

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**Efeitos a longo prazo de diferentes separações dos filhotes no período neonatal sobre as
genitoras**

EDUARDO VON POSER TOIGO

PORTO ALEGRE-RS, 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**Efeitos a longo prazo de diferentes separações dos filhotes no período neonatal sobre as
genitoras**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito parcial à
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas: Bioquímica

Orientador: Profa. Dra. Carla Dalmaz

Co-orientador: Dra. Letícia Pettenuzzo

“O único lugar no qual o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À professora Dr. Carla Dalmaz pela confiança e orientação iniciados com a iniciação científica e fortalecidos com a pós-graduação.

À Dr. Letícia Pettenuzzo, igualmente pela amizade, orientação e dedicação no auxílio ao desenvolvimento deste trabalho.

À todas as pessoas, pós graduandos e ICs do laboratório 37 pelo apoio e ajuda nos experimentos.

Aos funcionários da bioquímica, especialmente a Cléia da secretaria pela paciência.

Aos meus pais, Gilberto e Gilsane, pela confiança, motivação, apoio e amor durante todo esse tempo

Ao amor da minha vida, minha namorada Caroline pelo apoio incondicional, por ser minha parceira sempre, por me motivar e por fazer eu me sentir todos os dias o homem mais sortudo do mundo.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	3
Lista de abreviaturas	5
PARTE 1	
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Depressão	6
1.2. Separação Materna como modelo de depressão	9
1.3. Hedonia	11
1.4. Dopamina e depressão	14
1.5. Adenosina e depressão	15
1.6. Ocitocina, comportamento materno e depressão	17
1.7. Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase e a depressão	18
1.8. Estresse oxidativo na depressão	18
1.9. Óxido nítrico	20
1.10. Comportamento de risco	20
 OBJETIVOS	 22
PARTE 2	
CAPÍTULO 1 ARTIGO SUBMETIDO	23
CAPÍTULO 2	65
 DISCUSSÃO	 80
CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXO 1 ... fotos imunohistoquímica no microscópio confocal	103
ANEXO 2 ... fotos imunohistoquímica no microscópio fluorescência ...	106

RESUMO

Esse estudo foi realizado para verificar se a exposição a separações repetidas (por diferentes intervalos de tempo) de mães dos seus filhotes no período neonatal poderiam ser classificadas como indutoras de um estado do tipo deprimido em genitoras. Sessenta ratas Wistar prenhes foram divididas em 3 grupos: controle, separação por 10 minutos e separação por 3 horas. As intervenções neonatais foram realizadas nos dias 1-10 pós parto. Após o desmame as genitoras foram submetidas ao teste do nado forçado, ao teste do labirinto em cruz elevado e ao teste do odor de predador. Também foi avaliado o comportamento alimentar e os padrões de reatividade a um sabor doce e a um sabor amargo. Foi medido os níveis de ocitocina no líquido cefaloraquidiano, corticosterona plasmática e atividade hipocampal Na^+ , K^+ -ATPase, assim como a atividade das enzimas antioxidantes catalase, glutathiona peroxidase, superóxido dismutase, produção de radicais livres, e a produção de óxido nítrico, além dos níveis dos receptores A2A de adenosina e D2 de dopamina no estriado dorsoventral e no hipocampo. Foi observado que somente a separação por 3 h induziu um aumento significativo no tempo de imobilidade no teste do nado forçado, o que é consistente com estudos prévios. A atividade hipocampal da Na^+ , K^+ -ATPase se mostrou diminuída no grupo separado por 10 minutos e mais significativamente diminuída nas genitoras submetidas a separação por 3 horas de seus filhotes. Adicionalmente, os níveis de ocitocina no líquido cefaloraquidiano se encontravam aumentados no grupo separado por 10 minutos, o que pode estar relacionado a um aumento no cuidado materno, induzido por esta manipulação dos filhotes, por parte das genitoras, como reportado na literatura. Uma redução nos níveis de óxido nítrico no hipocampo das genitoras separadas por 3 horas foi observado. Nessas genitoras também foi verificado um aumento no comportamento de risco, uma diminuição no sentimento prazeroso frente a uma solução doce e aumento na sensibilidade a uma solução aversiva, o que é congruente a um perfil de estado do tipo deprimido. Além disso, nós verificamos uma diminuição na

quantidade do receptor de dopamina D2 no estriado das mães submetidas a separação por 3 horas dos filhotes, o que poderia ser relacionado com uma diminuição no prazer (anedonia) que acontece na depressão. Conclui-se que a retirada dos filhotes das mães por longos períodos tornam essas mães mais susceptíveis ao desenvolvimento de características depressivas.

Palavras-chaves: separação neonatal, ocitocina, teste do nado forçado, Na⁺, K⁺-ATPase, óxido nítrico, receptor de dopamina D2, receptor adenosina A2A, comportamento de risco, labirinto em cruz elevado, teste de odor de predador, paradigma de reatividade ao sabor.

ABSTRACT

This study was carried out to ascertain whether exposure to repeated separations (different times) of mothers from their pups in the neonatal period could be classified as an induction of a depressive-like state in dams. Sixty Wistar rats were divided into 3 groups: control, brief separation and long-term separation. The neonatal interventions were done on postpartum days 1-10. After weaning, the dams were subjected to the forced swimming test, elevated plus maze and predator odor test. It was also evaluated the feeding behavior and the taste reactivity patterns to a sweet and to a bitter solution. It was measured cerebral spinal fluid oxytocin, plasma corticosterone, and hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity, as well as the activity of the antioxidant enzymes catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, free radicals production, and the production of nitric oxide and the levels of adenosine A2A and dopamine D2 receptors in the dorsoventral striatum and hippocampus. It was observed that only the 3 h separation induced a significant increase in the immobility time of rats in the forced swimming test, which is consistent with previous studies. Hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity was decreased in the brief separated group and more significantly decreased in dams subjected to 3h separation from their pups. Additionally, cerebral spinal fluid oxytocin was increased in dams of the brief separated group, which may be related to the increased handled-induced maternal care, as reported in the literature. A reduction in nitric oxide levels in the hippocampus in dams of the long separated group was also observed. It was also verified an increase in the risk-taking behavior by the 3h separated mothers. The 3h separated mother also demonstrated a diminished feeling of pleasure with a sucrose solution and an increased sensibility to an aversive solution, which is congruent with a depressive like state profile. Furthermore, we showed a decrease in the dopamine D2 receptor quantity in the striatum of the 3 h separated mothers, which could be related to a decrease in pleasure feeling (anhedonia)

experienced in depression. It is concluded that the withdrawal of pups from their mothers for long periods make the mothers more susceptible to the development of depressive features.

Key words: neonatal separation, oxytocin, forced swimming test, Na⁺, K⁺-ATPase, nitric oxide, dopamine D2 receptor, adenosine A2A receptor, risk-taking behavior, plus-maze, predator odor test, taste reactivity paradigm.

LISTA DE ABREVIATURAS

DSMV-IV – Manual de diagnóstico e estatística de doenças mentais, 4º edição.

MAO - monoaminoxidase

COMT - catecol-O-metiltransferase

IMAOs - inibidores da monoaminoxidase

HHA - hipotalamo-hipófise-adrenal

DA - Dopamina

OT - ocitocina

GPx - glutathiona peroxidase

CAT - catalase

SOD - superóxido dismutase

EROs - espécies reativas de oxigênio

ERNs - espécies reativas de nitrogênio

ON - óxido nítrico

SNC - sistema nervoso central

PFA - paraformolaldeído

PVN - núcleo paraventricular

SON - núcleo supra-óptico

LCR - líquido cefalorraquidiano

PARTE 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Depressão

Transtornos do humor afetam aproximadamente 7% da população e estão enquadrados nas 10 principais causas de incapacitação profissional, estando associadas com uma morbidade grave e um aumento no risco de mortalidade (Murray *et al.*, 1996). Entre os quatro maiores transtornos de humor, a depressão é o mais comum. Esse transtorno é responsável por 4,4% do ônus mundial com doenças, uma contribuição semelhante a das doenças cardiovasculares isquêmicas ou diarréicas (Mann, 2005). As formas graves de depressão acometem cerca de 2-5% da população dos Estados Unidos e aproximadamente 20% sofre das formas mais leves. As mulheres são duas vezes mais acometidas que os homens. A incidência ao longo da vida é de 13% para homens e pode chegar até 25% para mulheres (American Psychiatric Association, 2000). Essa doença difere tanto qualitativa quanto quantitativamente de paciente para paciente, mas normalmente é caracterizada por desesperança, perda de reatividade humoral, incapacidade de obter prazer (anedonia), pensamentos suicidas e sintomas psicóticos, como delírios e alucinações (Nestler *et al.*, 2002).

O diagnóstico é feito a partir de um critério estabelecido pela “*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4^a Ed.*” (DSMV-IV) (US Department of Health). O DSMV-IV define que cinco ou mais sintomas característicos devem estar presentes durante duas semanas e devem representar uma mudança significativa na qualidade de vida do paciente para ser caracterizado como depressão. Pelo menos um dos sintomas deve ser humor deprimido ou perda de interesse e de prazer em atividades previamente prazerosas.

Os primeiros estudos clínicos da relação entre as monoaminas cerebrais e a depressão foram publicados por Freis (1954). Este pesquisador relatou que cinco pacientes hipertensos desenvolveram depressão após o tratamento com altas doses de reserpina. Esta substância causa uma depleção das monoaminas cerebrais, e desde então essa descoberta da relação das monoaminas com a depressão tem sido a base dos estudos para entender a fisiopatologia dessa doença e para o desenvolvimento de medicamentos antidepressivos (Pryor *et al.*, 1991). Nos anos 60, após a introdução dos primeiros medicamentos com efeito comprovadamente antidepressivo no mercado, se constatou que eles agiam em monoaminas (principalmente serotonina e noradrenalina) que atuam como neurotransmissores em sinapses nervosas. A serotonina e a noradrenalina são removidas das sinapses após sua liberação, por um processo de recaptação pelo neurônio pré-sináptico (Stahl, 1998). Após a recaptação, são destruídas dentro do neurônio, pelas enzimas monoaminoxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase (COMT) ou são novamente armazenadas em vesículas, para serem liberadas na fenda sináptica.

Utilizando-se desse conhecimento, verificou-se que os inibidores da monoaminoxidase (IMAOs) e substâncias capazes de inibir a recaptação das monoaminas (ex.: antidepressivos tricíclicos) produziam acúmulo do neurotransmissor na fenda sináptica. Essa constatação sugeriu inicialmente que os antidepressivos atuassem por aumento da transmissão serotoninérgica e noradrenérgica, compensando um possível estado de deficiência de neurotransmissores. No entanto, esse pensamento falha em explicar vários pontos relacionados à depressão: alguns antidepressivos (como a bupropiona e a mirtazapina) não têm efeito significativo nem sobre a MAO nem na recaptação de monoaminas; a cocaína e anfetaminas, potentes inibidores de recaptação de monoaminas, não têm efeito antidepressivo, o que leva à conclusão de que não há evidência convincente de que a depressão se deva somente à falta de transmissão noradrenérgica ou serotoninérgica (Stahl, 1998). Na realidade,

muitos pacientes com depressão grave, do tipo melancólica, parecem ter aumento e não deficiência da taxa de renovação ("*turnover*", isto é, síntese e destruição) de noradrenalina. Além disso, há uma grande discrepância temporal entre o rápido efeito bioquímico de antidepressivos, com aumento de neurotransmissores nas sinapses, em horas, e o efeito clínico antidepressivo, que leva cerca de duas semanas para se iniciar (Stahl, 1998).

Descobriu-se posteriormente que, em ratos, a administração de antidepressivos por duas semanas produz uma redução no número ("*down-regulation*") de determinados receptores adrenérgicos, acompanhada por alterações específicas em funções adrenérgicas. Alterações semelhantes em humanos poderiam explicar o tempo de evolução da ação antidepressiva desses medicamentos. Tal descoberta acabou por gerar uma nova teoria, de que alterações na sensibilidade de receptores monoaminérgicos, observadas após administração crônica de medicamentos, estão relacionadas ao mecanismo de ação antidepressiva (Stahl, 1998). Não há, entretanto nenhuma teoria plenamente convincente para explicar como a adaptação de receptores monoaminérgicos pode atuar na depressão.

Alterações lentas do Sistema Nervoso Central, que possam ser relacionadas ao efeito de antidepressivos, estão sendo pesquisadas. Uma hipótese nessa linha se refere a alterações no padrão de expressão gênica induzidas por antidepressivos, ou seja, pode ser que medicamentos antidepressivos modifiquem a forma como determinadas características biológicas se manifestam, por ação (inibição ou estímulo) em determinados genes (Stahl, 1998). Outra hipótese mais recente propõe a causa principal como uma reduzida atividade elétrica dos neurônios monoaminérgicos, uma vez que essa atividade é o fator limitante para a liberação dos neurotransmissores, ou seja, é o fator limitante da concentração das monoaminas (Kiss, 2008).

1.2. Separação Materna como modelo de depressão

Devido ao fato de que a depressão é uma doença multifatorial e de compreensão ainda limitada, existe um sério problema na pesquisa acerca dela: a falta de modelos animais validados. A maioria dos sintomas da depressão (humor deprimido, baixa auto-estima, idéias suicidas) é muito difícil de ser medida em animais de laboratório. Os modelos animais de depressão existentes hoje em dia baseiam-se nas similaridades entre as consequências de estressores crônicos, inescapáveis ou imprevisíveis e os sintomas da depressão. Os estressores incluem choque nas patas, restrição de movimento e/ou de água, agentes farmacológicos, procedimentos cirúrgicos e extremos de temperatura (Benmansour *et al.*, 1999; Lucki *et al.*, 2001; Cryan *et al.*, 2002; Newport *et al.*, 2002). Ao contrário dos modelos animais, a depressão em humanos ocorre na maioria das vezes devido a uma perda, rompimento ou mudança significativa em uma relação social.

A separação prolongada e repetida da mãe dos seus filhotes é um modelo animal que tem sido usado para estudar os efeitos de intervenções precoces nos filhotes quando estes chegam à vida adulta. Esse processo envolve separar os filhotes da mãe por normalmente 3 horas por dia durante as primeiras duas semanas de vida. Quando testados na idade adulta, estes filhotes apresentam respostas hormonais, comportamentais e neuroquímicas distintas dos filhotes não-separados, inclusive algumas características encontradas na depressão humana (Ladd *et al.*, 2000). Entretanto, não só os filhotes sofrem os efeitos da interação mãe-filhote neste período. A mãe também apresenta um conjunto de mudanças fisiológicas, muitas dessas estimuladas pelos próprios filhotes – tais como o estímulo de sucção que promove liberação de ocitocina e um aumento no comportamento agressivo frente a intrusos – de modo a cuidar de sua prole e garantir sua sobrevivência (Giovenardi *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2004). A estimulação feita pelos filhotes não só influencia o comportamento maternal, mas também a responsividade da mãe ao estresse. Por exemplo, ratas fêmeas apresentam, no

período final de gestação, no parto e no período de lactação, uma redução na resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) a uma variedade de estressores físicos e metabólicos (Walker *et al.*, 2004).

Vários estudos têm demonstrado o efeito da separação materna sobre os filhotes, considerando seu desenvolvimento neural e os efeitos produzidos quando atingem a idade adulta, incluindo alterações na resposta ao estresse (Levine *et al.*, 1967; Plotsky & Meaney, 1993; Ogawa *et al.*, 1994), e tem sido sugerido que as mudanças verificadas em animais adultos submetidos a separações maternas no período neonatal são, pelo menos em parte, devidas ao fato de que as separações são estressantes para as mães, pois isso vai alterar a interação mãe-filhote levando a uma transferência de respostas emocionais e ao estresse das mães para os filhotes, através de alterações na quantidade e na qualidade do cuidado materno (Ladd *et al.*, 2000; Pryce *et al.*, 2001; Macri & Wurbel, 2006). Entretanto, poucas investigações tem tido como objetivo verificar como os diferentes procedimentos de separação dos filhotes no período pós parto afetam as genitoras e se essas alterações se mantêm após o desmame, quando os animais são separados definitivamente da mãe e a longo prazo.

Sabe-se que uma relação mãe-filhote anormal leva a um aumento na vulnerabilidade a estresses psicológicos tanto na mãe como no filhote (Boccia & Pedersen, 2001). Em 2005, pesquisadores reportaram que estresse sócio-ambiental durante o período gestacional pode contribuir para o desenvolvimento de um transtorno do tipo deprimido em genitoras no período pós-parto (Misdrahi *et al.*, 2005). Outros estudos revelaram que genitoras separadas dos seus filhotes demonstraram uma diminuição no comportamento maternal (número de lambidas nos filhotes) (Boccia & Pedersen, 2001; Lovic *et al.*, 2001). Levando em conta todos estes aspectos, Boccia *et al.* (2007) sugeriram que separações longas repetidas das mães de seus filhotes poderiam produzir um comportamento do tipo deprimido em genitoras.

Desde então, outros estudos também têm proposto que separações longas repetidas entre a mãe e seus filhotes poderiam ser estressantes para a genitora e poderiam levar ao desenvolvimento de características do tipo deprimido nestas (Elizalde *et al.*, 2008; Eklund *et al.*, 2009; Maniam & Morris, 2010; Sung *et al.*, 2010). No entanto, é importante frisar que tais trabalhos desenvolvidos até hoje revelaram resultados divergentes e não conclusivos. Isso pode ser explicado por diversos fatores, tais como variações no cuidado materno, diferentes protocolos de separação materna, diferentes testes comportamentais usados, o fato de que o período pós-parto no qual os testes e as medidas bioquímicas são realizadas varia entre os estudos, assim como a utilização de diferentes grupos controle (não separados ou animais submetidos somente aos cuidados habituais de ratário).

1.3. Hedonia

Reações afetivas refletem a qualidade agradável ou desagradável do evento que as iniciam. Encontrar as causas neurais de reações afetivas positivas e negativas torna possível reconhecer e medir as reações a uma sensação quando ela ocorre. Existem várias estratégias diferentes para medir as reações: (1) medidas de avaliações subjetivas para avaliar o prazer consciente em humanos, (2) medida de desempenho em tarefas que gerem recompensa para examinar sistemas neurocomportamentais de recompensa em animais e humanos, ou (3) medida das reações afetivas fisiológicas e/ou comportamentais determinadas por um impacto hedônico imediatamente após a sensação prazerosa em animais e humanos.

Processos psicológicos afetivos implícitos ou inconscientes podem ocorrer no cérebro independentemente de sentimentos conscientes (Berridge, 1999; Damasio, 1999; LeDoux, 1996; Zajonc, 2000), assim como processos como percepção, aprendizado e cognição podem

ocorrer independentemente de qualquer consciência deles (Berridge & Winkielman, 2003; Winkielman et al, 2005).

Estudos que dependem de respostas conscientes de prazer podem falhar em observar reações afetivas em resposta a um evento (Winkielman, Zajonc, & Schwarz, 1997; Zajonc, 1980; Zajonc, 2000) e, por outro lado, a reação afetiva pode acontecer inconscientemente (Berridge & Winkielman, 2003; Damasio, 1999; Winkielman et al., 2005). A questão do que um animal sente frente a um estímulo é um tópico fascinante, porém de muito difícil estudo. Por outro lado, a questão de como o animal reage comportamentalmente e fisiologicamente a um estímulo prazeroso ou aversivo é algo possível de ser avaliado. A expressão facial de um bebê em resposta a um sabor doce é um exemplo de uma reação afetiva positiva a uma sensação prazerosa (Steiner, 1973; Steiner et al., 2001). Bebês normais tem essencialmente dois padrões de expressões faciais à sabores: afetivo positivo e afetivo negativo. O sabor doce do açúcar normalmente determina padrões positivos, como movimentos de protrusões de língua. Por outro lado, sabores aversivos determinam comportamentos negativos, como bocejos, sacudidas de cabeça e ranger de dentes (Ganchrow et al., 1983; Rosenstein & Oster, 1988; Steiner et al., 2001). O paradigma da responsividade afetiva ao sabor propõe que as várias reações afetivas apresentadas por camundongos e ratos são homólogas às reações faciais afetivas de humanos neonatos, macacos e grandes primatas - protrusões rítmicas da língua em resposta a sacarose (estímulo de recompensa) e bocejos e ranger de dentes em resposta ao ácido acético (estímulo aversivo). Através da quantificação dessas reações faciais é possível analisar a resposta a uma recompensa ou a um estímulo aversivo (Berridge, 2000; Feurte' *et al.*, 2000; Berridge 2003).

O prazer que o sabor doce gera dentro do cérebro é ativado por sistemas neurais que fazem do prazer uma sensação relacionada ao "gostar". Podemos estar acostumado a pensar em sabores doces como inerentemente agradáveis, mas esse prazer não está contido no

detalhe intrínseco de sua sensação e sim em sua capacidade para atuar como chaves que destravam a ativação dos sistemas de "gostar" do cérebro (Berridge & Kringelbach, 2008; James, 1884). Isto é evidente, considerando que, se a capacidade de desbloquear sistemas cerebrais hedônicos não está funcionando corretamente, um sabor doce pode não gerar a sensação prazerosa que ele geraria normalmente, permanecendo doce como sempre. Por outro lado, o prazer deve ser traduzido em motivação ou "querer", a fim de que recompensa do alimento influencie o comportamento alimentar, levando a uma motivação para comer.

A saliência do incentivo é atribuída a recompensas e suas dicas preditivas, as quais ajudam a determinar o seu valor motivacional (Pelchat et al., 2004). “Querer” é psicológica e neuralmente diferente do gostar, mesmo que eles ocorram normalmente juntos. Tanto o “querer” quanto o “gostar” são necessários para uma recompensa normal. “Querer” sem o “gostar” é meramente uma recompensa parcial, sem sensação prazerosa em nenhum sentido. A recompensa na sua totalidade não pode ocorrer sem a saliência do incentivo, mesmo se o “gostar” hedônico estiver presente. O “querer” pode ser também um processo psicológico da saliência motivacional do incentivo (Berridge & Robinson, 1998; Everitt & Robbins, 2005; Robinson & Berridge, 2003; Salamone & Correa, 2002).

Anedonia, a incapacidade de experimentar emoções prazerosas frente a eventos normalmente prazerosos tais como alimentação, exercício, interações sociais ou atividades sexuais, é considerada como um dos principais sintomas da depressão. Vários estudos de modelos animais, tais como o estresse crônico variável é capaz de induzir anedonia, sintoma este que é revertido pela administração de diferentes classes de antidepressivos (Willner, 1997; Willner *et al.*, 1992 a,b). Em adição as mudanças já bem estabelecidas na resposta a recompensas (anedonia), mudanças na reatividade a estímulos aversivos também acontecem na depressão. Essas mudanças consistem de uma tendência a enfatizar e representar em

demasia estímulos aversivos e experimentar sentimentos de pouca valia e culpa excessiva ou inapropriada. (American Psychiatric Association 1994).

