

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**PROGRAMAÇÃO COMPORTAMENTAL POR ESTRESSE
GESTACIONAL EM RATOS**

ELAINE LUCAS DOS SANTOS

**DOURADOS MS
2012**

ELAINE LUCAS DOS SANTOS

**PROGRAMAÇÃO COMPORTAMENTAL POR ESTRESSE
GESTACIONAL EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa Dra KELY DE PICOLI SOUZA

Co-orientador: Prof. Dr EDSON LUCAS DOS SANTOS

**DOURADOS MS
2012**

Agradecimentos

Condição - Lulu Santos

*Eu não sou diferente de ninguém
Quase todo mundo faz assim
Eu me viro bem melhor
Quando tá mais pra bom que pra ruim
Não quero causar impacto
Nem tampouco sensação
O que eu digo é muito exato
E o que cabe na canção
Qualquer um que ouve entende
Não precisa explicação
E se for pensar um pouco
Vai me dar toda razão
A senhora, a senhorita e também o cidadão
Todo mundo que se preza
Nega fogo não
Eu não sei viver sem ter carinho
É a minha condição
Eu não sei viver triste e sozinho
É a minha condição
Eu não sei viver preso ou fugindo*

E é exatamente porque ninguém vive sozinho que nenhuma conquista é mérito de apenas um indivíduo. De tal forma, este trabalho não poderia ser diferente. A conclusão desta pesquisa só é possível, graças ao empenho de uma equipe, não apenas daqueles que trabalharam diretamente para que ela se realizasse, mas daqueles que mesmo sem perceberem, mesmo à distância me ajudaram a finalizá-la.

Assim, agradeço profundamente:

- A Deus, por todas as graças a mim concedidas e pela fidelidade incondicional;
- A minha orientadora Kely de Picoli, pela oportunidade e por toda a confiança em mim depositada. Exemplo de responsabilidade, dedicação e capacidade, qualidades notórias e indiscutíveis que admiro e pretendo seguir;
- Ao meu co-orientador Edson Lucas dos Santos, por todos os puxões de orelhas desconcertantes, porém necessários. Cresci tendo-o como exemplo e vou admirá-lo sempre;
- Aos meus pais Cicera e Edival e ao meu irmão Edmilson por toda a confiança, carinho e amparo que sempre tiveram, obrigada por mesmo estando longe, estarem sempre tão presentes, obrigada por todo o apoio que me deram nos bons momentos e por todo o

suporte nos momentos não tão fáceis. Obrigada por tudo o que me ensinaram e por todas as oportunidades que me proporcionaram;

- A FUNDECT por todo o apoio financeiro;
- A todos os alunos graduandos e pós-graduandos do GEBBAM, Gláucia, Simone, Uilson, Carolina, Jaqueline, Kátia, Luís Fernando, Júnior, Cleide, Gisele, Salete, Paola, Flávia e Adriane, obrigada pela ajuda com os animais, com a pesquisa e em outros momentos do cotidiano;
- Aos companheiros da turma de mestrado, não foram muitos os momentos juntos, mas todos nós compartilhamos das dificuldades em ser a primeira turma do programa;
- Aos professores por todas as aulas ministradas e pelo conhecimento ensinado;
- Ao Alex por toda a ajuda nos assuntos burocráticos,
- Aos trabalhadores que fazem a vigilância da UFGD, obrigada por toda a ajuda seja nos serviços que exigiram força ou na companhia e segurança nos momentos de trabalho solitário na Universidade;
- A Priscila, minha companheira de casa, pessoa com quem dividi neste período não apenas o aluguel, mas as aflições do dia-a-dia;
- As amigas com quem cresci e a quem amo como irmãs, Mariza, Regiane, Juliane, Laiani, Danielle, Gisele, Roberta e Taise obrigada por não terem ficado apenas na minha infância, começamos todas juntas, a vida deu conta de traçar um caminho para cada uma de nós, mas é imensamente gratificante saber que estas são amigas que perduram além do tempo, além da distância, além da incompatibilidade dos objetivos;
- As amigas que fiz durante a graduação e que se manterão além daquela que alguns intitulam como “a melhor fase da vida”. Não sei se foi a melhor, espero viver muita coisa boa ao longo da minha jornada, mas sei que não poderia ter encontrado pessoas melhores, Maringá nos uniu, mas a amizade, carinho e companheirismo vindo de vocês estará comigo além da distância. Obrigada Francielle, Thaís, Jacqueline, Lara, Drielle, Daniela, minhas eternas Psix e obrigada Fernanda, Larissa, Alisson, Marcelo, Lucas e Leonardo. Obrigada amigos por cada palavra acolhedora e encorajadora, obrigada por cada silêncio compreensivo.

Dedicatória

Pra você guardei o amor - Nando Reis

*Pra você guardei o amor
Que nunca soube dar
O amor que tive e vi sem me deixar
Sentir sem conseguir provar
Sem entregar
E repartir
Pra você guardei o amor
Que sempre quis mostrar
O amor que vive em mim vem visitar
Sorrir, vem colorir solar
Vem esquentar
E permitir
Quem acolher o que ele tem e traz
Quem entender o que ele diz
No giz do gesto o jeito pronto
Do piscar dos cílios
Que o convite do silêncio
Exibe em cada olhar
Guardei
Sem ter porque
Nem por razão
Ou coisa outra qualquer
Além de não saber como fazer
Pra ter um jeito meu de me mostrar
Achei
Vendo em você
E explicação
Nenhuma isso requer
Se o coração bater forte e arder
No fogo o gelo vai queimar*

Dedico este trabalho aos dois pequeninos que eu mais amo na vida, meus verdadeiros “Xodós”, meus sobrinhos Iara e Heitor a quem amo sem razão, sem medida e sem cobrança e ao meu terceiro sobrinho, o Lucas que Deus enviou e ainda está a caminho, mas já é esperado com igual carinho.

Embora ainda vá demorar um bom tempo até que eles entendam o significado deste trabalho, espero que em momento algum tenham dúvidas do meu sentimento por eles.

Sumário

Agradecimentos	iii
Dedicatória.....	v
Listas de abreviaturas e símbolos	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Ritmos biológicos, estresse e mecanismos de resposta	1
1.2 Plasticidade do sistema nervoso	3
1.3 Programação comportamental precoce	5
1.3.1 Comportamento alimentar	5
1.3.2 Comportamentos cognitivo e emocional	6
1.3.3 Comportamento de adição ao etanol	7
1.4 Avaliação comportamental	8
1.4.1 Labirinto em cruz elevado	8
1.4.2 Campo aberto	8
1.4.3 Suspensão pela cauda	9
1.4.4 Labirinto aquático de Morris	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Programação comportamental precoce por estresse gestacional.....	12
2.2 Programação comportamental por fatores nutricionais.....	13
2.3 Programação comportamental precoce por fármacos	15
2.4 Programação comportamental por estimulação neonatal e cuidados parentais	16
3 OBJETIVOS	19
3.1 Geral	19
3.2 Específicos.....	19
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	iii
5 ANEXOS.....	27
Anexo 1: Artigo científico 1: Estresse gestacional por inversão de ciclo claro-escuro programa comportamento de ansiedade e cognição da prole adulta em ratos	
Anexo 2: Normas para publicação do artigo científico 1	
Anexo 3: Email de confirmação de submissão do artigo científico 1	
Anexo 4: Artigo científico 2: Estresse gestacional por inversão de ciclo claro-escuro aumenta a preferência por etanol em ratos adultos	
Anexo 5: Normas para publicação do artigo científico 2	
Anexo 6: Parecer do comitê de ética	

Listas de abreviaturas

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ArRP	Peptídeo relacionado ao Agouti
AVP	Arginina-vasopressina
CGEE	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
CRH	Hormônio inibidor de corticotrofina
HODSDC	Hipótese de origem de desenvolvimento da saúde, doença e comportamentos
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
NREM	Non-rapid eye movements
NPY	Neuropeptídeo Y
POMC	Pró-opiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular
REM	Rapid eye movements
SN	Sistema nervoso
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central

RESUMO

O funcionamento saudável do organismo baseia-se em eventos temporais sincronizados cuja ritmicidade circadiana e está fundamentalmente ligada ao ciclo claro-escuro ambiental. Mudanças no padrão de claro-escuro ambiental levam a alterações no ciclo sono-vigília e assim nos demais ritmos biológicos do organismo. Tal desequilíbrio inclui aumento de cortisol e redução de melatonina, dentre outros fatores e, portanto, configura-se como estresse. Adicionalmente, os hormônios alterados são transplacentários e capazes de atuarem no desenvolvimento do sistema nervoso durante a gestação e modificar permanentemente a morfologia e funções de estruturas, como os comportamentos pelos quais estas são responsáveis. Com base nessa premissa, objetivamos investigar os impactos tardios do estresse gestacional por inversão periódica do ciclo claro-escuro sobre o repertório comportamental e a vulnerabilidade ao consumo de etanol em ratos adultos. Foram colocados 7 machos e 14 fêmeas para acasalar, sendo que no dia em que foi confirmada a prenhez, as ratas foram divididas em genitoras controle (n:9) que permaneceram em ciclo de luminosidade padrão e genitoras que passaram por estresse gestacional (EG n:9), que passaram por inversão periódica de ciclo claro-escuro a cada 4 dias, durante toda a gestação. Após o nascimento as proles Controle (machos n:24 e fêmeas n:8) e EG (machos n:48 e fêmeas n:16). A avaliação do repertório comportamental iniciou-se aos 60 dias de vida dos animais. Para avaliar o comportamento locomotor foi utilizado o labirinto em cruz elevado e campo aberto, para testar o comportamento cognitivo, com enfoque na memória e aprendizagem foi utilizado o labirinto aquático de Morris. Foi feito acompanhamento da evolução da massa corporal, do consumo alimentar e da livre ingestão de etanol. Como resultados, observamos aumento de comportamentos semelhantes à ansiedade, redução no processo de aprendizagem e retenção de memória e maior ingestão e preferência por etanol, principalmente pelos animais do sexo feminino. Em conjunto, nossos resultados mostram que o estresse gestacional por inversão periódica do ciclo claro-escuro, juntamente com outros fatores, pode contribuir para a programação de comportamentos emocionais, reduz aspectos cognitivos relacionados à aprendizagem, formação e retenção de memória e favorecer a adição ao etanol, mesmo sem alterar a ingestão de água ou ração. Com base nestes resultados, novos estudos devem ser realizados

para elucidar os mecanismos neuroendócrinos subjacentes aos comportamentos investigados, bem como outros comportamentos que possam sofrer alterações.

ABSTRACT

The healthy functioning of the organism is based on synchronized temporal events which rhythmicity is controlled primarily by circadian rhythms linked to environmental light-dark cycle. Changes in standard light-dark environment lead to changes in sleep-wake cycle and therefore in the other body's biological rhythms. This imbalance includes increased cortisol and reduction of melatonin, thus it's configured as stress. The altered hormones are transplacental and able to act on the development of nervous system during gestation and permanently modify the morphology and functions of structures and hence behaviors which they are responsible. Based on this premise, we aimed to investigate the long-term impacts of gestational stress by periodic inversion of light-dark cycle on behavioral repertoire and vulnerability to ethanol consumption in adult rats. Models used to evaluate similar to anxiety behaviors were elevated plus maze and open field, for depression we used the tail suspension test and to evaluate learning and memory we used the Morris water maze. It was made up of the evolution of body weight, food consumption and free intake of ethanol. As results, we observed an increase of anxiety-like behavior, learning and memory hability and higher ethanol intake and preference, especially for female animals. Together, our results show that gestational stress by inversion of the periodic light-dark cycle program behaviors similar emotional anxiety, reduces cognitive aspects related to learning, training and memory retention, and favors the addition to ethanol. On the other hand, does not change eating behavior and does not increase depression-like behaviors. Based on these results, further studies should be performed to elucidate the neuroendocrine mechanisms underlying the behaviors investigated, as well as other behaviors that might change.

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso (SN) é continuamente moldado pela interação do sujeito com o meio ambiente durante toda a vida, entretanto, a gestação é o período mais vulnerável para estas remodelações (Hamilton et al., 2010; Remmers & Deleamarre-van de Waal, 2011). Esta alta plasticidade neural durante a gestação terá ligações diretas com os comportamentos do sujeito na vida adulta, sendo que o estresse gestacional pode acarretar consequências negativas à prole, gerando alterações comportamentais ligados ao medo, aprendizagem, interação social, agressividade, comportamentos exploratório, sexual, sucesso reprodutivo e posterior cuidado com suas proles. (Eriksen et al., 2011; Kranendonk, Van der Mheen, Fillerup, & Hopster, 2007; Zhou & Li, 2011).

Na atualidade estamos expostos constantemente a diversos eventos configurados como estresse e, de acordo com o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) do Governo Federal do Brasil, estima-se que em 2030 as doenças e transtornos mentais, cujas etiologias são complexas, seja uma das principais causas da incapacidade humana, atingindo milhões de pessoas no mundo todo. Portanto, se fazem necessários estudos como este que, identifiquem e ampliem a compreensão sobre quais eventos configuram-se como agentes estressores gestacionais e quais comportamentos adultos são influenciados pelos mesmos. Este conhecimento possivelmente servirá como subsídio científico para discussões a favor da qualidade de vida dos sujeitos e prevenção de doenças e transtornos mentais.

1.1 Ritmos biológicos, estresse e mecanismos de resposta

O organismo humano apresenta padrões de funcionamento que se repetem regularmente em intervalos ordenados de tempo, os quais são chamados de ritmos biológicos (Atkinson & Reilly, 1996). Os ritmos biológicos começam a se organizar já no início da vida intra-uterina, fazendo com que o organismo em desenvolvimento, embora esteja envolto por várias camadas de tecido epitelial e líquido amniótico, tenha ritmicidade. Esta ritmicidade intra-uterina é sincronizada pelos ritmos da mãe (Menna-Barreto & Wey, 2007). Após o nascimento é preciso se adaptar a nova realidade temporal, especialmente

pela identificação dos sinais de dia e noite e os sinais não luminosos como, sons, movimentos e intervenções relacionadas ao cuidado (Sadeh, Raviv, & Gruber, 2000).

O principal sincronizador dos ritmos biológicos após o nascimento é o ciclo claro-escuro ambiental (Menna-Barreto & Wey, 2007) o qual se relaciona, por sua vez, com o ritmo circadiano de ciclo sono-vigília da espécie. Durante o período de vigília, é registrado alto grau de atividade dos neurônios corticais, movimentos oculares aleatórios e acentuado tônus muscular. Em contraste, o sono pode ser dividido em sono REM (rapid eye movements) e não-REM. O sono não-REM é marcado pela redução progressiva do tônus muscular e pelo pico de liberação de hormônio do crescimento, leptina e início da liberação de cortisol até atingir seu máximo pela manhã (Anaclet, Pedersen, Fuller, & Lu, 2010). No sono REM ocorre a máxima hipotonia da musculatura esquelética e é marcado pela possível ocorrência de sonhos. A sequência sono não-REM e REM ocorre diariamente, desde que o organismo não se relacione temporariamente de forma diferente com o ambiente, como quando se submete a mudança de fuso horário, por exemplo. Caso isso ocorra, o desconforto permanece até que o organismo se adapte as mudanças e reajuste seu ritmo biológico de acordo com o ciclo comum a cada espécie. Os roedores, por exemplo, diferentemente do homem, tem hábitos noturnos (Menna-Barreto & Wey, 2007).

O cortisol liberado durante o sono, como dito anteriormente, tem sua liberação controlada por um sistema neuroendócrino. Este hormônio é um corticosteróide produzido pelas glândulas adrenais, ligado às respostas do organismo aos agentes estressores, um antagonista da insulina que, além de suprimir o sistema imunológico, aumenta a pressão arterial e o nível de glicemia. Durante a gestação, o cortisol pode atravessar a membrana placentária e alterar o desenvolvimento do SN (Brunton & Russell, 2010; Maganhin, 2008; Marciniak et al., 2011). As alterações do ciclo de sono e vigília, além de alterar os níveis de cortisol, também alteram os níveis de melatonina (Maganhin, 2008). A melatonina, uma indolamina produzida pela glândula pineal que, em conjunto com os núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos, faz parte de um sistema neuroendócrino responsável pela organização de vários eventos fisiológicos e comportamentais.

O período intra-uterino, como dito anteriormente, é um período no qual o SN está altamente vulnerável às modificações. Como o ritmo biológico do feto está diretamente ligado ao da mãe, caso ela seja submetida a uma condição ambiental que dessincronize seu ciclo de sono-vigília, por exemplo, o haverá aumento da produção de cortisol que poderá

chegar ao feto através da membrana placentária e alterar o desenvolvimento do mesmo (Laurent, Stevens, & Ablow, 2011).

O estresse, ou o estado de saída da homeostase, é caracterizado por um conjunto de alterações orgânicas e comportamentais (Lipp, 2003). Uma diversidade de estressores, físicos e psíquicos, é capaz de levar o organismo a este estado, dentre eles alterações do ciclo claro-escuro ambiental, ligadas a alterações do ciclo sono-vigília, como ocorre em pessoas submetidas a turnos alternados de trabalho. Na tentativa de recuperar a homeostase, o organismo passa a contar com um complexo conjunto de eventos endócrinos, neurovegetativos e comportamentais, conjuntamente conhecidos como a resposta ao estresse. Os dois principais sistemas neuroendócrinos ativados são o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o sistema nervoso autônomo (SNA) (Murani et al., 2010).

Quando ativado, o eixo HPA libera glicocorticosteróides na corrente sanguínea. Esta ativação ocorre por meio da síntese e secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelos neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo. Este hormônio estimulará a hipófise anterior produzir o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que promoverá a liberação de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (De Luca et al., 2010). A integração entre o eixo HPA e outros sistemas neuroendócrinos controla a função vascular e a captação de energia, gerando respostas comportamentais adequadas para o retorno da homeostase.

