DAIANE SANTOS ROSA

Avaliação do efeito em longo prazo do estresse neonatal causado pela separação ou privação materna em ratos sobre a expressão de comportamentos defensivos associados ao pânico

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de doutor em ciências

Área de concentração: Saúde Mental

Orientador: Prof. Dr. Hélio Zangrossi
Junior

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Biblioteca Central do Campus Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Rosa, Daiane Santos

Avaliação do efeito em longo prazo do estresse neonatal causado pela separação ou privação materna em ratos sobre a expressão de comportamentos defensivos associados ao pânico, 2017.

124 f.

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde Mental.

Orientador: Hélio Zangrossi Junior

Nome: ROSA, Daiane Santos

Título: Avaliação do efeito em longo prazo do estresse neonatal causado pela separação ou privação materna em ratos sobre a expressão de comportamentos defensivos associados ao pânico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em ciências

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A meus pais, José Roberto e Iralva. Ao meu irmão, Roberto. Ao meu esposo, Cleison. Ao meu filho, Thomás. Dedico esse trabalho a todos vocês pelo carinho, compreensão e principalmente pelo incansável apoio ao longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre proteger e guiar meu caminho.

Aos meus pais pelo apoio, pelos conselhos e principalmente pelos longos abraços.

Ao meu esposo por sua imensa paciência e seu admirável companheirismo. Muito obrigada, meu amor.

Ao meu filho que, mesmo sem entender nada ainda pela sua pouca idade, é capaz de afastar todas as preocupações do coração da mamãe apenas com um sorriso.

Ao meu orientador, Hélio Zangrossi Junior, por toda a paciência (eu sei que não foi fácil, professor), mas principalmente por tudo que aprendi com o senhor.

Aos meus amigos de laboratório Melina, Ailton, Ana, Helô, Léo e Gabriel pelos ensinamentos, dicas e também pelas risadas que tornaram o caminho mais fácil.

A Alana pela enorme contribuição para este trabalho durante meu período de licença maternidade. Muito obrigada.

Ao nosso querido técnico, Afonso por todo o suporte prestado para o desenvolvimento desse trabalho e por sempre ter uma solução para todos os problemas práticos.

A secretária do programa de pós-graduação em Saúde Mental, Ivana Geraldo Cintra Faria, pela realização de todo o trabalho burocrático.

Aos membros da banca examinadora pelo tempo dedicado e pelas contribuições dadas a esse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado

“ Ao menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”

Albert Einsten

RESUMO

Rosa, D.S. **Avaliação do efeito em longo prazo do estresse neonatal causado pela separação ou privação materna em ratos sobre a expressão de comportamentos defensivos associados ao pânico.** 2017. 124 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Diversos estudos demonstram que o estresse infantil, incluindo situações de perda dos pais, negligência e abusos, representa um forte fator de risco para o desenvolvimento de transtornos de ansiedade, sendo de especial interesse para este trabalho, o transtorno do pânico. Modelos de estresse neonatal em animais de laboratório, que se baseiam na ruptura da relação mãe-filhote, como a separação materna e a privação materna, têm sido amplamente utilizados para avaliar as consequências desse estressor sobre a expressão de comportamentos defensivos associados à ansiedade na vida adulta. No entanto, pouco se sabe sobre seus efeitos em modelos animais de ataques de pânico, mais especificamente aqueles que associam esta condição emocional à resposta defensiva de fuga em animais. Diante disso, o objetivo inicial do presente trabalho foi o de estender as investigações dos efeitos do estresse neonatal sobre o comportamento de fuga de ratos adultos (após 60 dias de nascimento) observado no labirinto em T elevado (LTE), pela estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (SCPD) e durante a exposição a um ambiente em hipóxia (7% O₂). Para efeitos comparativos, esses animais também foram testados em modelos animais associados à ansiedade generalizada e a depressão. Observamos que ratos Wistar submetidos à separação materna (3h/dia, do 2º ao 21º dia pós-nascimento) não diferiram de animais controles nos parâmetros comportamentais analisados nos modelos de pânico (fuga no LTE e pela estimulação elétrica da SCPD), nos de ansiedade (resposta de esquiva no LTE e o beber punido no teste de conflito de Vogel) ou no de depressão (tempo gasto em imobilidade no teste do nado forçado). Já em ratos privados da mãe (por 24h no 11º dia pós-nascimento), embora este estressor não tenha alterado a resposta de fuga no LTE, ele aumentou a expressão deste comportamento durante a exposição à hipóxia, sugestivo de

um efeito panicogênico. Ainda empregando a privação materna, observamos que a administração intraperitoneal de um inibidor da síntese de serotonina, a p-clorofenilalanina metil éster (p-CPA – 100mg/Kg/dia, por 4 dias antes dos testes comportamentais) facilitou a expressão do comportamento de fuga durante o teste da hipóxia nos animais controle, de maneira semelhante ao efeito obtido somente com a privação materna. Porém este tratamento não potencializou a fuga promovida pela privação materna. Já os níveis plasmáticos de corticosterona foram aumentados pela exposição à hipóxia, independentemente dos animais terem sido previamente privados da mãe ou terem recebido o p-CPA antes do teste. Por fim, também observamos, através de uma análise por *Western Blotting*, que nem a privação materna ou a exposição à hipóxia altera a concentração de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} na SCPD ou na amígdala. Em suma, nossos resultados mostram que a privação materna promove uma facilitação da resposta de fuga na hipóxia, sugerindo uma relação entre esse estresse neonatal e o desencadeamento de ataques de pânico de um subtipo específico, o pânico respiratório. Contudo, no que diz respeito ao envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica, mais estudos são necessários para entender sua participação nessa resposta.

Palavras-chave: Estresse neonatal. Privação materna. Separação materna. Pânico. Pânico respiratório. Hipóxia. Substância cinzenta periaquedutal. Serotonina.

ABSTRACT

Rosa, D.S. **Evaluation of the long-term effect of neonatal stress caused by maternal separation or deprivation in rats on the expression of defensive behaviors associated with panic.** 2017. 124 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Early life stress (ELS), including parental loss due to death, neglect or abuse, represents a major risk factor for the late development of psychiatric disorders, such as anxiety disorders. Animal models of ELS that are based on the disruption of mother-infant relationship, such as the repeated maternal separation or maternal deprivation, have been extensively used for the investigation of the long-term effects of these stressors on the expression of defensive behaviors associated with anxiety. However, little is known about their effects on animal models of panic attacks, more specifically in those that associate this emotional condition with escape behavior in animals. Therefore, the aim of the present study was to extend the investigation on the long-term consequences of neonatal stress on the escape response of adult rats (60 days after birth) evoked by the elevated T maze (ETM), electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray (DPAG) or hypoxia (7% O₂). For comparative reasons, these animals were also tested in animal models of anxiety and depression. The results showed that the repeated maternal separation of male Wistar (3 hours/day from day 2 to 21 after birth) did not affect the behavioral indexes measured in the panic (escape in the ETM or after DPAG electrical stimulation), anxiety (ETM inhibitory avoidance or punished licking in the Vogel conflict test) or depression (time in immobility in the forced swimming test) models. On the other hand, rats submitted to maternal deprivation (24 hs in the 11th day after birth), although not differing from the control animals on escape expression in the ETM, showed a pronounced escape response during hypoxia, indicating a panicogenic-like response. Also, using this maternal deprivation protocol, we observed that systemic administration of a 5-HT synthesis inhibitor, p-chlorophenylalanine methyl ester (p-CPA – 100mg/Kg/day, for 4 days before the behavioral tests), facilitated escape expression during hypoxia

in non-deprived animals to a level observed in non-pharmacologically treated deprived animals. We also observed that plasma corticosterone levels were increased 30 minutes after hypoxia exposure, independently of the previous condition of the animals (deprivation or drug treatment). Finally, we observed that the number of 5-HT_{1A} receptors in the DPAG or amygdala, measured by *Western Blotting*, was not affected by previous maternal deprivation or exposure to hypoxia. Taken together, our results show that a single maternal deprivation episode facilitates the expression of escape behavior during hypoxia, suggesting a relationship between this ELS with the observation of a specific subtype of panic attack, the respiratory panic. Further studies are required in order to clarify the 5-HT involvement on these responses.

Key words: Early life stress. Maternal deprivation. Maternal separation. Panic. Respiratory panic attacks. Hypoxia. Dorsal periaqueductal gray matter. Serotonin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da ordem dos eventos seguida no experimento 1 desde o nascimento até a exposição aos testes comportamentais.....	37
Figura 2 - Representação esquemática da ordem dos eventos seguida no experimento 2 desde o nascimento até a exposição ao teste comportamental..	40
Figura 3 - Representação esquemática da ordem dos eventos seguida no experimento 3 desde o nascimento até a exposição ao teste comportamental..	42
Figura 4 – Representação esquemática da ordem dos eventos seguida nos experimentos 4 e 5 desde o nascimento até a exposição aos testes comportamentais.....	46
Figura 5 – Representação gráfica dos comportamentos de esquiva inibitória (painel superior) e fuga (painel inferior) dos animais NS e S submetidos ao LTE..	54
Figura 6 - Representação gráfica da distância total percorrida (m) pelos animais NS e S submetidos campo aberto.....	55
Figura 7 – Representação gráfica do comportamento de imobilidade dos animais NS e S submetidos ao nado forçado.....	56
Figura 8 – Representação gráfica do número de lambidas punidas dos animais NS e S submetidos ao teste de conflito de Vogel.....	56
Figura 9 - Representação gráfica do limiar basal dos animais NS e S submetidos ao teste estimulação elétrica da SCPD..	57

Figura 10 – Representação gráfica dos comportamentos de esquiva inibitória (painel superior) e fuga (painel inferior) dos animais NSI e SI submetidos ao LTE..	59
Figura 11 - Representação gráfica da distância total percorrida (m) pelos animais NS e S submetidos campo aberto.....	60
Figura 12 – Representação gráfica do comportamento de imobilidade apresentado pelos animais NSI e SI submetidos ao nado forçado..	60
Figura 13 – Representação gráfica do número de lambidas punidas dos animais NSI e SI submetidos ao teste de conflito de Vogel.....	61
Figura 14. Representação gráfica dos comportamentos de esquiva inibitória (painel superior) e fuga (painel inferior) dos animais NP e P11 submetidos ao LTE.....	63
Figura 15 - Representação gráfica da distância total percorrida (m) pelos animais NS e S submetidos campo aberto.....	63
Figura 16 - Representação gráfica do tempo gasto no claro (painel superior) e do número de transições entre os compartimentos (painel inferior) no teste de transição claro-escuro pelos animais NP e P11.	65
Figura 17 - Representação gráfica do comportamento dos animais NP e P11 durante a exposição à hipóxia.....	66
Figura 18 Representação gráfica do comportamento dos animais NP e P11 durante a exposição à hipóxia.....	67
Figura 19 – Representação gráfica da atividade locomotora dos animais submetidos ao experimento 6..	68
Figura 20 – Representação gráfica dos níveis plasmáticos de corticosterona dos animais submetidos ao experimento 6..	69

Figura 21 – Quantificação por Western Blot de receptores 5HT1A em amostras de SCPD e amígdala.....	70
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. ANIMAIS	30
3.2. APARATOS EXPERIMENTAIS.....	30
3.2.1. Labirinto em T elevado	30
3.2.2. Campo aberto.....	31
3.2.3. Claro Escuro	31
3.2.4. Nado forçado	31
3.2.5. Teste de conflito de Vogel	31
3.2.6. Arena para estimulação elétrica	32
3.2.7. Hipóxia.....	32
3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	33
3.3.1. Estudos com a separação materna	33
3.3.2. Estudos com a privação materna	43
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
4. RESULTADOS	53
4.1. EXPERIMENTOS COM A SEPARAÇÃO MATERNA	53
4.1.1. Experimento 1 – Avaliação o efeito da separação materna sobre o comportamento de ratos adultos submetidos ao labirinto em T elevado, campo aberto, nado forçado e teste de conflito de Vogel.	53

4.1.2.	Experimento 2 – Avaliação do efeito da separação materna sobre a resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD de ratos adultos	57
4.1.3.	Experimento 3 - Avaliação do efeito da combinação da separação materna com o isolamento social na vida adulta sobre as respostas comportamentais de ratos submetidos ao labirinto em T elevado, campo aberto, nado forçado e teste de conflito de Vogel	57
4.2.	Experimentos com privação materna	61
4.2.1.	Experimento 4 - avaliação do efeito da privação materna sobre as respostas comportamentais de ratos adultos submetidos ao labirinto em T elevado, campo aberto e claro-escuro.	61
4.2.2.	Experimento 5 - avaliação do efeito da privação sobre as respostas comportamentais de ratos adultos submetidos à hipóxia.	65
4.2.3.	Experimento 6 - Avaliação do efeito da privação materna sobre a neurotransmissão serotoninérgica e sobre os níveis plasmáticos de corticosterona.	66
5.	DISCUSSÃO	71
6.	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO A. Detalhes metodológicos de estudos que investigaram os efeitos em longo prazo da separação materna em modelos animais de ansiedade.	105
	ANEXO B. Manuscrito	107

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 450 milhões de pessoas ao redor do mundo sofrem com transtornos mentais e de comportamento, sendo os transtornos de ansiedade os de maior prevalência dentre eles (OMS, 2001). Além do sofrimento pessoal, estes transtornos causam grandes prejuízos sociais, profissionais, financeiros e psicológicos não só aos pacientes, mas também às suas famílias. A falta de investimento em políticas de saúde mental por parte dos Governos e a falta de cobertura para transtornos mentais por parte dos planos de saúde são apenas alguns dos problemas que precisam ser enfrentados (OMS, 2001). Diante desse cenário, fica evidente a necessidade da criação e melhoria de programas de intervenção e prevenção e, consequentemente a necessidade de melhor entender os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento dos transtornos.

Nesse sentido, um crescente número de trabalhos tem estudado fatores intrínsecos e ambientais, e principalmente a interação entre eles, que contribuem para um aumento da vulnerabilidade para desenvolvimento dos transtornos mentais. Sabe-se, por exemplo, que baixo poder aquisitivo, exposição a eventos traumáticos ao longo da vida, histórico de doenças mentais na família, ser divorciado ou viúvo e ser mulher, estão entre esses fatores (MOLET *et al.*, 2014). Uma abordagem que tem atraído cada vez mais a atenção da comunidade científica, e que é de especial interesse para o presente trabalho, é o estudo da importância das etapas iniciais do neurodesenvolvimento, ou dos eventos que ocorrem durante essa fase, para a vulnerabilidade aos transtornos mentais ao longo da vida.

Em meados dos anos 1940 surgiram os primeiros trabalhos investigando a relação entre fatores sociais e suas consequências para a saúde mental do indivíduo (FRIEDLANDER, 1946a; 1946b). Em 1975, Jacobson e colaboradores testaram a hipótese de que “a falta, perda ou ausência de uma relação emocionalmente sustentável antes da adolescência” estaria relacionada ao desenvolvimento de um quadro depressivo na vida adulta. Os resultados encontrados pelo grupo demonstraram que a privação, mas não a perda dessa “relação emocionalmente sustentável” está relacionada ao surgimento da depressão no adulto. Além disso, foi

também observada uma relação entre o grau de privação experimentada pela criança e a gravidade do transtorno desenvolvido (JACOBSON, FASMAN e DIMASCIO, 1975)

A partir do final da década de 1980, é possível encontrar um número mais expressivo de trabalhos dedicados ao assunto. Por exemplo, Richman e Flaherty (1986) encontraram evidências de que relações problemáticas entre pais e filhos durante a infância estão correlacionadas com sintomas depressivos na vida adulta. Bachmann e colaboradores (1988) relatam que mulheres que sofreram abusos sexuais quando crianças são mais susceptíveis a sofrer de depressão, ansiedade e baixa autoestima. Breier e colaboradores (1988) investigaram o efeito da perda dos pais durante a infância sobre o desenvolvimento de psicopatologias em adultos, concluindo que a qualidade da convivência em família logo após a perda dos pais está fortemente relacionada à saúde mental do indivíduo quando adulto.

A partir da década de 1990, encontra-se publicado um número muito maior de trabalhos que investigaram os efeitos desses eventos traumáticos da infância sobre uma gama maior de transtornos psiquiátricos. O abuso infantil, por exemplo, é relatado como fator agravante para a sintomatologia de pacientes psicóticos (GOFF, *et al.*, 1991), depressivos e ansiosos (MARGO e MCLEES, 1991), além de antecipar a ocorrência do primeiro episódio desses transtornos. Foi também descrito que pacientes diagnosticados com transtorno de personalidade borderline e esquizofrenia relatam terem tido pais menos atenciosos e mais controladores/superprotetores em comparação com pessoas saudáveis (BYRNE, *et al.*, 1990; ZWEIG-FRANK e PARIS, 1991). Kendler e colaboradores (1992) fizeram uma correlação entre perda dos pais (antes dos 17 anos de idade) e o aumento do risco de desenvolver psicopatologias na vida adulta. Foi observado que essa relação variava de acordo com o tipo de perda (morte ou separação) e o parente envolvido (pai ou mãe). Os transtornos de depressão maior e ansiedade generalizada estavam associados a separação dos pais. O transtorno de pânico estava associado à morte dos pais ou a separação da mãe. Fobias estavam mais associadas a morte dos pais.

Mais recentemente, podemos encontrar diversas revisões que além de trazerem uma avaliação crítica da literatura, reforçando a conexão entre as experiências negativas da infância com as psicopatologias da vida adulta, também revisam as diferentes hipóteses de como nosso corpo estaria reagindo à essas experiências de forma que

suas consequências sejam sentidas em longo prazo (para revisão ver CARR, *et al.*, 2013; LI, D'ARCY e MENG, 2016; LUTZ, *et al.*, 2015; PINE e FOX, 2015; PROVENCAL e BINDER, 2015; SCHIAVONE, COLAIANNA e CURTIS, 2015).

Embora os estudos clínicos tragam importantes evidências que sugerem a influência das adversidades na infância com uma (ou mais) psicopatologia na vida adulta, não é possível que sejam estabelecidas relações de causalidade entre ambos, por exemplo, pela dificuldade de realização de estudos prospectivos, além da impossibilidade de manipulações no ambiente da criança devido a questões éticas. Assim sendo, vários esforços têm sido feitos no sentido de utilizar abordagens experimentais, principalmente com ratos e camundongos, que permitam controlar o ambiente pós-natal, bem como interferir na relação mãe-filho, a fim de avaliar em modelos animais possíveis alterações comportamentais relacionadas aos transtornos.

Nesse sentido, existe uma variedade de protocolos de estresse neonatal descritos na literatura (Tabela 1). Contudo, neste trabalho focamos em dois deles que se baseiam na interrupção do “padrão natural” de interação mãe-filhote: a separação materna e a privação materna. Esses protocolos têm sido amplamente utilizados na literatura, permitindo importantes contribuições para o entendimento das consequências das adversidades na infância (MARCO, *et al.*, 2015)

Para fins de definição, trataremos por separação materna as repetidas sessões de isolamento do contato entre mãe e ninhada, normalmente por períodos de 3 a 6 horas, compreendidas entre o primeiro e o 21º dia pós nascimento, período de lactação. Vale ressaltar, porém, que diferentes metodologias podem ser encontradas na literatura sob a mesma nomenclatura (para revisão ver (LEHMANN e FELDON, 2000; MOLET, *et al.*, 2014). A privação materna, por sua vez, consiste em uma única sessão de 24 horas de isolamento do contato da mãe com a ninhada, também dentro do período de lactação.

Tabela 1 – Protocolos de estresse neonatal

PROTOCOLO DE ESTRESSE NEONATAL	BREVE DESCRIÇÃO	REFERÊNCIAS
Adoção cruzada (Cross-fostering)	24 horas após o nascimento, a ninhada é atribuída a uma mãe adotiva que pode ou não ser da mesma linhagem	(SIVIY, <i>et al.</i> , 2017; GAUTHIER, DEANGELI e BUCCI, 2015)
<u>Criação artificial</u>	48 horas após o nascimento, os filhotes são separados da mãe e alimentados com leite artificial.	(YASUDA, <i>et al.</i> , 2016)
Desmame precoce (early weaning)	Nos últimos 3 dias de lactação, as fêmeas são envolvidas em ataduras, impedindo o acesso ao leite, sem isolar os filhotes do contato com a mãe.	(FRAGA, DE MOURA e GASPAR, <i>et al.</i> , 2014)
Privação materna	Sessão única de 24 h de privação do contato mãe-filhote em um dado momento dentro do período de lactação.	(SUCHECKI e TUFIK, 1997)
Restrição de nutrientes	Desnutrição no período pré e/ou pós-natal induzida tanto por redução de um ou mais nutrientes (normalmente proteína) na dieta ou redução da quantidade de alimento disponibilizado, quanto por ninhadas com grande número de filhotes.	(ALAMY e BENGELLOUN, 2012)
Separação materna	Repetidas sessões de privação do contato entre mãe e ninhada, por períodos de 3 a 6 horas durante o período de amamentação.	(VETULANI, 2013)

A separação materna é provavelmente o modelo de estresse neonatal mais estudado (MILLSTEIN e HOLMES, 2007). Diversos trabalhos utilizam esse modelo para estudar

não apenas os efeitos do estresse pós-natal (≤ 21 dias de idade) sobre o comportamento de animais adultos (60 a 90 dias de idade), mas também para avaliar seu efeito sobre outros parâmetros patofisiológicos.

Já foi observado, por exemplo, que a separação materna altera o eixo HPA, promovendo aumento nos níveis basais e pós estresse de corticosterona no rato adulto (LAJUD, *et al.*, 2012). Já foi também observada relação entre a separação materna e obesidade. A separação materna promoveu em ratos adultos: aumento no consumo de alimentos, no peso corporal e nos níveis de corticosterona e vasopressina, além de ter dessensibilizado os receptores CRH-R2 no núcleo paraventricular hipotalâmico, que, quando ativados pelo fator liberador de corticotrofina ou pela urocortina 2, induzem efeitos anoréxicos (ALCANTARA-ALONSO, *et al.*, 2017).

