

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO NA ÁREA DE NEUROCIÊNCIAS

KERSTIN CAMILE CREUTZBERG

**ESTRESSE PRECOCE E COMPORTAMENTOS DO TIPO ANSIEDADE NA VIDA
ADULTA: O PAPEL DO SISTEMA CORTICOTROFINÉRGICO NO NÚCLEO LEITO
DA ESTRIA TERMINAL**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Kerstin Camile Creutzberg

Estresse precoce e comportamentos do tipo ansiedade na vida adulta: o papel do sistema corticotrofinérgico no núcleo leito da estria terminal

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Neurociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira

Porto Alegre
2019

Ficha Catalográfica

C925e Creutzberg, Kerstin Camile

Estresse precoce e comportamentos do tipo ansiedade na vida adulta : O papel do sistema corticotrofinérgico no núcleo leito da estria terminal / Kerstin Camile Creutzberg . – 2019.

50.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira.

1. Estresse precoce. 2. Cuidado materno. 3. Corticotrofina. 4. Ansiedade. 5. Núcleo leito da estria terminal. I. Grassi de Oliveira, Rodrigo. II. Título.

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

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

Kerstin Camile Creutzberg

Estresse precoce e comportamentos do tipo ansiedade na vida adulta: o papel do sistema corticotrofinérgico no núcleo leito da estria terminal

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Neurociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: 10 de Setembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Nadja Schröder (UFRGS)

Dra. Cristiane Regina Guerino Furini (PUCRS)

Aline Zaparte (PUCRS – Suplente)

Porto Alegre
2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), e, aos professores e a equipe administrativa do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Agradeço ao *Developmental Cognitive Neuroscience Lab* (DCNL) pelo apoio, acolhimento e suporte durante toda minha trajetória. Agradeço imensamente ao coordenador do DCNL e meu orientador, Prof. Rodrigo Grassi-Oliveira, por ter acreditado e apostado no meu potencial, mas acima disso, por seu exemplo de pesquisador, que me incentiva e me motiva a melhorar constantemente.

Agradeço aos meus colegas, Thiago Wendt Viola, Luis Eduardo Wearick Silva e Rodrigo Orso pelo auxílio, pelos ensinamentos e pelas sugestões em diversos momentos do trabalho realizado. Agradeço aos demais colegas do modelo animal e de todo o DNCL. E gostaria de agradecer especialmente à colega, IC e amiga, Erika Kestering Ferreira, pela imensa ajuda em todas as etapas do meu mestrado, por ter se prontificado sempre que preciso e por sua vontade de aprender e acompanhar todos os protocolos aqui utilizados. Gostaria de agradecer também ao Dr. Lucas Albrechet de Souza por ter se disponibilizado diversas vezes para auxiliar e pelas sugestões e conselhos para o trabalho.

Agradeço também a toda a equipe administrativa e de trabalho do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE), pelo auxílio na manutenção dos animais e pela disponibilidade e eficiência sempre que solicitados.

Agradeço a minha mãe, Marion Creutzberg, minha maior incentivadora, que sempre me apoiou incondicionalmente e que desde cedo fez despertar em mim o interesse na vida acadêmica e na pesquisa. A minha madrinha Arleti Mattner e aos meus avós maternos, Vanda e Alfred, que foram essenciais na minha trajetória, e toda minha família. Gostaria também de agradecer ao meu namorado Rodrigo Orso, pelo companheirismo e suporte em todos os momentos, inclusive nos mais difíceis e desafiadores.

Por fim, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de estudos.

RESUMO

Introdução: A diminuição do cuidado materno durante o período inicial da vida pode acarretar em disfunções neurobiológicas e comportamentais. Acredita-se que o fator de liberação de corticotrofina (CRF) possui um papel importante na regulação do comportamento materno, entretanto os mecanismos e mediadores desta relação ainda não foram completamente entendidos.

Objetivos: Investigar os efeitos da infusão de CRF no BNST no comportamento materno e no comportamento do tipo ansioso da prole.

Métodos: As ninhadas de BALB/cJ foram aleatoriamente destinadas ao grupo SAL ou CRF. As mães foram submetidas a 5 infusões de CRF ou salina no BNST nas primeiras semanas depois do nascimento da prole, nos dias de infusão o comportamento materno das mães de ambos os grupos foi observado. A prole de ambos os grupos foi submetida a três diferentes protocolos para avaliar o comportamento do tipo ansioso.

Resultados: A infusão de CRF nas mães, durante as primeiras semanas de vida da prole, diminuiu a frequência do comportamento de amamentação com o dorso arqueado e aumentou o número de saídas do ninho. Essa diminuição no cuidado materno resultou no aumento do comportamento do tipo ansioso nas fêmeas da prole de mães do grupo CRF, e na diminuição deste comportamento nos machos. Além disso, a prole do grupo CRF, independente do sexo, aumentou a atividade locomotora.

Conclusões: Os resultados encontrados evidenciam mais uma vez o papel do CRF e do BNST no cuidado materno e contribuem com a hipótese de que a diminuição deste cuidado resulta no aumento de fenótipos do tipo ansioso no início da vida adulta.

Palavras-chave: Estresse precoce. Cuidado materno. Corticotrofina. Ansiedade. Núcleo leito da estria terminal.

ABSTRACT

Introduction: Decreased maternal care during early life period can lead to biological and behavioral disfunctions. It is believed that the corticotrophin-releasing factor (CRF) plays an important role in maternal behavior regulation. However, the mechanisms that underlie this relation are not fully understand.

Objectives: To investigate the effects of CRF infusion in the BNST in maternal care and anxiety-like behavior in the offspring.

Methods: The litters of BALB/cJ mice were randomly assigned to SAL or CRF group. The dams were exposed to 5 infusions of CRF or saline in the first and second week after birth, on the same days of the infusion, the maternal behavior of both groups was observed. The offspring of both groups was testes in three anxiety-like behavior protocols.

Results: The CRF infusion in the dams, during the first weeks of life of the offspring, decreased the frequency of arched-back nursing and increased the number of exits from the nest. This decrease in maternal care provoked increased anxiety-like behavior in female offspring from CRF dams and decreased in male. Moreover, CRF offspring, independently of sex, increased the locomotor activity.

Conclusion: The findings increase the evidence of the importance and role of CRF and BNST in maternal care and contribute to the hypothesis that decreased maternal care results in anxiety-like phenotypes in early adulthood.

Keywords: Early-life stress. Maternal care. Corticotrophin. Anxiety. Bed Nucleus of the Stria Terminalis.

LISTA DE ABREVIATURAS

BNST – Núcleo leito da estria terminal
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CeMBE – Centro de Modelos Biológicos Experimentais
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRF – Fator de Liberação de Corticotrofina
CRFR1 – Receptor de CRF tipo 1
CRFR2 – Receptor de CRF tipo 2
DCNL – *Developmental Cognitive Neuroscience Lab*
EPM – Labirinto de cruz elevada
HPA – Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
LB – *Limited Bedding*
LD – Caixa claro/escuro
MS – Separação materna
NIH – *National Institutes of Health of the United States*
OF – Campo aberto
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – *Phosphate-buffered Saline*
PFA – Paraformaldeído
PND – Dia pós-natal
PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
SIPESQ – Sistema de Pesquisa da PUCRS
SNC – Sistema Nervoso Central
Ucn – Urocortina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. DESENVOLVIMENTO	11
2.1 Revisão de literatura	11
2.1.1 Importância do cuidado materno na primeira infância	11
2.1.2 Desenvolvimento e o impacto do estresse precoce	11
2.1.3 Modelos animais de estresse precoce	13
2.1.3 Relação do sistema corticotrofinérgico com o cuidado materno	14
2.2 Objetivo Geral	16
2.2.1 Objetivos Específicos	16
2.3 Hipóteses	17
2.4 Métodos	18
2.4.1 Animais e desenho experimental	18
2.4.2 Tratamento	19
2.4.3 Comportamento materno	19
2.4.6 Testes de comportamento tipo ansioso	21
2.4.7 Campo aberto	21
2.4.8 Labirinto de cruz elevada	21
2.4.9 Caixa claro/escuro	21
2.4.10 Níveis de corticosterona	22
2.4.11 Análise estatística	22
3. CONCLUSÃO	23
Referências	24
ANEXO I – Aprovação do CEUA	27
ANEXO II – Artigo Científico	28

1. INTRODUÇÃO

A exposição a situações adversas e ambientes instáveis no início da vida, como por exemplo a negligência física ou emocional, pode desencadear alterações neurobiológicas e comportamentais a longo prazo, aumentando as chances do desenvolvimento de psicopatologias (Anda et al., 2006; Andersen & Teicher, 2009; Chocyk et al., 2013). Segundo dados de 2017 da Organização Mundial da Saúde (OMS), os Transtornos de Ansiedade afetam 3,6% da população mundial, sendo o Brasil o país com maior prevalência (9,3% da população) (World Health Organization, 2017). Decorrente da relevância desses dados o interesse científico e social na busca de possíveis ações preventivas, farmacológicas ou ambientais resultou num crescimento exponencial de estudos de pesquisa pré-clínica experimental. Assim como para o entendimento aprofundado das alterações consequentes do estresse precoce e também dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no desenvolvimento de condições clínicas.

Considerando a importância do tópico supracitado, um estudo de ciência básica foi realizado para compor essa dissertação. Esse estudo, de pesquisa experimental animal, se refere a uma investigação dos efeitos da infusão central do fator de liberação de corticotrofina (CRF) em mães lactantes sobre o comportamento materno e o comportamento do tipo ansioso nos filhotes adultos dessas mães, intitulado de *“CRF infusion in the BNST of dams altered maternal care and induced behavioral phenotypes in the offspring”*. A seguir, serão apresentados o embasamento teórico, os objetivos, as hipóteses e conclusões do presente estudo.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de literatura

2.1.1 Importância do cuidado materno na primeira infância

O cuidado materno é caracterizado como qualquer comportamento da mãe com o intuito de nutrir, cuidar ou proteger e por consequência proporcionar a sobrevivência e o crescimento da prole. Geralmente tal comportamento demanda um alto custo energético, que deixa a fêmea mais vulnerável, com recursos limitados e assim em maior risco de vida. O cuidado maternal evoluiu de forma extremamente variável entre espécies (Royle, Smiseth, & Kölliker, 2012).

Em mamíferos a relação entre mãe e filho é na maioria das vezes duradoura e indispensável, visto que ela começa na concepção e só se torna arbitrária com a independência da prole. Isso implica em uma extrema importância do cuidado da mãe para o desenvolvimento, visto que em diversas espécies a qualidade e a frequência do mesmo pode afetar a maturação cerebral, o comportamento, e os sistemas cognitivos e emocionais dos recém nascidos (Guardini et al., 2017). Adicionalmente, evidências recentes sugerem que a fragmentação do cuidado materno também impacta processos epigenéticos como a metilação do DNA, a modificação de histonas e a expressão de microRNAs (Curley & Champagne, 2016). Na maioria dos casos as fêmeas passam por mudanças anatômicas e fisiológicas significativas (Soma-Pillay, Nelson-Piercy, Tolppanen, & Mebazaa, 2016), além de alterações hormonais, mediadas principalmente pelo estradiol, pela progesterona e pela liberação de ocitocina (Lévy, 2016).

2.1.2 Desenvolvimento e o impacto do estresse precoce

O período inicial da vida de um indivíduo, que compreende desde o seu nascimento até o início da vida adulta, é essencial e crítico para o seu desenvolvimento (Anda et al., 2006). Durante este período o sistema nervoso central (SNC) sofre mudanças contínuas, e apesar de algumas estruturas apresentarem desenvolvimento acelerado, como o hipocampo, que atinge a “maturidade” já na primeira infância, outras regiões, como as corticais, possuem um desenvolvimento protraído e progressivo e só completam a maturação no início da vida adulta (Lupien, McEwen, Gunnar, & Heim, 2009). O SNC, devido a essas mudanças intensas, fica

suscetível e pode ser influenciado, de forma positiva ou negativa por fatores e estímulos externos (Andersen, 2003; Marco, Macrì, & Laviola, 2011).

