNAREs and traffic. **Biochim Biophys Acta**, n.1744, p.493-517, 2005.
- HUANG, Y. H.; BERGLES, D. E. Glutamate transporters bring competition to the synapse. **Curr Opin Neurobiol**, n.14, p.346-52, 2004.
- HUGHES, E. G. et al. Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking. **Brain Res Mol Brain Res**, n.124, p.114-23, 2004.
- HULSHOF, H. J. et al. 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**, n.216, p.552-60, 2012.
- HUOT, R. L. et al. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. **Psychopharmacology (Berl)**, n.158, p.366-73, 2001.
- JAHN, R.; SCHELLER, R. H. SNAREs--engines for membrane fusion. **Nat Rev Mol Cell Biol**, n.7, p.631-43, 2006.
- JIANG, J.; AMARA, S. G. New views of glutamate transporter structure and function: advances and challenges. **Neuropharmacology**, n.60, p.172-81, 2011.
- KALINICHEV, M. et al. 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**, n.73, p.131-40, 2002.

KANAI, Y.; HEDIGER, M. A. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. **Nature**, n.360, p.467-71, 1992.

KARLSSON, R. M. et al. Assessment of glutamate transporter GLAST (EAAT1)-deficient mice for phenotypes relevant to the negative and executive/cognitive symptoms of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, n.34, p.1578-89, 2009.

KATSOULI, S. et al. Sexually dimorphic long-term effects of an early life experience on AMPA receptor subunit expression in rat brain. **Neuroscience**, n.257, p.49-64, 2014.

KAUFMAN, J. et al. Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. **Biol Psychiatry**, n.48, p.778-90, 2000.

KEMPERMANN, G.; KUHN H. G.; GAGE, F. H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. **J Neurosci**, n.18, p.3206-12, 1998.

KESSLER, R. C. et al. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch Gen Psychiatry**, n.62, p.617-27, 2005.

KESSLER, R. C. et al. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **Int J Methods Psychiatr Res**, n.21, p.169-84, 2012.

KOE, A. S.; ASHOKAN, A.; MITRA, R. Short environmental enrichment in adulthood reverses anxiety and basolateral amygdala hypertrophy induced by maternal separation. **Transl Psychiatry**, n.6, e729, 2016.

KOEBERLE, P. D.; BÄHR, M. The upregulation of GLAST-1 is an indirect antiapoptotic mechanism of GDNF and neurturin in the adult CNS. **Cell Death Differ**, n.15, p.471-83, 2008.

LAJUD, N. et al. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. **Psychoneuroendocrinology**, n.37, p.410-20, 2012.

LARSSON, F.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A. H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. **Pharmacol Biochem Behav**, n.73, p.193-207, 2002.

LAVIOLA, G. et al. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. **Neurobiol Dis**, n.31, p.159-68, 2008.

LEE, H. J. et al. Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. **Mol Psychiatry**, n.6, p.610, 725-8, 2001.

LEE, A.; POW, D. V. Astrocytes: Glutamate transport and alternate splicing of transporters. **Int J Biochem Cell Biol**, n.42, p.1901-6, 2010.

LEE, Y. et al. Glia mechanisms in mood regulation: a novel model of mood disorders. **Psychopharmacology (Berl)**, n.191, p.55-65, 2007.

LEVENTOPOULOS, M. et al. Long-term effects of early life deprivation on brain glia in Fischer rats. **Brain Res**, n.1142, p.119-26, 2007.

LLINÁS, R. R. et al. Vesicular reuptake inhibition by a synaptotagmin I C2B domain antibody at the squid giant synapse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n.101, p.17855-60, 2004.

LLORENTE-BERZAL, A. et al. Neurobehavioral and metabolic long-term consequences of neonatal maternal deprivation stress and adolescent olanzapine treatment in male and female rats. **Neuropharmacology**, n.62, p.1332-41, 2012.

LOWY, M. T.; GAULT, L.; YAMAMOTO, B. K. Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. **J Neurochem**, n.61, p.1957-60, 1993.