1.4. Dopamina e a depressão

Dentre os muitos neurotransmissores que se acredita possam estar envolvido em distúrbios do sistema nervoso central, a dopamina tem recebido muita atenção, graças principalmente à distribuição disseminada de seus receptores por todo o cérebro e o seu papel em várias funções centrais, tais como a cognição, emoção, percepção, motivação, recompensa e sono. Acredita-se que distúrbios das vias dopaminérgicas centrais possam estar envolvidos no desenvolvimento de vários transtornos, tais como ansiedade, depressão e comportamentos compulsivos (Goetz, 2010; Ferrara & Stacy, 2008)

Vários estudos ao longo dos anos têm sugerido que a dopamina (DA) possui um papel na depressão (Willner, 1983; Jimerson, 1987; Kapur & Mann 1992, Berridge, 2007), e evidências experimentais obtidas em animais sugerem que a dopamina está implicada no funcionamento de antidepressivos (Nomikos *et al* 1991; Rossetti *et al* 1991; Dailly *et al.*, 2004) e, além disso, administração aguda de antidepressivos pertencentes a diferentes classes farmacológicas aumentam os níveis de dopamina extracelular no córtex pré-frontal (Tanda *et al.*, 1994). Em adição, ratos submetidos a estresse crônico variável, um modelo animal de depressão, demonstram uma liberação dopaminérgica diminuída no *shell* do núcleo accumbens e no córtex pré-frontal em resposta a uma exposição a um alimento palatável, o que pode ser revertido por tratamento crônico com desipramina (Di Chiara & Tanda 1997). Existem diferentes tipos de receptores dopaminérgicos: do tipo D1 (D1 e D5) e do tipo D2 (D2, D3 e D4). Existe normalmente uma expressão disseminada de todos os receptores dopaminérgicos pelo cérebro, com níveis abundantes de D1 e D2 e níveis moderados de D3,

D4 e D5 (Dailly et al., 2004; Emilien et al., 1999), sendo que os receptores D1 e D2 são encontrados principalmente no estriado, córtex, hipotálamo e bulbo olfatório (Creese et al., 1982; 1983; Senogles et al., 1988).

1.5. Adenosina e a depressão

A adenosina é um nucleosídeo formado pela união de uma adenina e uma ribose, presentes no meio intra e extracelular, possuindo um papel neuromodulador e hemostático (Cunha, 2001). A produção intracelular resulta da clivagem da S-adenosil-homocisteína, do ATP, do ADP ou do AMP. Enquanto o ATP funciona como um neurotransmissor em algumas áreas cerebrais, a adenosina não é armazenada ou liberada como um neurotransmissor clássico (Fredholm *et al.*, 2007)

Como a adenosina não é liberada por exocitose, ela funciona como uma molécula sinalizadora extracelular que influencia na transmissão sináptica modulando a atividade do sistema nervoso central no nível celular, pré-sináptico (inibindo ou facilitando a liberação de neurotransmissores) ou pós-sináptico (hiperpolarizando ou despolarizando neurônios) e/ou exercendo efeitos não-sinápticos (Ribeiro *et al.*, 2003)

A neuromodulação da adenosina é exercida através da ativação de quatro diferentes tipos de receptores, de alta afinidade (A1 e A2A), baixa afinidade (A2B) e o A3 que é um receptor de alta afinidade em humanos, mas ocorre em baixa densidade na maioria dos tecidos (Fredholm *et al.*, 2001). Os receptores A2A estão localizados principalmente no sistema nervoso central, ocorrendo basicamente no estriado, nos neurônios gabaérgicos do caudado-putamen, no núcleo acumbens e em menor quantidade em outras regiões do cérebro.

A adenosina modula vários receptores de neurotransmissores no cérebro, incluindo receptores dopaminérgicos (Xu *et al.*, 2005). Os receptores dopaminérgicos D1 e D2 são os principais reguladores da função estriatal e os receptores da adenosina A1 e A2A são os principais moduladores dessa via de sinalização. Essa modulação da adenosina ocorre através de interações receptor-receptor. Existem principalmente dois tipos de interações entre receptores da adenosina e os receptores dopaminérgicos no gânglio basal, a interação antagonista entre receptores A1/D1 e receptores A2A/D2 nos neurônios gabaérgicos da via estriato-palidal. A co-localização desses receptores no corpo estriado e núcleo acumbens está também bem estabelecida (Fredholm *et al.*, 1999)

A modulação do sistema adenosinérgico tem sido ligada à depressão através de observações que demonstram que a adenosina e seus análogos causam comportamentos do tipo deprimido em dois modelos animais de depressão amplamente utilizados: a elevação dos níveis de adenosina aumenta o tempo de imobilidade em ratos submetidos a choques inescapáveis assim como no teste do nado forçado (Hunter *et al.*, 2003; Minor *et al.*, 1994; Woodson *et al.*, 1998). Outro argumento sobre a capacidade do sistema adenosinérgico em controlar a depressão é a observação de que antidepressivos clássicos revertem a esse aumento no tempo de imobilidade induzido por adenosina em ambos os testes (Kulkarni & Mehta, 1985). El Yacoubi *et al.* (2001) encontraram que antagonistas de receptor A2A prolongam o comportamento de escape em dois testes de varredura para antidepressivos, a suspensão pela causa e o nado forçado. A observação de que a administração de um antagonista para receptor do tipo D2 (haloperidol) previne os efeitos antidepressivos resultantes do bloqueio ou inativação dos receptores A2A levou ao desenvolvimento da hipótese de que interações entre a dopamina e adenosina podem estar envolvidas nos efeitos eliciados pelas manipulações de receptores A2A (El Yacoubi *et al.*, 2001, 2003).

1.6. Ocitocina, comportamento materno e depressão

Vários estudos demonstram que a ocitocina (OT) está implicada na mediação neuromonal de certos comportamentos (van Leengoed *et al.*, 1987; Consiglio & Lucion, 1996; Pedersen, 1997; Nelson & Panksepp, 1998), como por exemplo, o reflexo da liberação de leite durante a lactação, e o comportamento materno frente a seus filhotes e frente a um potencial agressor (Giovenardi *et al.*, 1998). Ela também modula relações (apego), comportamento sexual, comportamentos sociais, memória, ansiedade, estresse e a imunidade.

Evidências fisiológicas apoiam a correlação entre ocitocina e o bem estar. A administração de ocitocina está relacionada com um menor tempo de imobilidade no teste do nado forçado e diminuição do comportamento do tipo ansioso no teste do labirinto em cruz elevado (Consiglio, 2006).

Recentemente, foi demonstrado que os neuropeptídios, incluindo a OT, possuem propriedades antioxidantes. Observou-se que a oxidação desse peptídeo poderia ajudar a preservar o hipotálamo, apesar de ser ao custo da integridade deste produto e das ações comportamentais positivas, já mencionadas, que ele exerce. Portanto, é possível que a OT atue como uma segunda linha de proteção contra as espécies reativas de oxigênio (EROs), quando outros antioxidantes (Glutationa Peroxidase [GPx], Catalase [CAT] e Superóxido Dismutase [SOD]) não são suficiente como proteção para uma situação com alto estresse oxidativo. Os efeitos comportamentais da OT poderiam estar diminuídos em função da preservação do hipotálamo (Consiglio, 2006).

Devido ao fato de que a liberação de glicocorticóides antes do nascimento aumenta tanto em roedores como em mulheres, e a resposta de neurônios ocitocinérgicos ao estresse é inibida no final da gestação (Scantamburlo et al., 2009), disfunção no sistema ocitocinérgico no cérebro materno pode ser um candidato para explicar a depressão pós-natal (Neumann, 2008).

1.7. Na⁺, K⁺-ATPase e a depressão

A Na⁺, K⁺-ATPase é a enzima responsável pelo transporte ativo dos íons sódio e potássio, sendo responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico necessário para excitabilidade neuronal e para regulação do volume das células neurais. Vários estudos têm sugerido que a atividade da isoforma cerebral da Na⁺, K⁺-ATPase poderia estar envolvida na etiologia de transtornos mentais. Particularmente, tem sido mostrado que a atividade dessa enzima está diminuída em pacientes com depressão e outros transtornos psiquiátricos (Hokin-Neaverson & JeVerson, 1989; El-Mallakh & Wyatt, 1995; Goldstein *et al.*, 2006), assim como no hipocampo de animais submetidos a um modelo de depressão (estresse crônico variável) (Gamero *et al.*, 2003; Goldstein *et al.*, 2006). Um estudo recente demonstrou que um tratamento antidepressivo previniu a diminuição da atividade da Na⁺K⁺-ATPase verificada em um modelo de comportamento depressivo por exposição ao malation (Acker *et al.*, 2009).

1.8. Estresse oxidativo na depressão

A fosforização oxidativa, que acontece na mitocôndria da célula, é a principal fonte de ATP em organismos aeróbicos. O lado negativo deste processo é que, como um subproduto, ela pode produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas altamente reativas que

podem gerar lipoperóxidos e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que irão propagar a reação de oxidação iniciada pelas EROs. Esses dois subprodutos possuem tanto papéis positivos quanto negativos na célula. Em concentrações baixas ou moderadas, eles atuam em processos fisiológicos normais, tais como na resposta celular a uma injúria ou infecção, na sinalização e na mitose (Valko *et al.*, 2007). Por outro lado, quando o balanço oxidativo é desequilibrado, levando a altas concentrações de EROs/ERNs, as células exibem condições prejudiciais de estresse oxidativo e nitrosativo.

O dano causado pelo estresse oxidativo tem um papel já bem caracterizado em várias condições patológicas, tais como doenças cardiovasculares, isquemia/reperfusão, diabetes e transtornos psiquiátricos (Halliwell, 2007; Valko *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2008). Vários estudos têm demonstrado alterações em parâmetros de estresse oxidativo na depressão e em modelos animais dessa doença (Palumbo *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2008; Cumurcu *et al.*, 2009; Kodydková *et al.*, 2009; Lucca *et al.*, 2009; Rezin *et al.*, 2009; Khovryakov *et al.*, 2010). O hipocampo, assim como todo o cérebro, é especialmente vulnerável a danos causados por radicais livres devido ao seu alto consumo de oxigênio, abundante quantidade de lipídios e relativa pobreza de enzimas antioxidantes (Olanow *et al.*, 1992; Halliwell *et al.*, 2007). O estresse oxidativo acontece quando há um desbalanço entre as defesas antioxidantes e as espécies oxidativas. Nesse caso, as defesas antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), não são capazes de neutralizar as espécies reativas eficientemente (Halliwell *et al.*, 2007). Como consequência, pode ocorrer dano a proteínas, lipídios e ao DNA das células (Cochrane *et al.*, 1991).

Tanto um estresse psicológico (Matsumoto *et al.*, 1999) quanto físico (Zafir & Banu, 2009) podem modular as defesas antioxidantes e aumentam o dano oxidativo no cérebro. Um aumento na geração do ânion superóxido foi observado no hipocampo e no córtex pré-frontal após os animais serem submetidos ao protocolo de estresse crônico variável (Lucca *et al.*,

2009), enquanto que níveis aumentados de óxido nítrico foram encontrados no cérebro total de camundongos (Matsumoto *et al.*, 1999), no hipocampo de ratos (Harvey *et al.*, 2004) e no soro de ratos submetidos a diferentes paradigmas de estresse (Kampe *et al.*, 2009).

1.9. Óxido nítrico

O óxido nítrico (ON) é um mensageiro multifuncional do sistema nervoso central (SNC) que consegue sinalizar tanto na direção anterógrada como retrógrada nas sinapses (Feil & Kleppisch, 2008). Estudos recentes, tanto em humanos (Oliveira *et al.*, 2008) como em modelos animais (Joca & Guimaraes, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Hua *et al.*, 2008; Wegener *et al.*, 2010), sugerem um envolvimento do ON endógeno hipocampal na neurobiologia do estresse e da depressão. Administração intra-hipocampal de inibidores da ON sintase induzem efeitos do tipo antidepressivo em roedores (Joca & Guimaraes, 2006; Wang *et al.*, 2008). Do mesmo modo, tratamentos com antidepressivos diminuem a produção de ON no córtex cerebral e no hipocampo (Ikenouchi-Sugita *et al.*, 2009). Por outro lado, a administração de um estimulante da produção de óxido nítrico reverteu efeitos do estresse crônico variado e deficiências na neurogênese hipocampal em camundongos (Zhou *et al.*, 2007; Hua *et al.*, 2008).

1.10 Comportamento de risco

A depressão e o comportamento de risco são dois fatores que aparecem muitas vezes em conjunto. Os centros de prevenção e controle de doenças dos Estados Unidos têm conduzido ao longo dos anos uma pesquisa telefônica sobre o comportamento de risco em adolescentes e jovens adultos. Essas pesquisas revelaram que comportamentos de risco como sexo sem o uso de preservativos, fumo, abuso de álcool e drogas são bastante comuns (Kann *et al.*, 1996; Grunbaun *et al.*, 1996). Uma pesquisa com 4.023 famílias demonstrou que o abuso de drogas

e a dependência estavam associados com estresse pós-traumático e/ou depressão maior entre garotos e garotas adolescentes (Kilpatrick et al., 2003). Uma outra pesquisa realizada no Reino Unido com 2.624 adolescentes conduzida pelo Instituto Nacional de estatística do Reino Unido demonstrou uma forte associação entre o fumo, o abuso de álcool e o uso de maconha com doenças psiquiátricas (Bender et al., 2006). Em animais como roedores, o comportamento de risco é caracterizado como exposição a situações perigosas no qual os animais estariam vulneráveis a presença de predadores. Esse comportamento é medido em tarefas como o teste do odor de predador e o teste do labirinto em cruz elevado (Cortese et al., 2009; Lofgren et al., 2009)

2. Objetivos

2.1. Gerais

Avaliar os efeitos de separações repetidas das mães dos filhotes no período neonatal sobre parâmetros relacionados a um comportamento do tipo depressivo nas genitoras.

2.2. Específicos

Avaliar os efeitos de separações repetidas das mães dos filhotes sobre:

1. Os níveis de ocitocina no líquido cefalorraquidiano das mães;
2. A atividade da enzima Na^+ , K^+ , ATPase no hipocampo;
3. Atividade de enzimas antioxidantes e do dano oxidativo ao hipocampo e ao estriado;
4. O comportamento alimentar das mães;
5. A responsividade das mães a um sabor prazeroso ou aversivo;
6. Comportamento defensivo frente a exposição a um odor de predador;
7. Receptores do tipo A2 e D2 no hipocampo e estriado;

Parte 2

Capítulo 1: Efeitos a longo prazo de separações repetidas de seus filhotes no período neonatal sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos de mães – um estudo em animais de experimentação.

O presente trabalho teve como objetivo aprofundar a análise de efeitos da separação materna em ratos. Foram analisados diferentes parâmetros, como atividade hipocampal da enzima Na^+ , K^+ -ATPase, produção de óxido nítrico e produção de radicais livres. Também foram analisados os níveis de ocitocina no fluido cerebrospinal e corticosterona plasmática, além do comportamento no teste do nado forçado.

Os resultados obtidos estão apresentados a seguir no manuscrito intitulado: Long-lasting effects of separation from their pups on behavior and biochemical parameters related to a depressive state of dams using a rat model. Submetido à revista *Journal of Neural Transmission*.

Long-lasting effects of separation from their pups on behavior and biochemical parameters related to a depressive state of dams using a rat model

Eduardo von Poser Toigo^{1,2}; Luisa A. Diehl^{1,3}, Andréa G. K. Ferreira^{1,2}, Vanize Mackendanz^{1,2}, Rachel Krolow^{1,2}, André N. D. Benitz¹, Cristie Noschang^{1,2}, Ana Paula Huffell¹, Angelica R. Consiglio⁴, Patrícia P. Silveira⁵, Angela T. S. Wyse^{1,2}; Carla Dalmaz^{1,2,3}

¹Departamento de Bioquímica, ²PPG Bioquímica, ³PPG Neurociências, ICBS, and ⁴Departamento de Biofísica, IB, ⁵Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author: carladalmaz@yahoo.com.br

Running Head: Effects of pups separation on dams

Abstract

This study was carried out to ascertain whether exposure to repeated separations (3h per day) of mothers from their pups in the neonatal period could be classified as an induction of a depressive-like state in dams. Forty-eight Wistar rats were divided into 3 groups: control, brief separation and long-term separation. The neonatal interventions were done on postpartum days 1-10. After weaning, the dams were subjected to the forced swimming test and later cerebral spinal fluid oxytocin, plasma corticosterone, and hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity were measured, as well as the activity of the antioxidant enzymes catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, free radicals production, and the production of nitric oxide. It was observed that only the 3h separation induced a significant increase in the immobility time of rats in the forced swimming test, which is consistent with previous studies. Hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity was decreased in the brief separated group and more significantly decreased in dams subjected to 3h separation from their pups. Additionally, cerebral spinal fluid oxytocin was increased in dams of the brief separated group, which may be related to the increased handled-induced maternal care, as reported in the literature. A reduction in nitric oxide levels in the hippocampus in dams of the long separated group was also observed. It is concluded that the withdrawal of pups from their mothers for long periods make the mothers more susceptible to the development of depressive features.

Key words: neonatal separation, oxytocin, forced swimming test, Na^+ , K^+ -ATPase, nitric oxide.

1. Introduction:

Mood disorders affect approximately 7% of the population (Murray & Lopes, 1996), and depression is the most common of these disorders, affecting women two times more than men (Nestler et al., 2002). Besides, women appear to be more susceptible to depression during pregnancy and the postpartum period (Marcus, 2009), and maternal depression affects the offspring in many different ways, including emotional, cognitive and physiologically.

Animal models of depression have used chronic exposure to stressors, such as restraint, foot shock, water and/or food deprivation, in order to induce depressive-like states in animals (Cryan et al., 2002; Lucassen et al., 2004; Lucki et al., 2001; Malatynska et al., 2002; Newport et al., 2002). However, depression in humans more often entails disruption of, or change in significant social relationships. In this scenario, a more homologous animal model to study human depression would be based on depression-like responses to social relationship disruptions. In this sense, Boccia et al. (2007) studied the performance of the female genitors subjected to separation from their pups on the forced swimming test, an animal model commonly used to assess depression (Cryan et al., 2002; Porsolt et al., 1978), and suggested that repeated long term separation from pups could be responsible for the onset of depression-like behaviors in rodents. Other studies have also proposed that repeated long term maternal separation is stressful to the dams and can lead to depressive-like characteristics (Eklund et al., 2009; Sung et al., 2010)

Some biochemical changes have been related to depression. Na^+ , K^+ -ATPase is the enzyme responsible for the active transport of sodium and potassium ions, and it maintains the electrochemical gradient necessary for neuronal excitability and regulation of neuronal cell volume. Accumulating evidence has suggested that brain Na^+ , K^+ -ATPase activity may be involved in the etiology of mental disorders. In particular, studies have shown that the activity of Na^+ , K^+ -ATPase is decreased in patients with depression and other

psychiatric disorders (El-Mallakh & Wyatt, 1995; Goldstein et al., 2006; Hokin-Neaverson & JeVerson, 1989) as well as in hippocampus of animals subjected to a model of depression (chronic mild stress) (Gamaro et al., 2003; Goldstein et al., 2006).

Nitric oxide (NO) is a multifunctional messenger in the central nervous system (CNS) that can signal both in antero- and retrograde directions across synapses (Feil and Kleppisch, 2008). Recent studies, both in humans (Oliveira et al., 2008) and in animal models (Hua et al., 2008; Joca & Guimaraes, 2006; Wang et al., 2008; Wegener et al., 2010; Zhou et al., 2007), suggest an involvement of endogenous hippocampal nitric oxide (NO) in the neurobiology of stress and depression. Intra-hippocampal administration of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors induce antidepressant-like effects in rodents (Joca & Guimaraes, 2006; Wang et al., 2008). In this same line of evidence, treatment with antidepressives causes a decrease in NO production in cerebral cortex and hippocampus (Ikenouchi-Sugita et al., 2009). On the other hand, administration of a NO donor reversed chronic mild stress-induced behavioral despair and hippocampal neurogenesis impairment in mice (Hua et al., 2008; Zhou et al., 2007).

Several studies have shown alterations in oxidative stress parameters in depression and animal models of this disease (Cumurcu et al., 2009; Jang et al., 2008; Khovryakov et al., 2010; Kodydková et al., 2009; Lucca et al., 2009; Palumbo et al., 2007; Rezin et al., 2009). The hippocampus, as well as the whole brain, is especially vulnerable to free radical-induced damage because of its high oxygen consumption, abundant lipid content and relative paucity of antioxidant enzymes (Halliwell et al., 2007; Olanow et al., 1992). Oxidative stress happens when there is an imbalance between antioxidant defenses and oxidative species. In this case, the antioxidant defenses, such as the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), are not able to neutralize the reactive species efficiently (Halliwell et al., 2007). As consequences, cellular proteins, lipids and DNA may be damaged (Cochrane et al., 1991).

Finally, several studies have demonstrated that oxytocin is implicated with the neurohormonal mediation of certain behaviors (Consiglio & Lucion, 1996; Nelson & Panksepp, 1998; Pedersen, 1997; van Leengoed et al., 1987). Physiological evidences support the correlation between oxytocin and well-being, and administration of oxytocin is related with lower immobility time in the forced swimming test and diminished anxiety-like behavior observed in the elevated plus-maze (review in: Consiglio, 2006).

In the present study, we aimed to further analyse the effects of maternal separation in rats on different parameters including hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity, NO production, free radical production and antioxidant enzymes activities. We also evaluated cerebrospinal fluid oxytocin, and plasma corticosterone, in addition to the forced swimming test.

2. Material and Methods

Animals: Pregnant Wistar rats randomly selected were bred in the Department of Biochemistry of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Animals were housed alone in home cages made of Plexiglas (65 x 25 x 15 cm) with the floor covered with sawdust and were maintained in a controlled environment until parturition: lights on between 07:00h and 19:00h, temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, cage cleaning once a week, food and water provided. All litters were culled to eight pups within 24 h after birth and were maintained intact unless for maternal separation procedures, which were carried out between 10:00h and 14:00h. Weaning was on postnatal day 21. Rats had free access to food (standard lab rat chow) and water.

All animal treatments were approved by the Institutional Ethical Committee and followed the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS).

Maternal separation procedures: The day of birth was considered as day 0. Maternal separation was carried out daily during days 1-10 of life, after which pups were left undisturbed until the 21 day of life.

Brief maternal separation (n=16): Cages were taken to another room and pups were removed from their home cage and placed into a clean cage lined with clean paper towel, inside an incubator at 32°C next to the dam's cage. After 10 minutes, pups were returned to their dams.

Prolonged maternal separation (n=16): Procedures were the same as for brief maternal separation, but pups remained in the incubator during 3 h. After 3 h, pups were returned to their dams.

Non-handled group (n=16): Pups were left undisturbed with the dam until weaning.