A exposição a situações adversas e ambientes instáveis durante esse período, como a negligência e os maus-tratos, pode alterar o curso esperado do neurodesenvolvimento e acarretar em disfunções, neurobiológicas e comportamentais, que afetariam o indivíduo durante toda a sua vida (Grassi-Oliveira, Ashy, & Stein, 2008; Teicher, Andersen, Polcari, Anderson, & Navalta, 2002). Assim, aumentando as chances do desenvolvimento de psicopatologias (Andersen & Teicher, 2009; Chocyk et al., 2013), como transtornos de ansiedade, de humor e aditivos, e de prejuízos cognitivos (Andersen, 2003), tanto na adolescência como na vida adulta.

Os transtornos de ansiedade são bastante comuns (Baxter, Vos, Scott, Ferrari, & Whiteford, 2014) e, de acordo com a OMS, em 2017, 264 milhões de pessoas eram afetadas por estes transtornos ao redor do mundo (World Health Organization, 2017). Sabe-se que o estresse precoce juntamente com a predisposição genética do indivíduo são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de ansiedade a nível patológico (Bandelow, Michaelis, & Wedekind, 2017; Penza, Heim, & Nemeroff, 2003). Além disso, estudos clínicos indicam altos índices de comorbidade entre transtorno de ansiedade e outras psicopatologias, potencializando problemas sociais e econômicos decorrentes dessas condições (Maron & Nutt, 2017; Meier & Deckert, 2019).

Neste contexto, nos últimos anos foram realizados diversos estudos com crianças e adolescentes expostos a negligência e abuso emocional ou físico com o intuito de investigar a prevalência do desenvolvimento de psicopatologias nessa população. Evidências indicam que esses indivíduos apresentam maior risco de desenvolver transtornos de ansiedade (Kisely et al., 2018; Rich, Gingerich, & Rosen, 1997), duas vezes mais chances de desenvolver depressão (Nanni, Uher, & Danese, 2012) e maior propensão a desenvolver transtornos aditivos (Viola, Tractenberg, Pezzi, Kristensen, & Grassi-Oliveira, 2013). Isso demonstra que a exposição ao estresse no início da vida desencadeia diversas alterações prejudiciais ao indivíduo do ponto de vista de saúde mental.

2.1.3 Modelos animais de estresse precoce

O uso de modelos animais permite o controle do ambiente e de fatores genéticos, além da manipulação das variáveis de interesse (Molet, Maras, Avishai-Eliner, & Baram, 2014). Adicionalmente, a obtenção de tecidos cerebrais para o entendimento de rotas metabólicas, genes, proteínas que estão envolvidos com as consequências do estresse precoce, são somente possíveis em modelos experimentais. Sendo assim, torna-se evidente a contribuição e importância destes modelos para o estudo das alterações neurobiológicas e comportamentais causadas pelo estresse precoce. Existe uma crescente discussão de que o termo “estresse precoce” deveria ser substituído por “adversidades no início da vida”, visto que nem todos os desfechos encontrados nestes estudos tem o estresse como fator primário (Brenhouse & Bath, 2019). Até que se chegue a um consenso, optamos neste estudo por manter o termo “estresse precoce”.

Em roedores diferentes protocolos são utilizados para promover o estresse no início da vida. Muitos destes levam em consideração a importância da relação entre mãe e filhote, e por este motivo visam criar intervenções que afetem tal relacionamento. O modelo de separação materna (MS) é amplamente utilizado como um protocolo de estresse pós-natal, e tem como objetivo separar os filhotes da mãe (o período e a duração dessa separação variam entre grupos de pesquisa). Tal separação busca mimetizar principalmente os efeitos da negligência materna. Outro modelo que vem sendo cada vez mais utilizado é o protocolo de *Limited Bedding* (LB), que tem como foco principal reduzir o material disponível para a mãe montar o ninho, e assim mimetizar os efeitos de um ambiente empobrecido e que levam a mãe a passar mais tempo procurando recursos ao invés de providenciar cuidado.

Evidências de estudos com ratos e camundongos indicam que a exposição ao protocolo de MS altera o comportamento materno e aumenta o comportamento do tipo ansioso na prole adolescente e também adulta (Chocyk et al., 2013; Romeo et al., 2003). Além disso, estudos com LB apontam comportamento materno fragmentado, alteração no comportamento tipo ansioso, no fenótipo de tomada de decisão e no aumento dos níveis de corticosterona da prole (Rice, Sandman, Lenjavi, & Baram, 2008; Santarelli et al., 2017; Viola et al., 2019). Adicionalmente, a análise da relação entre mãe e filhote durante as primeiras semanas de vida, vem sendo utilizada como um preditor das diferenças individuais da prole ao longo da vida (Weaver et al., 2004).

De acordo com as evidências supracitadas e inúmeras outras, alguns pesquisadores acreditam que a fragmentação do comportamento materno é o principal fator envolvido com as alterações comportamentais e neurobiológicas ao longo da vida dos filhotes, sugerindo que os efeitos deletérios de ambos os modelos de MS e LB estão associados ao impacto sobre o cuidado maternal.

2.1.3 Relação do sistema corticotrofinérgico com o cuidado materno

O fator de liberação de corticotrofina (CRF) é um neuropeptídeo envolvido com diversos processos neurais, endócrinos e imunológicos, mas tendo como seu papel principal a ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) que resulta no aumento da liberação de glicocorticoides. O sistema corticotrofinérgico é composto pelo CRF e por 3 peptídeos de urocortina (Ucn; Ucn1, Ucn2 e Ucn3), os quais se ligam a dois receptores, o receptor de CRF tipo 1 (CRFR1) e o receptor de CRF tipo 2 (CRFR2). O CRF é encontrado em áreas hipotalâmicas e projetado para áreas extra hipotalâmicas, incluindo a amígdala, a área tegmental ventral e o núcleo leito da estria terminal (BNST).

O BNST faz parte do sistema límbico, e é uma região cerebral sensível ao estresse e com um papel relevante no processamento do medo e ansiedade (Avery, Clauss, & Blackford, 2016), bem como sobre o comportamento materno (Klampfl & Bosch, 2019). O BNST recebe projeções axonais de diversas regiões cerebrais, como a amígdala, o hipocampo, o hipotálamo, o córtex pré-frontal entre outras, e está envolvido em diversos processos neurais e comportamentais, como os supracitados, devido a essa ampla conectividade (Goode & Maren, 2017).

Evidências apontam que a infusão de CRF no BNST altera o cuidado materno (Klampfl & Bosch, 2018; Klampfl, Brunton, Bayerl, & Bosch, 2014, 2016), diminuindo a frequência de *Arched-back nursing*, que é uma postura de amamentação que permite que os filhotes mamem e se movimentem confortavelmente (Franks, Curley, & Champagne, 2011). Tais estudos, além de avaliarem o comportamento materno natural, ou seja, o que a mãe realiza sem interferência do pesquisador, utilizaram também testes para avaliar outros comportamentos. Por exemplo, um teste de agressividade materna, onde as mães administradas com um agonista de CRF apresentaram maior latência para atacar o intruso na caixa, e um teste de motivação materna, onde essas mesmas mães apresentaram menos comportamento de recolher

os filhotes. Entretanto, nenhum estudo avaliou o impacto dessa diminuição do cuidado maternal na prole. O que poderia ser de grande interesse, considerando que o modelo isola a alteração do cuidado materno sem a necessidade de manipular os filhotes ou o ambiente, facilitando o entendimento do papel deste cuidado no desenvolvimento da prole e suas possíveis consequências quando alterado. Desta forma, esse estudo poderá ajudar a compreender se os efeitos do estresse precoce na prole são atribuídos a alterações do cuidado materno.

2.2 Objetivo Geral

Investigar um modelo farmacológico que pudesse mimetizar fenótipos identificados nos modelos de estresse precoce.

2.2.1 Objetivos Específicos

- (1) Investigar o comportamento materno de camundongas expostas a administração de CRF ou salina no BNST.
- (2) Investigar o comportamento do tipo ansioso em filhotes de camundongas expostas a administração de CRF ou salina no BNST.
- (3) Investigar os níveis de corticosterona periférica em filhotes de camundongas expostas a administração de CRF ou salina no BNST.

2.3 Hipóteses

Nossa hipótese se fundamenta na ideia de que as mães que receberam CRF diretamente no BNST apresentariam uma diminuição no comportamento materno (ex. amamentar) e um aumento de comportamentos não maternos (ex. sair do ninho) quando comparadas as mães do grupo controle.

Adicionalmente se esperava que os filhotes de mães que foram administradas com CRF teriam um aumento no comportamento do tipo ansioso quando comparados aos animais controle, concomitantemente com alterações nos níveis periféricos de corticosterona.

2.4 Métodos

Todos os procedimentos experimentais foram executados de acordo com a Lei Arouca (n 11.794/08), com as Diretrizes do CONCEA e do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health* (NIH, Estados Unidos). Os experimentos foram realizados no Centro de Modelos Experimentais (CeMBE) PUCRS e no laboratório do DCNL, localizado no Hospital São Lucas da PUCRS. O projeto foi aprovado pela comissão científica da Escola de Medicina e pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da PUCRS através do Sistema de Pesquisa da PUCRS (SIPESQ) com o código 9080.

2.4.1 Animais e desenho experimental

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem BALB/cJ, adquiridos através do biotério do CeMBE. Por volta do dia pós-natal (PND) 60, fêmeas adultas (n = 24) passaram pela cirurgia estereotáxica, sob anestesia de Ketamina (100mg/kg) e Xilazina (10mg/kg), para implantação de uma cânula-guia dupla (PlasticsOne) tendo o BNST como alvo. De acordo com o atlas *Mouse brain in stereotaxic coordinates* (Franklin B.J. & Paxinos, 2007) as coordenadas utilizadas para atingir o BNST foram: +0.3 mm antero-posterior a partir do bregma, ± 1.1 mm lateral à sutura medial e 4.3 mm ventral à dura. A taxa de mortalidade durante a cirurgia foi de 12,5% (n = 3) e a taxa pós cirúrgica (devido a retirada da cânula pelos animais) de 37,5% (n = 9), totalizando uma perda de 50%.

O acasalamento foi feito com a proporção de 1x1 (uma fêmea adulta canulada e um macho adulto) por 48h, após esse período o macho foi removido e colocado em uma nova caixa residência. Dezesete dias após o acasalamento, a caixa das fêmeas foi conferida diariamente com o intuito de verificar a presença de filhotes e o dia do nascimento foi caracterizado como PND0. No total 12 famílias foram utilizadas, aleatoriamente escolhidas para o grupo controle (SAL; 7 famílias) ou para o grupo tratado (CRF; 5 famílias). Os filhotes foram pesados no PND9, 21 e 58, desmamados no PND 21 e após o desmame deixados de 2 a 4 animais do mesmo sexo por caixa.

Todos os animais foram mantidos no vivário em salas climatizadas com temperatura média de 23°C, com sistema de renovação de ar e iluminação controlada automaticamente com ciclos de claro/escuro de 12/12 horas (7h/19h). Os animais receberam alimentação padrão para pequenos roedores *ad libitum*, de acordo com a

rotina do CeMBE. A troca das caixas, com o intuito de limpeza, foi feita manualmente e semanalmente pelos funcionários do CeMBE, exceto durante os primeiros 9 dias após o nascimento.

Os filhotes foram divididos em 4 grupos: *CRF* macho ($n = 12$), *CRF* fêmea ($n = 12$), *SAL* macho ($n = 12$) e *SAL* fêmea ($n = 10$), todos os animais ficaram sem manipulação do desmame até o início dos testes comportamentais (PND58), exceto nos momentos de troca de caixa (Figura 1).