LU, L. et al. Prenatal exposure to PCP produces behavioral deficits accompanied by the overexpression of GLAST in the prefrontal cortex of postpubertal mice. **Behav Brain Res**, n.220, p.132-9, 2011.

LUCASSEN, P. J. et al. Stress, depression and hippocampal apoptosis. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, n.5, p.531-46, 2006.

MADHUSUDANAN, P.; READE S.; SHANKARAPPA, S. A. Neuroglia as targets for drug delivery systems: A review. **Nanomedicine**, n.13, p.667-679, 2016.

MARTISOVA, E. et al. Long lasting effects of early-life stress on glutamatergic/GABAergic circuitry in the rat hippocampus. **Neuropharmacology**, n.62, p.1944-53, 2012.

MCINTOSH, J.; ANISMAN, H.; MERALI, Z. Short-and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. **Brain Res Dev Brain Res**, n.113, p.97-106, 1999.

MCINTYRE, R. S. et al. Brain volume abnormalities and neurocognitive deficits in diabetes mellitus: points of pathophysiological commonality with mood disorders? **Adv Ther**, n.27, p.63-80, 2010.

MCKENNA, M. C. et al. Glutamate oxidation in astrocytes: Roles of glutamate dehydrogenase and aminotransferases. **J Neurosci Res**, n.94, p.1561-1571, 2016.

MCKINNON, M. C. et al. A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. **J Psychiatry Neurosci**, n.34, p.41-54, 2009.

MEIJER, O. C. et al. Steroid receptor coactivator-1 splice variants differentially affect corticosteroid receptor signaling. **Endocrinology**, n.146, p.1438-48, 2005.

MERLO, S. et al. Enriched environment do not recover the hippocampal plasticity after neonatal stress. 2014. (Dados não Publicados)

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Prog Neurobiol**, n.93, p.421-43, 2011.

MIGUEL-HIDALGO, J. J. et al. Glial and glutamatergic markers in depression, alcoholism, and their comorbidity. **J Affect Disord**, n.127, p.230-40, 2010.

MIKOSHIBA, K. et al. Role of the C2A domain of synaptotagmin in transmitter release as determined by specific antibody injection into the squid giant synapse preterminal. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n.92, p.10703-7, 1995.

MILLSTEIN, R. A. et al. Effects of repeated maternal separation on prepulse inhibition of startle across inbred mouse strains. **Genes Brain Behav**, n.5, p.346-54, 2006.

- MINELLI, A. et al. The glial glutamate transporter GLT-1 is localized both in the vicinity of and at distance from axon terminals in the rat cerebral cortex. **Neuroscience**, n.108, p.51-9, 2001.
- MONROY, E.; HERNÁNDEZ-TORRES, E.; FLORES, G. Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. **J Chem Neuroanat**, n.40, p.93-101, 2010.
- MONTALVO-ORTIZ, J. L. et al. The role of genes involved in stress, neural plasticity, and brain circuitry in depressive phenotypes: Convergent findings in a mouse model of neglect. **Behav Brain Res**, n.315, p.71-4, 2016.
- MORA, F. et al. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. **Brain Res**, n.1476, p.71-85, 2012.
- MURAI, T. et al. Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. **Physiol Behav**, n.90, p.116-24, 2007.
- MUSHOLT, K. et al. Neonatal separation stress reduces glial fibrillary acidic protein- and S100beta-immunoreactive astrocytes in the rat medial precentral cortex. **Dev Neurobiol**, n.69, p.203-11, 2009.
- NAKAGAMI, Y.; SAITO, H.; MATSUKI, N. Optical recording of trisynaptic pathway in rat hippocampal slices with a voltage-sensitive dye. **Neuroscience**, n.81, p.1-8, 1997.
- NIEOULLON, A. et al. The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse? **J Neurochem**, n.98, p.1007-18, 2006.
- NISHI, M.; HORII-HAYASHI, N.; SASAGAWA, T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. **Front Neurosci**, n.8, p.166, 2014.
- NIWA, M. et al. Vulnerability in early life to changes in the rearing environment plays a crucial role in the aetiopathology of psychiatric disorders. **Int J Neuropsychopharmacol**, n.14, p.459-77, 2011.
- ODEON, M. M. et al. Chronic postnatal stress induces voluntary alcohol intake and modifies glutamate transporters in adolescent rats. **Stress**, n.18, p.427-34, 2015.