It was stated on the cage that these animals should not be touched, not even for cage cleaning. Dirty sawdust was carefully removed from one side of the cage, without disturbing the dam and the nest, and replaced by clean sawdust at that side by the principal researcher. Different animals were used in the different evaluations: 24 animals (8/group) were used for behavioral measurements, cerebral spinal fluid oxytocin, plasma corticosterone and hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase evaluations, and other set of 24 animals were used to oxidative stress measurements. Weaning was on postnatal day 21, and maternal cerebral spinal fluid collection was made on this day. Rats were transported to another room and anesthetized with 120 mg/kg ketamine HCl (Dopalen: Agribands, Campinas, SP, Brazil) and 16 mg/kg xylazine (Anasedan: Agribands, Campinas, SP, Brazil). Cerebral spinal fluid samples were obtained by magna cistern puncture and stored at -70°C for oxytocin measurement.

The forced swimming test: In this test, the animals are subjected to two trials during which they are forced to swim in a cylinder filled with water, and from which they cannot escape. The time that the test animal spends without moving in the second trial is measured. The classic interpretation is that immobility in the second test is a behavioural correlate of

negative mood (a depressive state). Therefore, three days after weaning, the dams were placed individually in a cylindrical apparatus measuring 20 cm in diameter and containing 30 cm of water at 23-24°C. A different set of animals were subjected to this test on day 35th post-partum, when the biochemical studies were performed. The animals were subjected to the procedure of swimming for 15 minutes on the first day and for 5 minutes on the second day (test). At the end of each swimming session, the animals were dried using towels. The time of immobility - the period that the animal was floating, with the nose on the surface of the water and making only slight movements with the front paws or the tail to not submerge was measured on the test day (Hargreaves et al., 2005; Porsolt et al., 1977; Porsolt et al., 1978).

Exposure to the open field : A 50-cm high, 40 x 60-cm open field made of wood with a frontal glass wall was used (Silveira et al., 2005). The floor was subdivided with white lines into 12 equal 13.3-by 15.0-cm rectangles. A different group of animals (including genitors from non-handled, brief- and prolonged maternal separation groups) were submitted to this task seven days after weaning, and were gently placed facing the left corner and allowed to explore the arena for 30 min. The distance traveled was counted and used as a measure of exploratory behavior.

Biochemical measurements: Two weeks after weaning, animals were sacrificed between 13:00 and 16:00 hours, the brain was rapidly removed, and the hippocampus was dissected and stored at -70°C until analysis. Trunk blood was collected into heparinized tubes, centrifuged at 4°C at 3,000 g, and plasma separated and stored at -20°C until analysis. All animals were sacrificed within this interval of time in a random order considering groups.

Oxytocin content: Oxytocin was measured in cerebral spinal fluid by ELISA, using a commercial kit (ELISA kit for immunoassay of oxytocin produced by Assay designs, Ann Arbor, USA).

Plasma corticosterone determination: Plasma was extracted with ethyl acetate, and the extract evaporated and dissolved for the hormone evaluation with an ELISA kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA).

Preparation of synaptic plasma membrane from hippocampus: Synaptic plasma membranes were prepared according to the method of Jones and Matus (1974), with some modifications (Wyse et al., 2000), to evaluate Na^+, K^+ -ATPase activity. The hippocampus was homogenized in 10 volumes of a 0.32-M sucrose solution containing 5 mM HEPES and 1 mM EDTA. The homogenate was centrifuged at 1000 g for 20 min and the supernatant removed and centrifuged at 12000 g for a further 20 min. The pellet was then resuspended in hypotonic buffer (5.0 mM Tris-HCl buffer, pH 8.1), incubated at 0°C for 30 min, and applied on a discontinuous sucrose density gradient consisting of successive layers of 0.3, 0.8, and 1.0 M. After centrifugation at 69,000 g for 2 h, the fraction at the 0.8–1.0 M sucrose interface was taken as the membrane enzyme preparation.

Na^+, K^+ -ATPase activity assay: The reaction mixture for the Na^+, K^+ -ATPase assay contained 5.0 mM MgCl_2 , 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl, and 40.0 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, in a final volume of 200 μl . The reaction was started by the addition of ATP (disodium salt, vanadium free) to a final concentration of 3.0 mM. Control was assayed under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na^+, K^+ -ATPase activity was calculated by the difference between the two assays (Tsakiris & Deliconstantinos, 1984; Wyse et al., 2000). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan et al. (1986). Enzyme-specific activities were expressed as nmol Pi released per minute per milligram of protein. Protein was measured by the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin used as standard. All assays were performed in duplicate, and the mean was used for statistical analysis.

Measurements of antioxidant enzymes activities and NO evaluation:

For determination of antioxidant enzymes activities and for nitric oxide evaluation, the hippocampus was homogenized in 10 vol (w:v) ice-cold 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), containing 1 mM EDTA. The homogenate was centrifuged at 4,000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatant was used. The total protein concentrations were determined using the method described by Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as the standard.

Free Radical Content: To assess the free radicals content we used 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a probe. This method does not determine the presence of specific free radicals, because dichlorofluorescein (DCFH) may be oxidized by several reactive intermediates (15). An aliquot of the sample was incubated with DCFH-DA (100 µM) at 37°C for 30 min. The reaction was terminated by chilling the reaction mixture in ice. The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and emission wavelengths of 488 and 525 nm, respectively, using a fluorescence spectrophotometer (Hitachi F-2000). The free radicals content was quantified using a DCF standard curve and results were expressed as pmol of DCF formed/mg protein. All procedures were performed in the dark, and blanks containing DCFH-DA (no homogenate) were processed for measurement of autofluorescence.

Nitric Oxide Production: Nitric oxide production was determined by measuring its metabolites nitrate (NO^3^-) and nitrite (NO^2^-), according to Miranda et al (2001). The principle of this assay is the reduction of nitrate by vanadium (III) combined with detection by the acidic Griess reaction. The resulting pink-stained pigment was determined in a spectrophotometer at 540 nm. A calibration curve was performed using sodium nitrite (0.2 – 4.0 nmol). Nitric oxide production values were calculated as nmol nitrite/mg protein.

Superoxide Dismutase Activity: Superoxide dismutase activity was determined using a RANSOD kit (Randox Labs., USA) which is based on the procedure described by Delmas-Beauvieux et al. (1995). This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radicals that react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride to form a formazan dye that is assayed spectrophotometrically at 492 nm at 37°C. The inhibition in production of the chromogen is proportional to the activity of SOD present in the sample.

Glutathione Peroxidase Activity: Glutathione peroxidase activity was determined according to Wendel (1981), with modifications. The reaction was carried out at 37°C in 200 µL of solution containing 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.7), 1.1 mM EDTA, 0.44 mM sodium azide, 0.5 mM NADPH, 2 mM glutathione and 0.4 U glutathione reductase. The activity of GPx was measured taking tert-butylhydroperoxide as the substrate at 340 nm. The contribution of spontaneous NADPH oxidation was always subtracted from the overall reaction ratio. GPx activity was expressed as nmol NADPH oxidized per minute per mg protein.

Catalase Activity: Catalase is an enzyme that degrades hydrogen peroxide (H₂O₂), and its activity assessment is based upon establishing the rate of H₂O₂ degradation spectrophotometrically at 240 nm at 25°C (Aebi, 1984). CAT activity was calculated in terms of micromol of H₂O₂ consumed per minute per mg of protein, using a molar extinction coefficient of 43.6 M⁻¹cm⁻¹.

Statistical analysis: Data were expressed as mean ± standard error of the mean, and were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Duncan multiple range test when the F test was significant. The significance level was accepted as different when the *P* value was equal or less than 0.05. Sample size varies in each experiment and is shown individually in the Results section.

3. Results

The forced swim test was used to evaluate depressive-like behavior, measuring immobility time on the test day. A one-way ANOVA showed significant differences between the groups [$F(2,18)=3.908$; $p < 0.05$], since dams separated from their pups for 3h/day showed higher immobility than dams subjected to shorter periods of separation or controls (Duncan's Post-Hoc, $p < 0.05$; Results shown in Figure 1). A different set of animals from 3 h maternal separated and control groups were evaluated on the 35th day post-partum, to verify if the effect was maintained. This time was chosen because it was the time when biochemical evaluations were performed. Separated genitors kept showing higher immobility time when compared to control group [mean \pm SEM (s): control, 193.8 ± 14.8 ; 3h separated, 247.8 ± 7.2 ; Student's t test, $t(10) = 3.6$; $P < 0.01$].

Other animals from these groups were subjected to the open field to evaluate motor activity. A one-way ANOVA showed no significant differences between the groups [$F(2,16)=0.246$; $p = 0.780$] (data not shown).

Biochemical measurements were done on the 35^o day post-partum. Plasma corticosterone showed no significant difference between the groups, although there was a non-significant increase in the 3h-separation group [ANOVA, $F(2,13)=0.920$; $p > 0.05$; Results are displayed in Figure 2A). As shown in Figure 2B, significant differences were observed in cerebral spinal fluid oxytocin [$F(2,28)=4.519$; $p < 0.05$], which were increased in the dams of the 10 min separation group in comparison to the dams of the 3h separation and the control group [Duncan's Post-Hoc, $p < 0.05$].

One-way ANOVA showed a significant difference in hippocampal $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ activity [$F(2,12)= 7.737$; $p < 0.01$], due to a decreased activity in the hippocampus of the

dams separated from their offspring for either 10 min or 3h in relation to the control group [Duncan's Post-Hoc test; $p < 0.05$; Results are shown in Figure 3).

Antioxidant enzymes activities and reactive species production in hippocampus from these animals were also evaluated. As displayed in Table 1, no difference was found in the activity of the antioxidant enzymes CAT [ANOVA, $F(2,21) = 1.48$; $p > 0.05$], GPx [ANOVA, $F(2,21) = 0.71$; $p > 0.05$] and SOD [ANOVA, $F(2,20) = 0.47$; $p > 0.05$], neither in the production of free radicals, measured by the DCF test [ANOVA, $F(2,14) = 0.16$; $p > 0.05$; Figure 4]. As shown in Fig 5, significant differences were observed in NO levels [ANOVA, $F(2,17) = 5.75$; $p < 0.05$], which were diminished in the dams of the 3h separation group in comparison to the other groups.

4. Discussion

This work intended to verify if long and/or brief repeated separation from the pups in the neonatal period may trigger the behavior characteristics associated with depressive in the dams, and to correlate, at the neurochemical level, changes in behavior with neurobiological modifications. We observed that repeated 3h separation increased immobility during the forced swimming test in dams. Cerebral spinal fluid oxytocin levels were increased at weaning only in the dams of the 10 min separation group. Hippocampal $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ activity was decreased in both separation groups, at least until 14 days postpartum. Additionally, NO levels were diminished in the dams of the 3h separation group in comparison to the other groups.

The increased immobility in the forced swim test has been considered as suggestive of a depressive-like state (Cryan et al., 2002; Porsolt et al., 1979), or at least it is considered to indicate stress vulnerability. The genitors whose offspring were subjected to repeated

handling (10 min) showed no differences in the immobility time in this test compared to controls. This result is consistent with the findings of Boccia et al. (2007), who also found increased immobility time in dams subjected to long separation from their pups. The separation from the pups seems to be a good approach to modeling depressive states in rodents (Boccia et al. 2007; Newport et al., 2002).

In order to study in this model biochemical markers which have been related to depressive-like state, we demonstrated that the hippocampal activity of Na^+, K^+ -ATPase was decreased in both groups subjected to separation from the pups (either 10 min or 3 h). These measurements were made two weeks post-partum and not soon after behavioral testing, since it has been shown that exposure to situations involving stress reduce Na^+, K^+ -ATPase activity in hippocampus, an effect that lasts for some hours and is not present in the following days (Wyse et al., 2004). Several studies show that the reduced activity of the enzyme Na^+, K^+ -ATPase is an important feature of depression (Acker et al., 2009; El-Mallakh & Li, 1993; El-Mallakh & Wyatt, 1995), and the reduction in this enzyme activity in hippocampus has been observed in other animal models of depression (de Vasconcellos et al., 2005, Gamaro et al., 2003, Goldstein et al., 2006). Besides, treatment with antidepressives such as fluoxetine (Zanatta et al., 2001) and desipramine (Viola & Rodríguez de Lores Arnaiz, 2007) has been reported to enhance Na^+, K^+ -ATPase activity in rat brain. This result further supports maternal separation for long periods as a model of depression. However, the reduced activity of Na^+, K^+ -ATPase in hippocampal synaptic membranes does not appear to be a specific characteristic of depressive states, since the 10 min separated group, which did not show any behavioral sign of depression, had also a reduced activity of this enzyme, similar to the dams separated for 3h. We cannot exclude, however, a higher susceptibility to a depressive state in this group of animals, not detected in the behavioral test used.

An extensive literature has shown that prolonged exposure to stressful situations may cause adverse effects in the hippocampus of rodents, including neuronal atrophy, possibly decreasing the number of synapses in the hippocampus (Duman & Monteggia 2006; Schmidt et al., 2007). In patients with depression, morphological alterations, such as volumetric reductions, have been verified in hippocampus (Chen et al., 2010; Lorenzetti et al., 2009). Therefore, it is possible that the exposure to stress represented by separation from their pups could lead to atrophy, which could be related to the decreased activity of Na^+, K^+ -ATPase observed in depression (de Vasconcellos et al., 2005). However, in this study we did not observe altered corticosterone levels in the separated group, which would be an evidence of increased stress. Another possibility to explain the decreased Na^+, K^+ -ATPase involves the redox status of the cell, since this enzyme activity has been reported to be reduced in oxidative stress situations (Morel et al., 1998; Petrushanko et al., 2006; Streck et al., 2001; Wilhelm et al., 2009). We observed no effects on antioxidant enzymes activities or on free radicals production when measured by the DCF test. Therefore, it is unlike that oxidative imbalance could explain the reduced activity of Na^+, K^+ -ATPase observed in both models of maternal separation. On the other hand, synaptosomal membrane Na^+, K^+ -ATPase activity is known to be stimulated by levels of neurotransmitters such as catecholamines (Rodríguez de Lores Arnaiz, 1992) as well serotonin (Rodríguez de Lores Arnaiz & Yamauchi, 1995), and these systems may be altered in depressive states.

In the present study, increased plasma corticosterone levels were expected in the dams of the 3h separation group, but these levels were not significantly different from the control group. On the other hand, the levels of glucocorticoids regarding depression syndrome are very diverse, as shown by several studies that show increased cortisol (Charlton & Ferrier, 1989; Pariante et al., 1995; Wolkowitz et al., 2009) or no difference in this hormone levels in

depressed patients (Kling et al., 1991; Kling et al., 1993; Molchan et al., 1993; Pitts et al., 1995).

It has been shown that oxidative stress can be associated with the pathophysiology of depression (Andreazza et al., 2010; Kodydková et al., 2009; Rezin et al., 2009). Our results showed that different maternal separation in the postnatal period appear to not affect the antioxidant enzymes activities or free radicals production in the hippocampus. This does not mean absence of oxidative stress, since other parameters may have been altered, such as damage to lipids or proteins, in this or other brain structures. Additionally, since the interventions used to induce these alterations (maternal separation) were applied during the first 10 days postpartum, and biochemical evaluations were done at 35 days postpartum, it is possible that previous alterations in free radicals productions could have returned to normal levels and other studies are warranted to evaluate this possibility.

Oxytocin is released in several regions of the brain, such as the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nuclei (SON) of the hypothalamus, particularly by magnocellular neurons (Wotjak et al., 2001). Several studies have shown that oxytocin is involved in the mediation of maternal behavior (Kendrick, 2000; van Leengoed et al., 1987). The manipulation or any other type of stimulation of the animal in the neonatal period causes a disturbance of the dam-pups relationship. It has been reported that dams separated from their pups for brief periods increase their maternal behavior, especially pup-licking, while dams separated for long periods (3 to 6 h) decrease their maternal behavior (Boccia & Pedersen, 2001; Lovic et al., 2001) or show similar increase in active maternal care (Macri et al., 2008). It was also reported that higher rates of maternal care, i.e., number of pup-licking, are accompanied by an increase in oxytocin receptors in various areas of the brain (Champagne & Meaney, 2001), as well as increased oxytocinergic projections (Shahrokh et al., 2010). In the present study, higher levels of oxytocin were observed in the cerebral spinal fluid of animals

subjected to brief periods of separation from their pups, which is consistent with the data reported above. Dams of the separated group did not show difference in cerebral spinal fluid oxytocin. It is important to note that the increase was observed at weaning (on postpartum day 21), showing that this effect remains even after a reasonable time has been elapsed after the period of the neonatal manipulation, which occurred only in the first 10 days after birth. It is also possible that this increased oxytocin in dams that had their pups briefly separated could act as a factor protecting these animals from a depressive-like behavior, since administration of oxytocin is possibly related to the relief of depressive symptoms and diminished anxiety-like behavior (Consiglio, 2006).

The decrease in the nitric oxide production observed in the 3h separated group in this study could also be due to an atrophy of hippocampal nitric oxide producing neurons (Palumbo et al., 2007). A decrease in the NO levels could diminish neural activity and synaptic plasticity in the hippocampus, which is believed to be mediated by NO (Hua et al., 2008). This could lead to cognitive impairments such as learning and memory disabilities (Law et al., 2002; Palumbo et al., 2007), other features of the depressive syndrome. As mentioned earlier, distinct effects have been reported concerning NO and depression. A variety of studies suggests an involvement of nitric oxide synthase in the pathophysiological mechanism of stress-associated depression-like behavior (Joca & Guimarães, 2006; Wang et al., 2008; Zhou et al., 2007), while some antidepressants reduce NO production (Ikenouchi-Sugita et al., 2009). However, it has also been shown that administration of NOS inhibitors N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) leads to increases in the animals' depression (Khovryakov et al., 2010), and accordingly, exogenous NO (through a NO donor) benefits chronic stress-induced depression by stimulating hippocampal neurogenesis (Hua et al., 2008). Therefore, it is possible that the reduced NO production observed in the long-term separated group may be implied in the depressive-like behavior observed.

In conclusion, our results show that the maternal separation (by removing the pups from mothers 3h/dia for 10 days) during the neonatal period may trigger a depressive-like behavior in dams, at least in these animals. This conclusion is supported by an increased immobility time in the forced swimming test and the decreased nitric oxide levels and of Na^+, K^+ -ATPase activity and in the hippocampus, although the reduced activity of this enzyme was not specific to the 3h separated group. In the group subjected to brief periods of separation (removing them from the mother 10 min/dia for 10 days) there was an increase in cerebral spinal fluid oxytocin, an effect that may be related to the increase in maternal care reported in the literature for this type of neonatal intervention. Therefore, it is possible that the important point here is the combinations of factors. In this sense, while both interventions (brief and long separation from the pups) reduce Na^+, K^+ -ATPase activity, which would be related to a depressive state, the fact that the brief separated group showed increased oxytocin levels could be a protective factor, since oxytocin has been related with well-being and lower immobility time in the forced swimming test (Shahrokh et al., 2010; Consiglio, 2006). Additionally, besides these factors that we evaluated, other factors could be playing a part. The depressive effects demonstrated in this study can be of use to the development of a model to study the consequences of depression in the postpartum period.

Acknowledgments: We thank the CNPq, Capes and FINEP/Rede IBN 01.06.0842-00. for their financial support

References

Acker CI, Luchese C, Prigol M, Nogueira CW (2009) Antidepressant-like effect of diphenyl diselenide on rats exposed to malathion: involvement of Na⁺K⁺ ATPase activity. *Neurosci Lett* 455:168-172.

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121—126.

Andreazza AC, Shao L, Wang JF, Young LT (2010) Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 67:360-368.

Arató M, Bánki CM, Nemeroff CB, Bissette G (1986) Hypothalamic– pituitary–adrenal axis and suicide. *Ann N Y Acad Sci* 487:263–270.

Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999) The role of corticotrophin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* 160:1-12.

Bánki CM, Bissette, Arató M, O'Connor L, Nemeroff CB (1987) Cerebrospinal fluid corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depression and schizophrenia. *Am J Psychiatry* 144:873–877.

Bánki CM, Karmacs L, Bissette G, Nemeroff CB (1992) Cerebrospinal fluid neuropeptides in mood disorders and dementia. *J Affect Disord* 25:39–46.

Barden N (2004) Implication of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the physiopathology of depression. *J Psychiatry Neurosci* 39:185–191.

Beck CT (1999) Maternal depression and child behavior problems: a meta-analysis. *J Adv Nurs* 29:623-629.

Boccia ML, Pedersen CA (2001) Brief vs. long maternal separation in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior, lactational levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 26: 657–672.

Boccia ML, Razzoli M, Vadlamudi SP, Trumbull W, Caleffie C, Pedersen CA (2007) Repeated long separations from pups produce depression-like behavior in rat mothers. *Psychoneuroendocrinology* 32:65-71.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-die-binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

Champagne F, Meaney MJ (2001) Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. *Prog Brain Res* 133:287-302.

Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380.

Charlton BG, Ferrier IN (1989) Hypothalamo-pituitary-adrenal axis abnormalities in depression: a review and a model. *Psychol Med* 19:331-6.

Chen MC, Hamilton JP, Gotlib IH (2010) Decreased hippocampal volume in healthy girls at risk of depression. *Arch Gen Psychiatry* 67:270-276.

Cicchetti D, Rogosch FA, Toth SL (1998) Maternal depressive disorder and contextual risk: contributions to the development of attachment insecurity and behavior problems in toddlerhood. *Dev Psychopathol* 10:283-300.

Cochrane CG (1991) Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med* 12:137—147.

Coppen A, Shaw DM, Malleon A, Costain R (1966) Mineral metabolism in mania. *Br Med J* 5479:71–75.

Consiglio AR, Lucion AB (1996) Lesion of hypothalamic paraventricular nucleus and maternal aggressive behavior. *Physiol Behav* 59:591-596.

Consiglio AR (2006) Depression under the perspective of oxytocin. *CNS Agents in Medicinal Chemistry* 6:293-310.

Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23:238–245.

Cumurcu BE, Ozyurt H, Etikan I, Demir S, Karlidag R (2009) Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: Impact of antidepressant treatment. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 63:639–645.

Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Dumon MF et al (1995) Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clin Biochem* 28:163-169.

de Vasconcellos AP, Zugno AI, Dos Santos AH, Nietto FB, Crema LM, Gonçalves M, Franzon R, de Souza Wyse AT, da Rocha ER, Dalmaz C (2005) Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. *Neurobiol Learn Mem* 84:102-110.

Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116-1127.

Eklund MB, Johansson LM, Uvnäs-Moberg K, Arborelius L (2009) Differential effects of repeated long and brief maternal separation on behavior and neuroendocrine parameters in Wistar dams. *Behavioural Brain Research* 203:69–75.

El-Mallakh RS, Li R (1993) Is the Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase the link between Phosphoinositide metabolism and bipolar disorder? *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 5:361–368.

El-Mallakh RS, Wyatt RJ (1995) The Na⁺, K⁺-ATPase hypothesis for bipolar illness. *Biol Psychiatry* 37:235–244.

Ericinska M, Silver IA (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 16:37-71.