Os glicocorticóides regulam várias funções que visam à manutenção dos processos metabólicos básicos, inclusive ligados a resposta ao estresse e recuperação da homeostase. No homem o principal glicocorticóide é o cortisol e no rato o correspondente é a corticosterona. Comumente os efeitos dos glicocorticóides em adultos são revertidos com a sua normalização na corrente sanguínea. No entanto, quando tal elevação ocorre nas primeiras fases do desenvolvimento, o indivíduo pode sofrer alterações irreversíveis, especialmente em tecidos com elevado grau de plasticidade neural (Belkacemi, Jelks, Chen, Ross, & Desai, 2011). Elevados níveis de glicocorticóides durante a formação do sistema nervoso central (SNC) podem modificar redes neurais e alterar os respectivos comportamentos pelos quais tais estruturas são responsáveis (Laurent et al., 2011).

O estresse, além de ativar o eixo HPA, também ativa o SNA. Esta alteração resulta na liberação de catecolaminas nos terminais sinápticos em órgãos específicos e na medula adrenal para a corrente sanguínea. De tal forma, as catecolaminas, causam várias

modificações nas funções vegetativas, indispensáveis para que o organismo responda de forma satisfatória ao estresse, resolvendo o problema e retornando à homeostase. No estado de alerta ocorrem várias alterações, como aumento da frequência cardíaca, respiratória, pressão arterial, dilatação das pupilas e dos brônquios, além de alterações metabólicas a favor da disponibilização de energia, especialmente para o SNC (Markovic, Cupic, Vukojevic, & Kolar-Anic, 2011).

1.2 Plasticidade do sistema nervoso

As modificações maternas, especialmente as que geram mediadores que atravessam a membrana placentária, têm impacto no SN em desenvolvimento. Durante a gestação a atividade neural é intensa e o SNC mais vulnerável a remodelações. A capacidade de se modificar funcional e estruturalmente frente a estímulos é denominada plasticidade neural e é compreendida como um mecanismo adaptativo do SN, principalmente frente a lesões, condições mutantes e estímulos ambientais, dentre outros (Hamilton et al., 2010).

A primeira vez em que o termo plasticidade foi utilizado nesta área, foi na década de 1930 por Albrecht Bethe, fisiologista alemão, quando foi empregado para explicar a capacidade do organismo em adaptar-se às mudanças ambientais externas e internas, graças à ação sinérgica de diferentes órgãos, coordenados pelo SN (Pia, 1985). Atualmente, o significado foi ampliado e refere-se a uma mudança adaptativa na estrutura e nas funções do SNC, podendo ocorrer em qualquer momento da ontogenia, sendo causada por interação com o meio interno ou externo. As mudanças no comportamento também podem surgir após traumas, intervenções cirúrgicas ou lesões do tecido nervoso (Phelps, 1990).

No entanto, para compreender como todo um sistema pode ser remodelado, se faz necessário compreender o neurônio, suas conexões sinápticas e sua organização nas áreas cerebrais, pois a cada nova experiência, redes neurais são rearranjadas, novas sinapses acontecem e novas respostas ao ambiente podem acontecer. Assim, a capacidade de estruturas neurais se rearranjarem e realizarem, por meios alternativos, uma finalidade que não são suas originalmente, depende não apenas de quanto de tecido foi danificado, mas da quantidade de tecido adjacente que permaneceu intacto, bem como, da idade do sujeito, do tempo e do local da lesão, bem como da natureza da mesma (Albert & Kesselring, 2011).

Três explicações são dadas as alterações celulares que respaldam a plasticidade cerebral e que podem ser a explicação fisiológica para uma reaprendizagem ou um

processo compensatório após lesão do tecido nervoso: 1-brotamento; 2-ativação de sinapses latentes, e 3-supersensitividade de desnervação (Jones & Pons, 1998).

Além de lesões diretas no tecido nervoso, estressores não físicos em fases iniciais do desenvolvimento podem gerar alterações neuroendócrinas e desregulação do eixo HPA, criando uma condição na qual se faz necessária uma regulação do mesmo através de glicocorticoides específicos, capazes de controlar a atividade das células, bem como, causar mudanças nos circuitos correspondentes (Levy & Tasker, 2012).

Contudo, embora o início do desenvolvimento do SN seja o período de maior plasticidade neural, a complexidade de um SNC maduro pode limitar, mas não impedir que estruturas possam ser rearranjadas. Portanto, a capacidade plástica perdura por toda a vida, inclusive na velhice (Stiles, 2000).

1.3 Programação comportamental precoce

O estresse sofrido pela genitora durante a gestação possibilita que o glicocorticóide atravesse a membrana placentária e aja diretamente no desenvolvimento do SNC da prole, como dito anteriormente, e conseqüentemente induza a alteração dos comportamentos pelos quais as estruturas afetadas são responsáveis (Laurent et al., 2011).

Especialmente as experiências negativas afetam diretamente a fisiologia e o comportamento dos sujeitos em diferentes fases da vida, e a exposição a eventos adversos no período gestacional, bem como nutrição inadequada, intervenção medicamentosa e cuidados parentais durante as primeiras fases do desenvolvimento podem acarretar em mudanças no desenvolvimento e em uma programação comportamental tardia (Bustamante et al., 2010; Davis, Glynn, Waffarn, & Sandman, 2011).

Estudos têm demonstrado correlação entre estresse materno e os comportamentos: alimentar, cognitivo, emocional e de adição da prole. Tais alterações incluem baixo peso da prole ao nascer, dificuldades no parto, abortos e nascimentos prematuros, predisposição à dependência química e alcoólica, além de esquizofrenia, as quais serão descritas a seguir. (Khashan et al., 2008; Schulz et al., 2011).

1.3.1 Comportamento alimentar

A ingestão e o metabolismo de nutrientes são influenciados por sistemas neuroendócrinos específicos, como hipotalâmicos e hipocampais, que amadurecem durante o desenvolvimento e são influenciados pelo meio. Portanto, alterações nestes sistemas

neurais podem gerar mudanças no comportamento alimentar (Cambraia, 2004). Dentre os neurotransmissores que controlam este comportamento destacamos o neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo transcrito relacionado à anfetamina e cocaína (CART), pró-ópio-melanocortina (POMC), peptídeo relacionado ao agouti (ArRP) noradrenalina, histamina, acetilcolina, glicina, serotonina e dopamina (Simansky, 1996).

Sistemas diferentes são responsáveis pela sensação de fome e de saciedade, cada sensação é regulada por sinais provenientes do SN, trato gastrintestinal, fígado e sistemas centrais periféricos (Cambraia, 2004). Normalmente, a sensação de fome faz com que alimentos para a ingestão sejam procurados. Após suprir a sensação de fome, em condições normais, surge a sensação de saciedade e a ingestão de alimentos é inibida. Porém, uma vez que um evento caracterizado como estressor é capaz de interferir nos sistemas neuroendócrinos, bem como nos seus produtos. Sendo este sistema ligado à sensação de fome e saciedade, estas podem ser desreguladas, alterando de tal forma o comportamento alimentar do sujeito.

1.3.2 Comportamentos cognitivo e emocional

Cognição significa conhecer ou adquirir conhecimento através de funções superiores como atenção, percepção, memória, raciocínio, juízo, imaginação, pensamento e linguagem. Existem dois tipos principais de cognição: os pensamentos automáticos, aqueles que englobam palavras, ideias, imagens ou lembranças em que se tenha contato frequentemente e surgem espontaneamente sem que exista controle sobre as mesmas. E, as crenças ou esquemas que são atitudes e regras conquistadas durante o desenvolvimento que explicam as respostas do sujeito frente a determinado estímulo (Lotufo Neto & Baltieri, 2001).

A memória é uma das capacidades cognitivas importantes que o animal possui. Ele reconhece um estímulo previamente encontrado, devido ao armazenamento de alguma representação referente a este. Sendo assim, sua sobrevivência está intimamente ligada à capacidade de armazenar informações, evocá-las e compará-las com estímulos futuros. A habilidade de antecipar riscos e oportunidades deve ter levado a um aumento das chances de sobrevivência; assim, aqueles com melhor competência nesta função cognitiva foram selecionados ao longo da evolução (Bueno, 1997).

Existe uma forte conexão entre os processos emocionais, cognitivos e homeostáticos, desta forma, à medida que se explica como se estabelece esta conexão, fica

mais fácil compreender a reação fisiológica do organismo frente as mais distintas situações (Siqueira-Batista, 2007). Embora não seja possível explicar o que é a emoção propriamente dita, o fato de as emoções estarem intimamente ligadas às respostas autônomas, endócrinas e motoras esqueléticas, todas dependentes de áreas subcorticais do sistema nervoso, permite que se explique como ocorrem os aspectos biológicos relacionados à emoção.

O anatomista Joseph Papez determinou um circuito fundamental das emoções, o circuito de Papez que é composto pelas seguintes estruturas: giro do cíngulo, giro parahipocampal, hipotálamo, tálamo e hipocampo. Embora não estejam no circuito de Papez, outras estruturas estão ligadas a este circuito das emoções, sendo elas, amígdala, septo, área pré-frontal e o cerebelo (Eggers, 2007).

As emoções podem estar relacionadas aos sentimentos de prazer e recompensa. Assim somam-se aos circuitos as áreas de recompensa e prazer do SNC. Independente do tipo de emoção as informações chegam ao SN e percorrem um caminho (circuito), estruturas límbicas e paralímbicas, onde são processadas,. Pelo circuito de Papez ou por outras vias chegam ao córtex cerebral responsável por cada tipo de sentimento, a fim darem significado cognitivo às emoções, permitindo que decisões sejam tomadas e ações sejam realizadas (Siqueira-Batista, 2007).

1.3.3 Comportamento de adição ao etanol

A adição ou dependência de drogas é uma doença crônica caracterizada pela compulsão por buscar determinada droga, perder o controle sobre o consumo da mesma e a manifestação de comportamentos emocionais como euforia, ansiedade e irritabilidade quando não há o acesso a droga (Koob, Kenneth Lloyd, & Mason, 2009).

Dois circuitos foram propostos para explicar a motivação em se buscar a droga, os circuitos neurobiológicos envolvidos na desregulação das propriedades de reforço positivo das drogas de abuso e os circuitos neurobiológicos associados ao recrutamento das propriedades reforçadoras negativas das drogas de abuso (Koob & Bloom, 1988).

Os efeitos agudos de reforço das drogas de abuso são mediados pela ativação dos sistemas de dopamina, serotonina, peptídeos opióides e GABA, quer por ação direta no telencéfalo basal ou por ações indiretas na área tegmental ventral (Koob et al., 2009).

O desenvolvimento da adição está relacionado a várias adaptações induzidas por drogas psicoativas, cujo potencial de abuso está relacionado ao controle do funcionamento neurológico, alterando tanto funções quanto estruturas anatômicas dos sistemas de

neurotransmissão GABAérgicos, glutamatérgicos, colinérgicos dopaminérgicos, serotoninérgicos e de peptídeos opióides. Dentre as vias neurais por eles moduladas destacam-se o sistema de recompensa, memória, motivação e autocontrole altamente afetado por modulação dopaminérgica (Tomkins & Sellers, 2001).

Quatro circuitos neurais integrados medeiam os três estágios do processo de adição: desintoxicação fissura ou compulsão e abstinência. O primeiro circuito encontra-se no núcleo accumbens e na parte ventral do globo pálido, modulando o processo de recompensa. O segundo circuito localiza-se dentro do córtex orbitofrontal e do córtex subcaloso e é o principal responsável pela geração de motivação e resposta emocional. O terceiro circuito se encontra na amígdala e no hipocampo e está relacionado à memória e aprendizagem. O último circuito que se localiza no giro do cíngulo anterior e no córtex pré-frontal é responsável pelo controle da cognição e pela função executiva (Volkow, Fowler, Wang, Swanson, & Telang, 2007).

Um método de se avaliar o consumo de etanol é mensurar diariamente a quantidade ingerida voluntariamente pelos animais, quando disponibilizado um recipiente contendo apenas água e outro contendo etanol. Maior consumo de etanol, é considerado como preferência pelo mesmo (McBride & Li, 1998).

1.4 Avaliação comportamental

Para o uso de animais como modelos experimentais é fundamental que os mecanismos patológicos sejam suficientemente similares aos da doença em humanos (Cruz, 1997). De tal forma, esse modelo animal deve permitir a avaliação de fenômenos que possam ser comparados em humanos.

Existem vários modelos animais utilizados para estudar comportamentos semelhantes à ansiedade, depressão, medo e atividade locomotora. No entanto, embora muito utilizados, a relação entre tais modelos e os transtornos de ansiedade em humanos não está totalmente elucidada devido às diferenças comportamentais e principalmente, a falta de verbalização entre humanos e animais (Cruz, 1997). Esta falta de comunicação verbal comum entre homem e animal em estudo gera diferentes interpretações para um mesmo comportamento. Por exemplo, a redução do tempo de imobilidade como indicativo de maior ou menor comportamento de ansiedade. Entretanto, estas diferenças são evidentes quando comparadas à ação de fármacos sobre o comportamento e estudos comportamentais que não fazem uso de medicamentos.

Para avaliação das consequências tardias do estresse gestacional em roedores, podem ser utilizadas para a avaliação da atividade locomotora, assim como, para avaliação de comportamento semelhante à ansiedade, o teste de campo aberto (CA) e o labirinto em cruz elevado (LCE); para avaliação da aprendizagem, formação e retenção de memória, o teste de labirinto aquático de Morris (LAM).

1.4.1 Campo Aberto

O teste de CA é um modelo animal que possibilita registrar comportamentos específicos no animal, como atividade locomotora, exploratória e medo (Cruz, 1997). O aparato consiste em uma área aberta na qual o animal é solto. Comumente é formado por um círculo de fórmica branca com 80 cm de diâmetro e 36 cm de altura cujo fundo do aparelho é dividido em 3 círculos concêntricos, chamados de anéis e subdividido em 24 espaços equivalentes.

O registro da atividade pode ser direto ou indireto, pelo próprio pesquisador ou por programas específicos de computador. Além de se avaliar o comportamento deambulação (números de espaços cruzados pelo animal com as 4 patas, ou, número de quadrantes explorados), podem ser analisados também, comportamentos específicos como: *grooming*, dirigir as patas dianteiras em direção à cabeça, corpo ou aos genitais, limpando-os; *rearing* levantar-se sobre as patas traseiras; defecar e finalmente, o tempo de *freezing*, paralisação, imobilidade, congelamento (Eilam, 2003; Leke et al., 2012).

A literatura afirma que a baixa atividade locomotora e a alta contagem de bolas fecais indicam comportamento de medo do animal. Ratos com medo costumam não se afastar das bordas do aparelho e evitam os comportamentos de *rearing* e *grooming*. Normalmente este tipo de comportamento é típico em ambientes novos, e acontece toda vez que o animal é colocado em um campo aberto desconhecido, porém a tendência é diminuir conforme o animal se acostuma com o ambiente (Cruz, 1997).

1.4.2 Labirinto em cruz elevado

O LCE é um dos modelos animais mais utilizados para estudos e avaliação de comportamentos emocionais relacionados ao medo e à ansiedade. O aparelho consiste em duas superfícies horizontais de madeira com piso de fórmica, medindo 50x10 cm,

justapostas pelas pontas, com bordas de acrílico de 1cm de altura (braços abertos), cruzados em angulo reto com duas superfícies de igual tamanho, circundadas por paredes de 40 cm de altura (braços fechados) exceto na parte central onde os braços se cruzam. Todo o aparato eleva-se a 50 cm do piso.

O LCE foi desenvolvido em 1984 por Handley e Mithani, e recebeu validação fisiológica, farmacológica e comportamental no ano seguinte por Pellow, Chopin, File e Briley. Este modelo recebe destaque na literatura na área da avaliação comportamental, devido à sua fácil utilização (Cruz, 1997).

O comportamento do rato pode ser medido por observação direta do pesquisador ou ainda, pode ser quantificado e avaliado por programas específicos de computadores. Em ambos os casos, deve-se analisar a frequência com que o animal entra nos braços abertos e fechados e contabilizado o tempo de permanência em cada espaço. A atividade locomotora pode ser avaliada, considerando o número de vezes em que o animal entra nos braços fechados e o comportamento semelhante à ansiedade pelo comportamento de *freezing* e o tempo gasto nos braços fechados (Cruz, 1997; Walf & Frye, 2007).

1.4.4 Labirinto aquático de Morris

Este modelo de labirinto aquático foi desenvolvido por Morris em 1981 para estudar a capacidade de memória espacial em ratos. Tal aparelho consiste em uma piscina circular (214 cm de diâmetro por 40 cm de altura) completada até a altura de 25 cm com água, onde se localiza no centro uma plataforma em acrílico transparente, com aproximadamente 8 ou 9 cm de diâmetro e 1 cm abaixo do nível da água. Esta deve ser mantida $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e o observador deve se manter suficientemente afastado para não interferir no experimento. A manipulação consiste em colocar o animal na água com o focinho voltado para a parede da piscina, e após ser liberado, o animal poderá nadar livremente até encontrar a plataforma submersa. O animal deverá subir de forma a evitar sua permanência na água, a avaliação neste teste é feita pela mensuração do tempo de latência do animal para encontrar a plataforma, quanto menor o tempo de latência, melhor a aprendizagem. A retenção da memória adquirida é avaliada pela exposição do animal ao teste por várias vezes, medindo o tempo gasto pelo animal ao longo de cada repetição.

Este procedimento deve ser repetido várias vezes, de forma que o animal diminua o tempo de latência, ou o intervalo de tempo desde sua liberação até o momento em que

sobe na plataforma (Pinel, 2005). O animal faz uso de pistas externas para se localizar e assim encontrar a plataforma escondida no labirinto aquático. Esse modelo tem se mostrado útil na avaliação de memória em ratos, associando-se a lesões específicas no SN, ou sob o efeito de drogas (D'Hooge & De Deyn, 2001; Pinel, 2005; Van Dam, Lenders, & De Deyn, 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Experiências precoces durante o início do desenvolvimento do sistema nervoso podem modificar permanentemente respostas comportamentais e fisiológicas tardias (Seckl & Meaney, 1993). A este fenômeno é dado o nome de programação (Seckl, 2004). De acordo com a plasticidade dos tecidos envolvidos, estes podem ter sua estrutura e funções alteradas em resposta a um estímulo. Assim, o impacto de um evento estressor pode ser diferente de acordo com a sua duração e a fase do desenvolvimento em que ocorreu (Seckl, 1998). As implicações destes conceitos estão presentes na Hipótese de Barker (Barker & Osmond, 1986) e na Hipótese de origem de desenvolvimento da saúde, doença e comportamentos (Van den Bergh, 2011).