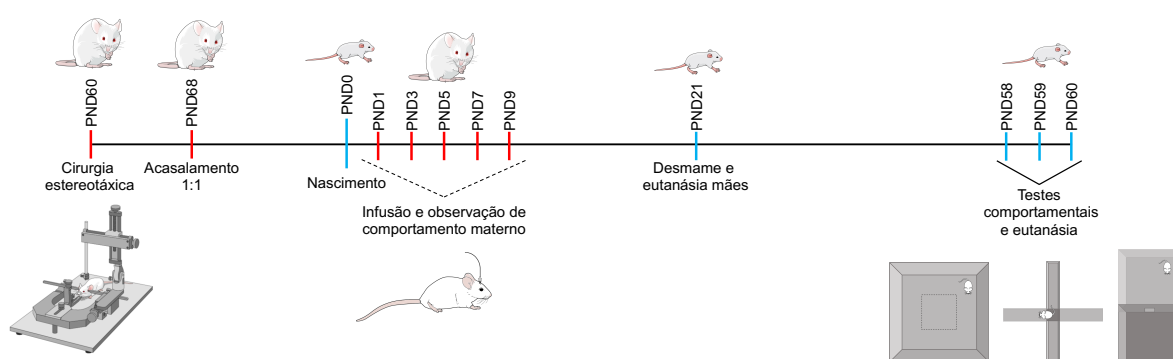


Figura 1. Delineamento experimental (vermelho para mães, azul para filhotes).

2.4.2 Tratamento

As infusões através das cânulas-guia foram feitas 5 vezes (PND1, 3, 5, 7 e 9), com *CRF* ($1 \mu\text{g}/0,5 \mu\text{L}$, *CRF* humant/rat, Tocris Bioscience) ou salina ($0,5 \mu\text{L}$, NaCl 0,9%), ambos com a taxa de infusão de $0,1 \mu\text{L}/\text{min}$. As doses foram determinadas com base em estudos prévios (Klampfl & Bosch, 2018; Klampfl et al., 2014, 2016). Para a realização da infusão foi utilizada uma bomba de infusão de 2 seringas Hamilton de $10 \mu\text{L}$ (EFF 311 Insight LTDA).

2.4.3 Comportamento materno

O protocolo de comportamento materno foi adaptado a partir do protocolo de Klampfl et al. (2018). O protocolo foi conduzido no PND1, 3, 5, 7 e 9, os mesmos dias da infusão de *CRF* ou salina. Este protocolo consiste na observação da frequência de comportamentos maternos e não maternos (Tabela 1). Os seguintes comportamentos foram considerados maternos: amamentando com o dorso arqueado, amamentando ao lado ou em cima dos filhotes, lambendo os filhotes, em contato com os filhotes, construindo o ninho, carregando os filhotes, comportamento agressivo com os filhotes.

Os comportamentos considerados não maternos foram: fora do ninho, se lambendo, comendo ou bebendo e o número de saídas do ninho.

Tabela 1. Descrição dos comportamentos maternos e não maternos.

Comportamento	Descrição
Amamentando com o dorso arqueado	É um comportamento de amamentação ativa, onde a mãe mantém uma postura arqueada que facilita a movimentação dos filhotes e propicia uma amamentação mais eficiente.
Amamentando ao lado ou em cima dos filhotes	É um comportamento que fica entre a amamentação passiva e ativa. A mãe fica deitada em cima dos filhotes ou ao lado deles.
Lambendo os filhotes	Lamber o corpo ou as áreas anogenitais dos filhotes. Lamber o corpo é importante para o desenvolvimento e as áreas anogenitais para induzir urinação e defecação dos filhotes.
Em contato com os filhotes	Neste comportamento a mãe mantém contato com os filhotes, mas sem nenhuma interação direta.
Construindo o ninho	A mãe constrói o ninho um dia antes do parto, mas regularmente acrescenta material ao ninho para providenciar abrigo adequado aos filhotes. A qualidade do ninho é importante para o desenvolvimento e a termoregulação dos filhotes.
Carregando os filhotes	A mãe carrega um filhote para dentro ou para fora do ninho.
Comportamento agressivo com os filhotes	Comportamento agressivo da mãe, como, pisar ou pular nos filhotes ou isolar os mesmos.
Fora do ninho	A mãe fica fora do ninho, caminhando pela caixa residência ou até mesmo dormindo longe dos filhotes.
Se lambendo	A mãe fica fora do ninho se lambendo.
Comendo ou bebendo	A mãe fica fora do ninho comendo a ração ou bebendo água.
Saída do ninho	A mãe sai do ninho por qualquer razão.

O comportamento da mãe foi avaliado por dois observadores independentes. As observações foram divididas em três períodos, em 7 blocos de 30 min, antes da infusão ($\pm 8:00-9:00$, blocos 1 e 2), 30 min após a infusão ($\pm 9:30-11:00$, blocos 3, 4 e 5) e 5 h após a infusão ($\pm 14:00-15:00$, blocos 6 e 7). O comportamento da mãe foi observado a cada 2 min, totalizando 105 observações por dia.

2.4.6 Testes de comportamento tipo ansioso

O campo aberto (OF), o labirinto em cruz elevado (EPM) e a caixa claro/escuro (LD) foram realizados do PND58, 59 e 60 respectivamente, com o intuito de avaliar a atividade locomotora e o comportamento do tipo ansioso. Todos os testes foram filmados e analisados no *software* Anymaze (Stoelting CO, Wood Dale, IL). Os aparatos foram limpos com álcool 70% entre um animal e outro.

2.4.7 Campo aberto

O teste do OF foi realizado em uma caixa de acrílico (30x30) com iluminação de 140-150 lux. O animal era colocado no centro do aparato e deixado no mesmo por 10 min. Para avaliar o tempo despendido na zona central e periférica a caixa foi dividida em 16 quadrados no *software*, os 4 quadrados centrais consistiram na zona central e os restantes na zona periférica. Além disso a distância total percorrida foi anvalidada.

2.4.8 Labirinto em cruz elevado

Para o teste do EPM um aparato de acrílico preto composto por 4 braços (30cm x 5cm), sendo dois deles completamente abertos e dois fechados com paredes nas laterais (15cm de altura), conectados por uma área central (5cm x 5cm) e a 40cm acima do chão, sob uma luminosidade de 40 lux. O animal era colocado no centro do aparato, de frente para o braço aberto e era deixado livre para explorar por 5 min. O tempo total nos braços abertos, o número de entradas nos braços abertos e número de comportamentos de avaliação de risco (*head dip*) nos braços abertos foram avaliados.

2.4.9 Caixa claro/escuro

O teste do LD foi realizado em uma caixa de acrílico (21x42x25cm) dividida em dois compartimentos de mesmo tamanho, conectados por uma pequena porta. Um dos compartimentos ficava sob intensa luminosidade (390 lux) e o outro completamente escuro. O animal era colocado no compartimento claro, de costas para a porta, e tinha 10 min para explorar o aparato. O tempo total dispendido em cada compartimento, a latência para entrar no compartimento escuro, o número de

transições entre os compartimentos e o número de comportamentos de avaliação de risco (*head poke*) total e feitos da zona clara para a escura foram contabilizados.

2.4.10 Níveis de corticosterona

Como uma medida de atividade do eixo HPA, os níveis de corticosterona no plasma sanguíneo foram avaliados (n = 10 por grupo). 30 min após o final do LD os animais foram eutanasiados e o sangue foi centrifugado para coletar o plasma. O total de 5µL de plasma foi utilizado para as análises realizadas através do kit *Corticosterone Enzyme Immunoassay (Arbor Assays) ELISA*, de acordo com as instruções do fabricante. A densidade óptica foi analisada no EspectraMax M2 em 450nm, a partir de uma curva padrão os resultados foram transformados em concentração (pg/mL).

2.4.11 Análise estatística

Todos os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. A significância estatística foi considerada quando $p < 0.05$. Os dados do comportamento materno e de peso corporal (PND9 e 21) foram analisados pelo teste *t* de *Student*. A análise de variância (ANOVA) de duas vias foi utilizada para analisar os comportamentos do tipo ansioso (OF, EPM e LD), os níveis de corticosterona e o peso corporal (PND58) com um fator sexo (macho x fêmea) e um fator tratamento (CRF x SAL).

3. CONCLUSÃO

A infusão de CRF no BNST de mães, durante as primeiras semanas de vida da prole, altera o comportamento materno, diminuindo a frequência de amamentação com o dorso arqueado e aumentando a frequência de saídas do ninho. O que resulta na fragmentação do cuidado maternal, devido ao número de vezes que a mãe interrompe a amamentação e outros comportamentos maternos. Essa fragmentação aumentou o comportamento do tipo ansioso nas fêmeas da prole de mães administradas com CRF, enquanto o efeito no comportamento do tipo ansioso nos machos foi o oposto. Além disso, os animais de mães administradas com CRF, independentemente do sexo, apresentaram atividade locomotora aumentada quando comparados aos animais de mães que receberam a infusão de salina. Sabemos que a localização do sítio de injeção é de extrema importância para a validação dos dados encontrados, por este motivo, o encéfalo das fêmeas canuladas foi coletado e será cortado para a verificação.

Os resultados encontrados evidenciam mais uma vez o papel do CRF e do BNST no cuidado materno e contribuem com a hipótese de que a diminuição do cuidado maternal no início da vida altera os fenótipos comportamentais de roedores no início da vida adulta, incluindo alterações na exploração e em comportamentos relacionados a ansiedade. Os resultados que apontam o comportamento do tipo ansioso aumentado nas fêmeas, corroboram com a hipótese de que as mães, quando em condições adversas, cuidam mais dos machos (Keller, Nowak, & Roth, 2019). Embora os mecanismos específicos relacionados com estes desfechos e com o efeito específico de sexo ainda não estejam completamente entendidos, é importante levar em conta que o sexo é um fator chave para alterações na exploração e em comportamentos do tipo ansioso causados pela fragmentação do cuidado materno.

Referências

- Anda, R. F., Felitti, V. J., Bremner, J. D., Walker, J. D., Whitfield, C., Perry, B. D., . . . Giles, W. H. (2006). The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood. A convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 256(3), 174-186. doi:10.1007/s00406-005-0624-4
- Andersen, S. L. (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev*, 27(1-2), 3-18.
- Andersen, S. L., & Teicher, M. H. (2009). Desperately driven and no brakes: developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse. *Neurosci Biobehav Rev*, 33(4), 516-524. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.09.009
- Avery, S. N., Clauss, J. A., & Blackford, J. U. (2016). The Human BNST: Functional Role in Anxiety and Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 126-141. doi:10.1038/npp.2015.185
- Bandelow, B., Michaelis, S., & Wedekind, D. (2017). Treatment of anxiety disorders. *Dialogues Clin Neurosci*, 19(2), 93-107.
- Baxter, A. J., Vos, T., Scott, K. M., Ferrari, A. J., & Whiteford, H. A. (2014). The global burden of anxiety disorders in 2010. *Psychol Med*, 44(11), 2363-2374. doi:10.1017/S0033291713003243
- Brenhouse, H. C., & Bath, K. G. (2019). Bundling the haystack to find the needle: Challenges and opportunities in modeling risk and resilience following early life stress. *Front Neuroendocrinol*, 100768. doi:10.1016/j.yfrne.2019.100768
- Chocyk, A., Bobula, B., Dudys, D., Przyborowska, A., Majcher-Maślanka, I., Hess, G., & Wędzony, K. (2013). Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *Eur J Neurosci*, 38(1), 2089-2107. doi:10.1111/ejn.12208
- Curley, J. P., & Champagne, F. A. (2016). Influence of maternal care on the developing brain: Mechanisms, temporal dynamics and sensitive periods. *Front Neuroendocrinol*, 40, 52-66. doi:10.1016/j.yfrne.2015.11.001
- Franklin B.J., K., & Paxinos, G. (2007). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (3th ed.).
- Franks, B., Curley, J. P., & Champagne, F. A. (2011). Measuring Variations in Maternal Behavior: Relevance for Studies of Mood and Anxiety. In *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*.
- Goode, T. D., & Maren, S. (2017). Role of the bed nucleus of the stria terminalis in aversive learning and memory. *Learn Mem*, 24(9), 480-491. doi:10.1101/lm.044206.116
- Grassi-Oliveira, R., Ashy, M., & Stein, L. M. (2008). Psychobiology of childhood maltreatment: effects of allostatic load? *Rev Bras Psiquiatr*, 30(1), 60-68.
- Guardini, G., Bowen, J., Mariti, C., Fatjó, J., Sighieri, C., & Gazzano, A. (2017). Influence of Maternal Care on Behavioural Development of Domestic Dogs (Canis Familiaris) Living in a Home Environment. *Animals (Basel)*, 7(12). doi:10.3390/ani7120093
- Keller, S. M., Nowak, A., & Roth, T. L. (2019). Female pups receive more maltreatment from stressed dams. *Dev Psychobiol*. doi:10.1002/dev.21834
- Kisely, S., Abajobir, A. A., Mills, R., Strathearn, L., Clavarino, A., & Najman, J. M. (2018). Child maltreatment and mental health problems in adulthood: birth cohort study. *Br J Psychiatry*, 213(6), 698-703. doi:10.1192/bjp.2018.207

