

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

BRUNA BUENO MILANESI

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROMORFOLÓGICOS DO ESTRESSE PRECOCE: uma
análise teórico-prática em modelos murinos e humanos

Porto Alegre
2023

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

BRUNA BUENO MILANESI

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROMORFOLÓGICOS DO ESTRESSE

PRECOCE: uma análise teórico-prática em modelos murinos e humanos

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia e Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Léder Leal Xavier

PORTO ALEGRE

2023

Ficha Catalográfica

M637e Milanesi, Bruna Bueno

Efeitos comportamentais e neuromorfológicos do estresse precoce
: uma análise teórico-prática em modelos murinos e humanos /
Bruna Bueno Milanesi. – 2023.

117 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Léder Leal Xavier.

1. Estresse precoce. 2. Morfologia. 3. Histologia. I. Xavier, Léder
Leal. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rejane e Lauro, pelo amor incondicional e incentivo que sempre me deram. O acolhimento e ajuda de vocês foi essencial para a conclusão dessa etapa. Ao meu amado irmão, Rodrigo, pela forte parceria e amor. À minha falecida irmã, Laura, que apesar de não estar presente de corpo, esteve sempre comigo em alma. Obrigada por estar presente em meus pensamentos, me dando força e me incentivando a ser melhor. Fica o meu eterno agradecimento a vocês por tudo!

Ao meu marido, Eduardo, que esteve ao meu lado durante essa trajetória, me apoiando, incentivando e torcendo sempre. Obrigada pelo amor e por se fazer presente sempre que precisei.

Ao pessoal do laboratório por toda ajuda, incentivo, colaboração, amizade e por todos os momentos de descontração e risadas. Raquel, Lisiê, Paula e Laura, vocês foram essenciais nessa jornada, muito obrigada por toda ajuda. Um agradecimento especial as alunas de Iniciação Científica, Bruna, Julia e Nicole, vocês foram excepcionais.

Um agradecimento especial à Raquel, que além de toda ajuda e auxílio técnico, se tornou uma grande amiga a qual tenho como exemplo de profissional e ser humano.

Ao meu orientador, Léder Xavier, por todos os anos de convivência e aprendizado, pela disponibilidade, pela inspiração como profissional e pesquisador, pela compreensão e empatia e por embarcar nessa aventura comigo. Tu fostes essencial para a conclusão dessa caminhada. Muito obrigada pelos ensinamentos que contribuíram tanto para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao pessoal do *Developmental Cognitive Neuroscience Lab*, Rodrigo Grassi-Oliveira, Francisco Lumertz e Rodrigo Orso, por todo apoio, ensinamentos e parceria. A ajuda e conhecimento de vocês foi indispensável para a realização e conclusão desse projeto. Obrigada por todo aprendizado.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pela estrutura e acolhimento. E ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular por todo suporte.

E, por fim, um agradecimento especial ao CNPq pela bolsa de suporte a pesquisa.

RESUMO

O estresse precoce (Early Life Stress) é capaz de alterar comportamentos, cognição e causar mudanças anatômicas e histológicas no sistema nervoso de animais de laboratório e seres humanos. Esse trabalho é dividido em dois estudos, cujos objetivos foram: 1- Produzir uma revisão descritiva sobre as alterações morfofuncionais produzidas pelo ELS em modelos murinos e humanos; 2- Avaliar os efeitos a longo prazo (>60 dias) da exposição a eventos estressores no início da vida, analisando parâmetros comportamentais e neuromorfológicos em camundongos. O primeiro estudo desta dissertação resultou na produção de um artigo científico de revisão descritiva sobre efeitos do ELS no sistema nervoso central de roedores e humanos, o qual traz um compilado de dados a respeito das principais alterações encefálicas a nível estrutural e celular. Em relação ao segundo estudo desta dissertação, o qual se refere a parte experimental, foram utilizados 24 animais, grupo controle (N=12) e grupo estressado (N=12) divididos igualmente em ambos os sexos. O estresse foi induzido através de um modelo combinado de estresse precoce (LBSM), que consiste na junção do protocolo de *limited bedding* (LB) concomitantemente com a separação materna (SM) por 3 horas/dia, do dia pós-natal 2 ao 15. Após 60 dias de vida, os animais foram analisados. Foram realizados os seguintes testes para avaliação de comportamentos do tipo depressivo/ansioso: 1- Teste de preferência a sacarose; 2-Campo aberto; 3-Labirinto em cruz elevado; 4-Claro/escuro e 5-Nado forçado. Posteriormente, os animais foram eutanasiados e seus encéfalos submetidos à técnica histológica de Nissl, associada aos métodos estereológicos de Cavalieri para análise volumétrica e morfometria planar das espessuras cortical e das camadas piramidais do CA1 e CA3 hipocampus, e estimativa das densidades neuronais e gliais e relação glia/neurônios em distintas regiões encefálicas. A análise de imagens foi realizada no software Image Pro Plus e a análise estatística (teste t não pareado) nos software GraphPad Prism ($p < 0,05$). No teste do labirinto em cruz elevado, as fêmeas ELS, aumentaram seu tempo de permanência nos braços abertos ($p=0,011$) e no centro ($p=0,019$), reduziram a permanência nos braços fechados ($p=0,005$) e aumentaram seu número de entradas nos braços abertos ($p=0,028$) e fechados ($p=0,048$). Nenhum outro parâmetro comportamental foi afetado de modo significativo pelo ELS em machos ou fêmeas. Em relação à morfometria cerebral dos machos observamos: (1) o ELS aumentou o volume hipocampal entre os Bregmas 1.46 até Bregmas 2.06 ($p=0,011$), sendo que o aumento significativo ocorreu na porção mais rostral do hipocampo, entre Bregma 1.46 até Bregma 1.70 ($p=0,001$); (2) o ELS aumentou a espessura cortical cerebral ($p=0,000006$) e a espessura da camada piramidal do CA1 hipocampal ($p=0,018$); e (3) o ELS reduziu a densidade neuronal cortical na área infralímbica do córtex pré-frontal medial ($p=0,016$). Analisando-se os dados relativos à morfometria cerebral das fêmeas, observa-se: (1) o ELS provocou um aumento da espessura de camada piramidal do CA1 hipocampal ($p=0,00006$); (2) o ELS reduziu a densidade neuronal cortical nas áreas pré-límbica ($p=0,048$) e infralímbica ($p=0,017$); (3) o ELS reduziu a densidade neuronal na amígdala basolateral ($p=0,041$) e a densidade glial do córtex cingulado ($p=0,025$). As alterações comportamentais encontradas são restritas às alterações no teste de labirinto em cruz elevado em fêmeas. Por sua vez, o protocolo ELS afetou de modo distinto a anatomia e histologia encefálica em machos e fêmeas. Nossos resultados sugerem que as respostas comportamentais de longo prazo ao ELS, em camundongos, relacionadas à depressão e ansiedade, podem ser mais significativas em fêmeas e que as alterações morfométricas cerebrais encontradas em machos submetidos ao ELS podem não se traduzir em alterações comportamentais analisadas pelos testes executados nessa dissertação, mas talvez estejam relacionadas a déficits em outras funções superiores.

Palavras-Chaves: Estresse precoce; Morfologia; Histologia.

Área conforme classificação CNPq: 20000006 - Ciências Biológicas

Sub-área conforme classificação CNPq: 20600003 – Morfologia

ABSTRACT

Early Life Stress is capable of altering behavior, cognition and causing anatomical and histological changes in the nervous system of laboratory animals and humans. This work is divided into two studies, whose objectives were: 1- Produce a descriptive review on the morphofunctional changes produced by ELS in murine and human models; 2- Evaluate the long-term effects (>60 days) of exposure to stressful events in early life, analyzing behavioral and neuromorphological parameters in mice. The first study of this dissertation resulted in the production of a scientific article of descriptive review on the effects of ELS on the central nervous system of rodents and humans, which brings a compilation of data regarding the main encephalic alterations at the structural and cellular level. Regarding the second study of this dissertation, which refers to the experimental part, 24 animals were used, control group (N=12) and stressed group (N=12) equally divided into both sexes. Stress was induced through a combined model of early stress (LBSM), which consists of joining the limited bedding (LB) protocol concomitantly with maternal separation (SM) for 3 hours/day, from postnatal day 2 to 15. After 60 days of life, the animals were analyzed. The following tests were performed to assess depressive/anxious behaviors: 1-Sucrose preference test; 2-Open field; 3-Labyrinth in elevated cross; 4-Light/Dark and 5-Forced Swim. Subsequently, the animals were euthanized and their brains submitted to Nissl's histological technique, associated with Cavalieri's stereological methods for volumetric analysis and planar morphometry of cortical thickness and pyramidal layers of hippocampal CA1 and CA3, and estimation of neuronal and glial densities and relationship glia/neurons in different brain regions. Image analysis was performed using Image Pro Plus software and statistical analysis (unpaired t test) using GraphPad Prism software ($p < 0.05$). In the elevated plus maze test, ELS females increased their time spent in the open arms ($p=0.011$) and in the center ($p=0.019$), reduced their time in the closed arms ($p=0.005$) and increased their number of entries into the open ($p=0.028$) and closed ($p=0.048$) arms. No other behavioral parameters were significantly affected by ELS in males or females. Regarding the cerebral morphometry of males, we observed: (1) ELS increased hippocampal volume between Bregmas 1.46 to Bregmas 2.06 ($p=0.011$), with a significant increase occurring in the most rostral portion of the hippocampus, between Bregma 1.46 to Bregma 1.70 ($p=0.001$); (2) ELS increased cerebral cortical thickness ($p=0.000006$) and hippocampal CA1 pyramidal layer thickness ($p=0.018$); and (3) ELS reduced cortical neuronal density in the infralimbic area of the medial prefrontal cortex ($p=0.016$). Analyzing the data related to the cerebral morphometry of the females, it is observed: (1) ELS caused an increase in the thickness of the pyramidal layer of the hippocampal CA1 ($p=0.000006$); (2) ELS reduced cortical neuronal density in the prelimbic ($p=0.048$) and infralimbic (0.017) areas; (3) ELS reduced neuronal density in the basolateral amygdala ($p=0.041$) and glial density in the cingulate cortex ($p=0.025$). The behavioral changes found are restricted to changes in the elevated plus maze test in females. In turn, the ELS protocol affected brain anatomy and histology differently in males and females. Our results suggest that long-term behavioral responses to ELS, in mice, related to depression and anxiety, may be more significant in females and that brain morphometric changes found in males submitted to ELS may not translate into behavioral changes analyzed by the tests performed in this dissertation, but perhaps they are related to deficits in other higher functions.

Key-words: Early life stress; Morphology; Histology.

Area according to CNPq classification: 20000006 - Biological Sciences

Sub-area according to CNPq classification: 20600003 - Morphology

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1** - Desenho esquemático mostrando as vias do estresse - Eixo HPA. (GR: receptor glicocorticoide, RM: receptor mineralocorticoide, CRH: hormônio liberador de corticotrofina, ACTH: hormônio adrenocorticotrófico)..... 14
- Figura 2** - Desenho do cérebro humano mostrando as principais regiões envolvida na resposta ao estresse: hipocampo (amarelo), amígdala (roxo) e córtex pré-frontal medial (CPFm) (azul)..... 20
- Figura 3** - Linha do tempo demonstrando o desenho experimental. 59
- Figura 4** - Exemplificação do protocolo de ELS..... 60
- Figura 5** - Esquema ilustrativo representando uma área de interesse (AOI) sobreposta sobre uma imagem histológica digitalizada, onde os traços verdes representam as linhas de inclusão e os traços vermelhos representam as linhas de exclusão. 66
- Figura 6** - Avaliação citológica de esfregaços vaginais para identificação do estágio estral das fêmeas. Fêmeas na fase metaestro. Presença de células epiteliais escamosas cornificadas (setas) e leucócitos (círculos)..... 68
- Figura 7** - Gráfico mostrando a preferência relativa à sacarose de machos e fêmeas, dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS) expostos ao estresse precoce. Teste t de *student* (Média $\pm$ DP) ($p < 0,05$). 69
- Figura 8** - Gráficos mostrando os resultados do teste de campo aberto em camundongos em machos e fêmeas, dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS) expostos ao estresse precoce. Os seguintes parâmetros foram avaliados: distância total percorrida (em metros) (A), tempo gasto na zona periférica (em segundos) (B) e o tempo gasto na zona central (em segundos) (C). Duração do teste 600 segundos. Teste t de *student* (Média $\pm$ DP) ($p < 0,05$). 70
- Figura 9** - Gráficos mostrando os resultados do teste de câmara clara/escura em camundongos machos e fêmeas, dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS) expostos ao estresse precoce. Os seguintes parâmetros foram avaliados: tempo na câmara clara (em segundos) (A), tempo na câmara escura (em segundos) (B), número de “espiadas” para a câmara clara (C), número de “espiadas” para a câmara escura (D), número de entradas na câmara clara (E) e número de entradas na câmara escura (F). Duração do teste 600 segundos. Teste t de *student* (Média $\pm$ DP) ($p < 0,05$). 72
- Figura 10** - Gráficos mostrando os resultados do teste do labirinto em cruz elevado em camundongos machos e fêmeas, dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS) expostos ao estresse precoce. Os seguintes parâmetros foram avaliados: distância total percorrida (em metros) (A), tempo nos braços abertos (em segundos) (B), tempo nos braços fechados (em segundos) (C), tempo no centro (em segundos) (D), número de entradas nos braços abertos (E) e número de entradas nos braços fechados (F). Duração do teste 600 segundos. Teste t de *student* (Média $\pm$ DP) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). 73
- Figura 11** - Gráficos mostrando os resultados do teste de nado forçado em camundongos machos e fêmeas, dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS) expostos ao estresse precoce. Os seguintes parâmetros foram avaliados: distância total percorrida (em metros) (A) e tempo imóvel (em segundos) (B). Teste t de *student* (Média $\pm$ DP) ($p < 0,05$). 74
- Figura 12** – Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce no volume hipocampal em camundongos machos e fêmeas. Imagens digitalizadas de secções coronais do cérebro coradas com Nissl mostrando o hipocampo de camundongos

machos, dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS). A figura mostra a volume hipocampal: A (V1, bregma -1.46 a -1.70), B (V2, bregma -1.70 a -1.94), C (V3, bregma -1.94 a -2.06), D (Vt, volume total, bregma -1.46 a -2.06). O desenho esquemático (E) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). Teste t de *student* (média $\pm$ DP) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). 76

Figura 13 – Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na espessura cortical, dos cornos de Ammon 1 e 3 (CA1 e CA3 respectivamente) em camundongos machos e fêmeas. Imagens digitalizadas de secções coronais do cérebro de camundongos machos e fêmeas coradas com Nissl mostrando o córtex cerebral (S1Tr – córtex somatossensorial) (A) e o hipocampo (camada piramidal do CA1) (B), dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS). O desenho esquemático (D) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). Teste t de *student* (média $\pm$ DP) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). 77

Figura 14 – Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na densidade neuronal cortical em camundongos machos e fêmeas. Imagens digitalizadas de secções coronais do cérebro de camundongos machos e fêmeas coradas com Nissl mostrando o Córtex Pré Frontal Medial (CPFm), mais especificamente o prélimbico (PrL) (B) e o infralimbico (IL) (C) dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS). Os gráficos mostram a densidade neuronal cortical, no CPFm: Córtex Cingulado (Cg1) (A), PrL (B), IL (C) e total (D). O desenho esquemático (E) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). Teste t de *student* (média $\pm$ DP). 79

Figura 15 – Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na densidade neuronal do sistema límbico em camundongos machos e fêmeas. Imagens digitalizadas de secções coronais do cérebro de camundongos machos e fêmeas coradas com Nissl mostrando a amígdala basolateral (BLA) (D) dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS). Os gráficos mostram a densidade neuronal no sistema límbico: Corno de Ammon 1 (CA1) (A), Corno de Ammon 3 (CA3) (B), Camada molecular do giro denteado (Mol-DG) (C) e amígdala basolateral (BLA) (D). O desenho esquemático (E) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). Teste t de *student*. (média $\pm$ DP) (* $p < 0,05$). 80

Figura 16 - Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na densidade glial cortical em camundongos machos e fêmeas. Imagens digitalizadas de secções coronais do cérebro de camundongos fêmeas coradas com Nissl mostrando o Córtex Pré-Frontal Medial (CPFm), mais especificamente o córtex cingulado (Cg1) (A) dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS). Os gráficos mostram a densidade glial cortical: Cg1 (A), córtex pré límbico (PrL) (B), córtex infralimbico (IL) (C) e Córtex Pré-Frontal Medial total (D). O desenho esquemático (E) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). Teste t de *student* (média $\pm$ DP) (* $p < 0,05$). 81

Figura 17 - Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na densidade glial do sistema límbico em camundongos machos e fêmeas. Os gráficos mostram a densidade de células da glia na camada molecular do giro denteado (Mol-DG) (A) e na amígdala basolateral (BLA) (B). O desenho esquemático (C) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). O número de células gliais nas camada piramidais de CA1 e CA3 classicamente é bastante reduzido, portanto não foram incluídas na figura. Teste t de *student* (Média $\pm$ DP). 82

Figura 18 - Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na relação glia/neurônio na região cortical em camundongos machos e fêmeas. Os gráficos mostram a razão de células da glia por neurônio, no Córtex Pré Frontal Medial

(CPFm): Córtex Cingulado (Cg1) (A), Córtex Pré límbico (PrL) (B), Córtex infra límbico (IL) (C) e Córtex Pré Frontal Medial total (D). O desenho esquemático (E) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). Teste t de *student* (média $\pm$ DP)..... 83

Figura 19 – Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na relação glia/neurônio do sistema límbico em camundongos machos e fêmeas. Os gráficos mostram a razão de células da glia por neurônio, na camada molecular do giro denteado (Mol-DG) (A) e na amígdala basolateral (BLA) (B). O desenho esquemático (E) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). O número de células gliais nas camada piramidais dos Cornos de Ammon 1 e 3 (CA1 e CA3 respectivamente) classicamente é bastante reduzido portanto a relação glia/neurônio nessas regiões não foi calculada. Teste t de *student* (média $\pm$ DP). 84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOI	Área de Interesse (<i>do inglês</i>) <i>Area of Interest</i>
APA	Associação Psiquiátrica Americana
AR	Avaliação de risco
AVP	Vasopressina Arginina
BLA	Amígdala Basolateral
CA1	Corno de Ammon 1
CA3	Corno de Ammon 3
CeA	Amígdala central
CeMBE	Centro de Modelos Biológicos Experimentais
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
Cg1	Córtex Cingulado
CPF	Córtex pré-fronol
CPFm	Córtex pré-frontal medial
CRH	Hormônio Liberador da Corticotrofina
CS	Estímulo condicionado
CTL	Controle
DPN	Dia pós-natal
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
ELS	Estresse precoce (<i>do inglês</i>) <i>Early Life Stress</i>
EPM	Labirinto em cruz elevado (<i>do inglês</i>) <i>elevated plus maze</i>
FS	Nado forçado (<i>do inglês</i>) <i>forced swim</i>
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HPG	Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal
Iba1	Molécula Adaptadora de Ligação de Cálcio Ionizado 1
IL	Córtex Infralímbico
LabCEMM	Laboratório Central de Microscopia e Microanálise
LB	<i>Limited Bedding</i>
LBSM	<i>Limited bedding</i> concomitantemente com a separação materna
LD	Claro/escuro (<i>do inglês</i>) <i>light/dark</i>

MEC	Matriz extracelular
Mol-DG	Camada Molecular do Giro Denteado
NCS	Pesquisa Nacional de Comorbidade
OF	Campo aberto (<i>do inglês</i>) <i>open field</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFA	Paraformaldeído
PNN	Perineuronal
PrL	Córtex Pré-límbico
RG	Receptor Glicocorticoide
RM	Receptor Mineralocorticóide
SNC	Sistema Nervoso Central
SM	Separação Materna
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TEPT	Transtorno de Estresse Pós-Traumático
TF	Tampão Fosfato

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
1 ESTRESSE.....	10
1.1 Estresse precoce: os períodos de sensibilidade do desenvolvimento	11
1.2 O sistema de resposta ao estresse – Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal	12
2 MODELOS DE ESTRESSE PRECOCE EM ROEDORES	14
3 DEPRESSÃO E ANSIEDADE.....	16
4 ESTRESSE E NEUROINFLAMAÇÃO	17
5 DIFERENÇAS DE SEXO NOS EFEITOS DA ELS	19
6 ESTRUTURAS ANATÔMICAS E SUAS ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS INDUZIDAS PELO ESTRESSE.....	19
6.1 Hipocampo.....	20
6.2 Córtex pré-frontal.....	21
6.3 Amígdala.....	22
ESTUDO 1.....	23
1 JUSTIFICATIVA.....	23
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 METODOLOGIA	25
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	26
APÊNDICE A – MANUSCRIPT	27
ESTUDO 2.....	55
1 JUSTIFICATIVA.....	55
2 OBJETIVOS.....	56
2.1 OBJETIVO GERAL	56
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO	57
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	57
3.3 ANIMAIS	57
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	58
3.5 PROTOCOLO DE ESTRESSE PRECOCE (ELS)	60

3.6	TESTES COMPORTAMENTAIS	61
3.6.1	Teste de preferência a sacarose	61
3.6.2	Teste de campo aberto (OF)	61
3.6.3	Teste claro/escuro (LD)	62
3.6.4	Labirinto em cruz elevado (EPM).....	62
3.6.5	Teste de nado forçado (FS)	62
3.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA	63
3.7.1	Determinação do ciclo estral das fêmeas	63
3.7.2	Eutanásia, fixação e seccionamento	63
3.7.3	Coloração de Nissl	64
3.7.4	Medida de volume hipocampal e espessura de camadas hipocampais e corticais	64
3.7.5	Estimativa de densidade neuronal e glial com coloração de Nissl	65
4.7	DESCARTE DOS ANIMAIS.....	66
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
5	RESULTADOS.....	68
5.1	ANÁLISE COMPORTAMENTAL	68
5.1.1	Avaliação citológica dos esfregaços vaginais.....	68
5.1.2	Comportamento anedônico.....	68
5.1.3	Comportamento exploratório.....	69
5.1.4	Avaliação de risco	71
5.1.5	Grau de conformismo.....	74
5.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA	74
5.2.1	Alterações morfológicas	74
5.2.2	Densidade neuronal e glial	78
6	DISCUSSÃO	85
	CONCLUSÃO.....	92
	PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS CIENTÍFICOS DURANTE O MESTRADO.....	94
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA.....	115
	ANEXO B – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS CIENTÍFICOS DURANTE O MESTRADO	116
	ANEXO C – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS CIENTÍFICOS DURANTE O MESTRADO	117

Esta dissertação de mestrado é composta por dois estudos que visam aprimorar o conhecimento em relação ao impacto da exposição ao estresse no início da vida sobre o comportamento da prole, assim como alterações neurobiológicas associadas. O primeiro estudo realizado foi uma revisão a respeito das alterações morfofisiológicas no cérebro, causadas pela exposição ao estresse no início da vida. Portanto, revisamos o impacto duradouro que o estresse precoce tem nas estruturas e células cerebrais, organizando os dados disponíveis de pesquisas com animais publicadas na última década. O segundo estudo se propôs a investigar o efeito da exposição da combinação de dois modelos clássicos de estresse no início da vida, identificando alterações comportamentais e morfofisiológicas em regiões do cérebro envolvidas nos comportamentos do tipo depressivo e ansioso em camundongos machos e fêmeas.

INTRODUÇÃO

1 ESTRESSE

O estresse é caracterizado como uma ameaça à homeostase geral do organismo, o qual, com objetivo de restabelecer esta homeostase, responde com um grande número de alterações fisiológicas consideradas adaptativas (1). Essa resposta ao estresse é definida como uma experiência emocional que envolve mudanças fisiológicas, cognitivas e comportamentais na adaptação a estímulos intrínsecos e extrínsecos (2). Quando um indivíduo é exposto ao estresse agudo, seja físico ou psicológico, uma cascata de processos biológicos é desencadeado e irá modular precisamente uma resposta adaptativa de acordo com a demanda. Tal resposta fornece ao corpo e ao encéfalo os recursos necessários para responder àquele estímulo de maneira adequada. Assim, sinapses são ativadas de forma a aumentar a atenção, o alerta, a frequência cardíaca, a pressão arterial, a frequência e amplitude ventilatória e as vias catabólicas. Uma vez que o evento estressor cesse, o mesmo ocorre com as respostas fisiológicas por ele desencadeadas. Se o organismo é incapaz de cessar a resposta ao estresse ao final da exposição ao mesmo, ou ainda, se o organismo for exposto ao estresse crônico, os mecanismos adaptativos que respondem a este estresse podem resultar em condições patológicas, contribuindo para perda neuronal em regiões chave como o hipocampo e a amígdala (3–5).

A chamada doença relacionada ao estresse tem sido bastante estudada nas últimas duas décadas. Evidências crescentes têm indicado um aumento do risco de desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos e físicos como resultado do estresse. Foi visto que o estresse é um fator de risco comum de 75% a 90% das doenças, incluindo doenças com alta taxa de morbidade e mortalidade, como doenças cardiovasculares (como hipertensão e aterosclerose), doenças metabólicas (como diabetes e doença hepática gordurosa não alcoólica), distúrbios psicóticos e neurodegenerativos (como depressão, Alzheimer e Parkinson) e câncer (6,7).

Atualmente, os distúrbios psiquiátricos são um dos maiores problemas de saúde pública. Este ainda é um assunto muito delicado, mas necessário, pois, são bem mais comuns do que se imagina. No mundo, estima-se que 970 milhões de pessoas sofram de distúrbios psiquiátricos (8). O número de pessoas com transtornos comuns, como a depressão e o transtorno de ansiedade cresce consideravelmente, especialmente em países de baixa renda. Situação de vulnerabilidade, como crises humanitárias entre outras adversidades, são fatores de risco para a população de tais países. Posteriormente, fatores como pobreza, abuso e negligência infantil

surgiram como fatores de risco principais para o início e persistência de distúrbios psiquiátricos (8,9).

1.1 Estresse precoce: os períodos de sensibilidade do desenvolvimento

Evidências demonstram que a exposição precoce a eventos estressores possui impacto negativo na saúde mental, aumentando o risco de desenvolvimento precoce e gravidade de distúrbios psiquiátricos (4,8,10-15). A Pesquisa Nacional de Comorbidade (NCS) destacou que a exposição ao estresse na primeira infância está associada à uma maior probabilidade de desfechos negativos ao longo do desenvolvimento. Foi sugerido que ambientes adversos precoces contribuem para até 45% dos distúrbios psiquiátricos de início na infância e mais de 30% de início na idade adulta (16,17).

Indivíduos com distúrbios psiquiátricos frequentemente possuem histórico de experiências traumáticas na infância onde o tipo de abuso varia desde abuso emocional e físico, até a negligência (18,19). Esses eventos estressores, quando excedem os recursos de enfrentamento da criança, e levam a exposições prolongadas ao estresse, é conhecido na literatura como *Early Life Stress* (ELS), e ocorrem em períodos do desenvolvimento em que o cérebro está mais suscetível as alterações ambientais (20). Os ELS comumente estudados abrangem abuso físico, sexual, emocional e verbal, negligência, privação social, desastres e disfunções domésticas incluindo testemunho de violência, atividade criminosa, separação dos pais, morte ou doença dos pais, pobreza e abuso de substâncias (21). Dados clínicos mostraram que o ELS está relacionado ao início precoce de distúrbios como depressão, ansiedade, transtornos de personalidade e abuso de substâncias durante o final da infância e adolescência (16,22,23).

Além disso, crianças maltratadas, geralmente, estão expostas a mais de um tipo de abuso simultaneamente. Entretanto, os tipos e a frequência que esses abusos ocorrem não são os únicos fatores que devem ser levados em consideração, mas também a duração e a idade em que a criança foi exposta a essa adversidade (24,25). Muitos dos desfechos associados ao ELS podem se dar de forma adaptativa no ambiente adverso imediato, porém, ao longo do curso da vida eles podem se tornar prejudiciais e não adaptativos (26). O nosso organismo, normalmente, se adapta bem a eventos estressores – estresse agudo – mas, quando esse estresse é persistente ou muito intenso – crônico – essa resposta, inicialmente adaptativa, torna-se uma carga alostática e, com isso, surgem psicopatologias induzidas pelo estresse (27).

Tem sido amplamente demonstrado na literatura da psicologia do desenvolvimento que os primeiros anos de vida do indivíduo são considerados um período de rápidas mudanças, estabelecendo assim, a base para grande parte do desenvolvimento físico, emocional e cognitivo do indivíduo (26). Esses diferentes momentos do desenvolvimento do indivíduo, durante a infância, são conhecidos como períodos de sensibilidade do desenvolvimento nos quais o sistema nervoso central (SNC) está mais suscetível aos estímulos ambientais e são associados ao desenvolvimento sinaptogênico e eventos maturacionais do cérebro. O cérebro é um órgão homeostático cujo desenvolvimento está associado à uma regulação fina na expressão de moléculas como hormônios, neurotransmissores e neurotrofinas. Perturbações neste delicado balanço levam a uma maior vulnerabilidade ao estresse, consequentemente aumentando o risco de desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos. Evidências diretas mostram que a exposição a eventos adversos durante esses períodos de sensibilidade do desenvolvimento pode resultar em uma reatividade exagerada ao estresse, causando alterações em vários circuitos neurais que irão persistir na idade adulta (28).

Em resposta a novos eventos, os circuitos neurais mudam constantemente para se adaptarem às novas exigências ambientais, um processo conhecido como neuroplasticidade. Ao longo da vida do indivíduo, seu cérebro se adapta a experiências específicas, modificando circuitos neurais, através de remodelação dendrítica e sináptica, mobilizando recursos para aumentar suas chances de sobrevivência (29). A neuroplasticidade, essa considerável capacidade de induzir mudanças estruturais e funcionais é altamente sensível ao estresse, sendo regulada negativamente quando há estressores agudos e crônicos atuando sobre a mesma (29,30). Assim, a exposição exacerbada a estressores crônicos, podem afetar o desenvolvimento do cérebro e, consequentemente, a saúde mental do indivíduo (31–36). Quando o ELS ocorre durante um período de sensibilidade do desenvolvimento, ele pode interferir na plasticidade induzida por experiência normal e, como consequência, afetar a programação de funções cerebrais específicas (37,38).

1.2 O sistema de resposta ao estresse – Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

O sistema fisiológico envolvido na resposta ao estresse, seja o estresse precoce ou na idade adulta, é o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (eixo HPA), também conhecido como eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal. Diante de um evento estressor, o eixo HPA é ativado e mobiliza os recursos metabólicos necessários para responder a tais eventos e retomar a homeostase do organismo. Quando o cérebro detecta uma ameaça, uma resposta fisiológica coordenada

envolvendo componentes do sistema autônomo, neuroendócrino, metabólico e imunológico é ativada. Neurônios da região parvocelular medial do núcleo paraventricular do hipotálamo liberam o hormônio liberador da corticotrofina (CRH) e vasopressina arginina (AVP), desencadeando a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula pituitária. Esse ACTH circulante irá atuar no córtex adrenal para sintetizar e liberar glicocorticoides, cortisol (no caso dos humanos) ou corticosterona (no caso dos roedores), que por sua vez atuam em todo o corpo para orquestrar uma resposta fisiológica ao estressor (26). Além disso, a medula adrenal libera catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina).

Em situações normais, nosso organismo é exposto a níveis de CRH e cortisol basais, os quais possuem papel importante na regulação diária do nosso organismo assim como para o desenvolvimento e as funções saudáveis do cérebro (39). Exposições repetidas a níveis elevados tanto de cortisol quanto de CRH, ou a elevação crônica desses níveis acaba resultando em efeitos prejudiciais para o organismo. Por exemplo, níveis elevados de exposição ao cortisol por períodos de 48 a 72 horas podem promover a formação de radicais livres que são tóxicos para os próprios neurônios (40).

Após a ativação do sistema, e uma vez que o estressor percebido tenha diminuído, ciclos de feedback são acionados em vários níveis do sistema (isto é, da glândula adrenal ao hipotálamo e outras regiões do cérebro, como o hipocampo e o córtex frontal) para desligar o eixo HPA e retornar a um ponto homeostático definido. Em contraste, a amígdala, que está envolvida no processamento do medo, ativa o eixo HPA a fim de colocar em movimento a resposta ao estresse necessária para lidar com o desafio (Figura 1). Além desses, há outros sistemas e fatores que respondem ao estresse, incluindo o sistema nervoso autônomo, as citocinas inflamatórias e os hormônios metabólicos. Todos esses são afetados pela atividade do eixo HPA e, por sua vez, afetando sua função, estando implicados nas mudanças fisiopatológicas que ocorrem em resposta ao estresse crônico, desde as primeiras experiências até a vida adulta (33,41). Estudos demonstraram que os glicocorticoides regulam os neurônios secretores de CRH hipotalâmicos, neurônios piramidais do hipocampo, neurônios corticais pré-frontais e neurônios amigdaloides basolaterais (41).

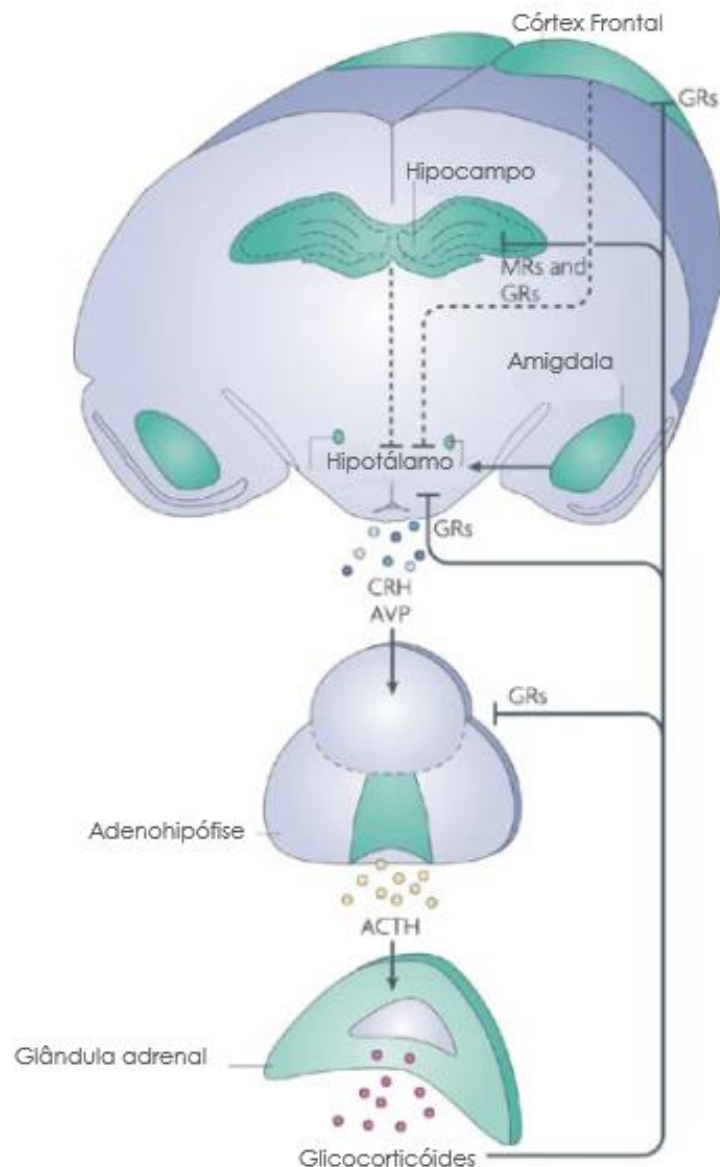


Figura 1 - Desenho esquemático mostrando as vias do estresse - Eixo HPA. (GR: receptor glicocorticoide, RM: receptor mineralocorticoide, CRH: hormônio liberador de corticotrofina, ACTH: hormônio adrenocorticotrófico, AVP: vasopressina arginina).

Fonte: Adaptado de Lupien *et al.*, (2009) (33).

2 MODELOS DE ESTRESSE PRECOCE EM ROEDORES

Apesar da relação entre ELS e o desenvolvimento de psicopatologias ao longo da vida já esteja bem caracterizada em humanos, os mecanismos associados a estes prejuízos comportamentais não estão completamente elucidados. Por este motivo, estudos com modelos animais são utilizados para investigar as alterações biológicas decorrentes da exposição ao estresse na fase inicial do desenvolvimento (42).