A origem fetal das doenças dos adultos, também conhecida como “Hipótese de Barker”, surgiu com base nos estudos de David Barker na década de 1990, ao mostrar que crianças com baixo peso ao nascer têm maior predisposição para o desenvolvimento de doenças cardíacas coronarianas (Barker & Osmond, 1986). Após este estudo, várias pesquisas epidemiológicas e experimentais foram realizadas e deram força à hipótese de Barker, mostrando que a exposição a um conjunto de eventos negativos de diferentes origens, durante a fase gestacional ou nos primeiros períodos do desenvolvimento, podem ter consequências determinantes na saúde do sujeito adulto (Page, Malik, Ripple, & Anday, 2009; Tamashiro & Moran, 2010; White, Purpera, & Morrison, 2009). Inicialmente foram descritos principalmente eventos que incluíam modificações da metilação do DNA e alterações de histonas, como bases biológicas para os eventos observados (Li et al., 2012).

Com base nos estudos sobre teoria da saúde do adulto surgiu a “Hipótese de origem de desenvolvimento da saúde, doença e comportamentos” de Van Den Berg. De acordo com tal hipótese é importante conhecer e ter bem estabelecida a conexão entre o desenvolvimento do SN, a morfofisiologia de seus componentes e os comportamentos pelos quais estes são responsáveis. Esta hipótese trás a perspectiva de prevenir doenças e transtornos (Van den Bergh, 2011). Estes pressupostos podem auxiliar na compreensão da natureza das psicopatologias, na sua prevenção, bem como em possíveis tratamentos.

Frente a eventos estressores, o organismo ativa respostas mediadas pelos sistemas nervoso e endócrino, especialmente o eixo HPA e o SNA, ambos envolvidos na restauração da homeostase frente a uma situação de estresse. Em consequência a ativação

do eixo HPA e do SNA, ocorre liberação hormonal de glicocorticoides e catecolaminas, respectivamente, que geram alterações fisiológicas, comportamentais e cognitivas de resposta ao estresse.

Além da programação precoce, alterações comportamentais podem ocorrer de forma indireta em todas as fases do desenvolvimento, entretanto, comumente de forma transitória. Sabe-se que algumas mudanças no fenótipo, como alterações de massa corporal, marcas na pele, malformação corporal, dentre outras, mesmo que não sejam diretamente ligadas a uma estrutura responsável por um comportamento específico, podem gerar uma condição, em humanos, na qual o sujeito pode estar predisposto a apresentar determinados comportamentos, principalmente por influência do impacto emocional decorrente do convívio e tratamento social.

Vários fatores podem agir durante as fases ontogenéticas iniciais, gestação e período pós-natal precoce, causando modificações estrutural e/ou funcional ligadas a alterações comportamentais tardias. Nesta revisão discutiremos as consequências geradas por estresse gestacional, nutrição materna, fármacos e estimulação neonatal em estudos experimentais com modelos animais e humanos.

2.1 Programação comportamental precoce por estresse gestacional

A gestação é o período em que os comportamentos e hábitos maternos podem ter impacto no desenvolvimento do feto por meio de substâncias que ultrapassam a membrana placentária e agem sobre os tecidos em desenvolvimento. Por exemplo, a elevação de cortisol materno em condições de estresse pode afetar o desenvolvimento do SN dependendo especialmente da fase gestacional, da quantidade e tempo de exposição ao hormônio. Dentre os modelos de estresse gestacional em roedores apresentados na literatura estão os que utilizam imobilização do animal, nado forçado, variação térmica, privação de sono e alimento, superlotação do ambiente e alteração do ciclo claro-escuro ambiental.

O estresse crônico por imobilização materna em roedores, por tempo e em períodos variados da gestação, gera alterações na prole. A imobilidade por 6 horas diárias nas duas últimas semanas de gestação em camundongos é capaz de reduzir o número de receptores para glicocorticoides em áreas específicas do hipocampo e, conseqüentemente, causar déficit de aprendizagem e memória espacial, além de afetar o peso da prole (Son et al.,

2006). O impacto para a prole também ocorre em ratos, sendo que ratas imobilizadas em três sessões diárias de 45 minutos cada na última semana de gestação geram alterações nos perfis endócrinos, cognitivos e neuroquímicos de suas proles (Bowman et al., 2004). A imobilização por 90 minutos diários nos últimos quatro dias de gestação, também em ratas, repercute em déficit de memória espacial e não espacial, de curto e longo prazo em proles juvenis de ambos os sexos (Meunier, Gue, Recasens, & Maurice, 2004).

Quando utilizados seis tipos de estresse randomizados diariamente durante a última semana de gestação (1- imobilização; 2- exposição à baixa temperatura; 3- privação de comida durante a noite; 4- privação de sono durante 90 minutos da fase clara do ciclo; 5- 15 min de nado forçado; 6- estresse social por superlotação da caixa de criação durante a fase escura do ciclo); as proles apresentaram aumento da atividade locomotora, redução da capacidade de reconhecimento, de aprendizagem, formação e consolidação da memória (Markham, Taylor, Taylor, Bell, & Koenig, 2010).

Com relação a modelos de estresse ambiental envolvendo alterações no ritmo circadiano dos roedores, Varcoe e colaboradores, mostraram que quando o ciclo claro-escuro das genitoras foi alterado cronicamente a cada três dias durante toda a gestação, as proles do sexo masculino apresentaram aumento do comportamento alimentar, tecido adiposo, níveis séricos de leptina e insulina e baixa tolerância à glicose (Varcoe, Wight, Voultios, Salkeld, & Kennaway, 2011). Em modelo de estresse por exposição à luz forte três vezes por dia durante os últimos dez dias de gestação, houve consequências comportamentais sexualmente dimórficas nas proles, aumentando o comportamento de ansiedade dos machos e reduzindo a expressão destes comportamentos nas fêmeas, avaliados em labirinto em cruz elevado (Zuena et al., 2008).

Com base nos estudos revisados, observa-se que o estresse gestacional e, possivelmente, a corticosterona gerada por este estresse em roedores, é, em conjunto com outros fatores, capaz de alterar comportamentos alimentares, emocionais, locomotores e cognitivos das proles.

2.2 Programação comportamental por fatores nutricionais

A saúde materna e seu estado nutricional influenciam severamente a maneira como o feto se desenvolve e as consequências podem ser transitórias ou de longo prazo, afetando vias centrais críticas, incluindo o sistema melanocortinérgico, serotoninérgico e/ou

dopaminérgicos, por isto, a alimentação materna deve ser equilibrada, tanto para manter uma gestação saudável, quanto para o bom desenvolvimento fetal (Sullivan, Smith, & Grove, 2011). Uma alimentação saudável deve conter quantidades adequadas de nutrientes, uma vez que danos ao organismo podem ser causados tanto pela falta quanto pelo excesso destes.

Visto que a gestação requer uma dieta apropriada e todos os nutrientes têm sua importância tanto para a genitora quanto para a prole, a deficiência de algum destes nutrientes durante este período pode acarretar em uma série de alterações morfológicas e funcionais do sistema nervoso. A deficiência de tiamina (vitamina B1) durante a gestação, por exemplo, pode acarretar em atrofia e morte das células do hipocampo, o que gera redução da capacidade de aprendizado e memória, aumento na concentração de GABA no tálamo e diminuição de glutamato no cerebelo o que tem como consequência, déficit da capacidade motora (Gaspard, Remiche, David, Ligot, & Legros, 2011).

Adicionalmente, a capacidade motora também pode ser afetada pela escassez de cobalamina ou cianocobalamina (vitamina B12) na dieta, devido à desmielinização dos neurônios que formam a medula espinal.

A deficiência de ácido fólico (vitamina B9) está ligada à má formação do sistema nervoso, principalmente do tubo neural. Em humanos adultos, devido à influência na formação do SNC, a falta de cobalamina e ácido fólico pode agravar problemas neuropsiquiátricos (Halicioglu et al., 2011).

Além da carência nutricional, outros problemas como dietas hipercalóricas e hipocalóricas trazem danos ao desenvolvimento nervoso e conseqüentemente, possíveis programações comportamentais. Estudos utilizando modelos animais indicam que dietas hipercalóricas durante o período gestacional aumentam o risco de a prole desenvolver transtornos alimentares e alterações de comportamentos, bem como, depressão, ansiedade, déficit de atenção e hiperatividade. Esta associação pode ser explicada pela alteração de vias que regulam o humor e o comportamento, tal como a via serotoninérgica. Estudos em roedores mostraram que uma dieta rica em gordura *trans* ou saturada durante a gestação e lactação aumenta a ansiedade e reduz a capacidade de aprendizagem espacial (Bilbo & Tsang, 2010).

Sabe-se ainda que, em mamíferos, o hipotálamo, bem como todo o sistema controlador da alimentação tem sua formação principalmente durante o período gestacional. Assim, estudos utilizando supernutrição materna induzida por dieta

hipercalórica levaram a prole a exibir alterações no desenvolvimento do sistema melanocortina hipotalâmico, o que pode interferir no comportamento e preferência alimentar e gerar quadros de hiperfagia (Bilbo & Tsang, 2010).

Como dito anteriormente, a desnutrição protéica total no período pré-natal também pode afetar o desenvolvimento do SNC, podendo reduzir sua plasticidade e causar déficits cognitivos, como na memória e aprendizagem e alterar comportamentais que podem perdurar por toda a vida. Estudos com humanos apresentaram um quadro de alteração nos níveis de neurotransmissores excitatórios (glutamato) e inibitórios (GABA) em crianças desnutridas, o que pode ter ocorrido pela baixa ingestão de aminoácido e seus precursores ou ainda, pela depleção de neurônios gabaérgicos no hipocampo e giro denteado (Andrade & Paula-Barbosa, 1996).

É importante ressaltar que assim como em outros animais, em humanos as primeiras fases da vida do bebê são fundamentais para que ele se desenvolva de forma saudável. Quando alterada a morfologia e/ou função de alguma parte do organismo, o indivíduo pode sofrer as consequências tardiamente, seja por ter comportamentos possivelmente programados, ou ainda por deficiências decorrentes da nutrição inadequada, bem como, o impacto emocional consequente de fenótipos adquiridos em consequência das mesmas.

2.3 Programação comportamental precoce por fármacos

Muitos medicamentos trazem consigo além da ação benéfica esperada algumas reações adversas, nem sempre estas reações se manifestam claramente, no entanto é sabido que alguns remédios têm ação teratogênica principalmente na organogênese, tanto que o uso de qualquer droga deve ser imediatamente informado ao médico em caso de gravidez (Knoppert, 2011). Tal cuidado se deve ao fato de alguns medicamentos serem constituídos por substâncias transplacentárias com ação no SN em desenvolvimento, sendo capazes de modificar estruturas neurais, bem como as funções as quais são responsáveis das mesmas.

Um estudo no qual foi aplicado em ratas prenhas o fármaco 1,4,6-androstatrieno-3, 17-diona (ATD), que bloqueia a conversão de testosterona em estradiol, mostrou que as proles de machos tiveram redução do comportamento sexual (Morales-Otal, Olayo-Lortia, Fernandez-Soto, Velazquez-Moctezuma, & Ferreira-Nuno, 2010).

No tratamento de ansiedade é muito comum a prescrição de fluoxetina, mesmo durante a gravidez. No entanto, um estudo com ratos mostrou que o uso de 5 mg/kg por dia deste medicamento durante a prenhes de ratas foi o suficiente para aumentar comportamentos semelhantes à depressão e reduzir o número de células do hipocampo da prole na adolescência (Rayen, van den Hove, Prickaerts, Steinbusch, & Pawluski, 2011). Outro estudo mostrando o uso de haloperidol durante a gestação mostrou redução no comportamento de cuidados das genitoras, o que conseqüentemente, pode acarretar em mudanças no comportamento das proles (Dobryakova, Dubynin, & Luijtelaar, 2011). Em um estudo no qual ratas prenhas receberam injeções de lipossacarídeos, mimetizando uma infecção bacteriana, houve redução em longo prazo de receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos, bem como, alterações neurofisiológicas, aumento de ansiedade e respostas de estresse (Lin, Lin, & Wang, 2012).

Estudos em humanos têm mostrado que a intensidade dos efeitos dos fármacos é maior no primeiro trimestre da gestação, pois este é um período de alto desenvolvimento e diferenciação de tecidos, sendo que a presença de substâncias químicas pode interferir e alterar negativamente estes processos (Vojtech et al., 2011).

Alguns medicamentos podem causar prejuízo nos processos fisiológicos necessários à manutenção do bem-estar fetal, como as drogas que alteram o fluxo sanguíneo placentário e podem reduzir o fluxo de nutrientes e oxigênio aos tecidos, ou ainda, alterar a intensidade das contrações, bem como, agir diretamente no desenvolvimento do SNC. Sabe-se que, em mamíferos as redes neurais continuam se formando após o nascimento e, em humanos isso ocorre principalmente durante todo o primeiro ano de vida da criança. Assim, fármacos administrados neste período, inclusive via leite materno, podem prejudicar o desenvolvimento nervoso e causar anormalidades comportamentais da mesma (Morrison, Riggs, & Rurak, 2005; Simpson et al., 2011), especialmente se considerada a imaturidade de metabolização hepática e renal do recém-nascido (Merino-Ibarra & Delgado Beltran, 2011).

2.4 Programação comportamental por estimulação neonatal e cuidados parentais

Como dito anteriormente, o SNC dos ratos não está completamente estruturado após o nascimento, assim ele é sensível frente transformações ambientais na fase neonatal (Padoin, Cadore, Gomes, Barros, & Lucion, 2001). É nesta fase também que ocorrem os

primeiros contatos e relações sociais, seja por parte da mãe em humanos, da genitora, ou ainda pelo experimentador no caso de animais experimentais. Em ambas as situações as consequências do contato nesta fase podem perdurar por toda a vida (Francis & Meaney, 1999)

Estudos mostram que animais recém-nascidos submetidos a estresse como frio ou choques no primeiro dia pós-natal, apresentam baixa ou nenhuma ativação do eixo HPA quando comparados aos adultos. Este período foi denominado período hiporresponsivo ao estresse. Após dois dias de vida, ratos apresentaram respostas ao calor, mas mantiveram-se inertes aos choques e aos nove dias de vida não apresentaram respostas significativas quando comparadas aos níveis basais. Somente após 15 dias de vida os animais passaram a responder ao estresse (Zarrow, Haltmeyer, Denenberg, & Thatcher, 1966).

Walker e colaboradores observaram que, em resposta a um estresse leve, há uma rápida transcrição do gene CRH no hipotálamo de roedores entre seis e doze dias de vida, ou seja, no período hiporresponsivo ao estresse. O fato do animal apresentar resposta endócrina ao evento estressor, indica que os mesmos tiveram resposta de CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo (Dent, Smith, & Levine, 2000). Estudos com animais adrenalectomizados durante o período hiporresponsivo responderam a um agente estressor com um aumento significativo de ACTH, indicando que a baixa ativação do eixo HPA se deve a um *feedback* negativo aumentado de corticosterona (Walker, Scribner, Cascio, & Dallman, 1991).

A estimulação neonatal é utilizada desde a década de 1970 em estudos que vão desde manipular animais recém-nascidos com as mãos ou modelos mais invasivos como os já citados, que envolvem choques, baixas temperaturas e substâncias químicas. Estudos mostram que esta manipulação na prole fará com que as genitoras reajam imediatamente, assim, combinando estímulos ambientais com o comportamento materno, comportamentos adultos da prole podem ser modificados (Dent et al., 2000; Walker et al., 1991; Zarrow et al., 1966). Tal fato pode ser explicado pelo aumento de ACTH e corticosterona consequentes da privação materna. No entanto, foi observado que escovando a região anogenital dos animais que foram afastados periodicamente de suas genitoras, a resposta é revertida, uma vez que este procedimento mimetiza o comportamento materno de lambida sua prole (van Oers, de Kloet, Whelan, & Levine, 1998).

O aumento do comportamento de lambida das genitoras roedoras é um estímulo motor que pode influenciar o desenvolvimento de machos e fêmeas adultos, inclusive o

comportamento sexual. Estudos mostram que filhotes fêmeas que recebem mais lambidas de suas genitoras, também tendem a ficar mais com suas ninhadas quando se tornam mães, os machos, por sua vez, copulam menos (Moore & Power, 1992).

A alteração no tempo de resposta ao estresse por animais manipulados precocemente, bem como as alterações comportamentais devido ao cuidado materno nas primeiras fases do desenvolvimento ocorrem, dentre outros fatores, porque ao nascer nem todos os sistemas neurais estão integralmente concluídos e os primeiros dias de vida são cruciais para a plena formação dos mesmos (Francis & Meaney, 1999). Em roedores, até aproximadamente se completarem duas semanas de vida os animais apresentam o eixo HPA imaturo, incapazes de responder adequadamente a estímulos estressantes, assim a relação com a mãe se faz necessária, pois estimula respostas fisiológicas da prole como manutenção dos níveis de hormônio de crescimento, frequência cardíaca e, caso a relação genitora-prole se dê de forma irregular, pode gerar consequências comportamentais negativas (Meaney, Szyf, & Seckl, 2007). E prejudicar inclusive, a produção de oxitocina; que além de ajudar nas contrações do parto e na liberação de leite para amamentação, também é responsável pela sensação de prazer materno no contato com a prole.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar os impactos tardios do estresse gestacional por inversão periódica do ciclo claro-escuro sobre o repertório comportamental e a vulnerabilidade ao consumo de etanol em ratos adultos.