- Klampfl, S. M., & Bosch, O. J. (2018). When mothers neglect their offspring: an activated CRF system in the BNST is detrimental for maternal behavior. *Arch Womens Ment Health*. doi:10.1007/s00737-018-0897-z
- Klampfl, S. M., & Bosch, O. J. (2019). When mothers neglect their offspring: an activated CRF system in the BNST is detrimental for maternal behavior. *Arch Womens Ment Health*, 22(3), 409-415. doi:10.1007/s00737-018-0897-z
- Klampfl, S. M., Brunton, P. J., Bayerl, D. S., & Bosch, O. J. (2014). Hypoactivation of CRF receptors, predominantly type 2, in the medial-posterior BNST is vital for adequate maternal behavior in lactating rats. *J Neurosci*, 34(29), 9665-9676. doi:10.1523/JNEUROSCI.4220-13.2014
- Klampfl, S. M., Brunton, P. J., Bayerl, D. S., & Bosch, O. J. (2016). CRF-R1 activation in the anterior-dorsal BNST induces maternal neglect in lactating rats via an HPA axis-independent central mechanism. *Psychoneuroendocrinology*, 64, 89-98. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.11.015
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*, 10(6), 434-445. doi:10.1038/nrn2639
- Lévy, F. (2016). Neuroendocrine control of maternal behavior in non-human and human mammals. *Ann Endocrinol (Paris)*, 77(2), 114-125. doi:10.1016/j.ando.2016.04.002
- Marco, E. M., Macrì, S., & Laviola, G. (2011). Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: evidence from animal models. *Neurotox Res*, 19(2), 286-307. doi:10.1007/s12640-010-9205-z
- Maron, E., & Nutt, D. (2017). Biological markers of generalized anxiety disorder. *Dialogues Clin Neurosci*, 19(2), 147-158.
- Meier, S. M., & Deckert, J. (2019). Genetics of Anxiety Disorders. *Curr Psychiatry Rep*, 21(3), 16. doi:10.1007/s11920-019-1002-7
- Molet, J., Maras, P. M., Avishai-Eliner, S., & Baram, T. Z. (2014). Naturalistic rodent models of chronic early-life stress. *Dev Psychobiol*, 56(8), 1675-1688. doi:10.1002/dev.21230
- Nanni, V., Uher, R., & Danese, A. (2012). Childhood maltreatment predicts unfavorable course of illness and treatment outcome in depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*, 169(2), 141-151. doi:10.1176/appi.ajp.2011.11020335
- Penza, K. M., Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2003). Neurobiological effects of childhood abuse: implications for the pathophysiology of depression and anxiety. *Arch Womens Ment Health*, 6(1), 15-22. doi:10.1007/s00737-002-0159-x
- Rice, C. J., Sandman, C. A., Lenjavi, M. R., & Baram, T. Z. (2008). A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology*, 149(10), 4892-4900. doi:10.1210/en.2008-0633
- Rich, D. J., Gingerich, K. J., & Rosen, L. A. (1997). Childhood Emotional Abuse and Associated Psychopathology in College Students. *Journal of College Student Psychotherapy*, 11(3), 13-28. doi:10.1300/J035v11n03_04
- Romeo, R. D., Mueller, A., Sisti, H. M., Ogawa, S., McEwen, B. S., & Brake, W. G. (2003). Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Horm Behav*, 43(5), 561-567.
- Royle, N. J., Smiseth, P. T., & Kölliker, M. (2012). *The evolution of parental care*. Oxford: Oxford University Press.

- Santarelli, S., Zimmermann, C., Kalideris, G., Lesuis, S. L., Arloth, J., Uribe, A., . . . Schmidt, M. V. (2017). An adverse early life environment can enhance stress resilience in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 78, 213-221. doi:10.1016/j.psyneuen.2017.01.021
- Soma-Pillay, P., Nelson-Piercy, C., Tolppanen, H., & Mebazaa, A. (2016). Physiological changes in pregnancy. *Cardiovasc J Afr*, 27(2), 89-94. doi:10.5830/CVJA-2016-021
- Teicher, M. H., Andersen, S. L., Polcari, A., Anderson, C. M., & Navalta, C. P. (2002). Developmental neurobiology of childhood stress and trauma. *Psychiatr Clin North Am*, 25(2), 397-426, vii-viii.
- Viola, T. W., Tractenberg, S. G., Pezzi, J. C., Kristensen, C. H., & Grassi-Oliveira, R. (2013). Childhood physical neglect associated with executive functions impairments in crack cocaine-dependent women. *Drug Alcohol Depend*, 132(1-2), 271-276. doi:10.1016/j.drugalcdep.2013.02.014
- Viola, T. W., Wearick-Silva, L. E., Creutzberg, K. C., Kesterling-Ferreira, É., Orso, R., Centeno-Silva, A., . . . Grassi-Oliveira, R. (2019). 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*, 99, 8-19. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.08.032
- Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., . . . Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*, 7(8), 847-854. doi:10.1038/nn1276
- World Health Organization. (2017). *Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates*. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>

ANEXO I – Aprovação do CEUA



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 9080

Porto Alegre, 27 de dezembro de 2018

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Estresse precoce e comportamentos do tipo depressão e ansiedade na vida adulta: o papel do sistema corticotrofinérgico no núcleo leito da estria terminal" coordenado por RODRIGO GRASSI DE OLIVEIRA.

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: 27/12/2018 - 27/12/2019

Nº de Animais	Espécie
120	mus musculus
65	mus musculus
120	mus musculus
44	mus musculus
Total de Animais: 349	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

ANEXO II – Artigo Científico

Title: CRF infusion in the BNST of dams altered maternal care and induced behavioral phenotypes in the offspring

Authors: Kerstin Camile Creutzberg¹, Érika Kestering-Ferreira¹, Thiago Wendt Viola¹, Luis Eduardo Wearick-Silva¹, Rodrigo Orso¹, Lucas Albrechet-Souza², Rosa Maria Martins de Almeida³, Rodrigo Grassi-Oliveira¹.

Affiliations: ¹Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Developmental Cognitive Neuroscience Lab, Porto Alegre, RS, Brazil. ²Louisiana State University, Health Sciences Center, Department of Physiology, New Orleans, United States. ³Federal University of Rio Grande do Sul, Psychology Institute, Porto Alegre, RS, Brazil.

Financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Corresponding author: Rodrigo Grassi-Oliveira

Address: PUCRS, Avenida Ipiranga 6690 – Prédio 63; Jardim Botânico – Porto Alegre, RS, Brasil; Email: rodrigo.grassi@pucrs.br

Abstract

Introduction: Decreased maternal care during early life can lead to future biological and behavioral disfunctions. Corticotrophin-releasing factor (CRF) signaling in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) has been suggested to regulate maternal behavior. **Objective:** We investigated the effects of CRF infusion in the BNST in maternal care behavior, and later we analyzed offspring locomotor activity, anxiety-like behavior and corticosterone (CORT) levels. **Methods:** BALB/cJ mice litters were randomly assigned to SAL or CRF group. The dams were exposed to 5 infusions of CRF or saline in the first weeks after birth. On the same days of the infusion maternal behavior was recorded. Offspring behavior was assessed during adulthood by the open field (OF), the elevated plus maze (EPM) and the light/dark (LD). The levels of plasma CORT were measured by ELISA protocol. **Results:** We found that CRF infusion in the BNST of the dams, during the first weeks of life of the offspring, decreased the frequency of arched-back nursing and increased the number of exits from the nest during the first weeks of life of the offspring. These changes in maternal care resulted in increased anxiety-like behavior among female offspring, while decreased among males. Additionally, both sexes of offspring raised by CRF-infused dams showed higher locomotor activity. **Conclusions:** We provided additional evidence to the role of CRF-BNST signaling in maternal behavior and for the hypothesis that poor maternal care during early life anticipates altered behavior phenotypes in rodents during young adulthood, particularly in a sex-specific manner.

Keywords: Early-life stress. Maternal behavior. Maternal care. Corticotrophin. Anxiety. Bed Nucleus of the Stria Terminalis.

Introduction

Early life is considered to be a critical period during development (Anda et al., 2006). Due to the many changes that the Central Nervous System (CNS) undergoes, it can be influenced positively or negatively by external factors (Marco et al., 2011). Exposure to adverse situations early in life, such as poor maternal care and neglect, can lead to long lasting neurobiological and behavior consequences, including the development of several psychiatric disorders later in life (Andersen & Teicher, 2009; Chocyk et al., 2013; Teicher et al., 2002).

Anxiety disorders, such as panic disorder, distinct phobias and generalized anxiety disorder (American Psychiatric Association, 2013), are common debilitating diseases (Bandelow et al., 2017; Baxter et al., 2014). According to the World Health Organization (WHO) in 2017, 264 million of people (3,6% of the global population) suffered from anxiety disorders, varying among different regions around the world (World Health Organization, 2017). These disorders have higher rates of comorbidity with other mental and physical diseases, increasing social and economic burden (Maron & Nutt, 2017; Meier & Deckert, 2019; Penza et al., 2003). Moreover, childhood trauma and genetic predisposition are known as major risk factors for developing anxiety disorders (Bandelow et al., 2017; Meier & Deckert, 2019; Penza et al., 2003). Epidemiological studies documented that people exposed to emotional abuse and neglect during childhood are at a greater risk to develop anxiety, including post-traumatic stress symptoms (Kisely et al., 2018; Rich et al., 1997).

Rodents are widely used to provide a better understanding of the neurobiological mechanisms that underlie the establishment of these disorders. Evidences of rat and mice studies indicate that exposure to maternal separation, a protocol where pups are separated from the dam and exposed to a new environment during early infancy, alters the maternal care (MC) of the dam and increases anxiety-like behavior of the offspring in adolescence and adulthood (Chocyk et al., 2013; Romeo et al., 2003). In addition, exposure to limited bedding in mice, that consists in the exposure of the dam and the pups to an impoverished environment during early development, resulted in fragmented MC, increased plasma CORT levels and altered behavioral phenotypes of risk-taking and anxiety in the offspring (Rice et al., 2008; Santarelli et al., 2017; Viola et al., 2019). Evidences indicate that these consequences could be attributed in part to low levels of MC (Tractenberg et al., 2016), given that the quality of the relationship between dam and pup during the first weeks of life have been

used as a possible predictor of offspring differences later in life (Weaver et al., 2004). For instance, the frequency and quality of MC can affect brain maturation, behavior, cognitive and emotional systems across mammalian species (Guardini et al., 2017).

In 2014, Klampfl et al. published a study indicating that the injection of Corticotrophin-Releasing Factor (CRF) in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis (BNST) alters MC (Klampfl et al., 2014). This alteration is evidenced by a decrease in Arched Back Nursing (ABN), which is an essential MC during the first weeks of life for an adequate pup neurodevelopment (Champagne, Francis, Mar, & Meaney, 2003; Cirulli, Berry, & Alleva, 2003; Orso et al., 2018). The CRF is a neuropeptide involved in many neural, endocrine and immunologic processes, but its primary role is the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by increasing the release of glucocorticoids (Koob, 1999; Rivier, Rivier, & Vale, 1982). This system is composed by the CRF itself and 3 urocortin (Ucn) peptides (Ucn1, Ucn2 and Ucn3), which bind to the two CRF receptors, CRFR1 and CRFR2. The CRF is highly present in hypothalamic areas but axons of CRF containing neurons project to extrahypothalamic areas, including the amygdala, the ventral tegmental area and the BNST (Albrechet-Souza, Viola, Grassi-Oliveira, Miczek, & de Almeida, 2017; Sawchenko et al., 1993; Swanson, Sawchenko, Rivier, & Vale, 1983). The BNST belongs to the limbic system, known as a sensitive brain area to stress and important to MC (Avery et al., 2016; Klampfl et al., 2014).