Feil R, Kleppisch T (2008) NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol* 184:529-560.

France RD, Urban B, Krishnan KRR, Bissette G, Bánki CM, Nemeroff CB, Speilman FJ (1988) CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in chronic pain patients with and without major depression. *Biol Psychiatry* 23:86–88.

Gamaro GD, Streck EL, Matté C, Prediger ME, Wyse AT, Dalmaz C (2003) Reduction of hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Res* 28:1339-1344.

Giovenardi M, Consiglio AR, Barros HMT, Lucion AB (2000) Pup age and aggressive behavior in lactating rats. *Braz J Med Res* 33:1083-1088.

Goldstein I, Levy T, Galili D, Ovadia H, Yirmiya R, Rosen H, Lichtstein D (2006) Involvement of Na, K -ATPase and Endogenous Digitalis-Like Compounds in Depressive Disorders. *Biol Psychiatry* 60:491–499.

Hargreaves GA, McGregor IS, Sachdev PS (2005) Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation is antidepressant but not anxiolytic in rat models of anxiety and depression. *Psychiatry Res* 15:113-121.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.

Hawkins RD, Son H, Arancio O (1998) Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res* 118:155-172.

Hokin-Neaverson M, JeVerson JW (1989) Erythrocytes sodium pump activity in bipolar affective disorder and other psychiatry disorders. *Neuropsychobiology* 22:1-7.

Hua Y, Huang XY, Zhou L, Zhou QG, Hu Y, Luo CX, Li F, Zhu DY (2008) DETA/NOONOate, a nitric oxide donor, produces antidepressant effects by promoting hippocampal neurogenesis. *Psychopharmacology* 200:231-242.

Ikenouchi-Sugita A, Toyohira Y, Yoshimura R, Ueno S, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N (2009) Opposite effects of milnacipran, a serotonin norepinephrine reuptake inhibitor, on the levels of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor in mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 380:479-86.

Jang S, Suh SH, Yoo H, Lee Y, Oh S (2008) Changes in iNOS, GFAP and NR1 Expression in Various Brain Regions and Elevation of Sphingosine-1-phosphate in Serum after Immobilized Stress *Neurochem Res* 33:842-851.

Joca SR, Guimarães FS (2006) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology* 185:298-305.

Jones DH, Matus AI (1974) Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combination flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta* 356:276–287.

Kendrick KM (2000) Oxytocin, motherhood and bonding. *Exp Physiol* 85:111-124.

Khovryakov AV, Podrezova EP, Kruglyakov PP, Shikhanov NP, Balykova MN, Semibratova NV, Sosunov AA, McKhann G, Airapetyants MG (2010) Involvement of the NO Synthase System in Stress-Mediated Brain Reactions *Neuroscience and Behavioral Physiology* 40:333-337.

Kling MA, Roy A, Doran AR, Calabrese JR, Rubinow DR, Whitfield HJ, May C, Post RM, Chrousos GP, Gold PW (1991) Cerebrospinal fluid immunoreactive corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotropin secretion in Cushing's disease and major depression: potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 72:260–271.

Kling MA, Rubinow DR, Doran AR, Roy A, Davis CL, Calabrese JR, Nieman LK, Post RM, Chrousos GP, Gold PW (1993) Cerebrospinal fluid immunoreactive somatostatin concentrations in patients with Cushing's disease and major depression: relationship to indices of corticotropin-releasing hormone and cortisol secretion. *Neuroendocrinology* 57:79–88.

Kodydková J, Vávrová L, Zeman M, Jiráček R, Macáček J, Staňková B, Tvrzická E, Žák A (2009) Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clinical Biochemistry* 42:1368–1374.

Law A, O'Donnell J, Gauthier S, Quirion R (2002) Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired Long-Evans rats. *Neuroscience* 112:267–275.

Leengood E, Kerker E, Swanson HH (1987) Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *J Endocrinol* 112:275-282.

Levine S (1994) The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann N Y Acad Sci* 30:275-288.

Levine S, Haltmeyer GC, Karas GG, Denenberg VH (1967) Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. *Physiol Behav* 2:55–59.

Looney SW, El-Mallakh RS (1997) Meta-analysis of erythrocyte Na,K-ATPase activity in bipolar illness. *Depress Anxiet* 5:53–65.

Lorenzetti V, Allen NB, Fornito A, Yücel M (2009) Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies. *J Affect Disord* 117:1-17.

Lovic V, Gonzalez A, Fleming AS (2001) Maternally separated rats show deficits in maternal care in adulthood. *Dev Psychobiol* 39:19–33.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75.

Lucassen PJ, Fuchs E, Czeh B (2004) Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiat* 55:789–796.

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Gavioli EC, Quevedo J (2009) Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochemistry International* 54:358–362.

Lucki I, Dalvi A, Mayorga AJ (2001) Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology* 155:315–322.

Macri S, Chiarotti F, Würbel H (2008) Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav Brain Res* 191: 227-234.

Macrí S, Mason GJ, Würbel H (2004) Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *Eur J Neurosci* 20:1017-1024.

Malatynska E, Goldenberg R, Shuck L, Haque A, Zamecki P (2002) Reduction of submissive behavior in rats: a test for antidepressant drug activity. *Pharmacology* 64:8–17.

Marcus SM (2009) Depression during pregnancy: rates, risks and consequences-Motherisk Update. *Can J Clin Pharmacol* 16:15-22.

McIntosh J, Anisman H, Merali Z (1999) Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Dev Brain Res* 113:97-106.

Molchan SE, Hill JL, Martinez RA, Lawlor BA, Mellow AM, Rubinow DR, Bissette G, Nemeroff CB, Sunderland T (1993) CSF somatostatin in Alzheimer's disease and major depression: relationship to hypothalamic-pituitary-adrenal axis and clinical measures. *Psychoneuroendocrinology* 19:509-519.

Morel P, Tallineau C, Pontcharraud R et al (1998) Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int* 33:531-540.

Murray CJ, Lopez AD (1996) Evidence-based health policy – lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 274:740 – 743.

Mynett-Johnson L, Murphy V, McCormack J, Shields DC, ClaVey E, Manley P (1998) Evidence for an allelic association between bipolar disorder and Na⁺ K⁺ adenosine triphosphatase alpha subunit gene (ATP1A3). *Biol Psychiat* 44:47-51.

Naylor GJ, McNamee HB, Moody JP (1971): Changes in erythrocyte sodium and potassium on recovery from depressive illness. *Br J Psychiatry* 118: 219-223.

Nelson EE, Panksepp J (1998) Brain substrates of infant-mother attachment: contributions of opioids, oxytocin, and norepinephrine. *Neurosci Biobehav Rev* 22:437-452.

Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226:1342–1344.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of Depression. *Neuron* 34:13-25.

Neumann ID (2002) Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Progr Brain Res* 139:147-162.

Newport DJ, Stowe ZN, Nemeroff CB (2002) Parental depression: animal models of an adverse life event. *Am J Psychiat* 159:1265–1283.

Nurnberger J, Jimerson DC, Allen JR, Simmons S, Gershon E (1982): Red cell ouabain-sensitive Na⁺-K⁺-adenosine triphosphatase: a state marker in affective disorder inversely related to plasma cortisol. *Biol Psychiatry* 17:981–992.

Ogawa T, Mikuni M, Kuroda Y, Muneoka K (1994) Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacol Biochem Behav* 49:961–967.

Olanow CW (1992) An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 32:2-9.

Oliveira RM, Guimarães FS, Deakin JF (2008) Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Braz J Med Biol Res* 41:333-41.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 87:315—424.

Palumbo ML, Fosser NS, Rios H, Zubilete MAZ, Guelman LR, Cremaschi GA, Genaro AM (2007) Loss of hippocampal neuronal nitric oxide synthase contributes to the stress-related deficit in learning and memory. *Journal of Neurochemistry* 102:261–274.

Pauli-Pott U, Mertesacker B, Beckmann D (2004) Predicting the development of infant emotionality from maternal characteristics. *Dev Psychopathol* 16:19-42.

Pariante CM, Nemeroff CB, Miller AH (1995) Glucocorticoid receptors in depression. *Isr J Med Sci* 31:705-12.

Pedersen CA (1997) Oxytocin control of maternal behavior: regulation by sex steroids and offspring stimuli. *Ann N Y Acad Sci* 807:126-145.

Peretti CS, Martin P, Bayle F, Banzet S (2003) Definitions and recommendations for studying the delay of antidepressant action: methodological aspects. *Encephale* 29:313-321.

Petrushanko I, Bogdanov N, Bulygina E et al. (2006) Na-K-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:916-925.

Pitts AF, Samuelson SD, Meller WH, Bissette G, Nemeroff CB, Kathol RG (1995) Cerebrospinal fluid corticotropin-releasing hormone, vasopressin, and oxytocin concentrations in treated patients with major depression and controls. *Biol Psychiat* 38:330–335.

Plotsky PM, Meaney MJ (1993) Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Mol Brain Res* 18:195–200.

Pögün S, Kuhar MJ (1994) Regulation of neurotransmitter reuptake by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci* 738:305-15.

Porsolt RD, Bertin A, Blavet N, Deniel M, Jalfre M (1979) Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur J Pharmacol* 57:201–210.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1978) “Behavioural despair” in rats and mice: strain difference and the effects of imipramine. *Europ J Pharmacol* 51:281–294.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730–732.

Rezin GT, Amboni G, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL (2009) Mitochondrial Dysfunction and Psychiatric Disorders. *Neurochem Res* 34:1021–1029.

Rodríguez de Lores Arnaiz G, Yamauchi L (1995) Serotonin reverses the inhibitory effect of a brain soluble fraction on Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Biocell* 19:153–157.

Rodríguez de Lores Arnaiz G (1992) In search of synaptosomal Na⁺, K⁺-ATPase regulators. *Mol Neurobiol* 6:359–375.

Rybakowsky J, Potok E, Strzizewski W, Nowakowska C (1984) Erythrocyte cation transport disturbances in patients with endogenous depression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 11:319–326.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1984) Glucocorticoid sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6174–6177.

Schmidt HD, Duman RS (2007) The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav Pharmacol* 18:391-418.

Shahrokh DK, Zhang TY, Diorio J, Gratton A, Meaney MJ (2010) Oxytocin-dopamine interactions mediate variations in maternal behavior in the rat. *Endocrinology* 151: 2276-2286.

Shaw DM (1966): Mineral metabolism, mania, and melancholia. *Br Med J* 5508:262–267.

Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C. (2005) The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23: 93-99.

Streck EL, Zugno AI, Tagliari B et al (2001) Inhibition of rat brain Na⁺, K⁺-ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. *Neurochem Res* 26:1195-1200.

Sung YH, Shin MS, Cho S, Baik HH, Jin BK, Chang HK, Lee EK, Kim CJ (2010) Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus. *Neurosci Lett* 470:86-90.

Tsakiris S, Deliconstantinos G (1984) Influence of phosphatidylserineon (Na⁺ + K⁺)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. *Biochem J* 220:301–307.

van Leengoed E, Kerker E, Swanson HH (1987) Inhibition of postpartum maternal behavior in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. *J Endocrinol* 112: 275-282.

Viola MS, Rodríguez de Lores Arnaiz G (2007) Brain Na⁺, K⁺-ATPase isoforms: different hypothalamus and mesencephalon response to acute desipramine treatment. *Life Sci* 81:228-233.

Walker CD, Deschamps S, Proulx K, Tu M, Salzman C, Woodside B, Lupien S, Gallo-Payet N, Richard D (2004) Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *Rev Psychiatr Neurosci* 29:364-382.

Wang D, An SC, Zhang X (2008) Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci Lett* 433:59-64.

Wegener G, Harvey BH, Bonefeld B, Müller HK, Volke V, Overstreet DH, Elfving B (2010) Increased stress-evoked nitric oxide signalling in the Flinders sensitive line (FSL) rat: a genetic animal model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:461-73.

Wang D, An SC, Zhang X (2008) Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci Lett* 433:59-64.

Wegener G, Harvey BH, Bonefeld B, Müller HK, Volke V, Overstreet DH, Elfving B (2010) Increased stress-evoked nitric oxide signalling in the Flinders sensitive line (FSL) rat: a genetic animal model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:461-473.

Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-333.

Wilhelm EA, Jesse CR, Bortolatto CF, et al. (2009) Anticonvulsant and antioxidant effects of 3-alkynyl selenophene in 21-day-old rats on pilocarpine model of seizures. *Brain Res Bull* 79:281-287.

Wolkowitz OM, Burke H, Epel ES, Reus VI. Glucocorticoids. Mood, memory, and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1179:19-40.

Wotjak CT, Naruoi T, Muraoka S, Simchen R, Landgraf R, Engelman M (2001) Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci* 13:2273-2281.

Wyse AT, Bavaresco CS, Reis EA, Zugno AI, Tagliari B, Calcagnotto T, Netto CA (2004) Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. *Physiol Behav.* 80: 475-479.

Wyse ATS, Streck EL, Worm P, Wajner A, Ritter F, Netto CA (2000) Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res* 25:971–975.

Zanatta LM, Nascimento FC, Barros SV, Silva GR, Zugno AI, Netto CA, Wyse AT (2001). In vivo and in vitro effect of imipramine and fluoxetine on Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptic plasma membranes from the cerebral cortex of rats. *Braz J Med Biol Res* 34:1265-1269.

Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X, Zhu XJ, Wang B, Xu JS, Zhu DY (2007) Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem* 103:1843-1854.

Table 1

Evaluation of the antioxidant enzymes activities in hippocampus of dams subjected to brief (10 min) or long (3 h) separation from their pups during the neonatal period, in relation to the control group. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of SOD (U/mg protein), GPx (nmol NADPH oxidized/min/mg protein), and CAT (μ mol H₂O₂ transformed/min/mg protein) activities. N = 8/group.

Antioxidant enzyme	Control	Separated 10 min	Separated 3 h
SOD	3.87 + 0.67	4.70 + 0.86	3.56 + 0.75
GPx	0.60 + 0.11	0.72 + 0.12	0.48 + 0.16
CAT	2.26 + 0.73	3.72 + 0.73	1.84 + 0.82

A one-way ANOVA showed no differences between groups.

Legends to Figures

Figure 1. Immobility time in the forced swimming test, in dams separated 10 min or 3h daily from their pups during the neonatal period, in relation to the control group. There was a significant effect of the neonatal intervention (One-way ANOVA, $p < 0.05$). $N = 5-8$ animals per group.

* Significant difference in comparison to control and separated 10 min groups (Duncan's Post-Hoc test, $p < 0.05$).

Figure 2. Plasma corticosterone and cerebral spinal fluid oxytocin in dams separated 10 min or 3 h daily from their pups during the neonatal period, in relation to the control group. A. Plasma corticosterone. There was no significant difference between the groups (ANOVA, $p > 0.05$). $N = 4-7$ animals per group. B. cerebral spinal fluid oxytocin. There was a significant effect of the neonatal intervention (One-way ANOVA, $p < 0.05$). $N = 4-6$ animals per group.

* Significant difference compared to control and separated 3 h groups (Duncan's Post-Hoc test, $p < 0.05$).

Figure 3. Na^+, K^+ -ATPase activity in hippocampal synaptic membranes from dams separated 10 min or 3 h daily from their pups during the neonatal period, in relation to the control group. There was a significant effect of the neonatal intervention (One-way ANOVA, $p < 0.05$). $N = 4-6$ animals per group.

* Significant difference compared to the control group (Duncan's Post-Hoc test, $p < 0.05$).

Figure 4. Levels of reactive species and NO production in hippocampus from dams separated 10 min or 3h daily from their pups during the neonatal period, in relation to the control group. A. Reactive species levels, measured through the DCF test. There was a significant effect of the neonatal intervention (One-way ANOVA, $p < 0.05$). $N = 5-8$ animals per group.

* Significant difference compared to control and separated 10 min groups (Duncan's Post-Hoc test, $p < 0.05$).

Figure 1

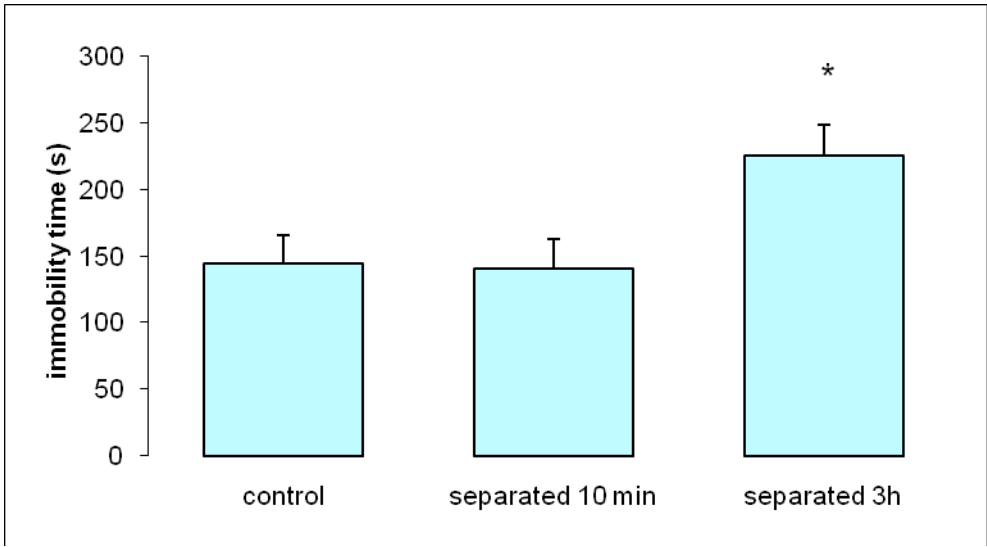


Figure 2

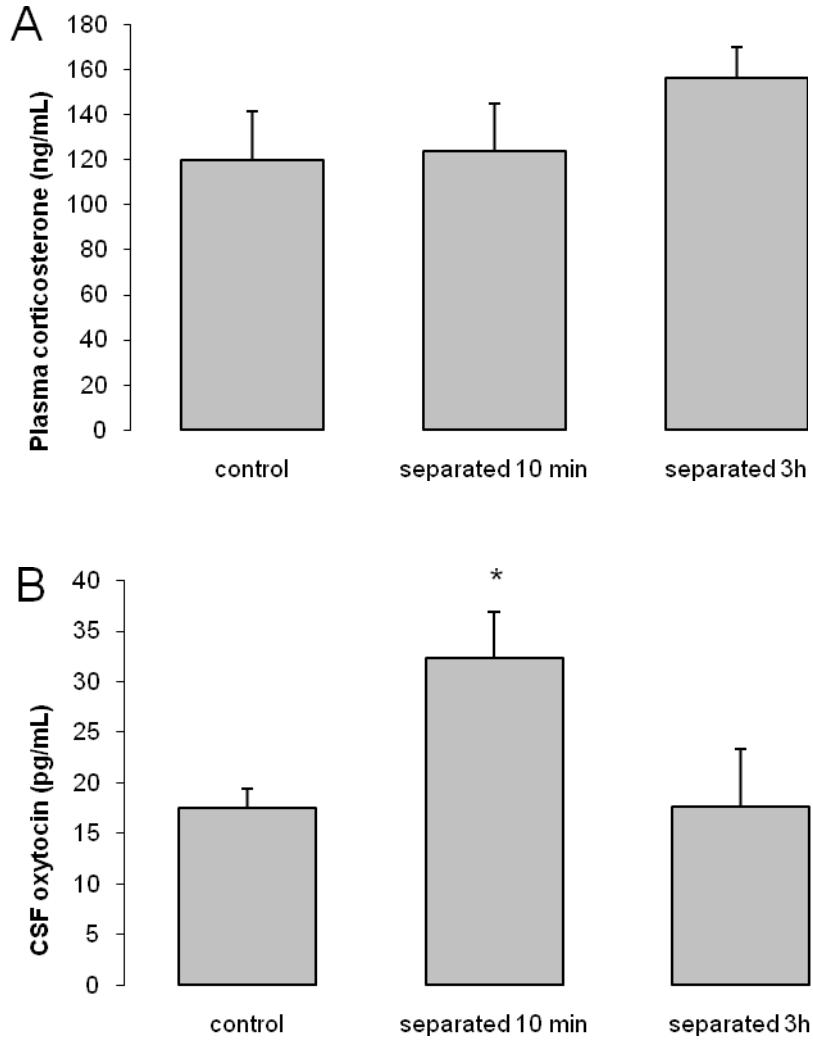


Figure 3

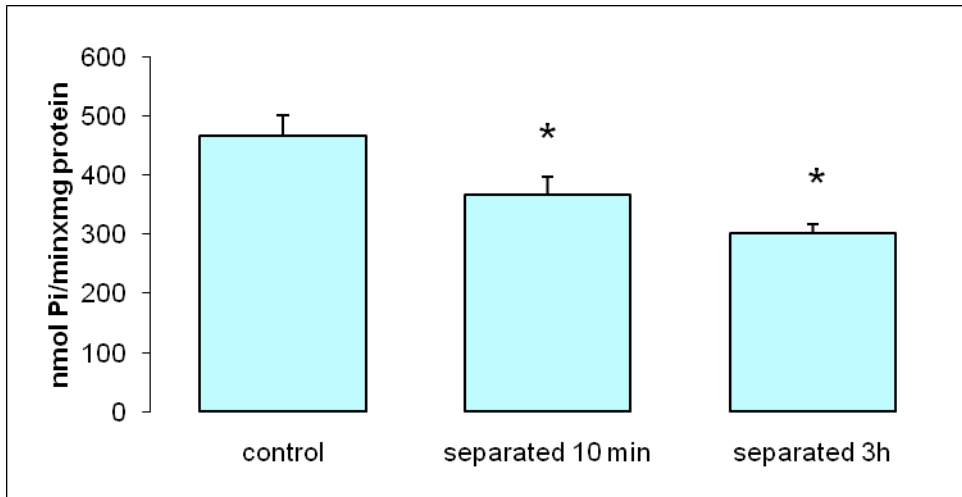
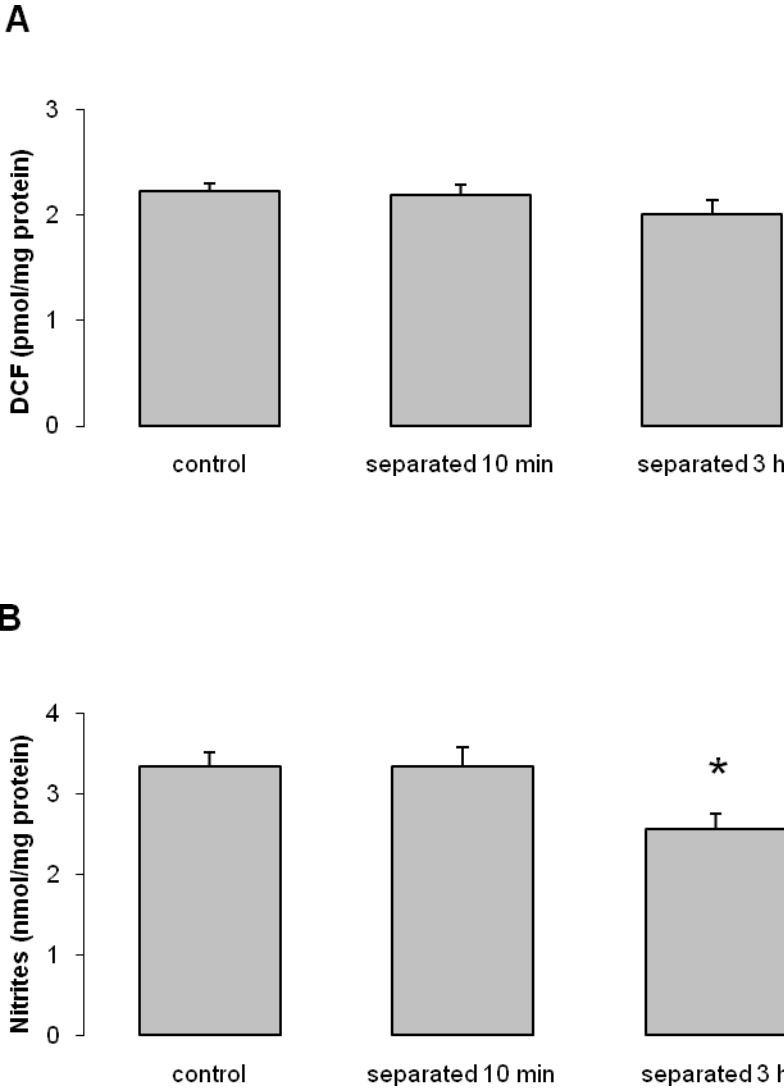


Figure 4



Capítulo 2: Resultados relacionados aos objetivos 4, 5, 6, 7

Em adição aos resultados apresentados no artigo exposto acima foram realizados mais experimentos com o objetivo de melhor entender os efeitos sobre as genitoras de diferentes separações maternas das mães de seus filhotes no período neonatal. Realizamos os seguintes experimentos: avaliação do comportamento de risco através do teste do odor de predador e do teste do labirinto em cruz elevado, resposta hedônica frente a um sabor prazeroso e a um sabor aversivo, comportamento alimentar e avaliação da quantidade de receptores A2A e D2 no hipocampo e no estriado através de imunistoquímica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de separação materna apresentado no artigo previamente exposto nessa dissertação. Os testes comportamentais foram realizados a partir do dia 33 pós-parto.