OMS. **Organização mundial da saúde**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso: 15 de janeiro de 2017.

ONGÜR, D.; DREVETS, W. C.; PRICE, J. L. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n.95, p.13290-5, 1998.

ORELAND, S. et al. Two repeated maternal separation procedures differentially affect brain 5-hydroxytryptamine transporter and receptors in young and adult male and female rats. **Brain Res**, n.1305, p.37-49, 2009.

ORREGO, F.; VILLANUEVA, S. The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. **Neuroscience**, n.56, p.539-55, 1993.

O'SHEA, R. D. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, n.29, p.1018-23, 2002.

PEREA, G.; SUR, M.; ARAQUE, A. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. **Front Cell Neurosci**, n.8, p.378, 2014.

PICKERING, C. et al. Repeated maternal separation of male Wistar rats alters glutamate receptor expression in the hippocampus but not the prefrontal cortex. **Brain Res**, n.1099, p.101-8, 2006.

PINES, G. et al. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. **Nature**, n.360, p.464-7, 1992.

PINTO, S. S. et al. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. **FEBS Lett**, n.486, p.203-7, 2000.

POPOLI, M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci**, n.13, p.22-37, 2011.

POST, R. M. et al. Neural plasticity and emotional memory. **Dev Psychopathol**, n.10, p.829-55, 1998.

QIAN, Y. et al. Astrocytic glutamate transporter-dependent neuroprotection against glutamate toxicity: an in vitro study of maslinic acid. **Eur J Pharmacol**, n.651, p.59-65, 2011.

RACEKOVÁ, E. et al. Maternal separation induced alterations of neurogenesis in the rat rostral migratory stream. **Cell Mol Neurobiol**, n.29, p.811-9, 2009.

RAO, V. L. R. et al. Glial glutamate transporter GLT-1 down-regulation precedes delayed neuronal death in gerbil hippocampus following transient global cerebral ischemia. **Neurochem Int**, n.36, p.531-7, 2009.

RAJKOWSKA, G. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. **Biol Psychiatry**, n.48, p.766-77, 2000.

RAJKOWSKA, G.; STOCKMEIER, C. A. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. **Curr Drug Targets**, n.14, p.1225-36, 2013.

RIMMELE, T. S.; ROSENBERG, P. A. GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. **Neurochem Int**, n.98, p.19-28, 2016.

ROBERTS, R. C.; ROCHE, J. K.; MCCULLUMSMITH, R. E. Localization of excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 in human postmortem cortex: a light and electron microscopic study. **Neuroscience**, n.277, p.522-40, 2014.

ROCERI, M. et al. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. **Mol Psychiatry**, n.7, p.609-16, 2002.

RONG, H. et al. Chronic mild stress induces fluoxetine-reversible decreases in hippocampal and cerebrospinal fluid levels of the neurotrophic factor S100B and its specific receptor. **Int J Mol Sci**, n.11, p.5310-22, 2010.

ROQUE, S. et al. The behavioral and immunological impact of maternal separation: a matter of timing. **Front Behav Neurosci**, 8, 192, 2014.

ROTHSTEIN, J. D. et al. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol**, n.38, p.73-84, 1995.

ROTHSTEIN, J. D. et al. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. **Neuron**, n.13, p.713-25, 1994.

SÁENZ, J. C. B.; VILLAGRA, O. R.; TRÍAS, I. J. T. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. **Behav Brain Res**, n.169, p.57-65, 2006.

SAKIMURA, K. et al. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. **Nature**, n.373, p.151-5, 1995.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, n.62, p.63-77, 2012.