A separação materna também promoveu alterações moleculares relacionadas ao metabolismo e gasto de energia no tecido adiposo de ratos adultos, que podem estar relacionadas a obesidade (MIKI, *et al.*, 2013). A separação materna também já foi relacionada a alterações cardiovasculares. Animais estressados no início da vida apresentaram menor frequência cardíaca em repouso, acompanhada de maior variabilidade na frequência cardíaca, sem alterar a pressão arterial, em comparação aos animais não estressados (RANA, *et al.*, 2016). Contudo, em outro estudo foi observado um aumento na resposta à ativação do sistema renina-angiotensina, importante regulador da pressão arterial, através da ação da angiotensina II, caracterizando a separação materna, ou o estresse neonatal, como fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão dependente de angiotensina II, aumentando a frequência cardíaca e a inflamação vascular (LORIA, POLLOCK e POLLOCK, 2010).

A separação materna também já foi relacionada com maior risco ao desenvolvimento de transtorno de abuso de substâncias. No teste de preferência condicionada por local, a separação materna induziu preferência por metanfetamina em animais espontaneamente hipertensos, modelo animal do transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (WOMERSLEY, *et al.*, 2016). Além disso, a separação materna também aumentou o consumo de álcool e a impulsividade em ratos adultos (GONDRE-LEWIS, *et al.*, 2016).

No que diz respeito aos trabalhos que focam na influência desse paradigma sobre alterações comportamentais relacionadas à ansiedade, principal interesse do presente trabalho, diversos estudos demonstram que animais que passaram pela separação materna apresentam comportamentos do tipo ansiosos, por exemplo, menor exploração dos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado, um dos modelos animais mais utilizados para o estudo da ansiedade (LEE, *et al.*, 2007; TROAKES e INGRAM, 2009; WIGGER e NEUMANN, 1999), diminuição do número de lambidas punidas no teste do lambear punido de Vogel (ZHANG, *et al.*, 2012) e menor exploração da área central do campo aberto (BENEKAREDDY, *et al.*, 2011). No entanto, houveram também resultados conflitantes, onde a separação materna promoveu efeito do tipo ansiolítico (RODRÍGUEZ e DUEÑAS, 2013; ZHANG, *et al.*, 2014), ou nenhuma alteração no comportamento (CLINTON, WATSON e AKIL, 2014; ESTANISLAU e MORATO, 2005; LAJUD, *et al.*, 2012) nos animais submetidos ao labirinto em cruz elevado. Essas incoerências podem estar relacionadas as muitas variáveis envolvidas nas metodologias utilizadas, como, por exemplo, diferenças nos tempos e frequências de isolamento (LEHMANN e FELDON, 2000).

Quanto a privação materna, os primeiros estudos descreveram seus efeitos em curto prazo, sendo observado que os animais privados apresentaram maior susceptibilidade de desenvolver erosões gástricas mais severas além de desenvolvê-las mais cedo (ACKERMAN, HOFER e WEINER, 1975). Alterações nos padrões de sono, como aumento do tempo acordado e redução do tempo gasto em sono paradoxal também foram relatadas (HOFER, 1976). A privação materna também provocou diminuição do peso corporal, da temperatura e das frequências cardíaca e respiratória dos filhotes por 3 dias após a privação. Esses animais também mostraram atraso para abrir os olhos. Apesar da diminuição da frequência cardíaca logo após a privação, com 21 e 30 dias de idade, os animais privados apresentam taxas cardíacas maiores que os animais controle (HOFER, 1975). Hofer propôs que essas alterações promovidas pela privação materna se dão por meio da retirada da influência regulatória dos estímulos térmicos, tácteis e olfatórios repetidamente providos pela mãe (para uma revisão detalhada ver (HOFER, 1987).

Foi também observado que 24 horas de privação materna promoveu aumento dos níveis de corticosterona plasmática, principalmente após administração do hormônio

adrenocorticotrófico ou corticotrofina (ACTH), mesmo durante o período hiporresponsivo ao estresse, demonstrando que o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é regulado por fatores maternos (SUCHECKI, ROSENFELD e LEVINE, 1993). Brevemente, o período hiporresponsivo ao estresse consiste em o período entre o 4º ao 14º dia pós nascimento onde a secreção de ACTH e corticosterona em resposta a um estímulo estressor está reduzida, de maneira que seja mantido um nível ótimo de corticosterona para o desenvolvimento neuronal em regiões cerebrais sensíveis a esse glucocorticoide (SAPOLSKY e MEANEY, 1986).

No que diz respeito aos efeitos da privação materna sobre respostas comportamentais e neuroendócrinas em longo prazo, Ellenbroek e colaboradores (1998) observaram que animais privados exibem um aumento na inibição do pré-pulso, inibição latente, “*gating*” sensorial auditório e na resposta de sobressalto, alterações comportamentais essas que refletem aspectos da esquizofrenia. Rentesi e colaboradores (2010) demonstraram que animais privados por 24 horas do contato da mãe no 9º dia pós nascimento apresentaram quando adultos (>69 dias de idade) menor peso corporal, menor exploração da área central do campo aberto, aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona e ACTH e um aumento na taxa de *turnover* serotoninérgico (5-HIAA/5-HT) no hipotálamo, comparado aos animais controles, evidenciando a relação entre o estresse neonatal e o desenvolvimento da ansiedade na vida adulta. No entanto, os resultados obtidos estão profundamente relacionados ao dia em que ocorre o episódio de privação materna (LEVINE, *et al.*, 1991; VAN OERS, DE KLOET e LEVINE, 1997), por exemplo, enquanto a privação no 9º dia de vida promove em ratos adultos aumento da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, ou seja, uma redução no comportamento do tipo ansioso (MARCO, LLORENTE, *et al.*, 2015; LLORENTE-BERZAL, *et al.*, 2011). Quando realizada do 11º dia de vida, a privação resulta em um aumento no comportamento do tipo ansioso, caracterizado pela diminuição da exploração do lado claro no teste de transição claro-escuro e aumento do comportamento de avaliação de risco no labirinto em cruz elevado (BARBOSA NETO, *et al.*, 2012; FATURI, *et al.*, 2010).

Apesar dos inúmeros estudos envolvendo a separação e a privação materna e suas consequências comportamentais, pouco se sabe sobre a influência desses estressores em modelos animais de ataques de pânico, ainda que estudos em

humanos demonstrem haver relação entre a perda precoce dos pais e o posterior desenvolvimento de transtorno do pânico (BANDELOW, *et al.*, 2002; BATTAGLIA, *et al.*, 2009; KENDLER, *et al.*, 1992), como mencionado anteriormente. De nosso conhecimento, apenas dois estudos investigaram essa relação, e ambos foram realizados com o protocolo de separação materna, não havendo, portanto, estudos publicados investigando os efeitos da privação materna em modelos animais de ataques de pânico. No primeiro estudo realizado, (ESTANISLAU e MORATO, 2005) avaliaram o efeito da separação materna, em ratos adultos (80 dias de idade) submetidos ao labirinto em T elevado (LTE). Este modelo experimental, derivado do labirinto em cruz elevado, baseia-se no medo inato de ratos à lugares abertos e altos, e possibilita a distinção entre respostas de fuga e esquiva inibitória, relacionadas, respectivamente, aos ataques de pânico e à ansiedade generalizada (para uma revisão detalhada sobre este teste, ver Zangrossi e Graeff (2014). No trabalho de Estanislau e Morato (2005) foi observado que 3 horas de separação materna, do dia pós-natal (DPN) 3 ao 14, em ratos adultos (DPN 60) não alteraram a resposta de fuga ou a de esquiva.

Mais recentemente, Quintino dos Santos e colaboradores (2014) avaliaram as consequências comportamentais da separação materna em um outro modelo experimental que associa a resposta de fuga com ataques de pânico, a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD). A SCPD é uma estrutura localizada no mesencéfalo, ao redor do aqueduto cerebral, e tem sido apontada como uma das principais estruturas envolvidas na gênese/regulação de comportamentos defensivos associados ao pânico, como a resposta de fuga (GRAEFF, 2004; MOBBS *et al.*, 2007). Tal relação baseia-se em evidências de que a estimulação elétrica da SCPD em humanos provoca o aparecimento de um perfil sintomático característico dos ataques de pânico, incluindo sensação de terror/medo intenso e de morte iminente, dentre outras sensações reconhecidas como bastante desagradáveis (MOBBS *et al.*, 2007; NASHOLD, WILSON e SLAUGHTER, 1969). Utilizando este modelo, Quintino do Santos e colaboradores (2014) demonstraram que animais que passaram pelo estresse de separação materna por 3 horas diárias, do DPN 2 ao 21, ao serem submetidos quando adultos (DPN 67) à estimulação elétrica da SCPD, apresentaram facilitação da expressão de resposta de fuga, interpretada como uma resposta panicogênica.

Diante do exposto, o objetivo inicial deste trabalho de pesquisa foi o de reendereçar a questão do efeito do estresse neonatal, mais especificamente da separação materna, sobre o comportamento de ratos adultos expostos ao LTE, um modelo animal mais naturalístico em relação à estimulação elétrica da SCPD, como empreendido por Quintino dos Santos e colaboradores (2014). A hipótese é que adotando o protocolo de separação materna utilizado por Quintino dos Santos e colaboradores (2014), protocolo este que, quando comparado ao utilizado por Estanislau e Morato (2005), expõe o animal a um período mais prolongado de estresse neonatal, haverá uma facilitação do comportamento de fuga no LTE. Dessa forma, no primeiro experimento realizado, os animais foram separados da mãe por 3 horas/dia, do 2º ao 21º DPN, e então submetidos LTE no DPN 60. Além disso, o comportamento desses animais foi também avaliado sequencialmente no campo aberto, no nado forçado e no teste de conflito de Vogel. Brevemente, o campo aberto permite avaliar a atividade locomotora por meio da observação da distância percorrida pelo animal durante um determinado intervalo de tempo (HOLLAND e WELDON, 1968). O nado forçado é um dos principais testes utilizados para a detecção de drogas antidepressivas através, principalmente, da observação do tempo de imobilidade do animal (BARROS e FERIGOLO, 1998). Por fim, no teste de Vogel, após passarem por 48 horas de privação de água, os animais são colocados em uma caixa contendo um bebedouro conectado a uma fonte elétrica, de maneira que o comportamento de lamber a água do bebedouro para saciar a sede seja punido com leves choques elétricos, permitindo assim avaliar o efeito de drogas ansiolíticas através da observação do aumento do comportamento punido (VOGEL, BEER e CLODY, 1971). Em um segundo experimento independente, os efeitos a longo prazo da separação materna foram também avaliados no protocolo de estimulação elétrica da SCPD utilizado em nosso laboratório, que difere daquele utilizado por Quintino dos Santos e colaboradores (2014) quanto ao tipo de análise comportamental e o tipo de estímulo elétrico empregado.

Diante dos resultados negativos obtidos nessa primeira etapa, uma nova hipótese foi testada: a de que a separação materna neonatal, somada ao isolamento social na vida adulta, favoreceria a expressão do comportamento de fuga no LTE. A ideia para esse experimento foi calcada na hipótese do estresse cumulativo (NEDERHOF e SCHMIDT, 2012), também chamada de hipótese “2-hit”, inicialmente elaborada para a esquizofrenia (MAYNARD, *et al.*, 2001), mas que pode ser aplicada a outras

psicopatologias (LLORENTE, *et al.*, 2011). Resumidamente, de acordo com essa hipótese, experiências aversivas vividas no início da vida tornariam o indivíduo mais predisposto ao desenvolvimento de doenças, mediante a exposição a novos eventos negativos ao longo da vida. Assim sendo, no experimento 3, animais que passaram pela separação materna no período neonatal e foram isolados do convívio social por no mínimo 5 dias quando jovens adultos (DPN 60) foram avaliados no LTE (DPN 65) e, adicionalmente, no campo aberto, nado forçado e no teste de conflito de Vogel.

Na segunda etapa deste trabalho, o foco de estudo foi direcionado à privação materna e suas consequências em modelos experimentais que associam a resposta de fuga ao pânico. Assim, no quarto experimento realizado, testamos a hipótese de que a privação materna no 11º DPN, tal como realizada por Barbosa Neto e colaboradores (2012), promoveria nos ratos adultos aumento na expressão do comportamento no LTE. Neste estudo os animais foram também avaliados no teste de transição claro-escuro e no campo aberto. O teste de transição claro-escuro consiste em uma arena dividida em dois compartimentos: um claro e um escuro. O aumento da atividade exploratória entre esses compartimentos, avaliada por meio do número de transições realizadas entre ambos, é associada a um efeito do tipo ansiolítico (CRAWLEY e GOODWIN, 1980). No quinto experimento, verificamos as consequências tardias da privação materna sobre o comportamento de fuga promovido pela exposição à condição de hipóxia (7%). A exposição de ratos à hipóxia promove a expressão de comportamento de fuga e a ativação da SCPD, medida através da expressão da proteína FOS (CASANOVA, *et al.*, 2013). Spiccioccoli e colaboradores (2015) mostraram que a administração sistêmica crônica de fluoxetina ou aguda de alprazolam, inibe o comportamento de fuga de ratos expostos à hipóxia (7% de O₂), corroborando para a validação da fuga promovida por hipóxia como modelo de ataques de pânico.

A partir da observação da facilitação da resposta de fuga no quinto experimento realizado, no experimento 6 testamos através da administração periférica do inibidor irreversível da triptofano hidroxilase, 4-cloro-DL-fenilalanina metil éster (p-CPA) (BERGER, GRZANNA e MOLLIVER, 1989; DRINGENBERG, *et al.*, 1995; KOE e WEISSMAN, 1966), a hipótese de que ao inibir a síntese de 5-HT na SCPD haverá aumento na expressão de fuga nos animais controles submetidos à hipóxia, e este

aumento possa ser ainda maior naqueles animais que foram previamente privados da mãe. A triptofano hidroxilase é uma importante enzima na biossíntese da 5-HT, responsável por catalisar a hidroxilação da triptofano a 5-hidroxitriptofano na presença de NADPH e oxigênio.

A importância da 5-HT na fisiopatologia do pânico tem sido amplamente reconhecida (SPIACCI, *et al.*, 2015; CORCHS, *et al.*, 2015; ZANGROSSI e GRAEFF, 2014; PAUL, *et al.*, 2014; DE BORTOLI, *et al.*, 2013; GRAEFF, 2012). Vários estudos mostram que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica na SCPD inibe a resposta de fuga (para uma revisão ver (GRAEFF, 2002). Por exemplo, Schütz e colaboradores (1985) demonstraram que a microinjeção de 5-HT nesta área mesencefálica aumenta o limiar aversivo capaz de induzir o comportamento de fuga mediante estimulação elétrica da SCPD, sugerindo que a 5-HT possui um efeito do tipo panicolítico.

No início da década de 1990, Deakin e Graeff (1991) propuseram a teoria do papel dual da 5-HT sobre o transtorno de ansiedade generalizada e o transtorno do pânico. Brevemente, os autores hipotetizaram que enquanto a 5-HT atua inibindo a expressão de respostas de fuga associadas ao pânico agindo na SCPD, por outro lado, ela facilita o comportamento de esquiva inibitória associado à ansiedade generalizada, atuando em áreas como a amígdala e o córtex frontal. Segundo esta teoria, um déficit na neurotransmissão serotoninérgica a nível da SCPD levaria à vulnerabilidade a ataques de pânico.

Estudos com a estimulação elétrica da SCPD e o LTE demonstram que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica mediada por receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} inibe a resposta de fuga (ZANOVELI, NOGUEIRA e ZANGROSSI, 2003; SOARES e ZANGROSSI, 2004; NOGUEIRA e GRAEFF, 1995). Outros trabalhos mostram que esses receptores 5-HT_{1A} na SCPD estão envolvidos na mediação do efeito panicolítico causado por drogas antidepressivas. Nesse sentido, Zanoveli e colaboradores (2005; 2007) demonstraram que o tratamento crônico (21 dias), mas não o tratamento agudo, com imipramina ou fluoxetina aumentou o efeito anti-fuga da injeção intra-SCPD de 5-HT, 8-OH-DPAT ou DOI no LTE. Mais recentemente, Zanoveli e colaboradores (2010) mostraram que a administração crônica de fluoxetina causou um aumento nos níveis extracelulares de 5-HT na SCPD. Em consonância com essa ideia, foi visto por microdiálise que a administração crônica, mas não aguda,

de fluoxetina em uma dose que aumenta a reatividade dos receptores 5-HT na DPAG, também aumenta a liberação de 5-HT na SCPD (ZANOVELI et al, 2010).

O núcleo dorsal da rafe é a principal fonte de inervações serotoninérgicas para a SCPD (VERTES, 1991; STEZHKA e LOVICK, 1997). Nesse sentido, estudo realizado também com microdiálise demonstrou que a estimulação de neurônios serotoninérgicos nesse mesmo núcleo da rafe eleva os níveis de 5-HT na SCPD (VIANA, GRAEFF e LOSCHMANN, 1997). Assim, esse aumento de 5-HT causado pela fluoxetina pode ser reflexo de uma sensibilização dos auto receptores 5-HT_{1A} localizados no núcleo dorsal da rafe (ZANGROSSI e GRAEFF, 2014). No estudo de Zanoveli e colaboradores (2010), foi também observado que o tratamento crônico com fluoxetina, além de aumentar a concentração de 5-HT na SCPD, também diminui a resposta de fuga no LTE. Além disso, o efeito panicolítico causado pelo tratamento com fluoxetina foi bloqueado pela administração intra-SCPD de WAY 100635, um antagonista de receptor 5-HT_{1A}. No mesmo sentido, a administração de WAY-100635 intra-SCPD também bloqueia o efeito panicolítico desse mesmo antagonista administrado no núcleo dorsal da rafe (POBBE e ZANGROSSI, 2005). Assim, o aumento na neurotransmissão serotoninérgica causada pelo tratamento crônico com fluoxetina pode acontecer tanto por meio de uma aumento nos níveis de 5-HT quanto pelo aumento na reatividade de receptores 5-HT_{1A}, ambos na SCPD (Zangrossi e Graeff, 2014)

Ainda no experimento 6, após esta análise mais global do envolvimento da 5-HT através da depleção desse neurotransmissor, os encéfalos desses mesmos animais foram dissecados para avaliação, por meio da técnica de Western Blotting, da expressão de receptores 5-HT_{1A} na SCP. Para efeitos comparativos, também foi avaliada a expressão desses mesmo receptores na amígdala. A nossa hipótese é de que nos animais privados ocorrerá uma diminuição da expressão destes receptores, favorecendo a maior susceptibilidade destes animais para estímulos que desencadeiam ataques de pânico. Adicionalmente, o sangue desses animais foi coletado para posterior análise dos níveis plasmáticos de corticosterona

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do estresse neonatal promovido pela separação ou pela privação materna sobre a resposta de fuga de ratos adultos em diferentes modelos animais que associam esta resposta defensiva à ataques de pânico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da separação materna (3 horas/dia do 2º ao 21º DPN) sobre o comportamento de fuga de ratos adultos (DPN 60) submetidos ao LTE. Adicionalmente, avaliar o comportamento desses animais no campo aberto, nado forçado e teste de conflito de Vogel;
- Avaliar o efeito da separação materna (3 horas/dia do 2º ao 21º DPN) sobre a resposta de fuga promovida pela estimulação elétrica da SCPD;
- Avaliar o efeito da separação materna (3 horas/dia do 2º ao 21º DPN) somada ao isolamento social sobre o comportamento de fuga de ratos adultos submetidos ao LTE. Adicionalmente, avaliar o comportamento desses animais no campo aberto, nado forçado e teste de conflito de Vogel;
- Avaliar o efeito da privação materna (24 horas no 11º DPN) sobre o comportamento de fuga e de esquiva inibitória de ratos adultos (DPN 60) submetidos ao LTE elevado. Adicionalmente avaliar o comportamento desses animais nos testes do campo aberto e transição claro-escuro;
- Avaliar o efeito da privação materna (24 horas no 11º DPN) sobre o comportamento de fuga de ratos adultos submetidos à hipóxia (7% O₂).
- Avaliar o efeito da depleção periférica de 5-HT obtida por meio da administração de p-CPA sobre o comportamento de ratos adultos previamente submetidos à privação materna e posteriormente testados no modelo da hipóxia. Adicionalmente, avaliar os níveis plasmáticos de

corticosterona desses animais e a concentração de receptores 5-HT_{1A} na SCP e na amígdala.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar nulíparas prenhas provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – campus de Ribeirão Preto - SP. Estas ratas foram mantidas individualmente em caixas de acrílico (42 x 24 x 17 cm; comprimento x largura x altura), com livre acesso a água e a comida e sobre condições controladas de luz (ciclo claro-escuro de 12 horas) e temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). As ratas foram acompanhadas diariamente para a determinação do dia do nascimento das ninhadas, denominado de DPN 0. No DPN 1, a ninhada foi padronizada em 6 a 8 filhotes machos por rata. Desse momento em diante, os animais não foram manipulados até o dia da separação/privação materna ou desmame, exceto para a manutenção das caixas, que foi realizada uma vez na semana, a fim de minimizar interferências na relação mãe-filhote. Para todos os grupos experimentais, o desmame ocorreu no DPN 21 e os filhotes foram então agrupados de acordo com o grupo (estressado ou controle), de 3 a 4 ratos por caixa, e assim mantidos sob as condições de luz e temperatura já citados até o dia da realização dos testes. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo 057/2012).

3.2. APARATOS EXPERIMENTAIS

3.2.1. Labirinto em T elevado

O LTE é constituído por três braços de madeira com 50 cm de comprimento e 12 cm de largura, cada. Um dos braços é protegido por paredes laterais de 40 cm de altura e fica perpendicular aos dois outros braços. Tais braços são considerados abertos, pois não possuem as paredes de madeira, mas são circundados por 1 cm de acrílico transparente para evitar quedas dos animais. O aparato está elevado 50 cm em relação ao solo.