3.2 Específicos

Avaliar nas proles adultas o efeito do estresse gestacional por inversão do ciclo claro-escuro sobre:

- 3.2.1. comportamento cognitivo e exploratório;
- 3.2.2. comportamento emocional;
- 3.2.3. atividade locomotora e reações comportamentais específicas;
- 3.2.4. capacidade de aprendizagem, formação e retenção de memória,
- 3.2.5. vulnerabilidade e preferência ao consumo de etanol.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, S. J., & Kesselring, J. (2011). Neurorehabilitation of stroke. *J Neurol*. doi: 10.1007/s00415-011-6247-y
- Anaclet, C., Pedersen, N. P., Fuller, P. M., & Lu, J. (2010). Brainstem circuitry regulating phasic activation of trigeminal motoneurons during REM sleep. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *PLoS One*, 5(1), e8788. doi: 10.1371/journal.pone.0008788
- Andrade, J. P., & Paula-Barbosa, M. M. (1996). Protein malnutrition alters the cholinergic and GABAergic systems of the hippocampal formation of the adult rat: an immunocytochemical study. *Neurosci Lett*, 211(3), 211-215. doi: 0304394096127348 [pii]
- Atkinson, G., & Reilly, T. (1996). Circadian variation in sports performance. [Review]. *Sports Med*, 21(4), 292-312.
- Barker, D. J., & Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, 1(8489), 1077-1081. doi: S0140-6736(86)91340-1 [pii]
- Belkacemi, L., Jelks, A., Chen, C. H., Ross, M. G., & Desai, M. (2011). Altered placental development in undernourished rats: role of maternal glucocorticoids. *Reprod Biol Endocrinol*, 9(1), 105. doi: 1477-7827-9-105 [pii]
10.1186/1477-7827-9-105
- Bilbo, S. D., & Tsang, V. (2010). Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *FASEB J*, 24(6), 2104-2115. doi: fj.09-144014 [pii]
10.1096/fj.09-144014
- Bowman, R. E., MacLusky, N. J., Sarmiento, Y., Frankfurt, M., Gordon, M., & Luine, V. N. (2004). Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology*, 145(8), 3778-3787. doi: 10.1210/en.2003-1759
en.2003-1759 [pii]

- Brunton, P. J., & Russell, J. A. (2010). Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects. *J Neuroendocrinol*, 22(4), 258-271. doi: JNE1969 [pii] 10.1111/j.1365-2826.2010.01969.x
- Bueno, J. L. O. (1997). O Imaginário Animal. *Revista de Psicologia USP*, 8(2).
- Bustamante, C., Bilbao, P., Contreras, W., Martinez, M., Mendoza, A., Reyes, A., & Pascual, R. (2010). Effects of prenatal stress and exercise on dentate granule cells maturation and spatial memory in adolescent mice. *Int J Dev Neurosci*, 28(7), 605-609. doi: S0736-5748(10)00345-X [pii] 10.1016/j.ijdevneu.2010.07.229
- Cabraia, R. P. B. (2004). Aspectos psicobiológicos do comportamento alimentar. *Revista de Nutrição*, 17(2).
- Castagne, V., Moser, P., Roux, S., & Porsolt, R. D. (2011). Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci, Chapter 8, Unit 8 10A*. doi: 10.1002/0471142301.ns0810as55
- Cruz, A. P. M. Z., H.; Graeff, F.G.; Landeira-Fernandez, J. (1997). *Modelos Animais de Ansiedade: Implicações para a seleção de drogas ansiolíticas*. (278 ed. Vol. 13).
- D'Hooze, R., & De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev*, 36(1), 60-90. doi: S0165017301000674 [pii]
- Davis, E. P., Glynn, L. M., Waffarn, F., & Sandman, C. A. (2011). Prenatal maternal stress programs infant stress regulation. *J Child Psychol Psychiatry*, 52(2), 119-129. doi: 10.1111/j.1469-7610.2010.02314.x
- De Luca, V., Tharmalingam, S., Zai, C., Potapova, N., Strauss, J., Vincent, J., & Kennedy, J. L. (2010). Association of HPA axis genes with suicidal behaviour in schizophrenia. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Psychopharmacol*, 24(5), 677-682. doi: 10.1177/0269881108097817
- Dent, G. W., Smith, M. A., & Levine, S. (2000). Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Endocrinology*, 141(5), 1593-1598.
- Dobryakova, Y. V., Dubynin, V. A., & Luijtelar, G. (2011). The effect of haloperidol on maternal behavior in WAG/Rij rats and its consequences in the offspring. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 71(3), 339-347. doi: 7140 [pii]

- Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Biol Psychiatry*, *59*(12), 1116-1127. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.02.013
- Eggers, A. E. (2007). Redrawing Papez' circuit: a theory about how acute stress becomes chronic and causes disease. *Med Hypotheses*, *69*(4), 852-857. doi: S0306-9877(07)00146-6 [pii] 10.1016/j.mehy.2007.01.074
- Eilam, D. (2003). Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behav Brain Res*, *142*(1-2), 53-62. doi: S0166432802003820 [pii]
- Eriksen, M. S., Faerevik, G., Kittilsen, S., McCormick, M. I., Damsgard, B., Braithwaite, V. A., . . . Bakken, M. (2011). Stressed mothers - troubled offspring: a study of behavioural maternal effects in farmed *Salmo salar*. *J Fish Biol*, *79*(3), 575-586. doi: 10.1111/j.1095-8649.2011.03036.x
- Francis, D. D., & Meaney, M. J. (1999). Maternal care and the development of stress responses. [Review]. *Curr Opin Neurobiol*, *9*(1), 128-134.
- Gaspard, N., Remiche, G., David, P., Ligot, N., & Legros, B. (2011). Subacute gestational neuropathy: role of thiamine deficiency. [Case Reports]. *Acta Neurol Belg*, *111*(4), 349-352.
- Halicioglu, O., Asik Akman, S., Sutcuoglu, S., Atabay, B., Turker, M., Akbay, S., & Yaprak, I. (2011). Nutritional B(1)(2) deficiency in infants of vitamin B(1)(2)-deficient mothers. *Int J Vitam Nutr Res*, *81*(5), 328-334. doi: 10.1024/0300-9831/a000080
- Hamilton, D. A., Akers, K. G., Rice, J. P., Johnson, T. E., Candelaria-Cook, F. T., Maes, L. I., . . . Savage, D. D. (2010). Prenatal exposure to moderate levels of ethanol alters social behavior in adult rats: relationship to structural plasticity and immediate early gene expression in frontal cortex. *Behav Brain Res*, *207*(2), 290-304. doi: S0166-4328(09)00606-8 [pii] 10.1016/j.bbr.2009.10.012
- Jones, E. G., & Pons, T. P. (1998). Thalamic and brainstem contributions to large-scale plasticity of primate somatosensory cortex. *Science*, *282*(5391), 1121-1125.
- Khashan, A. S., Abel, K. M., McNamee, R., Pedersen, M. G., Webb, R. T., Baker, P. N., . . . Mortensen, P. B. (2008). Higher risk of offspring schizophrenia following

- antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch Gen Psychiatry*, 65(2), 146-152. doi: 65/2/146 [pii]
10.1001/archgenpsychiatry.2007.20
- Knoppert, D. (2011). Safety and efficacy of drugs in pregnancy. *J Popul Ther Clin Pharmacol*, 18(3), e506-512.
- Koob, G. F., & Bloom, F. E. (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*, 242(4879), 715-723.
- Koob, G. F., Kenneth Lloyd, G., & Mason, B. J. (2009). Development of pharmacotherapies for drug addiction: a Rosetta stone approach. *Nat Rev Drug Discov*, 8(6), 500-515. doi: nrd2828 [pii]
10.1038/nrd2828
- Kranendonk, G., Van der Mheen, H., Fillerup, M., & Hopster, H. (2007). Social rank of pregnant sows affects their body weight gain and behavior and performance of the offspring. *J Anim Sci*, 85(2), 420-429. doi: 85/2/420 [pii]
10.2527/jas.2006-074
- Laurent, H. K., Stevens, A., & Ablow, J. C. (2011). Neural correlates of hypothalamic-pituitary-adrenal regulation of mothers with their infants. [Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Biol Psychiatry*, 70(9), 826-832. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.06.011
- Leke, R., de Oliveira, D. L., Mussulini, B. H., Pereira, M. S., Kazlauckas, V., Mazzini, G., . . . Portela, L. V. (2012). Impairment of the organization of locomotor and exploratory behaviors in bile duct-ligated rats. *PLoS One*, 7(5), e36322. doi: 10.1371/journal.pone.0036322
PONE-D-11-25136 [pii]
- Levy, B. H., & Tasker, J. G. (2012). Synaptic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress. *Front Cell Neurosci*, 6, 24. doi: 10.3389/fncel.2012.00024
- Li, J., Harris, R. A., Cheung, S. W., Coarfa, C., Jeong, M., Goodell, M. A., . . . Milosavljevic, A. (2012). Genomic hypomethylation in the human germline associates with selective structural mutability in the human genome. *PLoS Genet*, 8(5), e1002692. doi: 10.1371/journal.pgen.1002692

PGENETICS-D-11-02019 [pii]

- Lin, Y. L., Lin, S. Y., & Wang, S. (2012). Prenatal lipopolysaccharide exposure increases anxiety-like behaviors and enhances stress-induced corticosterone responses in adult rats. *Brain Behav Immun*, 26(3), 459-468. doi: S0889-1591(11)00604-0 [pii] 10.1016/j.bbi.2011.12.003
- Lipp, M. E. N. (2003). O modelo quadrifásico do stress. *Mecanismos neuropsicofisiológicos do stress: teoria e aplicações clínicas* 4.
- Lotufo Neto, F., & Baltieri, M. A. (2001). Processos cognitivos e seu tratamento no transtorno obsessivo-compulsivo. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 23(2), 3.
- Maganhin, C. (2008). Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. *Revista Associação Médica Brasileira*, 54(3).
- Marciniak, B., Patro-Malysza, J., Poniedzialek-Czajkowska, E., Kimber-Trojnar, Z., Leszczynska-Gorzela, B., & Oleszczuk, J. (2011). Glucocorticoids in pregnancy. *Curr Pharm Biotechnol*, 12(5), 750-757. doi: BSP/CPB/E-Pub/00090-12-8 [pii]
- Markham, J. A., Taylor, A. R., Taylor, S. B., Bell, D. B., & Koenig, J. I. (2010). Characterization of the cognitive impairments induced by prenatal exposure to stress in the rat. *Front Behav Neurosci*, 4, 173. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00173
- Markovic, V. M., Cupic, Z., Vukojevic, V., & Kolar-Anic, L. (2011). Predictive modeling of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis response to acute and chronic stress. *Endocr J*. doi: JST.JSTAGE/endocrj/EJ11-0037 [pii]
- McBride, W. J., & Li, T. K. (1998). Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Crit Rev Neurobiol*, 12(4), 339-369.
- Meaney, M. J., Szyf, M., & Seckl, J. R. (2007). Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends Mol Med*, 13(7), 269-277. doi: S1471-4914(07)00087-1 [pii] 10.1016/j.molmed.2007.05.003
- Menna-Barreto, L., & Wey, D. (2007). Ontogênese do sistema de temporização: a construção e as reformas dos ritmos biológicos ao longo da vida humana. *Revista de Psicologia USP*, 18(2), 20.
- Merino-Ibarra, E., & Delgado Beltran, C. (2011). [Rheumatoid arthritis: how to use drugs during pregnancy and lactation?]. [Review]. *Reumatol Clin*, 7(4), 262-266. doi: 10.1016/j.reuma.2010.11.017

- Meunier, J., Gue, M., Recasens, M., & Maurice, T. (2004). Attenuation by a sigma1 (sigma1) receptor agonist of the learning and memory deficits induced by a prenatal restraint stress in juvenile rats. *Br J Pharmacol*, *142*(4), 689-700. doi: 10.1038/sj.bjp.0705835
0705835 [pii]
- Moore, C. L., & Power, K. L. (1992). Variation in maternal care and individual differences in play, exploration, and grooming of juvenile Norway rat offspring. [Comparative Study
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]
- Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Dev Psychobiol*, *25*(3), 165-182. doi: 10.1002/dev.420250303
- Morales-Otal, A., Olayo-Lortia, J., Fernandez-Soto, C., Velazquez-Moctezuma, J., & Ferreira-Nuno, A. (2010). The mild stress of chronic prenatal injections may have additive effects on drugs administered during pregnancy to alter brain sexual differentiation. *Neuro Endocrinol Lett*, *31*(5), 708-716. doi: NEL310510A15 [pii]
- Morrison, J. L., Riggs, K. W., & Rurak, D. W. (2005). Fluoxetine during pregnancy: impact on fetal development. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Review]. *Reprod Fertil Dev*, *17*(6), 641-650.
- Murani, E., Ponsuksili, S., D'Eath, R. B., Turner, S. P., Kurt, E., Evans, G., . . . Wimmers, K. (2010). Association of HPA axis-related genetic variation with stress reactivity and aggressive behaviour in pigs. *BMC Genet*, *11*, 74. doi: 1471-2156-11-74 [pii]
10.1186/1471-2156-11-74
- Padoin, M. J., Cadore, L. P., Gomes, C. M., Barros, H. M., & Lucion, A. B. (2001). Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Behav Neurosci*, *115*(6), 1332-1340.
- Page, K. C., Malik, R. E., Ripple, J. A., & Anday, E. K. (2009). Maternal and postweaning diet interaction alters hypothalamic gene expression and modulates response to a high-fat diet in male offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *297*(4), R1049-1057. doi: 90585.2008 [pii]
10.1152/ajpregu.90585.2008
- Phelps, C. H. (1990). Neural plasticity in aging and Alzheimer's disease: some selected comments. *Prog Brain Res*, *86*, 3-9.

- Pia, H. W. (1985). Plasticity of the central nervous system--a neurosurgeon's experience of cerebral compensation and decompensation. *Acta Neurochir (Wien)*, 77(3-4), 81-102.
- Pinel, J. P. J. (2005). *Tratado de Biopsicologia* (5 ed.). Porto Alegre: Artmed.
- Rayen, I., van den Hove, D. L., Prickaerts, J., Steinbusch, H. W., & Pawluski, J. L. (2011). Fluoxetine during development reverses the effects of prenatal stress on depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis in adolescence. *PLoS One*, 6(9), e24003. doi: 10.1371/journal.pone.0024003
- PONE-D-11-05904 [pii]
- Remmers, F., & Delemarre-van de Waal, H. A. (2011). Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocr Rev*, 32(2), 272-311. doi: er.2009-0028 [pii]
- 10.1210/er.2009-0028
- Sadeh, A., Raviv, A., & Gruber, R. (2000). Sleep patterns and sleep disruptions in school-age children. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Dev Psychol*, 36(3), 291-301.
- Schulz, K. M., Pearson, J. N., Neeley, E. W., Berger, R., Leonard, S., Adams, C. E., & Stevens, K. E. (2011). Maternal stress during pregnancy causes sex-specific alterations in offspring memory performance, social interactions, indices of anxiety, and body mass. *Physiol Behav*, 104(2), 340-347. doi: S0031-9384(11)00085-0 [pii]
- 10.1016/j.physbeh.2011.02.021
- Seckl, J. R. (1998). Physiologic programming of the fetus. *Clin Perinatol*, 25(4), 939-962, vii.
- Seckl, J. R. (2004). Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol*, 151 Suppl 3, U49-62.
- Seckl, J. R., & Meaney, M. J. (1993). Early life events and later development of ischaemic heart disease. *Lancet*, 342(8881), 1236.
- Simansky, K. J. (1996). Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res*, 73(1-2), 37-42.
- Simpson, K. L., Weaver, K. J., de Villiers-Sidani, E., Lu, J. Y., Cai, Z., Pang, Y., . . . Lin, R. C. (2011). Perinatal antidepressant exposure alters cortical network function in rodents. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(45), 18465-18470. doi: 10.1073/pnas.1109353108
- Siqueira-Batista, R. (2007). Neurobiologia das emoções. *Rev. de Psiquiatria Clínica*.

- Son, G. H., Geum, D., Chung, S., Kim, E. J., Jo, J. H., Kim, C. M., . . . Kim, K. (2006). Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *J Neurosci*, *26*(12), 3309-3318. doi: 26/12/3309 [pii]
10.1523/JNEUROSCI.3850-05.2006
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, *85*(3), 367-370.
- Stiles, J. (2000). Neural plasticity and cognitive development. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Dev Neuropsychol*, *18*(2), 237-272. doi: 10.1207/S15326942DN1802_5
- Sullivan, E. L., Smith, M. S., & Grove, K. L. (2011). Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology*, *93*(1), 1-8. doi: 000322038 [pii]
10.1159/000322038
- Tamashiro, K. L., & Moran, T. H. (2010). Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. *Physiol Behav*, *100*(5), 560-566. doi: S0031-9384(10)00166-6 [pii]
10.1016/j.physbeh.2010.04.008
- Tomkins, D. M., & Sellers, E. M. (2001). Addiction and the brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence. *CMAJ*, *164*(6), 817-821.
- Van Dam, D., Lenders, G., & De Deyn, P. P. (2006). Effect of Morris water maze diameter on visual-spatial learning in different mouse strains. *Neurobiol Learn Mem*, *85*(2), 164-172. doi: S1074-7427(05)00106-1 [pii]
10.1016/j.nlm.2005.09.006
- Van den Bergh, B. R. (2011). Developmental programming of early brain and behaviour development and mental health: a conceptual framework. *Dev Med Child Neurol*, *53 Suppl 4*, 19-23. doi: 10.1111/j.1469-8749.2011.04057.x
- van Oers, H. J., de Kloet, E. R., Whelan, T., & Levine, S. (1998). Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Neurosci*, *18*(23), 10171-10179.