Em função da facilidade de manipulação e controle ambiental, modelos utilizando roedores acabam se destacando. Somando ao fato da similaridade genética entre roedores e

humanos, o que facilita a translação dos achados (43). A pesquisa em animais experimentais tem a vantagem adicional em relação ao trabalho em humanos de permitir o acesso ao tecido cerebral em qualquer ponto durante e após o ELS, permitindo a caracterização precisa de suas consequências celulares no SNC. O modelo animal mais utilizado para investigar as relações entre ELS e suas consequências psiquiátricas e físicas é a separação materna repetida (44). O estudo dos efeitos da interrupção do relacionamento mãe-bebê utilizam roedores visando replicar adversidades como negligência materna, abuso materno, separações repetidas e privação de cuidados maternos (45–47), as quais os bebês humanos podem estar sujeitos no início de suas vidas. A exposição a tais eventos, em momentos nos quais o organismo não está plenamente apto para responder, resultam em alterações imediatas e / ou de longo prazo do eixo HPA e demais sistemas envolvidos na resposta ao estresse (47-49). Especificamente, alterações no padrão de interações normais mãe-filhote estão relacionadas a desregulação neurobiológica, fisiológica e do comportamento emocional em animais adultos como resultado da desprogramação do eixo HPA (50,51).

O contato próximo e o apego do filhote com a mãe é extremamente importante para o neurodesenvolvimento saudável, fornecendo quase todos os requisitos básicos para a sobrevivência e o crescimento (52,53). Alterações nesse relacionamento no início da vida levam a uma reação significativa de protesto e desespero nos filhotes, induzindo a ativação de um cascata de eventos centrais e periféricos, resultando na exposição repetida aos mediadores de estresse, como glicocorticoides e catecolaminas (50,51,54). Consequentemente, essas alterações fisiológicas e hormonais aumentam o risco de desenvolvimento de comportamentos do tipo depressivo e ansioso (4,55–57).

Dentre os modelos animais utilizados no estudo dos efeitos da exposição ao ELS e que visam mimetizar os abusos da infância humana, como privação social e negligência, a separação materna (SM) é o mais utilizado (58). O modelo de SM consiste na separação dos filhotes de suas mães por um período de tempo significativo (por exemplo, 3h/dia) durante as primeiras duas semanas de vida pós-natal (46,49,59–61). Os períodos de separação ativam o eixo HPA dos filhotes, o que é evidenciado pelo aumento dos níveis plasmáticos de hormônio adrenocorticotrófico e glicocorticoides além de reduzir a ligação de CRH na hipófise (62,63).

Nas últimas décadas, surgiu um novo procedimento que tem por objetivo interromper o cuidado materno além da experiência normal, induzido pela limitação do acesso a maravalha (material de cama), criando um ambiente empobrecido, visando mimetizar a pobreza, o qual impede que a mãe construa um ninho satisfatório. Esse modelo de ELS é conhecido como

Limited Bedding (LB) ou “cama limitada” (64,65). Esse ambiente empobrecido aumenta os níveis de corticosterona basal na própria mãe (66). Essas condições estressantes alteram o padrão e a qualidade do cuidado materno, resultando em comportamentos de cuidado fragmentados e reduzidos. Os padrões alterados de cuidado materno induzem estresse nos filhotes evidenciado pelo aumento das concentrações plasmáticas de glicocorticóides e pela presença de glândulas supra-renais hipertrofiadas no final deste período de estresse (64,67). As consequências desta forma de ELS são profundas, incluindo uma perda progressiva da função cognitiva e desarranjos robustos das funções emocionais mais tarde na vida em estudos com camundongos e ratos.

Ambos os procedimentos contínuos e intermitentes foram desenvolvidos para produzir experimentalmente cuidados maternos fragmentados, imprevisíveis ou adversos, em um esforço para imitar a qualidade do cuidado que muitas vezes caracteriza mães humanas deprimidas, severamente estressadas ou que abusam de drogas.

3 DEPRESSÃO E ANSIEDADE

Durante o estresse ocorrem respostas fisiológicas adaptativas, onde uma disfunção contínua do sistema do estresse, caracterizada pela hiper ou hipoatividade do eixo HPA, tem um papel em várias doenças, incluindo uma gama do espectro depressivo (68). Considerada um dos distúrbios psiquiátricos mais incapacitantes, a depressão tem um alto índice de prevalência. A depressão é a causa de comorbidade psiquiátrica mais comum em adultos em todo o mundo. Dados de 2019 da Organização Mundial da Saúde (OMS), mostraram que o Brasil é o segundo país com maior número de depressivos das Américas, ficando atrás somente dos Estados Unidos (8). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) da Associação Psiquiátrica Americana (APA), as chances de desenvolver algum transtorno depressivo durante a vida é de 12 a 15% para homens e de 10 a 25% para mulheres (69).

A depressão clínica, também conhecida como transtorno depressivo maior (TDM), é caracterizada por um estado mental onde o indivíduo perde o prazer e/ou interesse em quase todas as atividades. A depressão deve ser vista como uma síndrome heterogênea composta por vários sintomas de causas distintas (70,71), como: humor deprimido, vazio ou irritável, perda de interesse ou de prazer, energia reduzida, tendência maior ao cansaço e uma atividade reduzida. Além disso, o quadro de depressão é, geralmente, acompanhado de alterações orgânicas como transtornos de sono, de apetite, da função sexual, da perda ou do ganho de peso e de alterações cognitivas que afetam significativamente a capacidade de funcionamento do

indivíduo (69,72). A depressão representa uma importante consequência psicossocial, sendo também associada ao aumento da incidência de doenças cardíacas, diabetes, hipertensão e de alterações no colesterol (73–76).

O transtorno de ansiedade, por sua vez, é um distúrbio psicológico com sintomas semelhantes vistos em pacientes com depressão, a qual é caracterizada por momentos de medo e ansiedade excessivos e perturbações comportamentais relacionados. Onde o medo é a resposta emocional a ameaça iminente real ou percebida, enquanto a ansiedade é a antecipação de ameaça futura de eventos negativos (69). Ela pode ocorrer de maneira adaptativa ou como transtorno psicológico, e a gravidade dessa doença e o tempo de permanência desse estado determinam a diferença entre essas ocorrências (77). A sobreposição de sintomas associados à depressão e à ansiedade dificulta o diagnóstico, a pesquisa e o tratamento. Os transtornos de depressão e ansiedade que se desenvolvem na infância tendem a persistir na idade adulta, se não tratados, podendo ser sentidos como grandes alterações patológicas que afetam progressivamente a estrutura do cérebro, através da desregulação hormonal e, eventualmente, afetando a saúde mental (33,78,79).

Um estudo sobre a relação entre estresse, eixo HPA e depressão, mostrou que as alterações desse eixo dependem de uma série de fatores: a gravidade e o tipo de depressão, o genótipo, história de trauma na infância, temperamento e, provavelmente, resiliência (80). O ELS é considerado um sério problema de saúde pública, pois foi visto que crianças que vivenciaram eventos adversos na infância possuem maiores chances de desenvolver depressão na adolescência e na idade adulta. Cerca de um quarto a um terço das crianças nessa situação estarão mais vulneráveis a desenvolver depressão até os 20 anos de idade (81). A prevalência é em indivíduos do sexo feminino, com uma proporção de 2:1 em comparação ao sexo masculino (69).

4 ESTRESSE E NEUROINFLAMAÇÃO

Alterações na estrutura e função do cérebro, como uma resposta prejudicada do eixo HPA ao estresse e um estado inflamatório anormal, são frequentemente relatados em pacientes que vivenciaram adversidade no início da vida (20,82–84), especialmente em regiões sensíveis, como o córtex pré-frontal, a amígdala e o hipocampo (85–92). A desregulação do sistema imunológico, incluindo inflamação, disfunção mitocondrial e desequilíbrio oxidante-antioxidante, é considerada fator de risco para o surgimento de transtornos psiquiátricos, incluindo ansiedade, depressão e dependência de drogas (93–96).

Tem sido reconhecido que a via inflamatória atua como uma base molecular fundamental na origem e no desenvolvimento de muitas doenças crônicas. Estudos tem demonstrado de maneira crescente, que a inflamação excessiva desempenha um papel crítico no início e/ou na progressão de doenças relacionadas ao estresse. Diversos estudos suportam que doenças multifatoriais, incluindo doenças cardiovasculares e metabólicas, distúrbios neurodegenerativos psicóticos e câncer, apresentam em comum um estado inflamatório (7,99).

Dados de modelos animais demonstram um importante papel da inflamação no desenvolvimento e manutenção dos sintomas depressivos, de ansiedade, mania, entre outros (100–104). Sabe-se que a desregulação imunológica e decorrente perfil inflamatório sistêmico, mais especificamente a *low-grade inflammation*, está associada ao desenvolvimento de transtornos de humor (97,98). Por sua vez, as citocinas inflamatórias circulantes atravessam a barreira hematoencefálica, podendo afetar células do sistema nervoso como neurônios, astrócitos e micróglia, as quais são ativadas (94,105).

A micróglia possui papel fundamental devido a sua capacidade macrofágica de defesa no SNC. Elas são consideradas as células imunes residentes do SNC, respondendo as mais diversas alterações fisiológicas que ocorram no encéfalo. Uma vez ativadas, respondem às alterações do ambiente cerebral por meio de alterações em sua morfologia e função (106,107). Apesar da micróglia ser descrita como um regulador imunológico, foi visto também que ela pode impactar os processos cognitivos, como aprendizagem e memória (108,109).

A ativação microglial tem sido observada em doenças neurodegenerativas, bem como no envelhecimento natural e, recentemente, descobriu-se um aumento na densidade microglial em amostras cerebrais *post mortem* de indivíduos que sofriam de TDM, evidenciado por aumentos nos níveis de Iba-1 (molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1) (110,111). As micróglia regulam a função neuronal durante um desafio inflamatório (106). Em função disso, a micróglia surgiu como um possível fator mediador das mudanças relatadas após a exposição ao estresse, com o intuito de conectar o estado neuroinflamatório alterado, que é observado após adversidades no início da vida, com o desenvolvimento de deficiências cognitivas e comportamentais (112–119). Experimentos em modelos animais conseguiram estabelecer uma ligação causal entre mediadores inflamatórios e sintomas semelhantes aos da depressão (112–115,120), onde foi demonstrada a ativação de células micróglia em resposta a eventos estressores crônicos e, tais alterações foram associadas ao comportamento depressivo nestes animais (121).

5 DIFERENÇAS DE SEXO NOS EFEITOS DA ELS

Homens e mulheres podem responder de forma diferente a esses desafios ambientais e imunológicos (122). Estudos mostraram que os homens tendem a ter respostas neuroinflamatórias mais pronunciadas após um desafio imunológico quando comparados às mulheres (123).

Dados clínicos mostraram o impacto de longo prazo do ELS na saúde mental em um número desproporcionalmente grande de mulheres (124). Foi visto que a regulação do eixo HPA é mais profundamente alterada em mulheres após ELS do que em homens, entretanto, os mecanismos subjacentes para essa diferença ainda não são totalmente compreendidos (125).

O controle do nível de cortisol após um estressor é devido ao feedback através do receptor glicocorticoide (RG) e do receptor mineralocorticóide (RM) no hipocampo e, aparentemente, esse feedback é prejudicado nas mulheres. O estresse para machos e fêmeas antes do acasalamento, estresse para a fêmea prenhe e o estresse para o animal recém-nascido/desmamado, produzem efeitos específicos ao sexo nas futuras respostas ao estresse, neuroquímica e comportamental (41). A literatura animal tem muitos exemplos de diferenças entre os sexos na resposta a um determinado estressor e o assunto foi recentemente revisado (126). Por exemplo, para ratos machos, aglomeração é mais estressante do que alojamento de isolamento, enquanto para fêmeas, o isolamento é mais estressante (127,128). Além disso, existem diferenças de sexo nos efeitos da ELS, com cada gênero respondendo de maneiras diferentes, dependendo das idades em que os estressores iniciais ocorreram.

6 ESTRUTURAS ANATÔMICAS E SUAS ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS INDUZIDAS PELO ESTRESSE

O papel do encéfalo nas respostas ao estresse está relacionado a determinar o que é ou não uma ameaça aos organismos, além de regular as respostas fisiológicas, comportamentais, cognitivas e emocionais ao mesmo, modulando sua plasticidade, de forma adaptativa ou não, frente aos eventos estressores (129).

Durante a infância e a adolescência, áreas e circuitos cerebrais que estão associados ao controle da emoção e da memória emocional, como a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal medial (CPFm), passam por processos de reestruturação e maturação (27). Essas regiões são bastante reativas ao estresse e na emocionalidade, sofrendo mudanças profundas em sua estrutura e função em resposta ao estresse (130).

As respostas emocionais são processadas através da interface de regiões do sistema límbico com outras regiões cerebrais. Hipocampo e amígdala irão interagir na codificação de memórias emocionais, como medo e raiva. Por sua vez, o córtex pré-frontal (CPF) está relacionado ao controle de estruturas subcorticais regulando respostas comportamentais de forma a que estas sejam adequadas (131). Juntos, hipocampo, amígdala e CPF compõem as regiões cerebrais envolvida no reestabelecimento da homeostase do organismo uma vez que eventos estressores cheguem ao seu fim (129) (Figura 2).

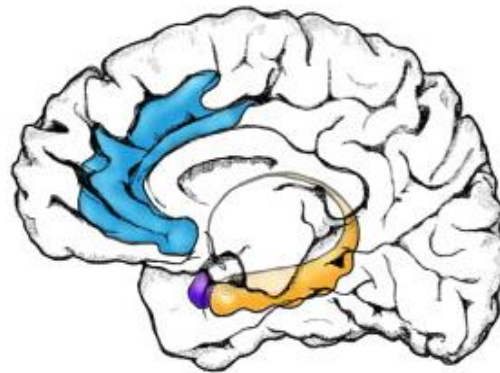


Figura 2 - Desenho do cérebro humano mostrando as principais regiões envolvida na resposta ao estresse: hipocampo (amarelo), amígdala (roxo) e córtex pré-frontal medial (CPFm) (azul).

Fonte: Godsil *et al.*, (2013) (132).

A literatura demonstra que a exposição ao ELS resulta em redução do volume cerebral. Regiões como o córtex pré-frontal, parietal e temporal, assim como estruturas subcorticais, além da massa cinzenta como um todo, apresentaram volumes reduzidos em crianças e bebês de baixo nível socioeconômico quando comparadas a seus pares de alto nível socioeconômico (133–135). Estudos avaliando indivíduos que sofreram maus-tratos na infância reportam volume reduzido no córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo quando comparados a indivíduos não maltratados (136–141). Esse efeito é presente somente na infância, uma vez que na idade adulta jovem um maior risco socioeconômico está associado a um maior volume da amígdala, um efeito que também é observado de acordo com a idade da adoção em indivíduos pós-institucionalizados (142,143).

6.1 Hipocampo

O hipocampo está relacionado a diversas sub-regiões encefálicas, estando envolvido em diferentes funções. O hipocampo é uma estrutura medial-temporal que possui alta plasticidade.

Sua principal função está relacionada com a formação, consolidação e processamento de memórias emocionais (144). Seu desenvolvimento e maturação é bastante heterogêneo ao longo do desenvolvimento. Em indivíduos saudáveis, além de se comunicar com o eixo HPA, a porção anterior do hipocampo se projeta para a amígdala e CPF, estando associado a comportamentos relacionados a ansiedade, memória associativa e processamento emocional. As regiões posteriores, por sua vez, mais especificamente a região CA3, estão envolvidas com processos de aprendizagem espacial e de memória contextual (145).

Receptores para glicocorticoides são encontrados em grande quantidade no hipocampo e possuem papel na modulação da liberação desses hormônios através dos efeitos inibidores sobre o eixo HPA (146–148). Dessa maneira, essa estrutura é indispensável para a integração cognitiva, neuro-hormonal e neuroquímica em resposta ao estresse (149). O estresse resulta no aumento do nível de glicocorticoides na circulação, que resulta na intensa exposição do hipocampo a esses hormônios (150,151).

Alterações morfológicas frente a diferentes tipos de estressores foram observadas nas células do hipocampo. Em um modelo experimental de exposição a um predador foi observado diminuições na complexidade dendrítica, no comprimento dos dendritos, no número de ramificações e na densidade de espinhos dendríticos nos neurônios de CA1, CA3 e giro denteado do hipocampo (152). Estudos em humanos corroboram os achados experimentais nos aspectos relacionados à redução morfológica hipocampal causada pelo estresse. Foi demonstrado que pacientes com doenças relacionadas ao estresse, como depressão, apresentam redução no volume do hipocampo (152–156).

6.2 Córtex pré-frontal

O córtex pré-frontal (CPF), assim como o córtex frontal de forma geral, é a região cerebral a amadurecer mais tardiamente, por volta dos 25 anos em humanos (157). Por este fato, o CPF, que orchestra a integração da cognição, emoção e ação por meio de suas redes corticais e subcorticais, foi considerada como uma região do cérebro muito sensível aos efeitos prejudiciais da exposição a adversidades pós-natais (158). Além de ser intimamente relacionado com funções cognitivas e alterações comportamentais, ele também está relacionado a comportamentos ansiosos, modulando diversas psicopatologias associadas ao estresse (33,158).

Apesar de limitados, dados da literatura demonstram que a exposição ao ELS afeta a plasticidade estrutural dessa região cerebral de forma multidirecional, afetando especificamente densidades sinápticas, comprimentos dendríticos e ramificações (159–167). Estudos anteriores

demonstraram que roedores expostos ao modelo de SM mostraram níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias do Córtex pré-frontal (CPF) e uma diminuição do desempenho em uma tarefa cognitiva dependente do CPF (168,176).

6.3 Amígdala

Uma das principais regiões que constituem o sistema límbico é a amígdala. Essa região apresenta fundamental importância na memória emocional (169,170). A amígdala é o centro de processamento do medo e ela está intimamente associado à patogênese do ataque de pânico e ao sistema de resposta ao estresse. Estudos comprovam que a amígdala está associada ao circuito neural do estresse e também está envolvida na codificação e recuperação das memórias de medo condicionado, bem como na modulação dos comportamentos de ansiedade (171–175). Estudos neuroanatômicos funcionais sugeriram que a amígdala funciona como um centro de integração de sinais de entrada do sistema imunológico periférico (177). As citocinas periféricas são conhecidas por alterar a atividade da amígdala e aumentar os comportamentos semelhantes à ansiedade.

Estudos morfométricos em humanos com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), apresentaram resultados distintos em relação ao volume da amígdala. Foram encontrados aumento (178), diminuição (179,180) ou nenhuma alteração (181–184). Veer e colaboradores (185) constataram uma diminuição apenas no volume da amígdala direita de pacientes com TEPT. Em veteranos de guerra, um estudo sugeriu que essa redução do volume da amígdala direita estaria relacionada aos sintomas de ansiedade e excitação nesses indivíduos (186).

Ainda não existe consenso sobre as alterações relacionadas ao estresse observadas na amígdala, devido à heterogeneidade dos resultados obtidos nos estudos. O que parece evidente é que cada núcleo amigdalóide possui funções específicas no circuito neural do estresse devido às suas distintas alterações (152).

ESTUDO 1

1 JUSTIFICATIVA

O ELS é um fator predisponente robusto para o surgimento de doenças mentais e várias condições de saúde durante a vida adulta. Mesmo curtos períodos de estresse no período perinatal podem causar efeitos deletérios permanentes ao longo da vida. Considerando o grande número de crianças crescendo em condições adversas em todo o mundo, é crucial entender o impacto do estresse no início da vida no desenvolvimento do cérebro.

Nesse campo de pesquisa, modelos animais ajudaram a esclarecer as relações causais entre ELS e fenótipos atípicos, elucidando as alterações na estrutura e função cerebral após a exposição a diferentes tipos de adversidades impostas durante os períodos iniciais críticos da vida. Foi demonstrado que roedores expostos a estresse pré-natal ou negligência materna pós-natal exibem respostas neuroendócrinas aprimoradas ao estresse, aumento da ansiedade e comportamentos do tipo depressivo e deficiências cognitivas e neuroanatômicas.

A fim de desenvolver estratégias terapêuticas e intervenções para melhorar a resiliência a tais distúrbios na vida adulta, é necessária pesquisa básica para investigar as conexões entre as experiências de um organismo em desenvolvimento e seus resultados posteriores ao longo de sua vida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar, através da realização de uma revisão bibliográfica de estudos com murinos e humanos, as alterações morfofisiológicas no cérebro causadas pela exposição ao estresse no início da vida e, posteriormente, a produção de um artigo científico de revisão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Levantar novos dados, informações e resultados relacionados ao impacto duradouro que o estresse precoce tem nas estruturas e células cerebrais.
- b) Utilizar estes materiais na confecção de um artigo de revisão, organizando os dados disponíveis de pesquisas com animais publicadas na última década.

3 METODOLOGIA

Realizamos esta revisão descritiva destacando o impacto do ELS nas estruturas e células cerebrais, organizando os dados disponíveis da última década a partir de pesquisas publicadas nas principais bases de dados científicas (PubMed, Scopus, Web Of Science e Science Direct). Os artigos foram incluídos com base em sua relevância para o assunto em análise e data de publicação de 2012 até o presente.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico intitulado “**Early life stress and its effects in rodents and humans brain morphology – A review**”, submetido ao periódico “**Developmental Psychobiology**”, FI: 3.038, em 10 de março de 2023 (Apêndice A).

Developmental Psychobiology

[JOURNAL HOME](#) [AUTHOR GUIDELINES](#) [EDITORIAL CONTACT](#)

Powered by [Atypoz ReX](#)

Submission Overview

Initial Submission This manuscript has been submitted to the editorial office for review. Changes cannot be made during editorial review, but you can view the information and files you submitted, below.

Article Type	Review Article		
Title	Early life stress and its effects in rodents and humans brain morphology - A review		
Manuscript Files	Name	Type of File	Size
	Manuscript - Early life stress and its effects in rodents and humans brain morphology - A review.docx	Main Document - MS Word	107.9 KB
	Figures 1, 2 and 3.pptx	Image	2.2 MB
	Table 1 - Summary of findings on early life stress and its effects on brain morphology and structure.xlsx	Table	16.9 KB
	Presentation Letter.docx	Cover letter / Comments	13.7 KB
Abstract	Early life stress (ELS) can have a long-lasting impact on brain structures. The brain's vulnerability to environmental stress is heightened during critical developmental periods. As a result, experiencing adversity during these time windows may lead to altered physiological responses that perpetuate throughout life. Research in this field has used animal models to understand the causal relationships between ELS and pathological phenotypes and has found that rodents exposed to stress during these critical periods display increased anxiety, depression, cognitive and neuroanatomical impairments. Here we explore how early life adversity is translated to animal research, the impact of ELS on brain cells such as neurons, astrocytes and microglia on several parameters, and how early adversity alters morphological parameters of different brain regions. This review provides a summary of findings concerning the effects of ELS on brain structure and morphology from the last decade, highlighting the topics that still need attention.		
Authors	Name	Email	Country/Location
	Bruna Bueno Milanesi ¹ Corresponding Author  0000-0002-0905-0173	bruna.milanesi@edu.pucrs.br	Brazil
	Lisiê Valéria Paz ¹	lisie.paz@acad.pucrs.br	Brazil
	Bruna Klein Brun ¹	bruna.brun@edu.pucrs.br	Brazil
	Nicole Rohleder Birck ¹	nicole.birck@edu.pucrs.br	Brazil
	Julia Spessatto Leffa ¹	julia.leffa@edu.pucrs.br	Brazil
	Francisco Sindermann Lumertz ²	fsindermannlumertz@gmail.com	Brazil
	Rodrigo Orso ²	rodrigo_orso@hotmail.com	Brazil
	Rodrigo Grassi-Oliveira ^{2, 3}	rodrigo.grassi@pucrs.br	Brazil
	Léder Leal Xavier ¹	llxavier@pucrs.br	Brazil
Affiliations	1. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Escola de Ciências as Saúde e da Vida, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, CEP 90619-900, Brasil		

APÊNDICE A – MANUSCRIPT

Early life stress and its effects in rodents and humans brain morphology - A review

Bruna Bueno Milanesi^{1*}, Lisiê Valéria Paz¹, Bruna Klein Brun¹, Nicole Rohleder Birck¹,
Julia Spessatto Leffa¹, Francisco Sindermann Lumertz², Rodrigo Orso², Rodrigo Grassi-
Oliveira^{2,3}, Léder Leal Xavier¹

¹Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, CEP 90619-900, Brasil.

²Developmental Cognitive Neuroscience Lab (DCNL), Instituto Do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.

³Translational Neuropsychiatry Unit, Department of Clinical Medicine, Aarhus University, Denmark.

* Corresponding Author:

Bruna Bueno Milanesi

Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

Escola de Ciências da Saúde e da Vida - PUCRS

Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 12, Sala 104. Porto Alegre, RS, Brasil. CEP: 90619-900

E-mail: bruna.milanesi@edu.pucrs.br

Telephone: +55 (51) 3320-3545

ABSTRACT

Early life stress (ELS) can have a long-lasting impact on brain structures. The brain's vulnerability to environmental stress is heightened during critical developmental periods. As a result, experiencing adversity during these time windows may lead to altered physiological responses that perpetuate throughout life. Research in this field has used animal models to understand the causal relationships between ELS and pathological phenotypes and has found that rodents exposed to stress during these critical periods display increased anxiety, depression, cognitive and neuroanatomical impairments. Here we explore how early life adversity is translated to animal research, the impact of ELS on brain cells such as neurons, astrocytes and microglia on several parameters, and how early adversity alters morphological parameters of different brain regions. This review provides a summary of findings concerning the effects of ELS on brain structure and morphology from the last decade, highlighting the topics that still need attention.

Keywords: Early life stress; brain; morphology; neurons; glial cells.

1. INTRODUCTION

Early life stress (ELS) is a robust predisposing factor to the emergence of mental illness and several health conditions during adulthood. The primary cause suggested is that during the early postnatal period, the brain is not fully mature and, therefore, vulnerable to environmental adversity. Even short periods of stress in the perinatal period can cause permanent deleterious effects throughout life. Early environmental triggers or stressors have a permanent effect on the individual. Considering the large number of children growing up in adverse conditions worldwide, it is crucial to understand the impact of early life stress on brain development (Brenhouse et al., 2019; Maras and Baram, 2015; Nishi, 2020; Nishi et al., 2013; Waters and Gould, 2022).

In this field of research, animal models have helped clarify the causal relationships between ELS and atypical phenotypes, elucidating the disruptions in brain structure and function after exposure to different types of adversity imposed during the critical initial periods of life (Brenhouse et al., 2019; Maras and Baram, 2015; Waters and

Gould, 2022). It has been shown that rodents exposed to prenatal stress or postnatal maternal neglect display enhanced neuroendocrine responses to stress, increased anxiety and depressive-like behaviours, and cognitive and neuroanatomical impairments. Given the common neurobiological mechanisms shared with the developing human brain, animal models provide us a chance to understand the mechanisms behind such alterations (Kestering-Ferreira et al., 2021; Maccari et al., 2014; Malcon et al., 2020).

In order to develop therapeutical strategies and interventions to improve resilience to such disorders in later life, basic research is necessary to investigate the connections between the experiences of a developing organism and its later outcomes throughout its lifespan (Brenhouse et al., 2019). Therefore, we carried out this descriptive review highlighting the impact of ELS on brain structures and cells, organizing the last decade's available data from research published in the main scientific databases (PubMed, Scopus, Web Of Science and Science Direct). Articles were included based on their relevance to the subject in review and publication date from 2012 until the present.

2. EARLY LIFE STRESS

It is widely recognized that early life stress (ELS) has a life-long impact on behaviour, cognitive and emotional functions, leading to a higher vulnerability to psychopathologies later in life (Agorastos et al., 2018). ELS in the research context includes any type of child maltreatment, including but not limited to physical, sexual and emotional abuse, physical and emotional neglect, as well as trauma associated with chronic illness, family separation, natural disasters, accidents, and witnessing a violent crime (Molet et al., 2014).

During the perinatal period, infancy, childhood and puberty, the brain is especially receptive to changes and modifications based on environmental influences. This is because these stages are characterised by increased neuroplasticity. Exposure to adversity during those critical periods can program persistent neuroendocrine, behavioural, morphological and metabolic changes. When this programming is maladaptive, it increases susceptibility to adulthood pathologies (Maccari et al., 2014).

The emerging interest on this research topic is due to the alarming number of pathologies that correlates with ELS. Not only psychopathologies but ELS has also been related to clinical conditions such as obesity, diabetes, cardiovascular disease, autoimmune disorders, certain types of cancer, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, microbiota-gut-brain axis dysfunction, among many other life-threatening conditions (Miller and Lumeng, 2018; Colleluori et al., 2022; Parrish et al., 2013; Slopen et al., 2012; Su et al., 2015; Vaiserman, 2014; Yang et al., 2013; Joung et al., 2014; Fagundes et al., 2013; Nusslock et al., 2016). The complexity and variety of adverse effects of ELS later in life are due to multiple factors such as type, intensity and timing of the stressor, as well as the individual genetic predispositions (Figure 1) (Brenhouse et al., 2019; Waters and Gould, 2022).

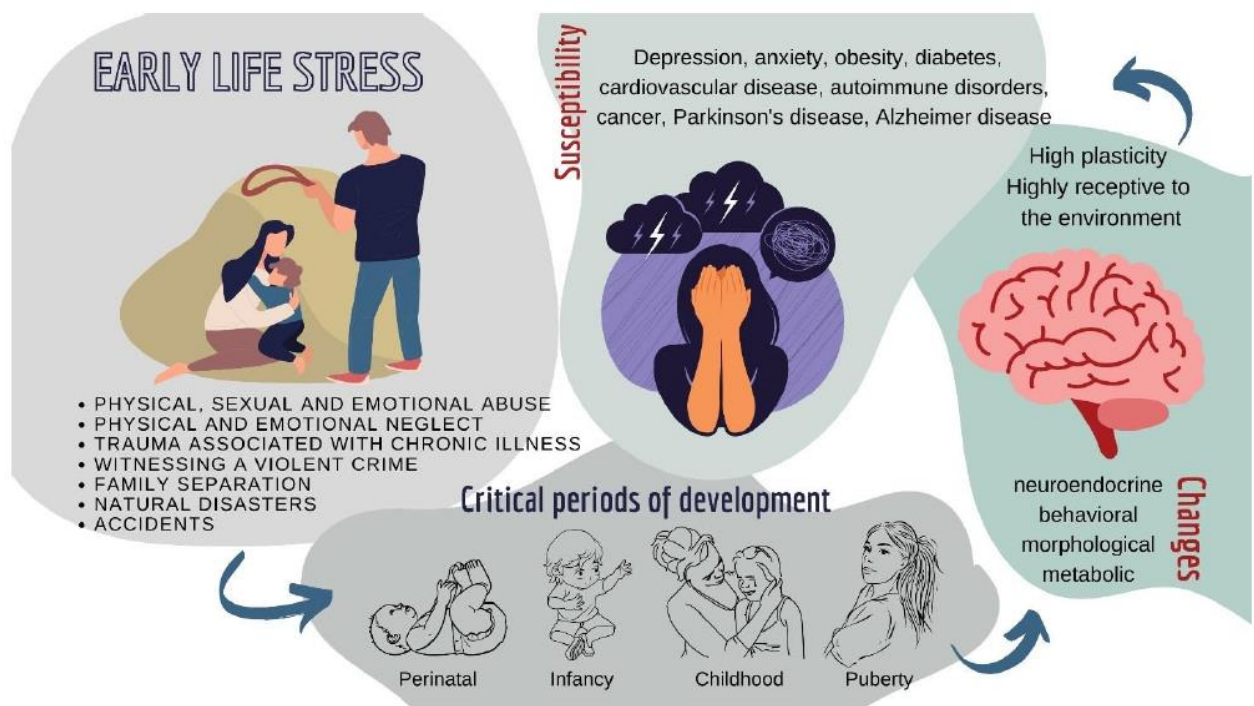


Fig. 1 - Summary of how early life stress correlates to several pathologies later in life. The type of adversity, the timing, the alterations it provokes as well as the individual susceptibilities all contribute to determining the type of outcome will be experienced by the adult. Developed by the authors (2023).

Considering the plurality of ELS, it has been observed that specific outcomes can be traced to specific types of adversities in infancy. While physical and sexual abuse correlates to anxiety and post-traumatic stress disorders, for example, a more significant correlation is observed among verbal abuse/emotional neglect and major depressive disorder (Carr et al., 2013). To investigate the intricate mechanisms and

effects of ELS, the experimental research field has been using rodents as the main animal model for ELS. Although not ideal, rodents express certain behaviours that mimic some aspects of psychiatric disorders, enabling a translational interpretation of results. In this scenario, different ELS protocols have been proposed to mimic different aspects of child maltreatment (Waters and Gould, 2022).

A few paradigms have been developed to induce physical pain, mirroring physical abuse, such as unpredictable electric shock in neonates and juveniles, formalin injection, or paw surgery, which increase avoidance behaviour and fear conditioning in rodents. Emotional and physical deprivation can be mimicked by the most used ELS protocol, maternal separation (MS). MS consist in separating pups from their dam for 1 up to 8 hours daily during the first 2 postnatal weeks, which results in a variety of behaviours in the adult offspring. The most observed outcome from MS is anxiety-like and depressive-like manifestations (Miragaia et al., 2018; Sadeghi et al., 2016). Limited bedding and nesting (LBN) is also extensively used in experimentation with rodents since it models scarce resources in childhood, providing a paradigm of neglect and abuse (Schmidt et al., 2011; Waters and Gould, 2022).

The neurobiological regulation of behaviour and stress-related responsiveness appears to be significantly influenced by adverse environments during the neonatal period in rodents. In fact, interruptions in normal mother-pup interactions during the perinatal period have been shown to lead to persistent changes in the neurobiology, physiology, and emotional behaviour of adult animals, potentially due to the dysregulation of the Hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis's responsiveness, among other mechanisms (Nishi et al., 2013; Juruena et al., 2021; van Bodegom et al., 2017).

3. NEURONS

The behaviour observed in clinical manifestations associated with early life adversity is believed to be regulated by specific neuronal activity in several rodent brain regions. Additionally, morphological changes are often apparent after induction of ELS in neurons within regions such as the hippocampus, amygdala, medial prefrontal cortex (mPFC), anterior cingulate, nucleus accumbens, among others (Bath et al., 2016;

Naninck et al., 2014; Agorastos et al., 2019; Wei et al., 2021; Marrocco et al., 2019; Pervanidou et al., 2017; McEwen et al., 2016). Therefore, it has been observed that ELS can induce region-specific alterations on neurons structure, morphology, and density. The mechanisms are still being discussed, but the brain's vulnerability to ELS may be influenced by genes that modulate the timing of neuronal maturation and developing circuits (Heun-Johnson and Levitt, 2018).

The morphology of dendritic arbours is directly linked to the functional properties of neurons. Therefore, it is essential to understand how early life stress play a role in the structure-function relationships in the mPFC. In 2016 it was reported that maternal separation induced dendritic proliferation and decreased the number of thin spines on distal dendrites of female rats in the mPFC. According to the authors, ELS may affect the reorganization of dendrites that occurs during later stages of development, potentially leading to a change in the number of synapses and altering the connectivity patterns in the mPFC to prioritize local cortical circuits (Farrell et al., 2016).

ELS has shown controversial outcomes regarding the dendritic spine density in the mPFC. Previous studies have demonstrated that exposure to stress during pregnancy and after birth can lead to the atrophy of apical dendrites of pyramidal neurons in the mPFC of animals (Chocyk et al., 2013; Markham et al., 2013; Muhammad et al., 2012; Mychasiuk et al., 2012). While some studies show a decrease of dendritic spines in the mPFC (Chocyk et al., 2013; Silva-Gómez et al., 2003), others show an increase of dendritic spines in the anterior cingulate cortex of male rats (Muhammad et al., 2012; Muhammad and Kolb, 2011).

The morphological alterations observed in the Ventral Tegmental Area (VTA) neurons after ELS protocol are discrete but relevant. Although the authors did not detect a significant influence of MS on the dendritic tree structure in either the medial or lateral VTA, they suggest a statistical tendency to larger and more complex dendritic trees in medial VTA when compared to lateral VTA. The dendritic spines also display minor modifications, with an increase in the diameter of spine heads on putative dopaminergic neurons in the lateral VTA. The authors suggest that the morphological changes observed in the VTA neurons may constitute an anatomical substrate of

enhanced synaptic activity of dopaminergic neurons after MS stress (Spyrka et al., 2020).