3.2.2. Campo aberto

O teste do campo aberto foi realizado em uma arena de madeira, medindo 60 x 60 cm, com paredes laterais de 40 cm de altura.

3.2.3. Claro Escuro

O aparato de transição claro-escuro consiste em uma caixa de madeira medindo 48 cm x 24 cm x 27 cm e uma grade como chão composta de barras espaçadas em 5mm. A caixa é dividida por uma barreira que possui uma passagem (10 cm x 10 cm) de forma que os ratos andar pelos dois compartimentos de igual tamanho (24 cm x 24 cm x 27 cm): um com paredes pretas e não iluminado, outro com paredes brancas, iluminado por uma fonte de luz de 50 lx.

3.2.4. Nado forçado

O nado forçado foi realizado em um cilindro de PVC com 55 cm de altura e 25 cm de diâmetro, preenchido com água a 24°C +/- 2°, 30 cm de profundidade.

3.2.5. Teste de conflito de Vogel

O teste de conflito de Vogel foi realizado em uma caixa de acrílico (42 cm x 25 cm x 20 cm) com chão composto de uma grade de aço inoxidável. O bico metálico de uma mamadeira contendo água é projetado para dentro da caixa. O contato do animal com o bico e o chão metálicos fecha o circuito elétrico controlado por um sensor (Insight Instruments) que produz pulsos sempre que o animal entra em contato com os dois componentes, ou seja, a cada lambida. A cada 20 lambidas o animal recebe um choque de 0,5 mA por 2 segundos. O sensor detecta o total de lambidas e choques

recebidos durante o período de teste. O aparato está alocado dentro de uma caixa de isolamento acústico.

3.2.6. Arena para estimulação elétrica

Os experimentos de estimulação elétrica da SCPD foram realizados em uma arena de acrílico com as seguintes dimensões: 25,5 cm de diâmetro na base, 40 cm de diâmetro na borda e 36 cm de altura. O seu assoalho foi forrado com maravalha a fim de reproduzir as condições da gaiola-viveiro do animal. Uma tela de *nylon* disposta na parte superior da cuba foi utilizada para impedir que os animais saltem para fora da área de teste durante as sessões de estimulação elétrica. A tela de *nylon* possui uma abertura em seu centro, que permite a passagem de um conector elétrico giratório de teflon ligado a dois canais de saídas. A primeira saída foi ligada a um estimulador, que gerou corrente contínua senoidal de 60 Hz (Marseillan, 1977). Tal corrente foi monitorada por meio de um osciloscópio (Pantec – 5205 – 10mHz), ligado em paralelo ao aparelho estimulador. A segunda saída foi conectada a um cabo flexível que se encaixa ao eletrodo fixado ao crânio do animal, permitindo assim a passagem de corrente elétrica para a SCPD. Este aparato permite a livre movimentação do animal na arena.

3.2.7. Hipóxia

O aparato experimental usado para expor os animais à hipóxia consiste em uma câmara cilíndrica de acrílico transparente (25 cm de diâmetro x 35 cm de altura), selado por uma tampa removível. A câmara é conectada a uma bomba de ar e a um cilindro de nitrogênio (N₂) através de uma válvula de fluxo. A fim de diminuir os níveis de O₂ na câmara, N₂ puro foi injetado a uma taxa de fluxo de 4,5 L/min, levando a condição de hipóxia (de 21% para 7% de O₂) em cerca de 270 s. As concentrações de O₂ e CO₂ dentro da câmara foi continuamente monitorada utilizando um analisador de gás (ML206 Gas Analyzer, Adinstruments, Australia). Os experimentos foram

gravados e analisados utilizando o software PowerLab Chart 5 (AdInstruments, Australia).

3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. Estudos com a separação materna

3.3.1.1. *Experimento 1 – Avaliação o efeito da separação materna sobre o comportamento de ratos adultos submetidos ao LTE, campo aberto, nado forçado e teste de conflito de Vogel.*

3.3.1.1.1. *Separação materna*

6 ninhadas foram destinadas ao experimento 1. No DPN 1 foi feita a padronização das ninhadas para 6 a 8 filhotes machos por mãe. Em uma mesma ninhada, os filhotes eram aleatoriamente divididos entre o grupo separação materna (S) e o grupo controle (NS). Os filhotes tiveram seus dorsos marcados, ainda no DPN 1, com caneta dermatográfica (Texta 500) a fim de identificar a qual grupo pertenciam. A separação materna foi realizada do DPN 2 ao 21, 180 minutos por dia, sempre iniciados entre as 8:30 e 9:30, com base no descrito por Quintino dos Santos (2014). Durante o procedimento de separação materna, os filhotes S foram individualmente acomodados nas caixas de separação, enquanto os filhotes NS, juntamente com a mãe eram transportados para uma nova caixa-ninho e mantidos na mesma sala onde estavam os animais S. Ao término dos 180 minutos, os animais, tanto S quanto NS, foram reagrupados, juntamente com suas mães, em suas respectivas caixas-ninho.

3.3.1.1.2. *Habituação*

Nos DPN 62 e 63, todos os animais foram manipulados individualmente por 5 minutos e logo após, colocados individualmente em uma caixa 39 x 32 x 16 cm, onde

permaneceram por mais 5 minutos. Este procedimento foi realizado com a finalidade de que os animais se habituassem ao experimentador e às condições pelas quais foram submetidos no dia do teste com o LTE. A iluminação nas salas onde ocorre a habituação e os testes era de 40 lux e havia um ruído de fundo constante produzido por exaustores de ar.

3.3.1.1.3. *Labirinto em T elevado e campo aberto*

No DPN 64, cada animal foi colocado individualmente em um dos braços abertos do labirinto durante 30 minutos. Teixeira e colaboradores (2000) mostram que a exposição prévia a um dos braços abertos do LTE potencializa a expressão do comportamento de fuga, reduzindo reações comportamentais à novidade.

No DPN 65, o teste no LTE foi iniciado pela tomada da esquiva inibitória. Para tal, animais foram individualmente colocados na extremidade distal do braço fechado e o tempo gasto para sair deste braço, cruzando a linha que o delimita com as quatro patas, foi registrado (Linha de Base). Após a saída do braço fechado, os animais eram levados para a mesma caixa que permaneceram durante cinco minutos nas habituações dos dias anteriores. Depois de 30 segundos, cada animal foi novamente colocado no braço fechado para tomada de mais uma resposta de saída (Esquiva 1), e isto se repetiu por mais uma vez (Esquiva 2). O tempo máximo de permanência no braço fechado foi de 5 minutos, em quaisquer das tentativas. Para a verificação da resposta de fuga, 30 segundos após a Esquiva 2, cada animal foi colocado na extremidade distal do mesmo braço aberto onde foi pré-exposto, e o tempo gasto para sair deste braço, cruzando a linha que o delimita com as quatro patas, foi cronometrado (Fuga 1). Este procedimento se repetiu mais duas vezes (Fugas 2 e 3), com intervalos de 30 segundos entre as tentativas. Trinta segundos após a tomada de Fuga 3, cada animal foi submetido ao campo aberto por 5 minutos, com a finalidade de verificar se o procedimento adotado interferiu na atividade locomotora dos animais.

3.3.1.1.4. *Nado forçado*

O teste do nado forçado foi realizado como descrito anteriormente (PORSOLT, *et al.*, 1978). No DPN 66, os animais foram pré-expostos individualmente ao aparato de nado forçado por 15 minutos. 24h depois, os animais foram resubmetidos ao teste por 5 minutos, durante o qual foi registrado o tempo gasto em imobilidade. A cada troca de animal foi também trocada a água do cilindro. Após o teste os animais foram secados e retornaram para suas respectivas caixas.

3.3.1.1.5. *Teste de conflito de Vogel*

Após 48h de descanso do teste de nado forçado, no DPN 70, os animais foram privados de água para a realização do teste de conflito de Vogel. 24 horas após a retirada da água, os animais foram pré-expostos ao aparato para aprendizagem da localização do bico dispensador de água. Uma vez aprendida a tarefa, os animais permaneciam no aparato por 10 minutos, podendo beber água livremente, sem punição para as lambidas. Animais que não aprendiam a tarefa após 10 minutos de exposição ao aparato foram excluídos do experimento. No DPN 72, os animais foram testados durante 5 minutos, sendo avaliada a quantidade de lambidas punidas.

Uma representação esquemática da ordem dos testes realizados no experimento 1 pode ser vista na figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática da ordem dos eventos seguida no experimento 1 desde o nascimento até a exposição aos testes comportamentais. Abreviações: DPN, dia pós-natal; S, separados maternalmente; NS, não separados maternalmente.

3.3.1.2. *Experimento 2 – Avaliação do efeito da separação materna sobre a resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD de ratos adultos*

3.3.1.2.1. *Separação materna*

3 ninhadas foram utilizadas para este experimento. Os animais foram submetidos ao protocolo de separação materna, conforme descrito para o experimento 1.

3.3.1.2.2. *Cirurgia para implantação do quimitrodo*

No 60º dia após o nascimento, os animais foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Aldrich – EUA) a 2,5% (10 mL/Kg, i.p.) e então adaptados a um aparelho estereotático (StoeltingCo – EUA). A seguir foi realizada a limpeza do campo cirúrgico e administrado anestésico local cloridrato de lidocaína associado a um vasoconstritor (Novocol 100, S.S. White – Brasil). Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal dos tecidos cutâneos e subcutâneos e dois orifícios foram perfurados na calota craniana, para a introdução de parafusos de aço inoxidável. Outro orifício foi perfurado a uma distância de 1,9 mm lateral ao lambda para a introdução de um quimitrodo, a uma profundidade 5,2mm abaixo da superfície craniana, com uma inclinação de 22° em relação ao plano sagital.

O quimitrodo consiste de uma cânula-guia conectada a um eletrodo confeccionado a partir de um fio de aço inoxidável flexível, de 250 µm de diâmetro, isolado em toda sua extensão, exceto nas secções transversas das extremidades. Um segmento desse fio é soldado a um pino inoxidável e colado paralelamente à metade distal de uma cânula-guia, ultrapassando-a em 1mm. A extremidade proximal do eletrodo é soldada a um pino de aço que juntamente com a extremidade superior da cânula-guia constituem os polos de estimulação.

Após o implante, o quimitrodo foi fixado à calota craniana por meio de resina dental autopolimerizável. Após a cirurgia, os animais receberam uma associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico, Fontoura-Wyeth-Brasil – 1ml/Kg, intra-muscular) e um agente analgésico, anti-inflamatório e antitérmico, flunixinina meglumina (Banamine, Schering-Plough S/A – Brasil), um agente analgésico, antiinflamatório e antitérmico (1ml/Kg, sub-cutâneo) e retornaram ao biotério do laboratório onde permaneceram até o dia do teste.

3.3.1.2.3. *Habituação*

Nos DPN 63 e 64, todos os animais foram manipulados individualmente por 5 minutos, de maneira a habituar os animais ao experimentador e às condições pelas quais seriam submetidos no dia do teste. A iluminação nas salas onde ocorre a habituação e os testes era de 40 lux e havia um ruído de fundo constante produzido por exaustores de ar.

3.3.1.2.4. *Estimulação elétrica da SCPD*

Para avaliação do efeito da separação materna sobre a fuga evocada pela estimulação elétrica da SCPD, ao DPN 65, foi determinado o limiar de fuga dos animais NS e S, que se refere a menor intensidade de corrente elétrica que aplicada a SPCD é capaz de produzir comportamento de fuga (corridas seguidas por saltos) por três tentativas consecutivas. Para sua determinação, um cabo flexível foi conectado ao quimitrodo, e o animal então colocado na arena de estimulação por um período de 5 minutos para habituação ao novo ambiente. Passado este período, foi iniciada a determinação dos limiares aversivos. A corrente elétrica inicial teve intensidade de 20 μ A, aumentando progressivamente (+ 4 μ A com relação à corrente precedente) até o limite de 152 μ A. A duração de cada estímulo foi de 10 segundos, seguidos de intervalos de 10 segundos. Quando a fuga não foi observada dentro da faixa de intensidade de corrente elétrica estabelecida, o animal foi excluído do experimento.

3.3.1.2.5. *Histologia*

Após o término do teste, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 3% e submetidos à microinjeção na SCPD de 0,2 μ L do corante azul de Evans a 1%. Posteriormente, foi realizada a perfusão intracardíaca com salina 0,9% e formol 10%. Após a perfusão, os encéfalos foram retirados e fixados em formol 10% por um período mínimo de 2 dias, para posterior análise histológica. A análise histológica foi realizada pelo corte dos cérebros em seções coronais de 60 μ m de espessura, com o auxílio de um criostato (Leica CM1850), seguida de verificação microscópica da posição do quimitrodo com base no atlas de Paxinos e Watson (2006). Foram considerados apenas os animais cuja localização dos quimitrodos estava na SCPD.

Uma representação esquemática da ordem dos testes realizados no experimento 2 pode ser vista na figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática da ordem dos eventos seguida no experimento 2 desde o nascimento até a exposição ao teste comportamental. Abreviações: DPN, dia pós-natal; S, separados maternalmente; NS, não separados maternalmente.

3.3.1.3. Experimento 3 – Avaliação do efeito da combinação da separação materna com o isolamento social na vida adulta sobre as respostas comportamentais de ratos submetidos ao labirinto em T elevado, campo aberto, nado forçado e teste de conflito de Vogel

5 ninhadas foram utilizadas para esse experimento, que seguiu a mesma bateria de testes descrita para o experimento 1, diferindo-se exclusivamente pelo isolamento social dos animais a partir do DPN 60 até o término do experimento.

3.3.1.3.1. Isolamento social

No DPN 60, os animais foram isolados individualmente em caixas de polipropileno (30 x 20 x 13 cm) e assim mantidos até o término dos experimentos comportamentais.

Uma representação esquemática da ordem dos testes realizados no experimento 3 pode ser vista na figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática da ordem dos eventos seguida no experimento 3 desde o nascimento até a exposição ao teste comportamental. Abreviações: DPN, dia pós-natal; S, separados maternalmente; NS, não separados maternalmente.

3.3.2. Estudos com a privação materna

3.3.2.1. *Experimento 4 - Avaliação do efeito da privação materna sobre as respostas comportamentais de ratos adultos submetidos ao labirinto em T elevado, campo aberto e teste de transição claro-escuro.*

3.3.2.1.1. *Privação materna*

A privação materna foi realizada de acordo com o protocolo utilizado pelo grupo da Prof^a Dr.^a Deborah Suchecki do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo. Brevemente, no DPN 1, a ninhada foi padronizada em 6 a 8 filhotes machos por rata. Nesse mesmo dia, cada ninhada foi aleatoriamente destinada ou ao grupo que passou por privação materna (P11) ou ao grupo controle não privado (NP). No DPN 11, os animais P11 foram submetidos a 24h de privação materna. Para tanto, a ninhada inteira foi transferida para uma nova caixa contendo maravalha da caixa ninho e levados para outra sala, enquanto a mãe permaneceu na caixa ninho, no biotério. A caixa de privação foi colocada sobre uma manta de aquecimento, mantendo a temperatura entre 30-33°C, correspondente à temperatura do ninho. Água e ração não foram fornecidas à ninhada durante a privação. Após esse período, os animais foram reagrupados à suas mães em suas respectivas caixas-ninho e não perturbados até o desmame no DPN 21. As ninhadas controle permaneceram no biotério durante todo o período de amamentação, sendo manipuladas apenas para limpeza das caixas a cada 4 a 5 dias. (BARBOSA NETO, *et al.*, 2012). Após o desmame, conforme descrito anteriormente, os animais foram agrupados (3 a 4 ratos por caixa), de acordo com o grupo experimental e mantidos no biotério até a realização dos experimentos. Em todos os experimentos realizados, um número máximo de 3 ratos de cada ninhada foi utilizado para compor um mesmo grupo experimental, assim garantindo a variabilidade genética dentro do grupo. Para este experimento, foram utilizadas 9 ninhadas (4 controles e 5 P11).

3.3.2.1.2. *Labirinto em T elevado e campo aberto*

Os animais foram submetidos ao LTE e ao campo aberto, de acordo com o protocolo descrito para o experimento 1.

3.3.2.1.3. *Teste de transição claro-escuro*

Ao término do teste no campo aberto, os animais foram submetidos ao teste de transição claro-escuro. O rato foi inicialmente colocado no compartimento claro, de frente para a passagem para o compartimento escuro. Durante 5 minutos, contados a partir da primeira transição para o compartimento escuro, foi analisado o tempo que o animal permaneceu em cada compartimento e o número total de transições entre os mesmos.

3.3.2.2. *Experimento 5 - avaliação do efeito da privação materna sobre as respostas comportamentais de ratos adultos submetidos à hipóxia.*

3.3.2.2.1. *Privação materna*

Nesse experimento, 8 ninhadas (4 controles e 4 P11) foram utilizadas. A privação materna foi realizada conforme descrito para o experimento 4.

3.3.2.2.2. *Hipóxia*

Um dia antes do teste, os ratos foram colocados no aparato por 15 minutos. Durante a sessão de habituação, o ar ambiente foi injetado na câmara a uma taxa de fluxo de 4,5L/min a fim de habituar os animais ao fluxo de gás e ao som do mesmo. No dia do

teste, os animais foram inicialmente colocados na câmara e aclimatados a ela sob condições de normoxia (21% de O₂) por 5 minutos. Para tanto, ar ambiente foi injetado na câmara (4,5L/min). Em seguida, N₂ puro foi injetado na câmara (4,5L/min) a fim de induzir hipóxia (de 21% a 7% de O₂) em 4 minutos. Atingida essa condição, a injeção de N₂ foi suspensa e a condição de hipóxia (7% de O₂) foi mantida por 6 minutos. Os comportamentos durante o teste foram gravados. Com o auxílio do programa ANY-maze®, a atividade locomotora de cada animal foi avaliada durante os primeiros 5 minutos de teste, sob condição de normóxia, por meio da quantificação da distância percorrida. Durante a condição de hipóxia, o número de saltos foi contado manualmente. Os saltos são caracterizados por movimentos em direção ao topo da câmara no qual o animal tira as quatro patas do chão.

Uma representação esquemática da ordem dos testes realizados nos experimentos 4 e 5 pode ser vista na figura 4.

Figura 4 – Representação esquemática da ordem dos eventos seguida nos experimentos 4 e 5 desde o nascimento até a exposição aos testes comportamentais. Abreviações: DPN, dia pós-natal; NP, não privado; P11, privado no 11º DPN.

3.3.2.3. *Experimento 6 - avaliação do efeito da privação materna sobre a neurotransmissão serotoninérgica e sobre os níveis plasmáticos de corticosterona.*

3.3.2.3.1. *Privação materna*

Para este experimento, 20 ninhadas (10 controles e 10 P11) foram utilizadas. A privação materna foi realizada conforme o protocolo descrito para o experimento 3.

3.3.2.3.2. *Tratamento com p-CPA para depleção sistêmica de 5-HT*

Por 4 dias consecutivos, os animais controle e privados foram tratados com p-CPA (100 mg/Kg/dia, i.p.) ou salina (0,9%), sendo a última injeção administrada 24 horas antes do teste. A dose escolhida foi baseada em estudo anterior realizado em nosso laboratório (Sant'Ana et al, 2016)

3.3.2.3.3. *Hipóxia*

Os animais foram submetidos ao teste de exposição à hipóxia, conforme descrito no experimento 4, ou apenas à normóxia, ou seja, durante os 15 minutos de teste foi mantida a concentração de O₂ em 21%. Assim sendo, foram formados os seguintes grupos: (a) animais controle ou privados submetidos à normóxia e tratados com salina, (b) animais controle ou privados submetidos à hipóxia e tratados com salina, (c) animais controle ou privados submetidos à hipóxia e tratados com p-CPA.

3.3.2.3.4. *Dissecação do encéfalo e coleta do sangue*

30 minutos após o término do teste da hipóxia, os animais foram sacrificados por decapitação para dissecação da encéfalo e coleta do sangue do tronco. A SCP e a amígdala de cada animal foram coletados com auxílio de um *punch* (1 mm de

diâmetro) e armazenados em tubos plásticos à temperatura de -70°C até a realização do ensaio para quantificação dos receptores 5HT_{1A}. O sangue de cada animal foi coletado em tubos plásticos heparinizados (50µL/mL). Em seguida, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 3000 rpm à temperatura de 4°C. Duas alíquotas de plasma foram coletadas em tubos plásticos e armazenadas à -20°C até a realização do ensaio para quantificação da CORT. Para evitar elevações inespecíficas nos níveis de corticosterona, os animais foram manipulados pelo mesmo experimentador durante o experimento, e a decapitação e coleta do sangue de cada animal ocorreu dentro do limite de 60 segundos.

3.3.2.3.5. *Ensaio para quantificação da corticosterona plasmática*

A concentração de corticosterona no plasma foi determinada por radioimunoensaio (RIA), após processo de extração por etanol, conforme descrito por Castro et al (1995).

3.3.2.3.6. *Ensaio de Western Blot para quantificação de receptores 5HT_{1A} na SCPD*

Seleção das amostras

Devido à inviabilidade prática de se utilizar todos os animais que passaram pelo teste comportamental para realização do ensaio de Western Blot, 6 animais do grupo controle – normóxia e 6 animais do grupo privado – normóxia, ambos tratados com salina, foram selecionados por meio de sorteio para prosseguir com a quantificação de receptores 5HT_{1A} na SCP e na amígdala. Os grupos de animais que foram submetidos à hipóxia não foram utilizados neste ensaio, pois a questão a ser respondida englobou apenas o efeito da privação materna sobre a expressão de proteínas de receptores 5-HT_{1A} na SCP, não sendo interessante nesse momento avaliar o efeito da exposição à hipóxia.