- Varcoe, T. J., Wight, N., Voultios, A., Salkeld, M. D., & Kennaway, D. J. (2011). Chronic phase shifts of the photoperiod throughout pregnancy programs glucose intolerance and insulin resistance in the rat. *PLoS One*, 6(4), e18504. doi: 10.1371/journal.pone.0018504
- Vojtech, J., Krofta, L., Urbankova, I., Dlouha, K., Haakova, L., & Feyereisl, J. (2011). [Ultrasound imaging of normal fetal central nervous system at 8 to 12 weeks of gestation]. *Ceska Gynecol*, 76(6), 446-449.
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Swanson, J. M., & Telang, F. (2007). Dopamine in drug abuse and addiction: results of imaging studies and treatment implications. *Arch Neurol*, 64(11), 1575-1579. doi: 64/11/1575 [pii] 10.1001/archneur.64.11.1575
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*, 2(2), 322-328. doi: nprot.2007.44 [pii] 10.1038/nprot.2007.44
- Walker, C. D., Scribner, K. A., Cascio, C. S., & Dallman, M. F. (1991). The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Endocrinology*, 128(3), 1385-1395.
- White, C. L., Purpera, M. N., & Morrison, C. D. (2009). Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296(5), R1464-1472. doi: 91015.2008 [pii] 10.1152/ajpregu.91015.2008
- Yu, H. L., Deng, X. Q., Li, Y. J., Li, Y. C., Quan, Z. S., & Sun, X. Y. (2011). N-palmitoylethanolamide, an endocannabinoid, exhibits antidepressant effects in the forced swim test and the tail suspension test in mice. *Pharmacol Rep*, 63(3), 834-839.
- Zarrow, M. X., Haltmeyer, G. C., Denenberg, V. H., & Thatcher, J. (1966). Response of the infantile rat to stress. *Endocrinology*, 79(3), 631-634.
- Zhou, X., & Li, L. (2011). [Prenatal anxiety and its influence on delivery outcome]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 36(8), 803-808. doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2011.08.020

Zuena, A. R., Mairesse, J., Casolini, P., Cinque, C., Alema, G. S., Morley-Fletcher, S., . . . Maccari, S. (2008). Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. *PLoS One*, 3(5), e2170. doi: 10.1371/journal.pone.0002170

Anexo 1: Artigo científico 1

**EARLY BEHAVIOR PROGRAMMING BY LIGHT-DARK CYCLE INVERSION
DURING PREGNANCY IN RAT**

¹Elaine Lucas dos Santos, ²Annye de Picoli Souza, ³Adriana Cristine Fonseca Mozzambani, ³João Bosco Pesquero, ^{1,2}Edson Lucas dos Santos, e ^{1,2}Kely de Picoli Souza

¹Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, ²Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, ³Universidade Federal de São Paulo, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, 79804-970, Dourados, MS, Brasil.

Running title: Behavior programming by light-dark cycle inversion

Corresponding author:

Kely de Picoli Souza, Ph.D

Professor-adjunto.

⁴Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, 79804-970, Dourados, MS, Brasil;

FONE/FAX: (55) 67 3410-2210

e-mail: kelypicoli@ufgd.edu.br

Abstract

Nervous system is continually shaped by the subject's interaction to environment. High neural plasticity during gestation makes it vulnerable to possible refurbishments. In this study, were evaluated the effects of periodic light-dark cycle inversion during pregnancy on locomotor, anxiety-like behaviors and cognitive development of offspring during adulthood. Female rats were placed for mating and on the first day of confirmed pregnancy they were separated into two groups: control dams (CD), maintained to standard light cycle, and stress dams (SD) submitted to periodic inversion of the pattern light cycle at every four days throughout all gestation. On postnatal first day, dams were evaluated in the open field (OF) and elevated plus maze (EPM) tests. The offspring of both genders were evaluated in adulthood, between 8 and 13 weeks, for locomotor, anxiety-like behaviors, OF and EPM, respectively, and cognition in Morris Water Maze (MWM). Student's T test was used for all comparisons of the two groups, using Graph Pad Prism 5.0 software. P-values of <0.05 were accepted as statistically significant. All data are given as mean \pm SEM (n). Our results showed significant increase of locomotor activity and anxiety-like behavior in males and females, and sex-dependent changes in the processes of learning and memory retention in offspring prenatal stress group. Together, these data indicate that inversion of light-dark cycle during gestation participates in programming behavior of long-term.

Keywords: Early programming; circadian rhythm; behavioral assessment, stress.

Introduction

Structural and functionally, central nervous system is molded by environment interaction, especially in early stages of development, which are characterized by high neural plasticity, affecting the individuality of the subject, substantiating in large part their behavior.

Disturbances or stressors events at this stage can lead to adverse functional consequences that manifest in adulthood, such as changes in exploratory, emotional and sexual behaviors, fear, learning skills and cognition, social interaction, maternal care, reproductive success, endocrine and neurochemical profiles of offspring (Bowman, et al. 2004; Hamilton and Meston 2011; Markham, et al. 2010; Meunier, et al. 2004; Varcoe, et al. 2011; Zuena, et al. 2008).

Studies in different models show that gestational stress can program, among other systems, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, resulting in increased basal secretion of glucocorticoids (Weinstock 2008), as well as the receptors of this system (Bowman, et al. 2004).

Cognitive ability related to learning and memory can also be disadvantaged due to the action of glucocorticoids during gestational development (Bustamante, et al. 2010; Gonzalez-Perez, et al. 2011; Loh, et al. 2010). The recognition of a previously encountered stimulus and the ability to compare it to others in future are fundamental skills to survival. Animals can adapt to new environments by their capacity of learning and memory (Mery 2012) Thus, a cognitive impairment such as learning and memory deficits, may bring negative consequences in several situations for the subject.

Late behavioral changes can be observed as a result of alterations in neural development (Weinstock 2008). Gestational stress has been suggested as a risk factor for illness development such as anxiety, depression and schizophrenia, neuropsychiatric diseases known by cognitive dysfunction (Schulz, et al. 2011). Moreover, the existence of anxiety and depression can lead to a condition of vulnerability for the emergence of other diseases.

Events that involve disruption of circadian sleep-wake cycle periodicity may be configured as environmental stressors, these rhythmicity rupture change behaviors and several hormones secretion (Toki, et al. 2007). In this context, this paper aims to investigate the effect of stress induced by repeated

inversions of light-dark cycle during pregnancy on locomotor, emotional behaviors, and cognitive development of offspring in adulthood.

Materials and methods

Experimental Groups

Adult (90 days) Wistar female rats ($n = 14$) were housed with males ($n = 7$) from the biotery of School of Environmental and Biological Science, Federal University of Grande Dourados, until pregnancy was confirmed by vaginal smears for sperm. Upon detection of mating, females were separated from males and shared into two groups: control dams (CD) maintained under control lighting conditions and stressed dams (SD, $n = 9$), described bellow. CD's offspring formed the control group (control: $n = 24$ males and females $n = 8$) and offspring from SD, formed the prenatal stress group (PS: $n = 24$ males and females $n = 8$). Experiment was conduct twice.

There were two repetitions of the experiment. All animal care and experimental aspects in this study was done according to the principles of animal research adopted by National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Institute of Biological Sciences, University of Brasília through UnBDOC document n° 47921/2010.

Prenatal stress model by light-dark cycle inversion

Rats from SD group were submitted to periodic light-dark cycle inversion at every four days throughout all pregnancy, summarizing five inversions. Control dams were kept in standard light-dark cycle (light cycle from 6 am to 6 pm and dark cycle from 6 am to 6 pm), as illustrated on Figure 1. On postnatal first day dams were evaluated in open field and elevated plus maze for behavior measure.

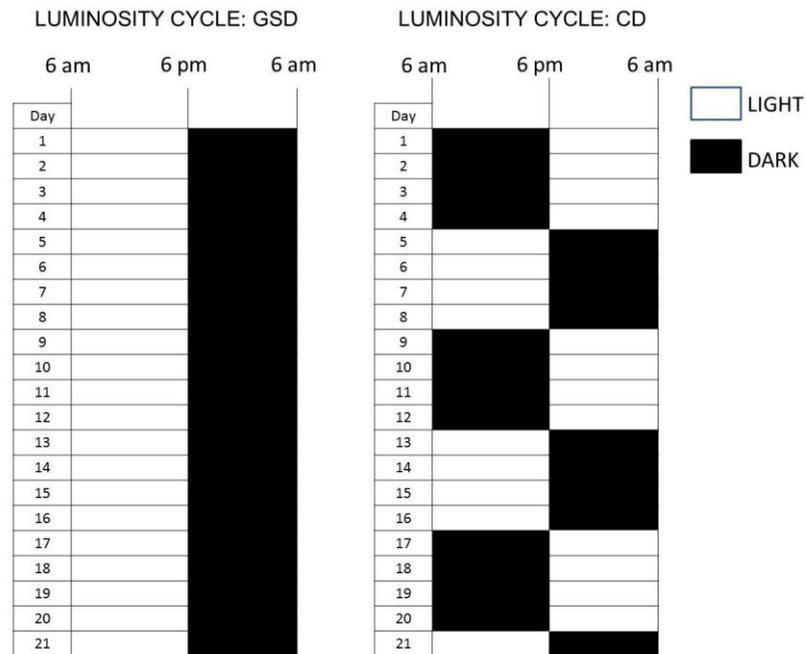


FIGURE 1: Luminosity cycle scheme for control dams (CD) and submitted to prenatal stress (SD).

Postnatal procedures

Animals were randomized on the first day postpartum, litters were formed by eight animals of same sex. Weaning occurred on 21 postnatal day (PND21). Then offspring were separated in collective boxes of 4 animals each and maintained under standard conditions of feeding (ad libitum), temperature ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) and luminosity (light cycle from 6 am to 6 pm and dark cycle from 6 am to 6 pm).

Behavioral assessment

Locomotor activity and anxiety-like behavior

To evaluate the locomotor activity, it was used the open field test and to anxiety-like behavior animals were submitted to elevated plus maze. Dams were evaluated on postnatal first day and offspring on days 60 and 75 postnatal, from 1 pm to 6 pm.

Open field (OF): Animals were tested in an 80 cm diameter X 36 cm in height white circular formica box. Arena was divided into 3 circles subdivided into 24 squares. Locomotor activity was analyzed by the number of crossed squares using 4 paws. Anxiety was indicated for the time animals spent in center area. Specific behaviors were recorded: grooming; self-cleaning activity, which animal directs its forepaws toward the head, body or genitals; rearing; to get up on its paws, usually as an exploratory behavior; were recorded; freezing, all the total freeze time of the animal, except movements necessary for breathing and the number of fecal boli. Freeze behavior is manifestation of fear in animals and fecal elimination should be “emotional defecation” in some anxious situations (Russell, et al. 1987).

Dams were evaluated once over 5 min in OF. By the way, offspring were submitted to three consecutive days of testing, over 5 min each session (Eilam 2003; Leke, et al. 2012).

Elevated plus maze (EPM): Behavior was tested over 5 min once in white formica an elevated plus maze elevated to a height of 50 cm above floor level, consisting of two closed and two open arms (50 cm x 40 cm x 10 cm) which extend from a common central platform (10 cm x 10 cm), each 50X5 cm in size. Animals were placed in the center, facing one of the open arm and entries into open or closed arm was recorded only when all four paws crossed into the new arm or into the neutral central area. After each test, the apparatus was cleaned to remove animal scent. This test was used to assess anxiety-like behavior being considered anxious the animal that spent more time in open arms, complemented by increased time in central region of it.

Dams were submitted to once 5 min session in EPM one week after finished assessments in OF, following the same test protocol.

Cognitive behavior

Both groups Control and PS were evaluated in Morris water maze (MWM) to assess learning, spatial memory acquisition and retention between postnatal days 85 and 100 from 1 am to 6 am.

Morris water maze: A 60 cm-high and 214 cm-diameter round tank was filled with water at $20\pm 1^\circ\text{C}$ to a depth of 50 cm and neutral pH. A hidden platform beneath the water surface was placed in the center of the tank and measured the latency to find it. Each animal was placed in the water tank in the same place all trials head facing the wall of the tank. Each rat received 5 trials in the first day or training day, considered spatial memory learning ability period. Then, in the four consecutive days, rats were evaluated once a day to memory acquisition test. Ten days after it, without being handled in this period, rats were assessed to long-term memory retention and latency in it was compared to the last day of memory acquisition (D'Hooge and De Deyn 2001; Van Dam, et al. 2006).

Statistical Analysis

The Student's t test was used for all comparisons of the two groups, using GraphPad Prism 5.0 software. All data are given as mean \pm SEM. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Behavioral assessment

Dams

On postnatal first day dams were submitted to behavioral assessment. SD showed in OF increased number of crossings (85%, $P < 0.001$), rearing (35%, $P < 0.05$) and fecal boli (5 times, $P < 0.01$) compared to CD group. There was a reduction in the freezing time (57%, $P < 0.01$), grooming behavior was not altered (Table 1).

Table 1: Assessment of anxiety-like behaviors in control dams (CD) and prenatal stressed dams (SD) on postnatal first day in open field (OF).

Parameters measure	CD	SD
Crossings (n)	63,0 ± 9,0	116,4 ± 5,5***
Time in the center (%)	58,9 ± 1,5	53,8 ± 0,7**
Freezing (s)	120,0 ± 7,0	51,0 ± 12,0**
Rearing (n)	17,0 ± 1,0	23,0 ± 2,1*
Grooming (n)	53,4 ± 4,0	39,3 ± 5,0
Fecal boli (n)	1,2 ± 0,4	6,3 ± 1,3**

Data are given as mean ± SEM (n), CD n= 5; SD n= 9; *P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 for SD vs CD groups.

Immediately after assessment in OF, dams from both groups were evaluated in EPM. In this test SD increased number of entries in open arms (22%, P <0.05) no changes in other measured parameters was showed (Table 2).

Table 2: Assessment of anxiety-like behaviors in control dams (CD) and prenatal stressed dams (SD) on postnatal first day in elevated plus maze (EPM).

Parameters measure	CD	SD
Entries in open arms (n)	5,0 ± 0,3	6,1 ± 0,3*
Entries in closed arms (n)	5,1 ± 0,4	6,3 ± 0,7
Time spent in open arms (s)	44,4 ± 6,4	53,1 ± 3,0
Time spent in closed arms (s)	221,4 ± 10,9	220,4 ± 7,3
Time spent in the center (s)	30,0 ± 6,5	22,8 ± 2,9

Data are given as mean ± SEM (n), CD n= 5; SD n= 9; *P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 for SD vs CD groups.

Offspring

Open field and elevated plus maze

In OF, males from PS group crossed more squares (25%, P <0.05) exhibited increased rearing behavior (40%, P <0.001) and decreased freezing time (32%, P <0.001), time spent in the center (14, P<0.001) as well as the number of fecal boli (43%, P <0.05). There was no difference in grooming behavior among males of the investigated groups. Females from PS group

exhibited increase in crossings (72%, $P < 0.05$) and fecal boli (3-fold, $P < 0.05$) and decreased freezing time (53%, $P < 0.05$) and time spent in the center of open field (21, $P < 0.001$). There were no differences in other parameters (Figure 2).

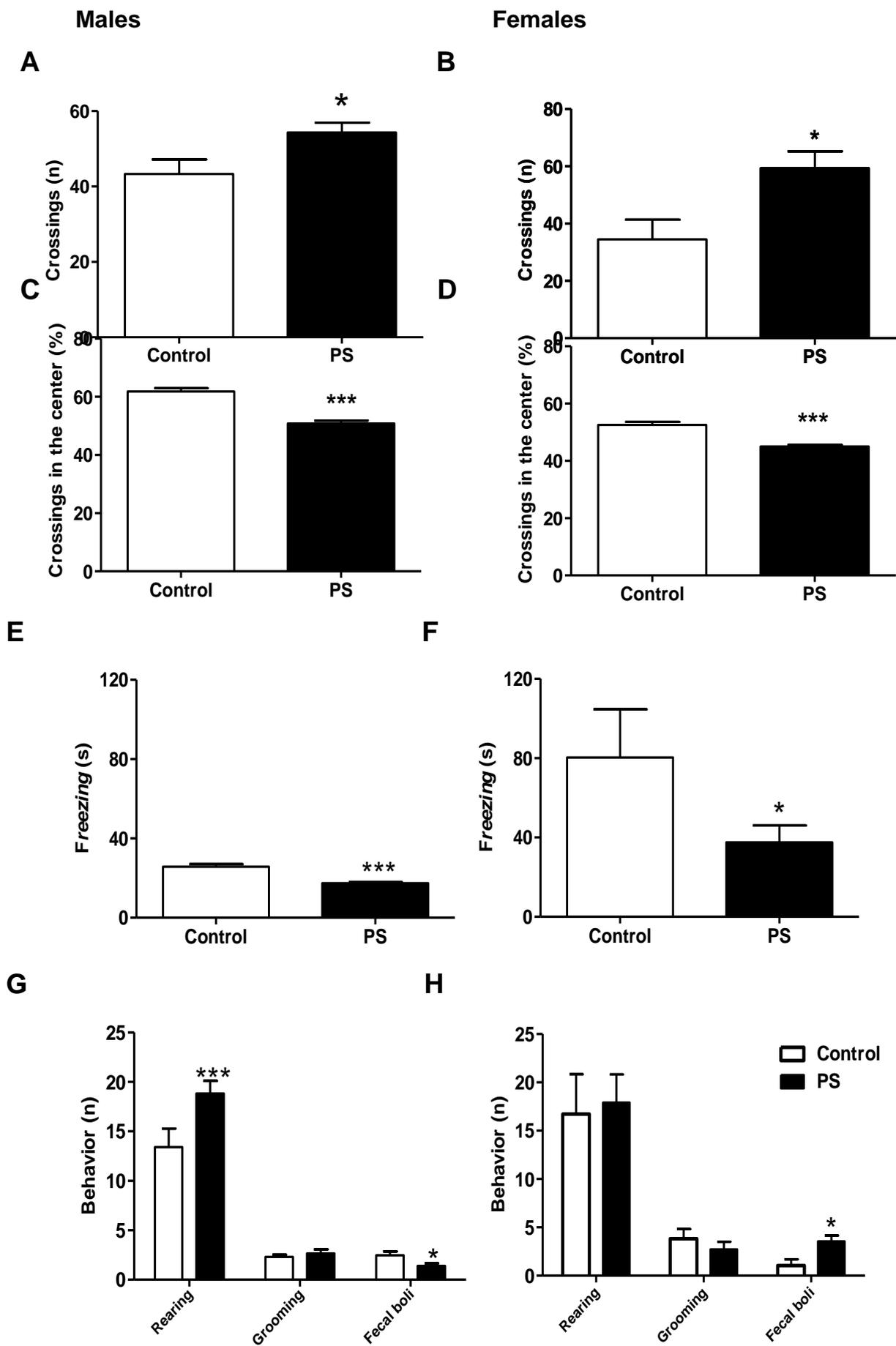


Figure 2: Control and prenatal stressed (PS) animals behavioral assessment in open field (OF). Male (on the left) and female (on the right): (A and B) number of crossings; (C and D) number of crossings in the center; (E and F) freezing time; (G and H) behaviors of rearing, grooming and fecal boli, respectively. Data are given as mean \pm SEM (n), Females: Control n= 8 and PS n= 8. Males: Control n= 24 and PS n =24; *P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 for PS vs Control groups.