After maternal deprivation, more strong results were achieved by analyzing NeuN-immunoreactive neurons in the nucleus accumbens and the amygdala. An important effect of ELS on limbic structures was observed, including a significant reduction in volume of the amygdala (17%) and the nucleus accumbens (9%) compared with the control animals. A significant decrease in the number of neurons also registered, with a decrease of 41 % in the NeuN neurons density in the amygdala and 43% in the nucleus accumbens compared with the control group. The cell soma area of NeuN-immunolabeled neurons also differed, showing a 12% reduction in the amygdala and 33% in the nucleus accumbens. The alterations observed suggest a neuronal loss in the limbic system during postnatal development, potentially due to an increase in glucocorticoids caused by early life stress (ELS), which enhanced glutamatergic synapses, known to be cytotoxic when in high concentrations (Aleksić et al., 2016). In fact, prenatal stress exposure can lead to an imbalanced ratio of excitation to inhibition in the PFC and an increased inhibition in the amygdala due to the dysregulation of genes related to glutamatergic transmission. This disruption in the PFC-to-AMY transmission is believed to be a persistent effect of ELS and may enhance the risk of mood disorders in the face of additional stress (Marchisella et al., 2021).

Several studies also report a reduced hippocampal neurogenesis followed by early life stress (Arabadzisz et al., 2010; Lajud and Torner, 2015; Naninck et al., 2015; Ruiz et al., 2018; Loi et al., 2014). A study observed a decrease in hippocampal neurogenesis as an early onset phenomenon, suggesting that adverse experiences alter hippocampal ontogeny after chronic elevation of glucocorticoid levels. The early increase in glucocorticoid levels after exposure to early life stress is assumed to affect hippocampal ontogeny by altering the hippocampus's negative feedback on the adult HPA axis (Lajud et al., 2012). The summary of results obtained by animal research on the effects of early life adversity suggests deleterious effects in at least some neuronal mechanisms involved in neurogenesis, cell proliferation and dendritic arborization. ELS elicits multiple changes in neuronal function and morphology within different cerebral structures. These changes cannot be the basis of all observed behavioural effects

induced by stress but seems to be part of the complex alterations displayed by early stressed animals (Zulma et al., 2017).

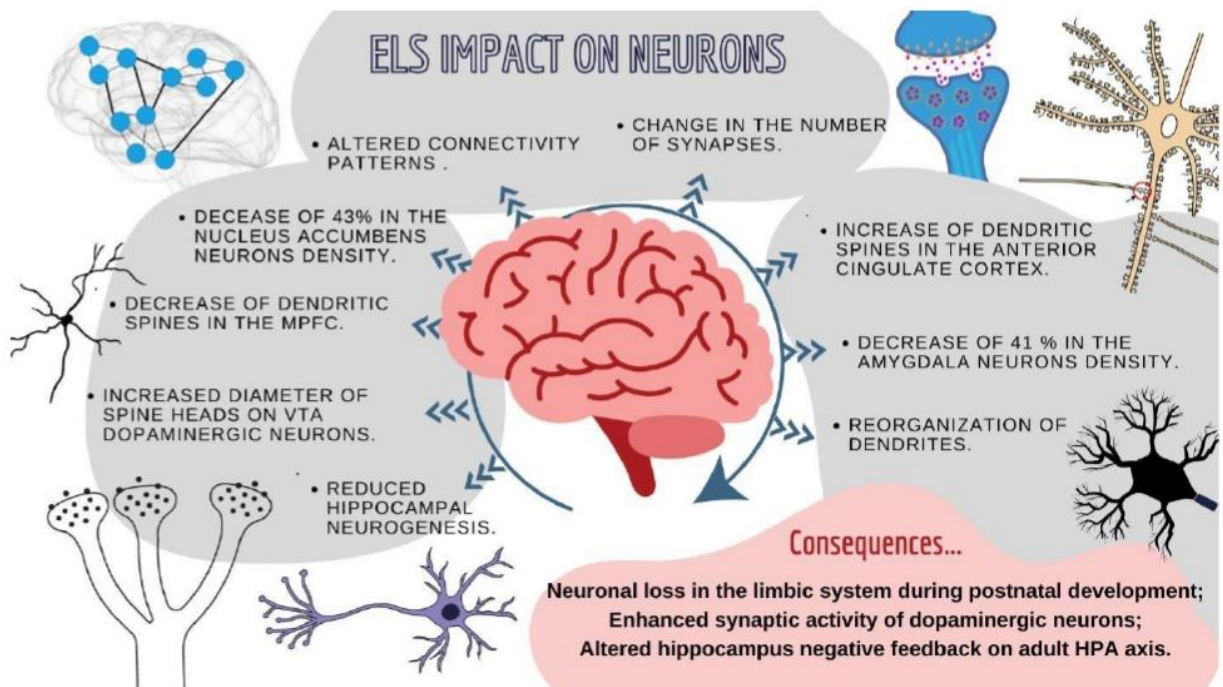


Fig. 2 - Summary of ELS impact on neurons and the consequences in the CNS. Developed by the authors (2023). Ventral Tegmental Area (VTA); medial prefrontal cortex (mPFC); Hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA).

4. MICROGLIA

Microglial cells are considered the primary immune cells in the brain and play a protective role in normal brain development. In addition, they are also thought to play a protective role by removing dead cells through phagocytosis and shaping the connections between neurons by trimming excess axons and synapses. The morphology of microglia changes depending on their activation state, which can contribute to an increased neuroinflammation state in the brain. The transformation of microglia from an ameboid to a ramified form usually occurs within two weeks after birth, and stress during this time may interfere with the normal development of microglia. Therefore, many studies have shown the effects of ELS on the density and morphology of microglia cells on animal models (Kaur et al., 2017; Johnson and Karffman, 2018; Wang et al., 2017; Delpech et al., 2016).

Pointing to the increase of ameboid microglia after ELS, a previous study shows a higher density of ameboid microglia and intermediate microglia in the PFC of 15-day-old male mice submitted to maternal separation or maternal deprivation with no changes in density and/or morphology in the hippocampus. Their results imply a stress- and region-specific effects of ELS on microglial morphology, suggesting that ELS can delay the transformation of ameboid microglia into ramified ones (Reshetnikov et al., 2020).

Other research groups have also observed changes in the morphology of microglia in the limbic brain region of pups and adults after experiencing early-life stress. These changes include an increase in the density of ameboid microglia in the hilus of the dentate gyrus in pups with maternal separation, as well as alteration of microglial composition in the hippocampus after only 40 minutes of separation from the mother on PND14, also exhibiting increased expression of genes related to phagocytic activity and decreased expression of inflammatory genes relative to controls, indicating that ELS perturbs the function of microglia (Catale et al., 2020; Delpech et al., 2016). Similar results were reported in 2017, showing that ELS altered microglial morphology and decreased Iba1+ staining coverage in the hippocampus of male mice at P9 (Hoeijmakers et al., 2017). ELS has also been shown to alter microglial morphology and function in male rodents' prefrontal cortex (PFC) during development (Reshetnikov et al., 2020).

A defective reactivity of the HPA axis has been documented as a major outcome of ELS. Animal studies have shown that ELS can affect the development of brain regions involved in reward and stress regulation, including the nucleus accumbens, amygdala, and hypothalamus (Wang et al., 2017; Bielefeld et al., 2021; Johnson et al., 2018). A recently published study indicates that microglia may play an important role in producing these outcomes due to their critical role in synaptic pruning. They demonstrated that reduced synaptic engulfment by microglia during ELS leads to increased excitatory synapse number on corticotropin-releasing hormone (CRH)-expressing neurons of the hypothalamus leading to aberrant stress reactivity in adulthood. Therefore, the behavioural changes observed after ELS are connected to a defective microglia activation and a defective HPA axis activity (Bolton et al., 2022).

This defective activation of the HPA axis may be linked to different alterations in men and women. Studies have shown that ELS leads to HPA axis hyperactivity in men, while women exposed to ELS are more likely to experience depression, suggesting that stress has differential effects according to the individual's sex (Goodwill et al., 2019). One of the mechanisms to facilitate the sex-specific effects of ELS is the microglial function that differs between males and females. Males have more activated microglia (or less mature) in certain regions, such as the hippocampus and amygdala, than females in early postnatal life. This pattern is the opposite during puberty when adolescent and adult females have more activated microglia in the same brain regions (Schwarz et al., 2012). Experiencing adversity during a developmental period in which microglia show sex differences in number and morphology in crucial brain regions could impact both sexes differently, resulting in sex-specific and region-specific changes in synaptic pruning induced by ELS and ultimately leading to different behaviour later in life (Garvin and Bolton, 2022).

Another interesting finding described using *in vivo* imaging technique was observing an increase in the motility of microglial processes in the somatosensorial cortex (SSC) in mice that went through maternal deprivation. This result significantly correlated with the decrease in the nociceptive threshold level, indicating that the increase in SSC activity increases microglia's motility in MD mice (Takatsuru et al., 2015). The authors hypothesized that the motility increased as a consequence of microglial activation by glutamate, which is supported by previous reports that show an increase in glutamate release and reduced glial cell-mediated glutamate cycling due to environmental stress (Sanacora et al., 2012).

Brief Daily Separation (BDS), a mild type of ELS protocol, is sufficient to cause a prolonged elevation of corticosterone during the postnatal period. Adult BDS mice have deficits in several hippocampal-dependent tasks and impaired neurodevelopmental processes in the hippocampus (Delpech et al., 2016; Wei et al., 2014). The leading hypothesis is that microglial dysfunction is responsible for perturbing normal hippocampal development, causing the observed alterations. In summary, BDS leads to a prolonged increase in corticosterone levels that impacts microglia, which have a high glucocorticoid receptor expression. The rise in

corticosterone levels leads to changes in cell density, phagocytic activity, and long-term changes in microglial reactivity. Additionally, microglia play a crucial role in guiding the development of several neuronal and non-neuronal processes that are abnormal in ELS, including neurogenesis, synaptogenesis, synaptic pruning, axonal growth, astrocyte maturation, myelination, and the integrity of the blood-brain barrier (Johnson and Kaffman, 2018).

5. ASTROCYTES

Astrocytes are considered to play a crucial role in regulating neuronal signalling. Forming the tripartite synapse in conjunction with neuronal pre- and post-synaptic sites, they contribute to the regulation of synaptic function using signalling mechanisms. Although there have been limited studies on how early-life stress affects non-neuronal processes and how it modifies neuronal information processing and synaptic plasticity, recent research suggests that astrocytes play a crucial role in synaptic transmission and plasticity by interacting with synaptic circuits (Çalışkan et al., 2020).

There are multiple processes by which astrocytes can control short- and long-term plasticity at the tripartite synapse. However, most studies that investigated the impact of early life stress on astrocytes have focused on the expression of astrocyte markers, such as glial fibrillary acid protein (GFAP) and the calcium-binding protein S100 β in brain areas involved in emotional behaviour control (Çalışkan et al., 2020). Therefore, the analysis of astrocyte functions and their role on modulating plasticity in the ELS brain is a knowledge gap that still needs to be explored.

What has already been explored is the density and morphology of GFAP+ astrocytes. As recently demonstrated, ELS increases GFAP expression at P9 in wild-type mice, which disappears at P30 and 6 months, and shows no differences in GFAP+ cell number or cell complexity. When analyzing gene expression, there is little impact on genes related to astrocytes at any of the time points studied in the hippocampus (HPC) and entorhinal cortex (EC) (Abbink et al., 2020). Conversely, another study showed a decrease of GFAP mRNA levels in the prefrontal cortex followed by maternal separation coupled with social isolation at all the time points analyzed (P7, P14, P21

and 10 weeks) (Yamawaki et al., 2018). These results agree with other findings on the effects of MS on the astroglial population of several brain regions. A significant and prolonged reduction of GFAP+ astrocyte density was observed on the prelimbic cortex, cingulate cortex, dorsal striatum, nucleus accumbens, dentate gyrus and hippocampal subregions CA1 and CA3 induced by ELS. The authors interpret this result as an expected impact of MS. Previous studies show that astroglia is often underdeveloped in adults who were submitted to ELS, showing a more severe impact on the described structures (Leventopoulos et al., 2007).

Another important point to take into consideration is the timing gliogenesis peak that occurs in the second postnatal week. Hence, a stress insult like MS could potentially affect this process and produce a long-term reduction of GFAP+ cells. Because of the key role astrocytes play in synaptic remodelling and neuronal communication, the reduction of these cells could be responsible for some of the neurocognitive deficits found in ELS subjects (Banqueri et al., 2019).

Another study showed a significantly lower intensity of GFAP immunoreactivity in the paraventricular nucleus (PVN) of ELS mice. It was also observed noticeably thinner GFAP-immunoreactive arbours in ELS mice compared with control. This alteration in astrocyte morphology was thought to be a result of the altered levels of EAAT1 expression, a glutamate transporter protein that is primarily expressed in astrocytes and is responsible for the uptake of glutamate from the synaptic cleft. The authors suggest that the changes in the EAAT1 and GFAP expression patterns imply a combined structural and neurochemical remodeling of astrocytes due to ELS (Gunn et al., 2013).

6. ANATOMICAL BRAIN MORPHOLOGY (RODENTS AND HUMANS)

A few studies have shown that early life adversity may be related to multiple differences on brain morphology. It is plausible to expect that early life stress would exert some effect on neuronal and glial cells, regarding number, density, morphology, and all the aspects mentioned above. However, structural changes in the brain are more dramatic alterations often linked to important deficits either related to brain function or behaviour.

In animal models, it was observed that hippocampal volume is affected by early life stress but recovered in adulthood. Using magnetic resonance volumetry on alive animals at P15, P30, and P70, the authors only found differences in hippocampal volumes (comparing with control mice) at P15 and P30, indicating short-lasting differences (Herpfer et al., 2012). In contrast, a different report shows that rats that went through maternal deprivation had a 17% reduction of the amygdala volume and 9% volume decrease for the nucleus accumbens, compared with the control group at P60 (Aleksić et al., 2016). Rodent models of ELS usually demonstrate long-term changes in neuroendocrine responses to stress, such as an HPA-axis dysfunction (mentioned previously). This hormonal disruption leads to a decrease of the volume of limbic system structures and consequentially develops psychotic symptoms and altered behaviour (Loi et al., 2017).

In human population-based studies, the data on brain regions volumes were collected with magnetic resonance imaging (MRI); therefore, there are a growing amount of studies with an impressive number of subjects being published. Recently, a study showed that adults with childhood trauma exposure had a positive association between medial orbitofrontal cortex (OFC) and amygdala volume. In contrast, adults with no childhood exposure showed a negative OFC–amygdala structural association, indicating that the relationship between the amygdala and OFC cortical volume varies as a function of childhood trauma exposure. Interestingly, volume variation in those areas was also related to pathological personality traits in adulthood, such as disinhibition and antagonism. The authors discuss that early trauma may result in the development of pathological personality traits due to alterations in the neurobiological systems responsible for regulating emotions and behaviour, like the amygdala and OFC (Bounoua et al., 2020).

A crucial point that has been receiving attention is the impact of the timing of ELS on brain structures. Studies have been conducted to determine if different age intervals during which the adversity was present will lead to different outcomes, not only in the expressed phenotype but also in the intricacy of brain morphology. Investigating this question, a study group aimed to see if limbic region volumes varied according to the age of self-reported ELS. In a study with 173 participants, later

childhood ELS (8 – 17 years) was associated with volumetric reductions in the anterior cingulate cortex (ACC) and insula, while ELS experienced between the ages of 1 month and 7 years was not associated with decreased brain volumes (Baker et al., 2013). A more recent, similar study evaluated cortical thickness (CT) of the orbitofrontal cortex (OFC) of 190 adults that experienced ELS, but in this case, the stressful events were up to the age of 4 years. Their results showed a significant association between ELS and reduced CT in the right medial OFC as well as an inverse relationship between the CT of OFC and depressive symptoms, indicating that a thicker OFC is correlated to fewer depressive symptoms. The OFC is believed to play a crucial role in regulating emotions, motivation, and reward-related states. As a result, changes in the volume of the OFC have been observed in patients with major depressive disorder (MDD) (Monninger et al., 2020). Another study explored the impact of the timing of life adversity (childhood or past few years) on the brain morphology of 129 patients. The analyses revealed significantly larger volumetric estimates in the amygdala/hippocampal complex in individuals with childhood adversity compared to those without and significantly smaller volumetric estimates in the anterior cingulate cortex in individuals with exposure to recent adversity as compared to those without, the data also revealed significantly smaller volumes in the bilateral ACC in participants with exposure to recent adversity. In summary, timing of adversity was differentially mirrored in morphometric alterations of limbic and prefrontal areas and both resulted in enhanced anxiety and depression (Kuhn et al., 2015).

When comparing MDD patients and healthy subjects with a history of child maltreatment, the results become more challenging to interpret. A whole brain analysis showed reduced grey matter volume in the left superior parietal lobule while increased in the right middle occipital gyrus in MDD patients compared to healthy subjects. In addition, the left dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) showed decreased grey matter volume in subjects with childhood trauma exposures compared to individuals without ELS. The authors suggest that decreased grey matter volume of the left DLPFC is a function of childhood trauma rather than MDD, which may represent the biological risk for developing MDD (Lu et al., 2019). Since the cause-and-effect relationship among ELS, MDD and structural brain alterations get intricate when

examined in greater detail, a study sought to differentiate the effects of child maltreatment (CM) from the impact of depression diagnosis on brain structure. The data pointed to different main effects of CM and depression on brain structure separately: the significant main effect of CM on front-limbic areas, visual cortex and cerebellum, and the main effect of depression on orbitofrontal regions and bilateral temporal lobes. Beyond that, MDD patients with childhood maltreatment showed an increase in grey matter volume in the left dorsomedial prefrontal cortex and right dorsolateral prefrontal cortex and a reduction in grey matter volume in the right ventrolateral prefrontal cortex compared with MDD patients with no history of CM. While between-group comparisons revealed that controls with childhood adversity showed lower grey matter volume in the left posterior cingulate gyrus and higher grey matter volume in the right dorsolateral prefrontal cortex in contrast to controls without ELS. This study suggested that ELS is associated with structural abnormalities of the front-limbic regions that are commonly related to the psychopathological consequence of depression (Figure 3) (Yang et al., 2017).

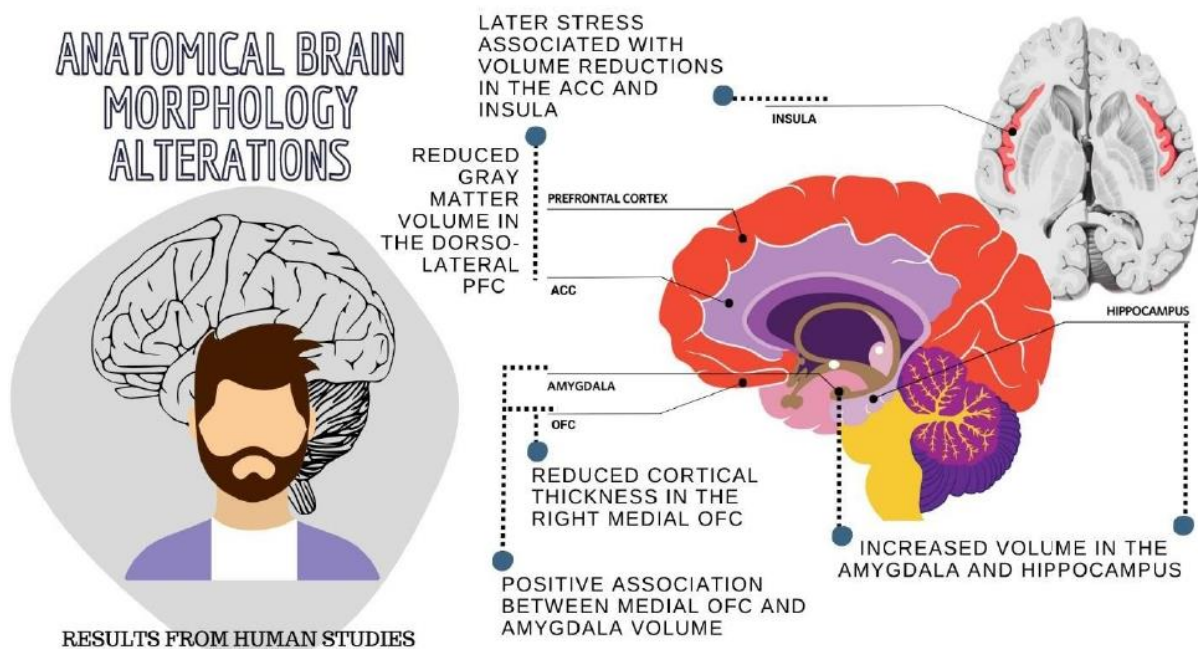


Fig. 3 - Summary of ELS induced alterations on anatomical brain morphology from studies with humans. Developed by the authors (2023). Orbitofrontal cortex (OFC); anterior cingulate cortex (ACC); prefrontal cortex (PFC).

7. CONCLUDING REMARKS

ELS is a well-known risk factor for developing comorbidities later in life. In the perinatal period and during the child's development, the brain is susceptible to environmental interference, either positive or negative. Therefore, any disturbance in the intricate and refined balance needed for optimal brain maturation can hold long-lasting effects. It is impossible to predict the type of impairment produced by early life stress, ranging from psychopathologies such as depression to systematic conditions like autoimmune disorders. However, a few aspects are crucial to consider and may be determinant in a causal-effect context, needing to be closely analyzed by future studies.

The first aspect to be considered is the type of adverse condition. Although a direct correlation cannot be established yet, there are nonetheless specific associations that can be identified. For example, physical and sexual abuses have a stronger correlation to anxiety and post-traumatic stress disorder. In contrast, verbal abuse and emotional neglect correlate with major depressive disorder (Waters and Gould, 2022). The second important point is the timing. Brain development has important time windows that act as critical points for neuroendocrine, morphological and metabolic changes. Those checkpoints during perinatal, infancy and puberty are moments of greater vulnerability, where exposure to stress may lead to specific outcomes (Maccari et al., 2014). For example, microglia maturation is more prominent during the first two weeks after birth; therefore, stress during this period increases the number of ameboid microglia and results in greater neuroinflammation (Kaur et al., 2017). The third aspect is the sex-specific effects of ELS. It is recognized that males and females show different coping mechanisms for early trauma (Garvin and Bolton, 2022). In the past few years, though, it has also been identified sexually dimorphic effects of ELS on brain morphology and behaviour on animal models. Maternal separation leads to dendritic hypertrophy of limbic regions in female but not male rats, for example. Females also had their social interactions impaired, while males did not (Farrell et al., 2016).

ELS affects brain structures differently. A reduced density of neurons in limbic areas can be observed, as well as impaired dendritic reorganization, changing patterns

of synaptic communication and connectivity (Farrell et al., 2016). Conversely, microglial cells often show an immature state in ELS individuals, which correlates with a reduced synaptic pruning that increases excitatory synapse number of CRH neurons and ultimately leads to defective stress response in adulthood (Bolton et al., 2022). Regarding the astrocytes, the tendency points to a decrease in density and GFAP expression in several areas, directly impacting synaptic remodelling and neuronal communication and probably linked to the neurocognitive deficits observed in ELS subjects (Banqueri et al., 2019). The human studies with MRI also convey necessary information about the effects of ELS. We can observe a significant volume reduction of limbic and frontal structures frequently correlated with pathological personality traits, impairments in emotion regulation, and the development of psychopathologies such as depression (Bounoua et al., 2020). For better visualization, table 1 summarizes the results mentioned in this review, highlighting the parameters analyzed and main observations (Table 1).

Taken together, those findings help us elucidate all the transformations going on the brain of an individual that went through early life adversity. It is impossible to predict outcomes and establish a cause-and-effect relationship, but we must use the already abundant available information to clarify patterns, be aware of tendencies and use it to define better therapy strategies and early interventions.

Author /year	Animal model	Cell type	ELS protocol	Parameters Analyzed	Main Observations
Hanke Heun-Johnson, Pat Levitt. 2018	Mice (male)	CA1 neurons	Limited bedding and nesting (modified)	dendritic length, dendritic complexity, dendritic spines morphology	↓ dendritic complexity
M.R. Farrell, F.H. Holland, R.M. Shansky, H.C. Brenhouse. 2016	Rat (female x male)	mPFC pyramidal neurons	Maternal Separation	Apical length, branch number, dendritic spines morphology	↑ branch points, branch length, apical dendritic length, dendritic material. ↓ density of thin spines. (females)
Jadwiga Spycka et al. 2020	Rat (female)	VTA neurons	Maternal Separation	Dendritic length, number of primary dendrites, bifurcations and branches, number of dendritic tips	↑ number of dendritic tips in the medial VTA, diameter of spine heads in the lateral VTA.
Dubravka Aleksic et al. 2016	Rat (Female x male)	NeoN neurons	Maternal Deprivation	Amygdala and Nucleus Accumbens volume, soma area of neuronal cells.	↓ Volume in migdala and nucleus accumbens , number of neurons and size of cells soma on both areas.
Maralinde R. Abbink et al. 2020	Mice (male)	Astrocytes	Limited nesting and bedding	GFAP coverage, cell density and complexity in HPC and EC.	↓ total GFAP coverage in HPC. ↑ GFAP coverage in the EC, coverage of the clustered GFAP signal in the HPC.
Yosuke Yamawaki et al. 2018	Rat (male)	Astrocytes	Maternal Separation	Gene expression of GFAP	↓ GFAP mRNA levels in the prefrontal cortex at ages P7,P14, P21, and 10 weeks
Jessica L. Bolton et al. 2022	Mice (male)	Microglia and neurons	Limited nesting and bedding material	Microglia activation, synapse density, and adult hormonal and behavioral stress responses	↑ excitatory synapses on hypothalamic CRH neurons; ↓ microglial process dynamics on CRH+ cells; impaired synapse engulfment and pruning.
Benjamin G. Gunn et al. 2013	Mice (Female and male)	Mpd neurons	Maternal neglect	Excitatory and inhibitory transmission in CRF-expressing neurons of the hypothalamus	↑ glutamatergic drive onto neonatal mpd neurons; impaired astrocytic glutamate reuptake.

Author /year	Animal model	Cell type	ELS protocol	Parameters Analyzed	Main Observations
David M. Lyons et al. 2001	Monkey (Female and male)	hippocampus volume	Maternal neglect or Maternal Separation	Variation in hippocampal volumes	↑ right hippocampal volumes
María Banqueri et al. 2019	Rats (male)	Glial cells	Maternal Separation	Number of GFAP+ cells, expression of Iba-1, IL-6 and TNFα in the PFC evaluated by rt-PCR.	↑ Iba-1+ cells in striatal areas; ↓ GFAP+ cells in striatal areas; ↑ Relative expression of IL-6 mRNA in the hippocampus.
Inga Herpfer et al. 2012	Mice	Hippocampal volume	Maternal Separation	Hippocampus volumetry, immunohistochemistry of neurogenesis, and measurements of synaptic plasticity.	↓ Hippocampal volume but recovered in adulthood; Synaptic plasticity exhibited a delayed impairment.
Yusuke Takatsuru et al. 2015	Mice (male)	Microglia	Maternal deprivation	Number and motility of microglial processes in early-life stressed mice.	↑ number and motility of filopodia-like protrusions of microglial processes.
Jean-Christophe Delpecha et al. 2016	Mice (male)	Microglia	Maternal Separation	Behavior, microglia density in the hippocampus, levels of phagocytic activity, maturation of microglia.	Impaired microglia maturation; dysregulated microglial molecular signature in the hippocampus; ↑ density of microglia in the hippocampus; ↑ number of CD11b-positive cells;
Lianne Hoeijmakers et al. 2016	Mice (male)	Neurons	Limited nesting and bedding	Amyloid β pathology, quantification of neuroinflammatory mediators, neuroinflammatory response to Aβ neuropathology.	↓ cell-associated amyloid, expression of IL-6; complexity of Iba1+ microglia; ↑ Aβ plaque load, microglia Iba1+ and CD68.
Ayman Saleh et al. 2017	Humans	Cortical thickness	Self reported ELS	Cortical thickness and regional gray matter volumes of cingulate cortex, OFC, amygdala, caudate and hippocampus.	↓ OFC volumes in depressed subjects; volumes of the lateral OFC and caudate; cortical thickness in several regions.

Table 1. Summary of findings on early life stress and its effects on brain morphology and structure.

Author /year	Animal model	Cell type	ELS protocol	Parameters Analyzed	Main Observations
Ayman Saleh et al. 2017	Humans	Cortical thickness	Self reported ELS	Cortical thickness and regional gray matter volumes of cingulate cortex, OFC, amygdala, caudate and hippocampus.	↓ OFC volumes in depressed subjects; volumes of the lateral OFC and caudate; cortical thickness in several regions.
Laurie M. Baker et al. 2022	Humans	Brain regions volumes	Self reported ELS	Volumetric morphology in limbic and basal ganglia volumes in adulthood.	↓ volumes in the ACC and insula.
Michail Leventopoulou et al. 2007	Rats (male)	Glial cells	Maternal deprivation	Regional distribution and morphology of GFAP+ astrocytes.	↓ GFAP+ astrocyte density in dorsal dentate gyrus, PFC, hippocampus (CA1), cingulate cortex and basolateral amygdala; ↓ GFAP-immunoreactivity.
Naima Lajud et al. 2011	Rats (male)	Neurogenesis	Maternal Separation	The survival of recently formed hippocampal granule cells in rat pups.	↓ density of doublecortin positive cells; hippocampal neurogenesis; ↑ CORT levels.
Vasiliy Reshetnikova et al. 2020	Mice (male)	Neurogenesis and microglia	Maternal Separation and Maternal Deprivation	Neuron density, neurogenesis, microglial morphology, and HPA axis programming.	↑ density of amoeboid microglia and intermediate microglia in the PFC; ↑ density of Ki67-positive cells in the dentate gyrus.

REFERENCES

- Abbink, M.R., Kotah, J.M., Hoeijmakers, L., Mak, A., Yvon-Durocher, G., Van Der Gaag, B., Lucassen, P.J., Korosi, A., 2020. Characterization of astrocytes throughout life in wild-type and APP/PS1 mice after early-life stress exposure. *J. Neuroinflammation* 17, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01762-z>
- Agorastos A, Pervanidou P, Chrousos GP, Baker DG. Developmental Trajectories of Early Life Stress and Trauma: A Narrative Review on Neurobiological Aspects Beyond Stress System Dysregulation. *Front Psychiatry*. 2019 Mar 11;10:118. doi: 10.3389/fpsyt.2019.00118. PMID: 30914979; PMCID: PMC6421311.
- Agorastos, A., Pervanidou, P., Chrousos, G.P. et al. Early life stress and trauma: developmental neuroendocrine aspects of prolonged stress system dysregulation. *Hormones* 17, 507–520 (2018). <https://doi.org/10.1007/s42000-018-0065-x>
- Aleksić, D., Aksić, M., Radonjić, N. V, Jovanović, A., Marković, B., Petronijević, N., Radonjić, V., Mališ, M., Filipović, B., 2016. Long-term Effects of Maternal Deprivation on the Volume, Number and Size of Neurons in the Amygdala and Nucleus Accumbens of Rats. *Psychiatr. Danub.* 28, 211–219.
- Arabadzisz D, Diaz-Heijtz R, Knuesel I, Weber E, Pilloud S, Dettling AC, Feldon J, Law AJ, Harrison PJ, Pryce CR. Primate early life stress leads to long-term mild hippocampal decreases in corticosteroid receptor expression. *Biol Psychiatry*. 2010 Jun 1;67(11):1106-9. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.12.016. Epub 2010 Feb 4. PMID: 20132928.
- Baker, L.M., Williams, L.M., Korgaonkar, M.S., Cohen, R.A., Heaps, J.M., Paul, R.H., 2013. Impact of early vs. late childhood early life stress on brain morphometrics. *Brain Imaging Behav.* 7, 196–203. <https://doi.org/10.1007/s11682-012-9215-y>
- Banqueri, M., Méndez, M., Gómez-Lázaro, E., Arias, J.L., 2019. Early life stress by repeated maternal separation induces long-term neuroinflammatory response in glial cells of male rats. *Stress* 22, 563–570. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1604666>
- Bath KG, Manzano-Nieves G, Goodwill H. Early life stress accelerates behavioral and neural maturation of the hippocampus in male mice. *Horm Behav.* 2016 Jun;82:64-71. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.04.010. Epub 2016 May 4. PMID: 27155103; PMCID: PMC5308418.
- Bolton, J.L., Short, A.K., Othy, S., Cassandra, L., Shao, M., Gunn, B.G., Beck, J., Bai, X., Law, S.M., Savage, J.C., Lambert, J.J., Belelli, D., 2022. Early stress-induced impaired microglial pruning of excitatory synapses on immature CRH-expressing neurons provokes aberrant adult stress responses 38. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110600>.Early
- Bounoua, N., Miglin, R., Spielberg, J.M., Johnson, C.L., Sadeh, N., 2020. Childhood trauma moderates morphometric associations between orbitofrontal cortex and amygdala: Implications for pathological personality traits. *Psychol. Med.* <https://doi.org/10.1017/S0033291720004468>

- Brenhouse, H.C., Bath, KG, Sciences, P., 2019. Bundling the haystack to find the needle: challenges and opportunities in modeling risk and resilience following early life stress. *Front. Neuroendocrinol.* 54, 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100768>. Bundling
- Çalışkan, G., Müller, A., Albrecht, A., 2020. Long-term impact of early-life stress on hippocampal plasticity: Spotlight on astrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21144999>
- Carr, Clara Passmann MSc*†; Martins, Camilla Maria Severi MPhil*; Stingel, Ana Maria PhD‡; Lemgruber, Vera Braga MD†; Juruena, Mario Francisco MD, PhD*. The Role of Early Life Stress in Adult Psychiatric Disorders: A Systematic Review According to Childhood Trauma Subtypes. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 201(12):p 1007-1020, December 2013. | DOI: 10.1097/NMD.0000000000000049
- Catale, C., Gironda, S., Iacono, L. Lo, Carola, V., 2020. Microglial function in the effects of early-life stress on brain and behavioral development. *J. Clin. Med.* 9. <https://doi.org/10.3390/jcm9020468>
- Chocyk, A., Bobula, B., Dudys, D., Przyborowska, A., Majcher-Maślanka, I., Hess, G., Wedzony, K., 2013. Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *Eur. J. Neurosci.* 38, 2089– 2107. <https://doi.org/10.1111/ejn.12208>
- Colleluori G, Galli C, Severi I, Perugini J, Giordano A. Early Life Stress, Brain Development, and Obesity Risk: Is Oxytocin the Missing Link? *Cells.* 2022 Feb 11;11(4):623. doi: 10.3390/cells11040623. PMID: 35203274; PMCID: PMC8870435.
- Delpech JC, Wei L, Hao J, Yu X, Madore C, Butovsky O, Kaffman A. Early life stress perturbs the maturation of microglia in the developing hippocampus. *Brain Behav Immun.* 2016 Oct;57:79-93. doi: 10.1016/j.bbi.2016.06.006. Epub 2016 Jun 11. PMID: 27301858; PMCID: PMC5010940.
- Delpech, J.-C., Wei, L., Hao, J., Yu, X., Madore, C., Butovsky, O., Kaffman, A., 2016. Early life stress perturbs the maturation of microglia in the developing hippocampus. *Brain. Behav. Immun.* 57, 79–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.006>. Early
- Fagundes CP, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stressful early life experiences and immune dysregulation across the lifespan. *Brain Behav Immun.* 2013 Jan;27(1):8-12. doi: 10.1016/j.bbi.2012.06.014. Epub 2012 Jul 6. PMID: 22771426; PMCID: PMC3518756.
- Farrell, M.R., Holland, FH, Shansky, R.M., Brenhouse, H.C., 2016. Sex-specific effects of early life stress on social interaction and prefrontal cortex dendritic morphology in young rats. *Behav. Brain Res.* 310, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.009>
- Garvin, M.M., Bolton, J.L., 2022. Sex-specific behavioral outcomes of early-life adversity and emerging microglia-dependent mechanisms. *Front. Behav. Neurosci.* 16, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1013865>
- Goodwill HL, Manzano-Nieves G, Gallo M, Lee HI, Oyerinde E, Serre T, Bath KG. Early life