Homogeneização das amostras

Para realização do ensaio de Western Blot, primeiramente as amostras foram homogeneizadas. Para tanto, as amostras foram retiradas do freezer -70°C e mantidas em gelo durante todo o processo. Em seguida, foi adicionado a cada amostra o tampão de lise (100 μL) contendo inibidores de protease e também uma pequena esfera de aço inoxidável, previamente autoclavada, com a finalidade de auxiliar na quebra do tecido e homogeneização da solução. As amostras foram então homogeneizadas no TissueLyser LT (Qiagen) a 15 oscilações/segundo, durante 1 minuto. Logo após, as amostras foram centrifugadas (12000 rpm, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante foi coletado. Repetiu-se o processo de centrifugação e então o sobrenadante foi aliquotado e armazenado novamente em freezer -70°C .

Quantificação das proteínas pelo método de Bradford

Para quantificação das proteínas foi utilizado o método colorimétrico de Bradford. Uma curva padrão foi feita a partir da diluição seriada de uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA) 2% diluído no mesmo tampão de lise utilizado nas amostras. A curva era composta de 7 concentrações de BSA: 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.250, 0.125 mg/mL. Em seguida, a curva padrão, uma amostra-branco (0 mg/ml) e as amostras experimentais foram pipetadas em triplicata em uma microplaca de 96 poços (5 μL /poço). 250 μL do reagente de Bradford (Bio-rad) foram adicionados a cada poço. Prosseguiu-se com uma incubação à temperatura ambiente por 5 minutos e então a medida da absorbância foi feita em uma leitora de microplacas no comprimento de onda de 595 nm.

Eletroforese

A partir da quantificação da concentração de proteínas em cada amostra, estas foram preparadas, ou seja, reduzidas e desnaturadas, para eletroforese, adicionando-se tampão de frente contendo SDS, agente redutor e água milli-q, de maneira a atingir uma concentração final de 1µg de proteína/µL. Após o preparo, as amostras foram colocadas no banho seco por 5 minutos a 70°C a fim de ajudar no processo de desnaturação das proteínas. Em uma cuba de eletroforese contendo tampão de corrida (NuPage® buffer - Bis-tris 4-12%; Tris-acetato 8-12%), as amostras foram carregadas no gel de poliacrilamida (Bolt® 4-12% Bis-Tris Plus - Novex®), juntamente com o padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Prestained Standarts Kaleidoscope™ - Bio-Rad). A corrida do gel se deu a uma voltagem de 150V por aproximadamente duas horas e meia, sempre acompanhando a corrida através do padrão de peso molecular.

Transferência

Após a eletroforese, iniciou-se o processo de transferência das proteínas separadas no gel para uma membrana de nitrocelulose. Em uma cuba de transferência, foi montado um “sanduiche” onde o gel foi colocado adjacente à membrana, com a membrana próxima ao polo positivo da cuba. A transferência se deu pela aplicação de um campo elétrico de voltagem crescente: 20 minutos – 10 V, 20 minutos – 20 V, 20 minutos – 30 V, 20 minutos – 40 V, 30 minutos – 50 V. A fim de confirmar se a transferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada com sucesso, foi utilizado o marcador de proteína, Ponceau red.

Bloqueio e incubação com anticorpos primário e secundário

Confirmada a transferência, a membrana foi lavada com salina tris-tamponada mais tween 20 (TBST), 3 vezes de 10, 5 e 10 minutos respectivamente, para retirar o Ponceau. Em seguida, para evitar ligações inespecíficas do anticorpo com a membrana, foi realizado o bloqueio da mesma com uma proteína neutra, para tanto,

a membrana foi mergulhada em uma solução de TBST, BSA 2% e leite (blotting grad milk - Bio-rad) 5% por 2 horas. Ao término do bloqueio, a membrana foi novamente lavada em TBST, como descrito a pouco, e então incubada com o anticorpo primário para receptor 5HT_{1A} (HTR1A polyclonal antibody - prod # PA5-28090 – Thermo Fisher Scientific - diluição 1:10000) overnight à 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário, foi feita outra lavagem, e então a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (donkey anti-rabbit IgG-HRP secondary antibody – sc2313 – Santa Cruz Biotechnology – diluição 1:10000) por 2 horas. Em seguida foi feita uma nova lavagem e prosseguiu-se com a detecção das proteínas.

Revelação - Detecção das proteínas via método de quimioluminescência

A membrana foi incubada, protegida da luz, por 5 minutos com o reagente de quimioluminescência ECL (Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent – GE® Healthcare Life Sciences). Imediatamente após a incubação, seguiu-se com a leitura da membrana (C-DiGit® Blot Scanner – LI-COR)

Normalização – Controle de carregamento das amostras no gel

Depois de feita a revelação da membrana com o anticorpo de interesse, foi realizado o controle do carregamento das amostras no gel, a fim de detectar falhas de pipetagem que pudessem interferir na análise. Para tanto, foi utilizado o anticorpo para β -actina, proteína estrutural que deve ser encontrada nos mesmos níveis em todas as amostras. Assim, a membrana foi novamente bloqueada com TBST, leite 5% e BSA 2% por 3 horas. Terminado o bloqueio, a membrana passou por três lavagens de 10, 5 e 10 minutos respectivamente com TBST e então foi incubada por 2 horas com o anticorpo anti- β actina (Anti-Actin antibody, clone c4 – cat. # MAB1501 – Merck Millipore – diluição 1:10000). Ao término da incubação, realizou-se outra lavagem como descrito anteriormente e então prosseguiu-se com a incubação com o anticorpo secundário (Donkey anti-mouse IgG-HRP – sc-2314 – Santa Cruz Biotechnology -

diluição 1:10000) por 1 hora. Por fim, uma última lavagem foi realizada e repetiu-se o processo de revelação da membrana pelo método de quimioluminescência, conforme descrito acima.

Quantificação dos receptores 5HT_{1A}

Após reveladas por quimioluminescência, as imagens geradas no programa Image Studio™ foram processadas utilizando o programa ImageJ. A quantificação dos receptores foi feita por análise densitométrica, ou seja, pela mensuração da intensidade da banda, sendo calculada para cada amostra a razão de 5HT_{1A}/β-actina.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no LTE (latências de esquiva inibitória e fuga) foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas, tendo como fator independente a separação ou a privação materna e, como medidas repetidas, as diferentes tentativas efetuadas: linha de base, esquiva 1 e esquiva 2; ou fuga 1, fuga 2 e fuga 3.

Os resultados obtidos no experimento 6 (animais submetidos à hipóxia) foram analisados utilizando a ANOVA de duas vias. Os fatores utilizados foram o estresse prévio e o tratamento.

Todos os demais resultados foram analisados utilizando teste t de Student.

Em todos os casos, quando conveniente, foram realizadas comparações múltiplas pelo teste de Duncan ou teste t de Student.

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTOS COM A SEPARAÇÃO MATERNA

4.1.1. Experimento 1 – Avaliação o efeito da separação materna sobre o comportamento de ratos adultos submetidos ao labirinto em T elevado, campo aberto, nado forçado e teste de conflito de Vogel.

4.1.1.1. *Labirinto em T elevado e campo aberto*

A resposta de esquia inibitória pode ser observada na Figura 5 (painel superior). De acordo com os resultados da ANOVA de medidas repetidas, houve aumento da latência de saída dos animais do braço fechado do LTE ao longo das tentativas, indicando a aquisição de esquia inibitória [$F(2,56) = 12,84$; $p = 0,00$]. No entanto, não houve efeito da separação materna [$F(1,28) = 0,60$; $p = 0,44$] e não foi constatada interação entre os fatores separação materna e tentativas [$F(2,56) = 0,40$; $p = 0,67$].

Na Figura 5 (inferior) pode ser observado o comportamento de fuga dos animais. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve efeito das tentativas [$F(2,56) = 2,25$; $p = 0,11$] ou interação entre separação materna e tentativas [$F(2,56) = 0,24$; $p = 0,78$]. Também não houve efeito do fator separação materna [$F(1,28) = 1,36$; $p = 0,25$].

Quanto à atividade locomotora (Figura 6), observa-se a que a separação materna não alterou a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto [$t(24) = 0,28$; $p = 0,78$].

Figura 5 – Representação gráfica dos comportamentos de esquiva inibitória (painel superior) e fuga (painel inferior) dos animais NS e S submetidos ao LTE. A separação materna no início da vida não teve efeito sobre o comportamento dos animais adultos no LTE. O gráfico superior mostra a latência para esquiva inibitória e o gráfico inferior, a latência para fuga. NS = não separados (n=14), S = separados (n=16). As colunas representam a média ($\pm$ EPM).

Figura 6 - **Representação gráfica da distância total percorrida (m) pelos animais NS e S submetidos campo aberto.** A separação materna no início da vida não teve efeito sobre a atividade locomotora de animais adultos submetidos ao campo aberto. NS = não separados (n=10), S = separados (n=16). As colunas representam a média ($\pm$ EPM).

4.1.1.2. *Nado Forçado*

A resposta dos animais submetidos à separação materna no teste do nado forçado pode ser observada na Figura 7. O resultado do teste t mostrou não haver alteração sobre o tempo de imobilidade dos animais [$t(28) = 0,64$, $p = 0,52$].

Figura 7 – **Representação gráfica do comportamento de imobilidade dos animais NS e S submetidos ao nado forçado.** A separação materna no início da vida não teve efeito sobre o comportamento dos animais adultos no nado forçado. NS = não separados (n=14), S = separados (n=16). As colunas representam a média ($\pm$ EPM).

4.1.1.3. *Teste de conflito de Vogel*

Devido a um problema técnico com o aparelho de contagem do número de choques e de lambidas emitidas em 4 das 7 sessões experimentais realizadas no teste de conflito de Vogel, o número de animais computados na estatística abaixo é menor do que aqueles dos demais testes (ver legenda da figura 8).

A resposta dos animais submetidos ao teste de conflito de Vogel pode ser observada na Figura 8. O teste t mostrou não haver diferença significativa quanto ao número de lambidas [$t(12) = 1,591$ $p = 0,13$].

Figura 8 – **Representação gráfica do número de lambidas punidas dos animais NS e S submetidos ao teste de conflito de Vogel.** A separação materna no início da vida não teve efeito sobre o comportamento dos animais adultos no teste de conflito de Vogel. NS = não separados (n=6), S = separados (n=8). As colunas representam a média ($\pm$ EPM).

4.1.2. Experimento 2 – Avaliação do efeito da separação materna sobre a resposta de fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPD de ratos adultos

A Figura 9 ilustra a média do limiar basal de fuga dos animais separados e não separados. O teste t mostrou que a separação materna não afeta o limiar basal de fuga dos animais submetidos à estimulação elétrica da SCPD [$t(12) = 0,4060$, $p = 0,69$].

Figura 9 - **Representação gráfica do limiar basal dos animais NS e S submetidos ao teste estimulação elétrica da SCPD.** A separação materna no início da vida não teve efeito sobre o comportamento dos animais adultos submetidos à estimulação elétrica. NS = não separados (n=5). S = separados (n=9). As colunas representam a média ($\pm$ EPM).

4.1.3. Experimento 3 - Avaliação do efeito da combinação da separação materna com o isolamento social na vida adulta sobre as respostas comportamentais de ratos submetidos ao labirinto em T elevado, campo aberto, nado forçado e teste de conflito de Vogel

4.1.3.1. *Labirinto em T elevado e campo aberto*

A resposta de esquiva inibitória pode ser observada no gráfico superior da Figura 10. De acordo com os resultados da ANOVA de medidas repetidas, houve um aumento

na latência para saída dos animais do braço fechado do LTE ao longo das tentativas, indicando a aquisição de aprendizado na tarefa de esquiva inibitória [$F(2,50) = 13,68$; $p = 0,00$]. No entanto, não houve efeito do fator separação materna [$F(1,25) = 1,81$; $p = 0,19$] e não foi constatada interação entre os fatores separação materna e tentativas [$F(2,50) = 1,71$; $p = 0,19$].

No gráfico inferior da Figura 10, pode ser observada a resposta de fuga dos animais submetidos ao LTE. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve efeito das tentativas [$F(2,50) = 0,55$; $p = 0,58$], nem interação entre os fatores separação materna e tentativas [$F(2,50) = 0,86$; $p = 0,43$] e também nenhum efeito do fator separação materna [$F(1,25) = 1,05$; $p = 0,31$].

Em relação à atividade locomotora, observa-se que a exposição à separação materna não alterou a distância percorrida pelos animais no teste campo aberto (Figura 11) [$t(25) = 1,03$, $p = 0,30$].

Figura 10 – **Representação gráfica dos comportamentos de esquia inibitória (painel superior) e fuga (painel inferior) dos animais NSI e SI submetidos ao LTE.** A separação materna no início da vida somada ao isolamento social na vida adulta não teve efeito sobre o comportamento dos animais no LTE. O gráfico superior mostra a latência para esquia inibitória e o gráfico inferior, a latência para fuga. NSI = Não separados e isolados (n=14), SI = separados e isolados (n=13). As colunas representam a média ($\pm$ EPM).

Figura 11 - **Representação gráfica da distância total percorrida (m) pelos animais NS e S submetidos campo aberto.** A separação materna no início da vida não teve efeito sobre a atividade locomotora de animais adultos submetidos ao campo aberto. NSI = não separados isolados a partir do DPN 60 (n=14), SI = separados isolados socialmente a partir do DPN 60 (n=13). As colunas representam a média ($\pm$ EPM).

4.1.3.2. Nado forçado

A resposta comportamental dos animais submetidos ao teste nado forçado pode ser observada na Figura 12. O resultado do teste t mostrou não haver alteração do tempo gasto em imobilidade pelos animais S em comparação aos animais NS [$t(25) = 1,66$, $p = 0,10$].

Figura 12 – **Representação gráfica do comportamento de imobilidade apresentado pelos animais NSI e SI submetidos ao nado forçado.** A separação materna no início da vida somada ao isolamento social na vida adulta não teve efeito sobre o comportamento dos animais no teste do nado forçado. NSI = Não separados e isolados (n=14), SI = separados e isolados (n=13). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM).

4.1.3.3. *Teste de conflito de Vogel*

A resposta dos animais submetidos ao teste de conflito de Vogel pode ser observada na Figura 13. O teste t mostrou não haver diferença significativa quanto ao número de lambidas punidas do grupo S em comparação ao NS [t (23) = 0,03, p = 0,97].

Figura 13 – **Representação gráfica do número de lambidas punidas dos animais NSI e SI submetidos ao teste de conflito de Vogel.** A separação materna no início da vida somada ao isolamento social na vida adulta não teve efeito sobre o comportamento dos animais no teste do teste de conflito de Vogel. NSI = Não separados e isolados (n=13), SI = separados e isolados (n=12). As colunas representam a média (± EPM).

4.2. EXPERIMENTOS COM PRIVAÇÃO MATERNA

4.2.1. Experimento 4 - avaliação do efeito da privação materna sobre as respostas comportamentais de ratos adultos submetidos ao labirinto em T elevado, campo aberto e claro-escuro.

4.2.1.1. *Labirinto em T elevado*

A resposta de esquia inibitória dos animais pode ser observada no gráfico superior da Figura 14. De acordo com os resultados da ANOVA de medidas repetidas, houve aumento da latência de saída dos animais do braço fechado do LTE ao longo das tentativas, indicando a aquisição de esquia inibitória [$F(2,50) = 20,93$; $p = 0,00$]. No entanto, não houve efeito do estressor [$F(1,25) = 0,47$; $p = 0,49$] e não foi constatada interação entre os fatores estressor e tentativas [$F(2,50) = 0,35$; $p = 0,70$].

No gráfico inferior da Figura 14, pode ser observado o comportamento de fuga dos animais privados ou não privados. A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve efeito das tentativas [$F(2,50) = 1,31$; $p = 0,27$] ou efeito do estressor [$F(1,25) = 0,32$; $p = 0,57$], nem interação estressor e tentativas [$F(2,50) = 0,60$; $p = 0,51$].

Em relação à atividade locomotora, na Figura 15 observa-se que a privação materna não alterou a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto [$t(24) = 0,79$, $p = 0,43$].

Figura 14. **Representação gráfica dos comportamentos de esquia inibitória (painel superior) e fuga (painel inferior) dos animais NP e P11 submetidos ao LTE.** A privação materna no início da vida não teve efeito sobre o comportamento dos animais adultos no LTE. O gráfico superior mostra a latência para esquia inibitória e o gráfico inferior, a latência para fuga. NP = não privado (n=12), P11 = privado no 11º DPN (n=15). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM).

Figura 15 - **Representação gráfica da distância total percorrida (m) pelos animais NS e S submetidos campo aberto.** A separação materna no início da vida não teve efeito sobre a atividade locomotora de animais adultos submetidos ao campo aberto. NP = não privados (n=11), P11 = privado no 11º DPN (n=15)

4.2.1.2. *Teste de transição claro-escuro*

O tempo (s) de permanência no lado claro e o número de transições entre os compartimentos dos animais privados e controle podem ser observados na

Figura 16 **Erro! Fonte de referência não encontrada..** De acordo com os resultados do teste t, a privação materna não alterou o tempo de permanência do lado claro [$t(25) = 1,10$; $p = 0,28$], e também não alterou o número de transições entre os compartimentos [$t(25) = 0,31$, $p = 0,75$].

Figura 16 - **Representação gráfica do tempo gasto no claro (painel superior) e do número de transições entre os compartimentos (painel inferior) no teste de transição claro-escuro pelos animais NP e P11.** A privação materna no início da vida não teve efeito sobre o comportamento dos animais adultos no teste de transição claro-escuro. O gráfico superior mostra o tempo gasto no lado claro e o gráfico inferior, o número total de transições entre os compartimentos. NP = não privado (n=12), P11 = privado no 11º DPN (n=15). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM).

4.2.2. Experimento 5 - avaliação do efeito da privação sobre as respostas comportamentais de ratos adultos submetidos à hipóxia.

4.2.2.1. *Hipóxia*

O número total de saltos espontâneos evocados durante a exposição à condição de hipóxia pode ser observado na Figura 17 **Erro! Fonte de referência não encontrada..** De acordo com o resultado do teste t, os animais que passaram pela privação materna apresentaram uma quantidade maior de pulos do que os animais controle [$t(23) = 2,45$, $p = 0,02$].

Figura 17 - **Representação gráfica do comportamento dos animais NP e P11 durante a exposição à hipóxia.** A privação materna no início da vida promoveu um aumento no número de saltos realizados pelos animais P11 em comparação aos animais NP. NP = não privado (n=11), P11 = privado no 11º DPN (n=14). As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). * $p < 0,05$.

4.2.3. Experimento 6 - Avaliação do efeito da privação materna sobre a neurotransmissão serotoninérgica e sobre os níveis plasmáticos de corticosterona.

4.2.3.1. *Resposta comportamental*

Em relação ao número de saltos, a análise estatística mostrou que os animais tratados com salina e submetidos a 15 minutos de normóxia diferiram significativamente em comparação aos grupos testados na hipóxia, seja após injeção de salina ou p-CPA.

A análise dos dados obtidos nos grupos testados na hipóxia por meio da ANOVA de duas vias mostra que houve efeito do fator estresse prévio [$F(1,44) = 3,91$; $p = 0,05$], mas não houve efeito do fator tratamento [$F(1,44) = 2,35$; $p = 0,13$] ou interação entre os fatores [$F(1,44) = 1,80$; $p = 0,18$]. O teste de comparações múltiplas de Duncan mostrou que o grupo NP salina-hipóxia foi diferente de todos os outros grupos que passaram por hipóxia.

Com relação à atividade locomotora, avaliada durante os 5 primeiros minutos de teste, o resultado do teste t mostrou que não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$) (Figura 19)

Figura 18 **Representação gráfica do comportamento dos animais NP e P11 durante a exposição à hipóxia.** A privação materna facilitou a expressão de saltos em ratos adultos expostos à condição de hipóxia. O tratamento com p-CPA teve efeito sobre os animais NP, mas não sobre os animais P11. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). * $p \leq 0,05$ em relação ao respectivo grupo tratado com salina e exposta à normóxia. # $p < 0,05$ em relação a todos os demais grupos expostos à hipóxia.

Figura 19 – **Representação gráfica da atividade locomotora dos animais submetidos ao experimento 6.** Não houve efeito de qualquer dos fatores sobre a distância percorrida pelos animais durante o teste. As colunas representam a distância total percorrida em metros (média $\pm$ EPM).

4.2.3.2. Níveis plasmáticos de corticosterona

A análise estatística dos resultados obtidos mostra que a exposição à hipóxia promoveu um aumento nos níveis de corticosterona plasmática nos animais controle tratados tanto com salina quanto com p-CPA, em relação ao seu respectivo controle submetido à normóxia (Figura 20).

Figura 20 – **Representação gráfica dos níveis plasmáticos de corticosterona dos animais submetidos ao experimento 6.** Os níveis plasmáticos de corticosterona foram elevados pela exposição à hipóxia. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle tratado com salina e submetido à normóxia.

4.2.3.3. Quantificação dos receptores 5HT_{1A} na SCP e na amígdala

A revelação da membrana permitiu detectar uma única banda de peso molecular ligeiramente acima de 50 kDa, correspondente ao esperado para marcação do receptor 5HT_{1A} ($\approx$ 56kDa). A análise densitométrica revelou não haver diferença nos níveis de receptores 5HT_{1A} entre animais privados e controle, tanto na SCP [$t(9) = 1,66$, $p = 0,12$] (Figura 21 A e C), quanto na amígdala [$t(10) = 1,85$; $p = 0,09$] (Figura 21, painéis B e D).

Figura 21 – **Quantificação por Western Blot de receptores 5HT_{1A} em amostras de SCPD e amígdala.** Amostras da SCP e da amígdala de 12 animais (6 não privados e 6 privados, ambos os grupos tratados com salina e expostos à normóxia) foram separadas em um gel Bis-tris 4-12% como descrito nos procedimentos experimentais item 3.3.2.3.6. Em A e B observa-se marcação das bandas do receptor 5HT_{1A} na SCP e na amígdala, respectivamente. Em C e D, estão as representações gráficas da quantificação dos receptores 5HT_{1A} na SCP e na amígdala, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do estresse neonatal, promovido pela separação materna ou pela privação materna, sobre as respostas de fuga de animais adultos em diferentes modelos de ataques de pânico.