One week after the assessment in OF, it was evaluated animals anxiety-like behavior EPM. Males from PS group spent less time in open arms (25%, P <0.05), closed arms (53%, P <0.001) and freezing time (37%, P <0.05). However, those animals showed an increase in time spent in the maze central region (23%, P <0.01). PS females of the exhibited reduction in time spent in open arms (48%, P <0.001) and no changes in other measured parameters (Figure 3).

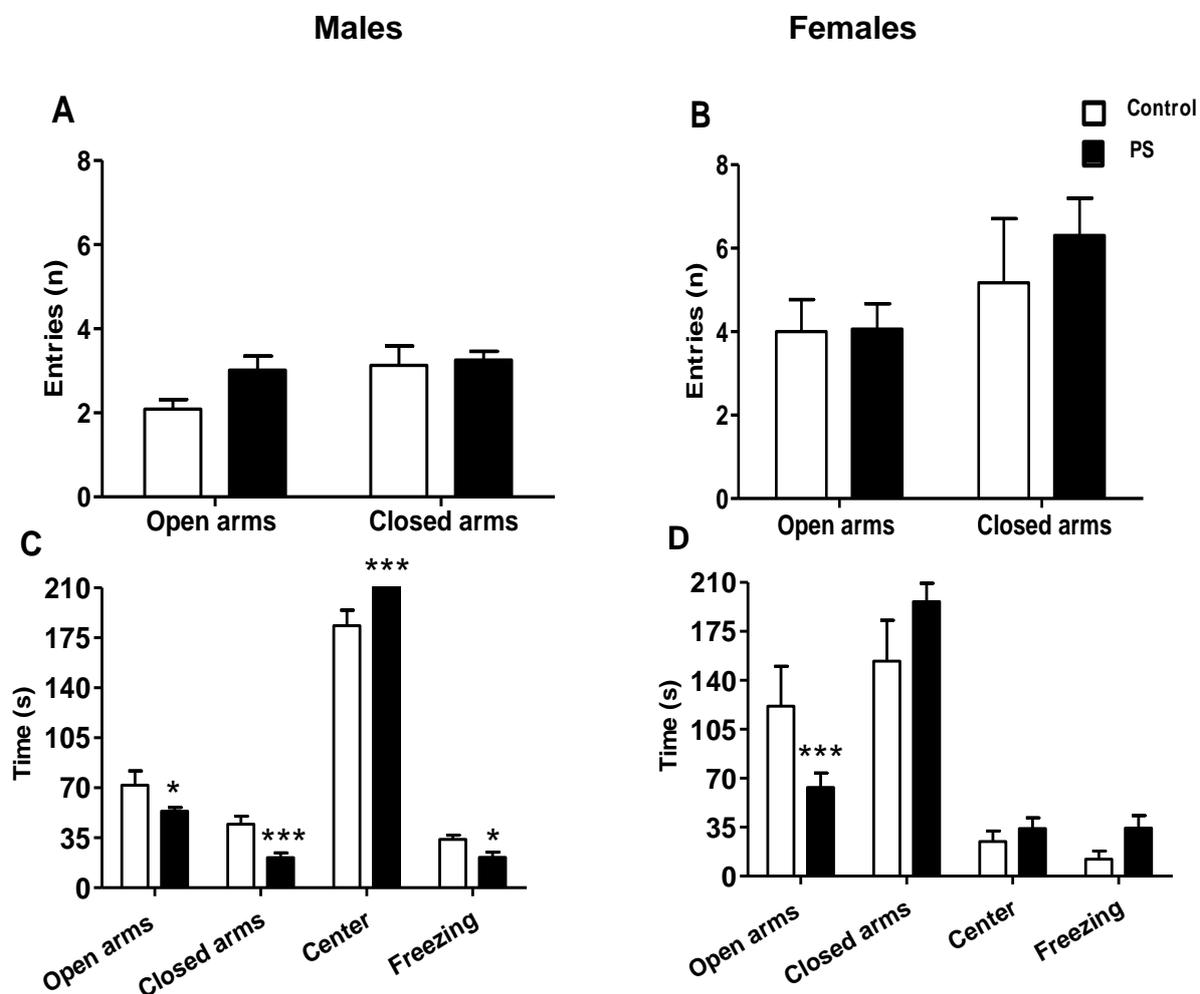


Figure 3: Control and prenatal stressed (PS) animals behavioral assessment in elevated plus maze (EPM). Male (on the left) and female (on the right): (A and B) number of open and closed arms entries, respectively; (C and D) time spent in open and closed arms, center and freezing behavior, respectively. Data are given as mean \pm SEM (n), Females: Control n= 8 and PS n= 8. Males: Control

n= 24 and PS n =24; *P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 for PS vs Control groups.

Morris water maze

Animals were submitted to cognitive assessment in the Morris water maze (MWM) for learning evaluation (during five trials in training day), post-acquisition training (over the four consecutively days of test) and memory retention (ten days after the last day of test).

During learning period, PS males decreased latency on fourth (59%, P <0.001) and fifth (49%, P <0.05) trials to find the platform (Figure 4A), as well as the first test day (26%, P <0.01). On subsequent days there was no difference between groups (Figure 4C). However, these animals showed increased latency in the retention test memory (260%, P <0.05) (Figure 5E).

PS females showed increase on latency from the second (P <0.05) trial to find the platform during the learning period, getting to the 5th trial with latency six times higher, compared to control group (Figure 4B). In the other hand, during the days of test or memory acquisition, there were no differences among the groups, although there is a greater variation intragroup from animals who were exposed to gestational stress (Figure 4D). In memory retention assessment PS females showed higher latency to find the platform (47%%, P <0.005) (Figure 4F).

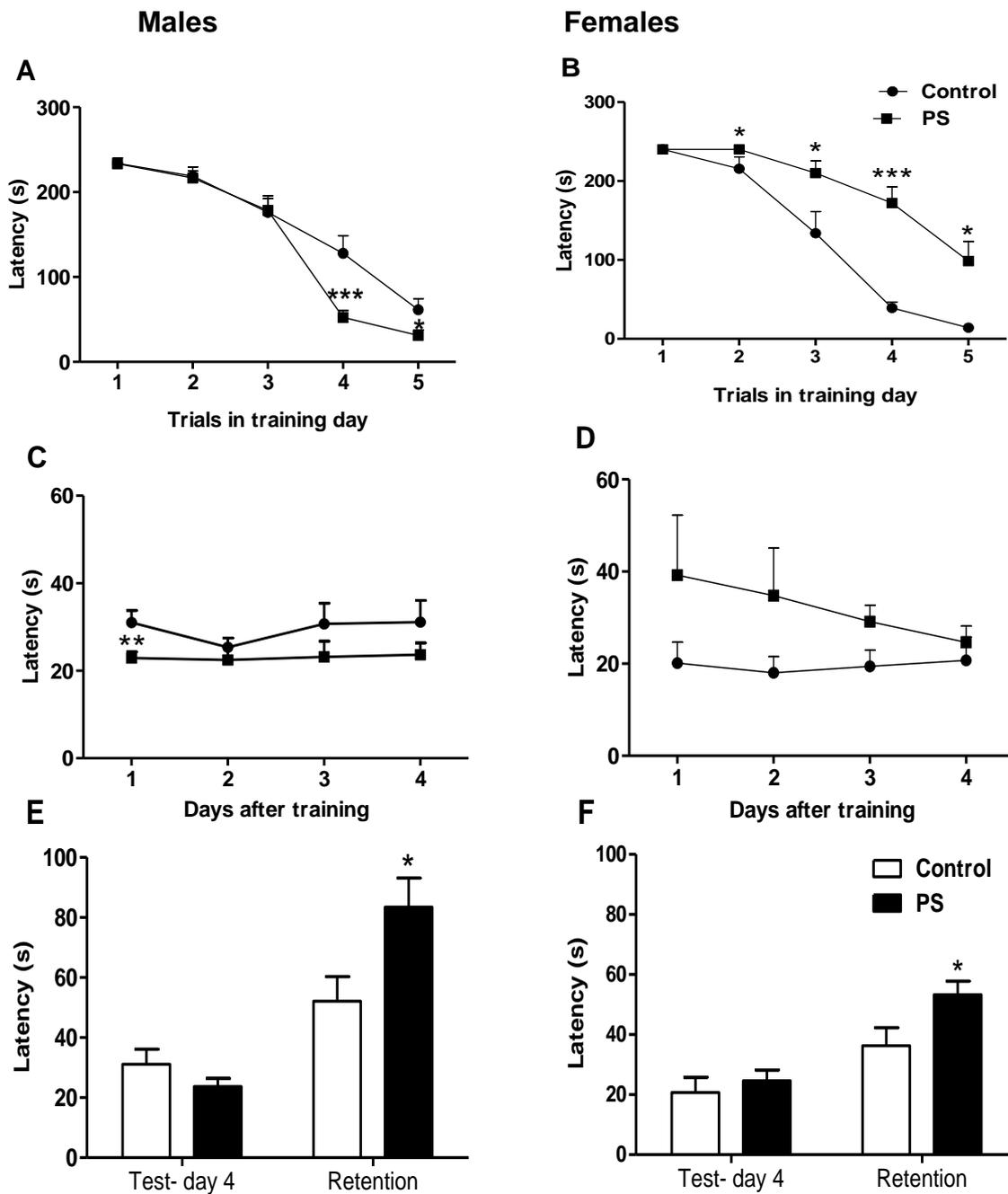


Figure 4: Control and prenatal stressed (PS) animals behavioral assessment in Morris water maze (MWM) for learning and retention of spatial memory. Latency male (on the left) and female (on the right) to find hidden platform on (A and B) training trials; (C and D) test days; (E and F) memory retention. Data are given as mean \pm SEM (n), Females: Control n= 8 and PS n= 8. Males: Control n= 24 and PS n =24; *P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 for PS vs Control groups.

DISCUSSION

Our results corroborate that stressful events during pregnancy are able to participate on programming of later behaviors (Bergman, et al. 2010; Markham, et al. 2010; Varcoe, et al. 2011) which neuroendocrine bases still need to be

investigated. The gestational stress by periodically light-dark cycle inversion resulted in increased locomotor activity, on anxiety-like behavior and cognitive impairment in spatial memory acquisition and retention in rats.

Stress, characterized by physiological and behavioral changes that include hypothalamic-pituitary-adrenal activation, norepinephrine release and increased level of glucocorticoids, can be triggered by several kinds of stressors, including disruption of light-dark circadian rhythm (Oliver, et al. 2012). By being transplacental, these stress hormones become mediators of maternal events to fetus, with potential to alter neuroendocrine development (Patel, et al. 2011). Additionally, periodic light-dark cycle inversion by disruption of many other hormonal rhythms such as melatonin can also alter neural development by modifying the proliferation and survival of nerve cells related to investigated behaviors (Mueller, et al. 2011; Shang and Zhdanova 2007).

Stress effects suffered during pregnancy may extend to the breastfeeding period and change maternal care. Dams who suffered gestational stress exhibited on first day post-partum increased locomotor activity and exploration in open field, showing clear emotional reactivity alteration expressed by high number of fecal boli. This condition individually or put together to the complex and morphological changes caused by neuroendocrine mediators of stress development during pregnancy, probably subsidize late behavioral changes observed in adult offspring (Belkacemi, et al. 2011; Fujita, et al. 2010).

Although it was observed an increase in the number of squares crossed and reduced freezing time in OF by animals whose their dams suffered stress during pregnancy, which indicates increase in locomotor activity of these animals, there was no change in body weight nor in their food intake. Therefore, increase in locomotor activity may be connected to rise of animal emotional activity during its exposure to the test (Piazza, et al. 1989). Emotional changes also could be observed by the increase in time spent in the center of OF by male and female puppies, indicating increased anxiety-like behavior in those animals. Growth in time to take a decision, showed in the increased time spent in the center of EPM, being more evident in males, make the anxiety-like behavior clearest. Behavioral changes observed in other studies may be due to the action of glucocorticoids during nervous system ontogeny (Pivina, et al.

2011; Schulz, et al. 2011; Uygur and Arslan 2010; Yee, et al. 2011; Zuena, et al. 2008).

During animal assessment in LAM, learning, memory acquisition and retention were evaluated. Hereby, it was found that male learning ability submitted to prenatal stress probably had no negative consequences, since these showed lower latency than control group to find the platform on last training day trials. Also, it was not observed changes on memory formation of these animals. Although, unlike its ability to retain that appeared reduced when assessed after 10 days of trial period. These effects were similar to those seen in females, except for the negative change presented by them as their learning ability. The losses in cognitive processes due to prenatal stress have been widely reported in literature, occurring dependent on the model of stress in which it was evaluated (Bustamante, et al. 2010; Gonzalez-Perez, et al. 2011; Karnam, et al. 2009; Loh, et al. 2010; Lui, et al. 2011; Schulz, et al. 2011).

Neural bases involved in processes of learning and memory consolidation include different nervous system areas. Spatial memory, which is evocated to find hidden platforms in MWM, is specially processed by the medial temporal lobe and hippocampus and its adjacent cortical areas (Kalpakidou, et al. 2012). It is possible that the action of increased corticosterone during pregnancy has changed the development of hippocampal tissues resulting in spatial memory deficits, which it is responsible, what would be consistent with studies in which damage in hippocampus or its connections cause spatial memory deficits without altering other kind of memory (Best, et al. 2001; Eichenbaum 1999).

CONCLUSION

Taken together, our results show that prenatal stress by periodically light-dark cycle inversion along with other facts can program emotional and cognitive behavior in adults of both genders. Further studies should be conducted to elucidate the neuroendocrine mechanisms underlying investigated behaviors, as well as other ones.

Aknowledgements

Elaine Lucas dos Santos was supported by Foundation to Support to Development of Education, Science and Technology of Mato Grosso do Sul State (FUNDECT).

REFERENCES

Belkacemi, L., et al.

2011 Altered placental development in undernourished rats: role of maternal glucocorticoids. *Reprod Biol Endocrinol* 9:105.

Bergman, K., et al.

2010 Maternal prenatal cortisol and infant cognitive development: moderation by infant-mother attachment. *Biol Psychiatry* 67(11):1026-32.

Best, P. J., A. M. White, and A. Minai

2001 Spatial processing in the brain: the activity of hippocampal place cells. *Annu Rev Neurosci* 24:459-86.

Bowman, R. E., et al.

2004 Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology* 145(8):3778-87.

Bustamante, C., et al.

2010 Effects of prenatal stress and exercise on dentate granule cells maturation and spatial memory in adolescent mice. *Int J Dev Neurosci* 28(7):605-9.

D'Hooge, R., and P. P. De Deyn

2001 Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 36(1):60-90.

Eichenbaum, H.

1999 The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav Brain Res* 103(2):123-33.

Eilam, D.

2003 Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behav Brain Res* 142(1-2):53-62.

Fujita, S., et al.

2010 "Green odor" inhalation by stressed rat dams reduces behavioral and neuroendocrine signs of prenatal stress in the offspring. *Horm Behav* 58(2):264-72.

Gonzalez-Perez, O., et al.

2011 [Intrauterine stress impairs spatial learning in the progeny of Wistar rats]. *Rev Invest Clin* 63(3):279-86.

Hamilton, L. D., and C. M. Meston

2011 The role of salivary cortisol and DHEA-S in response to sexual, humorous, and anxiety-inducing stimuli. *Horm Behav* 59(5):765-71.

Kalpakidou, A. K., et al.

2012 Neonatal brain injury and neuroanatomy of memory processing following very preterm birth in adulthood: an fMRI study. *PLoS One* 7(4):e34858.

Karnam, H. B., et al.

2009 Effect of age on cognitive sequelae following early life seizures in rats. *Epilepsy Res* 85(2-3):221-30.

Leke, R., et al.

2012 Impairment of the organization of locomotor and exploratory behaviors in bile duct-ligated rats. *PLoS One* 7(5):e36322.

Loh, D. H., et al.

2010 Rapid changes in the light/dark cycle disrupt memory of conditioned fear in mice. *PLoS One* 5(9).

Lui, C. C., et al.

2011 Prenatal stress in rat causes long-term spatial memory deficit and hippocampus MRI abnormality: differential effects of postweaning enriched environment. *Neurochem Int* 58(3):434-41.

Markham, J. A., et al.

2010 Characterization of the cognitive impairments induced by prenatal exposure to stress in the rat. *Front Behav Neurosci* 4:173.

Mery, F.

2012 Natural variation in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol*.

Meunier, J., et al.

2004 Attenuation by a sigma1 (sigma1) receptor agonist of the learning and memory deficits induced by a prenatal restraint stress in juvenile rats. *Br J Pharmacol* 142(4):689-700.