MEDIDAS COMPORTAMENTAIS

Teste do odor de predador:

Esta tarefa foi realizada em um aparato dividido em dois compartimentos, ambos com 50 cm de altura: um maior (40 cm x 30 cm) onde ficava localizado o pano com odor de predador e um compartimento menor (20 cm x 30 cm), chamado de caixa-esconderijo. Conectando os dois compartimentos da câmara, encontra-se uma porta de 4 cm por 5 cm, suficiente para o trânsito do rato entre os compartimentos mas que não permitiria a entrada de um predador, por exemplo, um gato.

O experimento foi dividido em três exposições, realizadas em três dias consecutivos. No 1º dia, chamado de habituação, o animal era colocado inicialmente no lado chamado de caixa-

esconderijo e neste dia o animal tinha 10 minutos para explorar todo o aparato. Era medido o tempo que o animal permanecia no compartimento da caixa-esconderijo, o tempo que permanecia no lado onde havia um pano sem o odor de predador (neutro) e o tempo que o animal permanecia na posição de avaliação de risco (o animal estende seu corpo pela porta com o objetivo de explorar o ambiente).

No 2º dia, o animal era novamente colocado no compartimento da caixa escondido, só que desta vez o outro compartimento continha o pano com o odor de predador. Esse pano era obtido deixando ele em contato com um gato no seu local de dormir por 2 dias antes do teste. Neste dia da tarefa o roedor também permanecia por 10 minutos e os mesmos parâmetros do primeiro dia eram avaliados.

No 3º dia, o animal era novamente colocado no compartimento caixa-esconderijo, sendo que o outro compartimento agora tinha novamente um pano sem o odor do predador (neutro), e os mesmos parâmetros foram avaliados também em 10 minutos (Dieleberg *et al.*, 1999).

Os dias do experimento foram realizados com um espaço de 24 horas entre cada um e nos três dias os comportamentos foram filmados para posterior avaliação.

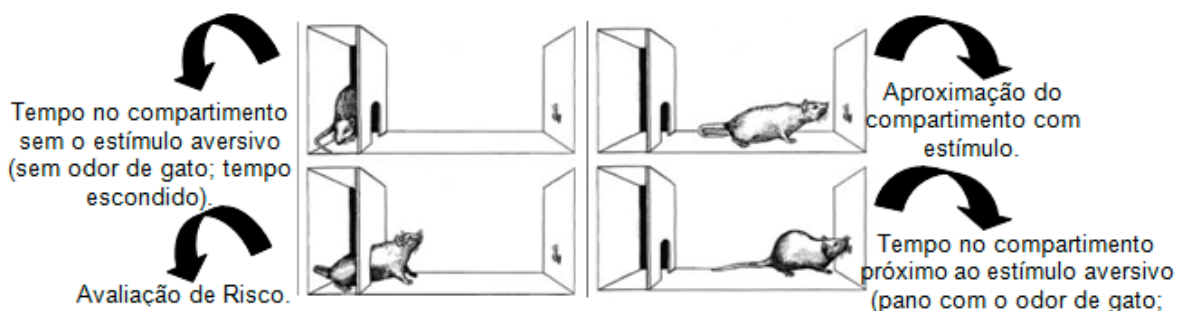


Figura 5. Esquema do teste do odor de gato (segundo Dieleberg *et al.*, 1999)

Teste do labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado foi conduzido utilizando um aparato padrão, mantido a 53 cm do chão, consistindo de 4 braços arrançados na forma de uma cruz (medidas dos braços 48 x 10 cm). Os quatro braços eram unidos no centro por uma plataforma quadrada de 10 cm. Dois dos braços, opostos um ao outro, não possuíam paredes (braços abertos); os outros dois braços (braços fechados) tinham paredes de 50 cm de altura. Esse teste pode ser utilizado para avaliar comportamento de risco, baseado no fato de que a exposição a um braço aberto e elevado pode ser considerado mais ameaçador para o animal, expondo ele a mais riscos como predadores (Cortese et al., 2009; Löfgren et al., 2009). Os animais eram colocados individualmente no centro do aparato, na junção entre os braços abertos e fechados, de frente para um dos braços abertos, e seu desempenho era avaliado durante 5 minutos. Era considerado que o rato havia entrado um braço somente quando todas as quatro patas estavam dentro desse braço. Foram monitorados número de entradas nos braços abertos, nos braços fechados e o tempo total que os animais passaram dentro de cada braço.

Comportamento alimentar

Os animais eram colocados em uma caixa retangular iluminada (40 cm x 15 cm x 20 cm) com o chão e as paredes feitas de madeira e um teto de vidro semitransparente. Dez rosquinhas de Froot loops (Kellogg's®) de amido de milho, trigo e sacarose (3,4 kcal/g) eram colocadas em uma extremidade da caixa. Cada animal era submetido a uma habituação de 3 minutos por dia em cinco dias subsequentes, com restrição alimentar (recebendo 80% da sua ingestão habitual de ração). Etanol 90% era usado para limpar o aparato e minimizar o odor entre cada animal testado ou habituado. Após serem habituados, os animais eram deixados

com comida *ad libitum* por 24 horas, e então colocados no mesmo aparato para uma sessão de teste de 3 minutos, quando o número de rosquinhas era contado (Gamaro et al., 2003; Silveira et al., 2006). Um protocolo foi estabelecido para que quando os animais tivessem comido parte de um Froot loop (ex.: 1/3 ou 1/4), essa fração fosse considerada. Para eliminar o viés interobservador, a contagem foi feita sempre pelo mesmo pesquisador.

Avaliação da reatividade ao sabor

Os animais eram submetidos a 5 dias de sessões de treino, nos quais eles eram segurados gentilmente e 100 microlitros de água eram administrados diretamente na boca, utilizando uma micropipeta automática (para habituá-los ao procedimento que seria usado no dia do teste). No dia do teste, os animais recebiam, em diferentes momentos, soluções com duas diferentes concentrações de sacarose (0,1 e 1M) e duas concentrações de ácido acético (0,5 e 5%). Após a administração das soluções, o comportamento dos animais era filmado durante 1 minuto para posterior análise. As diferentes concentrações eram administradas com um intervalo de 30 minutos entre uma e outra.

Análise dos videos. Os padrões de reações afetivas eram contados quadro a quadro (1 segundo equivale a 30 quadros). Reações hedônicas positivas incluíam protusões rítmicas de língua, enquanto reações negativas incluíam protusões de dente e bocejos.

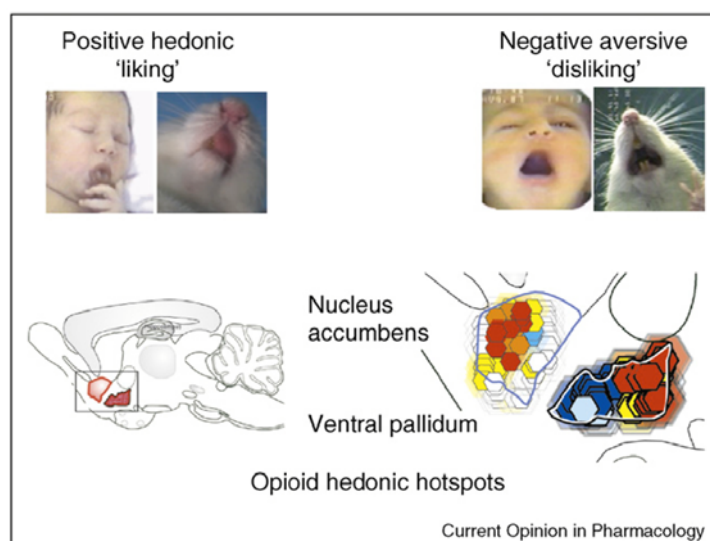


Figura 6: Ilustração de reações afetivas e núcleos cerebrais relacionados (retirado de Berridge, 2009).

MEDIDAS BIOQUÍMICAS

Imunoistoquímica

Após o término das medidas comportamentais (35 dias pós parto) os animais eram anestesiados com uma overdose de hidrato de cloral (1g por kg de peso corporal, intraperitonealmente) e perfundidos através de ventrículo esquerdo com solução salina seguida de uma solução de paraformolaldeído (PFA) a 4%. Os cérebros eram retirados da caixa craniana e armazenados na mesma solução. Os cérebros eram criopreservados com uma solução de sacarose (30%) e fatiados coronariamente em um criostato (Leica) em fatias de 40 µm de espessura.

Fatias contendo hipocampo e estriado dorsolateral (3-6 por grupo) foram marcadas com anticorpos anti-receptor A2A (Upstate) e anti-receptor D2 (Millipore). Os anticorpos secundários utilizados foram anticorpo anti IgG de coelho produzido em cabra Alexa Fluor 488 e anticorpo anti IgG de camundongo produzido em cabra Alexa Fluor 568 (1:500, Invitrogen). Resumidamente, as fatias eram fixadas em PFA 4%, lavadas com tampão fosfato salino (PBS), permeabilizadas com triton 0,4% por 10 minutos, e após, bloqueadas por 30 minutos com soro de cabra (GS) 5% (Sigma-Aldrich) em PBS com 0,4% Triton-X (PBS-Tx) em temperatura ambiente. A seguir, as fatias eram incubadas por 16 horas com o anticorpo primário a 4°C com PBS-Tx e GS 5%. Após essa incubação, as fatias eram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário fluorescente por 1 h em temperatura ambiente em uma câmara escura. Depois as fatias eram lavadas com PBS, era adicionado o meio de montagem fluoromounting (Sigma-Aldrich), cobertos com uma lamínula e após a secagem

eram seladas utilizando esmalte de unha incolor. Foi utilizado um microscópio invertido de fluorescência (Olympus FV1000), utilizando os filtros para GFP e MCherry. Três áreas aleatórias por região de interesse ($300 \mu\text{m}^2$) (hipocampo e estriado dorsolateral) foram escolhidas por animal e a fluorescência quantificada utilizando o programa Cell M (Olympus).

Os dados foram analisados por teste t, ANOVA de 1 via ou ANOVA de medidas repetidas, conforme o experimento, utilizando post hoc de Duncan quando apropriado.

Resultados

Avaliação do comportamento dos animais no teste de reatividade ao sabor

Esta tarefa foi utilizada como uma ferramenta para avaliar o comportamento dos animais frente a um sabor palatável, medindo-se a frequência do número de protrusões de língua durante 1 minuto. Foram observadas diferenças significativas conforme o estresse neonatal aplicado, indicando que as mães que tiveram seus filhotes separados por 3h no período neonatal apresentaram uma diminuição nas protrusões de língua tanto na concentração 0,1M [F(2,23) = 10,7; p < 0,01], quanto na concentração 1M [F(2,23) = 10; p < 0,01], enquanto que as mães que tiveram seus filhotes separados por 10 minutos apresentaram diminuição no número de protrusões de língua somente na solução de maior concentração (1M) (Post-Hoc de Duncan). Os resultados são mostrados na Figura 7.

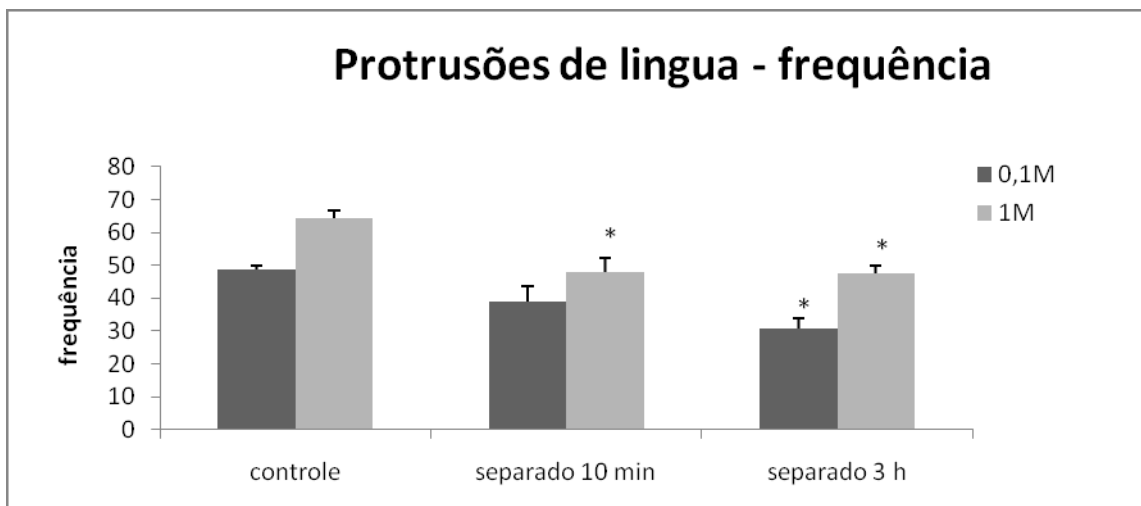


Figura 7: Efeitos de diferentes tempos de separação materna sobre a resposta hedônica nas genitoras no dia pós-parto 34 (protrusões de língua – frequência [número de quadros/min]). * diferente do controle, p < 0,05, post hoc de Duncan. n = 6-13 animais por grupo.

Além da frequência de protrusões de língua, também foi analisado o tempo total que os animais passaram realizando tal comportamento. Foram observadas diferenças significativas conforme o estresse neonatal aplicado, indicando que as mães que tiveram seus filhotes separados por 3h no período neonatal apresentaram uma diminuição no tempo total de protrusões de língua, tanto na concentração 0,1M [$F(2,23) = 5,8; p < 0,01$], quanto na concentração 1M [$F(2,23) = 6,4; p < 0,01$], enquanto que as mães que tiveram seus filhotes separados por 10 minutos apresentaram diminuição no tempo total de protrusões de língua somente na solução de maior concentração (1M) [$F(2,23) = 6,4; p < 0,01$]. Esses resultados, quando analisados em conjunto demonstram que as mães submetidas a separações repetidas de seus filhotes no período neonatal apresentam uma diminuição na reatividade ao sabor doce, sendo essa diminuição mais pronunciada em animais que sofreram separações por períodos maiores. Os resultados são mostrados na Figura 8

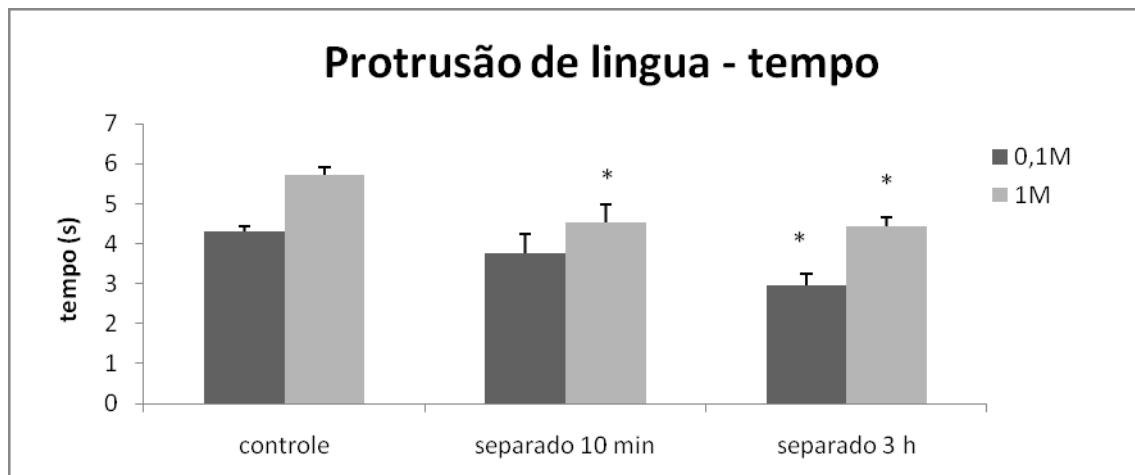


Figura 8. Efeitos de diferentes tempos de separação materna sobre a resposta hedônica em genitoras no dia 34 pós parto (protrusões de língua - tempo). * diferente do controle, $p < 0,05$, post hoc de Duncan. $n = 6-13$ animais por grupo.

Esta tarefa também foi utilizada como uma ferramenta para avaliar o comportamento dos animais frente a um sabor aversivo, medindo-se a frequência de mostrar os dentes durante 1 minuto. Foram observadas diferenças significativas conforme o estresse neonatal aplicado, indicando que as mães que tiveram seus filhotes separados por 10 min e 3h no período neonatal apresentaram um aumento na frequência deste comportamento quando utilizada a concentração de 5% de ácido acético [$F(2,23) = 5,85, p < 0,01$]. Por outro lado, as mães que tiveram seus filhotes separados por 10 minutos apresentaram uma diminuição nessa frequência na concentração 0,5% [$F(2,23) = 3,53, p < 0,05, \text{Post-Hoc de Duncan}$]. Os resultados são mostrados na Figura 9.

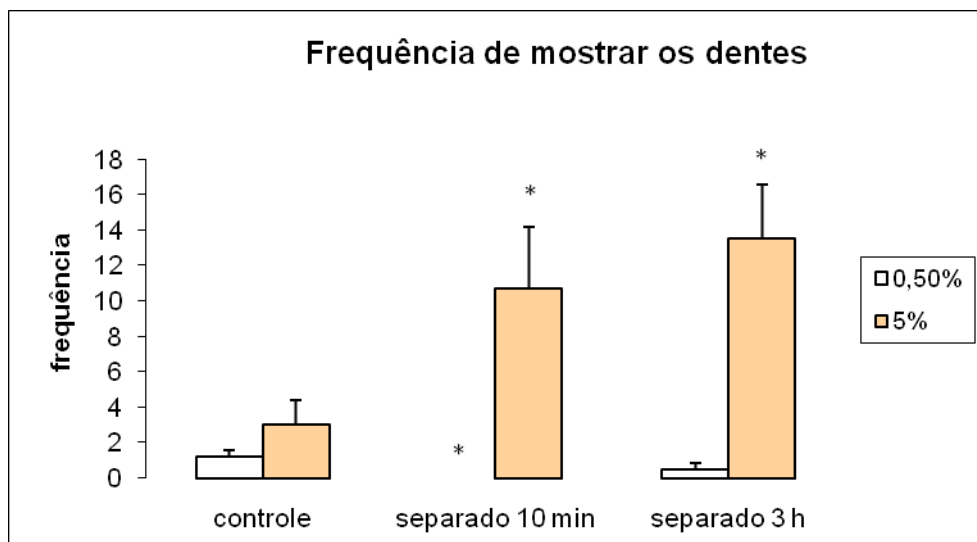


Figura 9. Efeitos de diferentes tempos de separação materna sobre a resposta aversiva em genitoras no dia 34 pós parto (frequência para o comportamento de mostrar os dentes). * diferente do controle, $p < 0,05$, post hoc de Duncan. $n = 6-13$ animais por grupo.

Além da frequência, também foi analisado o tempo total que os animais passavam realizando esse comportamento. Foram observadas diferenças significativas conforme o estresse neonatal aplicado, indicando que as mães que tiveram seus filhotes separados por 10 min e 3h no período neonatal apresentaram um aumento no tempo total do comportamento de mostrar os

dentes, quando utilizada a concentração de 5% de ácido acético [$F(2,23) = 6,10, p < 0,01$]. Por outro lado, as mães que tiveram seus filhotes separados por 10 minutos apresentaram uma diminuição no tempo total para esse comportamento quando usada a concentração 0,5% [$F(2,23) = 4,09, p < 0,05$, Post-Hoc de Duncan]. Esses dados, quando analisados em conjunto demonstram que as separações repetidas de seus filhotes no período neonatal afetam a responsividade a sabores aversivos nas mães. Os resultados são mostrados na Figura 10.

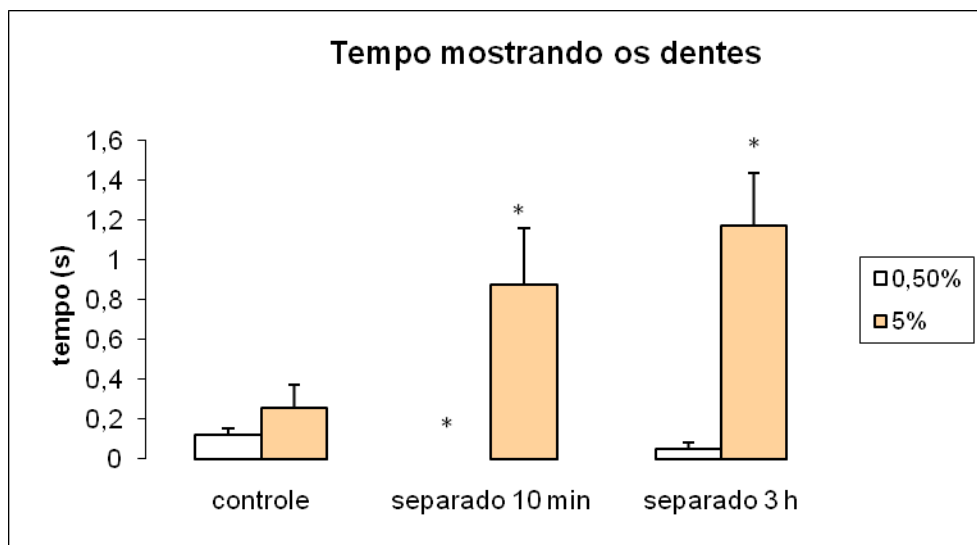


Figura 10. Efeitos de diferentes tempos de separação materna sobre a resposta aversiva em genitoras no dia 34 pós parto (tempo mostrando os dentes). * diferente do controle, $p < 0,05$, post hoc de Duncan. $n = 6-13$ animais por grupo.