Based on these findings, CRF infusion in the BNST seems to provoke an isolated impairment in MC, without the necessity of adding an environmental stress to induce alterations of mice mother-infant interactions. Nevertheless, no study investigated the impact of CRF infusion and alteration of MC on anxiety-like behaviors and locomotor activity of the pups. For this reason, we aimed to evaluate if pups of infused dams would present behavioral alterations as a consequence of the decreased MC through BNST pharmacological manipulation. Findings from this study may help to strength the evidence that the negative effects attributed to models of early life stress (ELS) are mostly caused by MC alterations.

Material and Methods

Animals

This study was performed with BALB/cJ mice from the colony of the Center for Experimental Biological Models (CeMBE), of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil. All animals were maintained under a 12h/12h light-dark cycle in ventilated Plexiglas cages with controlled temperature at 21 ± 1 °C and had access to food and water *ad libitum*. The cages were changed once per week, except during postnatal day (PND) 0-9. Mice were bred in-house due to the fact that adult females went under a surgical procedure before breeding. One female BALB/cJ was bred with one male BALB/cJ for 48h, after that the male was moved to a new cage. After 17 days the females were daily checked for the presence of pups, the day of birth was considered PND 0. In total, 12 litters were used, 7 were randomly assigned to saline (SAL) group and 5 to CRF group. Pups were weighted at PND 9, 21 and 58, and weaned at PND21, after weaning 3 to 5 animals of same sex were left per cage.

The procedures included in this study were conducted in accordance to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Institute of Health (NIH), of United States and were approved by the local Ethics Committee on the Use of Animals under the SIPESQ code 9080.

Stereotaxic surgery and Infusion

Around PND 65 females were implanted with a dual-cannula system (Plastics One, Roanoke, VA, United States) targeting the BNST (both hemispheres), under intraperitoneal (i.p.) anesthesia of a combination of ketamine (100mg/kg) and xylazine (10mg/kg). According to the mouse brain in stereotaxic coordinates atlas (Franklin B.J. & Paxinos, 2007) the used coordinates were: +0.3 mm posterior to bregma, ± 1.1 mm lateral to the midline, and 4.3 mm ventral to the dura. The infusion was done 5 times (PND1, 3, 5, 7 and 9), the dose of CRF (1 μ g/0.5 μ L, CRF human/rat, Tocris Bioscience) and saline (0.5 μ L, NaCl 0.9%) were infused at 0.1 μ L/min. Doses were chosen based on previous studies (Klampfl & Bosch, 2018; Klampfl et al., 2014, 2016).

Maternal behavior observations

The maternal behavior (MB) observation protocol was adapted from Klampfl (Klampfl et al., 2014). The protocol was conducted on PND1, 3, 5, 7 and 9, the same days of CRF/SAL infusion. The observations were conducted in seven 30min blocks. Before the infusion ($\pm$ 8am-9am, blocks 1 and 2), 30 min after infusion ($\pm$ 9.30am-

11am, blocks 3, 4 and 5) and the last, 5 hours after infusion ($\pm$ 14pm-15pm, blocks 6 and 7). One observation was made every 2 min, having a total of 105 observations each day. The frequency of the following behaviors were evaluated: arched-back nursing (ABN), blanket or passive nursing (N), licking and grooming (L), contact with pups (C), nest building (B), pup retrieval (R), off nest (X), harmful behavior (H), self-grooming (S), eating or drinking (E) and the number of exits from the nest. MB was recorded by two independent observers. Results are presented as the mean of all days from each block.

Anxiety-like behavior tests

Open field (OF), Elevated Plus Maze (EPM) and Light/Dark (LD) were performed from PND58-60 respectively, in order to evaluate locomotor activity and anxiety-like behavior. All the tests were video-recorded and analyzed in AnyMaze Software (Stoelting CO, Wood Dale, IL). Between animals, the apparatus was cleaned with ethanol 70%.

Open Field test

In OF box (clear Plexiglas square box 33cm x 33cm) illuminated at 140-150 lux, the animal was placed in the middle of the apparatus and allowed to explore for 10 min. To evaluate the time spent in the center zone and the periphery the box was divided in 16 squares, where the central 4 squares consisted in the center zone and the remaining ones in the periphery zone. Furthermore, number of entries in each zone and total travelled distance were measured.

Elevated Plus Maze test

The EPM apparatus was built of black Plexiglas, with two open arms (30cm x 5cm each) and two closed arms (30cm x 5cm x 15cm) connected by a central area (5cm x 5cm), in a height of 50cm above the ground, illuminated at 40 lux. The animal was placed in the central area facing an open arm and was allowed to explore for 5 min. Total time and number of entries in each arm and the number of head dipping in the open arm were analyzed.

Light/Dark test

The box used for LD test was constructed in Plexiglas (21cm x 42cm x 20cm), divided in two identical size chambers, connected by a door, one was illuminated at 390 lux and the other was completely dark. The animal was placed in the bright chamber and allowed to explore for 10 min. The total time spent in each chamber, the latency to first entry the dark chamber, the number of transitions and the number of head pokes the animal did to or from the dark zone were measured.

Corticosterone levels

As a measure of the HPA functioning, plasma CORT levels were measured ($n = 10$ per group). 30 min after the Light/Dark test the animals were euthanized, and trunk blood was centrifuged to collect the plasma. A total of 5 μ L of plasma were used for analyses in the Corticosterone Enzyme Immunoassay (Arbor Assays) ELISA kit, according to the manufacturer's instructions. The optical density was analyzed at 450 nm wavelength in an ELISA plate reader, and the data was subsequently transformed into concentration (pg/mL) using standard curve parameters.

Statistical analysis

All data are presented as the mean $\pm$ SEM, statistical significance was considered when $p < 0.05$. For each block, data from MB (frequency) and body weight (PND9 and 21) were analyzed by Student's t-test. Area under the curve (AUC) was used to analyze MB, as a total measure and not by points. Two-way ANOVA was used for behavioral tests (OF, EPM, LD), CORT levels and body weight (PND58), with a sex factor (male x female) and a treatment factor (SAL x CRF).

Results

Maternal behavior

30, 60 and 90 min after CRF infusion in the BNST dams presented lower levels of ABN (blocks 3, 4 and 5), and the same pattern was found 5 hours after infusion (block 6) [$t(10) = 2.29$, $p = 0.044$; $t(10) = 3.23$, $p = 0.009$; $t(10) = 5.52$, $p < 0.001$; $t(10) = 5.70$, $p < 0.001$, respectively; Fig. 1A]. No ABN alterations were observed immediately before infusion (blocks 1 and 2) [$t(10) = 0.486$, $p = 0.637$; $t(10) = -0.161$, $p = 0.876$, respectively; Fig. 1A] and 5 h and 30 min after infusion (block 7) [$t(10) = -0.124$, $p = 0.904$; Fig. 1A]. The area under curve (AUC) was lower in the CRF group [$t(10) = 3.83$, $p = 0.003$; Fig. 1B]. Moreover, an increase in the number of exits from the nest was observed in CRF dams only on block 4 [$t(10) = -2.94$, $p = 0.015$; Fig. 1C]. Additionally, the AUC for nest exits was significantly larger in CRF group than in SAL group [$t(10) = 2.45$, $p = 0.034$; Fig. 1D]. No significant differences were detected on remaining behaviors (data not shown).

Figure 1 here

Body weight

There were no differences in body weight between groups on PND9 and PND21 (Fig. 2A and B respectively). On PND58 there was only a sex effect [$F(1) = 218.74$, $p < 0.001$; Fig. 2C], as expected, females have lower body weight independently of treatment when compared to males.

Figure 2 here

Anxiety-like behavior tests

There was a significant effect of treatment in the OF, in which animals of CRF infused dams showed increased locomotor activity [$F(1) = 8.25$, $p = 0.006$; Fig. 3A] when compared to saline dams. No significant difference was detected in time spent in the center zone of the OF (Fig. 3B).

Figure 3 here

In EPM test a significant interaction effect was found in time spent in the open arms, showing that males from CRF infused dams increased their time while females decreased [$F(1,41) = 7.50$, $p = 0.009$; Fig. 4A]. No significant differences were observed in the number of entries in open arms and the frequency of head dipping behavior in the EPM (Fig. 4B and 4C).

Figure 4 here

In LD test there was a significant effect of treatment, in which animals of CRF group took more time to entry the dark zone [$F(1) = 4.29$, $p = 0.045$; Fig. 5B] and showed increased number of head pokes from the light to the dark zone [$F(1) = 4.59$, $p = 0.038$; Fig. 5D]. No significant differences were observed in the remaining measures of the LD (Fig. 5A, 5C and 5E).

Figure 5 here

Corticosterone levels

There was no difference between groups when measuring plasma corticosterone levels (Fig. 6).

Figure 6 here

Discussion

Here we demonstrated that CRF infusion in the BNST of dams during the first weeks after birth alters MC, by decreasing ABN and increasing the number of exits from the nest. These changes in MC resulted in increased anxiety among female offspring, while decreased it among males. Additionally, these MC changes induced higher locomotor activity in both offspring sexes. Although this was a sex-specific effect, the current study suggests that altered MC is a very important factor when accounting for the effects of rodent models of early life stress.

Anxiety-like behavior can be assessed by different protocols, as the OF, EPM and LD (Bailey & Crawley, 2009). To measure this behavior in the OF, the most used parameter is the time spent in the center of the arena. Here, we did not find differences between CRF and SAL animals in this parameter, however, CRF animals increased their total travelled distance when compared to SAL animals. These are well-known behavioral measures of activity and exploration, showing that our results are congruent with those found by Aya-Ramos et al. (2017) and Wang et al. (2015), who found that measures of locomotor activity increase significantly in animals that were subjected to postnatal maternal separation.

Additionally, in the LD the total number of transitions and the time spend in each chamber are classical parameters, but lately, the number of risk assessments have been used as a measure of related-anxiety behavior (Bailey & Crawley, 2009). We did not observe group differences in these classic measures, but we showed that CRF animal took more time to entry the dark zone and increased their number of head pokes from before the transition from the light to the dark zone. These behaviors may suggest a stronger link to exploratory actions, corroborating OF results.

Regarding the EPM, the most classic related-anxiety parameter is the time spent in the open arms, in which less time exploring opened compartments is an indication of more anxiety. Intriguingly, our data from this test presented a significant interaction effect, showing that CRF males increased their time while CRF females decreased it when compared to SAL animals. This result corroborates previous studies that showed an anxiolytic effect of maternal separation in male animals when these were tested in the EPM (Weiss, Franklin, Vizi, & Mansuy, 2011). In addition, it also corroborates with some previous studies showing that female animals are more vulnerable to effects of early life stress in a wide range of behavioral and neurobiological outcomes (Kawakami, Quadros, Machado, & Suchecki, 2013;

Papaioannou, Gerozissis, Prokopiou, Bolaris, & Stylianopoulou, 2002). According to Keller et al. (2019), the increased vulnerability in females may be related to maternal care, this study shows that in a maltreatment condition, females received higher adverse care from the dams when compared to males offspring. Therefore, we provided additional evidence to the hypothesis that poor MC during early life anticipates altered behavioral phenotypes in rodents during adolescence and adulthood, including changes in exploratory and related-anxiety behaviors. Although the exact mechanisms underlying these outcomes and the sex-specific effect are still unknown, it is important to note that sex is a key factor to alterations in exploratory and anxiety-like behaviors elicited by poor mother-infant attachment.