- stress leads to sex differences in development of depressive-like outcomes in a mouse model. *Neuropsychopharmacology*. 2019 Mar;44(4):711-720. doi: 10.1038/s41386-018-0195-5. Epub 2018 Sep 6. PMID: 30188513; PMCID: PMC6372611.
- Gunn, B.G., Cunningham, L., Cooper, M.A., Corteen, N.L., Seifi, M., Swinny, J.D., Lambert, J.J., Belelli, D., 2013. Dysfunctional astrocytic and synaptic regulation of hypothalamic glutamatergic transmission in a mouse model of early-life adversity: Relevance to neurosteroids and programming of the stress response. *J. Neurosci.* 33, 19534–19554. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1337-13.2013>
- Herpfer, I., Hezel, H., Reichardt, W., Clark, K., Geiger, J., Gross, C.M., Heyer, A., Neagu, V., Bhatia, H., Atas, H.C., Fiebich, B.L., Bischofberger, J., Haas, C.A., Lieb, K., Normann, C., 2012. Early Life Stress Differentially Modulates Distinct Forms of Brain Plasticity in Young and Adult Mice. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046004>
- Heun-Johnson, H., Levitt, P., 2018. Differential impact of Met receptor gene interaction with early-life stress on neuronal morphology and behavior in mice. *Neurobiol. Stress* 8, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.11.003>
- Hoeijmakers, L., Ruigrok, S.R., Amelanchik, A., Ivan, D., van Dam, A.M., Lucassen, P.J., Korosi, A., 2017. Early-life stress lastingly alters the neuroinflammatory response to amyloid pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Brain. Behav. Immun.* 63, 160–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.023>
- Johnson FK, Kaffman A. Early life stress perturbs the function of microglia in the developing rodent brain: New insights and future challenges. *Brain Behav Immun.* 2018 Mar;69:18-27. doi: 10.1016/j.bbi.2017.06.008. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28625767; PMCID: PMC5732099
- Johnson, F.K., Delpech, J.C., Thompson, G.J. et al. Amygdala hyper-connectivity in a mouse model of unpredictable early life stress. *Transl Psychiatry* 8, 49 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0092-z>
- Johnson, F.K., Kaffman, A., 2018. Early life stress perturbs the function of microglia in the developing rodent brain: New insights and future challenges. *Brain. Behav. Immun.* 69, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.008>
- Juruena MF, Bourne M, Young AH, Cleare AJ. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis dysfunction by early life stress. *Neurosci Lett.* 2021 Aug 10;759:136037. doi: 10.1016/j.neulet.2021.136037. Epub 2021 Jun 8. PMID: 34116195.
- Kaur, C., Rathnasamy, G., Ling, E.A., 2017. Biology of microglia in the developing brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 76, 736–753. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlx056>
- Kestering-Ferreira, E., Tractenberg, S.G., Lumertz, F.S., Orso, R., Creutzberg, K.C., Wearick-Silva, L.E., Viola, T.W., Grassi-Oliveira, R., 2021. Long-term Effects of Maternal Separation on Anxiety-Like Behavior and Neuroendocrine Parameters in Adult Balb/c Mice. *Chronic Stress* 5. <https://doi.org/10.1177/24705470211067181>
- Kuhn, M., Scharfenort, R., Schümann, D., Schiele, M.A., Münsterkötter, A.L., Deckert, J.,

- Domschke, K., Haaker, J., Kalisch, R., Pauli, P., Reif, A., Romanos, M., Zwanzger, P., Lonsdorf, T.B., 2015. Social Cognitive and Affective Neuroscience Advance Access published November 13 , 2015.
- Kyoung Eun Joung, Kyung-Hee Park, Lesya Zaichenko, Ayse Sahin-Efe, Bindiya Thakkar, Mary Brinkoetter, Nicole Usher, Dorothy Warner, Cynthia R. Davis, Judith A. Crowell, Christos S. Mantzoros, Early Life Adversity Is Associated With Elevated Levels of Circulating Leptin, Irisin, and Decreased Levels of Adiponectin in Midlife Adults, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 99, Issue 6, 1 June 2014, Pages E1055–E1060, <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3669>
- Lajud N, Torner L. Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. *Front Mol Neurosci*. 2015 Feb 13;8:3. doi: 10.3389/fnmol.2015.00003. PMID: 25741234; PMCID: PMC4327304.
- Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutiérrez-Ospina, G., Torner, L., 2012. 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* 37, 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.07.011>
- Leventopoulos, M., Rüedi-Bettschen, D., Knuesel, I., Feldon, J., Pryce, C.R., Opacka-Juffry, J., 2007. Long-term effects of early life deprivation on brain glia in Fischer rats. *Brain Res*. 1142, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.039>
- Loi M, Koricka S, Lucassen PJ, Joëls M. Age- and sex-dependent effects of early life stress on hippocampal neurogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014 Feb 20;5:13. doi: 10.3389/fendo.2014.00013. PMID: 24600436; PMCID: PMC3929839.
- Loi, M., Mossink, J.C.L., Meerhoff, G.F., Den Blaauwen, J.L., Lucassen, P.J., Joëls, M., 2017. Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents. *Neuroscience* 342, 101–119. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.024>
- Lu, S., Xu, R., Cao, J., Yin, Y., Gao, W., Wang, D., Wei, Z., Hu, S., Huang, M., Li, L., Xu, Y., 2019. The left dorsolateral prefrontal cortex volume is reduced in adults reporting childhood trauma independent of depression diagnosis. *J. Psychiatr. Res.* 112, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.02.014>
- Maccari, S., Krugers, H.J., Morley-Fletcher, S., Szyf, M., Brunton, P.J., 2014. The consequences of early-life adversity: Neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *J. Neuroendocrinol.* 26, 707–723. <https://doi.org/10.1111/jne.12175>
- Malcon, L.M.C., Wearick-Silva, L.E., Zaparte, A., Orso, R., Luft, C., Tractenberg, S.G., Donadio, M.V.F., de Oliveira, J.R., Grassi-Oliveira, R., 2020. Maternal separation induces long-term oxidative stress alterations and increases anxiety-like behavior of male Balb/cJ mice. *Exp. Brain Res.* 238, 2097–2107. <https://doi.org/10.1007/s00221-020-05859-y>
- Maras, P.M., Baram, T.Z., 2015. Early-Life Stress: Rodent Models, Lessons and Challenges.

- Neuroendocrinol. Stress 265–286. <https://doi.org/10.1002/9781118921692.ch12>
- Marchisella, F., Creutzberg, K.C., Begni, V., Sanson, A., Wearick-Silva, L.E., Tractenberg, S.G., Orso, R., Kestering-Ferreira, É., Grassi-Oliveira, R., Riva, M.A., 2021. Exposure to Prenatal Stress Is Associated With an Excitatory/Inhibitory Imbalance in Rat Prefrontal Cortex and Amygdala and an Increased Risk for Emotional Dysregulation. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.653384>
- Markham, J.A., Mullins, S.E., Koenig, J.I., 2013. Periadolescent maturation of the prefrontal cortex is sex-specific and is disrupted by prenatal stress. *J. Comp. Neurol.* 521, 1828–1843. <https://doi.org/10.1002/cne.23262>
- Marrocco J, Gray JD, Kogan JF, Einhorn NR, O'Conneide EM, Rubin TG, Carroll TS, Schmidt EF, McEwen BS. Early Life Stress Restricts Translational Reactivity in CA3 Neurons Associated With Altered Stress Responses in Adulthood. *Front Behav Neurosci.* 2019 Jul 11;13:157. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00157. PMID: 31354448; PMCID: PMC6637287.
- McEwen BS, Nasca C, Gray JD. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology.* 2016 Jan;41(1):3- 23. doi: 10.1038/npp.2015.171. Epub 2015 Jun 16. PMID: 26076834; PMCID: PMC4677120.
- Miller AL, Lumeng JC. Pathways of Association from Stress to Obesity in Early Childhood. *Obesity (Silver Spring).* 2018 Jul;26(7):1117-1124. doi: 10.1002/oby.22155. Epub 2018 Apr 14. PMID: 29656595.
- Miragaia AS, de Oliveira Wertheimer GS, Consoli AC, Cabbia R, Longo BM, Girardi CEN, Suchecki D. Maternal Deprivation Increases Anxiety- and Depressive-Like Behaviors in an Age-Dependent Fashion and Reduces Neuropeptide Y Expression in the Amygdala and Hippocampus of Male and Female Young Adult Rats. *Front Behav Neurosci.* 2018 Aug 7;12:159. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00159. PMID: 30131681; PMCID: PMC6090069.
- Molet, J., Maras, P.M., Avishai-Eliner, S., Baram, T.Z., Edu, T., 2014. Naturalistic Rodent Models of Chronic Early-Life Stress HHS Public Access INTRODUCTION: A RATIONALE FOR NATURALISTIC MODELS OF. *Dev Psychobiol* 56, 1675–1688. <https://doi.org/10.1002/dev.21230.Naturalistic>
- Monninger, M., Kraaijenvanger, E.J., Pollok, T.M., Boecker-Schlier, R., Jennen-Steinmetz, C., Baumeister, S., Esser, G., Schmidt, M., Meyer-Lindenberg, A., Laucht, M., Brandeis, D., Banaschewski, T., Holz, N.E., 2020. The Long-Term Impact of Early Life Stress on Orbitofrontal Cortical Thickness. *Cereb. Cortex* 30, 1307–1317. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz167>
- Muhammad, A., Carroll, C., Kolb, B., 2012. Stress during development alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and prefrontal cortex. *Neuroscience* 216, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.041>
- Muhammad, A., Kolb, B., 2011. Maternal separation altered behavior and neuronal spine density without influencing amphetamine sensitization. *Behav. Brain Res.* 223, 7–16.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.015>

- Mychasiuk, R., Gibb, R., Kolb, B., 2012. Prenatal stress alters dendritic morphology and synaptic connectivity in the prefrontal cortex and hippocampus of developing offspring. *Synapse* 66, 308–314. <https://doi.org/10.1002/syn.21512>
- Naninck EF, Hoeijmakers L, Kakava-Georgiadou N, Meesters A, Lazic SE, Lucassen PJ, Korosi A. Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice. *Hippocampus*. 2015 Mar;25(3):309-28. doi: 10.1002/hipo.22374. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25269685.
- Nishi, M., 2020. Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21197212>
- Nishi, M., Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., Matsunaga, W., 2013. Effects of early life stress on brain activity: Implications from maternal separation model in rodents. *Gen. Comp. Endocrinol.* 181, 306–309. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.09.024>
- Nusslock R, Miller GE. Early-Life Adversity and Physical and Emotional Health Across the Lifespan: A Neuroimmune Network Hypothesis. *Biol Psychiatry*. 2016 Jul 1;80(1):23-32. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.05.017. Epub 2015 Jun 4. PMID: 26166230; PMCID: PMC4670279.
- Parrish, C. P.J. Surkan, S.S. Martins, W.F. Gattaz, L.H. Andrade, M.C. Viana. Childhood adversity and adult onset of hypertension and heart disease in São Paulo, Brazil. *Prev. Chronic Dis.*, 10 (2013), 10.5888/pcd10.130193
- Pascal Bielefeld, Maralinde R. Abbink, Anna R. Davidson, Niels Reijner, Oihane Abiega, Paul J. Lucassen, Aniko Korosi & Carlos P. Fitzsimons (2021) Early life stress decreases cell proliferation and the number of putative adult neural stem cells in the adult hypothalamus, *Stress*, 24:2, 189-195, DOI: 10.1080/10253890.2021.1879787
- Pervanidou P, Agorastos A, Kolaitis G, Chrousos GP. Neuroendocrine responses to early life stress and trauma and susceptibility to disease. *Eur J Psychotraumatol*. 2017 Sep 29;8(sup4):1351218. doi: 10.1080/20008198.2017.1351218. PMCID: PMC5632771.
- Reshetnikov, V., Ryabushkina, Y., Kovner, A., Lepeshko, A., Bondar, N., 2020. Repeated and single maternal separation specifically alter microglial morphology in the prefrontal cortex and neurogenesis in the hippocampus of 15-day-old male mice. *Neuroreport* 1256–1264. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001544>
- Ruiz R, Roque A, Pineda E, Licon-Limón P, José Valdéz-Alarcón J, Lajud N. Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinology*. 2018 Oct;96:203-211. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.07.012. Epub 2018 Jul 18. PMID: 30048914.
- S. Su, X. Wang, J.S. Pollock, F.A. Treiber, X. Xu, H. Snieder, W.V. McCall, M. Stefanek, G.A. Harshfield. Adverse childhood experiences and blood pressure trajectories from childhood to young adulthood: the Georgia stress and heart study. *Circulation*, 131 (2015), pp. 1674-1681, 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013104

- Sadeghi M, Peeri M, Hosseini MJ. Adolescent voluntary exercise attenuated hippocampal innate immunity responses and depressive-like behaviors following maternal separation stress in male rats. *Physiol Behav.* 2016 Sep 1;163:177-183. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.05.017. Epub 2016 May 13. PMID: 27184238.
- Sanacora, G., Treccani, G., Popoli, M., 2012. Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62, 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.036>
- Schmidt, M. V., Wang, X.D., Meijer, O.C., 2011. Early life stress paradigms in rodents: Potential animal models of depression? *Psychopharmacology (Berl)*. 214, 131– 140. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2096-0>
- Schwarz, J.M., Sholar, P.W., Bilbo, S.D., 2012. Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *J. Neurochem.* 120, 948–963. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07630.x>
- Silva-Gómez, A.B., Rojas, D., Juárez, I., Flores, G., 2003. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. *Brain Res.* 983, 128–136. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)03042-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)03042-7)
- Slopen, N.K.C. Koenen, L.D. Kubzansky. Childhood adversity and immune and inflammatory biomarkers associated with cardiovascular risk in youth: a systematic review. *Brain. Behav. Immun.*, 26 (2012), pp. 239-250, 10.1016/j.bbi.2011.11.003
- Spyrka, J., Gugula, A., Rak, A., Tylko, G., Hess, G., Blasiak, A., 2020. Early life stress- induced alterations in the activity and morphology of ventral tegmental area neurons in female rats. *Neurobiol. Stress* 13, 100250. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100250>
- Takatsuru, Y., Nabekura, J., Ishikawa, T., Kohsaka, S. ichi, Koibuchi, N., 2015. Early-life stress increases the motility of microglia in adulthood. *J. Physiol. Sci.* 65, 187–194. <https://doi.org/10.1007/s12576-015-0361-z>
- Vaiserman A.M.. Epigenetic programming by early-life stress: evidence from human populations. *Dev. Dyn* (2014), 10.1002/dvdy.24211
- van Bodegom M, Homberg JR, Henckens MJAG. Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Front Cell Neurosci.* 2017 Apr 19;11:87. doi: 10.3389/fncel.2017.00087. PMID: 28469557; PMCID: PMC5395581.
- Wang, HT., Huang, FL., Hu, ZL. et al. Early-Life Social Isolation-Induced Depressive-Like Behavior in Rats Results in Microglial Activation and Neuronal Histone Methylation that Are Mitigated by Minocycline. *Neurotox Res* 31, 505–520 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9696-3>
- Waters, R.C., Gould, E., 2022. Early Life Adversity and Neuropsychiatric Disease: Differential Outcomes and Translational Relevance of Rodent Models. *Front. Syst. Neurosci.* 16. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2022.860847>

- Wei F, Zhang L, Ma B, Li W, Deng X, Zheng T, Wang X, Jing Y. Oxytocin system driven by experiences modifies social recognition and neuron morphology in female BALB/c mice. *Peptides*. 2021 Dec;146:170659. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170659. Epub 2021 Sep 24. PMID: 34571057.
- Wei L, Hao J, Kaffman A. Early life stress inhibits expression of ribosomal RNA in the developing hippocampus. *PLoS One*. 2014 Dec 17;9(12):e115283. doi: 10.1371/journal.pone.0115283. PMID: 25517398; PMCID: PMC4269428.
- Yamawaki, Y., Nishida, M., Harada, K., Akagi, H., 2018. Data on the effect of maternal separation coupled with social isolation in a forced swim test and gene expression of glial fibrillary acid protein in the prefrontal cortex of rats. *Data Br.* 18, 496–500. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.03.055>
- Yang, H B.-Z., Zhang, W. Ge, N. Weder, H. Douglas-Palumberi, F. Perepletchikova, J. Gelernter, J. Kaufman. Child abuse and epigenetic mechanisms of disease risk. *Am. J. Prev. Med.*, 44 (2013), pp. 101-107, 10.1016/j.amepre.2012.10.012
- Yang, S., Cheng, Y., Mo, Y., Bai, Y., Shen, Z., Liu, F., Li, N., Jiang, L., Chen, W., Lu, Y., Sun, X., Xu, X., 2017. Childhood maltreatment is associated with gray matter volume abnormalities in patients with first-episode depression. *Psychiatry Res. - Neuroimaging* 268, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2017.07.005>
- Zulma, D., Carlos, C.-M.J., Luz, T., 2017. Global Effects of Early Life Stress on Neurons and Glial Cells. *Curr. Pharm. Des.* 23, 6042–6049. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170224111641>

ESTUDO 2

1 JUSTIFICATIVA

Inúmeros estudos com humanos e roedores se propuseram a investigar os efeitos da exposição ao ELS no desenvolvimento de psicopatologias e alterações cognitivas a longo prazo. Diversos dados da literatura, animais e humanos, evidenciam o papel da exposição ao estresse precoce no aumento do risco de desenvolvimento de transtornos de humor do tipo depressivo e ansioso. Entretanto ainda existem lacunas para compreender os mecanismos neurobiológicos relacionados com tais alterações comportamentais. Foi demonstrado que essa exposição acarreta desregulações do eixo HPA – principal eixo na resposta ao estresse – alterando a responsividade do mesmo na idade adulta. Além disso, uma variedade de estudos mostrou que o ELS produz efeitos específicos ao sexo, com cada gênero respondendo de maneiras diferentes, dependendo das idades em que os estressores iniciais ocorreram.

Dessa maneira, conhecer as bases morfofisiológicas que estão potencialmente envolvidas na resiliência ou susceptibilidade pode abrir caminhos para identificar os fatores de risco biológicos que tornam determinados indivíduos especialmente vulneráveis a transtornos relacionados ao estresse, bem como aprimorar métodos de prevenção e tratamento de distúrbios neuropsiquiátricos como a depressão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações comportamentais e morfofisiológicas em regiões do cérebro envolvidas nos comportamentos do tipo depressivo e ansioso (CPF, hipocampo e amígdala), em camundongos machos e fêmeas expostos a um modelo combinado de estresse precoce (“*Limited bedding*” + separação materna, LBSM) durante o início da fase adulta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) A indução do estresse através do modelo combinado de ELS, “*Limited bedding*” concomitantemente com a separação materna (LBSM), nos grupos ELS, em camundongos de ambos os sexos da linhagem Balb/cJ;
- b) Investigar o efeito da exposição ao modelo combinado de estresse precoce sobre o comportamento do tipo depressivo e ansioso nas seguintes tarefas: preferência a sacarose, campo aberto, teste claro/escuro, labirinto em cruz elevado e nado forçado;
- c) Avaliar volumes e espessuras teciduais, assim como densidade neuronal, glial e relação glia/neurônio em diferentes regiões corticais e do sistema límbico utilizando a técnica de coloração de Nissl avaliada por técnicas estereológicas e de análise de imagens por morfometria planar, em animais controle e submetidos ao protocolo ELS de ambos os sexos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO

O presente projeto constitui uma parceria entre o *Developmental Cognitive Neuroscience Lab*, coordenado pelo Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira, da Escola de Medicina da PUCRS, e o Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, coordenado pelo Prof. Dr. Léder Leal Xavier, da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da PUCRS. Os procedimentos previstos neste projeto foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, no *Developmental Cognitive Neuroscience Lab*, no Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) e no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM).

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto ocorreu em parceria com o *Developmental Cognitive Neuroscience Lab*, coordenado pelo Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira, da Escola de Medicina da PUCRS. Os animais foram provenientes do projeto “Efeito do estresse precoce sobre o uso agudo de dietilpropiona em camundongos adolescentes machos”, o qual foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da PUCRS, sob protocolo: 10775 (Anexo A). Todos os procedimentos que envolvem manuseio e eutanásia dos animais estão de acordo com as regulamentações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e a Lei 11.794 de 8 de setembro de 2008 (Lei Arouca) sobre o uso científico de animais. Os procedimentos desenvolvidos neste projeto foram realizados de acordo com a orientação do CEUA – PUCRS.

3.3 ANIMAIS

Os animais foram obtidos da colônia do CeMBE - PUCRS. Foram utilizados 24 camundongos da linhagem BALB/cJ, heterogênicos, machos e fêmeas, desde o seu nascimento. Os animais foram mantidos no biotério da PUCRS, sob temperatura controlada de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ em gaiolas ventiladas em ciclo claro-escuro de 12h/12h. Alimentação e água ficaram disponíveis *ad libitum* durante todo o experimento. Os camundongos foram criados internamente para evitar qualquer estresse associado ao transporte dos animais. O procedimento de acasalamento consisti em agrupar duas fêmeas e um macho na mesma caixa por três dias. Após duas semanas,

as fêmeas foram separadas em caixas individuais e inspecionadas até a presença dos filhotes. A data de nascimento foi designada como dia pós-natal 0 (DPN 0). Após o nascimento, foi realizado o procedimento de *cross-fostering* e as ninhadas foram controladas para que tenham de 6-8 filhotes. As ninhadas foram então randomicamente separadas para serem expostas a condição de animais controle ou ELS.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 2 grupos (controle e ELS) para ambos os sexos: machos controle (n=6), fêmeas controle (n=6), machos ELS (n=6) e fêmeas ELS (n=6). Todos os procedimentos abaixo descritos foram realizados com o cuidado de minimizar o sofrimento e o número de animais utilizados.

Após o período de acasalamento e o nascimento dos filhotes, as ninhadas foram aleatoriamente designadas para os grupos CTL, e os grupos ELS. As ninhadas foram desmamadas no DPN 21. Após o desmame, três filhotes do mesmo sexo e do mesmo protocolo de criação foram agrupados por gaiola. Para evitar potenciais efeitos da ninhada, um máximo de dois filhotes por ninhada foi usado neste estudo. Os camundongos foram testados do DPN 60 ao DPN 64 e foram sacrificados após o último teste comportamental para coleta dos encéfalos. O projeto experimental é resumido na Figura 3.

Antes da realização dos testes comportamentais, foi realizado um esfregaço vaginal em todas as fêmeas para determinação da fase do ciclo estral em que se encontram. A determinação do ciclo estral é de grande importância em procedimentos de pesquisa, pois, ajuda a evitar uma série de vieses devido a alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo e permite conseguir grupo mais homogêneo (187). Portanto, os testes comportamentais foram realizados, no caso das fêmeas, sempre na mesma fase do ciclo estral, para evitar possíveis variações nos resultados.

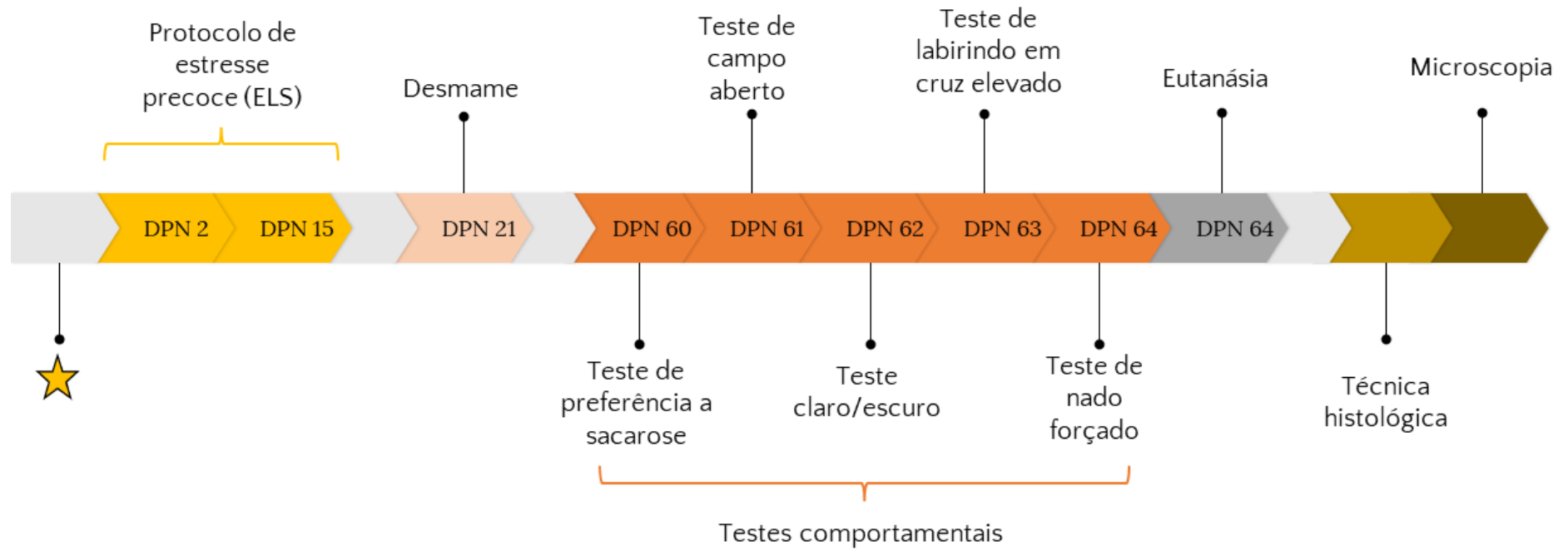


Figura 3 - Linha do tempo demonstrando o desenho experimental.
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

3.5 PROTOCOLO DE ESTRESSE PRECOCE (ELS)

O modelo de ELS utilizado consiste na combinação do protocolo de Limited Bedding concomitantemente com a Separação Materna (LBSM) (Figura 4). O protocolo de LB promove um ambiente com recursos reduzidos, o que dificulta o cuidado maternal e promove a exposição ao estresse na fase inicial do desenvolvimento (52). O protocolo de SM foi realizado concomitantemente com o modelo LB, do DPN 2 até o DPN 15 (188). Durante o protocolo de LB, uma malha de alumínio separa os filhotes e a mãe da maravalha na base da caixa residência, impedindo o uso da maravalha para a construção do ninho (52). Uma pequena quantidade de maravalha convencional foi adicionada somente para cobrir o fundo da caixa e conter os dejetos dos animais. Sobre a malha de alumínio somente 1g de algodão foi fornecida para a construção do ninho (189). Os filhotes do grupo ELS foram retirados de suas caixas moradia e acondicionados em novas caixas moradia de acordo com o protocolo de separação materna, uma vez ao dia, durante 3h, das 9h até as 12h. Os filhotes foram alojados individualmente em pequenas caixas plásticas com maravalha, as quais foram mantidas sobre uma manta térmica elétrica com temperatura de 34°C. Considerando que a vocalização entre mãe e filhote pode atenuar os efeitos da separação materna, os filhotes foram mantidos em uma sala diferente durante a duração do protocolo. Os animais do grupo controle não foram movidos de suas caixas. A partir do DPN 15 o protocolo de manutenção de caixas foi realizado igual ao grupo controle. As caixas residência dos animais em condição controle continham a quantidade padrão de maravalha e não possuíam a malha de alumínio. As caixas de todos os grupos experimentais foram trocadas semanalmente.

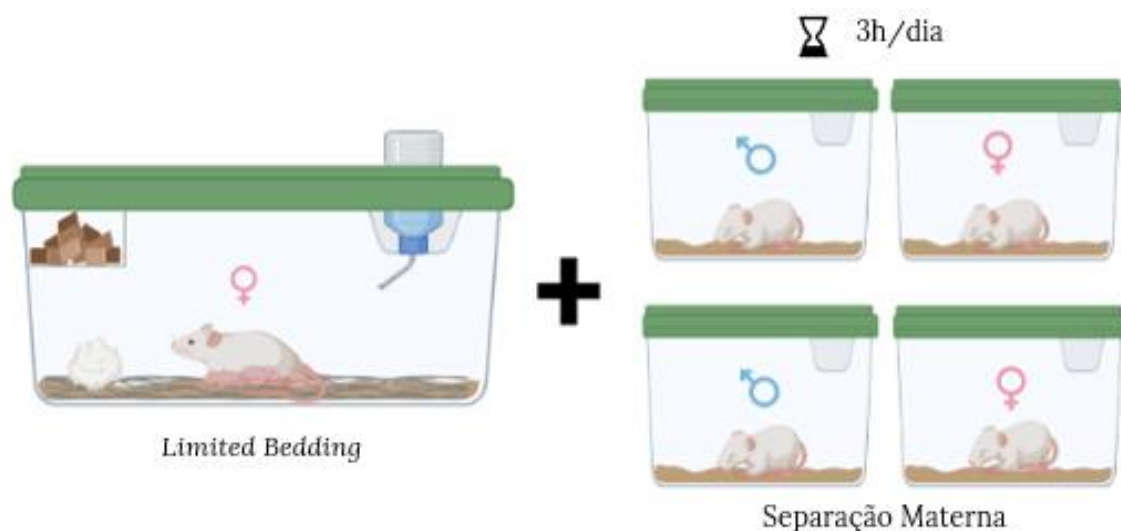


Figura 4 - Exemplificação do protocolo de ELS.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.6.1 Teste de preferência a sacarose

Com o intuito de avaliar o grau de depressão desses animais, foi realizado um teste de preferência a sacarose. O teste consistiu em introduzir duas garrafas na caixa moradia, uma com água potável e a outra com uma solução de sacarose a 1%. Ambas as garrafas foram deixadas de um dia para o outro. Ao final do teste, o consumo de cada garrafa foi calculado e tivemos como resultado a razão do consumo (consumo sacarose / consumo água) por caixa (190). A anedonia é um sintoma característico de depressão, definido como a incapacidade de sentir prazer diante de um estímulo prazeroso. Em murinos, a ingestão de soluções adocicadas, normalmente, está associada a um comportamento prazeroso, portanto, a preferência por água ao invés da solução de sacarose mostra um estado depressivo.

A preferência relativa por sacarose foi calculada como:

$$\text{Preferência de sacarose (\%)} = \frac{\text{Peso solução de sacarose (g)}}{\text{Peso solução de sacarose (g)} + \text{peso da água (g)}} \times 100\%$$

3.6.2 Teste de campo aberto (OF)

Com o intuito de avaliar o grau de ansiedade desses animais, foi realizado um teste de campo aberto. O teste consistiu em uma arena de acrílico transparente, medindo 30 de altura por 30 cm de raio. A base da estrutura é de cor preta para contrastar com a cor do animal. Os animais foram colocados em um canto da arena para iniciar o teste, e então tiveram o seu comportamento filmado durante 10 minutos. Usando o *software ANY-MAZE*, a arena foi dividida em 16 quadrados iguais, os quatro quadrados centrais foram considerados a zona central e os quadrados restantes foram considerados a zona periférica (192). A distância total percorrida (em metros) e o tempo gasto em cada zona (em segundos) foram avaliados. A redução do tempo na zona central e menos entradas na zona central estão associadas a um aumento do comportamento do tipo ansiedade.

3.6.3 Teste claro/escuro (LD)

Com o intuito de avaliar o grau de ansiedade desses animais, foi realizado um teste claro/escuro. Trata-se de um aparato o qual consiste em duas câmaras de acrílico ($21 \times 21 \times 20$ cm), uma câmara clara e uma câmara preta, conectadas por uma porta aberta (193). Os animais foram colocados na câmara clara, onde puderam explorar livremente todo o aparelho e tiveram o seu comportamento filmado durante 10 minutos. O tempo gasto em cada câmara, o número de transições entre as câmaras e o número de “*espiadas*” entre a câmara escura e clara foram analisados. A redução do tempo gasto na zona clara e do número de transições está associada a um aumento do comportamento do tipo ansiedade. Além disso, ocorre uma exploração horizontal de cabeça quando o animal explora uma câmara diferente do aparelho através da porta de conexão, o que é considerado um comportamento de avaliação de risco.

3.6.4 Labirinto em cruz elevado (EPM)

Com o intuito de avaliar o grau de ansiedade desses animais, foi realizado um teste de labirinto em cruz elevado. Trata-se de um aparato de acrílico preto, o qual fica a uma distância de 50 cm do solo, sendo composto por dois braços abertos (30×5 cm cada) e dois braços fechados (30×5 cm, com parede de 15 cm cada). Os animais foram colocados no centro do labirinto encabeçando um dos braços abertos e então tiveram o seu comportamento filmado durante 5 minutos (194). A distância total percorrida (m), o tempo gasto em cada braço e o número de entradas em cada braço foram avaliados. Todos os parâmetros foram analisados no *software ANY-MAZE*. A diminuição do tempo nos braços abertos e menos entradas nos braços abertos estão associados ao aumento do comportamento do tipo ansiedade. Além disso, um mergulho de cabeça no braço aberto para investigar sob o labirinto é considerado um comportamento de avaliação de risco.

3.6.5 Teste de nado forçado (FS)

Com o intuito de avaliar o grau de depressão desses animais, foi realizado um teste de nado forçado. O teste consiste em um cilindro inescapável, com 20 cm de diâmetro, preenchido com água a uma temperatura de $26 \pm 2,0$ °C, onde o animal não tem alcance às bordas nem ao fundo. Os animais foram colocados dentro do cilindro e tiveram o seu comportamento filmado durante 5 minutos. Foram calculados o tempo imóvel e o tempo de permanência na periferia e

nas bordas visando avaliar o grau de conformismo do animal (195,196). Este teste quantifica a imobilidade do animal, a qual foi proposta para ser análogo ao “desespero comportamental” observado em depressão. O tempo que o animal gasta na postura de imobilidade é um indicador da aquisição do “desespero comportamental” (197–199).

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

3.7.1 Determinação do ciclo estral das fêmeas

A determinação das fases do ciclo estral das fêmeas foi feita com a avaliação citológica do lavado vaginal (200). Os lavados foram colhidos com o auxílio de uma ponteira contendo aproximadamente 50 µL de água bidestilada estéril. Foi expelido ¼ do volume dessa solução na abertura do canal vaginal, coletado novamente e esse processo foi repetido de 4-5 vezes para obter um número de células suficiente para permitir análise citológica. O lavado extraído foi colocado em uma lâmina de vidro e o esfregaço foi seco naturalmente à temperatura ambiente. Após a secagem, os esfregaços foram corados com corante Violeta Cristal 0,1 % e fixados com glicerol 15 % e lamínula. As lâminas contendo os esfregaços corados foram imediatamente analisadas em microscópio e microfotografias foram tiradas no momento da análise para documentar a citologia observada.

3.7.2 Eutanásia, fixação e seccionamento

No DPN 64 os animais foram anestesiados com uma injeção via intraperitoneal com um coquetel de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Os procedimentos somente foram iniciados após conferência da ausência de reflexo corneal, conforme orientado pela resolução nº714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, de 20 de maio de 2002.

Após a conferência da ausência de reflexo, os animais foram perfundidos transcardialmente com solução salina 0,9% seguida de paraformaldeído (PFA) 4% em TF 0,1 M (pH 7,4). Após a perfusão, os animais foram rapidamente decapitados para a remoção do cérebro. Os cérebros foram extraídos do crânio, mantidos em PFA 4% por 4 horas e crioprotetidos em sacarose 30% por três dias. Os cérebros foram então seccionados em um criostato (Leica) em fatias de 50 µm de espessura. As fatias foram alocadas em lâminas revestidas com gelatina para posterior técnica histológica.

Como mencionado anteriormente, optamos por analisar áreas e circuitos cerebrais que estão associados ao controle da emoção e da memória emocional, como a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal medial (CPFm), os quais passam por processos de reestruturação e maturação durante a fase inicial do desenvolvimento. As regiões analisadas estão localizadas entre o Bregma 2.10 / Interaural 5.90 mm ao Bregma 1.42 mm / Interaural 5.22 mm (CPFm: Cg1 – córtex cingulado, PrL – pré-límbica e IL – infralímbica) e do Bregma -1.46 / Interaural 2.34 mm ao Bregma -1.94 mm / Interaural 1.86 mm (hipocampo: CA1 [camada piramidal], GD [camada molecular] e CA3 [camada piramidal]; e amígdala: BLA - amígdala basolateral).

3.7.3 Coloração de Nissl

Para o método de coloração de Nissl (violeta de cresil), cerca de 5 cortes por região analisada, foram montados em lâminas revestidas com gelatina e secos ao ar por 24 h para garantir a adesão. Em seguida, os cortes foram reidratados e corados com solução de violeta de cresil 0,1% a 36 °C por 10 minutos em tampão acetato. Logo após, os cortes foram desidratados em álcool 95% e depois em 100%; branqueados em xileno e revestidos com Entellan (Merck) e lamínulas.