No primeiro experimento, essa resposta de fuga foi avaliada em animais que passaram pela separação materna e foram avaliados, aos 60 dias de vida, no LTE. Os resultados obtidos mostram que a separação materna, por 3h/dia, do DPN 2 ao 21, não altera o comportamento de fuga de ratos adultos submetidos a esse teste. Da mesma maneira, Estanislau e Morato (2005) já haviam testado no LTE o protocolo de separação materna por 3h/dia, porém, por um período mais curto, do DPN 2 ao 14, sem observar diferenças em comparação com o grupo controle. É digno de nota, no entanto, que a fuga evocada pela estimulação elétrica da SCPD foi facilitada em animais que passaram pelo mesmo protocolo de separação materna utilizado no presente estudo (QUINTINO DOS SANTOS, et al., 2014).

Dessa maneira, a ausência de alterações comportamentais observada no LTE, tanto no presente trabalho quanto por Estanislau e Morato (2005) nos leva a crer que pode haver uma limitação do modelo em detectar os efeitos da separação materna, bem como outros vieses experimentais também podem ter interferido nos resultados.

Ainda assim, a resposta de fuga no LTE foi novamente acessada no experimento 3, a fim de investigar se a separação materna poderia gerar uma facilitação dessa resposta mediante a ocorrência de outro estímulo aversivo já na vida adulta. Isto estaria de acordo com a teoria, denominada no inglês por *2-hit*, ou teoria do estresse cumulativo, que propõe que o acúmulo de eventos estressores ao longo da vida promoveria uma maior vulnerabilidade ao desenvolvimento de transtornos mentais (MAYNARD, *et al.*, 2001; NEDERHOF e SCHMIDT, 2012). Dessa forma, o experimento 3 foi realizado combinando a separação materna durante a lactação com o isolamento social na vida adulta (a partir do DPN 60) e, posteriormente, submetendo os animais aos testes comportamentais. A escolha desse estímulo estressor foi devida a observações obtidas no laboratório do Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg (Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - comunicação pessoal) de que animais que passaram pelo estresse de separação materna e, quando adultos, foram alojados individualmente no biotério apresentaram um aumento na expressão

de comportamentos defensivos durante a estimulação elétrica da SCPD. No entanto, os resultados obtidos no experimento 3 mostraram que a separação materna, mesmo frente a um desafio na vida adulta, não alterou o comportamento de fuga dos animais no LTE. De maneira semelhante, Estanislau e Morato (2005) avaliaram o efeito da separação materna em animais submetidos ao labirinto em cruz elevado imediatamente após passarem ou não pelo estresse de restrição por 60 minutos. Os autores não observaram efeito da separação materna, aliada ou não a este outro estressor, sobre o comportamento desses animais.

Dessa forma, o segundo experimento foi realizado com o objetivo de testar os efeitos da separação materna sobre o comportamento de fuga evocado por um modelo mais próximo daquele utilizado com Quintino dos Santos e colaboradores (2014). Para tanto, ratos adultos previamente submetidos à separação materna foram avaliados seguindo o protocolo de estimulação elétrica da SCPD utilizado em nosso laboratório. Contraditoriamente aos resultados obtidos pelo referido grupo, nossos resultados mostraram que os animais previamente estressados não diferiram dos animais controle quanto ao comportamento de fuga promovido pela estimulação elétrica da SCPD.

Algumas questões metodológicas podem ter permeado as diferenças nos resultados obtidos. No estudo de Quintino dos Santos e colaboradores (2014) o comportamento de fuga foi avaliado mediante divisão do comportamento em respostas de galope, trote e pulo. Essa categorização, no entanto, não é viável dentro das condições do teste de estimulação elétrica realizado em nosso laboratório, entre outros fatores, pelo tamanho da arena utilizada. Ademais, os estímulos elétricos utilizados também possuem características diferentes. Em nosso protocolo, os estímulos elétricos (20-152 μ A, 60 Hz, 10 s) foram gerados a partir de um estimulador de corrente alternada e foram cessados assim que a resposta de fuga foi observada, a fim de minimizar os danos causados pelo aumento da intensidade da corrente. Por outro lado, o grupo do professor Schenberg utiliza corrente contínua com pulsos senoidais (0-70 μ A, 60 HZ, 30 s).

Com relação aos demais comportamentos defensivos por nós avaliados nos experimentos com a separação materna, nossos resultados mostram que esse estresse neonatal por si só (experimento 1) ou quando combinado a um novo

estressor na vida adulta (experimento 3), não teve efeito sobre a aquisição da resposta de esquiva no LTE ou sobre o número de lambidas punidas no teste de conflito de Vogel.

Contraditoriamente, diversos trabalhos relatam que a separação materna promoveu um efeito do tipo ansiogênico em ratos adultos submetidos a diferentes modelos animais como o labirinto em cruz elevado (TROAKES e INGRAM, 2009; WIGGER e NEUMANN, 1999; LEE, *et al.*, 2007), o teste do lambes punido de Vogel (ZHANG, *et al.*, 2012) e o campo aberto (BENEKAREDDY, *et al.*, 2011).

Entretanto, Quintino dos Santos (2014), assim como no presente trabalho, também não observaram efeito da separação materna (mesmo protocolo por nós utilizado) sobre o comportamento de ratos expostos ao labirinto em cruz elevado. Da mesma maneira, outros estudos também não observaram qualquer alteração na ansiedade basal de animais que sofreram a separação materna e foram expostos a esse mesmo modelo experimental (CLINTON, WATSON e AKIL, 2014; ESTANISLAU e MORATO, 2005; LAJUD, *et al.*, 2012; ROMAN, *et al.*, ZHANG, *et al.*, 2012).

Como pode-se notar, os resultados comportamentais obtidos com animais que sofreram a separação materna e foram submetidos à modelos animais de ansiedade são bastante controversos. Contudo, quando se trata das consequências em longo prazo das adversidades no início da vida, não apenas o tipo de estressor como também sua duração e intensidade, além de uma série de outros fatores são determinantes para o resultado observado, tornando complexa a comparação entre os trabalhos (LEHMANN e FELDON, 2000; FREUND, *et al.*, 2013). Alguns detalhes da metodologia empregada para realizar a separação materna nos trabalhos supracitados podem ser observados no APÊNDICE A.

Em relação ao modelo do nado forçado, um dos modelos experimentais mais empregados no estudo da depressão e na seleção de drogas para o tratamento deste transtorno afetivo, os resultados obtidos mostram que o estresse neonatal por nós empregado (experimento 1), mesmo associado a um novo evento estressor na vida adulta (experimento 3), não afetou o comportamento de imobilidade dos animais durante o teste.

É curioso notar que os resultados observados no trabalho de Quintino dos Santos e colaboradores (2014) nesse mesmo modelo animal salientam as questões metodológicas que temos abordado.

Dois grupos controle foram utilizados pelos autores: (1) animais não separados pertencentes à mesma ninhada dos animais separados e que, durante o procedimento de separação materna, permaneceram na mesma sala que os animais separados; e (2) um grupo controle mantido todo o tempo no biotério, sem ser manipulado; denominados pelos autores como SHAM e CTRL, respectivamente. Os resultados obtidos por Quintino dos Santos e colaboradores (2014) mostram que, em relação aos animais do grupo SHAM, nenhuma alteração foi observada quanto ao tempo de imobilidade durante o nado forçado, assim como observado no presente estudo com o mesmo tipo de grupo controle. Contudo, os animais CTRL apresentaram maior tempo de imobilidade tanto em relação aos animais que passaram pela separação materna, quanto em relação ao grupo SHAM. Esses resultados indicam que a manipulação dos animais durante o período neonatal promoveu um efeito protetor nos animais submetidos a esse modelo de depressão.

Contraditoriamente, trabalhos realizados pelo grupo coordenado pela pesquisadora Maria Javier Ramírez, da Universidade de Navarra - Espanha, mostram que a separação materna 3h/dia (DPN 2-21) promove um aumento no tempo de imobilidade no grupo dos animais separados da mãe comparados a animais não manipulados, mantidos em biotério (AISA, *et al.*, 2007; MARTISOVA, *et al.*, 2012 SOLAS, *et al.*, 2010).

Ainda que a separação materna em ratos seja amplamente utilizada para estudar os efeitos em longo prazo do estresse neonatal, os resultados obtidos no presente trabalho juntamente com o que está disponível na literatura ressaltam que há uma grande inconsistência nos resultados obtidos, ao menos no que tange as respostas comportamentais obtidas em modelos animais de ansiedade e depressão. Em revisão publicada por Lehmann e Feldon (2000), foi abordada a questão dos vários aspectos metodológicos da separação materna que diferem entre os estudos encontrados na literatura como possível explicação para tantos resultados conflitantes. Entre os fatores ressaltados pelos autores estão: a frequência e duração da separação, controle da temperatura da ninhada durante a separação, composição da ninhada

(sexo, número de filhotes), idade em que o teste foi realizado, escolha do grupo controle, impedimento ou não de contato vocal e físico entre os filhotes durante a separação, entre outros. De acordo com os autores, tantas variáveis entre os protocolos utilizados nos diferentes estudos publicados dificulta a comparação dos resultados. Ainda de acordo com os autores, antes de prosseguir com novas investigações dos efeitos da separação materna, é necessário fazer uma padronização do método.

Seguindo com as investigações do efeito do estresse neonatal sobre o comportamento de fuga de ratos adultos, na sequência do presente trabalho, avaliamos o efeito da privação materna em dois modelos experimentais. No experimento 4, animais privados da mãe foram expostos ao LTE. Os resultados obtidos mostraram não haver efeito da privação materna sobre a resposta de fuga nesse modelo. No entanto, no experimento 5, os animais privados da mãe foram susceptíveis aos efeitos da hipóxia, apresentando um número maior de saltos comparado aos animais não privados. Do nosso conhecimento, esse é o primeiro resultado que mostra uma associação entre a privação materna nos estágios iniciais da vida e a resposta de fuga expressa na idade adulta.

No modelo experimental de hipóxia empregado, drogas ansiogênicas e panicogênicas como a cafeína e a ioimbina, também facilitam a expressão do comportamento de salto (AILTON SPIACCI JR e HÉLIO ZANGROSSI JR, dados não publicados). Já drogas panicolíticas, como a fluoxetina e o alprazolam, fazem o oposto. Estes resultados têm sustentado a associação entre o comportamento de salto, interpretados como tentativas de fugir da caixa experimental, com os ataques de pânico (SPIACCI, et al, 2015).

É digno de nota que os resultados do experimento 4 mostram ainda que no LTE a privação materna não altera a aquisição da resposta de esquiva inibitória. Em contraste com este resultado, Barbosa Neto et al (2012) relatam que a privação materna (24 h no DPN 11) produziu efeito do tipo ansiogênico, observado pelo maior número de avaliações de risco e maior tempo gasto no centro do labirinto em cruz elevado. No entanto, ao avaliar o tempo gasto nos braços abertos e fechados, não

houve diferenças entre os grupos. De maneira interessante, estudos reportam que a avaliação de risco pode ser um parâmetro mais sensível ao efeito de tratamentos, lesões ou estressores do que a esquia inibitória, mais classicamente utilizada como medida de ansiedade (ALBRECHET-SOUZA, *et al.*, 2009; ROY e CHAPILLON, 2004). Nesse sentido, Albrechet-Souza e colaboradores, por exemplo, testaram o efeito do benzodiazepínico midazolam sobre o comportamento de ratos “*naïve*” ou reexpostos ao labirinto em cruz elevado. A avaliação de risco foi o único parâmetro a detectar o efeito ansiolítico da droga nas duas situações, enquanto o aumento da exploração dos braços abertos observado nos animais “*naïve*” tratados com midazolam, desapareceu quando avaliado nos animais reexpostos ao labirinto.

Nossos resultados também contrastam com os relatados por Faturi e colaboradores (2010) no modelo claro-escuro. Estes autores observaram que ratos (machos e fêmeas) privados por 24 h, no DPN 11, em procedimento semelhante ao por nós adotado, apresentavam uma redução na exploração do compartimento claro do referido teste. Ainda que as razões para essa incongruência não sejam totalmente claras, de maneira especulativa, talvez o fato de, no presente trabalho, os animais terem sido previamente expostos ao LTE, enquanto no trabalho de Faturi e colaboradores (2010) um grupo independente foi submetido ao teste, possa ter interferido na resposta obtida.

Os resultados contrastantes obtidos quanto as consequências da privação materna sobre as respostas de fugas avaliadas no LTE e na hipóxia pode indicar que estes dois comportamentos não reflitam o mesmo estado emocional. Neste sentido, tem sido proposto que o modelo da hipóxia possa modular um tipo específico de ataque de pânico, o pânico respiratório (SPIACCI *et al.*, 2015).

Essa proposta subdivisão entre pânico respiratório ou não foi elaborada a partir da observação de diferentes perfis sintomáticos apresentados durante os ataques de pânico (BRIGGS, STRETCH e BRANDON, 1993) e vem sendo corroborada por diversos estudos clínicos (SONG, *et al.*, 2014; ZUGLIANI, *et al.*, 2015; ROBERSON-NAY e KENDLER, 2011; ROBERSON-NAY, LATENDRESSE e KENDLER, 2012;

VALENCA, *et al.*, 2002). Brevemente, Briggs e colaboradores (1993) analisaram o relato do último ataque de pânico sofrido por 1168 pacientes participantes de um estudo transnacional de pânico. Eles observaram que havia uma clara divisão entre pacientes que apresentavam ou não proeminentes sintomas respiratórios durante o ataque. Além dessa diferença sintomatológica, o grupo com sintomas respiratórios proeminentes sofriam mais ataques de pânico espontâneos e respondiam ao tratamento com imipramina, enquanto o grupo sem sintomas respiratórios sofriam mais ataques situacionais e respondiam melhor ao tratamento com alprazolam. Trabalhos mais recentes têm correlacionado os ataques de pânico respiratórios com uma forma mais severa do transtorno de pânico (SONG *et al.*, 2014; ROBERSON-NAY, LATENDRESSE e KENDLER, 2012; VALENCA *et al.*, 2012).

No mesmo sentido, evidências clínicas e pré-clínicas sugerem uma relação entre o transtorno do pânico e desafios ou transtornos respiratórios. Por exemplo, tem sido relatado que em pacientes asmáticos há uma maior prevalência de transtorno de pânico e da ocorrência de ataques de pânico em relação àquela descrita para a população em geral (PERNA, *et al.*, 1997; COOPER, *et al.*, 2007). Além disso, Beck e colaboradores (1999) observaram que pacientes com diagnóstico de transtorno do pânico apresentaram maior taxa respiratória e maior ansiedade, não apenas quando expostos à hipercapnia, mas também diante uma situação de hipóxia, em relação a indivíduos saudáveis. Posteriormente, Beck e colaboradores (2000) demonstraram também que essas elevadas taxas respiratórias em resposta à hipóxia são mais proeminentes em pacientes que relatam sintomas respiratórios durante os ataques em comparação àqueles que não relatam. Já em laboratório, a exposição de ratos à hipóxia, como observado aqui, promove a expressão de comportamento de fuga, assim como recruta a SCPD (CASANOVA, *et al.*, 2013), uma área encefálica considerada crítica na fisiopatologia do transtorno de pânico (GRAEFF, 2004; 2012; SCHENBERG, *et al.*, 2014).

Por fim, cabe mencionar que a questão respiratória está no cerne de uma das mais importantes teorias sobre o pânico, a teoria do falso alarme de sufocamento, proposta por Donald Klein (1993). Esta teoria propõe a existência de um sistema de alarme de sufocamento fisiológico que monitora as informações sobre um potencial sufocamento. Assim, os ataques de pânico ocorrem quando esse alarme é

erroneamente ativado por estímulos normalmente inócuos, como pequenos aumentos na concentração de CO₂ (KLEIN, 1993). Em uma extensão dessa hipótese, Preter e Klein (2008) abordam os resultados observados por Beck e colaboradores (1999, 2000) ressaltando sua consonância com a teoria do falso alarme de sufocamento, uma vez que a hipóxia também seria um estímulo que sinaliza uma situação de sufocamento.

Retomando a questão dessa subdivisão dos ataques de pânico em respiratório e não respiratório do ponto de vista experimental, outros estudos ainda são necessários para melhor entender em quais outros parâmetros a fuga no LTE e na hipóxia diferem. No que diz respeito ao papel da 5-HT em inibir a fuga na SCPD, estes dois modelos parecem ter mais semelhanças do que contrastes. Nesse sentido, tanto a facilitação da neurotransmissão mediada por receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} nessa estrutura inibem a expressão deste comportamento defensivo nos dois modelos experimentais (ZANOVELI et al., 2003; SPIACCI et al., 2015). No entanto, um trabalho mais recente do nosso grupo de pesquisa não sugere o mesmo quando o efeito da manipulação de outros sistemas de neurotransmissão na SCPD, como o mediado pelo CRF, é avaliado. Mais especificamente, Leonardo Daniel Mendes, Ailton Spiacci Jr e Hélio Zangrossi Jr. (resultados não publicados) observaram que a ativação de receptores do tipo CRF1 nesta área encefálica não altera a expressão da fuga no modelo da hipóxia. Isto contrasta com os resultados obtidos por Sérgio e colaboradores (2014) que mostram que a mesma manipulação farmacológica foi capaz de facilitar a resposta de fuga tanto no LTE quanto na estimulação elétrica da SCPD.

Nos estudos finais deste trabalho focamos nossa atenção sobre a importância da neurotransmissão serotoninérgica na regulação do comportamento de fuga durante a hipóxia de animais previamente privados da mãe.

Assim como observado no experimento 5, no experimento 6 a privação materna também aumentou a expressão de saltos durante a hipóxia, mostrando a consistência dessa resposta. Neste mesmo experimento, o tratamento com p-CPA, um inibidor da síntese de 5-HT, promoveu nos animais não privados um aumento no número de saltos, semelhante ao ocorrido com a privação materna, porém esse tratamento não foi capaz de potencializar a resposta dos animais privados.

Já foi demonstrado na literatura que o tratamento com p-CPA, tal qual empregado por nós, causa uma diminuição nos níveis de 5-HT em diferentes estruturas encefálicas como a amígdala e o estriato (SANT'ANA, *et al.*, 2016). Outros estudos também demonstram que o p-CPA, administrado em dose e regime similares aos empregados no presente trabalho, é capaz de promover uma ampla redução nos níveis de 5-HT no encéfalo (BARNES, *et al.*, 1992; O'CONNELL, *et al.*, 1991). Ainda que não tenha sido uma questão abordada em estudos anteriores, é concebível que este mesmo tratamento tenha também diminuído os níveis de 5-HT na SCPD. Assim, de uma maneira especulativa, é possível inferir que a diminuição nos níveis de 5-HT nesta área mesencefálica tenha contribuído para uma maior expressão da resposta de saltos durante a hipóxia de animais não privados da mãe. Ainda de maneira especulativa, é possível que, por outro lado, a ausência de efeito do p-CPA sobre os animais privados seja porque a privação materna por si só tenha promovido uma redução de 5-HT na SCPD, semelhante àquela promovida pelo tratamento. Entretanto, mais estudos são necessários para uma melhor análise deste envolvimento da 5-HT na resposta de fuga observada na hipóxia, mediante manipulações mais seletivas desta neurotransmissão a nível da SCPD.

Ainda no experimento 6, com base nas evidências que apontam para a participação dos receptores 5-HT_{1A} na inibição das respostas de fuga, investigamos o efeito da privação materna sobre a concentração desses receptores na SCPD e, comparativamente, na amígdala. Os resultados obtidos através da técnica de Western Blotting mostraram que a privação materna não alterou a quantidade de 5-HT_{1A} nestas duas áreas encefálicas.

A influência da privação materna sobre o sistema serotoninérgico vem sendo investigada em diferentes regiões cerebrais relacionadas à mediação de comportamentos defensivos, principalmente no hipocampo e no núcleo dorsal da rafe. Mais especificamente quanto aos receptores 5-HT_{1A}, foi observado que 24h de privação materna no DPN 9 e 12, mas não no DPN 6, causou nos filhotes um aumento de mRNA de receptores 5HT_{1A} na região CA1 do hipocampo, aumento de mRNA de receptores 5HT_{2A} no córtex pré-frontal, mas nenhuma alteração quanto ao mRNA de receptores 5HT_{1A} no núcleo dorsal da rafe (VAZQUEZ, *et al.*, 2000). Contudo, nenhum

estudo até então havia sido feito na principal área de interesse do presente trabalho, a SCPD.

Por fim, ainda no experimento 6, procuramos investigar se a privação materna promoveu um efeito a longo prazo sobre os níveis plasmáticos de corticosterona. Os resultados obtidos mostram que a exposição à hipóxia promoveu um aumento nos níveis plasmáticos desse glucocorticóide, porém, nenhum efeito da privação materna sobre esse parâmetro foi observado.

É interessante notar que a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) durante ataques de pânico é controversa, não havendo um consenso sobre sua ativação ou não durante o ataque de pânico (LIM, *et al.*, 2011). De maneira geral, estudos clínicos mostram que ataques de pânicos espontâneos não promovem aumento nos níveis dos chamados hormônios do estresse – corticotropina, cortisol e prolactina (ARMINI, *et al.*, 2015). Por outro lado, ataques de pânicos, que foram induzidos por drogas como o CCK-4, ioimbina, cafeína, entre outras, promoveram aumento nos níveis salivares e plasmáticos de cortisol (LIM *et al.*, 2011).

Em animais, Lim e colaboradores (2011) demonstraram que a estimulação elétrica da SCP promoveu um aumento de corticosterona plasmática 30 minutos após a reação de fuga. Esse aumento foi revertido pelo tratamento com escitalopram, inibidor seletivo da recaptação de 5-HT que possui efeito panicolítico, mas não pela buspirona, agonista de receptores 5-HT_{1A} com efeito ansiolítico. Porém, mais tarde Armini *et al.* (2015) demonstraram que a estimulação elétrica da SCPD promoveu uma ativação do eixo HPA de maneira dependente da execução da tarefa de fuga, ou seja, quando a fuga foi impedida pelo uso de uma arena de estimulação pequena, não houve alteração dos hormônios do estresse.