Mueller, A. D., R. J. Mear, and R. E. Mistlberger

- 2011 Inhibition of hippocampal neurogenesis by sleep deprivation is independent of circadian disruption and melatonin suppression. *Neuroscience* 193:170-81.
- Oliver, P. L., et al.
2012 Disrupted circadian rhythms in a mouse model of schizophrenia. *Curr Biol* 22(4):314-9.
- Patel, J., et al.
2011 Thyroid hormones and fetal neurological development. *J Endocrinol* 209(1):1-8.
- Piazza, P. V., et al.
1989 Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* 245(4925):1511-3.
- Pivina, S. G., et al.
2011 [Influence of fluoxetine and paroxetine on anxiety-like behavior in young and adult prenatally stressed male rats]. *Eksp Klin Farmakol* 74(4):3-5.
- Russell, K. H., S. H. Hagenmeyer-Houser, and P. R. Sanberg
1987 Haloperidol-induced emotional defecation: a possible model for neuroleptic anxiety syndrome. *Psychopharmacology (Berl)* 91(1):45-9.
- Schulz, K. M., et al.
2011 Maternal stress during pregnancy causes sex-specific alterations in offspring memory performance, social interactions, indices of anxiety, and body mass. *Physiol Behav* 104(2):340-7.
- Shang, E. H., and I. V. Zhdanova
2007 The circadian system is a target and modulator of prenatal cocaine effects. *PLoS One* 2(7):e587.
- Toki, S., et al.
2007 Importance of early lighting conditions in maternal care by dam as well as anxiety and memory later in life of offspring. *Eur J Neurosci* 25(3):815-29.
- Uygur, E. E., and M. Arslan
2010 Effects of chronic stress on cognitive functions and anxiety related behaviors in rats. *Acta Physiol Hung* 97(3):297-306.
- Van Dam, D., G. Lenders, and P. P. De Deyn

2006 Effect of Morris water maze diameter on visual-spatial learning in different mouse strains. *Neurobiol Learn Mem* 85(2):164-72.

Varcoe, T. J., et al.

2011 Chronic phase shifts of the photoperiod throughout pregnancy programs glucose intolerance and insulin resistance in the rat. *PLoS One* 6(4):e18504.

Weinstock, M.

2008 The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 32(6):1073-86.

Yee, N., et al.

2011 Differential effects of maternal immune activation and juvenile stress on anxiety-like behaviour and physiology in adult rats: no evidence for the "double-hit hypothesis". *Behav Brain Res* 224(1):180-8.

Zuena, A. R., et al.

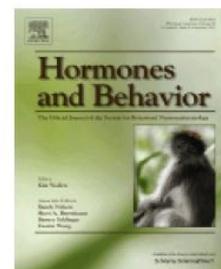
2008 Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. *PLoS One* 3(5):e2170.

Anexo 2: Normas para publicação do artigo científico 1



HORMONES AND BEHAVIOR

Official Journal of the Society for Behavioral Neuroendocrinology



ISSN: 0018-506X

PERIÓDICO

HORMONES AND BEHAVIOR

Fator de impacto: 3.865

Média de fator de impacto nos últimos 5 anos: 4.126

Qualis Capes: Medicina II- A2 (2012)

SCOPE

Hormones and Behavior publishes original research articles, reviews and special issues concerning hormone-brain-behavior relationships, broadly defined. The journal's scope ranges from laboratory and field studies concerning neuroendocrine as well as endocrine mechanisms controlling the development or adult expression of behavior to studies concerning the environmental control and evolutionary significance of hormone-behavior relationships. The journal welcomes studies conducted on species ranging from invertebrates to mammals, including humans.

NORMAS PARA ELABORAÇÃO DO MANUSCRITO

O guia com informações e normas para elaboração do manuscrito para publicação encontra-se disponível em:

<http://www.elsevier.com/journals/hormones-and-behavior/0018-506X/guide-for-authors>

Anexo 3: Email de confirmação de submissão do artigo científico 1

Hormones and Behavior: Submission Confirmation Voltar para mensagens |  

HB (ELS) [Adicionar a contatos](#) 19:47
Para elaine_ls@hotmail.com Responder ▾

Title: EARLY BEHAVIOR PROGRAMMING BY LIGHT-DARK CYCLE INVERSION DURING PREGNANCY IN RAT
Corresponding Author: Miss. Elaine Lucas Santos
Authors: Anye de Picoli Souza; Adriana Cristine Fonseca Mozzambani; João Bosco Pesquero; Edson Lucas dos Santos

Dear Miss. Santos,

This is to confirm that your manuscript has been received for consideration in Hormones and Behavior.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Hormones and Behavior as an author:
<http://ees.elsevier.com/hb/>
Your username is: Elaine Lucas
If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/hb/automail_query.asp

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Hormones and Behavior. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Journal Manager
Hormones and Behavior
E-mail: hb@elsevier.com

Our new self-help site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923/> describes a range of EES topics, answers frequently asked questions, and provides interactive EES tutorials for authors, editors and reviewers.

Anexo 4: Artigo científico 2 em construção

**ESTRESSE GESTACIONAL POR INVERSÃO DE CICLO CLARO-ESCURO
AUMENTA A PREFERÊNCIA POR ETANOL EM RATOS ADULTOS**

¹Elaine Lucas dos Santos, ²Annye de Picoli Souza, ³João Bosco Pesquero,
^{1,4}Edson Lucas dos Santos, and ^{1,2}Kely de Picoli Souza

¹Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, ⁴Faculdade de Ciências
Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia
Dourados-Itahum, Km 12, 79804-970, Dourados, MS, Brasil.

Título abreviado: Consumo de etanol após estresse gestacional.

Endereço para correspondência:

Kely de Picoli Souza, Ph.D

Professora-adjunta.

⁴Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da
Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, 79804-970, Dourados,
MS, Brasil;

FONE: 55 xx 67 3410-2210 FAX: 55 xx 67 3410

e-mail: kelypicoli@ufgd.edu.br

Resumo

O ritmo circadiano ligado ao ciclo claro-escuro ambiental é um dos principais sincronizadores neuroendócrinos do organismo, portanto um dos principais responsáveis para o funcionamento saudável do mesmo. Assim, alterações no padrão de claro-escuro ambiental gerando aumento de cortisol e redução de melatonina, configurando-se como estresse. Estes hormônios são transplacentários e capazes de atuarem no desenvolvimento do sistema nervoso durante a gestação e modificar permanentemente a morfologia e funções de estruturas e conseqüentemente, comportamentos pelos quais estas são responsáveis. Neste trabalho objetivamos avaliar os efeitos do estresse gestacional por inversão periódica do ciclo claro/escuro sobre o comportamento alimentar, a evolução da massa corporal e a preferência pelo consumo de etanol na prole adulta. Ratas *Wistar* adultas foram colocadas para acasalamento e, no primeiro dia de prenhes foram separadas em dois grupos: Controle (submetidas a ciclo de luminosidade padrão) e Estresse Gestacional (submetidas à inversão periódica do ciclo padrão de luminosidade a cada três dias durante toda a gestação). Foi acompanhado o consumo de água (ml), ração padrão (g), bem como, a evolução da massa corporal dos mesmos (g). Aos 120 dias de vida foi avaliada a ingestão de etanol 10% *ad libitum* por 5 dias, seguida de avaliação em campo aberto (CA). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e analisados pelo *Student t test*. As diferenças entre os dados foram consideradas significantes quando $p < 0.05$. O estresse gestacional sofrido não alterou comportamentos alimentares nas proles, nem a evolução da massa corporal, no entanto aumentou o consumo de etanol nos animais cujas mães sofreram estresse gestacional.

Palavras-chave: Adição, programação comportamental, ansiedade, álcool.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de etanol é um problema que merece atenção e investigação quanto aos possíveis fatores que causam ou mantêm o comportamento aditivo (Richoux et al., 2011). Estudos epidemiológicos estimam que a herdabilidade para o risco de alcoolismo seja de 40% a 60% para o sexo masculino, enquanto para o sexo feminino não há registros de

estimativas conclusivas. No entanto, estes estudos não trazem explicações concisas de como a transmissão genética é efetivada. (Messas & Vallada Filho, 2004). A relação do sujeito com o meio é sinérgica e dinâmica, o que dificulta estabelecer com exatidão até que ponto a adição se dá por fatores genéticos ou por condições emocionais, sociais, ambientais, dentre outras.

O desenvolvimento da adição está relacionado a várias adaptações induzidas por drogas psicoativas, cujo potencial de abuso está relacionado ao controle do funcionamento neurológico, alterando tanto funções quanto estruturas anatômicas dos sistemas de neurotransmissão, GABAérgicos, glutamatérgicos, colinérgicos dopaminérgicos, serotoninérgicos e de peptídeos opióides (Tomkins & Sellers, 2001). Dentre as vias neurais por eles moduladas, destacam-se o sistema de recompensa, memória, motivação e autocontrole altamente afetado por modulação dopaminérgica (Tomkins & Sellers, 2001).

O estresse gestacional induzido por fatores nutricionais, hormonais, sociais, físicos e psíquicos pode alterar o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e de diversos outros sistemas fisiológicos de forma transitória ou permanente. A programação precoce de comportamentos tardios por estresse gestacional tem sido relacionada a comportamentos de ansiedade, depressão, esquizofrenia, déficit de memória, isolamento social, bem como ao aumento da vulnerabilidade ao consumo de drogas (Bowman et al., 2004; Khashan et al., 2008; Seckl, 2004; Zuena et al., 2008).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo investigar o efeito do estresse induzido por meio de inversões repetidas de ciclo claro/escuro no período gestacional sobre o comportamento alimentar, a evolução da massa corporal e a preferência pelo consumo de etanol em ratos adultos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Grupos experimentais

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília por meio do documento UnBDOC nº 47921/2010.

Ratas (n=14) e ratos (n=7) *Wistar* adultos do biotério de criação da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da

Grande Dourados, com 90 dias de vida, foram colocadas para acasalamento. Depois de confirmada a prenhez por esfregaço vaginal no primeiro dia de gestação, foram divididas em dois grupos: genitoras (G) Controle (G_Control, n=5) e genitoras submetidas a estresse gestacional (EG) (G_EG, n=9). As proles dos G_Control formaram o grupo Controle (Machos n=24 e Fêmeas n=8) e as dos G_EG formaram o grupo EG (Machos n=50 e Fêmeas n=16).

2.2 Modelo de estresse gestacional

As genitoras do G_EG foram submetidas à inversão periódica de ciclo claro-escuro (ciclo claro as 18 as 6 h e ciclo escuro das 6 as 18 h) a cada quatro dias durante toda a gestação conforme ilustrado pela **Figura 1**. As genitoras do Grupo Controle foram mantidas em ciclo claro-escuro padrão (ciclo claro das 6 as 18 h e ciclo escuro das 18 as 6 h).

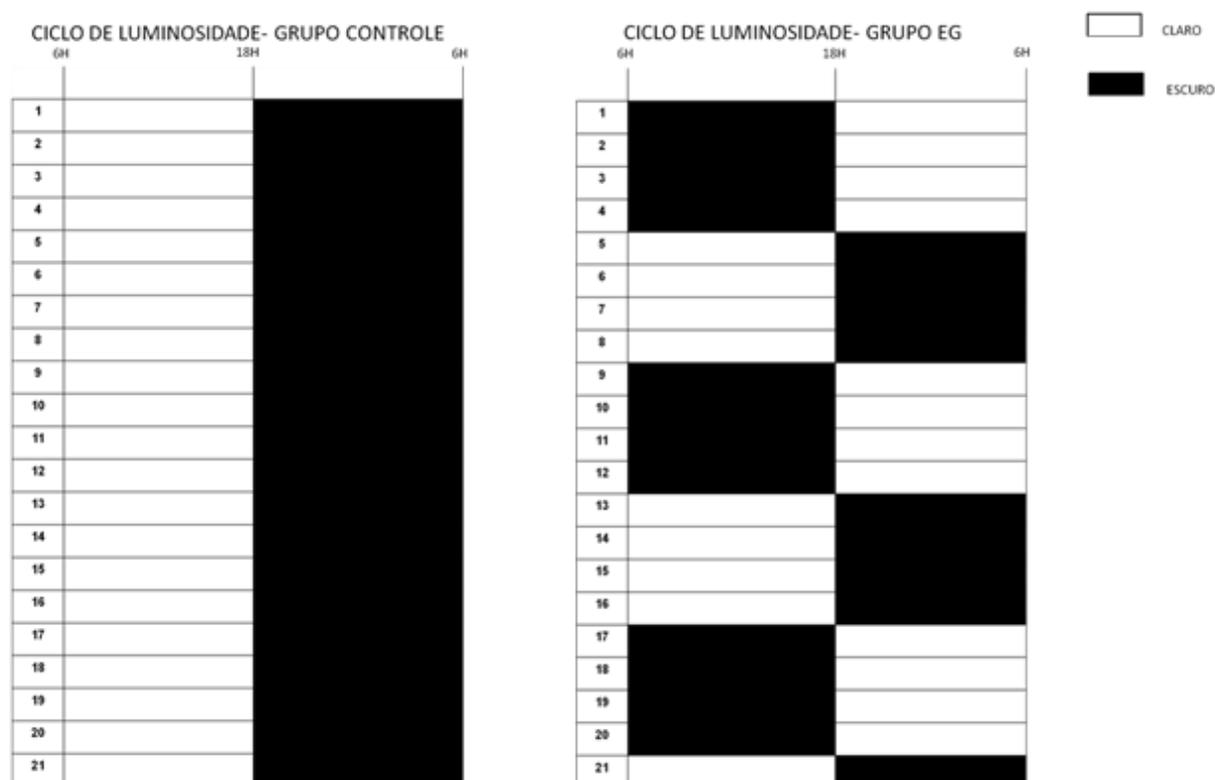


FIGURA 1: Esquema de ciclo de luminosidade para as genitoras dos Grupos Controle e Estresse Gestacional durante a gestação.

2.3 Procedimentos pós-natal

As ninhadas foram mantidas com 8 animais até o desmame que ocorreu aos 21 dias após o nascimento (PN21). Em seguida, as proles foram separadas de acordo com o sexo, em caixas coletivas de 4 animais cada e

mantidos em condições padrão de alimentação (*ad libitum*), temperatura (24°C \pm 1°C) e luminosidade (ciclo claro as 6 as 18 h e ciclo escuro das 18 as 6 h).

2.4 Comportamento alimentar

Os animais foram pesados semanalmente para acompanhamento da evolução da massa corporal em gramas, entre os dias pós-natal 21 e 120 (PN21 e PN120, respectivamente). Adicionalmente avaliou-se a média de consumo diário de água (ml) e ração (g) por caixa durante o mesmo período.

2.5 Comportamento de preferência por etanol

Aos 120 dias de vida pós-natal (PN120), os animais dos grupos Controle e EG foram testados quanto à sua preferência pela ingestão de etanol. Foram disponibilizadas a todos os animais 2 garrafas, uma contendo água e outra etanol 10%. Diariamente foram avaliados o consumo de ambos os líquidos por um período de 5 dias consecutivos. No quinto dia após o início da exposição ao consumo de etanol, os animais foram submetidos a uma nova avaliação em Campo Aberto.

Campo Aberto: Modelo circular de fórmica branca com 80 cm de diâmetro e 36 cm de altura cujo fundo é dividido em 3 círculos concêntricos chamados de anéis subdivididos em 24 espaços iguais chamados de quadrantes. Foram observados os comportamentos deambulação (números de espaços cruzados pelo animal com as 4 patas, ou, número de quadrantes explorados), *grooming*, que significa limpar, ou seja, dirigir as patas dianteiras em direção à cabeça e ao corpo, ou aos genitais; *rearing*, ou seja, levantar-se sobre as patas traseiras; *freezing*, que significa o tempo de congelamento e por fim, o número de bolos fecais.

2.6 Análise estatística

Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos dados dos grupos EG e Controle foi realizada pelo *Student t test* utilizando-se o GraphPad Prism 5. As diferenças entre os dados foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

2 RESULTADOS

3.1 Evolução da massa corporal (g)

Não houve diferença na massa corporal dos animais fêmeas e machos dos grupos Controle e EG durante o período avaliado (Figura 2).

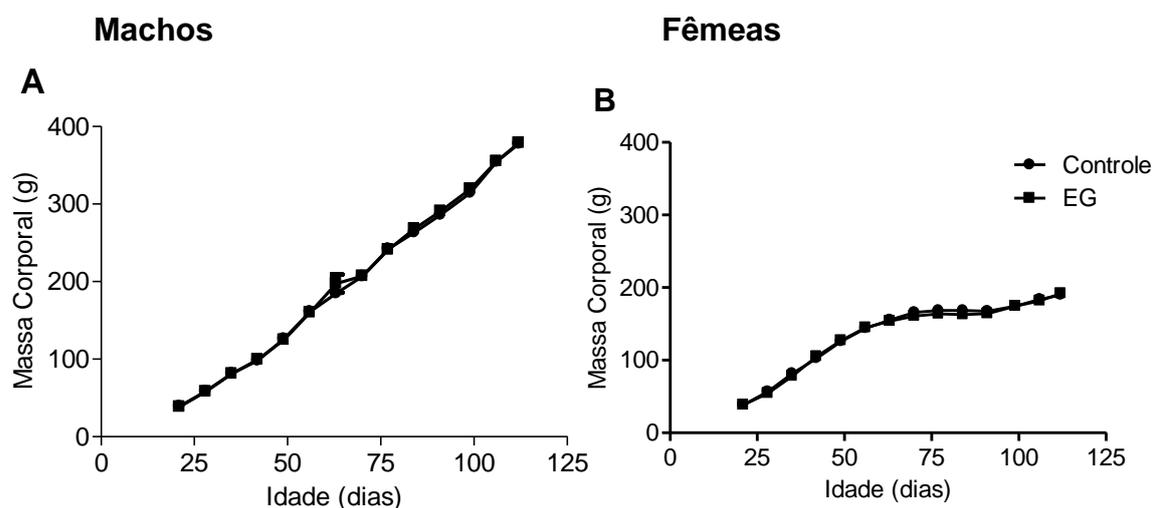


Figura 2: Evolução da massa corporal (g) dos animais dos grupos Controle e EG (submetidos a estresse gestacional) (A) machos e (B) fêmeas, entre os dias PN21 e PN120. Os dados são apresentados como média \pm EPM. Machos: Controle n=24 e EG n=50. Fêmeas: Controle n=9 e EG n=16.