3.7.4 Medida de volume hipocampal e espessura de camadas hipocampais e corticais

A estimativa de volume do hipocampo dorsal entre os bregmas -1,46 até -2,06 foi realizada por uma adaptação do método de Cavalieri (criado pelo matemático Italiano Francesco “Bonaventura” Cavalieri, no século XVII) associado ao Atlas Neuroanatômico de Paxinos e Watson para camundongos. Basicamente a estimativa de volume hipocampal foi realizada através da projeção ao longo do eixo rostral caudal de medidas da área hipocampal obtidas em 3 seções que caracterizavam anatomicamente os Bregmas -1.46; -1.70; -1.94, sendo essas áreas denominadas A1, A2 e A3, respectivamente. A fórmula que define o volume hipocampal entre esses Bregmas é: Volume hipocampal = (V1) + (V2) + (V3); ou mais especificamente: Volume hipocampal = (A1*0,24 mm) + (A2*0,24 mm) + (A3*0,12 mm).

As áreas (A1, A2 e A3) foram obtidas pelo método de contagem de pontos, inicialmente descrito pelo russo A. A. Glagolev em 1930, em estudos geológicos (201–203). Para determinação da área hipocampal, um grid de cruzeiros com intervalos equidistantes, com um valor de área/ponto (a/p) de 46911 μm^2 , foi colocado sobre as imagens microscópicas

hipocampais obtidas. As cruzes que tinham seu quadrante superior direito tocando a imagem do hipocampo foram contadas. A área hipocampal é produto da seguinte equação:

$$\text{Área} = (a/p) \times \text{número de pontos contados.}$$

As medidas de espessura de camadas hipocampais, como o Corno de Ammon 1 e 3 (CA1 e CA3) e córtex cerebral, foram realizadas por medida de comprimento por morfometria planar simples, em um ângulo reto em relação ao eixo base-topo dessas estruturas.

Todas as análises foram feitas com o auxílio do software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics USA), devidamente calibrado com imagem em microscópio de micrometro objeto obtida de modo totalmente idêntico ao das imagens analisadas, ademais, toda lógica matemática/anatômica/histológica dos resultados foi revisada pela pesquisadora.

3.7.5 Estimativa de densidade neuronal e glial com coloração de Nissl

O número de neurônios e células gliais por mm² foi estimado por análise de imagens com morfometria planar. As imagens foram adquiridas usando um microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Japão) acoplado a uma câmera CCD (Qimaging, modelo MicroPublisher 3.3 RTV) e analisadas no software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, EUA).

Para estimar as densidades neuronal e glial, foram analisadas 5 imagens (20x) por região por animal. Uma área quadrada de interesse (AOI) medindo 160 µm² foi sobreposta em cada imagem. Neurônios e células gliais localizados dentro da AOI, ou interceptados pela borda superior e/ou direita da AOI foram contados. Neurônios e células gliais que foram interceptados pela borda inferior e/ou esquerda da AOI não foram contados (figura 5).

Os neurônios foram identificados por seus núcleos grandes e pálidos (eucromáticos) circundados por um citoplasma corado de violeta. As células gliais foram identificadas pelos núcleos pequenos e escuros (heterocromáticos) e pela ausência de citoplasma corado.

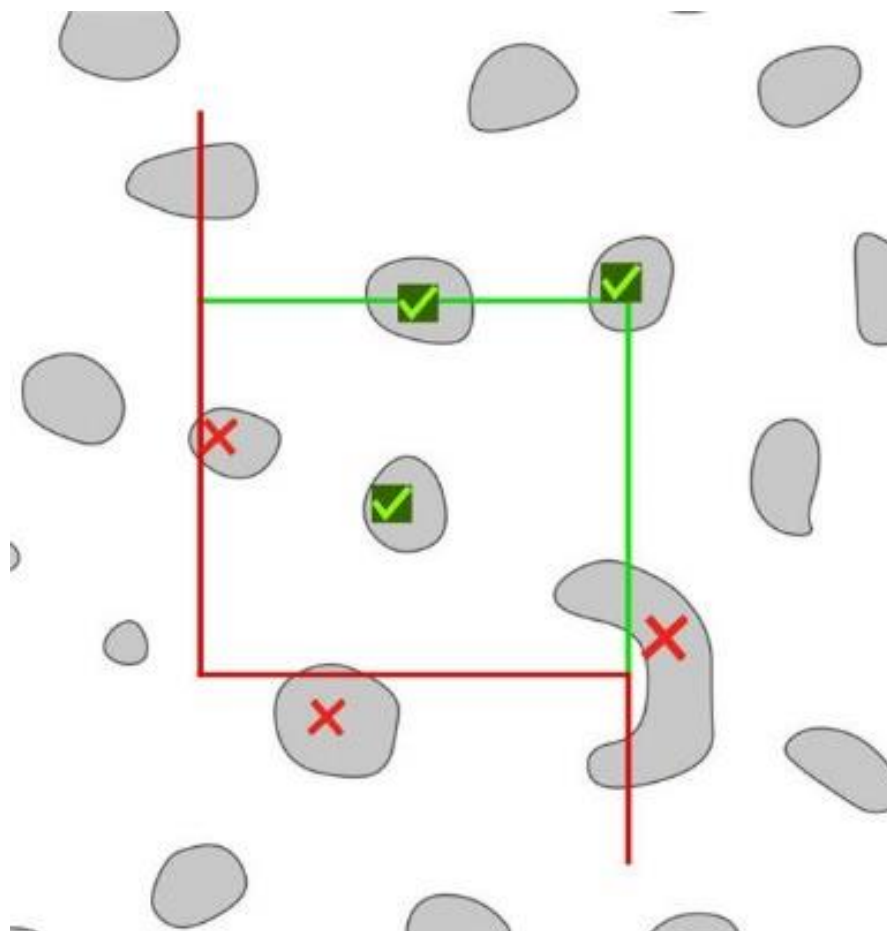


Figura 5 - Esquema ilustrativo representando uma área de interesse (AOI) sobreposta sobre uma imagem histológica digitalizada, onde os traços verdes representam as linhas de inclusão e os traços vermelhos representam as linhas de exclusão.

Fonte: Disponível em: stereology.info. Acesso em: 26 jan. 2023.

4.7 DESCARTE DOS ANIMAIS

O descarte dos animais, após a verificação da morte, seguiu as normas previstas na legislação em vigor no país. No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pela normatização e fiscalização destes procedimentos.

Portanto, os resíduos gerados e as carcaças dos animais-teste serão classificados de acordo com o experimento conduzido. A legislação deverá ser consultada caso a caso. Como procedimento padrão, deverá ser adotada a coleta especializada das carcaças de roedores por empresas com licenças requeridas pela legislação. De acordo com a RDC 306 da ANVISA, a coleta e transporte externos dos resíduos de serviços Uso de Animais de Experimentação e Legislação Correlata: orientações sobre estudos e roedores de saúde devem ser realizados de acordo com as normas NBR 12.810 e NBR 14652 da ABNT. No caso do presente trabalho, o descarte foi realizado pelo CEMBE-PUCRS.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o software estatístico GraphPad Prism versão 9 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados obtidos referente aos testes comportamentais e à histologia foram submetidos a um teste t de *student* para uma comparação entre controle vs. tratamento de ambos os sexos ([macho CTL vs. macho ELS] e [fêmea CTL vs. fêmea ELS]). Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$ para todos os testes descritos.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

5.1.1 Avaliação citológica dos esfregaços vaginais

Antes da realização dos testes comportamentais, foi realizado um esfregaço vaginal em todas as fêmeas para determinação da fase do ciclo estral em que se encontram. A partir das imagens obtidas dos esfregaços vaginais, foi possível determinar a fase do ciclo estral em que estas fêmeas se encontravam no momento da coleta, pois cada fase do ciclo é caracterizada por uma alteração morfológica distinta (200). Todas as fêmeas encontravam-se na fase metaestro, a qual foi constatada pela presença de leucócitos e de células epiteliais escamosas cornificadas (muitas vezes fragmentadas) (figura 6).

Avaliação Citológica de Esfregaços Vaginais

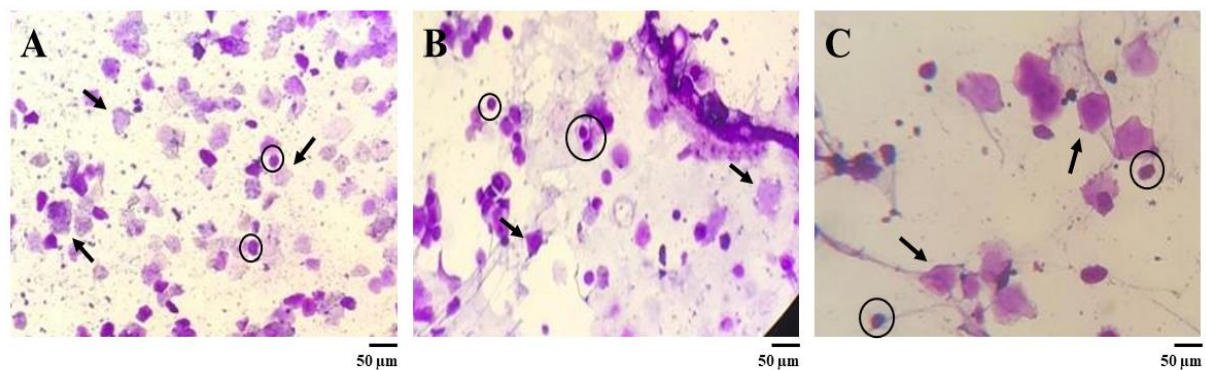


Figura 6 - Avaliação citológica de esfregaços vaginais para identificação do estágio estral das fêmeas. Fêmeas na fase metaestro. Presença de células epiteliais escamosas cornificadas (setas) e leucócitos (círculos).

Fonte: Da autora (2023).

5.1.2 Comportamento anedônico

A presença do comportamento anedônico nos animais foi observada utilizando o teste de preferência a sacarose 1%, o qual não apresentou nenhum resultado significativo (machos, $p=0,502$; fêmeas, $p=0,417$) (figura 7). Entretanto, é possível observar um estado anedônico inicial nestes animais, principalmente nas fêmeas ELS, as quais apresentam uma preferência relativa à sacarose menor que as do grupo controle ($CTL \pm 61\%$; $ELS \pm 55\%$). Se tratando dos machos, ambos os grupos apresentaram uma taxa de preferência à sacarose em torno de 45%,

o que nos mostra também um comportamento anedônico inicial nestes animais, mas de forma mais leve (CTL $\pm$ 42%; ELS $\pm$ 45%).

Preferência a Sacarose

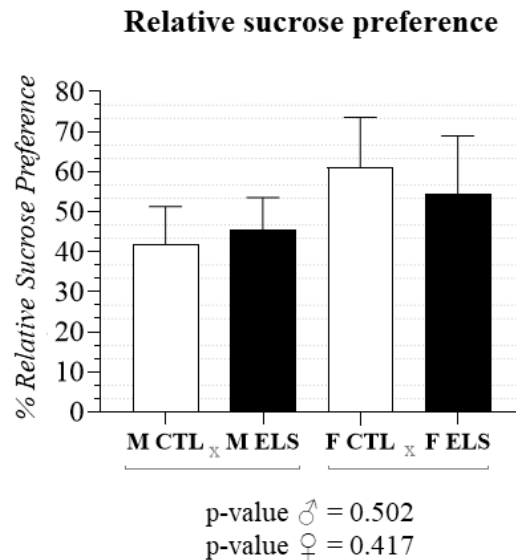


Figura 7 - Gráfico mostrando a preferência relativa à sacarose de machos e fêmeas, dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS) expostos ao estresse precoce. Teste t de *student* (Média $\pm$ DP) ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023).

5.1.3 Comportamento exploratório

O comportamento exploratório dos animais foi avaliado através do teste do campo aberto. Diferenças significativas não foram observadas entre os sexos nos parâmetros relacionados à atividade exploratória (distância total percorrida [machos, $p=0,605$; fêmeas, $p=0,692$], tempo na periferia [machos, $p=0,168$; fêmeas, $p=0,083$] e tempo no centro [machos, $p=0,168$; fêmeas, $p=0,082$]) (figura 8).

Campo Aberto

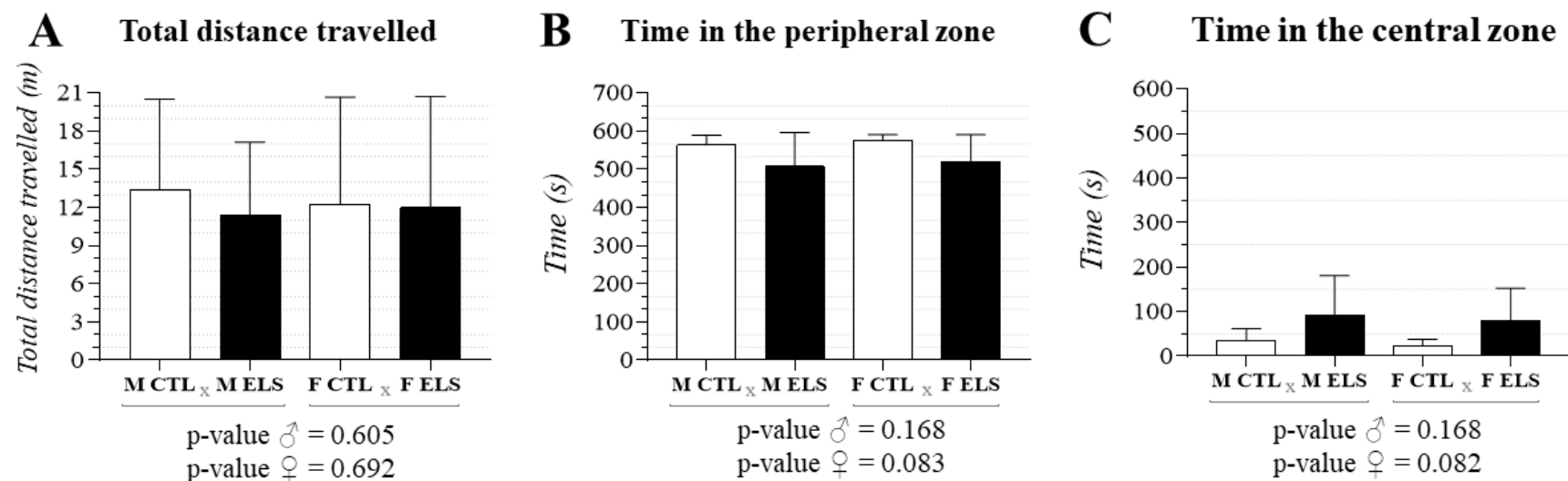


Figura 8 - Gráficos mostrando os resultados do teste de campo aberto em camundongos em machos e fêmeas, dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS) expostos ao estresse precoce. Os seguintes parâmetros foram avaliados: distância total percorrida (em metros) (A), tempo gasto na zona periférica (em segundos) (B) e o tempo gasto na zona central (em segundos) (C). Duração do teste 600 segundos. Teste t de *student* (Média $\pm$ DP) ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023).

5.1.4 Avaliação de risco

O comportamento de avaliação de risco é comumente observado em roedores e pode ser exemplificado no momento de hesitação antes do animal explorar um ambiente novo – quando ele avalia os possíveis riscos de seguir por aquele caminho (205). O padrão de exploração do labirinto em cruz elevado e do teste claro/escuro foi avaliado a fim de se mensurar a avaliação de risco e a consequente tomada de decisão dos animais.

Não houve diferenças significativas entre os grupos controle e estresse de ambos os sexos em nenhum dos parâmetros avaliados no teste da câmara clara/escuro (figura 9). Entretanto, o comportamento dos animais nos braços abertos e fechados diferiu entre as fêmeas dos grupos controle e estressado. Houve diferenças significativas nos animais do sexo feminino, onde as fêmeas do grupo estressado passaram mais tempo explorando os braços abertos (tempo gasto [$p=0,011$] e número de entradas [$p=0,028$]) (figura 10B, E), o centro do aparato ($p=0,019$) (figura 10D) e entraram mais nos braços fechados ($p=0,048$) (figura 10F) em relação ao grupo controle; consequentemente, as fêmeas do grupo controle permaneceram mais tempo nos braços fechados ($p=0,005$) quando comparadas com o grupo estressado (figura 10C). Não houve diferenças significativas entre os machos.

Câmara Clara/Escura

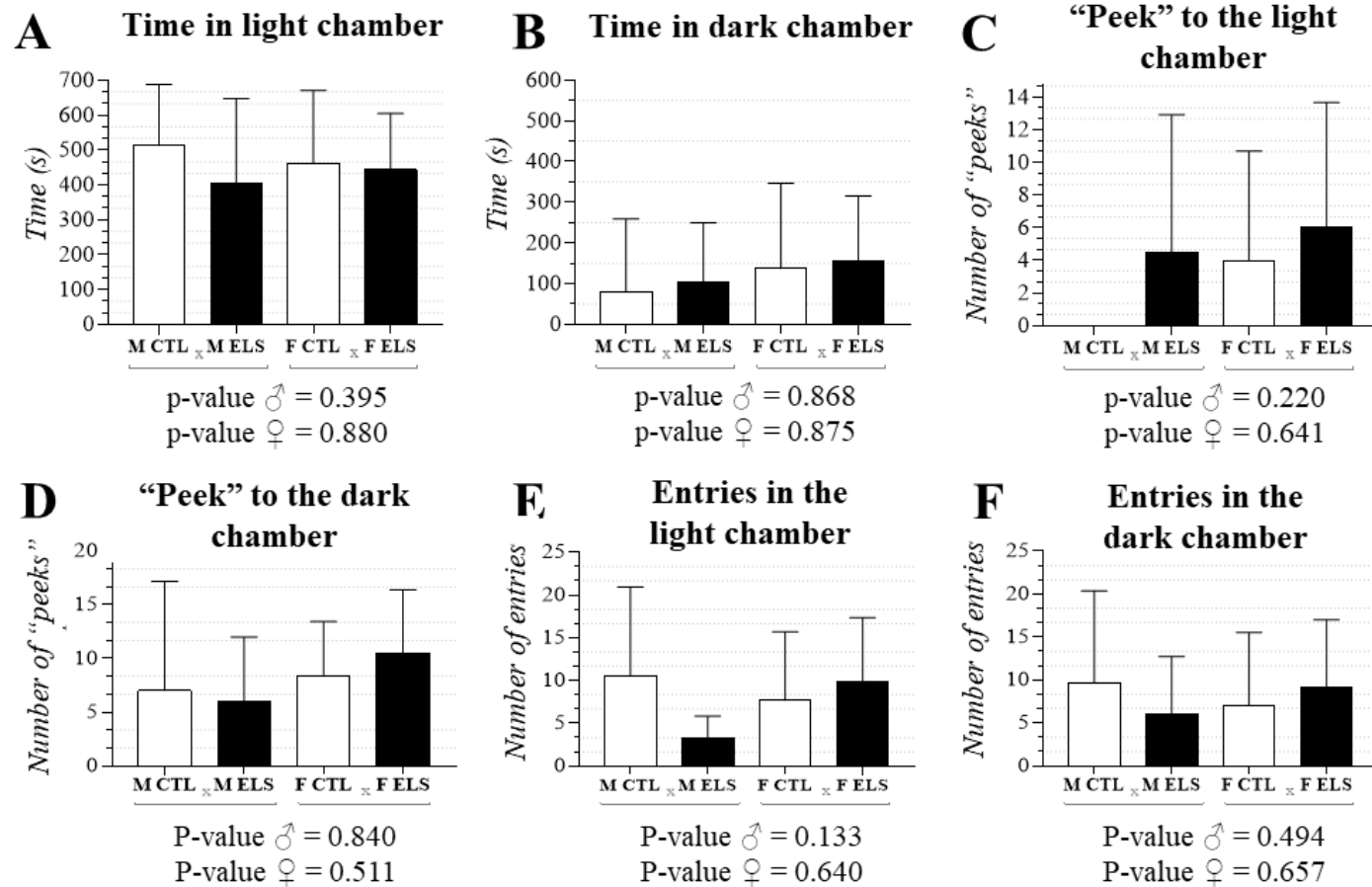


Figura 9 - Gráficos mostrando os resultados do teste de câmara clara/escura em camundongos machos e fêmeas, dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS) expostos ao estresse precoce. Os seguintes parâmetros foram avaliados: tempo na câmara clara (em segundos) (A), tempo na câmara escura (em segundos) (B), número de “espiadas” para a câmara clara (C), número de “espiadas” para a câmara escura (D), número de entradas na câmara clara (E) e número de entradas na câmara escura (F). Duração do teste 600 segundos. Teste t de *student* (Média ± DP) ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023).

Labirinto em Cruz Elevado

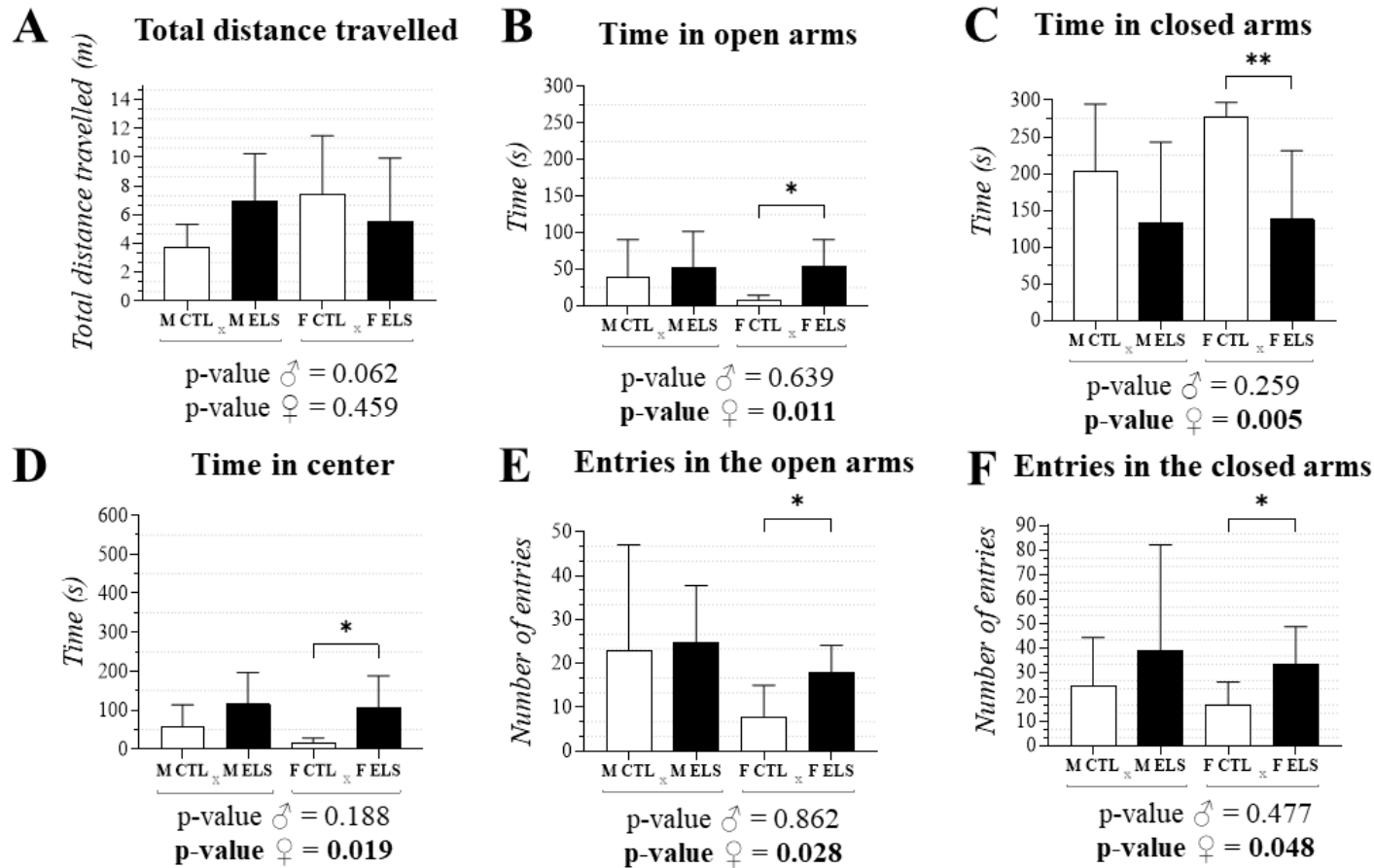


Figura 10 - Gráficos mostrando os resultados do teste do labirinto em cruz elevado em camundongos machos e fêmeas, dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS) expostos ao estresse precoce. Os seguintes parâmetros foram avaliados: distância total percorrida (em metros) (A), tempo nos braços abertos (em segundos) (B), tempo nos braços fechados (em segundos) (C), tempo no centro (em segundos) (D), número de entradas nos braços abertos (E) e número de entradas nos braços fechados (F). Duração do teste 600 segundos. Teste t de *student* (Média ± DP) (*p<0,05; **p<0,01).

Fonte: Da autora (2023).

5.1.5 Grau de conformismo

O grau de conformismo foi avaliado através do teste de nado forçado, o qual quantifica a imobilidade do animal, a qual foi proposta para ser análogo ao “desespero comportamental” observado em depressão. O tempo que o animal gasta na postura de imobilidade é um indicador da aquisição do “desespero comportamental” (197–199). Diferenças significativas não foram observadas entre os sexos nos parâmetros avaliados (figura 11).

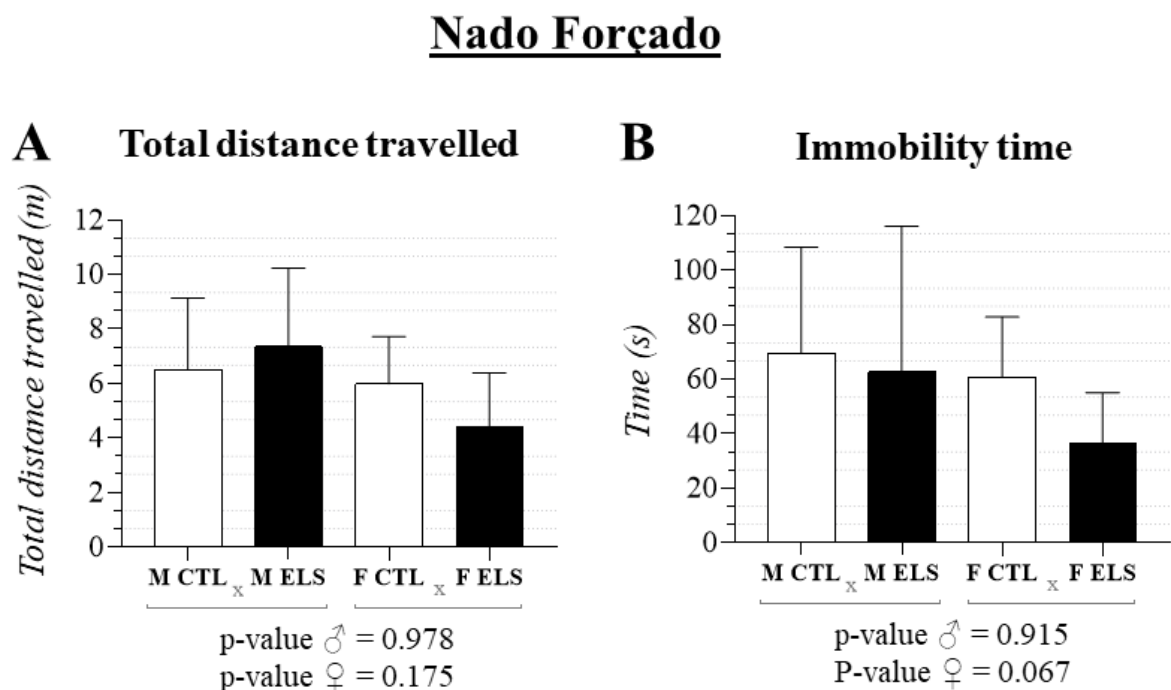


Figura 11 - Gráficos mostrando os resultados do teste de nado forçado em camundongos machos e fêmeas, dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS) expostos ao estresse precoce. Os seguintes parâmetros foram avaliados: distância total percorrida (em metros) (A) e tempo imóvel (em segundos) (B). Teste t de *student* (Média ± DP) ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2023).

5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

5.2.1 Alterações morfológicas

Uma análise comparativa entre o grupo controle e estressado de cada sexo, mostrou um aumento do volume hipocampal nos machos do grupo estressado ($p = 0,011$) em comparação com os do grupo controle. Esse aumento foi mais pronunciado entre os bregmas -1.46 a -1.70 (V_1 , $p = 0,001$) (figura 12A). Em relação à espessura das camadas, foi observado um aumento na camada cortical (S1Tr, *córtex somatossensorial* – Bregma -1.46 / Interaural 2.34 mm ao

Bregma -1.94 mm / Interaural 1.86 mm) dos machos estressados em relação ao grupo controle ($p=0,000006$) (figura 13A). Foi observado também um aumento da camada piramidal do hipocampo (CA1) em ambos os sexos do grupo estressado (machos, $p=0,018$; fêmeas, $p=0,00006$) em comparação com as do grupo controle (figura 13B).

Volume Hipocampal

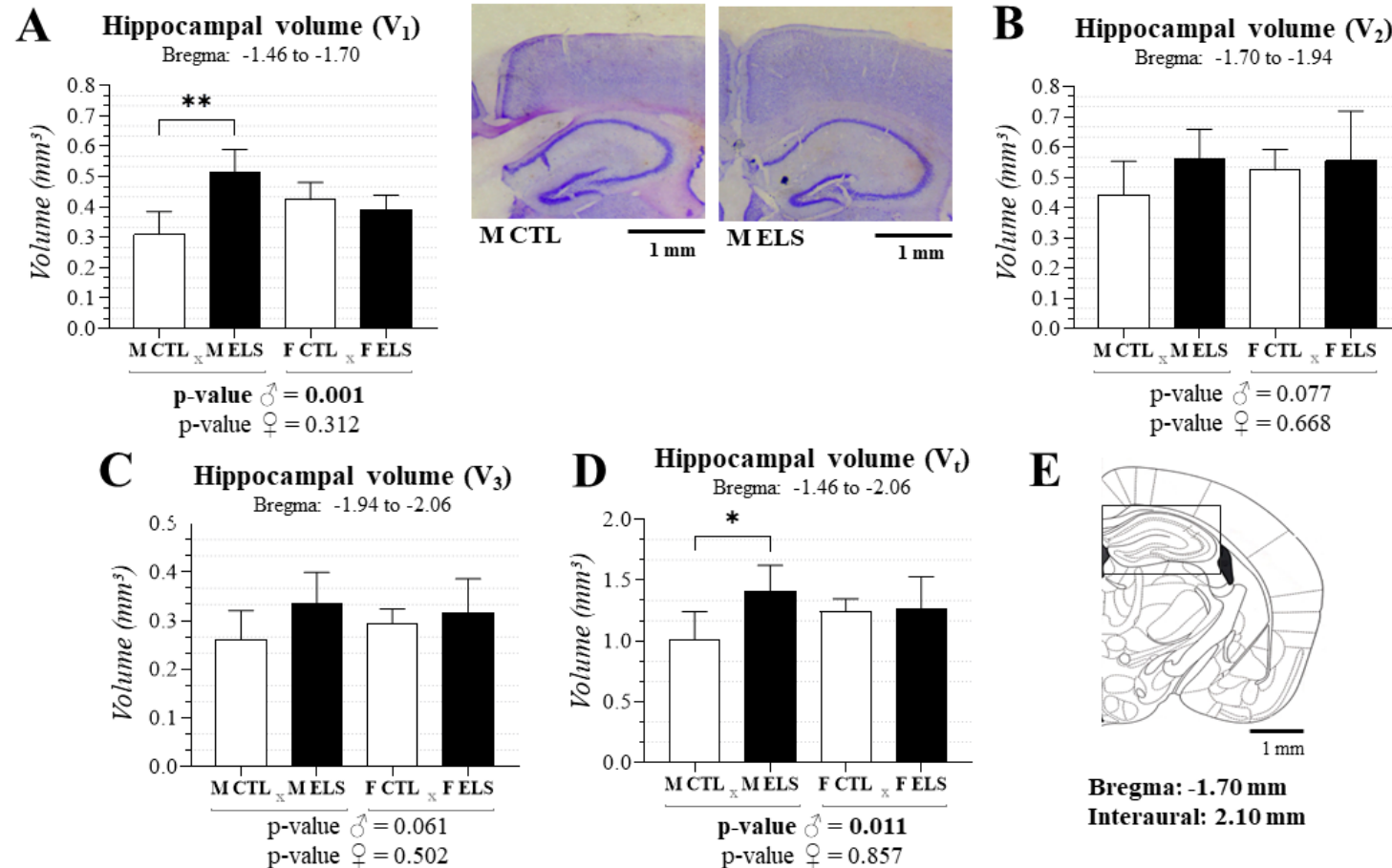


Figura 12 – Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce no volume hipocampal em camundongos machos e fêmeas. Imagens digitalizadas de secções coronais do cérebro coradas com Nissl mostrando o hipocampo de camundongos machos, dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS). A figura mostra a volume hipocampal: A (V₁, bregma -1.46 a -1.70), B (V₂, bregma -1.70 a -1.94), C (V₃, bregma -1.94 a -2.06), D (V_t, volume total, bregma -1.46 a -2.06). O desenho esquemático (E) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). Teste t de *student* (média ± DP) (*p<0,05; **p<0,01).

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

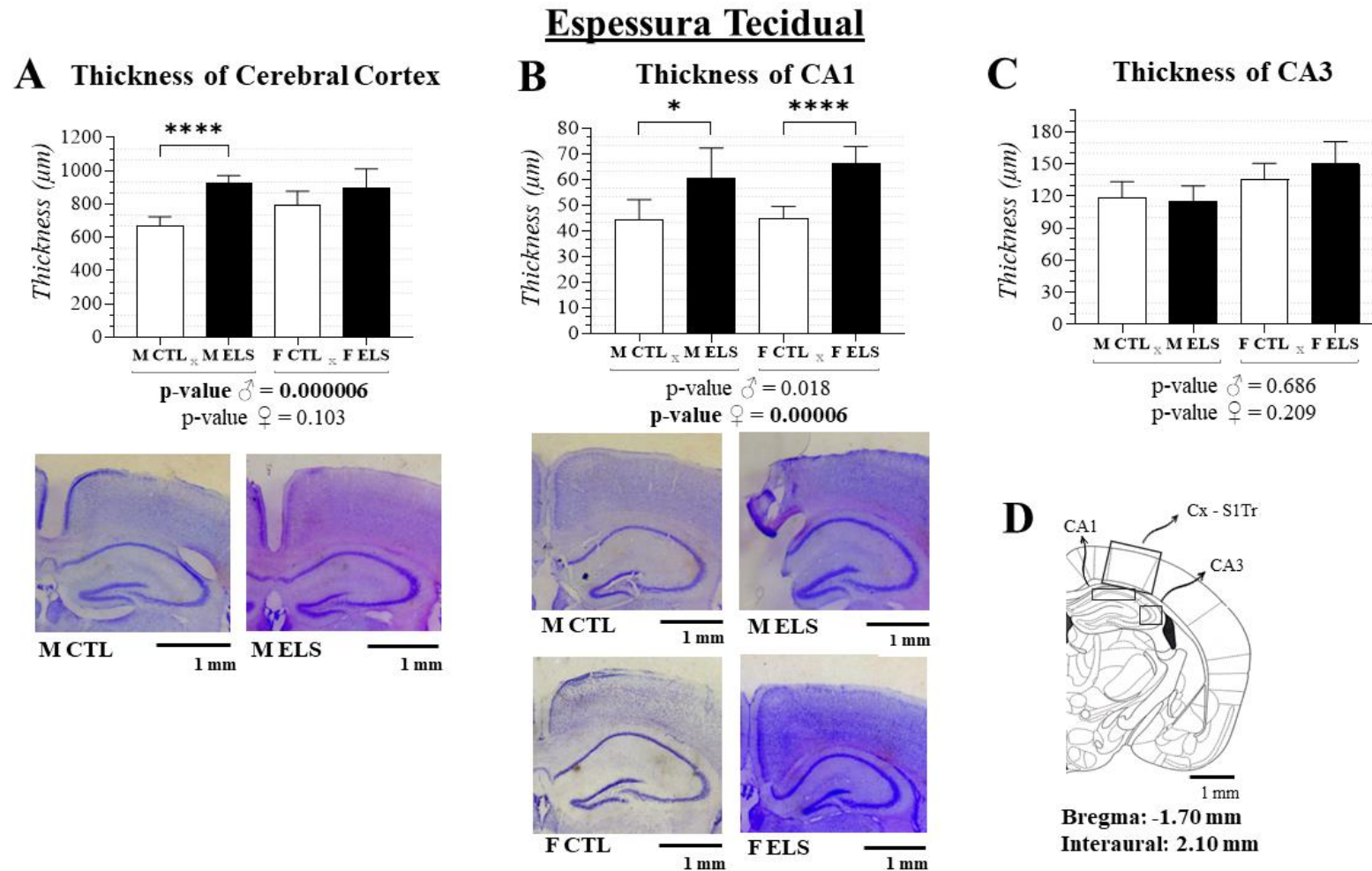


Figura 13 – Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na espessura cortical, dos cornos de Ammon 1 e 3 (CA1 e CA3 respectivamente) em camundongos machos e fêmeas. Imagens digitalizadas de secções coronais do cérebro de camundongos machos e fêmeas coradas com Nissl mostrando o córtex cerebral (S1Tr – córtex somatossensorial) (A) e o hipocampo (camada piramidal do CA1) (B), dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS). O desenho esquemático (D) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). Teste t de *student* (média ± DP) (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0001).