Avaliação do comportamento dos animais no teste do odor de predador

Essa tarefa foi desenvolvida para avaliar o comportamento de risco dos animais. Foi observado que os animais passaram mais tempo no local abrigado longe do pano quando o pano apresentava odor de predador [$F(1,21) = 23,7, p < 0,01$]. Também observamos que houve uma interação entre grupo e odor [$F(2,21) = 12,17, p < 0,01$] no qual a presença do

odor gerou um grande aumento no tempo no local abrigado no grupo controle, um aumento menor no grupo submetido a separações de 10 min e não houve aumento no grupo separado por 3 horas. Resultados mostrados na figura 11.

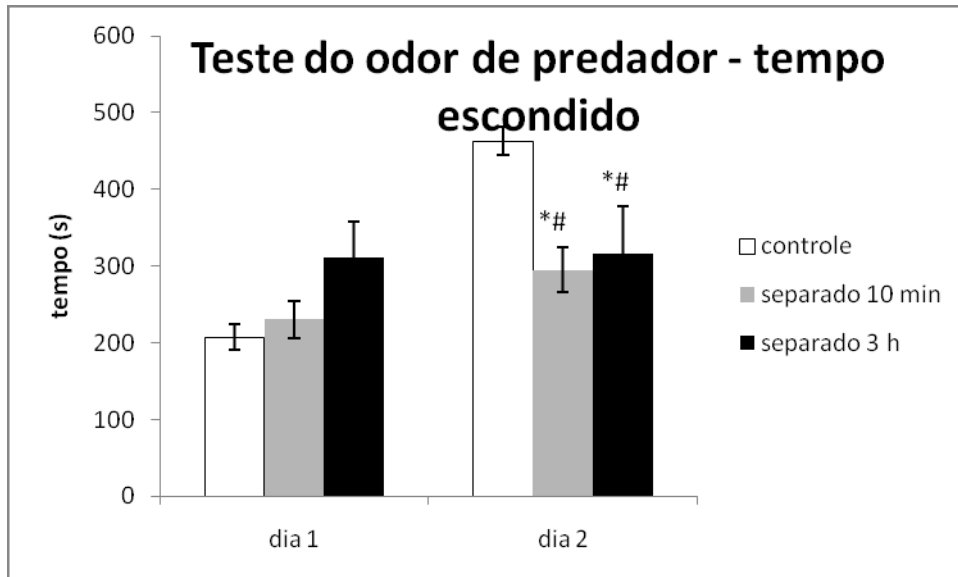


Figura 11. Efeitos de diferentes tempos de separação materna sobre o tempo no compartimento protegido na tarefa do odor de predador. * diferente do controle, $p < 0.05$, # interação entre dia e grupo, post hoc de Duncan. $n = 8-11$ animais por grupo.

Foi avaliado também o tempo que o animal passou na proximidade do pano. Foi observado que os animais diminuíram o tempo gasto próximos ao pano com odor de predador [$F(1,21) = 32,6$, $p < 0,01$], e também observamos uma interação entre grupos x presença de odor de predador [$F(2,21) = 7,88$, $p < 0,01$], uma vez que as ratas que sofreram separação de seus filhotes no período neonatal por 3 h não mostraram diminuição no tempo no pano com odor de predador como ocorreu com os demais grupos. Os resultados são mostrados na figura 12.

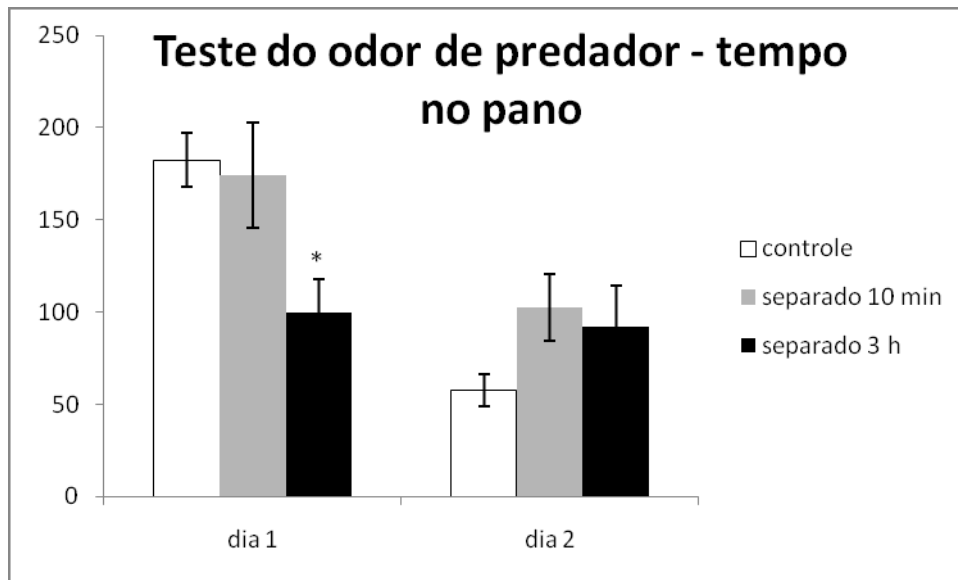


Figura 12. Efeitos de diferentes tempos de separação materna sobre o tempo na região contendo o pano na tarefa do odor de predador. * diferente do controle, $p < 0.05$, post hoc de Duncan. $n = 8 - 11$ animais por grupo.

Avaliação do comportamento dos animais no teste do labirinto em cruz elevado

Esta tarefa foi realizada com o objetivo de avaliar o comportamento de risco dos animais, que é equivalente a um maior tempo nos braços abertos. Neste experimento somente foram utilizadas animais controle e do grupo separado por 3h pois esse grupo apresentou efeitos mais marcantes nas avaliações feitas até esse momento, especialmente em relação ao comportamento de risco no teste do odor de predador, sendo esse teste feito para confirmar os resultados encontrados previamente. Foi observada uma diferença significativa entre as mães submetidas a separações por 3h no período neonatal e o grupo controle. Verificou-se que as mães submetidas à separação materna de 3 h apresentaram um menor tempo nos braços fechados quando comparadas com o grupo controle $t(6) = 2,72$, $p < 0,05$ e uma tendência a um maior tempo nos braços abertos $t(6) = 2,28$, $p = 0,062$, demonstrando um maior comportamento de risco. Esses resultados analisados em conjunto com os anteriores do teste do odor de predador podem indicar que os animais do grupo submetido a separação por 3 h

apresentam um comportamento de negligência ao perigo, ou comportamento de risco. Esses resultados são mostrados na figura 13.

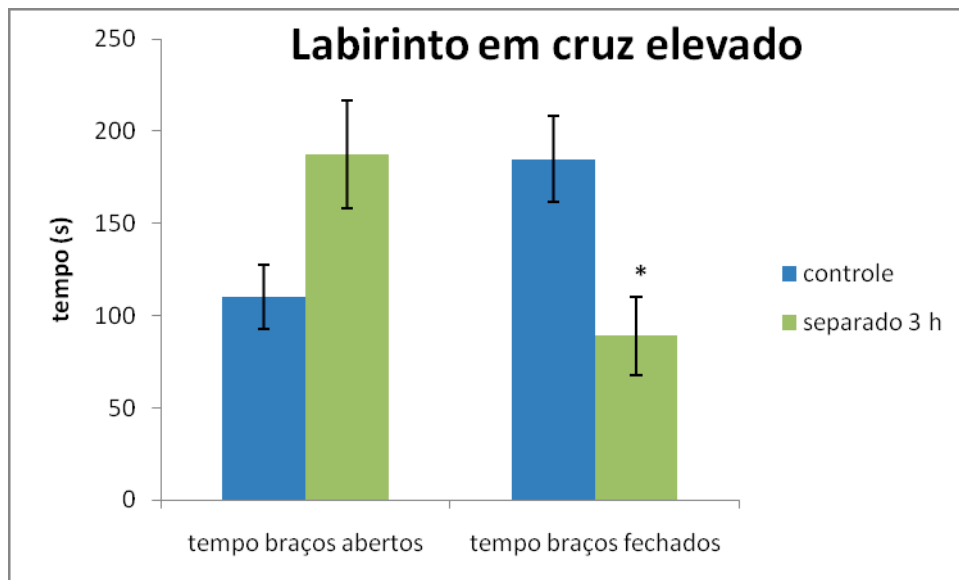


Figura 13. Efeitos da separação materna sobre o tempo nos braços abertos e fechados na tarefa do labirinto em cruz elevado nas genitoras. Dados expressos como média \pm EPM. * diferente do controle, $p < 0,05$, post hoc de Duncan. N= 5-6 animais por grupo.

Avaliação da quantidade de receptors de adenosina A2A e dopamina

Esta técnica foi utilizada para analisar a quantidade de receptores de adenosina A2A e dopamina D2 no estriado dorsoventral. Foi verificado que as mães submetidas a separações de 3 h no período neonatal tiveram uma diminuição na quantidade de receptores de dopamina D2 no estriado [$F(2,11) = 4,79$, $p < 0,05$]. Resultados mostrados na figura 14.

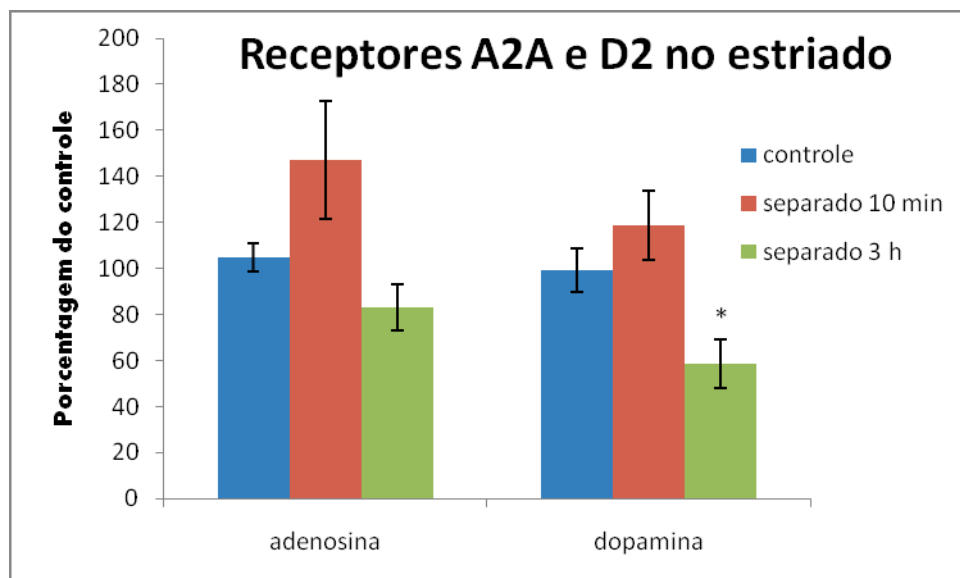


Figura 14. Efeitos de diferentes tempos de separação materna sobre a quantidade de receptores A2A e D2 no estriado das genitoras avaliado através de densitometria da imunoistoquímica. Dados expressos como porcentagem do controle. * diferente do controle, $p < 0.05$, post hoc de Duncan. $n = 3-6$ animais por grupo.

Também foram realizadas medidas desses dois receptores no hipocampo; entretanto, não foi verificada qualquer diferença entre os grupos nessa região cerebral, apesar de existir uma tendência a um aumento no número de receptores de dopamina nas mães submetidas a separação de 10 minutos dos seus filhotes no período neonatal [$F(2,11) = 3,43$, $p = 0,070$]. Resultados mostrados na figura 15.

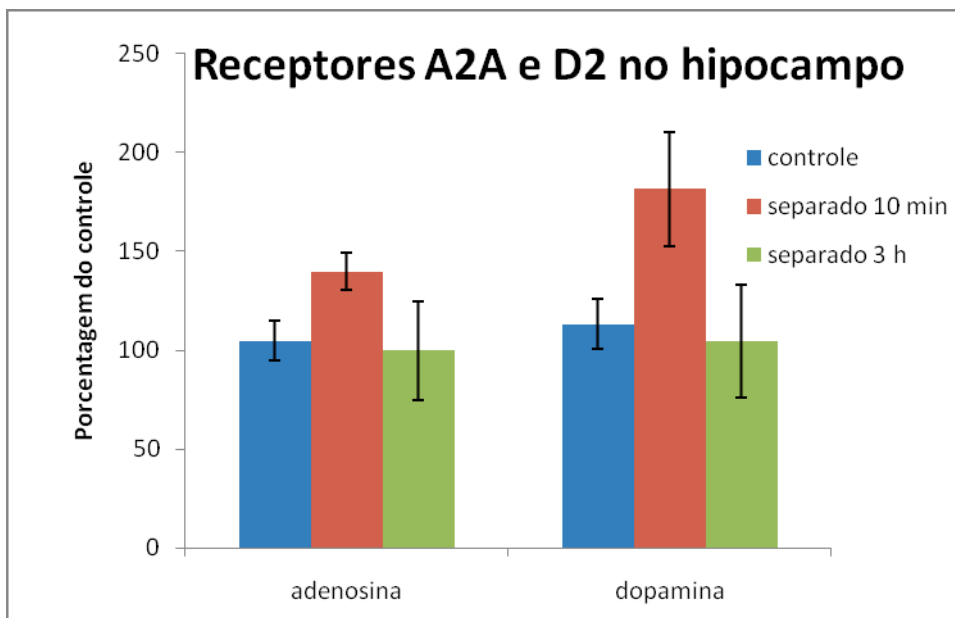


Figura 15. Efeitos de diferentes tempos de separação materna sobre a quantidade de receptores A2A e D2 no hipocampo das genitoras avaliado através de densitometria da imunohistoquímica. Dados expressos como porcentagem do controle. n = 3-6 animais por grupo.

DISCUSSÃO

Este trabalho teve o objetivo de investigar se diferentes tipos de separações dos filhotes (longa ou curta duração) poderiam facilitar o desenvolvimento de comportamentos do tipo deprimido nas mães e correlacionar tais mudanças comportamentais com alterações neurobiológicas. Foi observado que separações repetidas por 3 horas aumentaram o tempo de imobilidade durante o teste do nado forçado nas mães. Também se verificou que separações repetidas por 3 horas aumentaram o comportamento de risco das mães verificado tanto no teste do labirinto em cruz elevado como no teste do odor de predador. Verificou-se que tanto as genitoras submetidas a separação por 10 minutos quanto as submetidas a separação por 3 horas tiveram uma diminuição na sensação prazerosa frente a uma solução doce e uma exacerbação do efeito aversivo frente a um sabor ácido. A atividade hipocampal da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ estava diminuída nos dois tipos de separações, e os níveis de ocitocina cerebral, medida no liquor, estavam aumentados nas mães que foram separadas por 10 minutos dos seus filhotes. Adicionalmente, os níveis de óxido nítrico se encontraram diminuídos no hipocampo das mães que sofreram separações repetidas de 3 horas em comparação com os outros grupos e a quantidade de receptores de dopamina D2 no estriado dessas genitoras também se encontrava diminuído em comparação com os outros grupos

O aumento na imobilidade no teste do nado forçado tem sido considerado como sugestivo de um estado do tipo deprimido (Porsolt *et al.*, 1979; Cryan *et al.*, 2002). As genitoras as quais foram submetidas a manipulações repetidas (10 minutos/dia) não demonstraram diferença no tempo de imobilidade neste teste quando comparadas com as controles. Esses resultados são consistentes com os achados de Boccia *et al.* (2007), que também encontraram um aumento no tempo de imobilidade nas mães submetidas a separações longas e repetidas de seus filhotes. A separação dos filhotes parece ser uma boa

maneira de modelar estados do tipo deprimido em roedores (Newport *et al.*, 2002; Boccia *et al.* 2007; Eklund *et al.*, 2009; Sung *et al.*, 2010).

De modo a estudar marcadores bioquímicos relacionados à depressão, demonstramos que a atividade hipocampal da enzima Na^+, K^+ -ATPase estava diminuída em ambos os grupos submetidos à separação dos seus filhotes (tanto 10 min quanto 3 h). Vários estudos demonstram que uma atividade reduzida da enzima Na^+, K^+ -ATPase é uma característica importante da depressão (El-Mallakh & Li, 1993; El-Mallakh & Wyatt, 1995; Acker *et al.*, 2009), e a redução da atividade dessa enzima no hipocampo tem sido observada em outros modelos animais de depressão (Gamaro *et al.*, 2003; de Vasconcellos *et al.*, 2005; Goldstein *et al.*, 2006). Além disso, tem sido reportado que o tratamento com antidepressivos como a fluoxetina (Zanatta *et al.*, 2001) e a desipramina (Viola & Rodríguez de Lores Arnaiz, 2007) aumentam a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no cérebro de ratos. Este resultado dá ainda mais embasamento para a separação maternal de longa duração como um modelo de depressão. Por outro lado, a atividade reduzida da Na^+, K^+ -ATPase em membranas sinápticas não parece ser uma característica específica dos estados deprimidos, uma vez que o grupo separado por 10 minutos, o qual não demonstrou qualquer sinal comportamental de depressão, teve também uma atividade reduzida dessa enzima, similar ao encontrado nas mães submetidas à separação por 3 horas. Entretanto, não pode ser excluída uma maior susceptibilidade a um estado deprimido desse grupo de animais não detectado nos testes comportamentais utilizados.

Uma extensiva literatura tem demonstrado que exposições prolongadas a situações estressantes podem causar efeitos adversos no hipocampo de roedores, incluindo atrofia neuronal, possivelmente diminuindo o número de sinapses no hipocampo (Duman & Monteggia, 2006; Schmidt *et al.*, 2007). Em pacientes com depressão, alterações morfológicas, como reduções volumétricas, têm sido verificadas no hipocampo (Lorenzetti *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). Portanto, é possível que a exposição ao estresse representada pela

separação de seus filhotes possa levar a atrofia, o que poderia estar relacionado com a diminuição na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase observada na depressão (de Vasconcellos *et al.*, 2005). Entretanto, nesse estudo não foi observado alterações nos níveis de corticosterona basal no grupo separado, o que seria uma evidência de aumento de estresse. Por outro lado, diferentes níveis de glicocorticóides têm sido relatados na síndrome depressiva, como é demonstrado por diversos estudos que mostram aumento no cortisol (Charlton & Ferrier, 1989; Pariante *et al.*, 1995; Wolkowitz *et al.*, 2009) ou nenhuma diferença nos níveis desse hormônio em pacientes deprimidos (Kling *et al.*, 1991; Kling *et al.*, 1993; Molchan *et al.*, 1993; Pitts *et al.*, 1995).

Outra possibilidade para explicar a diminuição da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase envolve o estado redox da célula, uma vez que tem sido demonstrado que a atividade dessa enzima está reduzida em situações de estresse oxidativo (Morel *et al.*, 1998; Streck *et al.*, 2001; Petrushanko *et al.*, 2006; Wilhelm *et al.*, 2009). Nesse trabalho, não foi observado qualquer efeito sobre a atividade das enzimas antioxidantes ou sobre a produção de radicais livres quando medidos pelo teste do DCF. Portanto, é improvável que o desbalanço oxidativo possa explicar a reduzida atividade da Na⁺, K⁺-ATPase observada em ambos os modelos de separação maternal. Por outro lado, sabe-se que a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase em membranas sinaptossomais é estimulada por neurotransmissores como catecolaminas (Rodríguez de Lores Arnaiz, 1992) ou serotonina (Rodríguez de Lores Arnaiz & Yamauchi, 1995), e esses sistemas podem estar alterados em estados deprimidos.

Tem sido demonstrado que o estresse oxidativo pode estar associado com a patofisiologia da depressão (Kodydková *et al.*, 2009; Rezin *et al.*, 2009; Andreatza *et al.*, 2010). Nossos resultados demonstraram que diferentes separações maternas no período pós-natal não alteraram a atividade das enzimas antioxidantes nem a produção de radicais livres no hipocampo. Isso não significa a ausência de estresse oxidativo, uma vez que outros

parâmetros podem estar alterados, como dano a lipídios ou a proteínas, nessa ou outras estruturas cerebrais. Adicionalmente, uma vez que as intervenções utilizadas para induzir essas alterações (separação materna) foram aplicadas durante os primeiros 10 dias pós-parto, e as avaliações bioquímicas foram feitas no 35º dia pós-parto, é possível que alterações prévias na produção de radicais livres possam ter retornado a níveis normais e outros estudos são necessários para avaliar essa possibilidade.

A diminuição na produção de óxido nítrico observada no grupo separação por 3 horas nesse estudo pode também ser devido a uma atrofia dos neurônios hipocâmpais produtores de óxido nítrico (Palumbo *et al.*, 2007). Uma diminuição nos níveis de óxido nítrico poderia diminuir a atividade neural e a plasticidade sináptica no hipocampo, o que se acredita sofrer influência do óxido nítrico (Hua *et al.*, 2008). Isso poderia levar a alterações cognitivas tais como problemas de aprendizado e de memória (Law *et al.*, 2002; Palumbo *et al.*, 2007), outra característica da síndrome depressiva. Como mencionado, diferentes efeitos têm sido relatados em relação ao óxido nítrico e à depressão. Uma variedade de estudos sugere um envolvimento da óxido nítrico sintase no mecanismo patofisiológico do comportamento do tipo deprimido associado ao estresse (Joca & Guimarães, 2006; Zhou *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008), enquanto alguns antidepressivos reduzem a produção de óxido nítrico (Ikenouchi-Sugita *et al.*, 2009). Entretanto, também tem sido demonstrado que a administração do inibidor da óxido nítrico sintase N(omega)-nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME) – leva a um aumento no comportamento do tipo depressivo em animais (Khovryakov *et al.*, 2010). Além disso, a administração de óxido nítrico exógeno (através de um doador de óxido nítrico) melhora o comportamento do tipo depressivo induzido por estresse crônico através da estimulação da neurogênese hipocâmpal (Hua *et al.*, 2008). Portanto, é possível que a redução na produção de óxido nítrico observada no grupo separação (3 horas) possa estar implicada no comportamento do tipo depressivo observado.