The behavioral alterations observed in offspring were elicited by activation of CRF-BNST signaling pathway in the limbic system of dams. The BNST is a complex brain region, involved in different circuits and processes, but with a critical role in stress response and stress-related disorders, including anxiety (Avery et al., 2016; Kim et al., 2013). BNST express both CRF receptors, CRFR1 and CRFR2. CRF itself has higher affinity for CRFR1, and evidence support that this receptor is linked to the increase of anxiety-related phenotypes in response to stress (Kash et al., 2015; Sanders & Nemeroff, 2016). As mentioned, the expression of CRF induces the activation of the HPA axis, increasing the release of glucocorticoids (Koob, 1999). For this reason, CRF infusion in the BNST has been associated with different behavior outcomes, as anxiogenic-like effects and involvement in fear response (Lee & Davis, 1997; Sahuque et al., 2006; Schulkin, Morgan, & Rosen, 2005; Walker, Toufexis, & Davis, 2003). The CRF in the BNST also plays a role in social-defeat and anhedonia (Albrechet-Souza et al., 2017; Stout, Mortas, Owens, Nemeroff, & Moreau, 2000). In addition, the overexpression of this neuropeptide in the BNST, reduces MC and maternal aggression while increases anxiety-like behavior, plasmatic CORT and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) levels in lactating dams (Klampfl & Bosch, 2019; Klampfl et al., 2016).

Several studies that used the limited bedding protocol reported that stressed dams, when compared to control dams, increased the number of exits from the nest (Arp et al., 2016; Gunn et al., 2013; Hsiao et al., 2016; Lesuis, Weggen, Baches, Lucassen, & Krugers, 2018; Rice et al., 2008; Viola et al., 2019), data that correspond with our findings, that CRF dams, have more exits from the nest than SAL dams. This augmentation in the frequency of exits from the nest alters the natural pattern of

maternal behavior, resulting in fragmented MC, due to the increased number of times that the dam interrupt nurturing behavior. We also observed a decrease in the frequency of ABN in CRF dams, that is explained by the reasons mentioned above. However, we are not able to say that our data of ABN totally correspond to studies with early life stress protocols. Most of the studies that used maternal separation report an increase in this behavior, after reunion (Bailoo, Jordan, Garza, & Tyler, 2014; Daskalakis et al., 2014; O'Malley, Dinan, & Cryan, 2011; Rüedi-Bettschen et al., 2006), probably as an attempt to compensate the time away from the pups. Unfortunately, there is a lack of information about the maternal behavior before and after a longer time post reunion. Even though the maternal separation studies present an increased ABN, they report anxiety-like behavior in the offspring of these stressed dams, so we could suppose that the compensatory nursing behavior post-reunion is not effective to protect the pups from further consequences.

References

- Albrechet-Souza, L., Viola, T. W., Grassi-Oliveira, R., Miczek, K. A., & de Almeida, R. M. M. (2017). Corticotropin Releasing Factor in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in Socially Defeated and Non-stressed Mice with a History of Chronic Alcohol Intake. *Front Pharmacol*, 8, 762. doi:10.3389/fphar.2017.00762
- American Psychiatric Association. (2013). Anxiety Disorders. In *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5th ed.). Washington, DC.
- Anda, R. F., Felitti, V. J., Bremner, J. D., Walker, J. D., Whitfield, C., Perry, B. D., . . . Giles, W. H. (2006). The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood. A convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 256(3), 174-186. doi:10.1007/s00406-005-0624-4
- Andersen, S. L. (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev*, 27(1-2), 3-18.
- Andersen, S. L., & Teicher, M. H. (2009). Desperately driven and no brakes: developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse. *Neurosci Biobehav Rev*, 33(4), 516-524. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.09.009
- Arp, J. M., Ter Horst, J. P., Loi, M., den Blaauwen, J., Bangert, E., Fernández, G., . . . Krugers, H. J. (2016). Blocking glucocorticoid receptors at adolescent age prevents enhanced freezing between repeated cue-exposures after conditioned fear in adult mice raised under chronic early life stress. *Neurobiol Learn Mem*, 133, 30-38. doi:10.1016/j.nlm.2016.05.009
- Avery, S. N., Clauss, J. A., & Blackford, J. U. (2016). The Human BNST: Functional Role in Anxiety and Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 126-141. doi:10.1038/npp.2015.185
- Aya-Ramos, L., Contreras-Vargas, C., Rico, J. L., & Dueñas, Z. (2017). Early maternal separation induces preference for sucrose and aspartame associated with increased blood glucose and hyperactivity. *Food Funct*, 8(7), 2592-2600. doi:10.1039/c7fo00408g
- Bailey, K. R., & Crawley, J. N. (2009). Anxiety-Related Behaviors in Mice. In B. JJ (Ed.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* (2nd ed.). Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Bailoo, J. D., Jordan, R. L., Garza, X. J., & Tyler, A. N. (2014). Brief and long periods of maternal separation affect maternal behavior and offspring behavioral development in C57BL/6 mice. *Dev Psychobiol*, 56(4), 674-685. doi:10.1002/dev.21135
- Bandelow, B., Michaelis, S., & Wedekind, D. (2017). Treatment of anxiety disorders. *Dialogues Clin Neurosci*, 19(2), 93-107.
- Baxter, A. J., Vos, T., Scott, K. M., Ferrari, A. J., & Whiteford, H. A. (2014). The global burden of anxiety disorders in 2010. *Psychol Med*, 44(11), 2363-2374. doi:10.1017/S0033291713003243
- Brenhouse, H. C., & Bath, K. G. (2019). Bundling the haystack to find the needle: Challenges and opportunities in modeling risk and resilience following early life stress. *Front Neuroendocrinol*, 100768. doi:10.1016/j.yfrne.2019.100768
- Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav*, 79(3), 359-371.

- Chocyk, A., Bobula, B., Dudys, D., Przyborowska, A., Majcher-Maślanka, I., Hess, G., & Wędzony, K. (2013). Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *Eur J Neurosci*, 38(1), 2089-2107. doi:10.1111/ejn.12208
- Cirulli, F., Berry, A., & Alleva, E. (2003). Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev*, 27(1-2), 73-82.
- Curley, J. P., & Champagne, F. A. (2016). Influence of maternal care on the developing brain: Mechanisms, temporal dynamics and sensitive periods. *Front Neuroendocrinol*, 40, 52-66. doi:10.1016/j.yfrne.2015.11.001
- Daskalakis, N. P., Diamantopoulou, A., Claessens, S. E., Remmers, E., Tjälve, M., Oitzl, M. S., . . . de Kloet, E. R. (2014). Early experience of a novel-environment in isolation primes a fearful phenotype characterized by persistent amygdala activation. *Psychoneuroendocrinology*, 39, 39-57. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.09.021
- Franklin B.J., K., & Paxinos, G. (2007). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (3th ed.).
- Franks, B., Curley, J. P., & Champagne, F. A. (2011). Measuring Variations in Maternal Behavior: Relevance for Studies of Mood and Anxiety. In *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*.
- Grassi-Oliveira, R., Ashy, M., & Stein, L. M. (2008). Psychobiology of childhood maltreatment: effects of allostatic load? *Rev Bras Psiquiatr*, 30(1), 60-68.
- Guardini, G., Bowen, J., Mariti, C., Fatjó, J., Sighieri, C., & Gazzano, A. (2017). Influence of Maternal Care on Behavioural Development of Domestic Dogs (Canis Familiaris) Living in a Home Environment. *Animals (Basel)*, 7(12). doi:10.3390/ani7120093
- Gunn, B. G., Cunningham, L., Cooper, M. A., Corteen, N. L., Seifi, M., Swinny, J. D., . . . 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(50), 19534-19554. doi:10.1523/JNEUROSCI.1337-13.2013
- Hsiao, Y. M., Tsai, T. C., Lin, Y. T., Chen, C. C., Huang, C. C., & Hsu, K. S. (2016). Early life stress dampens stress responsiveness in adolescence: Evaluation of neuroendocrine reactivity and coping behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 67, 86-99. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.02.004
- Kash, T. L., Pleil, K. E., Marcinkiewicz, C. A., Lowery-Gionta, E. G., Crowley, N., Mazzone, C., . . . McElligott, Z. A. (2015). Neuropeptide regulation of signaling and behavior in the BNST. *Mol Cells*, 38(1), 1-13. doi:10.14348/molcells.2015.2261
- Kawakami, S. E., Quadros, I. M., Machado, R. B., & Suchecki, D. (2013). Sex-dependent effects of maternal separation on plasma corticosterone and brain monoamines in response to chronic ethanol administration. *Neuroscience*, 253, 55-66. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.08.031
- Keller, S. M., Nowak, A., & Roth, T. L. (2019). Female pups receive more maltreatment from stressed dams. *Dev Psychobiol*. doi:10.1002/dev.21834
- Kim, S. Y., Adhikari, A., Lee, S. Y., Marshel, J. H., Kim, C. K., Mallory, C. S., . . . Deisseroth, K. (2013). Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. *Nature*, 496(7444), 219-223. doi:10.1038/nature12018

- Kisely, S., Abajobir, A. A., Mills, R., Strathearn, L., Clavarino, A., & Najman, J. M. (2018). Child maltreatment and mental health problems in adulthood: birth cohort study. *Br J Psychiatry*, 213(6), 698-703. doi:10.1192/bjp.2018.207
- Klampfl, S. M., & Bosch, O. J. (2018). When mothers neglect their offspring: an activated CRF system in the BNST is detrimental for maternal behavior. *Arch Womens Ment Health*. doi:10.1007/s00737-018-0897-z
- Klampfl, S. M., & Bosch, O. J. (2019). When mothers neglect their offspring: an activated CRF system in the BNST is detrimental for maternal behavior. *Arch Womens Ment Health*, 22(3), 409-415. doi:10.1007/s00737-018-0897-z
- Klampfl, S. M., Brunton, P. J., Bayerl, D. S., & Bosch, O. J. (2014). Hypoactivation of CRF receptors, predominantly type 2, in the medial-posterior BNST is vital for adequate maternal behavior in lactating rats. *J Neurosci*, 34(29), 9665-9676. doi:10.1523/JNEUROSCI.4220-13.2014
- Klampfl, S. M., Brunton, P. J., Bayerl, D. S., & Bosch, O. J. (2016). CRF-R1 activation in the anterior-dorsal BNST induces maternal neglect in lactating rats via an HPA axis-independent central mechanism. *Psychoneuroendocrinology*, 64, 89-98. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.11.015
- Koob, G. F. (1999). Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol Psychiatry*, 46(9), 1167-1180.
- Lee, Y., & Davis, M. (1997). Role of the hippocampus, the bed nucleus of the stria terminalis, and the amygdala in the excitatory effect of corticotropin-releasing hormone on the acoustic startle reflex. *J Neurosci*, 17(16), 6434-6446.
- Lesuis, S. L., Weggen, S., Baches, S., Lucassen, P. J., & Krugers, H. J. (2018). Targeting glucocorticoid receptors prevents the effects of early life stress on amyloid pathology and cognitive performance in APP/PS1 mice. *Transl Psychiatry*, 8(1), 53. doi:10.1038/s41398-018-0101-2
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*, 10(6), 434-445. doi:10.1038/nrn2639
- Lévy, F. (2016). Neuroendocrine control of maternal behavior in non-human and human mammals. *Ann Endocrinol (Paris)*, 77(2), 114-125. doi:10.1016/j.ando.2016.04.002
- Marco, E. M., Macrì, S., & Laviola, G. (2011). Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: evidence from animal models. *Neurotox Res*, 19(2), 286-307. doi:10.1007/s12640-010-9205-z
- Maron, E., & Nutt, D. (2017). Biological markers of generalized anxiety disorder. *Dialogues Clin Neurosci*, 19(2), 147-158.
- Meier, S. M., & Deckert, J. (2019). Genetics of Anxiety Disorders. *Curr Psychiatry Rep*, 21(3), 16. doi:10.1007/s11920-019-1002-7
- Molet, J., Maras, P. M., Avishai-Eliner, S., & Baram, T. Z. (2014). Naturalistic rodent models of chronic early-life stress. *Dev Psychobiol*, 56(8), 1675-1688. doi:10.1002/dev.21230
- Nanni, V., Uher, R., & Danese, A. (2012). Childhood maltreatment predicts unfavorable course of illness and treatment outcome in depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*, 169(2), 141-151. doi:10.1176/appi.ajp.2011.11020335
- O'Malley, D., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2011). Neonatal maternal separation in the rat impacts on the stress responsivity of central corticotropin-releasing factor receptors in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)*, 214(1), 221-229. doi:10.1007/s00213-010-1885-9