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.2.2 Densidade neuronal e glial

Uma análise comparativa entre os grupos estressado e controle de cada sexo, mostrou uma densidade neuronal cortical diminuída no grupo estressado em relação ao controle especificamente nas regiões PrL (região pre-límbica do CPFm; fêmeas, $p=0,048$) (figura 14B) e IL (região infralímbica do CPFm; machos, $p=0,016$; e fêmeas, $p=0,017$) (figura 14C). Houve uma diminuição da densidade neuronal do sistema límbico, especificamente na amígdala (BLA), das fêmeas estressadas ($p=0,041$) (figura 15D). Além disso, foi observado uma diminuição da densidade glial cortical, especificamente na região Cg1, nas fêmeas estressadas ($p=0,025$) (figura 16A).

As demais regiões, assim como a relação glia/neurônio, não mostraram alterações significativas nos parâmetros analisados (figuras 17, 18, 19).

Densidade Neuronal Cortical

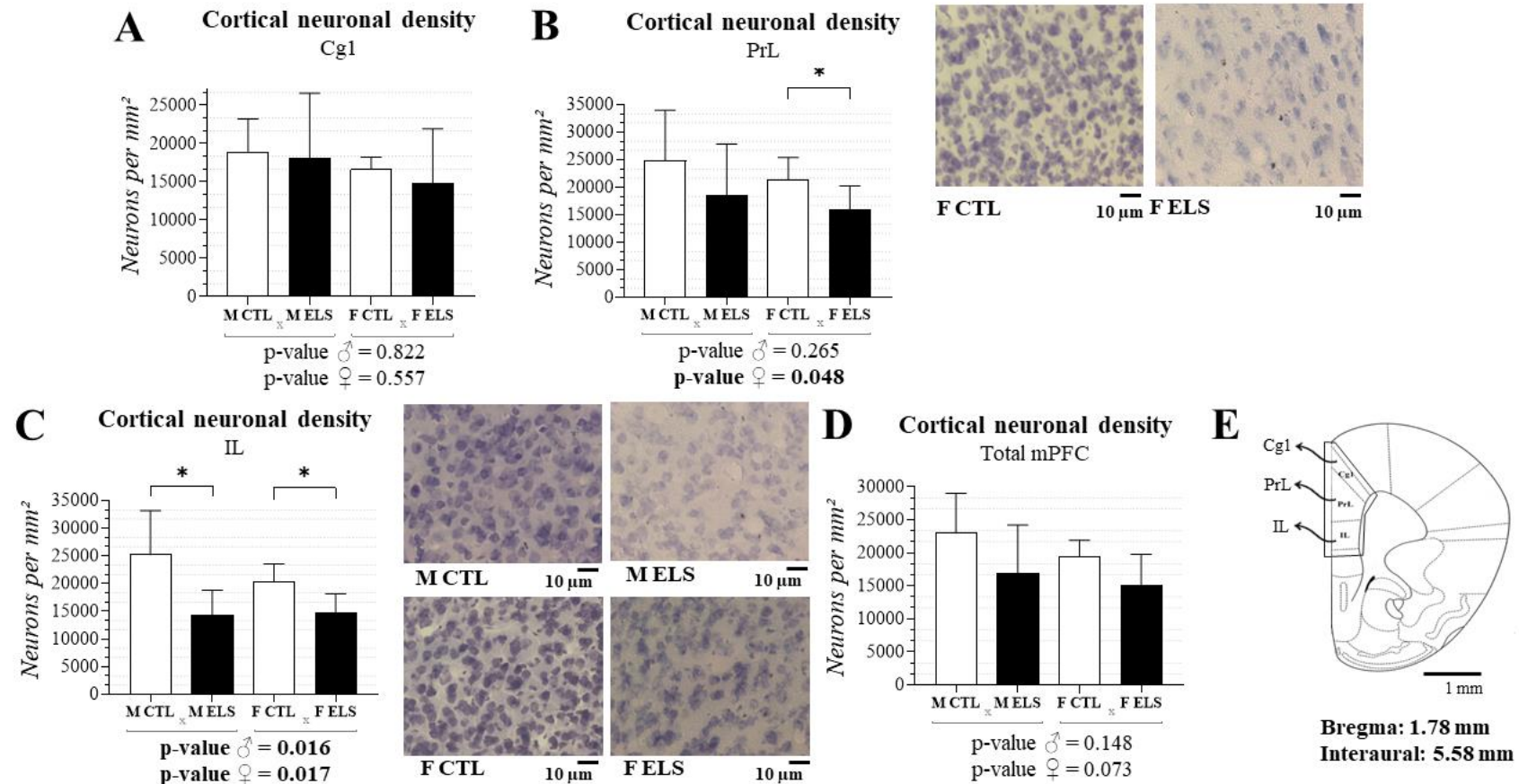


Figura 14 – Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na densidade neuronal cortical em camundongos machos e fêmeas. Imagens digitalizadas de secções coronais do cérebro de camundongos machos e fêmeas coradas com Nissl mostrando o Córtex Pré Frontal Medial (CPFm), mais especificamente o prélimbico (PrL) (B) e o infralímbico (IL) (C) dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS). Os gráficos mostram a densidade neuronal cortical, no CPFm: Córtex Cingulado (Cg1) (A), PrL (B), IL (C) e total (D). O desenho esquemático (E) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). Teste t de *student* (média ± DP).

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Densidade Neuronal – Sistema Límbico

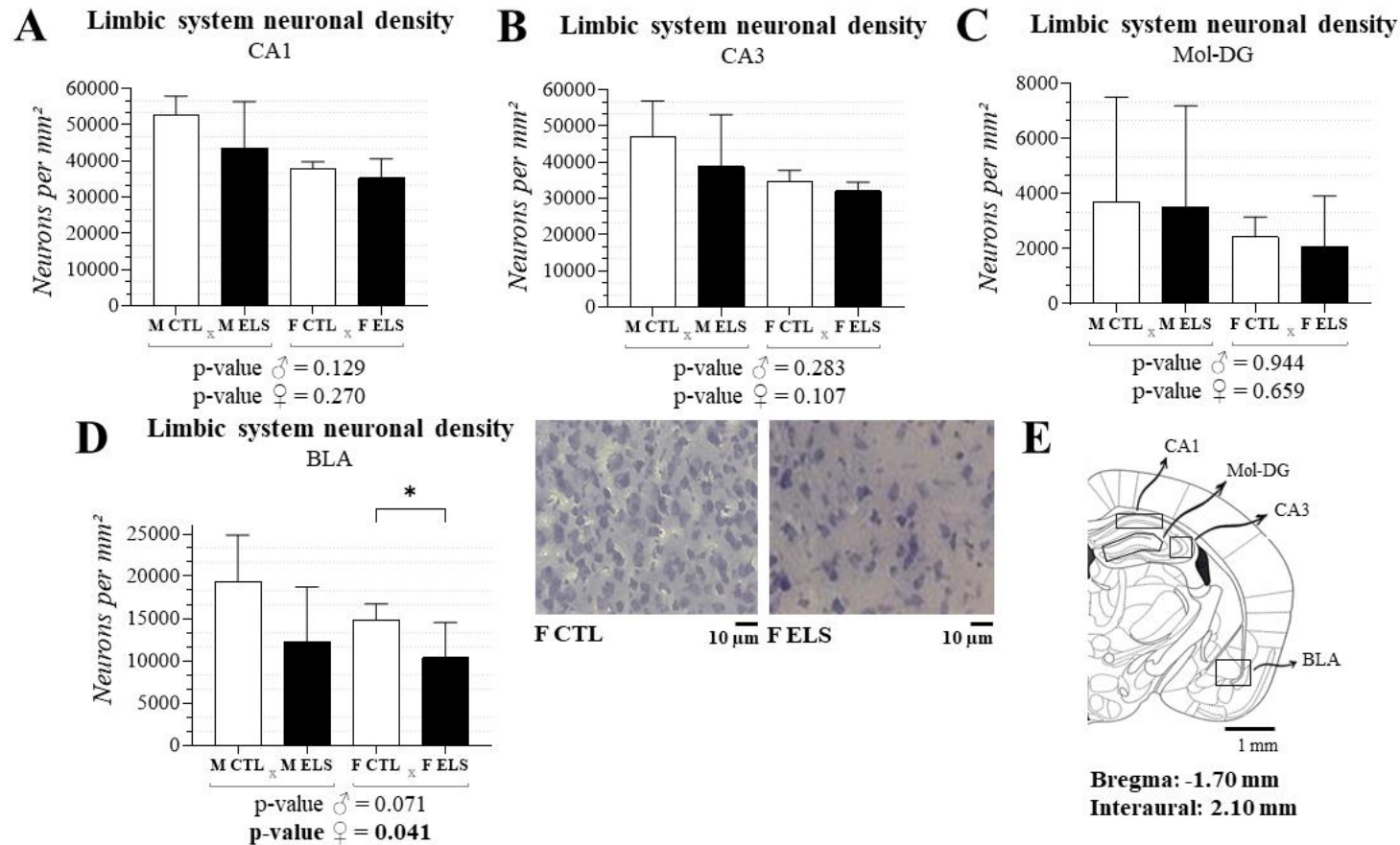


Figura 15 – Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na densidade neuronal do sistema límbico em camundongos machos e fêmeas. Imagens digitalizadas de secções coronais do cérebro de camundongos machos e fêmeas coradas com Nissl mostrando a amígdala basolateral (BLA) (D) dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS). Os gráficos mostram a densidade neuronal no sistema límbico: Corno de Ammon 1 (CA1) (A), Corno de Ammon 3 (CA3) (B), Camada molecular do giro denteado (Mol-DG) (C) e amígdala basolateral (BLA) (D). O desenho esquemático (E) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). Teste t de *student*. (média ± DP) (*p<0,05).

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Densidade Glial Cortical

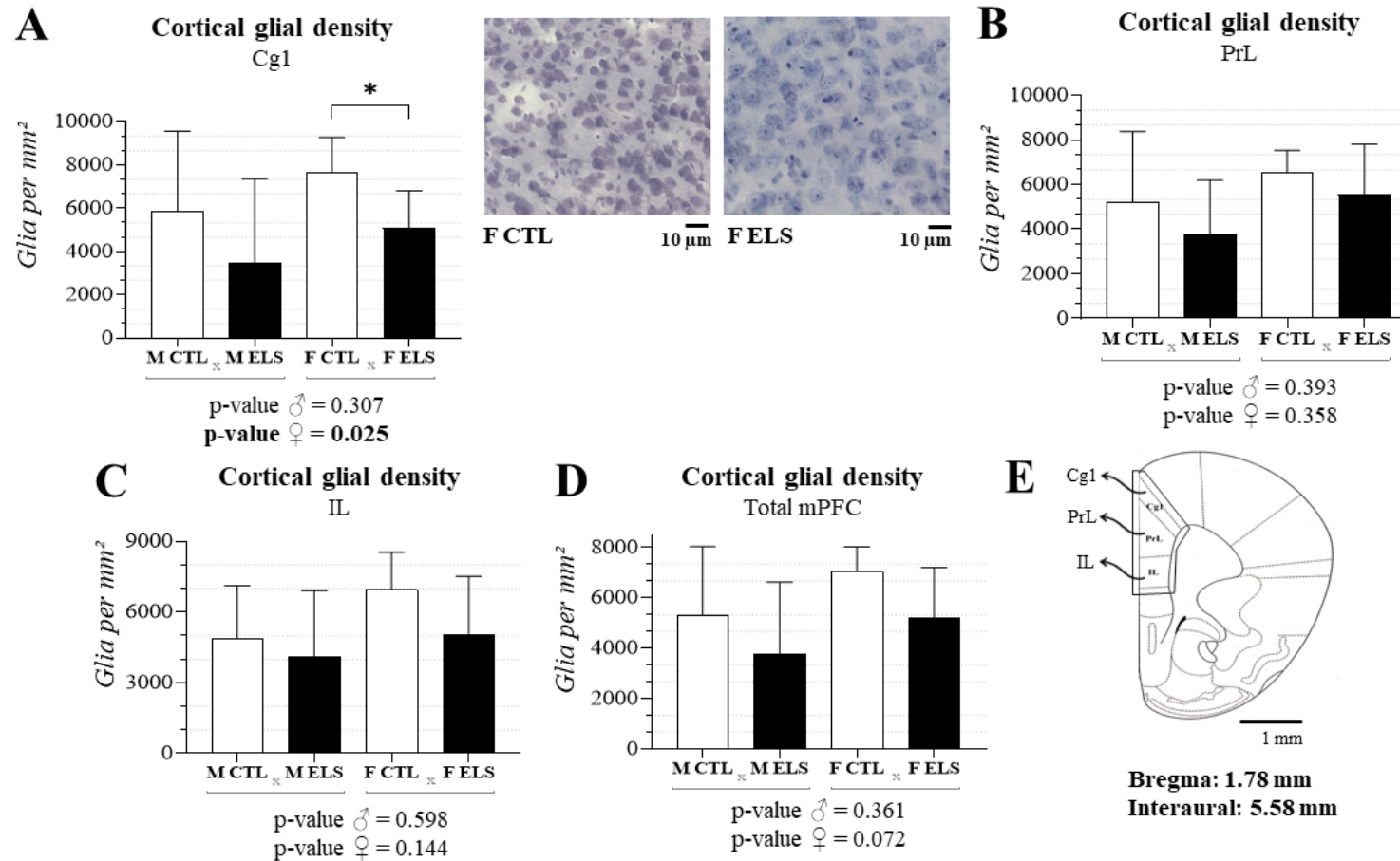


Figura 16 - Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na densidade glial cortical em camundongos machos e fêmeas. Imagens digitalizadas de secções coronais do cérebro de camundongos fêmeas coradas com Nissl mostrando o Córtex Pré-Frontal Medial (CPFm), mais especificamente o córtex cingulado (Cg1) (A) dos grupos controle (CTL) e estresse (ELS). Os gráficos mostram a densidade glial cortical: Cg1 (A), córtex pré límbico (PrL) (B), córtex infralímbico (IL) (C) e Córtex Pré-Frontal Medial total (D). O desenho esquemático (E) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). Teste t de *student* (média ± DP) (*p<0,05).

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Densidade Glial - Sistema Límbico

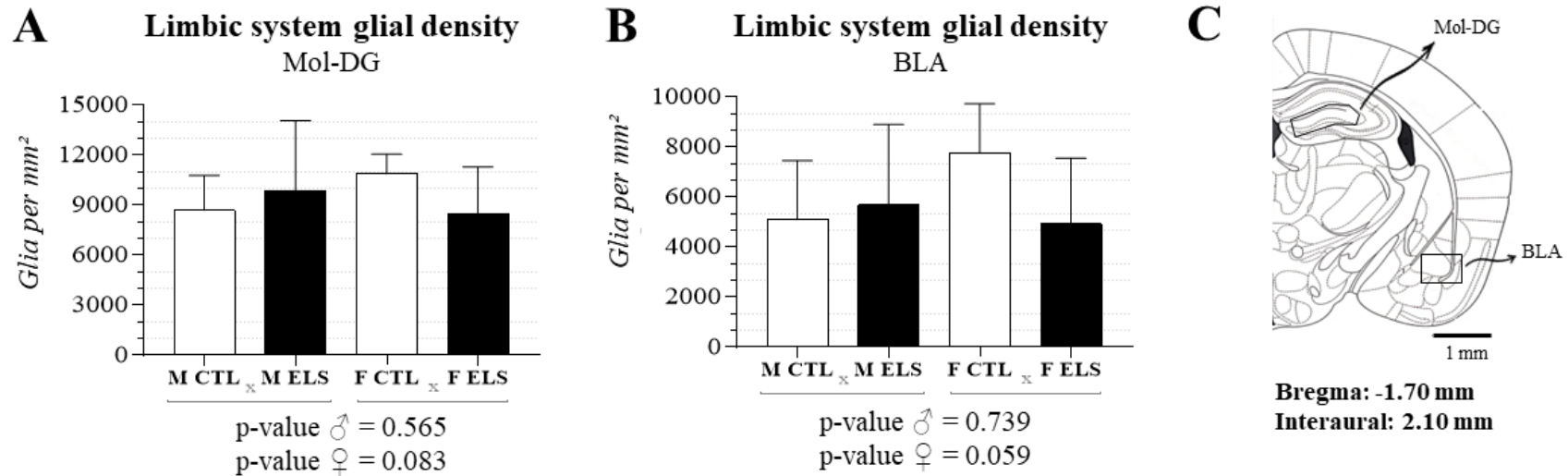


Figura 17 - Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na densidade glial do sistema límbico em camundongos machos e fêmeas. Os gráficos mostram a densidade de células da glia na camada molecular do giro denteado (Mol-DG) (A) e na amígdala basolateral (BLA) (B). O desenho esquemático (C) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). O número de células gliais nas camadas piramidais de CA1 e CA3 classicamente é bastante reduzido, portanto não foram incluídas na figura. Teste t de *student* (Média ± DP).

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Relação Glia / Neurônio – Região Cortical

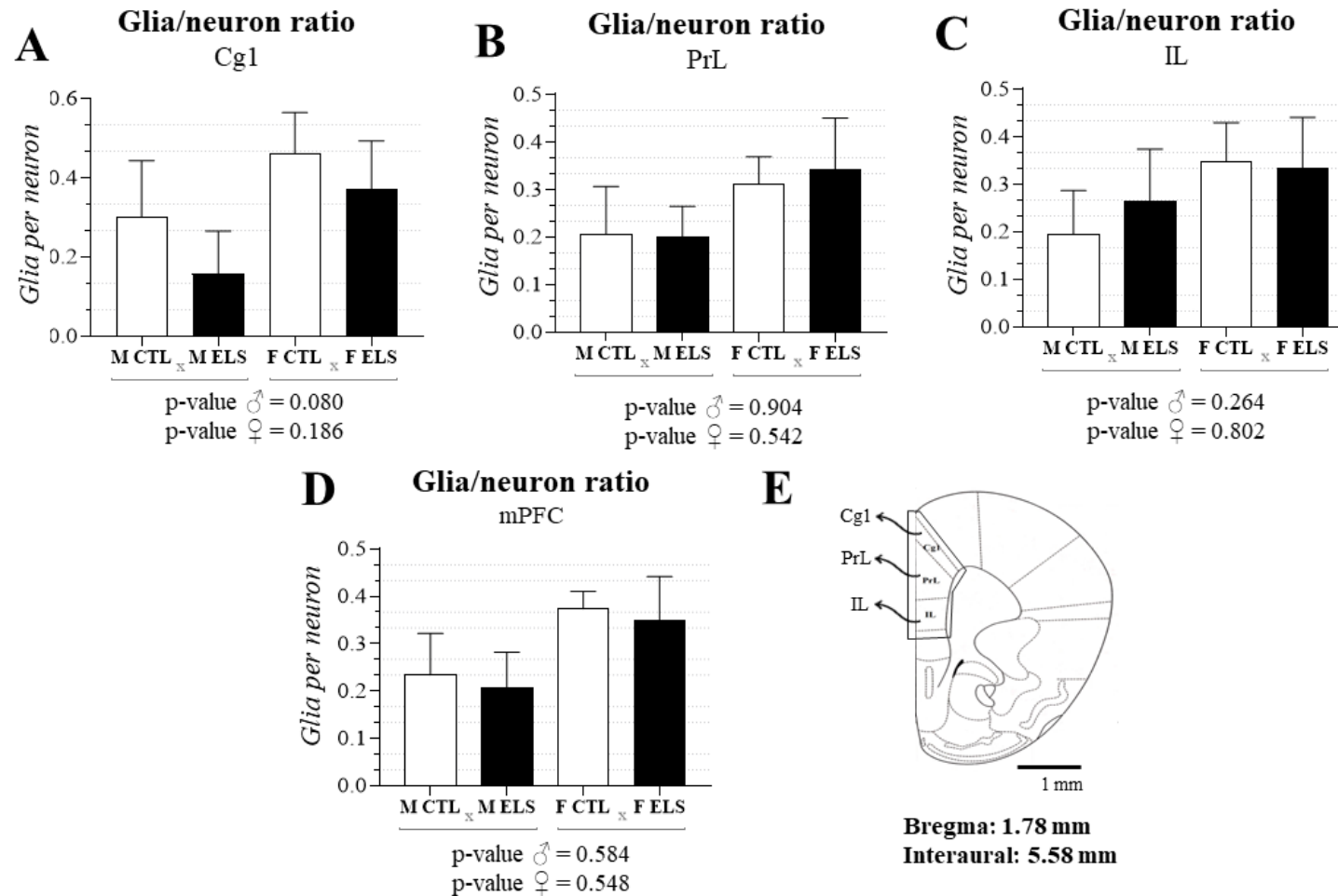


Figura 18 - Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na relação glia/neurônio na região cortical em camundongos machos e fêmeas. Os gráficos mostram a razão de células da glia por neurônio, no Córtex Pré Frontal Medial (CPFm): Córtex Cingulado (Cg1) (A), Córtex Pré límbico (PrL) (B), Córtex infra límbico (IL) (C) e Córtex Pré Frontal Medial total (D). O desenho esquemático (E) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). Teste t de *student* (média $\pm$ DP).

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Relação Glia / Neurônio – Sistema Límbico

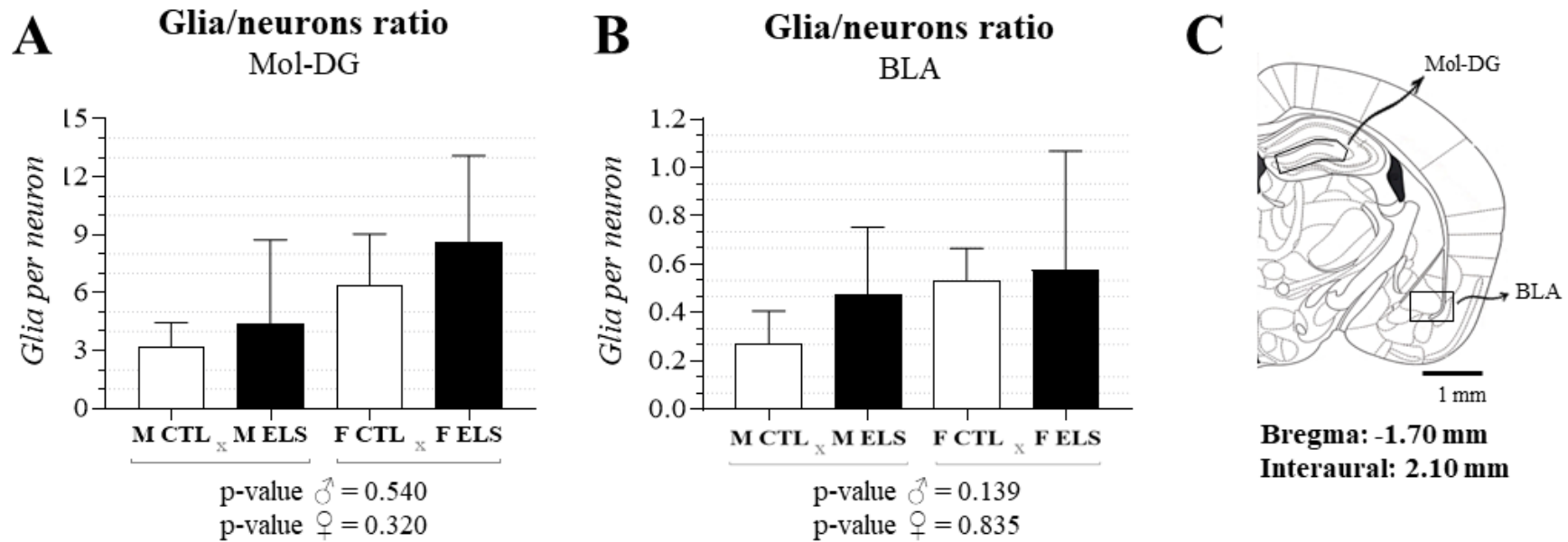


Figura 19 – Efeitos a longo prazo (>60 dias de vida) do estresse precoce na relação glia/neurônio do sistema límbico em camundongos machos e fêmeas. Os gráficos mostram a razão de células da glia por neurônio, na camada molecular do giro denteado (Mol-DG) (A) e na amígdala basolateral (BLA) (B). O desenho esquemático (C) foi adaptado do atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2014). O número de células gliais nas camadas piramidais dos Cornos de Ammon 1 e 3 (CA1 e CA3 respectivamente) classicamente é bastante reduzido, portanto a relação glia/neurônio nessas regiões não foi calculada. Teste t de *student* (média $\pm$ DP).

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

6 DISCUSSÃO

O estresse crônico experimentado precocemente na vida é um fator de risco generalizado que está relacionado ao aparecimento de distúrbios psiquiátricos, como ansiedade e depressão (206). Estudos pré-clínicos anteriores relataram que roedores expostos a paradigmas de estresse no início da vida (ELS) apresentam níveis mais altos de comportamentos depressivos e semelhantes a ansiedade, bem como aumento do medo e da capacidade de resposta ao estresse (207). Neste estudo, usamos um modelo experimental de estresse precoce (*Limited Bedding + Separação Materna*, LBSM) para investigar o impacto sobre o cérebro, avaliando possíveis alterações comportamentais semelhantes à depressão e ansiedade, e possíveis alterações neuromorfológicas, em camundongos jovens adultos (>60 dias) de ambos os sexos.

Nossos achados não mostraram diferenças significativas no comportamento relacionado a depressão/ansiedade nos machos. Diferentemente das fêmeas, que apresentaram alterações comportamentais significativas no teste de labirinto em cruz elevado (EPM). É bem demonstrado na literatura que fêmeas e machos respondem de formas diferentes ao estresse precoce. Fatores cruciais para determinar o tipo de déficit comportamental na vida adulta estendem-se para além do sexo, abrangendo timing do evento estressor, intensidade do estresse, e momento da vida que esses animais são testados. Em estudos em animais observa-se que enquanto ratos machos demonstram maiores dificuldades de aprendizado e memória espacial frente ao estresse precoce, fêmeas apresentam um comportamento ansioso mais frequentemente. Essas alterações podem estar ligadas a uma redução sexo-dependente da neurogênese e da morfologia dendrítica na formação do córtex pré-frontal e do hipocampo (208). Nossos resultados corroboram o aumento de ansiedade nas fêmeas, mas infelizmente não foi possível medir a capacidade cognitiva dos machos nos testes comportamentais. Em estudos com humanos, sugere-se que o estresse gestacional produz não somente fenótipos comportamentais diferentes em fêmeas e machos como psicopatologias diferentes, onde TDAH e esquizofrenia se mostram mais frequentes em homens enquanto depressão e ansiedade é mais comum entre as mulheres (208).

A exposição ao estresse desencadeia diversas respostas sistêmicas, incluindo respostas do sistema nervoso simpático. Entre essas respostas, observa-se a ativação do sistema de glucocorticoides, e ativação do eixo HPA, que modula as respostas ao estresse e parece estar desregulado no transtorno ansioso. O eixo HPA se conecta com o hipocampo, CPFm e amígdala, regiões essenciais no aprendizado e processamento do medo, que também contêm receptores para hormônios do estresse. A resposta do eixo HPA ao estresse difere entre homens

e mulheres, com as mulheres parecendo ter uma maior reatividade do HPA e uma liberação mais alta de hormônios do estresse. O que nos ajuda a entender essas diferenças é a interação entre o eixo HPA e o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG), que regula a secreção de hormônios gonadais como estrogênio, progesterona e testosterona. Os níveis de estrogênio e testosterona podem participar da regulação e resposta do eixo HPA, inclusive se observa que a testosterona pode inibir a atividade do eixo HPA, enquanto o estrogênio age de forma contrária, intensificando sua atividade, dependendo de qual receptor para o estrogênio está sendo ativado (209).

Se tratando das alterações comportamentais observadas nas fêmeas, no teste do labirinto em cruz elevado o grupo ELS aumentou seu tempo de permanência nos braços abertos ($p=0,011$) e no centro ($p=0,019$), reduziu a permanência nos braços fechados ($p=0,005$) e aumentou seu número de entradas nos braços abertos ($p=0,028$) e fechados ($p=0,048$). Isso indica que as fêmeas tiveram uma resposta ao estresse (ao contrário dos machos), contudo essa resposta é ambígua, uma vez que a diminuição de tempo nos braços fechados e aumento de tempo nos braços abertos e no centro indica que as fêmeas estressadas apresentam menos medo, e o aumento do número de entradas e saídas dos braços indica o aumento de ansiedade.

A presença de ansiedade e ausência de medo indica um comportamento de valentia nessas fêmeas estressadas que também pode ser interpretado como uma incapacidade de avaliação de risco. Estudos anteriores mostram que o estresse induz um aumento da formação de memória aversiva em machos enquanto prejudica a aquisição em fêmeas, além de induzir um aumento no comportamento ansioso de fêmeas similar ao que observamos (210). De acordo com Viola et al. (211), a redução do comportamento de avaliação de risco (AR) em camundongos estressados pode ser associada a uma tendência à impulsividade, o que leva esses animais a se engajarem em comportamentos de risco com maior frequência devido à falta de AR. Esses comportamentos são considerados uma medida confiável da manifestação de comportamentos similares à ansiedade, uma vez que a avaliação etológica fornece informações sobre a resposta emocional do animal ao ambiente (212). O comportamento de AR é influenciado pela percepção de ameaça no ambiente e pela capacidade do animal de se relacionar com seu entorno (213). Nesse sentido, a alteração da reatividade emocional durante a realização da tarefa, em que há um conflito entre abordagem e evitação, pode ser interpretada como um estado ansiogênico (214).

Além disso, a circuitaria do medo em roedores envolve importantes regiões encefálicas, com alterações histológicas observadas nesse estudo. O circuito que regula a expressão do medo

envolve um estímulo excitatório da parte pré-limbica (PL) do córtex pré-frontal medial (CPFm) para a amígdala basolateral (BLA), que ativa a amígdala central (CeA) para aumentar a expressão do medo. A área infralímbica (IL) do CPFm se projeta e ativa células intercaladas inibitórias na amígdala que conectam a BLA à CeA e inibem a saída do estímulo de medo. O hipocampo interage com essa rede em resposta ao contexto e pode induzir ou impedir que uma memória de medo seja evocada. Em suma, o hipocampo pode ativar a região IL para suprimir o medo quando o estímulo condicionado (CS) for apresentado no contexto em que foi extinto (209). Nossos resultados comportamentais mostram uma redução da expressão de medo nas fêmeas estressadas associado a uma redução da densidade neuronal nas regiões PL, IL e BLA. Essa relação entre os achados comportamentais e morfológicos indica que a redução neuronal nessas regiões críticas para a regulação do comportamento de medo pode ser a causa do comportamento de valentia observados nas fêmeas ELS.

Os efeitos do protocolo de separação materna (SM) na idade adulta têm sido amplamente observados em ratos e camundongos, e os resultados têm sido variados e até mesmo contraditórios, de acordo com Tractenberg *et al.*, (215). Enquanto alguns estudos com diferentes protocolos de SM não encontraram efeitos em relação à ansiedade e depressão em adultos (216), outros estudos mostraram efeitos da SM em comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão na idade adulta (217–219). De maneira geral, os perfis comportamentais observados em nossos resultados, são indicativos de um leve perfil ansioso, principalmente em relação às fêmeas.

Se tratando dos aspectos morfológicos, machos e fêmeas apresentaram alterações em locais diferentes no cérebro. Foi observado um aumento do volume hipocampal nos machos estressados em comparação com os do grupo controle, porém não foram observadas alterações dos mesmos parâmetros nas fêmeas. O ELS aumentou o volume hipocampal dos machos estressados entre os Bregma -1.46 até Bregma -2.06 ($p=0,011$), sendo que o aumento significativo ocorreu na porção mais rostral do hipocampo (Bregma -1.46 à -1.70) ($p=0,001$). Além disso, os machos estressados apresentaram um aumento significativo da espessura tecidual do córtex cerebral (mais especificamente no córtex somatossensorial, $p=0,000006$) e da camada piramidal do hipocampo, em CA1 ($p=0,018$), em relação ao grupo controle. Esse aumento da espessura tecidual de CA1 também foi observado nas fêmeas estressadas, as quais apresentaram uma diferença significativa maior que a observada nos machos ($p=0,00006$). A relação entre dimorfismo sexual e diferenças anatômicas histológicas na estrutura cerebral são

bastante descritas na literatura, com homens possuindo uma maior variabilidade anatômica individual que mulheres (220).

O hipocampo é uma estrutura cerebral importante para o processamento e armazenamento da memória. Ele é composto por várias camadas celulares e possui conexões com outras regiões cerebrais envolvidas na memória, como o córtex entorrinal, a amígdala e o córtex pré-frontal (221). Conforme citado anteriormente, o hipocampo exerce forte controle regulatório do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. O ELS causa elevações dos hormônios do estresse, os quais levam à disfunção do hipocampo em humanos e roedores (222, 223). Em humanos, a diminuição do volume do hipocampo e a disfunção do hipocampo estão associadas a distúrbios psicológicos com fortes componentes afetivos, como transtorno de estresse pós-traumático, transtorno bipolar e depressão (224, 225).

A bibliografia atual dispõe de resultados contrastantes quanto ao volume hipocampal, onde geralmente se observa redução após exposição a estresse precoce em ambos os sexos (226). Porém, sugerimos que o aumento do volume hipocampal somente nos machos estressados pode estar relacionado ao que já foi observado em estudo anterior, onde os machos que passaram pelo protocolo de ELS apresentaram um aumento em número, volume e complexidade dos dendritos e espinhos dendríticos, enquanto as fêmeas tiveram redução dos dendritos e menor densidade de espinhos, tendo como consequência uma alteração no volume hipocampal observado apenas nos machos (227). Como nossa técnica permite apenas a visualização principalmente do celular, e alguns prolongamentos, não foi possível responder se a alteração de volume observada está relacionada a uma alteração dendrítica.

Além disso o remodelamento hipocampal é intimamente afetado pela presença de hormônios circulantes, como o cortisol e hormônios sexuais. Por exemplo, estresse repetido leva a um remodelamento de dendritos na região CA3 do hipocampo, além de suprimir a neurogênese do giro denteado em machos, porém, em fêmeas, o estrogênio parece estimular a neurogênese dessa região, e conferir uma resistência à atrofia induzida por estresse dos dendritos do hipocampo observada em ratos machos (228). Esses estudos que contrastam com nossos resultados, sugerem que além das diferenças sexuais estruturais e funcionais, o estrogênio pode ter um papel neuroprotetor em relação ao estresse e à secreção e ação de glicocorticóides no cérebro (229).