Com relação à hipóxia, é de nosso conhecimento apenas um trabalho que avaliou o efeito da exposição aguda (20 minutos) à hipóxia sobre a ativação do eixo HPA. Raff e Roarty (1988) demonstraram que a exposição à hipercapnia (8% CO₂) ou à hipóxia (7% O₂) aumentaram os níveis de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e esse aumento foi potencializado pela exposição à hipóxia hipercapnia (7% - 8% CO₂). No entanto, esse modelo de exposição à hipóxia guarda pouca semelhança com o modelo utilizado no presente trabalho. Os diferentes mecanismos envolvidos em cada um dos tipos de ataques de pânico podem estar envolvidos nas diferentes respostas observadas no presente trabalho e em estudo

clínicos e pré-clínicos já publicados. De qualquer maneira, mais investigações são necessárias a fim de melhor entender o funcionamento desse sistema.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a privação materna foi capaz de promover uma facilitação da resposta de fuga no teste de exposição à hipóxia, mas não no LTE. Esses dados sugerem que o estresse neonatal pode estar relacionado a uma maior vulnerabilidade à ataques de pânico de caráter respiratório.

REFERÊNCIAS

ACKERMAN, S. H.; HOFER, M. A.; WEINER, H. Age at maternal separation and gastric erosion susceptibility in the rat. **Psychosomatic medicine**, United, v. 37, n. 2, p. 180-4, Mar-Apr 1975.

AISA, B. et al. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. 256-66, 2007. ISSN ISSN: 0306-4530. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307298>>.

ALAMY, M.; BENGELLOUN, W. A. Malnutrition and brain development: an analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, United, v. 36, n. 6, p. 1463-80, Jul 2012.

ALBRECHET-SOUZA, L. et al. The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and Fos immunoreactivity. **Neuroscience**, United, v. 164, n. 2, p. 387-97, Dec 2009.

ALCANTARA-ALONSO, V. et al. Altered functionality of the corticotrophin-releasing hormone receptor-2 in the hypothalamic paraventricular nucleus of hyperphagic maternally separated rats. **Neuropeptides**, Netherlands, Feb 2017.

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, v. 145, p. 738-750, #mar# 2007. ISSN: 0306-4522. Disponivel em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452206016800>>.

ARMINI, R. S. et al. In a rat model of panic, corticotropin responses to dorsal periaqueductal gray stimulation depend on physical exertion. **Psychoneuroendocrinology**, v. 53, p. 136-47, 2015. ISSN ISSN: 1873-3360. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25618592>>.

ASSOCIATION, A. P. Anxiety Disorders. In: _____ **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Fifth edition. ed. Arlington: [s.n.], 2013. p. 189-233.

BACHMANN, G. A.; MOELLER, T. P.; BENETT, J. Childhood sexual abuse and the consequences in adult women. **Obstetrics and gynecology**, United, v. 71, n. 4, p. 631-42, Apr 1988.

BANDELOW, B. et al. Early traumatic life events, parental attitudes, family history, and birth risk factors in patients with panic disorder. **Comprehensive psychiatry**, United, v. 43, n. 4, p. 269-78, Jul-Aug 2002.

BARBOSA NETO, J. B. et al. Stress during development alters anxiety-like behavior and hippocampal neurotransmission in male and female rats. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 518-26, 2012. ISSN ISSN: 1873-7064. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21945413>>.

BARNES, N. M. et al. The interaction of R(+)- and S(-)-zacopride with PCPA to modify rodent aversive behaviour. **European journal of pharmacology**, Netherlands, v. 218, n. 1, p. 15-25, Jul 1992.

BARROS, H. M. T.; FERIGOLO, M. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences, v. 23, p. 279-286, #dec# 1998. ISSN ISSN: 0149-7634. Disponivel em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763498000293>>.

BATTAGLIA, M. Separation anxiety: at the neurobiological crossroads of adaptation and illness. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 17, p. 277-85, 2015. ISSN ISSN: 1958-5969. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26487808>>.

BATTAGLIA, M. et al. A genetically informed study of the association between childhood separation anxiety, sensitivity to CO₂, panic disorder, and the effect of childhood parental loss. **Archives of general psychiatry**, United, v. 66, n. 1, p. 64-71, Jan 2009.

BECK, J. G.; OHTAKE, P. J.; SHIPHERD, J. C. Exaggerated anxiety is not unique to CO₂ in panic disorder: a comparison of hypercapnic and hypoxic challenges. **Journal of abnormal psychology**, United, v. 108, n. 3, p. 473-82, Aug 1999.

BECK, J. G.; SHIPHERD, J. C.; OHTAKE, P. Do panic symptom profiles influence response to a hypoxic challenge in patients with panic disorder? A preliminary report.

Psychosom Med, v. 62, p. 678-83, 2000. ISSN ISSN: 0033-3174. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11020098>>.

BENEKAREDDY, M. et al. Postnatal serotonin type 2 receptor blockade prevents the emergence of anxiety behavior, dysregulated stress-induced immediate early gene responses, and specific transcriptional changes that arise following early life stress. **Biological psychiatry**, United, v. 70, n. 11, p. 1024-32, Dec 2011.

BERGER, U. V.; GRZANNA, R.; MOLLIVER, M. E. Depletion of serotonin using p-chlorophenylalanine (PCPA) and reserpine protects against the neurotoxic effects of p-chloroamphetamine (PCA) in the brain. **Experimental neurology**, United, v. 103, n. 2, p. 111-5, Feb 1989.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, Engla, v. 447, n. 7143, p. 396-8, May 2007.

BLAYA, C. et al. Panic disorder and serotonergic genes (SLC6A4, HTR1A and HTR2A): Association and interaction with childhood trauma and parenting. **Neuroscience letters**, Irela, v. 485, n. 1, p. 11-5, Nov 2010.

BOERSMA, G. J. et al. Long-term impact of early life events on physiology and behaviour. **J Neuroendocrinol**, v. 26, p. 587-602, 2014. ISSN ISSN: 1365-2826. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690036>>.

BORTOLUZZI, A. et al. Anxiety disorders and anxiety-related traits and serotonin transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) in adolescents: case-control and trio studies. **Psychiatric genetics**, Engla, v. 24, n. 4, p. 176-80, Aug 2014.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Dialogues in clinical neuroscience**, France, v. 17, n. 3, p. 295-303, Sep 2015.

BRANCHI, I.; CIRULLI, F. Early experiences: building up the tools to face the challenges of adult life. **Dev Psychobiol**, v. 56, p. 1661-74, 2014. ISSN ISSN: 1098-2302. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24986379>>.

BRAVO, J. A.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT1A receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. **Front Mol Neurosci**, v. 7, p. 24, 2014. ISSN ISSN: 1662-5099. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782706>>.

BREIER, A. et al. Early parental loss and development of adult psychopathology. **Archives of general psychiatry**, United, v. 45, n. 11, p. 987-93, Nov 1988.

BRIGGS, A. C.; STRETCH, D. D.; BRANDON, S. Subtyping of panic disorder by symptom profile. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, England, v. 163, p. 201-9, Aug 1993.

BYRNE, C. P. et al. A comparison of borderline and schizophrenic patients for childhood life events and parent-child relationships. **Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie**, United, v. 35, n. 7, p. 590-5, Oct 1990.

CARR, C. P. et al. The role of early life stress in adult psychiatric disorders: a systematic review according to childhood trauma subtypes. **J Nerv Ment Dis**, v. 201, p. 1007-20, 2013. ISSN ISSN: 1539-736X. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24284634>>.

CASANOVA, J. P. et al. Effect of insular cortex inactivation on autonomic and behavioral responses to acute hypoxia in conscious rats. **Behav Brain Res**, v. 253, p. 60-7, 2013. ISSN ISSN: 1872-7549. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23860120>>.

CASTRO, M.; FIGUEIREDO, F.; MOREIRA, A. C. Time-course of hypothalamic CRH and pituitary ACTH contents, and pituitary responsiveness to CRH stimulation after bilateral adrenalectomy. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme**, Germany, v. 27, n. 1, p. 10-5, Jan 1995.

CLINTON, S. M.; WATSON, S. J.; AKIL, H. High novelty-seeking rats are resilient to negative physiological effects of the early life stress. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, England, v. 17, n. 1, p. 97-107, Jan 2014.

COOPER, C. L. et al. Anxiety and panic fear in adults with asthma: prevalence in primary care. **BMC family practice**, England, v. 8, p. 62, Oct 2007.

CORCHS, F. et al. Evidence for serotonin function as a neurochemical difference between fear and anxiety disorders in humans? **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, United, v. 29, n. 10, p. 1061-9, Oct 2015.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, United, v. 13, n. 2, p. 167-70, Aug 1980.

DE BORTOLI AND CAMIN, V.; YAMASHITA, P. S. D. M.; ZANGROSSI, H. J. 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor control of a panic-like defensive response in the rat dorsomedial hypothalamic nucleus. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, United, v. 27, n. 12, p. 1116-23, Dec 2013.

DE KLOET, E. R.; ROTS, N. Y.; COOLS, A. R. Brain-corticosteroid hormone dialogue: slow and persistent. **Cell Mol Neurobiol**, v. 16, p. 345-56, 1996. ISSN ISSN: 0272-4340. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8818401>>.

DEAKIN, J. F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, United, v. 5, n. 4, p. 305-15, Jan 1991.

DONG, M. et al. The interrelatedness of multiple forms of childhood abuse, neglect, and household dysfunction, v. 28, p. 771-784, #jul# 2004. ISSN ISSN: 0145-2134. Disponivel em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145213404001486>>.

DRINGENBERG, H. C. et al. p-chlorophenylalanine-induced serotonin depletion: reduction in exploratory locomotion but no obvious sensory-motor deficits. **Behavioural brain research**, Netherlands, v. 68, n. 2, p. 229-37, Jun 1995.

DRISCOLL, C. A.; BARR, C. S. Studying longitudinal trajectories in animal models of psychiatric illness and their translation to the human condition. **Neuroscience research**, Irela, v. 102, p. 67-77, Jan 2016.

ELLENBROEK, B. A.; VAN DEN KROONENBERG AND P., T.; COOLS, A. R. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. **Schizophrenia research**, Netherlands, v. 30, n. 3, p. 251-60, Apr 1998.

ERHARDT, A.; SPOORMAKER, V. I. Translational approaches to anxiety: focus on genetics, fear extinction and brain imaging. **Curr Psychiatry Rep**, v. 15, p. 417, 2013. ISSN ISSN: 1535-1645. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24234873>>.

ESTANISLAU, C.; MORATO, S. Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze.

Behav Brain Res, v. 163, p. 70-7, 2005. ISSN: 0166-4328. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15941599>>.

FAGENHOLZ, P. J. et al. New-onset anxiety disorders at high altitude. **Wilderness Environ Med**, v. 18, p. 312-6, 2007. ISSN: 1080-6032. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18076297>>.

FARAVELLI, C. et al. Childhood stressful events, HPA axis and anxiety disorders. **World J Psychiatry**, v. 2, p. 13-25, 2012. ISSN: 2220-3206. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24175164>>.

FATURI, C. B. et al. Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: altered corticosterone secretion does not explain everything. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 34, p. 821-34, 2010. ISSN: 1873-7528. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19751762>>.

FELITTI MD, F. V. J. et al. Relationship of Childhood Abuse and Household Dysfunction to Many of the Leading Causes of Death in Adults: The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study, v. 14, p. 245-258, #may# 1998. ISSN: 0749-3797. Disponivel em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749379798000178>>.

FERNANDES, V.; OSÓRIO, F. L. Are there associations between early emotional trauma and anxiety disorders? Evidence from a systematic literature review and meta-analysis. **Eur Psychiatry**, v. 30, p. 756-64, 2015. ISSN: 1778-3585. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26163920>>.

FRAGA, M. C. et al. Anxiety-like, novelty-seeking and memory/learning behavioral traits in male Wistar rats submitted to early weaning. **Physiology & behavior**, United, v. 124, p. 100-6, Jan 2014.

FREUND, N. et al. Windows of vulnerability: maternal separation, age, and fluoxetine on adolescent depressive-like behavior in rats. **Neuroscience**, v. 249, p. 88-97, 2013. ISSN: 1873-7544. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23850503>>.

FRIEDLANDER, K. Social factors and mental health; early childhood. **Health education journal**, United, v. 4, p. 66-70, Apr 1946.

FRIEDLANDER, K. Social factors and mental health; the latency period of childhood. **Health education journal**, United, v. 4, p. 122-6, Jul 1946.

GAUTHIER, A. C.; DEANGELI, N. E.; BUCCI, D. J. Cross-fostering differentially affects ADHD-related behaviors in spontaneously hypertensive rats. **Dev Psychobiol**, v. 57, p. 226-236, #mar# 2015. ISSN: 1098-2302. Disponivel em: <<http://dx.doi.org/10.1002/dev.21286>>.

GENEST, S. E. et al. Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. **J Physiol**, v. 554, p. 543-57, 2004. ISSN: 0022-3751. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634199>>.

GERSHON, A. et al. The long-term impact of early adversity on late-life psychiatric disorders. **Curr Psychiatry Rep**, v. 15, p. 352, Fev 2013.

GOFF, D. C. et al. Self-reports of childhood abuse in chronically psychotic patients. **Psychiatry research**, Ireland, v. 37, n. 1, p. 73-80, Apr 1991.

GONDRE-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 (Amsterdam, Netherlands)**, England, v. 19, n. 2, p. 235-47, 2016.

GRAEFF, F. G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, Germany, v. 163, n. 3-4, p. 467-76, Oct 2002.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, United, v. 28, n. 3, p. 239-59, May 2004.

GRAEFF, F. G. New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, Brazil, v. 45, n. 4, p. 366-75, Apr 2012.

GRAEFF, F. G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, United, v. 54, n. 1, p. 129-41, May 1996.

GRAEFF, F. G.; FERREIRA NETTO, C.; ZANGROSSI JR, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety, v. 23, p. 237-246, #dec# 1998. ISSN: 0149-7634. Disponivel em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763498000244>>.

HOFER, M. A. Survival and recovery of physiologic functions after early maternal separation in rats. **Physiology & behavior**, United, v. 15, n. 5, p. 475-80, Oct 1975.

HOFER, M. A. The organization of sleep and wakefulness after maternal separation in young rats. **Developmental psychobiology**, United, v. 9, n. 2, p. 189-205, Mar 1976.

HOFER, M. A. Early social relationships: a psychobiologist's view. **Child development**, United, v. 58, n. 3, p. 633-47, Jun 1987.

HOLLAND, H. C.; WELDON, E. A note on a new technique of recording ambulation in the open field test and its validation. **Acta psychologica**, Netherlands, v. 28, n. 3, p. 293-300, Jul 1968.

JACOB, C. A. et al. Chronic imipramine enhances 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray, v. 72, p. 761-766, #jul# 2002. ISSN: 0091-3057. Disponivel em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305701007857>>.

JACOBSON, S.; FASMAN, J.; DIMASCIO, A. Deprivation in the childhood of depressed women. **The Journal of nervous and mental disease**, United, v. 160, n. 1, p. 5-14, Jan 1975.

KENDLER, K. S. et al. Childhood parental loss and adult psychopathology in women. A twin study perspective. **Archives of general psychiatry**, United, v. 49, n. 2, p. 109-16, Feb 1992.

KESSLER, R. C. et al. The global burden of mental disorders: an update from the WHO World Mental Health (WMH) surveys. **Epidemiol Psichiatr Soc**, v. 18, p. 23-33, 2009. ISSN: 1121-189X. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19378696>>.

KLAUKE, B. et al. Life events in panic disorder-an update on "candidate stressors". **Depress Anxiety**, v. 27, p. 716-30, 2010. ISSN: 1520-6394. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20112245>>.

KLEIN, D. F. False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. **Archives of general psychiatry**, United, v. 50, n. 4, p. 306-17, Apr 1993.

KOE, B. K.; WEISSMAN, A. p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, United, v. 154, n. 3, p. 499-516, Dec 1966.

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**, England, v. 37, n. 3, p. 410-20, Mar 2012.

LEE, J. H. et al. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. **Neurosci Res**, v. 58, p. 32-9, 2007. ISSN: 0168-0102. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17298851>>.

LEE, J.-H. et al. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation, v. 58, p. 32-39, #may# 2007. ISSN: 0168-0102. Disponivel em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168010207000338>>.

LEHMANN, J.; FELDON, J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? **Rev Neurosci**, v. 11, p. 383-408, 2000. ISSN: 0334-1763. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11065281>>.

LEVINE, S. Infantile experience and resistance to physiological stress, v. 126, p. 405-406, 1957.

LEVINE, S. Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. **Science (New York, N.Y.)**, United, v. 156, n. 3772, p. 258-60, Apr 1967.

LEVINE, S. et al. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. **Developmental psychobiology**, United, v. 24, n. 8, p. 547-58, Dec 1991.

LEVINE, S. et al. Pituitary-adrenal and interleukin-6 responses to recombinant interleukin-1 in neonatal rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, p. 143-53, 1994. ISSN: 0306-4530. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8190834>>.

LI, M.; D'ARCY, C.; MENG, X. Maltreatment in childhood substantially increases the risk of adult depression and anxiety in prospective cohort studies: systematic review, meta-analysis, and proportional attributable fractions. **Psychological medicine**, England, v. 46, n. 4, p. 717-30, Mar 2016.

LIM, L. W. et al. Increased plasma corticosterone levels after periaqueductal gray stimulation-induced escape reaction or panic attacks in rats. **Behav Brain Res**, v. 218, p. 301-7, 2011. ISSN: 1872-7549. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21185871>>.

LLORENTE, R. et al. Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. **Journal of neuroendocrinology**, United, v. 23, n. 4, p. 329-44, Apr 2011.

LLORENTE-BERZAL, A. et al. Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. **Addiction biology**, United, v. 16, n. 4, p. 624-37, Oct 2011.

LORIA, A. S.; POLLOCK, D. M.; POLLOCK, J. S. Early life stress sensitizes rats to angiotensin II-induced hypertension and vascular inflammation in adult life. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, United, v. 55, n. 2, p. 494-9, Feb 2010.

LUTZ, P.-E. et al. Childhood maltreatment and stress-related psychopathology: the epigenetic memory hypothesis. **Current pharmaceutical design**, Netherlands, v. 21, n. 11, p. 1413-7, 2015.

MANFRO, G. G. et al. Stress regulates the lymphocyte homing receptor CD62L (L-selectin). **Arquivos de neuro-psiquiatria**, Braz, v. 61, n. 1, p. 20-4, Mar 2003.

MANIAM, J.; ANTONIADIS, C.; MORRIS, M. J. Early-Life Stress, HPA Axis Adaptation, and Mechanisms Contributing to Later Health Outcomes. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 5, p. 73, 2014. ISSN: 1664-2392. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24860550>>.

MARCO, E. M. et al. Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 33, p. 498-507, 2009. ISSN: 0149-7634. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18457877>>.

MARCO, E. M. et al. The maternal deprivation animal model revisited. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, United, v. 51, p. 151-63, Apr 2015.

MARGO, G. M.; MCLEES, E. M. Further evidence for the significance of a childhood abuse history in psychiatric inpatients, v. 32, p. 362-366, #jul# 1991. ISSN: 0010-440X. Disponivel em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/0010440X9190086R>.

MARTISOVA, E. et al. Long lasting effects of early-life stress on glutamatergic/GABAergic circuitry in the rat hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 1944-53, 2012. ISSN: 1873-7064. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22245561>>.

MAYNARD, T. M. et al. Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. **Schizophrenia bulletin**, United, v. 27, n. 3, p. 457-76, 2001.

MIKI, T. et al. Early postnatal maternal separation causes alterations in the expression of beta3-adrenergic receptor in rat adipose tissue suggesting long-term influence on obesity. **Biochemical and biophysical research communications**, United, v. 442, n. 1-2, p. 68-71, Dec 2013.

MILLSTEIN, R. A.; HOLMES, A. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. **Neurogenetics and Behavior**, v. 31, p. 3-17, 2007. ISSN: 0149-7634. Disponivel em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763406000431>.

MOLET, J. et al. Naturalistic rodent models of chronic early-life stress. **Dev Psychobiol**, v. 56, p. 1675-88, 2014. ISSN: 1098-2302. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24910169>>.

NASHOLD, B. S. J.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **Journal of neurosurgery**, United, v. 30, n. 1, p. 14-24, Jan 1969.

NEDERHOF, E.; SCHMIDT, M. V. Mismatch or cumulative stress: toward an integrated hypothesis of programming effects. **Physiol Behav**, v. 106, p. 691-700, 2012. ISSN: 1873-507X. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210393>>.

NEWMAN, L. et al. Early origins of mental disorder - risk factors in the perinatal and infant period. **BMC psychiatry**, Engla, v. 16, p. 270, Jul 2016.

NIETO, S. J. et al. Don't worry; be informed about the epigenetics of anxiety. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, United, v. 146-147, p. 60-72, Jul-Aug 2016.

NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, United, v. 52, n. 1, p. 1-6, Sep 1995.

O'CONNELL, M. T. et al. Effect of p-chlorophenylalanine on release of 5-hydroxytryptamine from the rat frontal cortex in vivo. **British journal of pharmacology**, England, v. 102, n. 4, p. 831-6, Apr 1991.

OOMEN, C. A. et al. Severe early life stress hampers spatial learning and neurogenesis, but improves hippocampal synaptic plasticity and emotional learning under high-stress conditions in adulthood. **J Neurosci**, v. 30, p. 6635-45, 2010. ISSN: 1529-2401. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463226>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The world health report: 2001: Mental health: new understanding, new hope**. World Health Organization. Suíça, p. 1-16. 2001. (1020-3311).

OTOWA, T. et al. The impact of childhood parental loss on risk for mood, anxiety and substance use disorders in a population-based sample of male twins. **Psychiatry Res**, v. 220, p. 404-9, 2014. ISSN: 1872-7123. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25146695>>.

PAUL, E. D. et al. The Deakin/Graeff hypothesis: focus on serotonergic inhibition of panic. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, United, v. 46 Pt 3, p. 379-96, Oct 2014.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 6th. ed. [S.I.]: ELSEVIER, 2006.