SÁNCHEZ, M. M.; LADD, C. O.; PLOTSKY, P. M. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. **Dev Psychopathol**, n.13, p.419-49, 2001.

SAPOLSKY, R. M.; MEANEY, M. J. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Res**, n.396, p.64-76, 1986.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. **Exp Gerontol**, n.34, p.721-32, 1999.

SCHLOESSER, R. J. et al. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. **Mol Psychiatry**, n.15, p.1152-63, 2010.

SCHMITT, A. et al. Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. **Neuroscience**, n.71, p.989-1004, 1996.

SCHMITT, W. B. et al. Restoration of spatial working memory by genetic rescue of GluR-A-deficient mice. **Nat Neurosci**, n.8, p.270-2, 2005.

SCHOUSBOE, A. Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons are glial cells. **Int Rev Neurobiol**, n.22, p.1-45, 1981.

SCHREINER, A. E. et al. Laminar and subcellular heterogeneity of GLAST and GLT-1 immunoreactivity in the developing postnatal mouse hippocampus. **J Comp Neurol**, n.522, p.204-24, 2014.

SEGOVIA, G. et al. Environmental enrichment reduces the response to stress of the cholinergic system in the prefrontal cortex during aging. **Neurochem Int**, n.52, p.1198-203, 2008.

SELIG, D. K. et al. Independent mechanisms for long-term depression of AMPA and NMDA responses. **Neuron**, n.15, p.417-26, 1995.

SELINFREUND, R. H. et al. Antisense inhibition of glial S100 beta production results in alterations in cell morphology, cytoskeletal organization, and cell proliferation. **J Cell Biol**, n.111, p.2021-8, 1990.

SHASHIDHARAN, P. et al. Immunohistochemical localization of the neuron-specific glutamate transporter EAAC1 (EAAT3) in rat brain and spinal cord revealed by a novel monoclonal antibody. **Brain Res**, n.773, p.139-48, 1997.

SHIN, O. H. et al. Differential but convergent functions of Ca²⁺ binding to synaptotagmin-1 C2 domains mediate neurotransmitter release. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n.106, p.16469-74, 2009.

SHINODA, Y. et al. Galacto-N-biose is neuroprotective against glutamate-induced excitotoxicity in vitro. **Eur J Pharmacol**, n.791, p.711-717, 2016.

SOMJEN, G. G. Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. **Glia**, n.1, p.2-9, 1988.

SPIVEY, J. M. et al. Adolescent female rats are more resistant than males to the effects of early stress on prefrontal cortex and impulsive behavior. **Dev Psychobiol**, n.51, p.277-88, 2009.

STERLEY, T. L. et al. Genetic predisposition and early life experience interact to determine glutamate transporter (GLT1) and solute carrier family 12 member 5 (KCC2) levels in rat hippocampus. **Metab Brain Dis**, n.31, p.169-82, 2016.

STORCK, T. et al. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n.89, p.10955-9, 1992.

SÖLLNER, T. SNAREs and targeted membrane fusion. **FEBS Lett**, n.369, p.80-3, 1995.

SÜDHOF, T. C.; ROTHMAN, J. E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. **Science**, n.323, p.474-7, 2009.

TAKAHASHI, K.; FOSTER, J. B.; LIN, C. L. Glutamate transporter EAAT2: regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. **Cell Mol Life Sci**, n.72, p.3489-506, 2015.

TORP, R. et al. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. **Eur J Neurosci**, n.6, p.936-42, 1994.

_____. Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and rEAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: an in situ hybridization analysis. **Anat Embryol (Berl)**, n.195, p.317-26, 1997.

TSIEN, J. Z.; HUERTA, P. T.; TONEGAWA, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. **Cell**, n.87, p.1327-38, 1996.

BERG, C. J. van den; GARFINKEL, B. A simulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. **Biochem J**, n.123, p.211-8, 1971.

BUUSE, M. van den; GARNER, B.; KOCH, M. Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: effects on prepulse inhibition. **Curr Mol Med**, n.3, p.459-71, 2003.