- Orso, R., Wearick-Silva, L. E., Creutzberg, K. C., Centeno-Silva, A., Glusman Roithmann, L., Pazzin, R., . . . Grassi-Oliveira, R. (2018). Maternal behavior of the mouse dam toward pups: implications for maternal separation model of early life stress. *Stress*, 21(1), 19-27. doi:10.1080/10253890.2017.1389883
- Papaioannou, A., Gerozissis, K., Prokopiou, A., Bolaris, S., & Stylianopoulou, F. (2002). Sex differences in the effects of neonatal handling on the animal's response to stress and the vulnerability for depressive behaviour. *Behav Brain Res*, 129(1-2), 131-139.
- Penza, K. M., Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2003). Neurobiological effects of childhood abuse: implications for the pathophysiology of depression and anxiety. *Arch Womens Ment Health*, 6(1), 15-22. doi:10.1007/s00737-002-0159-x
- Rice, C. J., Sandman, C. A., Lenjavi, M. R., & Baram, T. Z. (2008). A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology*, 149(10), 4892-4900. doi:10.1210/en.2008-0633
- Rich, D. J., Gingerich, K. J., & Rosen, L. A. (1997). Childhood Emotional Abuse and Associated Psychopathology in College Students. *Journal of College Student Psychotherapy*, 11(3), 13-28. doi:10.1300/J035v11n03_04
- Rivier, C., Rivier, J., & Vale, W. (1982). Inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor. *Science*, 218(4570), 377-379.
- Romeo, R. D., Mueller, A., Sisti, H. M., Ogawa, S., McEwen, B. S., & Brake, W. G. (2003). Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Horm Behav*, 43(5), 561-567.
- Royle, N. J., Smiseth, P. T., & Kölliker, M. (2012). *The evolution of parental care*. Oxford: Oxford University Press.
- Rüedi-Bettschen, D., Zhang, W., Russig, H., Ferger, B., Weston, A., Pedersen, E. M., . . . Pryce, C. R. (2006). Early deprivation leads to altered behavioural, autonomic and endocrine responses to environmental challenge in adult Fischer rats. *Eur J Neurosci*, 24(10), 2879-2893. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05158.x
- Sahuque, L. L., Kullberg, E. F., Mcgeehan, A. J., Kinder, J. R., Hicks, M. P., Blanton, M. G., . . . Olive, M. F. (2006). Anxiogenic and aversive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat: role of CRF receptor subtypes. *Psychopharmacology (Berl)*, 186(1), 122-132. doi:10.1007/s00213-006-0362-y
- Sanders, J., & Nemeroff, C. (2016). The CRF System as a Therapeutic Target for Neuropsychiatric Disorders. *Trends Pharmacol Sci*, 37(12), 1045-1054. doi:10.1016/j.tips.2016.09.004
- Santarelli, S., Zimmermann, C., Kalideris, G., Lesuis, S. L., Arloth, J., Uribe, A., . . . Schmidt, M. V. (2017). An adverse early life environment can enhance stress resilience in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*, 78, 213-221. doi:10.1016/j.psyneuen.2017.01.021
- Sawchenko, P. E., Imaki, T., Potter, E., Kovács, K., Imaki, J., & Vale, W. (1993). The functional neuroanatomy of corticotropin-releasing factor. *Ciba Found Symp*, 172, 5-21; discussion 21-29.
- Schulkin, J., Morgan, M. A., & Rosen, J. B. (2005). A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. *Trends Neurosci*, 28(12), 629-635. doi:10.1016/j.tins.2005.09.009

- Soma-Pillay, P., Nelson-Piercy, C., Tolppanen, H., & Mebazaa, A. (2016). Physiological changes in pregnancy. *Cardiovasc J Afr*, 27(2), 89-94. doi:10.5830/CVJA-2016-021
- Stout, S. C., Mortas, P., Owens, M. J., Nemeroff, C. B., & Moreau, J. (2000). Increased corticotropin-releasing factor concentrations in the bed nucleus of the stria terminalis of anhedonic rats. *Eur J Pharmacol*, 401(1), 39-46. doi:10.1016/s0014-2999(00)00412-x
- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., & Vale, W. W. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*, 36(3), 165-186. doi:10.1159/000123454
- Teicher, M. H., Andersen, S. L., Polcari, A., Anderson, C. M., & Navalta, C. P. (2002). Developmental neurobiology of childhood stress and trauma. *Psychiatr Clin North Am*, 25(2), 397-426, vii-viii.
- Tractenberg, S. G., Levandowski, M. L., de Azeredo, L. A., Orso, R., Roithmann, L. G., Hoffmann, E. S., . . . Grassi-Oliveira, R. (2016). An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*, 68, 489-503. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.06.021
- Viola, T. W., Tractenberg, S. G., Pezzi, J. C., Kristensen, C. H., & Grassi-Oliveira, R. (2013). Childhood physical neglect associated with executive functions impairments in crack cocaine-dependent women. *Drug Alcohol Depend*, 132(1-2), 271-276. doi:10.1016/j.drugalcdep.2013.02.014
- Viola, T. W., Wearick-Silva, L. E., Creutzberg, K. C., Kestering-Ferreira, É., Orso, R., Centeno-Silva, A., . . . Grassi-Oliveira, R. (2019). 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*, 99, 8-19. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.08.032
- Walker, D. L., Toufexis, D. J., & Davis, M. (2003). Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol*, 463(1-3), 199-216. doi:10.1016/s0014-2999(03)01282-2
- Wang, Q., Li, M., Du, W., Shao, F., & Wang, W. (2015). The different effects of maternal separation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behav Brain Res*, 280, 16-23. doi:10.1016/j.bbr.2014.11.040
- Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., . . . Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*, 7(8), 847-854. doi:10.1038/nn1276
- Weiss, I. C., Franklin, T. B., Vizi, S., & Mansuy, I. M. (2011). Inheritable effect of unpredictable maternal separation on behavioral responses in mice. *Front Behav Neurosci*, 5, 3. doi:10.3389/fnbeh.2011.00003
- World Health Organization. (2017). *Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates*. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>

Figures

Figure 1. **Effects of CRF infusion in the BNST of dams on the frequency of ABN and exits from the nest.**

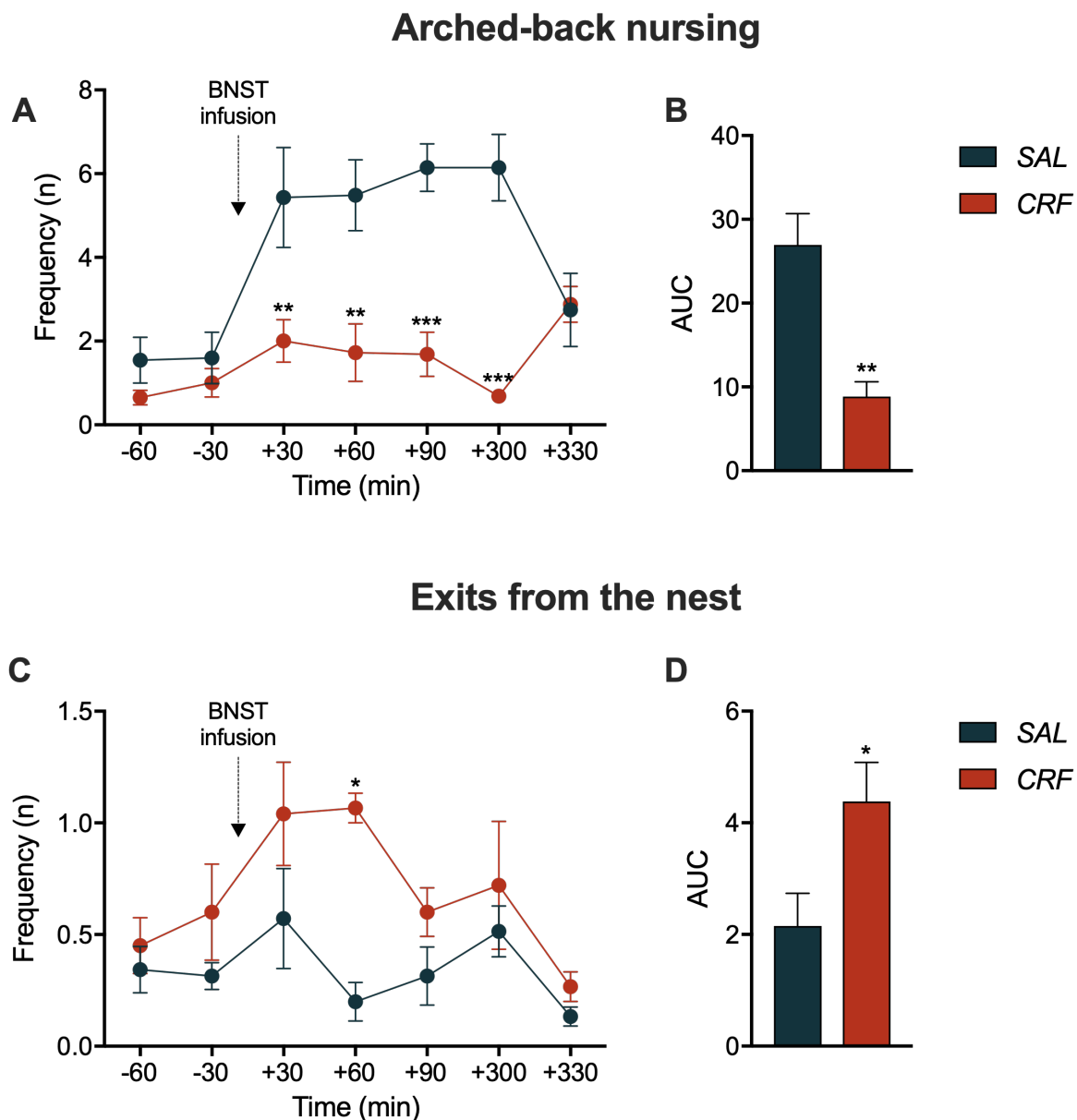


Figure 1 legend: SAL, saline dams; CRF, crf dams; AUC, area under curve. (A) Frequency of ABN was decreased in CRF dams in blocks 3, 4, 5 and 6. (B) AUC of ABN was lower in CRF dams. (C) Frequency of exits from the nest was increased in CRF dams in block 4. (D) AUC of exits from the nest was larger in CRF dams. SAL: $n = 7$, CRF: $n = 5$. Data are presented as the mean $\pm$ SEM of all days from each block. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (t -test).