PEÑASCO, S. et al. Early maternal deprivation enhances voluntary alcohol intake induced by exposure to stressful events later in life. **Neural Plast**, v. 2015, p. 342761,

2015. ISSN ISSN: 1687-5443. Disponivel em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25821601>>.

PERNA, G. et al. Asthma and panic attacks. **Biological psychiatry**, United, v. 42, n. 7, p. 625-30, Oct 1997.

PINE, D. S.; FOX, N. A. Childhood antecedents and risk for adult mental disorders. **Annual review of psychology**, United, v. 66, p. 459-85, Jan 2015.

PINHEIRO, R. T. et al. Association of a serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and stressful life events with postpartum depressive symptoms: a population-based study. **Journal of psychosomatic obstetrics and gynaecology**, Engla, v. 34, n. 1, p. 29-33, Mar 2013.

POBBE, R. L. H.; ZANGROSSI, H. J. 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Psychopharmacology**, Germany, v. 183, n. 3, p. 314-21, Dec 2005.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European journal of pharmacology**, Netherlands, v. 47, n. 4, p. 379-91, Feb 1978.

PRETER, M.; KLEIN, D. F. Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, England, v. 32, n. 3, p. 603-12, Apr 2008.

PRETER, M.; KLEIN, D. F. Lifelong opioidergic vulnerability through early life separation: A recent extension of the false suffocation alarm theory of panic disorder. **Translational approaches to panic disorder**, v. 46, Part 3, p. 345-351, #oct# 2014. ISSN: 0149-7634. Disponivel em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763414000827>>.

PRETER, M.; KLEIN, D. F. Lifelong opioidergic vulnerability through early life separation: a recent extension of the false suffocation alarm theory of panic disorder. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, United, v. 46 Pt 3, p. 345-51, Oct 2014.

PROVENÇAL, N.; BINDER, E. B. The effects of early life stress on the epigenome: From the womb to adulthood and even before. **Experimental neurology**, United, v. 268, p. 10-20, Jun 2015.

QUINTINO DOS SANTOS, J. W. **Determinantes biológicos da comorbidade dos ataques de pânico com depressão e ansiedade de separação**. Universidade Federal do Espírito Santos. Vitória. 2011.

QUINTINO-DOS-SANTOS, J. W. et al. Evidence that the periaqueductal gray matter mediates the facilitation of panic-like reactions in neonatally-isolated adult rats. **PLoS One**, v. 9, p. e90726, 2014. ISSN: 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24594924>>.

RAFF, H.; ROARTY, T. P. Renin, ACTH, and aldosterone during acute hypercapnia and hypoxia in conscious rats. **Am J Physiol**, v. 254, p. R431-5, 1988. ISSN: 0002-9513. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2831742>>.

RANA, S. et al. Independent effects of early-life experience and trait aggression on cardiovascular function. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, United, v. 311, n. 2, p. R272-86, Aug 2016.

RENTESI, G. et al. Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat. **Neuroscience letters**, Ireland, v. 480, n. 1, p. 7-11, Aug 2010.

RENTESI, G. et al. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats, v. 244, p. 29-37, #may# 2013. ISSN: 0166-4328. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432813000673>>.

RICHMAN, J. A.; FLAHERTY, J. A. Childhood relationships, adult coping resources and depression. **Social science & medicine (1982)**, England, v. 23, n. 7, p. 709-16, 1986.

ROBERSON-NAY, R.; KENDLER, K. S. Panic disorder and its subtypes: a comprehensive analysis of panic symptom heterogeneity using epidemiological and treatment seeking samples. **Psychological medicine**, England, v. 41, n. 11, p. 2411-21, Nov 2011.

ROBERSON-NAY, R.; LATENDRESSE, S. J.; KENDLER, K. S. A latent class approach to the external validation of respiratory and non-respiratory panic subtypes. **Psychological medicine**, England, v. 42, n. 3, p. 461-74, Mar 2012.

RODRÍGUEZ, D. L. A.; DUEÑAS, Z. Maternal Separation during Breastfeeding Induces Gender-Dependent Changes in Anxiety and the GABA-A Receptor Alpha-Subunit in Adult Wistar Rats. **PLoS ONE**, San, v. 8, p. e68010, #may# 2013. ISSN ISSN: 1932-6203. Disponivel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3694908/>>.

ROMAN, E. et al. Behavioral profiles and stress-induced corticosteroid secretion in male Wistar rats subjected to short and prolonged periods of maternal separation. **Hormones and behavior**, United, v. 50, n. 5, p. 736-47, Dec 2006.

ROTH, W. T. et al. High altitudes, anxiety, and panic attacks: is there a relationship? **Depress Anxiety**, v. 16, p. 51-8, 2002. ISSN ISSN: 1091-4269. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12219335>>.

ROY, V.; CHAPILLON, P. Further evidences that risk assessment and object exploration behaviours are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. **Behavioural brain research**, Netherlands, v. 154, n. 2, p. 439-48, Oct 2004.

SANT'ANA, A. B. et al. Panic-modulating effects of alprazolam, moclobemide and sumatriptan in the rat elevated T-maze. **Behavioural brain research**, Netherlands, v. 315, p. 115-22, Dec 2016.

SAPOLSKY, R. M.; MEANEY, M. J. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain research**, Netherlands, v. 396, n. 1, p. 64-76, Mar 1986.

SCHENBERG, L. C. et al. Translational approach to studying panic disorder in rats: hits and misses. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46 Pt 3, p. 472-96, 2014. ISSN ISSN: 1873-7528. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25316571>>.

SCHENKEL, L. C. et al. Serotonin gene polymorphisms and psychiatry comorbidities in temporal lobe epilepsy. **Epilepsy research**, Netherlan, v. 99, n. 3, p. 260-6, May 2012.

SCHIAVONE, S.; COLAIANNA, M.; CURTIS, L. **Impact of early life stress on the pathogenesis of mental disorders:** relation to brain oxidative stress. Current pharmaceutical design. Netherlands: [s.n.]. 2015. p. 1404-12.

SCHUTZ, M. T.; DE AGUIAR AND J., C.; GRAEFF, F. G. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. **Psychopharmacology**, Germany, v. 85, n. 3, p. 340-5, 1985.

SEGAL, J. et al. Novel allelic variants in the human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) among depressed patients with suicide attempt. **Neuroscience letters**, Ireland, v. 451, n. 1, p. 79-82, Feb 2009.

SERGIO, T. D. O.; SPIACCI, A. J.; ZANGROSSI, H. J. Effects of dorsal periaqueductal gray CRF1- and CRF2-receptor stimulation in animal models of panic. **Psychoneuroendocrinology**, England, v. 49, p. 321-30, Nov 2014.

SIVIY, S. M. et al. Effects of cross-fostering on play and anxiety in juvenile Fischer 344 and Lewis rats. **Physiology & behavior**, United, v. 169, p. 147-154, Feb 2017.

SOARES, V. D. P.; ZANGROSSI JR., H. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze, v. 64, p. 181-188, #aug# 2004. ISSN ISSN: 0361-9230. Disponivel em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0361923004001595>>.

SOLAS, M. et al. Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for Alzheimer's disease. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, England, v. 35, n. 8, p. 1664-73, Jul 2010.

SONG, H.-M. et al. Clinical characteristics of the respiratory subtype in panic disorder patients. **Psychiatry investigation**, Korea (South), v. 11, n. 4, p. 412-8, Oct 2014.

SPIACCI, A. et al. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray inhibits panic-like defensive behaviors in rats exposed to acute hypoxia. **Neuroscience**, v. 307, p. 191-8, 2015. ISSN: 1873-7544. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26319117>>.

SRACIC, M. K. et al. Syndrome of acute anxiety among marines after recent arrival at high altitude. **Mil Med**, v. 179, p. 559-64, 2014. ISSN: 1930-613X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24806502>>.

STAMATAKIS, A. et al. Rat dams exposed repeatedly to a daily brief separation from the pups exhibit increased maternal behavior, decreased anxiety and altered levels of receptors for estrogens (ER α , ER β), oxytocin and serotonin (5-HT1A) in their brain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 212-228, 2015. ISSN: 0306-4530. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306453014004284>>.

STEZHKA, V. V.; LOVICK, T. A. Projections from dorsal raphe nucleus to the periaqueductal grey matter: studies in slices of rat midbrain maintained in vitro. **Neuroscience letters**, Ireland, v. 230, n. 1, p. 57-60, Jul 1997.

SUCHECKI, D.; ROSENFELD, P.; LEVINE, S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. **Brain research. Developmental brain research**, Netherlands, v. 75, n. 2, p. 185-92, Oct 1993.

SUCHECKI, D.; TUFIK, S. Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. **Am J Physiol**, v. 273, p. R1332-8, 1997. ISSN: 0002-9513. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9362296>>.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 65, p. 571-6, 2000. ISSN: 0091-3057. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764908>>.

TROAKES, C.; INGRAM, C. D. Anxiety behaviour of the male rat on the elevated plus maze: associated regional increase in c-fos mRNA expression and modulation by early maternal separation. **Stress**, v. 12, p. 362-9, 2009. ISSN: 1607-8888. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19051121>>.

VALENCA, A. M. et al. Respiratory panic disorder subtype and sensitivity to the carbon dioxide challenge test. **Brazilian journal of medical and biological research =**

Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas, Brazil, v. 35, n. 7, p. 783-8, Jul 2002.

VAN OERS, H.; DE KLOET, E.; LEVINE, S. Persistent, but Paradoxical, Effects on HPA Regulation of Infants Maternally Deprived at Different Ages. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, England, v. 1, n. 4, p. 249-262, Aug 1997.

VAZQUEZ, D. M. et al. Maternal deprivation regulates serotonin 1A and 2A receptors in the infant rat. **Brain research**, Netherlands, v. 855, n. 1, p. 76-82, Feb 2000.

VERTES, R. P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **The Journal of comparative neurology**, United, v. 313, n. 4, p. 643-68, Nov 1991.

VETULANI, J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. **Pharmacological reports : PR**, Poland, v. 65, n. 6, p. 1451-61, 2013.

VIANA, M. B.; GRAEFF, F. G.; LOSCHMANN, P. A. Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, United, v. 58, n. 1, p. 167-72, Sep 1997.

VOGEL, J. R.; BEER, B.; CLODY, D. E. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. **Psychopharmacologia**, The Squibb Institute for Medical Research, New Brunswick, New Jersey, United States, v. 21, p. 1-7, 1971. Disponivel em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0015004136&doi=10.1007%2fBF00403989&partnerID=40&md5=e370758f4b2b7d2c4014f6213ece9c39>>.

WACHLESKI, C. et al. Lack of association between the serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) and personality traits in asymptomatic patients with panic disorder. **Neuroscience letters**, Irela, v. 431, n. 2, p. 173-8, Jan 2008.

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**, v. 66, p. 293-302, 1999. ISSN: 0031-9384. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10336157>>.

WOMERSLEY, J. S. et al. Developmental stress elicits preference for methamphetamine in the spontaneously hypertensive rat model of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Behavioral and brain functions : BBF**, England, v. 12, n. 1, p. 18, Jun 2016.

XUE, X. et al. Maternal separation induces alterations of serotonergic system in different aged rats, v. 95, p. 15-20, #jun# 2013. ISSN: 0361-9230. Disponivel em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0361923013000567>>.

YASUDA, H. et al. Artificially reared mice exhibit anxiety-like behavior in adulthood. **Experimental Animals**, v. 65, p. 267-274, #feb# 2016. ISSN: 1881-7122. Disponivel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4976240/>>.

YOO, S. B. et al. Adolescence fluoxetine increases serotonergic activity in the raphe-hippocampus axis and improves depression-like behaviors in female rats that experienced neonatal maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, p. 777-88, 2013. ISSN: 1873-3360. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23010142>>.

ZALOSNIK, M. I. et al. Effect of maternal separation and chronic stress on hippocampal-dependent memory in young adult rats: evidence for the match-mismatch hypothesis. **Stress**, v. 17, p. 445-50, 2014. ISSN: 1607-8888. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24930801>>.

ZAMBERLETTI, E. et al. Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats. **Neuroscience**, v. 204, p. 245-57, 2012. ISSN: 1873-7544. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178986>>.

ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F. G. Behavioral Validation of the Elevated T-Maze, a New Animal Model of Anxiety, v. 44, p. 1-5, 1997. ISSN: 0361-9230. Disponivel em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0361923096003814>>.

ZANGROSSI, H. J.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, United, v. 46 Pt 3, p. 397-406, Oct 2014.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46 Pt 3, p. 397-406, 2014. ISSN ISSN: 1873-7528. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24657635>>.

ZANOVELI, J. M. et al. Facilitation of 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. **The international journal of neuropsychopharmacology**, England, v. 13, n. 8, p. 1079-88, Sep 2010.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. J. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. **European journal of pharmacology**, Netherlands, v. 473, n. 2-3, p. 153-61, Jul 2003.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. J. Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. **Behavioural pharmacology**, England, v. 16, n. 7, p. 543-52, Nov 2005.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. J. Enhanced reactivity of 5-HT_{1A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: evidence from the elevated T-maze. **Neuropharmacology**, England, v. 52, n. 4, p. 1188-95, Mar 2007.

ZHANG, L. et al. Hypothalamic vasopressin system regulation by maternal separation: its impact on anxiety in rats. **Neuroscience**, v. 215, p. 135-48, 2012. ISSN: 1873-7544. Disponivel em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22522466>>.

ZHANG, X. et al. Early deprivation reduced anxiety and enhanced memory in adult male rats. **Brain Research Bulletin**, v. 108, p. 44-50, 2014. ISSN ISSN: 0361-9230. Disponivel em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0361923014001245>>.

ZUGLIANI, M. M. et al. Laboratory, clinical and therapeutic features of respiratory panic disorder subtype. **CNS & neurological disorders drug targets**, United, v. 14, n. 5, p. 627-35, 2015.

ZWEIG-FRANK, H.; PARIS, J. Parents' emotional neglect and overprotection according to the recollections of patients with borderline personality disorder. **The American journal of psychiatry**, United, v. 148, n. 5, p. 648-51, May 1991.

ANEXO A - Detalhes metodológicos de estudos que investigaram os efeitos em longo prazo da separação materna em modelos animais de ansiedade

	Referência	Linhagem	Composição da ninhada	Separação materna	Grupo controle	Data de início dos testes	Observações
<i>Estudos que observaram respostas do tipo ansiogênicas</i>	Lee et al., 2007	Sprague-Dawley	5 machos e 5 fêmeas	180 min/dia do DPN 1 a 14	não manipulado	DPN 61	Labirinto em cruz realizado 7 dias após nado forçado
	Wigger e Neumann, 2007	Wistar	6 machos e 6 fêmeas	180 min/dia DPN 1 a 12	Não manipulados	3 – 4 meses	Cirurgia para implantação de cateter na jugular 5 dias antes dos testes
	Toakres e Ingram, 2009	Hooded Lister	10 filhotes, preferencialmente machos ¹	10 sessões de 5 a 6 horas aleatoriamente realizadas entre o DPN 5 e 20	Não manipulados	DPN 70	Sessão única (10 min) no labirinto em cruz elevado, sem pré-exposição.
	Zhang et al., 2012	Wistar	7 a 8 filhotes, sendo 5 a 6 machos	180 min/dia DPN 2 a 15	Não manipulados	DPN 65	Animais pré-expostos ao campo aberto antes do labirinto em cruz e, 24 horas após esse teste, pré expostos ao aparato do teste de Vogel para habituação.

Estudos que não observaram efeito da separação materna em
modelos de ansiedade

						Experimento realizados na fase escura
Benekareddy et al., 2011	Sprague-Dawley	Sem informação	180 min/dia DPN 2 a 14	Sem informação ²	DPN 90	-
Lajud et al., 2012	Sprague-Dawley	8 filhotes	180 min/dia DPN 1 a 14	Metade da ninhada foi separada da mãe e metade utilizada com controle	adultos	Labirinto em cruz elevado realizado sem pré-exposição.
Roman et al., 2006	Wistar	10 filhotes com n° equilibrado de machos e fêmeas	15 min ou 6 horas/dia DPN 1 a 21	Não manipulados	DPN 73-76	-
Estanislau e Morato, 2005	Wistar	6 macho e duas fêmeas, se possível	180 min/ dia DPN 3 a 14	Não manipulados	DPN 60	Sem pré-exposição ao labirinto em cruz elevado.
Clinton, Watson e Akil 2014	10º geração de Sprague-Dawley reproduzidos seletivamente (muito ou pouco resposivos à novidade)	6 machos e 6 fêmeas	180 min/dia DPN 1 a 14	Não manipulados	DPN 75	Sem pré-exposição no labirinto em cruz elevado

Neonatal stress alters panic-like behavior on hypoxia but not on elevated T maze: evidence for panic subtyping

Daiane Santos Rosa¹; Alana Tercino Frias²; Ailton Spiacchi Junior²; Hlio Zangrossi Junior^{1,2}.

¹ Neuroscience and Behavioral Science Department. Medical School of Ribeiro Preto, University of So Paulo, Ribeiro Preto, So Paulo, Brazil.

² Pharmacology Department, Medical School of Ribeiro Preto, University of So Paulo, Ribeiro Preto, So Paulo, Brazil.

INTRODUCTION

Stressful events that occur early in life are known to be a significant risk factor for the development of psychiatry disorders (Teicher and Samson, 2016; McCrory et al, 2011), such as panic disorder (PD) (Sugaya et al, 2012; Cougle et al, 2010; Kendler et al, 2000). Additionally, these events can increase the severity of the disorder, anticipate the time of onset and diminish response to treatment, among other aggravating factors (for a review see Teicher and Samson 2013).

Disruptions on parent-infant relationship (e.g. childhood parental loss, including parental death, separation and divorce), parent neglect and childhood separation anxiety disorder (SAD) seems to be specially related to a later appearance of PD (Battaglia et al, 2009; Battaglia et al, 2014). Klein (1964), for example, reported that from 32 PD patients, 16 suffered from SAD on childhood. In the same direction, Kossowsky et al., 2013 conducted a meta-analysis study of the relationship between childhood SAD and future psychopathology. By reviewing twenty five studies (14.855 participants), the authors concluded that childhood SAD is a significant risk factor for the later development of PD. However clinical studies can not provide cause-effect relationship due to their correlational nature (Teicher et al, 2006). Thus, translational animal models become indispensable for better understand how early life events affect the central nervous system making it more vulnerable to mental disorders.

In rodents, the effects of stressful events early in life have been extensively studied by using models of dam-offspring interaction disruptions. More specifically, the separation of the pups from the dam during the early postnatal period has been a valuable tool for the understanding of its effects later in life (Marco et al, 2015). It is known that neonates, from postnatal day (PND) 4 to 14, present a period of suppressed glucocorticoids response to stress, so called the stress

hyporesponsive period (SHRP), in which most stressors (e.g. saline injection, exposure to novelty and maternal deprivation lower than 8h) fail to elevate the corticosterone (CORT) level, acting as a protective mechanism for the brain development (Levine et al, 1994; Kloet et al, 1996). Conversely, there are evidences that the disruption of this system results in abnormal phenotypes and is involved with the later development of behavioral responses related to psychopathologies (for a review see Macrì et al, 2011 and Faturi et al, 2010).

In this way, single maternal deprivation (MD), i.e. one single 24h episode of dam-pup separation in some time point before weaning, is a consistent model for studying the long-term effects of exposure to early life stressful events. It was evidenced that MD alters corticosterone plasma levels CORT depending on the PND that it occurs. For instance, MD on PND 11 causes an augment on corticosterone plasma levels immediately after the end of the deprivation period (Suchecki and Tufik, 1997). On PND 3, it is also observed an elevated level of CORT 24 h later (Oomen et al, 2009). In the same way, rats deprived on PND 9 presented an increase on CORT 12, 24 and 36 hours after the beginning of the MD (Viveiros et al, 2010).

The long lasting behavioral consequences of MD are also demonstrated. Adult maternal deprived rats (MD rats) on PND 11 presented an increased frequency of risk assessment when exposed to the elevated plus maze (Barbosa Neto et al, 2012). MD on PND 3 increased the freezing response to a novel environment and in response to a tone during the cued fear conditioning (Oomen et al, 2010). On PND 9, MD increased the number of aggressive behaviors on social interaction test and a longer time spent in immobility on the forced swim test (Zamberletti et al, 2012).

Although many studies investigate the effects of MD and other neonatal stress protocols on animal models of anxiety and depression, little is known about its effects on animal models of panic attacks. Recently it was demonstrated that repeated maternal separation (180min/day from DPN 2-21) promoted a facilitation of the escape response evoked by the electric stimulation of dorsal periaqueductal gray (dPAG) (Quintino dos Santos et al, 2014). The dPAG is pointed as a key structure on the genesis/regulation of the defensive behaviors associated with panic attacks (Graeff, 2004; Johnson et al, 2014; Schenberg et al, 2014), so that the facilitation of the escape response observed by the authors is interpreted as a panicogenic response.

The serotonin (5-HT) participation on the physiopathology of PD has been widely recognized (Spiacchi et al, 2015; Corchs et al, 2015; Zangrossi e Graeff, 2014; Paul et al, 2014; de Bortoli et al, 2013; Graeff, 2012). Several studies demonstrated that the facilitation of the serotonergic neurotransmission at the dPAG inhibits escape (for a review see Graeff, 2002) and that this inhibition is mediated by 5-HT_{1A/2A} receptors in this same brain region (Zanoveli et al, 2003; de Paula Soares e Zangrossi, 2004; Nogueira e Graeff, 1995)

In the light of these evidence, we hypothesized that single MD on DPN 11 would induce the facilitation of escape in different animal models of panic attacks and would alter the serotonergic neurotransmission involved with this response. More specifically, Wistar pups were deprived from contact with the dam for 24 hours on DPN 11 and submitted, when young adults (60 days old), to different animal models. In experiment 1, rats were submitted to ETM to access the escape behavior. Additionally, the same animals were also submitted to open field and light-dark box test, to access locomotion and anxiety, respectively. In experiment 2, the escape behavior was accessed by exposition to hypoxia challenge. Finally, in experiment 3, it was tested if systemic 5-HT depletion would improve the escape response in the maternally deprived rats. Also, it was evaluated by Western Blotting (WB) if single MD was affecting the amount of 5-HT_{1A} at dPAG and, comparatively, at amygdala. Additionally, plasma corticosterone level was analyzed.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Nulliparous Wistar rats (University of São Paulo, campus of Ribeirão Preto) were obtained around the last week of pregnancy. They were housed individually under a 12-hour dark-light cycle (lights on at 7 a.m.) and maintained at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with free access to food and water. The day of birth was designed as day 0. On postnatal day 1 (PND 1), litters were culled to 6 - 8 male pups and housed with their mothers at the same conditions. All procedures were conducted in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and were approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA).