Os machos estressados apresentaram um aumento de espessura na camada cortical (mais especificamente no córtex somatossensorial), porém, esse aumento não foi observado nas fêmeas. O córtex somatossensorial é uma região do cérebro responsável pelo processamento de

informações sensoriais relacionadas a discriminação sensorial, processamento de informações de dor, percepção de temperatura e propriocepção (230 – 233). Embora não haja evidências que indiquem um aumento na espessura do córtex somatossensorial em situações de estresse, o estresse pode afetar o funcionamento dessa região cerebral, afetando a percepção sensorial, a conectividade funcional com outras áreas cerebrais e a plasticidade sináptica. Estudos sobre estresse precoce demonstram uma série de alterações morfológicas e funcionais no córtex somatossensorial que não se observam em outras regiões corticais, como aumento de espinhos dendríticos do tipo cogumelo, aumento nos níveis basais de corticosterona, aumento dos níveis basais e pós-estresse de glutamato e aumento da motilidade da micróglia (234). Além do seu papel no processamento sensorial, o córtex somatossensorial, também desempenha um papel importante no processamento emocional, incluindo a identificação de significado emocional em um estímulo, a expressão de estados emocionais e a regulação da emoção. Estudos realizados em indivíduos que sofrem de transtornos psicológicos associados à regulação emocional anormal, como depressão, transtorno bipolar, esquizofrenia, transtorno de estresse pós-traumático, transtornos de ansiedade e pânico, encontraram alterações estruturais e funcionais no córtex somatossensorial. Entre essas alterações, observam-se alterações no volume de matéria cinzenta, espessura cortical, conectividade funcional anormal com outras regiões cerebrais e mudanças nas taxas metabólicas. Dessa forma, é razoável a interpretação de que um aumento da espessura do córtex somatossensorial desses animais tenha sido benéfica e esteja relacionada a ausência do comportamento ansioso e depressivo que seria esperado, devido a uma melhor regulação emocional mesmo após exposição a estímulo estressor (235).

O aumento da espessura hipocampal em CA1, observada em ambos os sexos, não foi acompanhada de alterações na densidade neuronal e glial. O transtorno depressivo é associado ao comprometimento da neuroplasticidade, como atrofia neuronal e perda sináptica de regiões específicas do cérebro, em particular o hipocampo (236). Recentemente, um corpo convergente de literatura tem sugerido que a quantidade excessiva de matriz extracelular (MEC) é uma característica crítica da depressão. E um dos mecanismos pelo qual se observa esse aumento de MEC é pelo aumento da deposição de moléculas da rede perineuronal (PNN), uma estrutura de MEC predominantemente localizada em interneurônios inibitórios que regulam a plasticidade (237, 238). Em outro estudo, quando se observou a regulação gênica relacionada ao aumento de MEC, foram identificados 15 genes suprarregulados relacionados à deposição de MEC. O enriquecimento da via de genes regulados positivamente mostrou que as vias hiperativadas associadas à MEC, tinham como função trimerização da cadeia de colágeno, biossíntese de

colágeno e enzimas modificadoras, formação de colágeno, organização da matriz extracelular etc. (239). Dessa forma, entende-se que a deposição excessiva de MEC parece criar um ambiente que não permite e limita a plasticidade em distúrbios de humor como a depressão (240). Além disso, trabalhos recentes revelaram a importância da MEC no controle da plasticidade no sistema nervoso central (SNC) e provaram que uma desregulação dessa estrutura se relaciona a vários outros distúrbios psiquiátricos, onde o estresse atua como um fator de predisposição (240). Em nossa análise, não avaliamos os percentuais de MEC, porém, considerando esses achados recentes que indicam que pode haver uma deposição excessiva de MEC no hipocampo de camundongos que passaram por diferentes protocolos estressores, sugerimos que possa haver um aumento da MEC na região hipocampal visto que a espessura da região está aumentada nos camundongos estressados, porém sem alguma indicação de aumento da densidade celular.

Nossos resultados mostraram uma diminuição significativa na densidade neuronal cortical, especificamente no córtex prélimbico (PrL) das fêmeas estressadas ($p=0,048$); e no córtex infralímbico (IL) de machos [$p=0,016$] e fêmeas [$p=0,017$], ambos do grupo ELS. Existe atualmente uma vasta literatura atribuindo ao CPFm uma variedade de funções relacionadas ao controle de comportamento, incluindo a regulação emocional, tomada de decisões e codificação contextual (241 – 244). Em roedores, o CPFm é dividido em três áreas distintas que são, no sentido dorsoventral, o córtex cingulado anterior (Cg1), o córtex prélimbico (PrL) e o córtex infralímbico (IL). Essas três sub-regiões apresentam funções relativamente distintas em roedores: o Cg1 está envolvido no controle emocional, aprendizado, memória e tomada de decisões, além de ser essencial para a regulação da resposta ao estresse e à dor (245); o PrL tem sido relacionado à aquisição de tarefas que dependem da manutenção de informações ao longo do tempo, como rastreamento de condicionamento de medo (246 – 251), comportamento exploratório, memória espacial e regulação emocional, sendo considerado uma peça-chave no processamento de memórias e consolidação de memórias aversivas (249). Já o IL está envolvido em funções como regulação do comportamento, condicionamento ao medo, processamento de recompensas e aprendizagem de hábitos (252 – 254). Há uma hipótese de que o IL atua, de forma sutil, como um “freio” em certos comportamentos, uma ideia consistente com o vmPFC humano inibindo respostas impróprias e respostas emocionais negativas (255). Essa alteração morfológica observada nas fêmeas ELS pode ser relacionada com o comportamento de valentia exibido por elas, e já discutido anteriormente. Uma vez com a capacidade de regulação

emocional e freio comportamental reduzido além de uma ansiedade aumentada, esses animais têm um comportamento condizente com a perda neuronal observada, nas regiões supracitadas.

Houve também uma diminuição significativa na densidade glial cortical das fêmeas estressadas, no córtex cingulado anterior (Cg1) ($p=0,025$). Essa diminuição se reflete em uma perda funcional, vista a importante função de controle emocional da região aliada às várias funções que podem ser comprometidas ao se perder células gliais. As células da glia possuem um papel crucial no SNC: interagem reciprocamente com os neurônios, atuando na regulação, formação e função do sistema nervoso, além de conduzir a neurogênese, regular a migração neuronal, o crescimento axonal e a formação de sinapses (256). Há vários tipos de células gliais com diferentes funções no SNC, sendo elas: glia radial (progenitores do SNC que geram a maioria de nossos neurônios e células gliais), astrócitos (células com processos que interagem com vários tipos de células no SNC, ajudando a impulsionar o desenvolvimento do sistema nervoso e esculpir sua atividade), oligodendrócitos (aceleram a condução do impulso nervoso e fornecem suporte metabólico aos axônios) e micróglia (conhecidas como macrófagos residentes no cérebro, os quais regulam a função neuronal durante um desafio inflamatório) (106, 246). Entre os tipos de células gliais citados, destaca-se a micróglia como um possível fator mediador das mudanças relatadas após a exposição ao estresse, geralmente relacionado a um estado neuroinflamatório alterado e ao desenvolvimento de deficiências cognitivas e comportamentais (112–119). Entretanto, a técnica histológica que optamos por utilizar, não torna possível distinguir de modo nítido os diferentes tipos de glia no SNC. Portanto, estudos futuros com marcadores imunohistoquímicos específicos contra proteínas específicas de cada tipo de célula da glia, como GFAP (para astrócitos), CNPase (para oligodendrócitos) e Iba1 (para micróglia), podem nos apontar com mais clareza as variações nas populações gliais. Apesar de ter sido observada uma perda neuronal e glial em áreas corticais, essas perdas não se correlacionam com as diferenças contrastantes na espessura cortical, além de também não ter sido observado alterações na razão glia/neurônio nas regiões analisadas.

Outra alteração observada foi a redução da densidade neuronal na BLA de fêmeas expostas ao estresse. A amígdala basolateral tem um papel chave no condicionamento ao medo e é extremamente reativa ao estresse precoce. Em estudo anterior foi observado que em filhotes de ratos machos, mas não fêmeas, houve um aumento na densidade de espinhos neuronais da BLA, acompanhado de aumento nas respostas sinápticas e conectividade funcional alterada. O trabalho sugere que os efeitos da exposição ao estresse precoce na função sináptica da BLA são sexualmente dimórficos e possivelmente recrutam mecanismos diferentes (257). De acordo

com Likhtik et al. (258), a conexão entre o CPFm e a amígdala é essencial para regular respostas comportamentais relacionadas à expressão de medo e ansiedade. Em condições normais, o CPFm inibe a ativação da amígdala, a fim de evitar a expressão exagerada de emoções (259, 260). No entanto, o prejuízo no controle do CPFm sobre a amígdala é bem documentado em situações de estresse crônico (261), o que pode contribuir para o desenvolvimento de condições patológicas. Como o CPFm é uma região importante para a regulação da avaliação de risco e tomada de decisão (262), a análise do comportamento de avaliação de risco pode refletir o controle exercido pela conexão CPFm-amígdala (211, 262, 263).

Portanto, pode se estabelecer que a exposição ao estresse durante esse período de desenvolvimento do indivíduo, o qual o SNC está mais suscetível aos estímulos ambientais, pode desencadear múltiplos efeitos sobre as funções cognitivas, emocionais e comportamentais, que podem ser influenciados por uma série de fatores (background genético do indivíduo, tipo e as condições da exposição ao estresse, diferenças na relação mãe-filhote após a exposição ao ELS, as condições em que esse indivíduo é exposto ao estresse na vida adulta, e os outros possíveis fatores citados anteriormente). Assim, os efeitos que as adversidades no início da vida podem causar, dependerão desses contextos, podendo ocasionar um efeito deletério e consequente aumento da vulnerabilidade ou um efeito positivo com aumento da capacidade do indivíduo de se adaptar a situações de estresse na vida adulta com maior resiliência (264 – 267).

Feitas as possíveis correlações e observações, algumas questões ficam em aberto: 1- Qual a idade mais vulnerável aos efeitos do ELS? 2- Os efeitos do ELS são reversíveis? 3- Há ocorrência de mecanismos compensatórios? e 4- O cuidado materno, possivelmente mais acentuado no grupo estressado, pode ter influenciado em uma maior resiliência ao estresse na vida adulta?. Com isso, se fazem necessários mais estudos a fim de se buscar entender cada vez mais como e em que grau o estresse precoce é capaz de interferir na vida do indivíduo.

CONCLUSÃO

As alterações comportamentais encontradas foram restritas a alterações no teste de labirinto em cruz elevado em fêmeas. Por sua vez, o protocolo ELS afetou de modo distinto a anatomia e histologia encefálica em machos e fêmeas. Nossos resultados sugerem que as respostas comportamentais de longo prazo ao ELS, em camundongos, relacionadas à depressão e ansiedade, podem ser mais significativas em fêmeas e que as alterações morfométricas cerebrais encontradas em machos submetidos ao ELS podem não se traduzir em alterações comportamentais analisadas pelos testes executados nessa dissertação, mas talvez estejam

relacionadas à déficits em outras funções superiores. A vulnerabilidade do cérebro ao estresse ambiental aumenta durante os períodos críticos de desenvolvimento, o qual está mais suscetível a essas interferências ambientais, sejam elas positivas ou negativas. Como resultado, vivenciar adversidades durante essas janelas de tempo pode levar a respostas fisiológicas alteradas que se perpetuam ao longo da vida. A pesquisa neste campo usou modelos animais para entender as relações causais entre ELS e fenótipos patológicos e descobriu que roedores expostos ao estresse durante esses períodos críticos podem apresentar um aumento da ansiedade, depressão, deficiências cognitivas e neuroanatômicas. Entretanto, alguns aspectos importantes devem ser levados em consideração, como o tipo de condição adversa que este indivíduo é exposto, o timing e os aspectos específicos do sexo após o ELS. Essas descobertas, tomadas em conjunto, nos ajudam a esclarecer as transformações que ocorrem no cérebro de um indivíduo que passou por adversidades no início da vida. É difícil prever resultados e estabelecer uma relação de causa e efeito, mas devemos usar a já abundante informação disponível para esclarecer padrões, estar atentos aos dados mais recentes de literatura científica e utilizá-los para definir melhores estratégias terapêuticas e possíveis intervenções precoces.

PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS CIENTÍFICOS DURANTE O MESTRADO

- 1) **“Contagious depression: Automatic mimicry and the mirror neuron system - A review”**, publicado no periódico “Neuroscience & Biobehavioral Reviews”, FI: 8,989, em 27 de dezembro de 2021 (Anexo B).
- 2) **“Age-related tolerance to paraquat-induced parkinsonism in Drosophila melanogaster”**, publicado no periódico “Toxicology Letters”, FI: 4,372, em 31 de março de 2022 (Anexo C).

REFERÊNCIAS

1. Ströhle A, Holsboer F. Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry*. novembro de 2003;36 Suppl 3:S207-14.
2. Park MJ, Jang EH, Kim AY, Kim H, Kim HS, Byun S, et al. Comparison of Peripheral Biomarkers and Reduction of Stress Response in Patients With Major Depressive Disorders vs. Panic Disorder. *Front Psychiatry*. 2022 Mar 31;13:348.
3. Gatt JM, Nemeroff CB, Dobson-Stone C, Paul RH, Bryant RA, Schofield PR, et al. Interactions between BDNF Val66Met polymorphism and early life stress predict brain and arousal pathways to syndromal depression and anxiety. *Mol Psychiatry*. julho de 2009;14(7):681–95.
4. Heim C, Nemeroff CB. The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol Psychiatry*. dezembro de 1999;46(11):1509–22.
5. Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology* 2016 233:9 [Internet]. 2016 Feb 5 [cited 2023 Mar 15];233(9):1637–50.
6. Cohen S, Janicki-Deverts D, Miller GE. Psychological stress and disease. *JAMA* [Internet]. 2007 Oct 10 [cited 2023 Mar 15];298(14):1685–7.
7. Liu YZ, Wang YX, Jiang CL, Meyerhoff DJ, Murakami M, Roeveer L, et al. Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases. 2017 [cited 2023 Feb 27]; Available from: www.frontiersin.org
8. GHDx, 2019. Instituto de Métricas e Avaliação de Saúde. Global Health Data Exchange (GHDx). Disponível em: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>. Acesso em: 25 jan. 2023).
9. Lund C, Breen A, Flisher AJ, Kakuma R, Corrigall J, Joska JA, et al. Poverty and common mental disorders in low and middle income countries: A systematic review. *Soc Sci Med*. agosto de 2010;71(3):517–28.
10. Andersen SL, Napierata L, Brenhouse HC, Sonntag KC. Juvenile methylphenidate modulates reward-related behaviors and cerebral blood flow by decreasing cortical D3 receptors. *Eur J Neurosci*. junho de 2008;27(11):2962–72.
11. Danese A, Moffitt TE, Harrington H, Milne BJ, Polanczyk G, Pariante CM, et al. Adverse childhood experiences and adult risk factors for age-related disease: depression, inflammation, and clustering of metabolic risk markers. *Arch Pediatr Adolesc Med*. dezembro de 2009;163(12):1135–43.
12. Hall FS. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit Rev Neurobiol*. 1998;12(1–2):129–62.
13. Marco EM, Macrì S, Laviola G. Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: evidence from animal models. *Neurotox Res*. fevereiro de 2011;19(2):286–307.

14. Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP, Kim DM. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003;27(1–2):33–44.
15. Grassi-Oliveira R, Ashy M, Stein LM. Psychobiology of childhood maltreatment: effects of allostatic load? *Rev Bras Psiquiatr.* março de 2008;30(1):60–8.
16. Green JG, McLaughlin KA, Berglund PA, Gruber MJ, Sampson NA, Zaslavsky AM, et al. Childhood adversities and adult psychiatric disorders in the national comorbidity survey replication I: associations with first onset of DSM-IV disorders. *Arch Gen Psychiatry.* fevereiro de 2010;67(2):113–23.
17. McLaughlin KA, Green JG, Gruber MJ, Sampson NA, Zaslavsky AM, Kessler RC. Childhood adversities and adult psychiatric disorders in the national comorbidity survey replication II: associations with persistence of DSM-IV disorders. *Arch Gen Psychiatry.* fevereiro de 2010;67(2):124–32.
18. Battle CL, Shea MT, Johnson DM, Yen S, Zlotnick C, Zanarini MC, et al. Childhood maltreatment associated with adult personality disorders: findings from the Collaborative Longitudinal Personality Disorders Study. *J Pers Disord.* abril de 2004;18(2):193–211.
19. Tyrka AR, Wyche MC, Kelly MM, Price LH, Carpenter LL. Childhood maltreatment and adult personality disorder symptoms: influence of maltreatment type. *Psychiatry Res.* fevereiro de 2009;165(3):281–7.
20. Pechtel P, Pizzagalli DA. Effects of early life stress on cognitive and affective function: an integrated review of human literature. *Psychopharmacology (Berl).* março de 2011;214(1):55–70.
21. Brown DW, Anda RF, Tiemeier H, Felitti VJ, Edwards VJ, Croft JB, et al. Adverse childhood experiences and the risk of premature mortality. *Am J Prev Med.* novembro de 2009;37(5):389–96.
22. Kessler RC, McLaughlin KA, Green JG, Gruber MJ, Sampson NA, Zaslavsky AM, et al. Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO World Mental Health Surveys. *Br J Psychiatry.* novembro de 2010;197(5):378–85.
23. Burghy CA, Stodola DE, Ruttle PL, Molloy EK, Armstrong JM, Oler JA, et al. Developmental pathways to amygdala-prefrontal function and internalizing symptoms in adolescence. *Nat Neurosci.* dezembro de 2012;15(12):1736–41.
24. Cicchetti D. Annual Research Review: Resilient functioning in maltreated children--past, present, and future perspectives. *J Child Psychol Psychiatry.* abril de 2013;54(4):402–22.
25. Cowell RA, Cicchetti D, Rogosch FA, Toth SL. Childhood maltreatment and its effect on neurocognitive functioning: Timing and chronicity matter. *Dev Psychopathol.* maio de 2015;27(2):521–33.
26. Herzberg MP, Gunnar MR. Early life stress and brain function: Activity and connectivity associated with processing emotion and reward. *Neuroimage.* abril de 2020;209:116493.
27. Çalışkan G, Müller A, Albrecht A. Long-Term Impact of Early-Life Stress on

- Hippocampal Plasticity: Spotlight on Astrocytes. *Int J Mol Sci.* julho de 2020;21(14).
28. Ignácio ZM, Réus GZ, Abelaira HM, Maciel AL, de Moura AB, Matos D, et al. Quetiapine treatment reverses depressive-like behavior and reduces DNA methyltransferase activity induced by maternal deprivation. *Behav Brain Res.* março de 2017;320:225–32.
 29. Schmidt M V. Animal models for depression and the mismatch hypothesis of disease. *Psychoneuroendocrinology.* abril de 2011;36(3):330–8.
 30. McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology.* janeiro de 2012;62(1):3–12.
 31. Anda RF, Felitti VJ, Bremner JD, Walker JD, Whitfield C, Perry BD, et al. The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood. A convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* abril de 2006;256(3):174–86.
 32. De Bellis MD, Baum AS, Birmaher B, Keshavan MS, Eccard CH, Boring AM, et al. A.E. Bennett Research Award. Developmental traumatology. Part I: Biological stress systems. *Biol Psychiatry.* maio de 1999;45(10):1259–70.
 33. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci.* junho de 2009;10(6):434–45.
 34. Maniglio R. The impact of child sexual abuse on health: a systematic review of reviews. *Clin Psychol Rev.* novembro de 2009;29(7):647–57.
 35. Pirkola S, Isometsä E, Aro H, Kestilä L, Hämäläinen J, Veijola J, et al. Childhood adversities as risk factors for adult mental disorders: results from the Health 2000 study. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* outubro de 2005;40(10):769–77.
 36. Spataro J, Mullen PE, Burgess PM, Wells DL, Moss SA. Impact of child sexual abuse on mental health: prospective study in males and females. *Br J Psychiatry.* maio de 2004;184:416–21.
 37. Bock J, Braun K. The impact of perinatal stress on the functional maturation of prefronto-cortical synaptic circuits: implications for the pathophysiology of ADHD? *Prog Brain Res.* 2011;189:155–69.
 38. McClelland S, Korosi A, Cope J, Ivy A, Baram TZ. Emerging roles of epigenetic mechanisms in the enduring effects of early-life stress and experience on learning and memory. *Neurobiol Learn Mem.* julho de 2011;96(1):79–88.
 39. McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, et al. Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci.* outubro de 2015;18(10):1353–63.
 40. Du J, Wang Y, Hunter R, Wei Y, Blumenthal R, Falke C, et al. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* março de 2009;106(9):3543–8
 41. Dow-Edwards D. Sex differences in the interactive effects of early life stress and the endocannabinoid system. *Neurotoxicol Teratol.* 2020;80:106893.
 42. Lyons DM, Parker KJ, Schatzberg AF. Animal Models of Early Life Stress:

- Implications for Understanding Resilience. *Dev Psychobiol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2023 Mar 8];52(5):402.
43. Bryda EC. The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. *Mo Med* [Internet]. 2013 May [cited 2023 Feb 27];110(3):207–11.
 44. Dutcher EG, Pama EAC, Lynall ME, Khan S, Clatworthy MR, Robbins TW, et al. Early-life stress and inflammation: A systematic review of a key experimental approach in rodents. *Brain Neurosci Adv* [Internet]. 2020 Jan [cited 2023 Feb 27];4:239821282097804.
 45. Rainecki C, Moriceau S, Sullivan RM. Developing a neurobehavioral animal model of infant attachment to an abusive caregiver. *Biol Psychiatry*. junho de 2010;67(12):1137–45.
 46. Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*. maio de 1993;18(3):195–200.
 47. Ellenbroek BA, van den Kroonenberg PT, Cools AR. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res*. abril de 1998;30(3):251–60.
 48. Enthoven L, Oitzl MS, Koning N, van der Mark M, de Kloet ER. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of newborn mice rapidly desensitizes to repeated maternal absence but becomes highly responsive to novelty. *Endocrinology*. dezembro de 2008;149(12):6366–77.
 49. Pryce CR, Feldon J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;27(1–2):57–71.
 50. Trujillo V, Durando PE, Suárez MM. Maternal separation in early life modifies anxious behavior and Fos and glucocorticoid receptor expression in limbic neurons after chronic stress in rats: effects of tianeptine. *Stress*. 2016;19(1):91–103.
 51. Rajan KE, Soundarya S, Karen C, Shanmugapriya V, Radhakrishnan K. Presence of Mother Reduces Early-Life Social Stress: Linking the Alteration in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Serotonergic System. *Dev Neurosci*. 2019;41(3–4):212–22.
 52. Molet J, Maras PM, Avishai-Eliner S, Baram TZ. Naturalistic rodent models of chronic early-life stress. *Dev Psychobiol*. dezembro de 2014;56(8):1675–88
 53. Vetulani J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacol Rep*. 2013;65(6):1451–61.
 54. Nishi M. Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents. *Int J Mol Sci*. setembro de 2020;21(19)
 55. Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ. Childhood parental loss and adult psychopathology in women. A twin study perspective. *Arch Gen Psychiatry*. fevereiro de 1992;49(2):109–16.
 56. Agid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, et al. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. março de

1999;4(2):163–72.

57. Furukawa TA, Ogura A, Hirai T, Fujihara S, Kitamura T, Takahashi K. Early parental separation experiences among patients with bipolar disorder and major depression: a case-control study. *J Affect Disord.* 1999;52(1–3):85–91.
58. Haller J, Harold G, Sandi C, Neumann ID. Effects of adverse early-life events on aggression and anti-social behaviours in animals and humans. *J Neuroendocrinol.* outubro de 2014;26(10):724–38.
59. Huot RL, Thirivikraman K V, Meaney MJ, Plotsky PM. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl).* dezembro de 2001;158(4):366–73.
60. Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman K V, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res.* 2000;122:81–103.
61. Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci.* 2014;8:166.
62. Levine S, Wiener SG. Psychoendocrine aspects of mother-infant relationships in nonhuman primates. *Psychoneuroendocrinology.* 1988;13(1–2):143–54.
63. Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci.* 1998;16(3–4):149–64.
64. Rice CJ, Sandman CA, Lenjavi MR, Baram TZ. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology.* outubro de 2008;149(10):4892–900.
65. McLaughlin KA, Sheridan MA, Lambert HK. Childhood adversity and neural development: deprivation and threat as distinct dimensions of early experience. *Neurosci Biobehav Rev.* novembro de 2014;47:578–91.
66. Ivy AS, Brunson KL, Sandman C, Baram TZ. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience.* junho de 2008;154(3):1132–42.
67. Wang X-D, Chen Y, Wolf M, Wagner K V, Liebl C, Scharf SH, et al. Forebrain CRHR1 deficiency attenuates chronic stress-induced cognitive deficits and dendritic remodeling. *Neurobiol Dis.* junho de 2011;42(3):300–10.
68. Juruena MF. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. *Epilepsy Behav.* setembro de 2014;38:148–59.
69. APA. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais [recurso eletrônico]:DSM-5 / [American Psychiatric Association ; tradução: Maria Inês Corrêa Nascimento ... et al.] ; revisão técnica: Aristides Volpato Cordioli ... [et al.]. – 5.ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, 2014. Disponível em: <http://www.niip.com.br/wp-content/uploads/2018/06/Manual-Diagnostic-e-Estatistico-de-Transtornos-Mentais-DSM-5-1-pdf.pdf>. Acesso em: 12 set. 2021.

70. Marsh L, McDonald WM, Cummings J, Ravina B; NINDS/NIMH Work Group on Depression and Parkinson's Disease. Provisional diagnostic criteria for depression in Parkinson's disease: report of an NINDS/NIMH Work Group. *Mov Disord*. 2006 Feb;21(2):148-58. doi: 10.1002/mds.20723. PMID: 16211591.
71. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002 Mar 28;34(1):13-25. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00653-0. PMID: 11931738
72. Depressão: Causas e tratamento - 2º edição. Aaron T. Beck, Brad A. Alford. Artmed Editora, 2009.
73. Barth J, Schumacher M, Herrmann-Lingen C. Depression as a risk factor for mortality in patients with coronary heart disease: a meta-analysis. *Psychosom Med*. 2004;66(6):802-13.
74. Musselman DL, Betan E, Larsen H, Phillips LS. Relationship of depression to diabetes types 1 and 2: epidemiology, biology, and treatment. *Biol Psychiatry*. agosto de 2003;54(3):317-29.
75. Farmer A, Korszun A, Owen MJ, Craddock N, Jones L, Jones I, et al. Medical disorders in people with recurrent depression. *Br J Psychiatry*. maio de 2008;192(5):351-5.
76. Veen G, Giltay EJ, DeRijk RH, van Vliet IM, van Pelt J, Zitman FG. Salivary cortisol, serum lipids, and adiposity in patients with depressive and anxiety disorders. *Metabolism*. junho de 2009;58(6):821-7.
77. Apóstolo JLA, Mendes AC, Azeredo ZA. Adaptación para la lengua Portuguesa de la Depression, Anxiety and Stress Scale (DASS). *Rev Lat Am Enfermagem*. 2006;14(6):863-71.
78. Miller K, Massie MJ. Depression and anxiety. *Cancer J*. 2006 Sep-Oct;12(5):388-97. doi: 10.1097/00130404-200609000-00008. PMID: 17034675.
79. Chen LJ, Shen BQ, Liu DD, Li ST. The effects of early-life predator stress on anxiety- and depression-like behaviors of adult rats. *Neural Plast*. 2014;2014:163908. doi: 10.1155/2014/163908. Epub 2014 Apr 15. PMID: 24839560; PMCID: PMC4009288.
80. Mello AF, Jurueña MF, Pariente CM, Tyrka AR, Price LH, Carpenter LL, et al. [Depression and stress: is there an endophenotype?]. *Rev Bras Psiquiatr*. maio de 2007;29 Suppl 1(0 1):S13-8
81. Mello MF, Faria AA, Mello AF, Carpenter LL, Tyrka AR, Price LH. Childhood maltreatment and adult psychopathology: Pathways to hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction. *Rev Bras Psiquiatr*. 2009;31(suppl 2):S41-8.
82. Teicher MH, Samson JA, Anderson CM, Ohashi K. The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. *Nat Rev Neurosci*. setembro de 2016;17(10):652-66.
83. Tursich M, Neufeld RWJ, Frewen PA, Harricharan S, Kibler JL, Rhind SG, et al. Association of trauma exposure with proinflammatory activity: a transdiagnostic meta-analysis. *Transl Psychiatry*. 2014 Jul;4(7):e413.
84. Zhang H, Yao Z, Lin L, Sun X, Shi X, Zhang L. Early life stress predicts cortisol response to psychosocial stress in healthy young adults. *Psych J*. 2019 Sep;8(3):353-

62.

85. D. Aleksić, M. Aksić, N.V. Radonjić, A. Jovanović, B. Marković, N. Petronijević, V. Radonjić, M. Mališ, B. Filipović. Long-term effects of maternal deprivation on the volume, number and size of neurons in the amygdala and nucleus accumbens of rats. *Psychiatr. Danub.*, 28 (3) (2016), pp. 211-219.
86. Agorastos A, Pervanidou P, Chrousos GP, Baker DG. Developmental Trajectories of Early Life Stress and Trauma: A Narrative Review on Neurobiological Aspects Beyond Stress System Dysregulation. *Front Psychiatry* [Internet]. 2019 [cited 2023 Feb 27];10(MAR).
87. L.A. de Azeredo, L.E. Wearick-Silva, T.W. Viola, S.G. Tractenberg, A. Centeno-Silva, R. Orso, N. Schröder, T.W. Bredy, R. Grassi-Oliveira. Maternal separation induces hippocampal changes in cadherin-1 (CDH-1) mRNA and recognition memory impairment in adolescent mice. *Neurobiol. Learn Mem.*, 141 (2017), pp. 157-167, 10.1016/j.nlm.2017.04.006.
88. Brenhouse HC, Danese A, Grassi-Oliveira R. Neuroimmune Impacts of Early-Life Stress on Development and Psychopathology. *Curr Top Behav Neurosci* [Internet]. 2019 [cited 2023 Feb 27];43:423–47.
89. J.L. Hanson, B.M. Nacewicz, M.J. Sutterer, A.A. Cayo, S.M. Schaefer, K.D. Rudolph, E.A. Shirtcliff, S.D. Pollak, R.J. Davidson. Behavioral problems after early life stress: contributions of the hippocampus and amygdala. *Biol. Psychiatry*, 77 (4) (2015), pp. 314-323, 10.1016/j.biopsych.2014.04.020
90. R. Massart, Z. Nemoda, M.J. Suderman, S. Sutti, A.M. Ruggiero, A.M. Dettmer, S.J. Suomi, M. Szyf. Early life adversity alters normal sex-dependent developmental dynamics of DNA methylation. *Dev. Psychopathol.*, 28 (4pt2) (2016), pp. 1259-1272, 10.1017/S0954579416000833.
91. Teissier A, Le Magueresse C, Olusakin J, Andrade da Costa BLS, De Stasi AM, Bacci A, et al. Early-life stress impairs postnatal oligodendrogenesis and adult emotional behaviour through activity-dependent mechanisms. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2023 Feb 27];25(6):1159–74.
92. Lumertz FS, Kestering-Ferreira E, Orso R, Creutzberg KC, Tractenberg SG, Stocchero BA, et al. Effects of early life stress on brain cytokines: A systematic review and meta-analysis of rodent studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 2022 Aug 1;139:104746.
93. H.J. Park, S.A. Kim, W.S. Kang, J.W. Kim. Early-life stress modulates gut microbiota and peripheral and central inflammation in a sex-dependent manner. *Int J. Mol. Sci.*, 22 (4) (2021), 10.3390/ijms22041899.
94. J. Tannous, B.R. Godlewska, V. Tirumalaraju, J.C. Soares, P.J. Cowen, S. Selvaraj. Stress, inflammation and hippocampal subfields in depression: a 7 Tesla MRI Study. *Transl. Psychiatry*, 10 (1) (2020), p. 78, 10.1038/s41398-020-0759-0
95. Lo Iacono L, Catale C, Martini A, Valzania A, Viscomi MT, Chiurchiù V, et al. From Traumatic Childhood to Cocaine Abuse: The Critical Function of the Immune System. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2018 Dec 15 [cited 2023 Feb 27];84(12):905–16.
96. A. Danese, S. J Lewis. Psychoneuroimmunology of early-life stress: the hidden wounds of childhood trauma. *Neuropsychopharmacology*, 42 (1) (2017), pp. 99-114,

10.1038/npp.2016.198

97. Schiepers OJG, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005 Feb;29(2):201–17.
98. Czarny P, Wigner P, Galecki P, Sliwinski T. The interplay between inflammation, oxidative stress, DNA damage, DNA repair and mitochondrial dysfunction in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018 Jan;80(Pt C):309–21.
99. Scrivo R, Vasile M, Bartosiewicz I, Valesini G. Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases. *Autoimmun Rev*. 2011 May;10(7):369–74. doi: 10.1016/j.autrev.2010.12.006. Epub 2010 Dec 30. PMID: 21195808.
100. Goldstein BI, Kemp DE, Soczynska JK, McIntyre RS. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *J Clin Psychiatry*. agosto de 2009;70(8):1078–90.
101. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. maio de 2009;65(9):732–41.
102. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. janeiro de 2008;9(1):46–56.
103. Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*. janeiro de 2006;27(1):24–31.
104. Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. janeiro de 2012;37(1):137–62.
105. Nakamura M, Okada S, Toyama Y, Okano H. Role of IL-6 in spinal cord injury in a mouse model. *Clin Rev Allergy Immunol*. junho de 2005;28(3):197–204.
106. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. maio de 2005;308(5726):1314–8.
107. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*. abril de 2009;29(13):3974–80.
108. Augusto-Oliveira M, Arrifano GP, Lopes-Araújo A, Santos-Sacramento L, Takeda PY, Anthony DC, et al. What Do Microglia Really Do in Healthy Adult Brain? *Cells*. outubro de 2019;8(10).
109. Maroun M, Kavushansky A, Holmes A, Wellman C, Motanis H. Enhanced extinction of aversive memories by high-frequency stimulation of the rat infralimbic cortex. *PLoS One*. 2012;7(5):e35853.
110. Torres-Platas SG, Cruceanu C, Chen GG, Turecki G, Mechawar N. Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain Behav Immun*. novembro de 2014;42:50–9.

111. Setiawan E, Wilson AA, Mizrahi R, Rusjan PM, Miler L, Rajkowska G, et al. Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes. *JAMA psychiatry*. março de 2015;72(3):268–75.
112. D'Mello C, Swain MG. Liver-brain interactions in inflammatory liver diseases: implications for fatigue and mood disorders. *Brain Behav Immun*. janeiro de 2014;35:9–20.
113. Hodes GE, Pfau ML, Leboeuf M, Golden SA, Christoffel DJ, Bregman D, et al. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. novembro de 2014;111(45):16136–41.
114. McKim DB, Weber MD, Niraula A, Sawicki CM, Liu X, Jarrett BL, et al. Microglial recruitment of IL-1 β -producing monocytes to brain endothelium causes stress-induced anxiety. *Mol Psychiatry*. junho de 2018;23(6):1421–31.
115. Yirmiya R, Rimmerman N, Reshef R. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci*. outubro de 2015;38(10):637–58.
116. Johnson FK, Kaffman A. Early life stress perturbs the function of microglia in the developing rodent brain: New insights and future challenges. *Brain Behav Immun*. março de 2018;69:18–27.
117. Catale C, Girona S, Lo Iacono L, Carola V. Microglial Function in the Effects of Early-Life Stress on Brain and Behavioral Development. *J Clin Med*. fevereiro de 2020;9(2).
118. Kreisel T, Frank MG, Licht T, Reshef R, Ben-Menachem-Zidon O, Baratta M V, et al. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. *Mol Psychiatry*. junho de 2014;19(6):699–709.
119. Weber MD, McKim DB, Niraula A, Witcher KG, Yin W, Sobol CG, et al. The Influence of Microglial Elimination and Repopulation on Stress Sensitization Induced by Repeated Social Defeat. *Biol Psychiatry*. abril de 2019;85(8):667–78.
120. Blank T, Detje CN, Spieß A, Hagemeyer N, Brendecke SM, Wolfart J, et al. Brain Endothelial- and Epithelial-Specific Interferon Receptor Chain 1 Drives Virus-Induced Sickness Behavior and Cognitive Impairment. *Immunity*. abril de 2016;44(4):901–12.
121. Nair A, Bonneau RH. Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. *J Neuroimmunol*. fevereiro de 2006;171(1–2):72–85.
122. Bekhbat M, Neigh GN. Sex differences in the neuro-immune consequences of stress: Focus on depression and anxiety. *Brain Behav Immun*. janeiro de 2018;67:1–12.
123. Fonken LK, Frank MG, Gaudet AD, D'Angelo HM, Daut RA, Hampson EC, et al. Neuroinflammatory priming to stress is differentially regulated in male and female rats. *Brain Behav Immun*. maio de 2018;70:257–67.
124. Neigh GN, Gillespie CF, Nemeroff CB. The neurobiological toll of child abuse and neglect. *Trauma Violence Abuse*. outubro de 2009;10(4):389–410.
125. Bourke CH, Harrell CS, Neigh GN. Stress-induced sex differences: adaptations mediated by the glucocorticoid receptor. *Horm Behav*. agosto de 2012;62(3):210–8.