3.2 Consumo alimentar

O consumo médio diário de ração (g) e água (ml) dos animais de cada grupo foi avaliado durante os dias PN21 e PN120 e não houve diferença entre os grupos Controle e EG de ambos os sexos (Tabela 1).

Tabela 1: Média de consumo diário de água e ração de machos e fêmeas Controle e EG (submetidos a estresse gestacional).

Consumo	Machos		Fêmeas	
	Controle	EG	Controle	EG
Ração (g)	32,12 \pm 0,25	31,80 \pm 0,13	26,10 \pm 0,70	26,09 \pm 0,34
Água (ml)	30,45 \pm 0,83	30,23 \pm 0,62	18,94 \pm 1,85	19,86 \pm 1,05

Dados expressos como média \pm EPM.

3.3 Preferência por etanol

Observou-se aumento no consumo médio diário de etanol nos animais machos e fêmeas do grupo EG ($p < 0,001$) (Figuras 2).

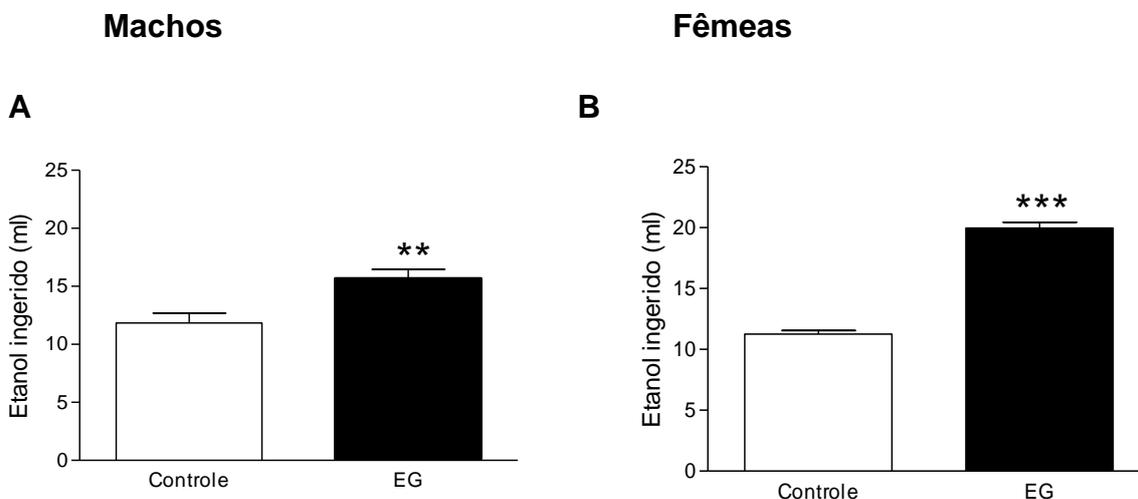


Figura 2: Consumo médio diário por animal de etanol 10% durante 5 dias, em PN120, (A) machos e (B) fêmeas dos grupos Controle EG (submetidos à estresse gestacional). Os dados são apresentados como média \pm EPM. Machos: Controle $n=24$ e EG $n=50$. Fêmeas: Controle $n=8$ e EG $n=16$. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, EG vs Controle.

3.4 Avaliação Comportamental em campo aberto após exposição ao etanol

Após quatro dias de ingestão de etanol, os animais foram submetidos a uma avaliação única em teste de campo aberto, nas fêmeas houve aumento no número de quadrantes invadidos ($p < 0,01$), redução no tempo de *freezing* ($p < 0,05$) e aumento no número de respostas de *rearing* ($p < 0,05$).

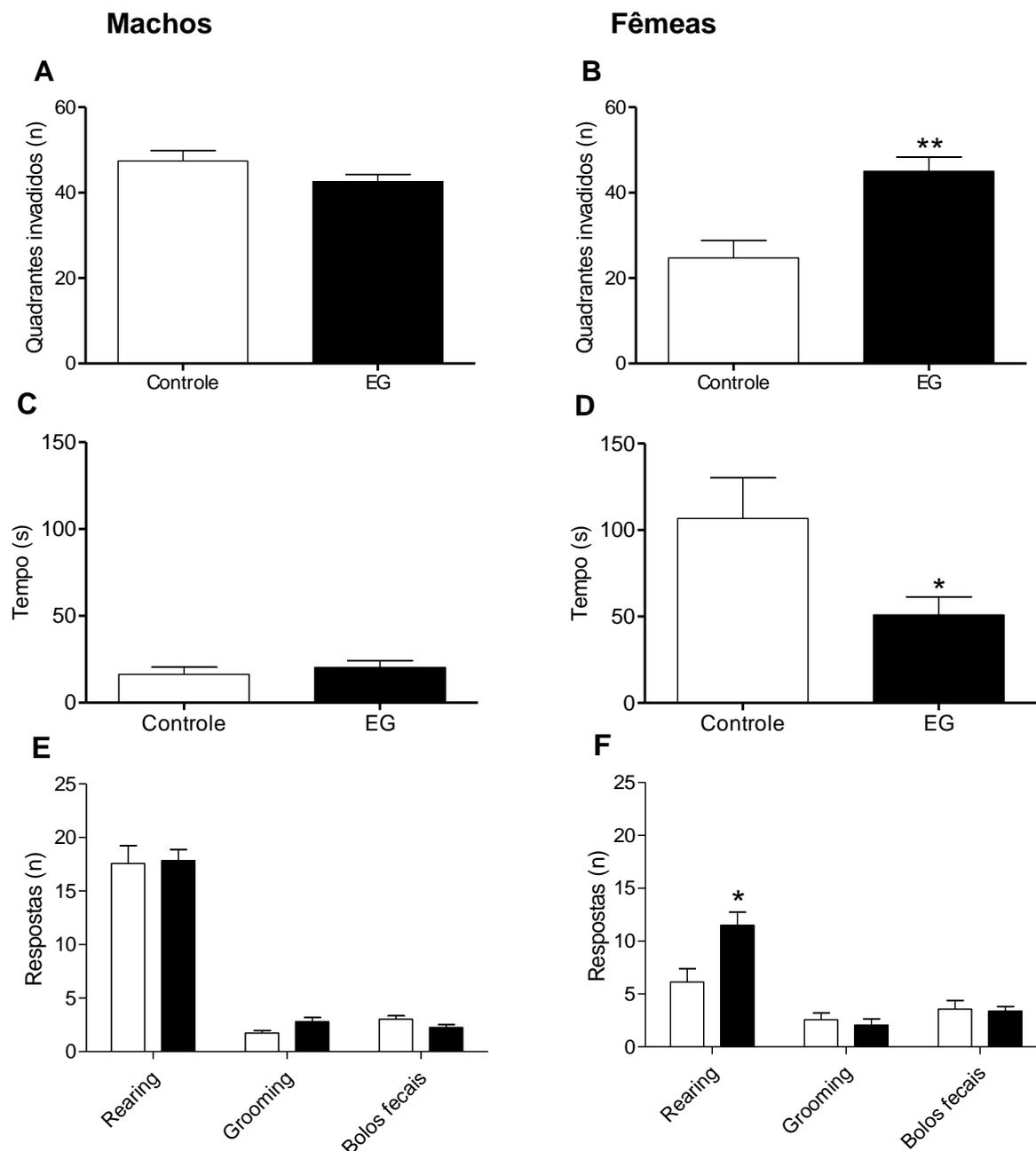


Figura 3: Avaliação comportamental em campo aberto das proles dos grupos Controle e EG (submetidos a estresse gestacional) após exposição ao consumo de etanol 10%. Número de quadrantes invadidos (A) pelos machos e (B) pelas fêmeas. *Freezing* (em s) (C) dos machos e (D) das fêmeas. Respostas de *rearing*, *grooming* e bolos fecais, respectivamente, emitidas (E) pelos machos e (F) pelas fêmeas. Os dados são apresentados como média \pm EPM. Machos: Controle n=24; EG n=50. Fêmeas: Controle n=7 e EG n=16. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, EG vs Controle.

4 DISCUSSÃO

O alcoolismo é definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o consumo de bebidas alcoólicas de forma continuada, causando

prejuízo emocional, social e físico ao indivíduo (Babor, 2010). O abuso no consumo de etanol, bem como a dependência da droga é um problema mundial. Muitos são os problemas econômicos e sociais gerados em consequência do uso desta substância, por exemplo, acidentes automobilísticos, violência de vários níveis, redução da produtividade intelectual e laboral (Babor, 2010; Moore, 2010).

A condição emocional do sujeito, estado de ansiedade e depressão, é comumente relacionada ao uso de etanol bem como a possibilidade de adição ao mesmo. O estresse gestacional tem sido apontado como um programador precoce para comportamentos tardios, inclusive comportamentos relacionados à adição, seja por alterar comportamentos que criam condições para o sujeito buscar a droga, como a ansiedade, citada anteriormente, ou ainda por alterar estruturas neurais ligadas à adição (Markham & Koenig, 2011; Markham, Taylor, Taylor, Bell, & Koenig, 2010; Varcoe, Wight, Voultsios, Salkeld, & Kennaway, 2011).

O modelo de estresse gestacional por inversão periódica do ciclo claro-escuro mostrou-se capaz de aumentar a ansiedade e causar déficit de memória e aprendizagem em ratos (Dos Santos et al., xxxx), porém, mesmo que comportamentos alimentares possam ser relacionados à ansiedade e ao estresse precoce, não foi observada alteração no consumo alimentar nem na massa corporal dos animais que sofreram esse tipo de estresse gestacional.

Nossos resultados mostraram que, embora a alimentação seja uma fonte de prazer, o modelo de estresse não interferiu nos hábitos alimentares comuns, porém causou impacto no consumo e na preferência por etanol, aumentando significativamente a ingestão da droga, principalmente nas proles fêmeas. Adicionalmente, o alto consumo da substância aumentou comportamentos motores e exploratórios nas fêmeas, sem que tenha sido observada alteração de comportamentos nos machos. A diferença na alteração de comportamento pode estar direta ou indiretamente ligada ao processo de metabolização do etanol no organismo que se difere de acordo com o sexo.

Estudos mostram que modelos de livre acesso ao etanol, como o adotado em nosso estudo, tem se mostrado eficiente em determinar a vulnerabilidade de determinados animais à adição (Bhave, Snell, Tabakoff, & Hoffman, 1996; Spanagel, 2000; Wolffgramm & Heyne, 1995). Uma vez que

amígdala e hipocampo fazem parte de um dos circuitos envolvidos no processo de adição (Chastain, 2006) e estudos mostram que estas são estruturas modificadas pelos glicocorticóides oriundos do estresse gestacional (Bergman, Sarkar, Glover, & O'Connor, 2010;) é possível que, além de participar da programação de comportamentos emocionais e cognitivos, os glicocorticóides participem também da alteração e programação das vias responsáveis pela adição.

Quatro circuitos neurais integrados medeiam os três estágios do processo de adição: desintoxicação, fissura ou compulsão e abstinência. O primeiro circuito encontra-se no núcleo accumbens e na parte ventral do globo pálido, modulando o processo de recompensa (Volkow, Fowler, Wang, Swanson, & Telang, 2007). O segundo circuito localiza-se dentro do córtex orbitofrontal e do córtex subcaloso e é o principal responsável pela geração de motivação e resposta emocional. O terceiro circuito se encontra na amígdala e no hipocampo e está relacionado à memória e aprendizagem. O último circuito que se localiza no giro do cíngulo anterior e no córtex pré-frontal é responsável pelo controle da cognição e pela função executiva (Volkow et al., 2007).

Estes circuitos, assim como todo o sistema nervoso, apresentam durante a gestação alta vulnerabilidade à plasticidade, sendo passíveis de influência e modificação por diversos agentes estressores. Porém, como outros estudos mostram que eventos precoces podem alterar a morfologia, bem como o número de células hipocampais (Weaver, 2009), levantamos a hipótese que uma vez tendo sido comprometidos processos de aprendizagem e memória dos animais que passaram por esse modelo de estresse gestacional (Dos Santos et al., xxxx), é provável que o circuito neural responsável pela adição mais afetado pela ação dos glicocorticóides, deve ter sido justamente o que envolve o hipocampo.

3 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados mostraram que o estresse gestacional por inversão periódica do ciclo claro-escuro é um evento que pode alterar comportamentos tardios, auxiliando na programação à vulnerabilidade ao consumo de etanol da prole na fase adulta. Novos estudos devem ser

realizados a fim de elucidar as vias neuroendócrinas envolvidas, assim como a adição à outras drogas, além do etanol.

6 REFERÊNCIAS

- Babor, T. F. (2010). Public health science and the global strategy on alcohol. *Bull World Health Organ*, 88(9), 643. doi: 10.2471/BLT.10.081729
- Bergman, K., Sarkar, P., Glover, V., & O'Connor, T. G. (2010). Maternal prenatal cortisol and infant cognitive development: moderation by infant-mother attachment. *Biol Psychiatry*, 67(11), 1026-1032. doi: S0006-3223(10)00013-2 [pii]
10.1016/j.biopsych.2010.01.002
- Bhave, S. V., Snell, L. D., Tabakoff, B., & Hoffman, P. L. (1996). Mechanism of ethanol inhibition of NMDA receptor function in primary cultures of cerebral cortical cells. *Alcohol Clin Exp Res*, 20(5), 934-941.
- Bowman, R. E., MacLusky, N. J., Sarmiento, Y., Frankfurt, M., Gordon, M., & Luine, V. N. (2004). Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology*, 145(8), 3778-3787. doi: 10.1210/en.2003-1759
en.2003-1759 [pii]
- Chastain, G. (2006). Alcohol, neurotransmitter systems, and behavior. *J Gen Psychol*, 133(4), 329-335. doi: 10.3200/GENP.133.4.329-335
- Dos Santos, E. L., Souza, A. P., Mozzambani, A. C. F., Pesquero, J. B., Santos, E. L., & De Picoli Souza, K. (xxxx). Estresse gestacional por inversão de ciclo claro-escuro programa comportamento de ansiedade e cognição da prole adulta em ratos. *Plos one*.
- Khashan, A. S., Abel, K. M., McNamee, R., Pedersen, M. G., Webb, R. T., Baker, P. N., . . . Mortensen, P. B. (2008). Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch Gen Psychiatry*, 65(2), 146-152. doi: 65/2/146 [pii]
10.1001/archgenpsychiatry.2007.20
- Markham, J. A., & Koenig, J. I. (2011). Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. *Psychopharmacology (Berl)*, 214(1), 89-106. doi: 10.1007/s00213-010-2035-0
- Markham, J. A., Taylor, A. R., Taylor, S. B., Bell, D. B., & Koenig, J. I. (2010). Characterization of the cognitive impairments induced by prenatal exposure to stress in the rat. *Front Behav Neurosci*, 4, 173. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00173
- Messas, G. P., & Vallada Filho, H. P. (2004). O papel da genética na dependência do álcool. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 26, 5.
- Moore, S. C. (2010). Substitution and complementarity in the face of alcohol-specific policy interventions. *Alcohol Alcohol*, 45(5), 403-408. doi: agq048 [pii]
10.1093/alcalc/agq048
- Richoux, C., Ferrand, I., Casalino, E., Fleury, B., Ginsburg, C., & Lejoyeux, M. (2011). Alcohol use disorders in the emergency ward: choice of the best mode of assessment and identification of at-risk situations. *Int J Emerg Med*, 4(1), 27. doi: 1865-1380-4-27 [pii]
10.1186/1865-1380-4-27
- Seckl, J. R. (2004). Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol*, 151 Suppl 3, U49-62.

- Spanagel, R. (2000). Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Res Health*, 24(2), 124-131.
- Tomkins, D. M., & Sellers, E. M. (2001). Addiction and the brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence. *CMAJ*, 164(6), 817-821.
- Varcoe, T. J., Wight, N., Voultios, A., Salkeld, M. D., & Kennaway, D. J. (2011). Chronic phase shifts of the photoperiod throughout pregnancy programs glucose intolerance and insulin resistance in the rat. *PLoS One*, 6(4), e18504. doi: 10.1371/journal.pone.0018504
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Swanson, J. M., & Telang, F. (2007). Dopamine in drug abuse and addiction: results of imaging studies and treatment implications. *Arch Neurol*, 64(11), 1575-1579. doi: 10.1001/archneur.64.11.1575 [pii]
- Weaver, I. C. (2009). Epigenetic effects of glucocorticoids. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 14(3), 143-150. doi: 10.1016/j.siny.2008.12.002
- Wolffgramm, J., & Heyne, A. (1995). From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. *Behav Brain Res*, 70(1), 77-94. doi: 0166-4328(95)00131-C [pii]
- Zuena, A. R., Mairesse, J., Casolini, P., Cinque, C., Alema, G. S., Morley-Fletcher, S., . . . Maccari, S. (2008). Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. *PLoS One*, 3(5), e2170. doi: 10.1371/journal.pone.0002170

Anexo 5: Normas para publicação do artigo científico 2**PERIÓDICO**

Alcoholism: Clinical and Experimental Research

Fator de impacto: 3.468

Qualis Capes: Medicina II- A2 (2012)

SCOPE

Alcoholism: Clinical and Experimental Research's scope spans animal and human clinical research, epidemiological, experimental, policy, and historical research relating to any aspect of alcohol abuse, dependence, or alcoholism. This journal uses a multi-disciplinary approach in its scope of alcoholism, its causes, clinical and animal effect, consequences, patterns, treatments and recovery, predictors and prevention.

NORMAS PARA ELABORAÇÃO DO MANUSCRITO

O guia com informações e normas para elaboração do manuscrito para publicação encontra-se disponível em:

<http://www.wiley.com/bw/submit.asp?ref=0145-6008>

Anexo 6: Parecer do comitê de ética


Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética no Uso Animal

DECLARAÇÃO

Brasília, 30 de junho de 2010.



Declaramos que o projeto intitulado **“Consequências Tardias do Estresse Gestacional Sobre os Comportamentos Alimentar, Cognitivo e Emocional em Ratos”**, UnBDOC nº. 47921/2010, sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Kely de Picoli Souza, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


 Prof. Antonio Sebben
 Coordenador do CEUA