Deprivation procedure

Single MD protocol was done as described by on PND 11, mothers remained in their home cages while pups were removed to a new Plexiglas cage. Pups were placed in a separated room, on the top of an electric heating pad set at $30 - 33^\circ\text{C}$ under the same light and temperature conditions of the animal facility room. Maternal deprivation lasted 24h. At the end of this period, pups were reunited with their mothers until weaning on PND 21. Non deprived (NDEP) pups remained with their mothers on the animal facility room. After weaning, siblings were housed in groups of 3-4 rats per cage and reared until the test day which occurred always between PND 60 – 64.

Drug

The following drug was used: 4-Chloro-DL-phenylalanine methyl ester hydrochloride (PCPA – Sigma-Aldrich) dissolved in sterile saline (0,9%).

Apparatus

ETM was made of wood and had three arms of equal dimensions (50×12 cm). One arm, enclosed by 40 cm high walls, was perpendicular to two opposed open arms. The open arms were surrounded by a 1 cm high Plexiglass rim, in order to avoid falls. The whole apparatus was elevated 50 cm above the floor.

The open-field test was performed in a wooden square arena (60×60 cm), with 30 cm high walls. The light-dark box test was performed in a wooden box (48x24x27 cm) with a grid floor composed of bars spaced 5 mm apart. The box was divided by a barrier possessing a doorway (10x10 cm), so that rats could cross into two chambers of equal size (24x24x27): one painted black, not illuminated, and one painted white and illuminated with a 50 lx light source.

The hypoxia test was performed in a roof-sealed cylinder (25 cm diameter, 35 cm height) made of transparent Plexiglas. A removable rubber floor was used to prevent the animals from skidding. The chamber had a flow valve connected to both an air pump and a nitrogen (N₂) cylinder. Hypoxia (7% O₂) was produced by N₂ administration at a flow rate of 4.5L/min during approximately 270 s. Chamber concentrations of both O₂ and CO₂ were monitored using a gas analyzer (ML206 Gas Analyzer, AdInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) and scanned online with the PowerLab Chart 5 software (AdInstruments, Bella Vista, NSW, Australia)

Luminosity at test rooms was 60 lx. After each experimental session, the apparatus was cleaned with a 20% ethanol solution.

Testing procedure

The study was divided into three experiments. In all of it, a number of 2 to 3 pups per litter was used to compose each one of the experimental group.

In the first experiment, 12 litters (6 NDEP and 6 DEP11) were used to investigate the single MD effect over the scape behavior on ETM. Subsequently, animals were tested in the open field to access locomotion and in the dark-light box test, an animal model of anxiety.

In the second experiment, 12 litters (5 NDEP and 7 DEP11) were used to access scape response evoked by a 15 minutes hypoxia session.

In the third experiment, the aim was to investigate if the single MD long-term effects were modulated by 5-HT neurotransmission. To do so, 12 litters (6 NDEP e 6 DEP11) were separated into 6 groups: NDEP/DEP11 animals treated with saline and subjected do normoxia (NDEP/DEP11 NOR), NDEP/DEP11 animals treated with saline and subjected to hypoxia (NDEP/DEP11 SAL), and NDEP/DEP11 treated with PCPA and submitted to hypoxia (NDEP/DEP11 PCPA). PCPA is a tryptophan hydroxylase's inhibitor that was peripheral injected

100 mg/Kg/day during four days, the last injection being administered 24 hours before the test. Immediately after the test, each animal was placed individually in a small Plexiglas cage, where they stayed for 30 minutes and then were brought to an adjacent room where they were sacrificed. Limbic brain structures - PAG and amygdala - were dissected for posterior WB analysis. Additionally, trunk blood was collected for the CORT levels determination.

Behavioral tests

Elevated T maze and open field

Two days before the test, the animals were gently handled by the experimenter for 5 min. Twenty-four hours before the test, the rats were again handled for 5 min and then exposed to one of the open arms of the ETM for 30 min. A wooden barrier mounted on the border of the maze central area and the proximal end of the open arm isolated this arm from the rest of the maze. The pre-exposure to the open arm diminishes the latencies to withdrawal from it during the test, rendering the escape task more sensitive to the effects of antipanic drugs (Teixeira et al, 2000).

The test in ETM was initiated by measuring inhibitory avoidance. Each animal was placed at the distal end of the enclosed arm of the ETM facing the intersection of the arms. The time taken by the rat to leave this arm with all four paws was recorded (baseline latency). The same measurement was repeated in two subsequent trials (avoidance 1 and 2) at 30 s intervals. Following the avoidance procedure (30 s), rats were placed at the end of the same previously experienced open arm and the latency to leave this arm with all four paws was recorded three times (escape 1, 2, and 3) with 30 s inter trial intervals. A cut-off time of 300 s was established for the avoidance and escape latencies.

To assess the locomotor activity, immediately after testing in ETM, the total distance traveled by each rat in an open field was evaluated by a video tracking system (Ethovision; Noldus, Wageningen, Holland) for 5 min.

Light-dark box test

Immediately after testing in the open field, animals were submitted to the light-dark test. Rats were individually placed in the middle of the light compartment facing the doorway that separate the two compartments. After the first transition to the dark compartment, the behavior of the animal was recorded for a 5 min period. During this period, the total time spent in the light compartment and the total number of transitions between the two compartments was measured.

Hypoxia

In Experiment 2, one day before the hypoxia challenge, the animals were placed in the gas chamber for 15 minutes for habituation. During this session, room air was flushed into the chamber at a flow rate of 4,5 L/min in order to familiarize the rats with the gas flow and the air jet sound, also it reduces the neophobic reactions to the cage environment.

Evaluation of 5-HT modulation on the escape behavior evoked by hypoxia

Hypoxia

In Experiment 3, the habituation sessions has started 4 days before the hypoxia challenge. During this period, everyday each animal was manipulated for 5 minutes by the experimenter and then it was placed into the gas chamber for a 15 minutes habituation session as described above. Subsequently, the animal was injected either with saline or with PCPA, according to the group in which it was designated.

In both experiments, 24 hours after the last habituation, during the test session, the animals were placed individually into the chamber and acclimated to it under normoxic condition (21% O₂) for 5 minutes, in the same flow rate conditions of habituation session. Subsequently, N₂ was flushed into the chamber (4,5 L/min) for approximately 4 minutes up to the production of hypoxia (7% O₂). Next, N₂ infusion was suspended and the hypoxia condition was maintained for 6 minutes. The number of upward jumps was computed live, anyway, the animal behavior was recorded throughout the experiment.

Western Blottin analysis

The WB analysis was performed with PAG and amygdala samples from 6 NDEP-NOR and 6 DEP11-NOR animals that were randomly selected.

For WB procedure, the rats that were submitted to normoxia as described previously were then euthanized by decapitation 30 minutes later. Soon after, the brains were removed and quickly frozen in dry ice. Immediately, the PAG and amygdala areas were removed with punch needles (dPAG: x mm diameter; amygdala: x mm diameter) and frozen at -80°C for posterior WB analysis. At the day that the analyze was performed, the tissues were macerated for protein extraction with a lysis buffer (NaCl 137 mM; Tris-HCl 20 mM pH 7.6; glycerol 10%) and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Total proteins were quantified by the Bradford method (Bradford, 1976). The samples were submitted to an electrophoresis in an acrylamide gel (4-12%) and transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore, MA, EUA). In order to block unspecific sites, the membrane was incubated in 3% BSA-TBS for 2 h. After, it was incubated overnight with the specific rabbit anti-5HT1A primary antibody (Thermo Fisher Scientific - PA5-28090 - 1:10000). The immunoblots were washed with TBS-t (0.1% Tween 20)

and incubated to a specific secondary antibody (donkey anti-rabbit IgG-HRP secondary antibody – sc2313 – Santa Cruz Biotechnology – 1:10000) by 1 h and, after three washes, revealed (ECL chemiluminescent kit). Unsaturated bands had their densities quantified using the Image J Software. In this experiment, the β -actin was used as the normalizing protein (Anti-Actin antibody, clone c4 – cat. # MAB1501 – Merck Millipore – 1:10000).

Blood sampling procedure

Trunk blood of each animal from experiment 3 was collected into heparinized (50 μ L/mL) plastic tubes, which were then centrifuged for 30 minutes at 3000 rpm at 4°C. Two plasma aliquots were collected in plastic tubes and kept at -20°C until CORT assay was performed.

Corticosterone Assay

The plasma CORT concentration was determined through radioimmunoassay (RIA) after ethanol extraction process (Castro et al., 1995). The assay sensitivities and intra- and inter-assay coefficient of variation were 0.4 μ g/dL, 3.3% and 10.0% respectively.

Statistical analyses

Repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was used to analyze both ETM avoidance and escape data, with maternal deprivation as independent factor and trials as repeated measures. Data from open field, hypoxia and corticosterone assay were analyzed by Student t tes. Post hoc comparisons were performed by the Duncan's test, when appropriate. Values of P less than 0,05 were considered statistically significant.

RESULTS

Behavioral effects

Single MD elicits a panicogenic like response on DEP11 rats exposed to hypoxia, but not to those exposed to the ETM.

ETM results

Repeated-measures analysis of variance showed that there was inhibitory avoidance acquisition [$F(2,50) = 20,93$; $p = 0,00$]. However, there was no MD effect [$F(1,25) = 0,47$; $p = 0,49$] or interection between the MD and trials [$F(2,50) = 0,35$; $p = 0,70$]. (Fig. 2 – upper panel)

Regarding the escape behavior, ANOVA showed that there was no effect of trials [$F(2,50) = 1,31$; $p = 0,27$] or MD [$F(1,25) = 0,32$; $p = 0,57$], nor interaction between both of them [$F(2,50) = 0,60$; $p = 0,51$] (Fig. 1 – lower panel)

The locomotor activity measured on the open field also was not altered by MD [$t(24) = 0,79$, $p = 0,43$] (Fig. 2)

Fig. 1 Absence of effect of MD on PND 11 on the inhibitory avoidance (upper panel) and on the escape behavior (lower panel) on the ETM. Each bar represents mean ($\pm$ SEM). NDEP = non-deprived groups. DEP11 = deprived on PND 11 group

Fig. 2 Absence of effect of MD on PND 11 on the locomotor activity on the open field. Each bar represents mean ($\pm$ SEM). NDEP = non-deprived groups. DEP11 = deprived on PND 11 group

Hypoxia results

One-way ANOVA revealed that the number of jumps was significantly different between the groups NDEP, DEP3 and DEP11 [$F(2,32) = 3,782$; $p < 0,05$]. Post hoc analyses showed that DEP11 animals jumped significantly more than NDEP during hypoxia challenge (Fig. 3).

Fig. 3 Effect of MD on PND 11 on the escape behavior evoked by hypoxia exposition. MD on PND 11 altered the number of jumps expressed during hypoxia. Each bar represents mean ($\pm$ SEM). NDEP = non-deprived groups. DEP11 = deprived on PND 11 group * $p < 0,05$ compared to control group (NDEP).

The single MD episode on PND 11 also did not altered the inhibitory avoidance on light-dark box test.

The time spent on the light compartment and the number of transition between the compartments on the light-dark box test can be observed on fig. 4. According to the Student t test, MD did not altered the time on the light compartment [$t(25) = 1,10$; $p = 0,28$] or the number of transitions between the compartments [$t(25) = 0,31$, $p = 0,75$] (fig. 4)

Fig. 4 Absence of effect of MD on PND 11 on the defensive behaviors evoked by light-dark box test. Each bar represents mean ($\pm$ SEM). NDEP = non-deprived groups. DEP11 = deprived on PND 11 group

Evaluation of 5-HT modulation on the escape behavior evoked by hypoxia

Results of 5-HT depletion on the escape behavior evoked by hypoxia

PCPA treatment promoted a panicogenic-like response on NDEP rats, without alter DEP11 rats behavior.

Regarding the number of jumps, statistical analysis showed that the rats treated with saline and submitted to 15 minutes of normoxic condition were significantly different from that exposed to hypoxia, either treated with saline or with PCPA (fig. 5)

The two-way ANOVA analysis of the groups that were submitted to hypoxia showed that there was an effect of MD [$F(1,44) = 3,91$; $p = 0,05$], but no effect of the treatment [$F(1,44) = 2,35$; $p = 0,13$], or interaction between the factors [$F(1,44) = 1,80$; $p = 0,18$]. The multiple comparison test of Duncan showed that the NDEP-SAL group was different from all the other groups (Fig. 5)

The locomotor activity observed during the first 5 minutes of the test was not different between the groups ($p > 0,05$) (Fig.6)

Fig. 5 Effect of 5-HT depletion on the escape behavior of maternally deprived rats submitted to normoxia or hypoxia. The treatment with PCPA facilitated the expression of jumps on NDEP animals during hypoxia. Each bar represents mean ($\pm$ SEM). NDEP = non-deprived groups. DEP11 = deprived on PND 11 group. * $p < 0,05$ comparing to respective group treated with saline and submitted to normoxia. # $p < 0,05$ comparing to all the other groups.

Fig. 6 Absence of effect of MD on PND 11 on the locomotor activity during the first 5 minutes of hypoxia test. Each bar represents mean ($\pm$ SEM). NDEP = non-deprived groups. DEP11 = deprived on PND 11 group

Results of Western Blotting analysis for the quantification of 5-HT_{1A} receptors on dPAG and amygdala

The single MD episode on PND 11 did not altered the amount of 5-HT_{1A} receptors on dPAG or amygdala

Membrane revelation allowed the detection of a single band of molecular weight slightly above 50 kDa, corresponding to the expected staining for the 5-HT_{1A} receptor ($\approx$ 56 kDa). Densitometric analysis revealed no differences on the amount of 5-HT_{1A} receptor between NDEP and DEP11 groups at dPAG [$t(9) = 1,66$, $p = 0,12$] or at amygdala [$t(10) = 1,85$; $p = 0,09$] (Fig. 7)

Fig. 7 Effect of single MD on PND 11 in the expression of 5-HT_{1A} receptors in de periaqueductal gray (PAG) and in the amygdala. The stress protocol did not alter the expression of 5-HT_{1A} receptors in de PAG or in the amygdala. Each bar represents mean ($\pm$ SEM). NDEP = non-deprived groups. DEP11 = deprived on PND 11 group.

Corticosterone plasma levels

Exposition to hypoxia promoted an increase on the plasma CORT levels, but no alterations were observed due to MD.

According to statistical analysis, the exposition to hypoxia promoted an increase on plasma corticosterone levels on NDEP animals under treatment either with saline or with PCPA, comparing to its respective control submitted to normoxia (Fig. 8).

Fig. 8 Corticosterone plasma levels of 60 day-old rats submitted to maternal deprivation on PND11. The exposition to hypoxia increased the corticosterone levels on NDEP group. The blood samples were collected 30 minutes after hypoxia test. Each bar represents mean ($\pm$ SEM). NDEP = non-deprived groups. DEP11 = deprived on PND 11 group. * significantly different from respective control submitted to normoxia ($p < 0,05$).

DISCUSSION

The results of the present study showed that single MD (24 hours at PND 11) facilitated the escape behavior in the hypoxia test but not in the ETM test. To our knowledge, it is the first result that demonstrated an association between single MD and escape behavior.

The differences seen between the results obtained in the ETM and in the hypoxia test may indicate that the escape behavior elicited by each of the tests may correspond to different emotional states. In this sense, it has been proposed that the hypoxia challenge may modulate a specific type of panic attack, the respiratory panic (Spiacchi et al, 2015). This subdivision between respiratory and non-respiratory panic was proposed based on the observation of different symptomatic profile presented during a panic attack in which some patients respond with prominent respiratory symptoms while others do not (Briggs et al, 1993). Since then, several studies have been corroborating this subdivision (Song et al, 2014; Zugliani et al, 2015; Roberson-Nay e Kendler, 2011; Roberson-Nay et al, 2012; Valenca et al, 2002).

Conversely, Beck et al (1999) described that PD patients presents an elevated respiratory rate and more anxiety symptoms, when exposed to both hypercapnic and hypoxic challenge, when compared to health controls. Later, Beck et al (2000) also

demonstrated these enhanced respiratory rates among PD patients was even more prominent in that patients with respiratory panic. Furthermore, a preclinical study showed that the exposition to hypoxia elicited in rats more jumps behavior and promoted the dPAG recruitment (Casanova et al, 2013).

This respiratory issue is the core of one of the most important hypothesis about PD, the false suffocation alarm hypothesis proposed by Donald Klein (1993). According to his theory, there is a physiological suffocation alarm that monitors the information about a potential suffocation. Thus, the panic attacks are the response for a wrong activation of this alarm by a generally innocuous stimulus, like small CO₂ elevations. In an extension of this hypothesis, Preter and Klein (2008) incorporated the results obtained by Beck et al (1999, 2000) highlighting its consonance with the false suffocation alarm theory, once the hypoxia situation also is a signal for suffocation.

Concerning the results of the MD effects on anxiety-like behaviors, our results did not showed an effect of single MD on inhibitory avoidance behavior in ETM. Interestingly, Barbosa-Neto et al (2012), using the same MD protocol, demonstrated that the adult rats previously maternally deprived on PND 11 had an augmented risk assessment behavior and lengthen time on the central area of the elevated plus maze (EPM). However, the same author did not noticed any alteration on the time spent and the number of entries at the open and the closed arms of the maze. It has been proposed that the risk assessment behavior may be a more sensitive parameter for the measurement of anxiety level (Roy and Chapillon, 2004; Albrechet-Souza et al, 2009). For example, the effect of the benzodiazepine midazolam was evaluated in the EPM in rats that were or not pre-exposed to it. The risk assessment was the only parameter to detect the anxiolytic effect of midazolam on both situations, once the enhanced exploration of the open arms seen at the naive rats was not observed in re-exposed rats.

On the other hand, the absence of effect of single MD in the light-dark box test contrasts with the results observed by Faturi et al (2010). The authors showed that maternally deprived rats (24 hours on PND 11) had an diminished exploration of the light compartment of the light-dark box. Though the reason for this incongruence is not clear, in a speculative way, the fact that, in the present study, the animals had been submitted to ETM before the light-dark box test, while Faturi et al used naïve animals, may be a confounding factor.

Regarding the investigation of the serotonergic modulation of the escape behavior evoked by hypoxia in animals previously submitted to single MD, our results showed that

the serotonin depletion by means of the PCPA administration facilitated the expression of escape behavior on control group, however, the same treatment was not able to potentialize the response of the deprived group.

It was previously demonstrated that PCPA administration, same posology adopted by us, reduces the 5-HT level at different brain regions like amygdala and striatum (Sant'Ana et al, 2016). Other studies also demonstrated that PCPA, in similar dose and regime used in our study, is capable of promote a widespread reduction in brain 5-HT (o'Connell et al, 1991; Barnes et al, 1992). Even that in the present study it was not evaluated the range of the 5-HT depletion, it is acceptable that the same treatment has diminished the amount of 5-HT at dPAG. Thus, in a speculative way, it is possible that the facilitation of the escape behavior observed on the control group was due to a reduction of 5-HT at dPAG. Still in a speculative way, it is possible that the PCPA was not able to potentialize the already heightened escape behavior of DEP11 animals because the MD itself had already promoted a 5-HT decrease.

Curiously, the quantification of 5-HT_{1A} receptors at dPAG was not different among NDEP and DEP11 groups. The same is valid for this receptors analysis at amygdala. Other studies have evaluated the serotonergic neurotransmission in different brain regions that modulates defensive behaviors, mainly on hippocampus and dorsal raphe nucleus. It was demonstrated that 24 hours deprivation on PND 9 e 12, but not on PND 6, promoted on pups an increase on 5-HT_{1A} receptors mRNA at the hippocampus, but did not altered its content at the dorsal raphe nucleus (Vazquez et al, 2000). However, there are no studies on the PAG content of 5-HT_{1A} receptor.

Finally, about the corticosterone quantification, ours results showed that the exposition to hypoxia promoted an increase on corticosterone plasmatic level, but there was no effect of MD on this parameter.

It is interesting to notice that the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis on PD is controversial, without a consensus about its activation or not during the panic attacks (Lim et al, 2011). In general lines, clinical studies show that spontaneous panic attacks do not promote an increase on the stress hormone, i.e. corticotrophin, cortisol and prolactin (Armini et al, 2015). On the other hand, panic attacks induced by the administration of drugs such as CCK-4, yohimbine and caffeine do increase the salivary and plasmatic cortisol levels (Lim et al, 2011).

In rats, Lim et al (2011) demonstrated that the electric stimulation of de dPAG increased the plasmatic corticosterone level 30 minutes after the escape response. However,

Armini et al (2015) showed that this same stimulus activated the HPA axis in a way that was dependent from the performance of the escape behavior. In other words, the HPA axis only was activated when the escape behavior was performed. When the area of the stimulation arena was reduced to prevent this response, it was not observed the HPA axis activation.

The effect of the acute (20 minutes) exposition to hypoxia over the activation of the HPA axis was investigated by Raff and Roarty (1988). The authors demonstrated that both hypercapnia (8% CO₂) and hypoxia (7% O₂) was capable of increase the adrecorticotrophic hormone (ACTH) in rats. Yet, this hypoxia model holds little resemblance with the model used in this present study.