A ocitocina é liberada em várias regiões cerebrais, como os núcleos paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON) do hipotálamo, particularmente por neurônios magnocelulares (Wotjak *et al.*, 2001). Vários estudos têm demonstrado que a ocitocina está envolvida na mediação de comportamento materno (van Leengoed *et al.*, 1987; Kendrick, 2000). A manipulação, ou qualquer outro tipo de estimulação do animal no período neonatal causa um distúrbio da relação mãe-filhote. Tem sido relatado que mães separadas de seus filhotes por breves períodos aumentam seu comportamento materno, especialmente o número de lambidas, enquanto que mães separadas por longos períodos (3 a 6 horas) diminuem seu comportamento materno (Boccia & Pedersen, 2001; Lovic *et al.*, 2001) ou mostram um aumento similar no comportamento materno total (Macri *et al.*, 2008). Também foi visto que maiores taxas de cuidado materno, isto é, número de lambidas nos filhotes, são acompanhadas por um aumento nos receptores de ocitocina em várias áreas do cérebro (Champagne & Meaney, 2001). No presente estudo, foram observados maiores níveis de ocitocina no líquido cefalorraquidiano (LCR) de animais submetidos a separações curtas de seus filhotes, dado esse que é consistente com a literatura apresentada acima. As mães do grupo separado não demonstraram diferenças nos níveis de ocitocina no LCR. É importante ressaltar que o aumento foi observado no dia do desmame (21º dia pós-parto), demonstrando que este efeito permanece mesmo após um tempo razoável ter passado desde as manipulações neonatais, que ocorreram nos 10 primeiros dias pós-parto. Também é possível que esse aumento na ocitocina nas mães do grupo manipulado possa atuar como um fator protegendo esses animais do desenvolvimento de um comportamento do tipo deprimido, uma vez que a administração de ocitocina está possivelmente relacionada com o alívio de sintomas depressivos e com a diminuição de comportamento do tipo ansioso (Consiglio, 2006).

O teste do labirinto em cruz elevado é um dos paradigmas usados para medir comportamento do tipo ansioso em ratos. Ele é baseado no conflito entre dois

comportamentos que são naturalmente exibidos pelos roedores: o fato de evitarem espaços abertos e a tendência a explorar novos ambientes. Portanto, ratos exibindo menor comportamento do tipo ansioso vão entrar e passar mais tempo nos braços abertos do labirinto (Kulkarni & Sharma, 1991). Por outro lado, mais recentemente, o teste do labirinto em cruz elevado tem também sido utilizado como uma medida de avaliação de comportamento de risco em animais de laboratório, considerando-se que o número de entradas e o tempo passado nos braços abertos representam comportamentos de risco, além da diminuição no tempo nos braços protegidos (fechados) (Cortese et al., 2009; Lofgren et al., 2009).

Por outro lado, sinais químicos, como o odor, têm um papel significativo no comportamento de animais, influenciando comportamentos reprodutivos, agressivos, sociais (Brown, 1979 ; Umphries et al., 1992; Kavaliers & Colwell, 1995). Eles também são importantes na detecção do predador para que o mesmo possa ser evitado. Animais normalmente respondem à ameaça de um predador com uma variedade de comportamentos defensivos, incluindo imobilização (*freezing*) e avaliação de risco, além de supressão de comportamentos não-defensivos (Blanchard et al., 1990; Lima, 1998). Resultados de uma grande variedade de estudos têm demonstrado que roedores apresentam respostas aversivas a odor de predadores como o gato doméstico (File et al., 1993; Kavaliers & Colwell, 1995; Blanchard et al., 1998; Morrow et al., 2000). No presente estudo foi verificado que as genitoras submetidas à separação repetida de seus filhotes por 3 horas no período neonatal demonstraram um maior tempo nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado e no teste do odor de predador não apresentaram os comportamentos defensivos esperados de um roedor na presença do odor do predador. Essas genitoras não apresentaram aumento no tempo passado no compartimento escondido nem diminuição no tempo passado sobre o pano quando havia o odor de predador, ao contrário das genitoras controle e das genitoras submetidas a separação de seus filhotes por 10 minutos durante o período neonatal. Todos esses dados

analisados em conjunto, podem indicar que os animais do grupo submetido à separação por 3 h apresentam um comportamento de negligência em relação ao perigo, ou comportamento de risco, o qual está bastante associado com depressão (Bender, 2006; Harris et al., 1996; Grunbaum et al., 1996; Kilpatrick et al., 2003).

No teste de reatividade ao sabor foi verificado que a separação das genitoras de seus filhotes no período neonatal tanto por 10 minutos quanto por 3 horas modificou a forma como essas genitoras respondem tanto a um sabor prazeroso (doce) quanto a um sabor aversivo (ácido). Foi observada uma exacerbação nas reações frente a um sabor aversivo nas mães de ambos os modelos. Além disso, foi verificada uma diminuição do “gostar” nos dois grupos de separação, ou seja, esses animais demonstraram menos prazer quando lhes era administrada uma solução doce. Entretanto, a separação por 3 horas parece ser mais marcante para a mãe do que a de 10 minutos, uma vez que essa diminuição nas reações afetivas ao sabor prazeroso já foram verificadas na concentração de 0,1M de sacarose, enquanto que nas mães separadas por 10 minutos isso só se verificou na concentração mais alta de 1 M.

A anedonia é caracterizada por uma diminuição no prazer, ou seja, no “gostar”. Verificamos que houve uma diminuição somente no “gostar” e não no “querer” por parte desses animais, uma vez que quando avaliado o comportamento desses animais todos os grupos comeram a mesma quantidade de alimento doce (dados não mostrados). Um padrão de resposta no qual o querer é maior do que o gostar foi observado em indivíduos dependentes de drogas, onde ocorre uma redução no valor subjetivo de recompensa da droga (Volkow, et al., 1997; Goldstein et al., 2010). O sistema “gostar” é ativado quando se recebe a recompensa, enquanto o sistema “querer” gera comportamentos motivados pela antecipação. Quando esses dois sistemas são expostos a drogas, o sistema do “querer” motiva a perseguição persistente das drogas que não mais dão prazer.

A dopamina é um neurotransmissor de grande atuação no cérebro e que possui seus receptores bastante disseminados neste, participando de várias funções, tais como emoção, percepção, recompensa e motivação. Evidências convergentes de neuroimagem, estudos *pós-mortem*, estudos comportamentais e farmacológicos apontam para uma redução da função dopaminérgica na depressão maior (Pizzagalli et al., 2005; Ebmeier et al., 2006; Dunlop and Nemeroff, 2007; Gershon et al., 2007). Uma diminuição na função dopaminérgica parece contribuir para o comportamento anedônico em vários modelos animais (Dunlop & Nemeroff, 2007; Gershon et al., 2007; aan het Rot et al., 2009; Nestler & Carlezon, 2006). Concentrações do metabólito da dopamina, ácido homovalínico, medidas no fluido cerebrospinal encontram-se diminuídas em pacientes deprimidos e vítimas de suicídio, e são inversamente relacionada com o humor deprimido e retardo motor (Post et al., 1973; Roy et al., 1992; Reddy et al., 1992; Brown & Gershon, 1993). A depressão também é uma característica comum na doença de Parkinson, uma desordem neurodegenerativa na qual ocorre a perda de neurônios nigroestriatais dopaminérgicos (Harvey et al., 2007). A densidade de receptores dopaminérgicos do tipo D2 ou do seu RNAm encontram-se diminuídas no núcleo accumbens em vários modelos de depressão com roedores, tais como anedonia induzida por estresse crônico variado e isolamento social (Papp et al., 1994; Bjornebekk et al. 2007). Os ratos Wistar-Kyoto, outro modelo animal de depressão também exibe diminuição no binding de receptor D2 no núcleo accumbens (Yaroslavsky et al., 2006). Uma diminuição na neurotransmissão dopaminérgica poderia estar por trás da anedonia e déficits motivacionais associados com esse transtorno (Harvey et al., 2007). No nosso estudo, encontramos uma diminuição na quantidade de receptores dopaminérgicos D2 no estriado das genitoras submetidas à separação repetida dos filhotes por 3h/dia no período neonatal. Essa observação é consistente com a proposta da hipoatividade do sistema dopaminérgico mesolímbico na depressão (Dunlop & Nemeroff, 2007 ; aan het Rot et al., 2009 ; Nestler & Carlezon, 2006).

Essa diminuição poderia estar envolvida em uma neurotransmissão dopaminérgica diminuída e potencialmente com o maior potencial anedônico verificado nessas genitoras.

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que a separação materna (remover os filhotes das mães por 3h/dia por 10 dias) durante o período neonatal pode desenvolver um comportamento do tipo deprimido nas mães, pelo menos nesses animais. Essa conclusão tem como base um aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado, uma diminuição nos níveis de óxido nítrico e da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo, apesar do fato de que essa atividade reduzida não foi específica para o grupo separado por 3 horas. Além desses resultados, as genitoras separadas por 3 horas apresentaram um aumento no comportamento de risco, verificado no teste do odor de predador e no teste do labirinto em cruz elevado, uma menor resposta no teste de responsividade ao sabor doce e maior resposta no teste de reatividade a um sabor desagradável (que possivelmente esteja relacionado à anedonia) e uma diminuição na quantidade de receptores dopaminérgicos no estriado, evidenciando uma possível hipoatividade do sistema dopaminérgico mesolímbico. Todas essas características congruentes com aspectos da síndrome depressiva. Em adição a esses resultados, no grupo submetido a separações breves de seus filhotes (10 min/dia por 10 dias) houve um aumento na ocitocina medida no fluido cerebrospinal, um efeito que pode ser relacionado com o aumento no cuidado materno verificado nesse tipo de intervenção neonatal. Alguns dos efeitos observados para a separação por 3h também foram encontrados neste grupo, embora menos acentuados, o que pode sugerir maior susceptibilidade a um estado de depressão, se outros insultos/agentes ambientais estivessem envolvidos. Os efeitos do tipo depressivo demonstrados nesse estudo podem ainda ser úteis para o desenvolvimento de um modelo para estudar as consequências da depressão no período pós-parto.

REFERÊNCIAS

- aan het Rot, M.; Mathew, S.J.; Charney, D.S. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. **Can Med Assoc J.**, v. 180, p. 305–313, 2009.
- Acker, C. I.; Luchese, C.; Prigol, M.; Nogueira, C.W. Antidepressant-like effect of diphenyl diselenide on rats exposed to malathion: involvement of Na⁺K⁺ ATPase activity. **Neurosci Lett.**, v. 455, p. 168-172, 2009
- APA. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSMV-IV). 4. ed. Washington: Editado por American Psychiatric Association, 1994.
- APA. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSMV-IV). 4. ed. Washington: Editado por American Psychiatric Association, 2000.
- Bender, B. G. Risk taking, depression, adherence, and symptom control in adolescents and young adults with asthma. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 173, p.953-957, 2006.
- Benmansour, S.; Cecchi, M.; Morilak, D. A.; Gerhardt, G. A.; Javors, M. A.; Gould, G. G.; Frazer, A. Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 23, p. 10494-10501, 1999.
- Berridge, K. C. Pleasure, pain, desire, and dread: Hidden core processes of emotion. **Well-being: The foundations of hedonic psychology**, p. 525–557, 1999.
- Berridge, K. C. Measuring hedonic impact in animals and infants: Microstructure of affective taste reactivity patterns. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, p. 173–198, 2000.
- Berridge, K. C. Pleasures of the brain. **Brain Cogn.**, v. 52, p. 106-128, 2003.
- Berridge, K. C. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. **Psychopharmacology**, v. 191, p. 391-431, 2007.
- Berridge, K. C. “Liking” and “wanting” food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. **Physiol Behav.**, v. 97, p. 537-550, 2009.
- Berridge, K. C. & Kringelbach M. L. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. **Psychopharmacology**, v. 199, p. 457–480, 2008.
- Berridge, K. C. & Robinson, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Res Rev.**, v. 28, p. 309–369, 1998.

- Bjornebekk, A.; Mathe, A. A.; Brene, S. Isolated Flinders sensitive line rats have decreased dopamine D2 receptor mRNA. **Neuroreport**, v. 18, p. 1039–1043, 2007.
- Blanchard, D. C.; Blanchard, R. J.; Rodgers, R. J.; Weiss, S. M. The characterization and modeling of antipredator defensive behavior. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.14, p. 463 – 472, 1990.
- Blanchard, R. J.; Nikulina, J. N.; Sakai, R. R.; Mckittrick, C.; Mcewen, B.; Blanchard, C. Behavioral and endocrine changes following chronic predatory stress. **Physiol. Behav.**, v. 63, p. 561-569. 1998.
- Boccia, M. L. & Pedersen, C. A. Brief vs. long maternal separation in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior, lactational levels of aggression and anxiety. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, p. 657–672, 2001.
- Boccia, M. L.; Razzoli, M.; Vadlamudi, S. P.; Trumbull, W.; Caleffie, C.; Pedersen, C. A. Repeated long separations from pups produce depression-like behavior in rat mothers. **Psychoendocrinology**, v. 32, p. 65-71, 2007.
- Brown, R. E. Mammalian social odours: A critical review. **Ad. Study Behav.**, v.10, p. 103-162, 1979.
- Brown, R. G. & Gershon, S. Dopamine and depression. **J Neural Trans.**, v. 91, p. 75–109, 1993.
- Champagne, F. & Meaney, M. J. Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. **Progress in brain research**, v. 133, p. 287-302, 2001.
- Cochrane, C. G. Mechanisms of oxidant injury of cells. **Mol Aspects Med.**, v. 12, p.137—147, 1991.
- Consiglio, A. R.; Lucion, A. B. Lesion of hypothalamic paraventricular nucleus and maternal aggressive behavior. **Physiol. Behav.**, v. 59, p. 591-596, 1996.
- Consiglio, R. A. Depression under the perspective of oxytocin. **CNS Agents in Medical Chemistry**, v. 6, p. 293-310, 2006.
- Cortese, B. M. ; Mitchell, T. R. ; Galloway, M. P.; Prevost, K. E.; Fang, J.; Moore, G. J.; Uhde, T. W. Region-specific alteration in brain glutamate: possible relationship to risk-taking behavior. **Physiology & Behavior**, v. 99, p. 445–450, 2010.
- Creese, I.; Morrow, A. L.; Leff, S. E.; Sibley, D. R.; Hamblin, M. W. Dopamine receptors in the central nervous system. **Int Rev Neurobiol.**, v. 23, p. 255-301, 1982.
- Creese, I.; Sibley, D. R.; Hamblin, M. W.; Leff, S. E. The classification of dopamine receptors: relationship to radioligand binding. **Annu Rev Neurosci.**, v. 6, p. 43-71, 1983.
- Cryan, J. F.; Markou, A.; Lucki, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, n. 5, p. 238–245, 2002.

Cumurcu, B. E.; Ozyurt, H.; Etikan, I.; Demir, S.; Karlidag, R. Total antioxidant capacity and total oxidant status in patients with major depression: Impact of antidepressant treatment. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 63, p. 639–645, 2009.

Cunha, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem Int.**, v. 38, p. 107-125, 2001.

Dailly, E.; Chenu, F.; Renard, C. E.; Bourin, M. Dopamine, depression and antidepressants. **Fundam Clin Pharmacol.**, v. 18, p. 601-617, 2004.

Damasio, A. R. The feeling of what happens: Body and emotion in the making of consciousness (1st ed.). New York: Harcourt Brace, 1999.

Di Chiara, G. & Tanda, G. Blunting of reactivity of dopamine transmission to palatable food: A biochemical marker of anhedonia in the CMS model? **Psychopharmacology** v. 134, p. 351-353, 1997.

Dielenberg, R. A.; Arnold, J. C.; McGregor, I. S. Low dose midazolam attenuates predatory odor avoidance in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 62, p. 197-201, 1999.

Duman, R. S. & Monteggia, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 59, p. 1116-1127, 2006.

Dunlop, B. W. & Nemeroff, C. B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 64, p. 327–337, 2007.

Emilien, G.; Maloteaux, J. M.; Geurts, M.; Hoogenberg, K.; Cragg, S. Dopamine receptors--physiological understanding to therapeutic intervention potential. **Pharmacol Ther.**, v. 84, p. 133-156, 1999.

Eklund, M. B.; Johansson, L. M.; Uvnäs-Moberg, K.; Arborelius, L. Differential effects of repeated long and brief maternal separation on behavior and neuroendocrine parameters in Wistar dams. **Behavioural Brain Research**, v. 203, p. 69–75, 2009.

Elizalde, N.; Gil-Bea, F. J.; Ramírez, M. J.; Aisa, B.; Lasheras, B.; Del Rio, J.; Tordera, R. M. Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. **Psychopharmacology**, v. 199, p. 1-14, 2008.

El-Mallakh, R. S.; Li, R. Is the Na(+)-K(+)-ATPase the link between Phosphoinositide metabolism and bipolar disorder? **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 5, p. 361–368, 1993.

El-Mallakh, R. S.; Wyatt, R. J. The Na,K-ATPase hypothesis for bipolar illness. **Biological Psychiatry**, v. 37, p. 235–244, 1995.

El Yacoubi, M.; Ledent, C.; Parmentier, M.; Bertorelli, R.; Ongini, E.; Costentin, J.,; Vaugeois, J. M. Adenosine A2A receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A2A receptor knockout mice. **Br J Pharmacol.**, v. 134, p.68–77.

El Yacoubi, M.; Costentin, J.; Vaugeois, J. M. Adenosine A2A receptors and depression. **Neurology**, v. 61, p. 82–87, 2003.

Everitt, B. J. & Robbins, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habitsto compulsion. **Nat Neurosci.**, v.8, p. 1481–1489, 2005.

Fava, M. &| Kendler, K. S. Major depressive disorder. **Neu-Sci.**, v. 20, p. 59–61, 2000.

Feil, R. & Kleppisch, T. NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. **Handb Exp Pharmacol.**, v. 184, p. 529-60, 2008.

Freis, E. D. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. **N Engl J Med**, v. 251, p. 1006 – 1008, 1954.

Ferrara, J. M. & Stacy, M. Impulse-control disorders in Parkinson's disease. **CNS Spectr.**, v. 13, p. 690-698, 2008.

Feurté, S.; Nicolaidis, S.; Berridge, K. C. Conditioned taste aversion in rats for a threonine-deficient diet: demonstration by the taste reactivity test. **Physiol Behav.**, v. 68, p. 423-429, 2000.

File, S. E.; Zangrossi, H. Jr.; Sanders, F. L.; Mabbutt, P. S. Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. **Physiol. Behav.**, v. 54, 109-111, 1993.

Fredholm, B. B. ; Battig, K. ; Holmén, J. ; Nehlig, A. ; Zwartau, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol. Rev.**, v. 51, p. 83-133, 1999.

Fredholm, B. B.; Arslan, G.; Halldner, L.; Kull, B.; Schulte, G.; Wasserman, W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 362, p. 364-374.

Fredholm, B. B.; Chern, Y.; Franco, R.; Sitkovsky. M. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. **Prog Neurobiol.**, v. 83, p. 263-276, 2007.

Gamaro, G. D.; Streck, E. L.; Matté, C.; Prediger, M. E.; Wyse, A. T.; Dalmaz, C. Reduction of hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. **Neurochem Res.**, v. 28, p.1339-1344, 2003.

Ganchrow, J. R.; Steiner, J. E.; Daher, M. Neonatal facial expressions in response to different qualities and intensities of gustatory stimuli. **Infant Behavior and Development**, v. 6, p. 189–200, 1983.

Gershon, A. A.; Vishne, T.; Grunhaus, L. Dopamine D2 -like receptors and the antidepressant response. **Biol Psychiatry**, v. 61, p. 145–153, 2007.

Giovenardi, M.; Padoin, M. J.; Cadore, L. P.; Lucion, A. B. Hypothalamic Paraventricular Nucleus Modulates Maternal Aggression in Rats: Effects of Ibotenic Acid Lesion and Oxytocin Antisense - From behavior to gene expression. **Physiol. Behav.**, v. 63, n. 3, p. 351-359, 1998.

Giovenardi, M.; Consiglio, A. R.; Barros, H. M. T.; Lucion, A. B. Pup age and aggressive behavior in lactating rats. **Braz J Med Res.**, v. 33, p. 1083-1088, 2000.

Goetz, C. G. New developments in depression, anxiety, compulsiveness, and hallucinations in Parkinson's disease. **Mov Disord.**, v. 25, 2010.

Goldstein, I.; Levy, T.; Galili, D.; Ovadia, H.; Yirmiya, R.; Rosen, H.; Lichtstein, D. Involvement of Na, K -ATPase and Endogenous Digitalis-Like Compounds in Depressive Disorders. **Biol Psychiatry**, v. 60, p. 491–499, 2006.

Goldstein, R. Z.; Woicik, P. A.; Moeller, S. J.; Telang, F.; Jayne, M.; Wong, C.; Wang, G. J.; Fowler, J. S.; Volkow, N. D. Liking and wanting of drug and non-drug rewards in active cocaine users: the STRAP-R questionnaire. **J Psychopharmacol.**, v. 24, p. 257-266, 2010.

Grunbaum, J.; Kann, L.; Kinchen, S. Youth risk behavior surveillance: United States. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 51, p. 1–64, 1996

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, 2007.

Harvey, P. O.; Pruessner, J.; Czechowska Y. Individual differences in trait anhedonia: a structural and functional magnetic resonance imaging study in non-clinical subjects. **Mol Psychiatry**, v. 703, p. 767–775, 2007.

Hokin-Neaverson, M.; JeVerson, J. W. Erythrocytes sodium pump activity in bipolar affective disorder and other psychiatry disorders. **Neuropsychobiology**, v. 22, p. 1–7, 1989.

Hua, Y.; Huang, X. Y.; Zhou, L.; Zhou, Q. G.; Hu, Y.; Luo, C. X.; Li, F.; Zhu, D. Y. DETA/NONOate, a nitric oxide donor, produces antidepressant effects by promoting hippocampal neurogenesis. **Psychopharmacology** v. 200, p. 231-242, 2008.

Humphries, R. E.; Robertson, D. H. L.; Beynon, R. J.; Hurst, J. L. Unravelling the chemical basis of competitive scent marking in house mice. **Anim. Behav.**, v. 58, p. 1177-1190, 1999.

Hunter, A. M.; Balleine, B. W.; Minor, T. R. Helplessness and escape performance: glutamate-adenosine interactions in the frontal cortex. **Behav Neurosci.**, v. 117, p. 123–135, 2003.

Ikenouchi-Sugita, A.; Toyohira, Y.; Yoshimura, R.; Ueno, S.; Tsutsui, M.; Nakamura, J.; Yanagihara, N. Opposite effects of milnacipran, a serotonin norepinephrine reuptake

inhibitor, on the levels of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor in mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* v. 380, p. 479-486, 2009.

James, W. What is an emotion. **Mind**, v. 9:188–205, 1884.

Jang, S.; Suh, S.H.; Yoo, H.; Lee, Y.; Oh, S. Changes in iNOS, GFAP and NR1 Expression in Various Brain Regions and Elevation of Sphingosine-1-phosphate in Serum after Immobilized Stress. **Neurochem Res** v. 33 p. 842–851, 2008.