126. Weinstock M. Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. *Neurobiol Stress*. fevereiro de 2017;6:3–13.
127. Brown KJ, Grunberg NE. Effects of housing on male and female rats: crowding stresses male but calm females. *Physiol Behav*. dezembro de 1995;58(6):1085–9.
128. Haller J, Fuchs E, Halász J, Makara GB. Defeat is a major stressor in males while social instability is stressful mainly in females: towards the development of a social stress model in female rats. *Brain Res Bull*. setembro de 1999;50(1):33–9.
129. McEwen BS, Gianaros PJ. Stress- and allostasis-induced brain plasticity. *Annu Rev Med*. 2011;62:431–45.
130. McEwen BS. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism*. maio de 2005;54(5 Suppl 1):20–3.
131. Giustino TF, Maren S. The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Front Behav Neurosci*. 2015;9:298.
132. Godsil BP, Kiss JP, Spedding M, Jay TM. The hippocampal-prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders? *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol*. outubro de 2013;23(10):1165–81.
133. Hair NL, Hanson JL, Wolfe BL, Pollak SD. Association of Child Poverty, Brain Development, and Academic Achievement. *JAMA Pediatr*. setembro de 2015;169(9):822–9.
134. Hanson JL, Adluru N, Chung MK, Alexander AL, Davidson RJ, Pollak SD. Early neglect is associated with alterations in white matter integrity and cognitive functioning. *Child Dev*. 2013;84(5):1566–78.
135. Luby J, Belden A, Botteron K, Marrus N, Harms MP, Babb C, et al. The effects of poverty on childhood brain development: the mediating effect of caregiving and stressful life events. *JAMA Pediatr*. dezembro de 2013;167(12):1135–42.
136. Carrion VG, Weems CF, Reiss AL. Stress predicts brain changes in children: a pilot longitudinal study on youth stress, posttraumatic stress disorder, and the hippocampus. *Pediatrics*. março de 2007;119(3):509–16.
137. Chaney A, Carballido A, Amico F, Fagan A, Skokauskas N, Meaney J, et al. Effect of childhood maltreatment on brain structure in adult patients with major depressive disorder and healthy participants. *J Psychiatry Neurosci*. janeiro de 2014;39(1):50–9.
138. Hoy K, Barrett S, Shannon C, Campbell C, Watson D, Rushe T, et al. Childhood trauma and hippocampal and amygdalar volumes in first-episode psychosis. *Schizophr Bull*. novembro de 2012;38(6):1162–9.
139. Paquola C, Bennett MR, Lagopoulos J. Understanding heterogeneity in grey matter research of adults with childhood maltreatment-A meta-analysis and review. *Neurosci Biobehav Rev*. outubro de 2016;69:299–312.
140. Pederson CL, Maurer SH, Kaminski PL, Zander KA, Peters CM, Stokes-Crowe LA, et al. Hippocampal volume and memory performance in a community-based sample of women with posttraumatic stress disorder secondary to child abuse. *J Trauma Stress*. fevereiro de 2004;17(1):37–40.

141. Sheffield JM, Williams LE, Woodward ND, Heckers S. Reduced gray matter volume in psychotic disorder patients with a history of childhood sexual abuse. *Schizophr Res.* janeiro de 2013;143(1):185–91.
142. Tottenham N, Hare TA, Quinn BT, McCarry TW, Nurse M, Gilhooly T, et al. Prolonged institutional rearing is associated with atypically large amygdala volume and difficulties in emotion regulation. *Dev Sci.* janeiro de 2010;13(1):46–61.
143. Evans GW, Swain JE, King AP, Wang X, Javanbakht A, Ho SS, et al. Childhood Cumulative Risk Exposure and Adult Amygdala Volume and Function. *J Neurosci Res.* junho de 2016;94(6):535–43.
144. Leuner B, Gould E. Structural plasticity and hippocampal function. *Annu Rev Psychol.* 2010;61:111–40, C1-3.
145. Gogtay N, Nugent TF 3rd, Herman DH, Ordonez A, Greenstein D, Hayashi KM, et al. Dynamic mapping of normal human hippocampal development. *Hippocampus.* 2006;16(8):664–72.
146. McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol.* abril de 2008;583(2–3):174–85.
147. Sapolsky RM, Romero LM, Munck a. U. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses ? Preparative Actions *. *Endocr Rev.* 2000;21(April):55–89.
148. Sapolsky RM. Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem Res.* novembro de 2003;28(11):1735–42.
149. Bremner JD. Does stress damage the brain? *Biol Psychiatry.* abril de 1999;45(7):797–805.
150. Kao C-Y, Stalla G, Stalla J, Wotjak CT, Anderzhanova E. Norepinephrine and corticosterone in the medial prefrontal cortex and hippocampus predict PTSD-like symptoms in mice. *Eur J Neurosci.* maio de 2015;41(9):1139–48.
151. Reber SO. Stress and animal models of inflammatory bowel disease--an update on the role of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology.* janeiro de 2012;37(1):1–19.
152. Cohen H, Kozlovsky N, Matar MA, Zohar J, Kaplan Z. Distinctive hippocampal and amygdalar cytoarchitectural changes underlie specific patterns of behavioral disruption following stress exposure in an animal model of PTSD. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol.* dezembro de 2014;24(12):1925–44.
153. Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry.* abril de 2004;161(4):598–607.
154. Kitayama N, Vaccarino V, Kutner M, Weiss P, Bremner JD. Magnetic resonance imaging (MRI) measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord.* setembro de 2005;88(1):79–86.
155. Lindauer RJL, Olff M, van Meijel EPM, Carlier IVE, Gersons BPR. Cortisol, learning, memory, and attention in relation to smaller hippocampal volume in police officers with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry.* janeiro de 2006;59(2):171–7.

156. Shin LM, Shin PS, Heckers S, Krangel TS, Macklin ML, Orr SP, et al. Hippocampal function in posttraumatic stress disorder. *Hippocampus*. 2004;14(3):292–300.
157. Arain M, Haque M, Johal L, Mathur P, Nel W, Rais A, et al. Maturation of the adolescent brain. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2013;9:449–61.
158. Arnsten AFT. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci*. junho de 2009;10(6):410–22.
159. Bock J, Gruss M, Becker S, Braun K. Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: correlation with developmental time windows. *Cereb Cortex*. junho de 2005;15(6):802–8.
160. Pascual R, Zamora-León SP. Effects of neonatal maternal deprivation and postweaning environmental complexity on dendritic morphology of prefrontal pyramidal neurons in the rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2007;67(4):471–9.
161. Zehle S, Bock J, Jezierski G, Gruss M, Braun K. Methylphenidate treatment recovers stress-induced elevated dendritic spine densities in the rodent dorsal anterior cingulate cortex. *Dev Neurobiol*. dezembro de 2007;67(14):1891–900.
162. Gos T, Bock J, Poeggel G, Braun K. Stress-induced synaptic changes in the rat anterior cingulate cortex are dependent on endocrine developmental time windows. *Synapse*. março de 2008;62(3):229–32.
163. Monroy E, Hernández-Torres E, Flores G. Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *J Chem Neuroanat*. outubro de 2010;40(2):93–101.
164. Muhammad A, Kolb B. Maternal separation altered behavior and neuronal spine density without influencing amphetamine sensitization. *Behav Brain Res*. setembro de 2011;223(1):7–16.
165. Stevenson CW, Marsden CA, Mason R. Early life stress causes FG-7142-induced corticolimbic dysfunction in adulthood. *Brain Res*. fevereiro de 2008;1193:43–50.
166. Judo C, Matsumoto M, Yamazaki D, Hiraide S, Yanagawa Y, Kimura S, et al. Early stress exposure impairs synaptic potentiation in the rat medial prefrontal cortex underlying contextual fear extinction. *Neuroscience*. setembro de 2010;169(4):1705–14.
167. Baudin A, Blot K, Verney C, Estevez L, Santamaria J, Gressens P, et al. Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem*. outubro de 2012;98(3):207–14.
168. do Prado CH, Narahari T, Holland FH, Lee H-N, Murthy SK, Brenhouse HC. Effects of early adolescent environmental enrichment on cognitive dysfunction, prefrontal cortex development, and inflammatory cytokines after early life stress. *Dev Psychobiol*. maio de 2016;58(4):482–91.
169. Han F, Ding J, Shi Y. Expression of amygdala mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the single-prolonged stress rats. *BMC Neurosci*. junho de 2014;15:77.
170. Harding AJ, Stimson E, Henderson JM, Halliday GM. Clinical correlates of selective

- pathology in the amygdala of patients with Parkinson's disease. *Brain*. novembro de 2002;125(Pt 11):2431–45.
171. Shekhar A, Truitt W, Rainnie D, Sajdyk T. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. *Stress*. dezembro de 2005;8(4):209–19.
 172. Ebner K, Rupniak NM, Saria A, Singewald N. Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. março de 2004;101(12):4280–5.
 173. Carter RN, Pinnock SB, Herbert J. Does the amygdala modulate adaptation to repeated stress? *Neuroscience*. 2004;126(1):9–19.
 174. Davis M. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. *Am Psychol*. novembro de 2006;61(8):741–56.
 175. Roozendaal B, McGaugh JL. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem*. janeiro de 1996;65(1):1–8.
 176. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. setembro de 2011;333(6048):1456–8.
 177. Engler H, Doenlen R, Engler A, Riether C, Prager G, Niemi MB, et al. Acute amygdaloid response to systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2011; 25:1384–92. doi: 10.1016/j.bbi.2011.04.005
 178. Kuo JR, Kaloupek DG, Woodward SH. Amygdala volume in combat-exposed veterans with and without posttraumatic stress disorder: a cross-sectional study. *Arch Gen Psychiatry*. outubro de 2012;69(10):1080–6.
 179. Weniger G, Lange C, Sachsse U, Irle E. Amygdala and hippocampal volumes and cognition in adult survivors of childhood abuse with dissociative disorders. *Acta Psychiatr Scand*. outubro de 2008;118(4):281–90.
 180. Morey RA, Gold AL, LaBar KS, Beall SK, Brown VM, Haswell CC, et al. Amygdala volume changes in posttraumatic stress disorder in a large case-controlled veterans group. *Arch Gen Psychiatry*. novembro de 2012;69(11):1169–78.
 181. Bremner JD, Randall P, Vermetten E, Staib L, Bronen RA, Mazure C, et al. Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse--a preliminary report. *Biol Psychiatry*. janeiro de 1997;41(1):23–32.
 182. Lindauer RJL, Vlieger E-J, Jalink M, Olff M, Carlier IVE, Majoie CBLM, et al. Smaller hippocampal volume in Dutch police officers with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*. setembro de 2004;56(5):356–63.
 183. Lindauer RJL, Vlieger E-J, Jalink M, Olff M, Carlier IVE, Majoie CBLM, et al. Effects of psychotherapy on hippocampal volume in out-patients with post-traumatic stress disorder: a MRI investigation. *Psychol Med*. outubro de 2005;35(10):1421–31.
 184. Schmahl C, Berne K, Krause A, Kleindienst N, Valerius G, Vermetten E, et al. Hippocampus and amygdala volumes in patients with borderline personality disorder

- with or without posttraumatic stress disorder. *J Psychiatry Neurosci.* julho de 2009;34(4):289–95.
185. Veer IM, Oei NYL, van Buchem MA, Spinhoven P, Elzinga BM, Rombouts SARB. Evidence for smaller right amygdala volumes in posttraumatic stress disorder following childhood trauma. *Psychiatry Res.* setembro de 2015;233(3):436–42.
 186. Pietrzak RH, Averill LA, Abdallah CG, Neumeister A, Krystal JH, Levy I, et al. Amygdala-hippocampal volume and the phenotypic heterogeneity of posttraumatic stress disorder: a cross-sectional study. *JAMA psychiatry.* abril de 2015;72(4):396–8.
 187. Vilela MG, Santos Júnior JL, Castro-Silva JG. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *Femina.* outubro de 2007;35(10):667-70.
 188. Tractenberg SG, Levandowski ML, de Azeredo LA, Orso R, Roithmann LG, Hoffmann ES, et al. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav Rev.* setembro de 2016;68:489–503.
 189. Rice CJ, Sandman CA, Lenjavi MR, Baram TZ. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology.* outubro de 2008;149(10):4892–900.
 190. Banasr M, Valentine GW, Li X-Y, Gourley SL, Taylor JR, Duman RS. Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. *Biol Psychiatry.* setembro de 2007;62(5):496–504.
 191. Liu MY, Yin CY, Zhu LJ, Zhu XH, Xu C, Luo CX, et al. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat Protoc [Internet].* 2018 Jul 1 [cited 2023 Feb 27];13(7):1686–98.
 192. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp.* fevereiro de 2015;(96):e52434.
 193. Bourin M, Hascoët M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol.* fevereiro de 2003;463(1–3):55–65.
 194. Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. *J Vis Exp.* dezembro de 2008;(22).
 195. Sazanova K, Osmolovskaya N, Schiparev S, Yakkonen K, Kuchaeva L, Vlasov D. Organic acids induce tolerance to zinc- and copper-exposed fungi under various growth conditions. *Curr Microbiol.* abril de 2015;70(4):520–7.
 196. Li N, Lee B, Liu R-J, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science.* agosto de 2010;329(5994):959–64.
 197. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* abril de 1977;266(5604):730–2.
 198. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. “Behavioural despair” in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol.* outubro de 1978;51(3):291–4.
 199. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for

- antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* outubro de 1977;229(2):327–36.
200. McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SAL. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp [Internet].* 2012 Sep 15 [cited 2023 Mar 16];(67).
 201. Fernandes RO, De Castro AL, Bonetto JHP, Ortiz VD, Müller DD, Campos-Carraro C, et al. Sulforaphane effects on postinfarction cardiac remodeling in rats: modulation of redox-sensitive prosurvival and proapoptotic proteins. *J Nutr Biochem [Internet].* 2016 May 27 [cited 2023 Feb 27];34:106–17.
 202. Ilha J, Araujo RT, Malysz T, Hermel EES, Rigon P, Xavier LL, et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil Neural Repair.* 2008;22(4):355–66.
 203. Lazzarotto Rucatti A, Boemo Jaenisch R, Dalcin Rossato D, Poletto Bonetto JH, Ferreira J, Xavier LL, et al. Skeletal muscle electrical stimulation improves baroreflex sensitivity and heart rate variability in heart failure rats. *Auton Neurosci [Internet].* 2015 Dec 1 [cited 2023 Mar 15];193:92–6.
 204. Roberts N, Puddephat MJ, McNulty V. The benefit of stereology for quantitative radiology. *Br J Radiol [Internet].* 2000 [cited 2023 Mar 15];73(871):679–97.
 205. Yang M, Fu Q, Hu X, Li B, Ma C. Behavior of Rats in a Self-Paced Risky Decision-Making Task Based on Definite Probability. *Brain Sci [Internet].* 2022 Jun 1 [cited 2023 Feb 27];12(6).
 206. Syed SA, Nemeroff CB. Early Life Stress, Mood, and Anxiety Disorders. [cited 2023 Mar 15]; Available from: <https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>.
 207. Gracia-Rubio I, Moscoso-Castro M, Pozo OJ, Marcos J, Nadal R, Valverde O. Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry [Internet].* 2016 Feb 4 [cited 2023 Mar 15];65:104–17.
 208. Weinstock M. Sex-dependent changes induced by prenatal stress in cortical and hippocampal morphology and behaviour in rats: an update. *Stress [Internet].* 2011 Nov [cited 2023 Mar 16];14(6):604–13.
 209. Maeng LY, Milad MR. Sex differences in anxiety disorders: Interactions between fear, stress, and gonadal hormones. *Horm Behav [Internet].* 2015 Nov 1 [cited 2023 Mar 15];76:106–17.
 210. Nascimento EB, Dierschnabel AL, Lima RH, Sousa MBC, Suchecki D, Silva RH, et al. Stress-related impairment of fear memory acquisition and disruption of risk assessment behavior in female but not in male mice. *Behavioural processes [Internet].* 2022 Jun 1 [cited 2023 Mar 15];199.
 211. Viola TW, Wearick-Silva LE, Creutzberg KC, Kestering-Ferreira É, Orso R, Centeno-Silva A, et al. Postnatal impoverished housing impairs adolescent risk-assessment and increases risk-taking: A sex-specific effect associated with histone epigenetic regulation of *Crfr1* in the medial prefrontal cortex. *Psychoneuroendocrinology.* 2019 Jan 1;99:8–19.

212. Rodgers RJ, Cole JC. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiol Behav* [Internet]. 1993 [cited 2023 Mar 15];53(2):383–8.
213. Blanchard DC, Blanchard RJ, Rodgers RJ. Risk Assessment and Animal Models of Anxiety. *Animal Models in Psychopharmacology* [Internet]. 1991 [cited 2023 Mar 15];117–34.
214. Roy V, Chapillon P. Further evidences that risk assessment and object exploration behaviours are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. *Behavioural Brain Research* [Internet]. 2004 Oct 5 [cited 2023 Mar 15];154(2):439–48.
215. Tractenberg SG, Levandowski ML, de Azeredo LA, Orso R, Roithmann LG, Hoffmann ES, et al. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 Sep;68:489–503.
216. Millstein RA, Holmes A. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2007 [cited 2023 Mar 15];31(1):3–17.
217. Lesse A, Rether K, Gröger N, Braun K, Bock J. Chronic Postnatal Stress Lesse A, Rether K, Gröger N, Braun K, Bock J. Chronic Postnatal Stress Induces Depressive-like Behavior in Male Mice and Programs second-Hit Stress-Induced Gene Expression Patterns of OxtR and AvpR1a in Adulthood. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2023 Mar 15];54(6):4813–9.
218. Romeo RD, Mueller A, Sisti HM, Ogawa S, McEwen BS, Brake WG. Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Horm Behav* [Internet]. 2003 [cited 2023 Mar 15];43(5):561–7.
219. Tchenio A, Lecca S, Valentinova K, Mameli M. Limiting habenular hyperactivity ameliorates maternal separation-driven depressive-like symptoms. *Nature Communications* 2017 8:1 [Internet]. 2017 Oct 26 [cited 2023 Mar 15];8(1):1–8.
220. Wierenga LM, Doucet GE, Dima D, Agartz I, Aghajani M, Akudjedu TN, et al. Greater male than female variability in regional brain structure across the lifespan. *Hum Brain Mapp* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2023 Mar 15];43(1):470–99.
221. Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* [Internet]. 2010 Jan 14 [cited 2023 Mar 15];65(1):7–19.
222. McEwen BS, Conrad CD, Kuroda Y, Frankfurt M, Maria Magarinos A, McKittrick C. Prevention of stress-induced morphological and cognitive consequences. *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet]. 1997 Oct 1 [cited 2023 Mar 16];7 Suppl 3(SUPPL. 3).
223. Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* [Internet]. 2005 Dec [cited 2023 Mar 15];29(8):1201–13.
224. Bonne O, Vythilingam M, Inagaki M, Wood S, Neumeister A, Nugent AC, et al. Reduced posterior hippocampal volume in posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry* [Internet]. 2008 [cited 2023 Mar 15];69(7):1087–91.

225. Frey BN, Andreazza AC, Nery FG, Martins MR, Quevedo J, Soares JC, et al. The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder. *Behavioural pharmacology* [Internet]. 2007 Sep [cited 2023 Mar 15];18(5–6):419–30.
226. Reshetnikov V V., Ayriyants KA, Ryabushkina YA, Sozonov NG, Bondar NP. Sex-specific behavioral and structural alterations caused by early-life stress in C57BL/6 and BTBR mice. *Behavioural brain research* [Internet]. 2021 Sep 24 [cited 2023 Mar 15];414.
227. Bock J, Murmu MS, Biala Y, Weinstock M, Braun K. Prenatal stress and neonatal handling induce sex-specific changes in dendritic complexity and dendritic spine density in hippocampal subregions of prepubertal rats. *Neuroscience* [Internet]. 2011 Oct 13 [cited 2023 Mar 16];193:34–43.
228. McEwen BS. Sex, stress and the hippocampus: Allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2002 Sep [cited 2023 Mar 16];23(5):921–39.
229. Galea LAM, McEwen BS, Tanapat P, Deak T, Spencer RL, Dhabhar FS. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience* [Internet]. 1997 Sep 26 [cited 2023 Mar 16];81(3):689–97.
230. Kaas JH. Evolution of somatosensory and motor cortex in primates. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. 2004 Nov;281(1):1148–56.
231. Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C. The human central nervous system. *The Human Central Nervous System*. 2008;1–967.
232. Craig AD. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2002 [cited 2023 Mar 16];3(8):655–66.
233. Peyron R, Laurent B, García-Larrea L. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis (2000). *Neurophysiol Clin* [Internet]. 2000 [cited 2023 Mar 16];30(5):263–88.
234. Takatsuru Y, Koibuchi N. Alteration of somatosensory response in adulthood by early life stress. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2015 May 19 [cited 2023 Mar 16];8(MAY).
235. Kropf E, Syan SK, Minuzzi L, Frey BN. From anatomy to function: the role of the somatosensory cortex in emotional regulation. *Braz J Psychiatry* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2023 Mar 16];41(3):261–9.
236. Price RB, Duman R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Mar 16];25(3):530–43.
237. Carulli D, Broersen R, de Winter F, Muir EM, Meškovic M, de Waal M, et al. Cerebellar plasticity and associative memories are controlled by perineuronal nets. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2020 Mar 24 [cited 2023 Mar 16];117(12):6855–65.
238. Alaiyed S, McCann M, Mahajan G, Rajkowska G, Stockmeier CA, Kellar KJ, et al. Venlafaxine Stimulates an MMP-9-Dependent Increase in Excitatory/Inhibitory Balance in a Stress Model of Depression. *Journal of Neuroscience* [Internet]. 2020 May 27 [cited 2023 Mar 16];40(22):4418–31.
239. Feng Y, Zhu G, Chen R, Shi G, Peng M, Zhou Y, et al. Electroacupuncture remodels

- the extracellular matrix and promotes synaptic plasticity in a mouse model of depression. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2022 Oct 20 [cited 2023 Mar 16];626:44–50.
240. Spijker S, Koskinen MK, Riga D. Incubation of depression: ECM assembly and parvalbumin interneurons after stress. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Mar 16];118:65–79.
 241. Pitman RK, Rasmusson AM, Koenen KC, Shin LM, Orr SP, Gilbertson MW, et al. Biological Studies of Posttraumatic Stress Disorder. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2012 Nov [cited 2023 Mar 16];13(11):769.
 242. Roy M, Shohamy D, Wager TD. Ventromedial prefrontal-subcortical systems and the generation of affective meaning. *Trends Cogn Sci* [Internet]. 2012 Mar [cited 2023 Mar 16];16(3):147–56.
 243. Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL. The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron* [Internet]. 2012 Dec 12 [cited 2023 Mar 16];76(6):1057.
 244. Wood KH, Ver Hoef LW, Knight DC. Neural mechanisms underlying the conditioned diminution of the unconditioned fear response. *Neuroimage* [Internet]. 2012 Mar [cited 2023 Mar 16];60(1):787–99.
 245. Matisz CE, Gruber AJ. Neuroinflammatory remodeling of the anterior cingulate cortex as a key driver of mood disorders in gastrointestinal disease and disorders. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Mar 16];133.
 246. Gilmartin MR, Helmstetter FJ. Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. *Learning & Memory* [Internet]. 2010 Jun [cited 2023 Mar 16];17(6):289.
 247. Gilmartin MR, Kwapis JL, Helmstetter FJ. Trace and contextual fear conditioning are impaired following unilateral microinjection of muscimol in the ventral hippocampus or amygdala, but not the medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem* [Internet]. 2012 May [cited 2023 Mar 16];97(4):452–64.
 248. Gilmartin MR, McEchron MD. Single neurons in the medial prefrontal cortex of the rat exhibit tonic and phasic coding during trace fear conditioning. *Behavioral neuroscience* [Internet]. 2005 Dec [cited 2023 Mar 16];119(6):1496–510.
 249. Reis DS, Jarome TJ, Helmstetter FJ. Memory formation for trace fear conditioning requires ubiquitin-proteasome mediated protein degradation in the prefrontal cortex. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2013 [cited 2023 Mar 16];7(OCT).
 250. Runyan JD, Dash PK. Intra-medial prefrontal administration of SCH-23390 attenuates ERK phosphorylation and long-term memory for trace fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem* [Internet]. 2004 Sep [cited 2023 Mar 16];82(2):65–70.
 251. Runyan JD, Moore AN, Dash PK. A role for prefrontal cortex in memory storage for trace fear conditioning. *J Neurosci* [Internet]. 2004 Feb 11 [cited 2023 Mar 16];24(6):1288–95.
 252. Gourley SL, Taylor JR. Going and stopping: Dichotomies in behavioral control by the prefrontal cortex. *Nat Neurosci* [Internet]. 2016 Apr 4 [cited 2023 Mar 16];19(6):656.

253. Muller Ewald VA, LaLumiere RT. Neural systems mediating the inhibition of cocaine-seeking behaviors. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2023 Mar 16];174:53–63.
254. Peters J, Kalivas PW, Quirk GJ. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learn Mem* [Internet]. 2009 May [cited 2023 Mar 16];16(5):279–88.
255. Hiser J, Koenigs M. The Multifaceted Role of the Ventromedial Prefrontal Cortex in Emotion, Decision Making, Social Cognition, and Psychopathology. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2018 Apr 15 [cited 2023 Mar 16];83(8):638–47.
256. Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* [Internet]. 2018 Oct 12 [cited 2023 Mar 16];362(6411):181–5.
257. Guadagno A, Verlezza S, Long H, Wong TP, Walker CD. It Is All in the Right Amygdala: Increased Synaptic Plasticity and Perineuronal Nets in Male, But Not Female, Juvenile Rat Pups after Exposure to Early-Life Stress. *J Neurosci* [Internet]. 2020 Oct 21 [cited 2023 Mar 16];40(43):8276–91.
258. Likhtik E, Stujenske JM, Topiwala MA, Harris AZ, Gordon JA. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. *Nat Neurosci* [Internet]. 2014 Jan [cited 2023 Mar 16];17(1):106–13.
259. Quirk GJ, Likhtik E, Pelletier JG, Paré D. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *J Neurosci* [Internet]. 2003 Sep 24 [cited 2023 Mar 16];23(25):8800–7.
260. Rosenkranz JA, Moore H, Grace AA. The prefrontal cortex regulates lateral amygdala neuronal plasticity and responses to previously conditioned stimuli. *J Neurosci* [Internet]. 2003 Dec 3 [cited 2023 Mar 16];23(35):11054–64.
261. Correll CM, Rosenkranz JA, Grace AA. Chronic cold stress alters prefrontal cortical modulation of amygdala neuronal activity in rats. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2023 Mar 16];58(5):382–91.
262. Orsini CA, Heshmati SC, Garman TS, Wall SC, Bizon JL, Setlow B. Contributions of medial prefrontal cortex to decision making involving risk of punishment. *Neuropharmacology* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2023 Mar 16];139:205–16.
263. Hong DD, Huang WQ, Ji AA, Yang SS, Xu H, Sun KY, et al. Neurons in rat orbitofrontal cortex and medial prefrontal cortex exhibit distinct responses in reward and strategy-update in a risk-based decision-making task. *Metab Brain Dis* [Internet]. 2019 Apr 15 [cited 2023 Mar 16];34(2):417–29.
264. Daskalakis NP, Enthoven L, Schoonheere E, de Kloet ER, Oitzl MS. Immediate effects of maternal deprivation on the (re)activity of the HPA-axis differ in CD1 and C57Bl/6J mouse pups. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014 Nov 5;5(NOV):190.
265. Suri D, Veenit V, Sarkar A, Thiagarajan D, Kumar A, Nestler EJ, et al. Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2023 Mar 16];73(7):658–66.
266. Pryce CR, Feldon J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;27(1–2):57–71.

267. Bondar NP, Lepeshko AA, Reshetnikov V V. Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects. Behavioural neurology [Internet]. 2018 [cited 2023 Mar 8];2018.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA



SIPESQ Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 10755

Porto Alegre, 11 de março de 2022

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "EFEITO DO ESTRESSE PRECOCE SOBRE O USO AGUDO DE DIETILPROPIONA EM CAMUNDONGOS ADOLESCENTES MACHOS" coordenado por THIAGO W E N D T V I O L A .

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 11/03/2022 - 11/03/2024

Nº de Animais	Espécie
107	Mus musculus
Total de Animais: 107	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

ANEXO B – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS CIENTÍFICOS DURANTE O MESTRADO

Neuroscience and Biobehavioral Reviews 134 (2022) 104509



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience and Biobehavioral Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neubiorev



Review article

Contagious depression: Automatic mimicry and the mirror neuron system - A review

Lisié Valéria Paz^a, Thiago Wendt Viola^b, Bruna Bueno Milanesi^a, Juliana Henz Sulzbach^a, Régis Gemerasca Mestriner^a, Andrea Wieck^a, Léder Leal Xavier^{a,*}

^a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Av. Ipiranga 6681, Prédio 12C, Sala 104, Porto Alegre, Rio Grande do Sul CEP 90619-900, Brazil

^b Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Avenida Ipiranga 6681, prédio 11, sala 926, Porto Alegre, Rio Grande do Sul CEP 90619-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Contagious depression
Emotional contagion
Mimicry
Mirror neuron system
Empathy

ABSTRACT

Contagious depression is a theory proposing that depression can be induced or triggered by our social environment. This theory is based on emotional contagion, the idea that affective states can be transferred during social interaction, since humans can use emotional contagion to communicate feelings and emotions in conscious and unconscious ways. This review presents behavioral, physiological, and neuroanatomical aspects of two essential contagious depression mechanisms, automatic mimicry and the mirror neuron system.

1. Introduction

Emotions can spread like an infectious disease across social networks in a phenomenon called emotional contagion, which can be defined as a tendency to acquire affective states from our social contacts (Hatfield et al., 1994). For instance, the probability of an individual becoming “discontent” increases with the number of discontent contacts (Hill et al., 2010). This indicates that the social network is a potential source of both positive and negative emotions. Furthermore, emotional contagion seems to occur mostly between family members, partners, roommates, close friends, or co-workers that have strong ties and frequent contact (Bastiampillai et al., 2013; Hill et al., 2010).

It is not only emotions that seem to be contagious, complex neuropsychiatric conditions such as depression, anxiety, and its clinical features such as loneliness, are also thought to spread in a similar way (Fowler and Christakis, 2009). This theory is supported by experimental evidence from a study demonstrating that roommates of depressed college students became more depressed after three weeks living together (Joiner, 1994).

Here we will discuss two important aspects of emotional contagion that may be imperative in developing contagious depression, elucidating the mechanisms that seem to be involved in transferring emotions, namely automatic mimicry, and the mirror neuron system (MNS).

Additionally, we will explore other aspects that may be involved, such as empathic concern, the direction of contagion, and why this phenomenon has been selected during human evolution. For this purpose, we adopted the following main questions to guide this review: 1-How can affective states interfere in interactions between people?; 2- Can one person's emotional state “infect” another's?; 3-What mechanisms are involved in the transmission of emotions?; 4- What determines who is the sender and who is the receiver of emotions?

2. Sharing bad emotions: implications for major depressive disorder

Forty-four years ago, James Coyne first described the role social environment plays in depression (Coyne, 1976). Since first being described in the 1970s, several studies have tested the hypothesis that depression can be as contagious as an infectious disease (Abela et al., 2009; Bastiampillai et al., 2013; Coyne, 1976; Karp, 2017; Kiuru et al., 2012). Joiner (1994) investigated the possibility that negative emotions were contagious among roommates during 3-weeks of follow-up. This study found that, while depressive symptoms were contagious, measured by the reliable and well-validated questionnaire for depressive symptomatology – the Beck Depressive Inventory - anxiety and negative affect showed no contagious pattern. (Joiner, 1994). Moreover,

* Corresponding author.

E-mail addresses: lisi-paz@acad.pucrs.br (L.V. Paz), thiago.wendt.viola@gmail.com (T.W. Viola), bruna.milanesi@acad.pucrs.br (B.B. Milanesi), julianasulzbach10@gmail.com (J.H. Sulzbach), regis.mestriner@pucrs.br (R.G. Mestriner), aandrea.wieck@edu.pucrs.br (A. Wieck), llxavier@pucrs.br (L.L. Xavier).

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.12.032>

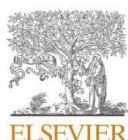
Received 13 January 2021; Received in revised form 19 June 2021; Accepted 19 December 2021

Available online 27 December 2021

0149-7634/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO C – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS CIENTÍFICOS DURANTE O MESTRADO

Toxicology Letters 361 (2022) 43–53



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.journals.elsevier.com/toxicology-letters



Age-related tolerance to paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster*

Paula Fernanda Ribas Neves^{a,b}, Bruna Bueno Milanese^{a,b}, Lisiê Valéria Paz^{a,b},
Valentina Aguiar Cardozo de Miranda Monteiro^a, Laura Tartari Neves^{a,b},
Louise Cordoni da Veiga^a, Rafaela Barboza da Silva^a, Juliana Henz Sulzbach^a,
Gabriela Padilla Knijkik^a, Eduarda Correa de Revoredo Ribeiro^a, Ellen Larissa de Souza Silva^c,
Moema Queiroz Vieira^c, Pamela Brambilla Bagatini^a, Andrea Wieck^{a,b,*},
Régis Gemerasca Mestriner^{a,b}, Léder Leal Xavier^{a,b,c}

^a Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Escola de Ciências, da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCeMM), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Editor: Dr. Angela Mally

Keywords:

Paraquat
Drosophila melanogaster
TEM
Parkinson's disease
Mitochondria

ABSTRACT

Paraquat (PQ) is a widely used herbicide that can cross the dopaminergic neuronal membrane, accumulate in mitochondria and damage complex I of the electron transport chain, leading to neuronal death. In *Drosophila melanogaster*, PQ exposure leads to the development of parkinsonism and is a classical model for studying Parkinson's Disease (PD). Muscle mitochondrial dysfunction, affecting survival and locomotion, is described in familial PD in *D. melanogaster* mutants. However, no study has shown the effects of PQ-induced parkinsonism in *D. melanogaster* regarding muscle ultrastructure and locomotor behavior at different ages. Thus, we evaluated survival, locomotion, and morphological parameters of mitochondria and myofibrils using transmission electron microscopy in 2 and 15-day-old *D. melanogaster*, treated with different PQ doses: control, 10, 50, 100, 150, and 200 mM. PQ100mM presented 100% lethality in 15-day-old *D. melanogaster*, while in 2-day-old animals PQ150mM produced 20% lethality. Bradykinesia was only observed in 15-day-old *D. melanogaster* treated with PQ10 mM and PQ50 mM. However, these results are unlikely to be associated with changes to morphology. Taken together, our data indicate pathophysiological differences between PQ-induced parkinsonism and familial parkinsonism in *D. melanogaster* (resultant from gene mutations), demonstrating for the first time a differential susceptibility to PQ in two developmental stages.

1. Introduction

Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) (PQ) is a broad-spectrum herbicide applied against annual or perennial weeds affecting cotton, cocoa, soybean, rice, and other crops, which is widely used in more than 100 countries (Rashidipour et al., 2019). Although safe for soil microorganisms and plant roots, when used for extensive periods it is highly toxic for humans and the environment (Frimpong et al., 2018), thus, PQ has been banned in several countries and regions, including South Korea and the European Union (Cha et al., 2016; Bang

et al., 2017).

Motor deficits and severe muscle integrity disruption, mainly in myofibrils and mitochondria of indirect flight muscles (IFMs) (Fig. 1), were found in familial Parkinson's disease (PD) in *Drosophila* (Pesah, 2004; Yang et al., 2006; Greene et al., 2003; Klein et al., 2014; Si et al., 2019). This reduction in mitochondrial function promoted by PD is also observed in rodents, since, in transgenic mice, α -synuclein overexpression impairs mitochondrial function (Song et al., 2004; Martin, 2006).

In addition to the numerous cases of PQ poisoning that have been

* Correspondence to: Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, PUCRS, Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 12, Sala 104, Porto Alegre, RS CEP:90619-900, Brazil.

E-mail address: andrea.wieck@edu.pucrs.br (A. Wieck).

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.03.010>

Received 21 July 2021; Received in revised form 28 February 2022; Accepted 28 March 2022

Available online 31 March 2022

0378-4274/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.