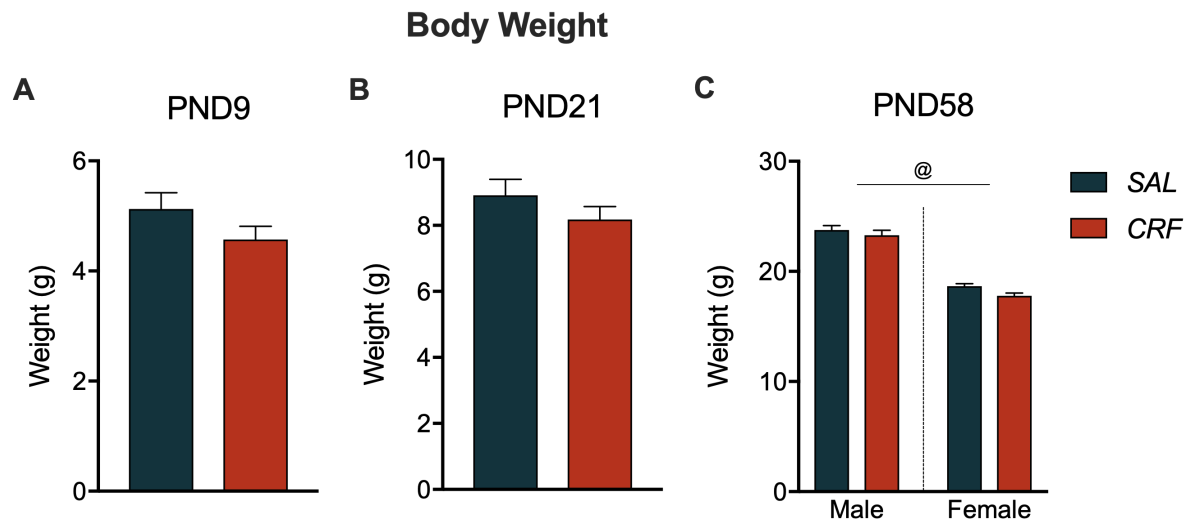
Figure 2. **Body weight.**

Figure 2 legend: *SAL*, saline infused dams offspring; *CRF*, corticotrophin infused dams offspring. (A) Body weight of the offspring at PND9 in grams (*SAL* = 7 families, *CRF* = 5 families). (B) Body weight of the offspring at PND21 in grams (*SAL* = 7 families, *CRF* = 5 families). (C) Body weight of the offspring at PND58 in grams ($n = 12$ per group, except *SAL* female, $n = 10$). @, sex-effect in the 2-way ANOVA, where females have lower body weight than males independently of treatment. Results are presented as the mean $\pm$ SEM.

Figure 3. Parameters of the OF.

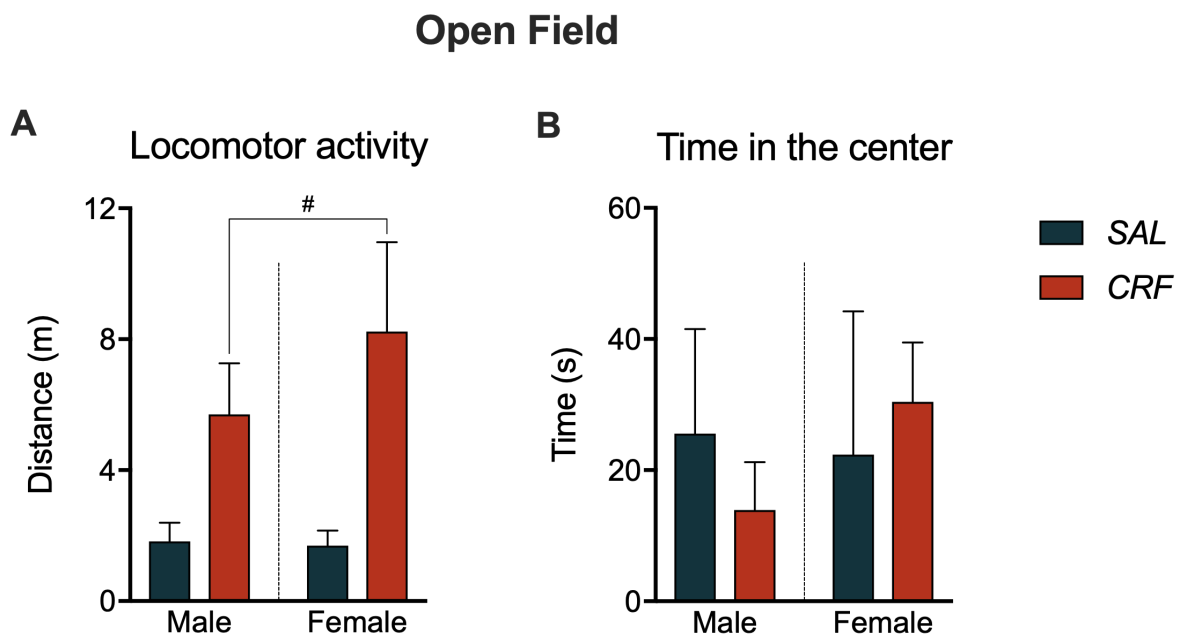


Figure 3 legend: *SAL*, saline infused dams offspring; *CRF*, corticotrophin infused dams offspring. (A) Locomotor activity in meters. (B) Time spent in the center zone in seconds. #, treatment-effect in the 2-way ANOVA, *CRF* animals presented higher travelled distance. Results are presented as the mean $\pm$ SEM ($n = 12$ per group, except *SAL* female, $n = 10$).

Figure 4. Parameters of the EPM.

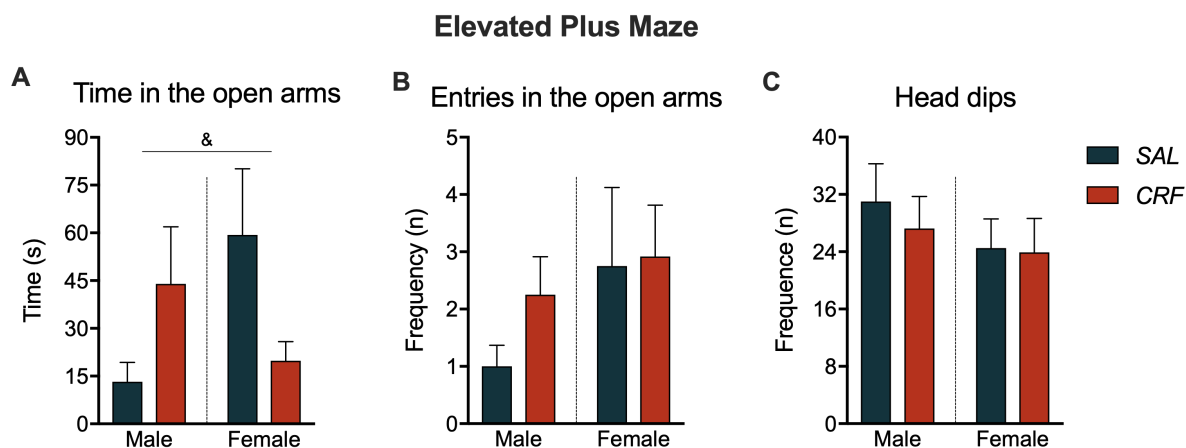


Figure 4 legend: *SAL*, saline infused dams offspring; *CRF*, corticotrophin infused dams offspring. (A) Time spent in the open arms in seconds. (B) Number of entries in the open arms. (C) Number of head dips. &, interaction effect in the 2-way ANOVA, showing that *CRF* males increased their time while *CRF* females decreased. Results are presented as the mean $\pm$ SEM ($n = 12$ per group, except *SAL* female, $n = 10$).

Figure 5. Parameters of the LD.

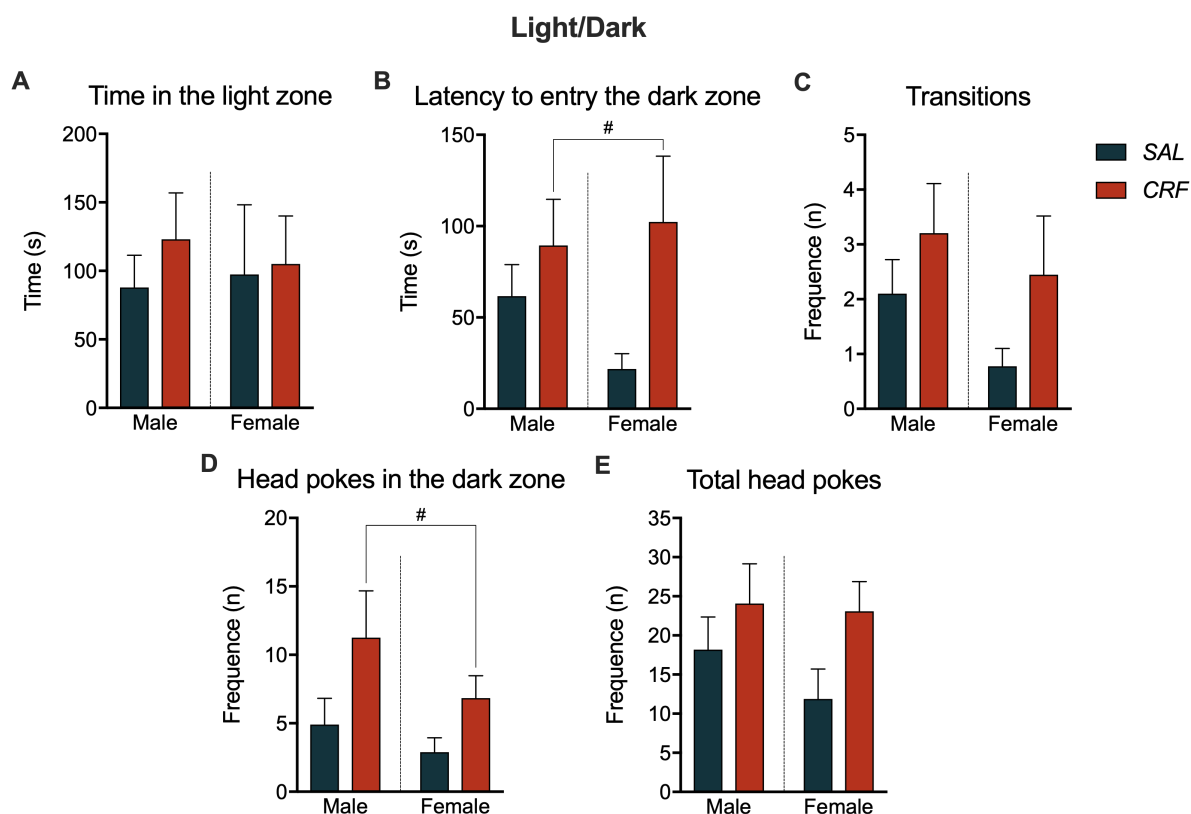


Figure 5 legend: SAL, saline infused dams offspring; CRF, corticotrophin infused dams offspring. (A) Time spent in the light zone in seconds. (B) Latency to enter the dark zone in seconds. (C) Number of transitions between the dark and light chamber. (D) Number of head pokes from the light to the dark zone. (E) Number of total head pokes. #, treatment-effect in the 2-way ANOVA, where CRF animals took more time to leave the light zone for the first time and increased the number of head pokes in the dark zone when compared to SAL. Results are presented as the mean $\pm$ SEM ($n = 12$ per group, except SAL female, $n = 10$).

Figure 6. **Plasma corticosterone levels.**

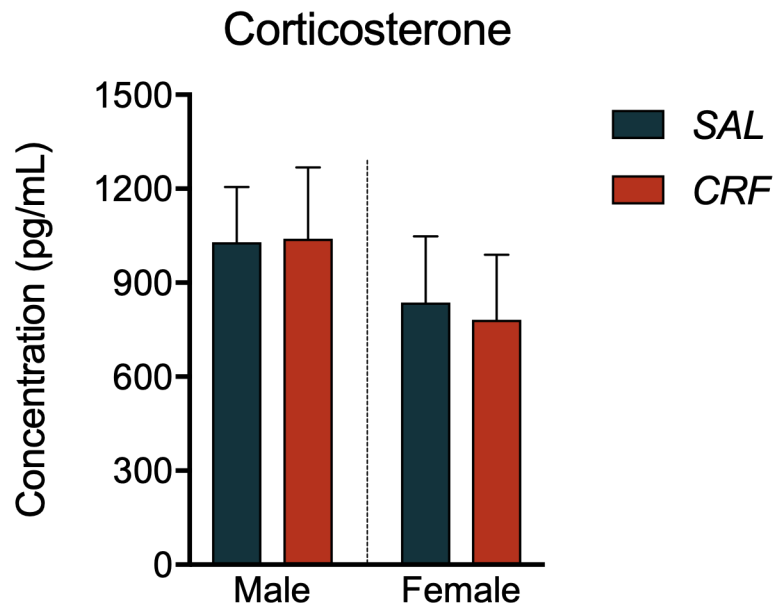


Figure 6 legend: *SAL*, saline infused dams offspring; *CRF*, corticotrophin infused dams offspring. Levels of plasma corticosterone at PND58. Results are presented as the mean $\pm$ SEM ($n = 10$ per group).



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br