PRAAG, H. van; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nat Rev Neurosci**, n.1, p.191-8, 2000.

VEENA, J. et al. Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats. **Neurosci Lett**, n.455, p.178-82, 2009.

VENERO, C.; BORRELL, J. Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. **Eur J Neurosci**, n.11, p.2465-73, 1999.

VERKHRATSKY, A.; KIRCHHOFF, F. Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. **J Anat**, n.210, p.651-60, 2007.

VERMA, R. et al. Pharmacological evaluation of glutamate transporter 1 (GLT-1) mediated neuroprotection following cerebral ischemia/reperfusion injury. **Eur J Pharmacol**, n.638, p.65-71, 2010.

VOLK, D. W.; LEWIS, D. A. Prefrontal cortical circuits in schizophrenia. **Curr Top Behav Neurosci**, n.4, p.485-508, 2010.

WANG, H.; GONDRÉ-LEWIS, M. C. Prenatal nicotine and maternal deprivation stress de-regulate the development of CA1, CA3, and dentate gyrus neurons in hippocampus of infant rats. **PLoS One**, n.8, e65517, 2013.

WANG, X. et al. Exercise pre-conditioning alleviates brain damage via excitatory amino acid transporter 2 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 following ischemic stroke in rats. **Mol Med Rep**, n.11, p.1523-7, 2015.

WEBER, S. et al. Structural brain abnormalities in psychopaths-a review. **Behav Sci Law**, n.26, p.7-28, 2008.

WEINSTEIN, D. E.; SHELANSKI, M. L.; LIEM, R. K. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. **J Cell Biol**, n.112, p.1205-13, 1991.

WEISS, I. C. et al. Dissociation between the effects of pre-weaning and/or post-weaning social isolation on prepulse inhibition and latent inhibition in adult Sprague--Dawley rats. **Behav Brain Res**, n.121, p.207-18, 2001.

WIGGER, A.; NEUMANN, I. D. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. **Physiol Behav**, n.66, p.293-302, 1999.

WITTER, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, n.31, p.571-91, 1989.

WOON, F. L.; SOOD, S.; HEDGES, D. W. Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: a meta-analysis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, n.34, p.1181-8, 2010.

WORKMAN, J. L. et al. Post-weaning environmental enrichment alters affective responses and interacts with behavioral testing to alter nNOS immunoreactivity. **Pharmacol Biochem Behav**, n.100, p.25-32, 2011.

YECKEL, M. F.; BERGER, T. W. Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n.87, p.5832-6, 1990.

ZHANG, X. H. et al. Involvement of pGluR1, EAAT2 and EAAT3 in offspring depression induced by prenatal stress. **Neuroscience**, n.250, p.333-41, 2013.

ZHANG, L. X. et al. Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. **Brain Res Dev Brain Res**, n.133, p.1-11, 2002.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **J Neural Transm (Vienna)**, n.121, p.799-817, 2014.

ZIEGLER, D. R. et al. The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. **Neurochem Res**, n.23, p.1259-63, 1998.

ZIMMER, D. B. et al. The S100 protein family: history, function, and expression. **Brain Res Bull**, n.37, p.417-29, 1995.

ZINK, M. et al. Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. **Neuropharmacology**, n.58, p.465-73, 2010.

ZINK, M. et al. Fluoxetine treatment induces EAAT2 expression in rat brain. **J Neural Transm (Vienna)**, n.118, p.849-55, 2011.

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3315-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 121/2014, sobre o projeto intitulado “*Envolvimento de células gliais e transportadores de glutamato em alterações promovidas pela separação materna e enriquecimento ambiental no hipocampo de ratos jovens*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Jorge Eduardo Moreira** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de abril de 2015.

We certify that the protocol nº 121/2014, entitled “*Involvement of glial cells and glutamate transporters in changes promoted by maternal separation and environmental enrichment in the hippocampus of young rats*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 04/27/2015.

Ribeirão Preto, 27 de abril de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP - USP