Jimerson, D.C. Role of dopamine mechanisms in affective disorders. **Psychopharmacology**, p. 505-511, 1987.

Joca, S.R. & Guimarães, F.S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology**, v. 185, p.298-305, 2006.

Kampe, J.; Tschöp, M.H.; Hollis, J.H.; Oldfield, B.J. An anatomic basis for the communication of hypothalamic, cortical and mesolimbic circuitry in the regulation of energy balance. **Eur J Neurosci.**, v. 3, p. 415-430, 2009.

Kann, L.; Warren, C.; Harris, W. Youth risk behavior surveillance: United States. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, v.45, p. 1–83, 1996.

Kapur, S. & Mann, J.J. Role of the dopaminergic system in depression. **Biol Psychiatry** v. 32, p. 1-17, 1992

Kavaliers, M. & Colwell, D. D. Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. **Proc. Roy. Soc.**, v. 261, p. 31-35.

Kendrick, K.M. Oxytocin, motherhood and bonding **Exp. Physiol.**, v. 85, p. 111-124, 2000.

Khovryakov, A.V.; Podrezova, E.P.; Kruglyakov, P.P.; Shikhanov, N.P.; Balykova, M.N.; Semibratova, N.V.; Sosunov, A.A.; McKhann, G.; Airapetyants, M.G. Involvement of the NO Synthase System in Stress-Mediated Brain Reactions. **Neuroscience and Behavioral Physiology.**, v. 40, p.333-337, 2010.

Kilpatrick, D.; Ruggiero, K.; Acierno, R.; Saunder, B.; Resnick, H.; Best, C. Violence and risk of PTSD, major depression, substance abuse/dependence, and cormorbidity: results from the National Survey of Adolescents. **J Consult Clin Psychol.** v. 7, p. 692–700, 2003.

Kiss, J.P. Theory of active antidepressants: A nonsynaptic approach to the treatment of depression. **Neurochemistry international**, v. 52, p. 34-39, 2008.

Kling, M. A.; Roy, A.; Doran, A. R.; Calabrese, J. R.; Rubinow, D. R.; Whitfield, H. J.; May, C.; Post, R. M.; Chrousos, G. P.; Gold, P. W. Cerebrospinal fluid immunoreactive corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotropin secretion in Cushing's disease and major depression: potential clinical implications. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 72, p. 260–271, 1991.

Kling, M. A.; Rubinow, D. R.; Doran, A. R.; Roy, A.; Davis, C. L.; Calabrese, J. R.; Nieman, L. K.; Post, R. M.; Chrousos, G. P.; Gold, P. W. Cerebrospinal fluid immunoreactive somatostatin concentrations in patients with Cushing's disease and major depression: relationship to indices of corticotropin-releasing hormone and cortisol secretion. **Neuroendocrinology**, v. 57, p. 79–88, 1993.

Kodydková, J.; Vávrová, L.; Zeman, M.; Jiráček, R.; Macáček, J.; Staňková, B.; Tvrzická, E.; Žák, A. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 1368–1374, 2009.

Kulkarni, S.K. & Mehta, A.K. Purine nucleoside-mediated immobility in mice: reversal by antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 460–463, 1985.

Kulkarni, S.K. & Sharma, A.C. Elevated plus-maze: a novel psychobehavioral tool to measure anxiety in rodents. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.**, v. 13, p.573-577, 1991

Ladd, C. O.; Huot, R. L.; Thirivikraman, K. V.; Nemeroff, C. B.; Meaney, M. J.; Plotsky, P. M. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. **Prog Brain Res.**, v. 122, p. 81-103, 2000.

LeDoux, J. The emotional brain: The mysterious underpinnings of emotional life. **New York: Simon & Schuster, 1996.**

Levine, S.; Haltmeyer, G. C.; Karas, G. G.; Denenberg, V. H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. **Physiol. Behav.**, v. 2, p. 55–59, 1967.

Lima. S. M. Stress and decision making under the risk of predation: Recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. **Ad. Study Behav.**, v. 27, p. 215-290, 1998.

Löfgren, M.; Johansson, I.M.; Meyerson, B.; Turkmen, S.; Bäckström, T. Withdrawal effects from progesterone and estradiol relate to individual risk-taking and explorative behavior in female rats. **Physiol Behav.**, v. 96, p. 91–97, 2009.

Lovic, V.; Gonzalez, A.; Fleming, A. S. Maternally separated rats show deficits in maternal care in adulthood. **Development on Psychobiology**, v. 39, n.1, p. 19 –33, 2001.

Lucca, G.; Comim, C. M.; Valvassori, S. S.; Réus, G. Z.; Vuolo, F.; Petronilho, F.; Dal-Pizzol F.; Gavioli, E. C.; Quevedo, J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. **Neurochemistry International** v. 54, p.358–362, 2009.

Lucki, I.; Dalvi, A.; Mayorga, A. J. Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. **Psychopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 315–322, 2001.

Macri, S. & Wurbel, H. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats : a critical review of the maternal mediation hypothesis. **Horm Behav.**, v. 50, p. 667-680, 2006.

- Maniam, J & Morris, M. J. Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. **Behav Brain Res.**, v. 208, p. 72-79, 2010.
- Mann, J. J. The Medical management of depression. **N Engl J Med.**, v. 353, n. 17, p. 1819-1834, 2005.
- Matsumoto, K.; Yobimoto, K.; Huong, N.T.; Abdel-Fattah, M.; Van Hien, T.; Watanabe, H. Psychological stress-induced enhancement of brain lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and anxiogenic drugs in mice. **Brain Res.** v. v. 839, p. 74-84, 1999.
- Minor, T. R.; Winslow, J. L.; Chang, W. C. Stress and adenosine: II. Adenosine analogs mimic the effect of inescapable shock on shuttle-escape performance in rats. **Behav Neurosci.**, v. 108, p. 265–276, 1994.
- Misdrahi, D.; Pardon, M. C.; Pérez-Diaz, F. ; Hanoun, N. ; Cohen-Salmon, C. Prepartum chronic ultramild stress increases corticosterone and estradiol levels in gestating mice : implications for postpartum depressive disorders. **Psychiatry Res.**, v. 137, p. 123-130. 2005.
- Molchan, S. E.; Hill, J. L.; Martinez, R. A.; Lawlor, B. A.; Mellow, A. M.; Rubinow, D. R.; Bissette, G.; Nemeroff, C. B.; Sunderland, T. CSF somatostatin in Alzheimer’s disease and major depression: relationship to hypothalamic–pituitary–adrenal axis and clinical measures. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, p. 509–519, 1993.
- Moosmann, B. & Behl, C. Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: structure activity relationship. **Mol. Pharmacol.**, v. 61, p. 260-268, 2002.
- Morrow, B. A.; Redmond, A. J.; Roth, R. H.; Elsworth, J. D. The predator odor, TMT, displays a unique stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. **Brain Res.**, v. 864, p. 146-151, 2000.
- Murray, C. J. & Lopez, A. D. Evidence-based health policy – lessons from the Global Burden of Disease Study. **Science**, v. 274, p. 740 – 743, 1996.
- Nelson, E. E. & Panksepp, J. Brain substrates of infant-mother attachment: contributions of opioids, oxytocin, and norepinephrine. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 22, n.3, p. 437-452, 1998.
- Nestler, E. J.; Barrot, M.; DiLeone, R. J.; Eisch, A. J.; Gold, S. J.; Monteggia, L. M. Neurobiology of Depression. **Neuron**, v.34, p. 13-25, 2002.
- Nestler, E. J.; & Carlezon, W.A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiatry**, v. 59, p.1151–1159, 2006.
- Neumann, I. D. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. **J Neuroendocrinol.**, v. 20, p. 858-865, 2008.
- Newport, D. J.; Stowe, Z. N.; Nemeroff, C. B. Parental depression: animal models of an adverse life event. **Am. J. Psychiat.**, v. 159, p. 1265-1283, 2002.

Ng, F.; Berk, M.; Dean, O.; Bush, A. I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol.*, v. 11, p. 851-876, 2008.

Nomikos, G. G.; Damsma, G.; Wenkstern, D.; Fibiger, H. C. Chronic desipramine enhances amphetamine-induced increases in interstitial concentrations of dopamine in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol.*, v. 195, p. 63-73, 1991.

Ogawa, T.; Mikuni, M.; Kuroda, Y.; Muneoka, K. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 49, p. 961-967, 1994.

Oliveira, R.M.; Guimarães, F.S.; Deakin, J.F. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Braz J Med Biol Res.*, v. 41, p. 333-341, 2008.

Palumbo, M. L.; Fosser, N. S.; Rios, H.; Zubilete, M. A. Z.; Guelman, L. R.; Cremaschi, G. A.; Genaro, A. M. Loss of hippocampal neuronal nitric oxide synthase contributes to the stress-related deficit in learning and memory. *Journal of Neurochemistry*, v. 102, p. 261-274, 2007.

Papp, M.; Klimek, V.; Willner, P. Parallel changes in dopamine D2 receptor binding in limbic forebrain associated with chronic mild stress-induced anhedonia and its reversal by imipramine. *Psychopharmacology*, v. 115, p. 441-446, 1994.

Pedersen, C.A. Oxytocin control of maternal behavior: regulation by sex steroids and offspring stimuli. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 807, p. 126-145, 1997.

Pelchat, M.L.; Johnson, A.; Chan, R.; Valdez, J.; Ragland, J. D. Images of desire: food-craving activation during fMRI. *Neuroimage*, v. 23, p. 1486-1493, 2004.

Pitts, A. F.; Samuelson, S. D.; Meller, W. H.; Bissette, G.; Nemeroff, C. B.; Kathol R. G. Cerebrospinal fluid corticotropin-releasing hormone, vasopressin, and oxytocin concentrations in treated patients with major depression and controls. *Biological Psychiatry*, v. 38, p. 330-335, 1995.

Porsolt, R.D. Animal model of depression. *Biomedicine*, v. 30, p. 139-140, 1979.

Post, R. M.; Kotin, J.; Goodwin, F. K. Psychomotor activity and cerebrospinal fluid metabolites in affective illness. *Am J Psychiatry*, v. 130, p. 67-72, 1973.

Plotsky, P. M. & Meaney, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Mol. Brain Res.*, v. 18, p. 195-200, 1993.

Pryce, C. R.; Bettschen, D.; Feldon, J. Comparison of effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev Psychobiol.*, v 39, p. 239-251, 2001.

Pryor, J. C. & Sulser, F. Evolution of the monoamine hypothesis of depression. **Biological aspects of affective disorders. New York Academic Press**, v. 2, p. 77- 94, 1991.

Reddy, P. L.; Khanna, S.; Subash, M. N. CSF amino metabolites in depression. **Biol Psychiatry**, v. 31, p. 112–118, 1992.

Rezin, G. T.; Amboni, G.; Zugno, A. I.; Quevedo, J.; Streck, E. L. Mitochondrial Dysfunction and Psychiatric Disorders. **Neurochem Res.**, v. 34, p. 1021–1029, 2009.

Ribeiro, J. A.; Sebastião, A. M.; de Mendonça, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. **Prog Neurobiol.**, v. 68, p. 377-392, 2002.

Robinson, T. E. & Berridge, K. C. Addiction. **Annu Rev Psychol** v. 54, p. 25–53, 2003.

Rosenstein, D. & Oster, H. Differential facial responses to four basic tastes in newborns. **Child Development**, v. 59, p. 1555–1568, 1988.

Rossetti, Z. L.; D'Aquila, P. S.; Hmaidan, Y.; Gessa, G. L.; Serra, G. Repeated treatment with imipramine potentiates cocaine-induced dopamine release and motor stimulation. **Eur J Pharmacol.**, v. 201, p. 243-245, 1991.

Roy, A.; Karoum, F.; Pollack, S. Marked reduction in indexes of dopamine transmission among patients with depression who attempted suicide. **Arch Gen Psychiatry**, v. 49: p. 447–450, 1992.

Salamone, J. D. & Correa, M. Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. **Behav Brain Res.**, v. 137, p.3–25, 2002.

Sanders, A. R.; Detera-Wadleigh, S. D.; Gershon, E. S. Molecular genetics of mood disorders. **Neurobiology of Mental Illness**, v. 1, p. 299–316, 1999.

Scantamburlo, G.; Anseau, M.; Geenen, V.; Legros, J. J. Oxytocin: From milk ejection to maladaptation in stress response and psychiatric disorders. A psychoneuroendocrine perspective. **Ann Endocrinol.**, v. 70, p. 449-454, 2009.

Schmidt, H. D. & Duman, R. S. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. **Behav Pharmacol.**, v. 5, p. 391-418, 2007.

Senogles, S. E.; Amlaiky, N.; Berger, J. G.; Caron, M. G. Biochemical properties of D1 and D2 dopamine receptors. **Adv Exp Med Biol.**, v. 235, p. 33-41, 1988.

Silveira, P. P.; Portella, A. K.; Clemente, Z.; Gamaro, G. D.; Dalmaz, C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. **Int J Dev Neurosci.**, v. 23, p. 93-99, 2005.

Stahl, S. Psicofarmacologia - Bases Neurocientíficas e Aplicações Clínicas. 1º ed. Rio de Janeiro: Editado por Medsi Editora Médica e Científica LTDA, 1998.

Steiner, J. E. The gustofacial response: Observation on normal and anencephalic newborn infants. **Symposium on Oral Sensation and Perception**, v. 4, p. 254–278, 1973.

Steiner, J. E.; Glaser, D.; Hawilo, M. E.; Berridge, K. C. Comparative expression of hedonic impact: Affective reactions to taste by human infants and other primates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 53–74, 2001.

Sung, Y. H.; Shin, M. S.; Cho, S.; Baik, H. H.; Jin, B. K.; Chang, H. K. ; Lee, E. K.; Kim, C. J. Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus. **Neurosci Lett.**, v. 470, p. 86-90, 2010.

Tanda, G.; Carboni, E.; Frau, R.; Di Chiara, G. Increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex: A trait of drugs with antidepressant potential? **Psychopharmacology**, v. 115, p. 285-288, 1994

Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**v. 39, p. 44-84, 2007.

van Leengoed, E.; Kerker, E.; Swanson, H. H. Inhibition of postpartum maternal behavior in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. **Journal of Endocrinology**, v. 112, p. 275-282, 1987.

Viola, M. S. & Rodríguez de Lores Arnaiz, G. Brain Na⁺, K⁺-ATPase isoforms: different hypothalamus and mesencephalon response to acute desipramine treatment. **Life Sci.** v. 81, p. 228-233, 2007.

Volkow, N. D.; Wang, G. J.; Fischman, M. W.; Foltin, R. W.; Fowler, J. S. Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. **Nature** v. 386, p. 827–830, 1997.

Volkow, N. D.; Wang, G. J.; Fowler, J. S.; Logan, J.; Gatley, S. J.; Hitzemann, R.; Chen, A.D.; Dewey, S.L.; Pappas, N. Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. **Nature**. v. 386, p. 830-833, 1997.

Wang, D.; An, S. C.; Zhang, X. Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. **Neurosci Lett.**, v. 433, p. 59-64, 2008.

Walker, C. D.; Deschamps, S.; Proulx, K.; Tu, M.; Salzman, C.; Woodside, B.; Lupien, S.; Gallo-Payet, N.; Richard, D. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. **Rev Psychiatr Neurosci**, v. 29, p. 364-382, 2004.

Wegener, G.; Harvey, B. H.; Bonefeld, B.; Müller, H.K.; Volke, V.; Overstreet, D. H.; Elfving, B. Increased stress-evoked nitric oxide signalling in the Flinders sensitive line (FSL) rat: a genetic animal model of depression. **Int J Neuropsychopharmacol.**, v. 13, p. 461-473, 2010.

Willner, P. Dopamine and depression: A review of recent evidence. **Brain Res Rev** v. 6, p. 211-224, 1983.

Willner, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, 319-329, 1997.

Willner, P.; Muscat, R.; Papp, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 16, p. 525-534, 1992.

Willner, P.; Muscat, R.; Papp, M. An animal model of anhedonia. **Clin Neuropharmacol.**, v.15, p. 550-551, 1992.

Winkielman, P.; Berridge, K. C.; Wilbarger, J. Unconscious affective reactions to masked happy versus angry faces influence consumption behavior and judgments of value. **Pers Soc Psychol Bull.**, v. 31, p. 121-135, 2005.

Winkielman, P.; Zajonc, R. B.; Schwarz, N. Subliminal affective priming resists attributional interventions. **Cognition and Emotion**, v. 11, p. 433-465, 1997.

Woodson, J. C.; Minor, T.R.; Job, R.F. Inhibition of adenosine deaminase by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) mimics the effect of inescapable shock on escape learning in rats. **Behav Neurosci.**, v. 112, p. 399-409, 1998.

Wotjak, C. T.; Naruoi, T.; Muraoka, S.; Simchen, R.; Landgraf, R.; Engelman, M. Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. **Eur. J. Neurosci.**, v. 13, p. 2273-2281, 2001.

Xu, K.; Bastia, E.; Schwarzschild, M. Therapeutic potential of adenosine A(2A)receptor antagonists in Parkinson's disease. **Pharmacol Ther.**, v. 105, p. 267-310, 2005.

Yaroslavsky, I.; Colletti, M.; Jiao, X. Strain differences in the distribution of dopamine (DA-2 and DA-3) receptor sites in rat brain. **Life Sci.**, v. 79, p. 772-776, 2006.

Zafir, A. & Banu, N. Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. **Indian J Biochem Biophys.**, v. 46, p. 53-58, 2009.

Zanatta, L. M.; Nascimento, F. C.; Barros, S. V.; Silva, G. R.; Zugno, A. I.; Netto, C. A.; Wyse, A. T. S. In vivo and in vitro effect of imipramine and fluoxetine on Na⁺ K⁺-ATPase activity in synaptic plasma membranes from the cerebral cortex of rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 1265–1269, 2001.

Zajonc, R. B. Feeling and thinking: Preferences need no inferences. **American Psychologist**, v.35, p.151–175, 1980

Zajonc, R. B. Feeling and thinking: The role of affect in social cognition. **In J. P.**, p. 31–58, 2000.

Zhou, Q. G.; Hu, Y.; Hua, Y.; Hu, M.; Luo, C. X.; Han, X.; Zhu, X. J.; Wang, B.; Xu, J. S.; Zhu, D. Y. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. **J Neurochem.**, v.103, p.1843-1854, 2007.

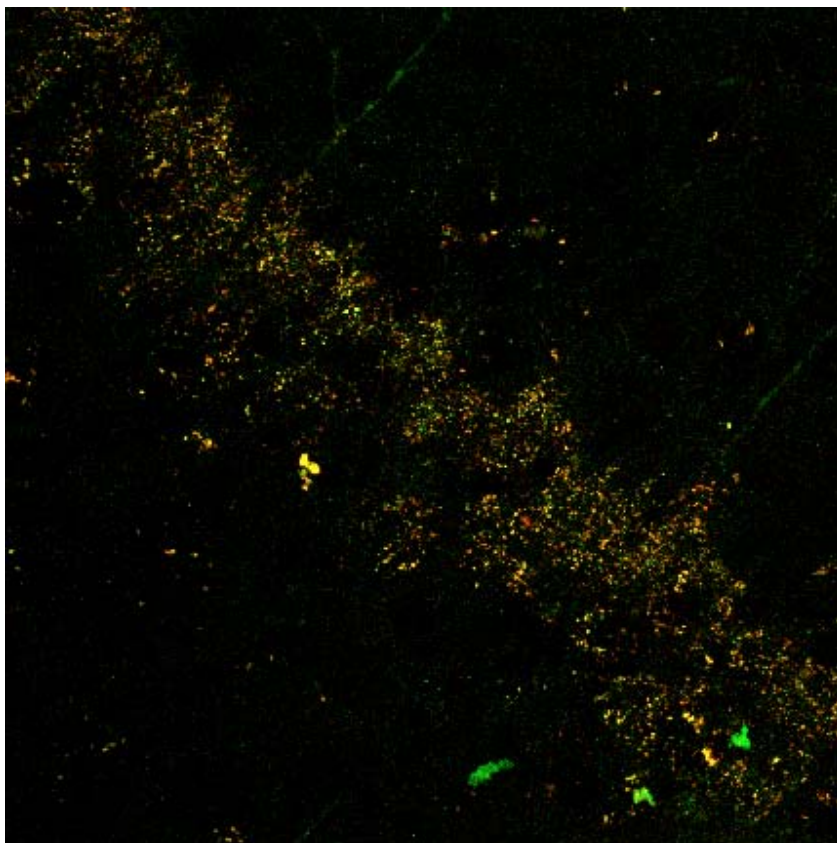
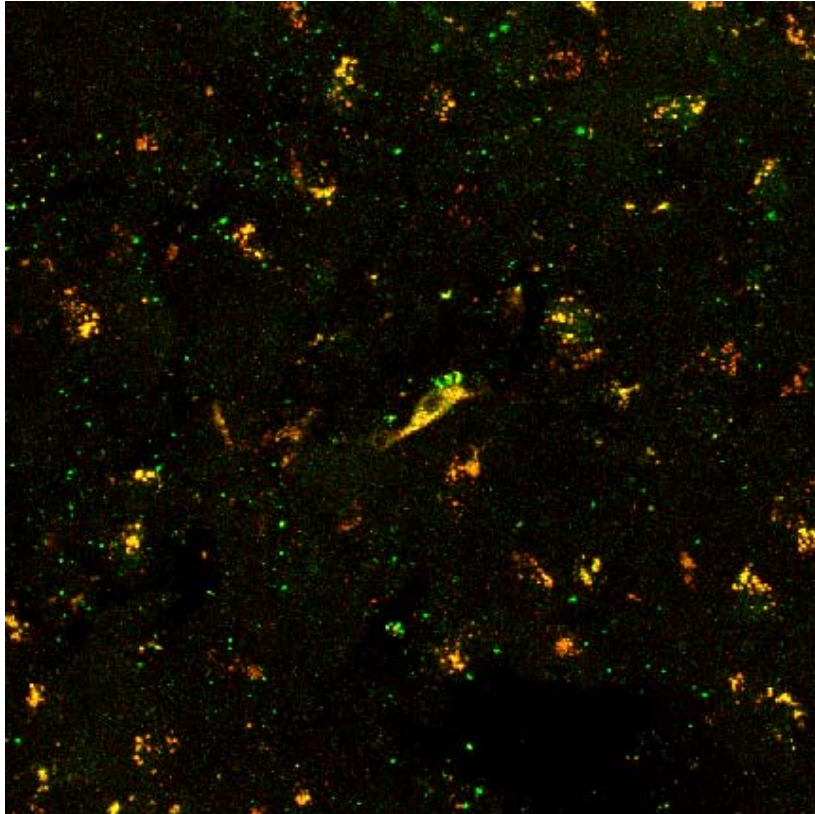
ANEXO 1 –Fotos de imunohistoquímica realizadas por Microscopia confocal

Marcação para receptores A2A de adenosina: pontos vermelhos

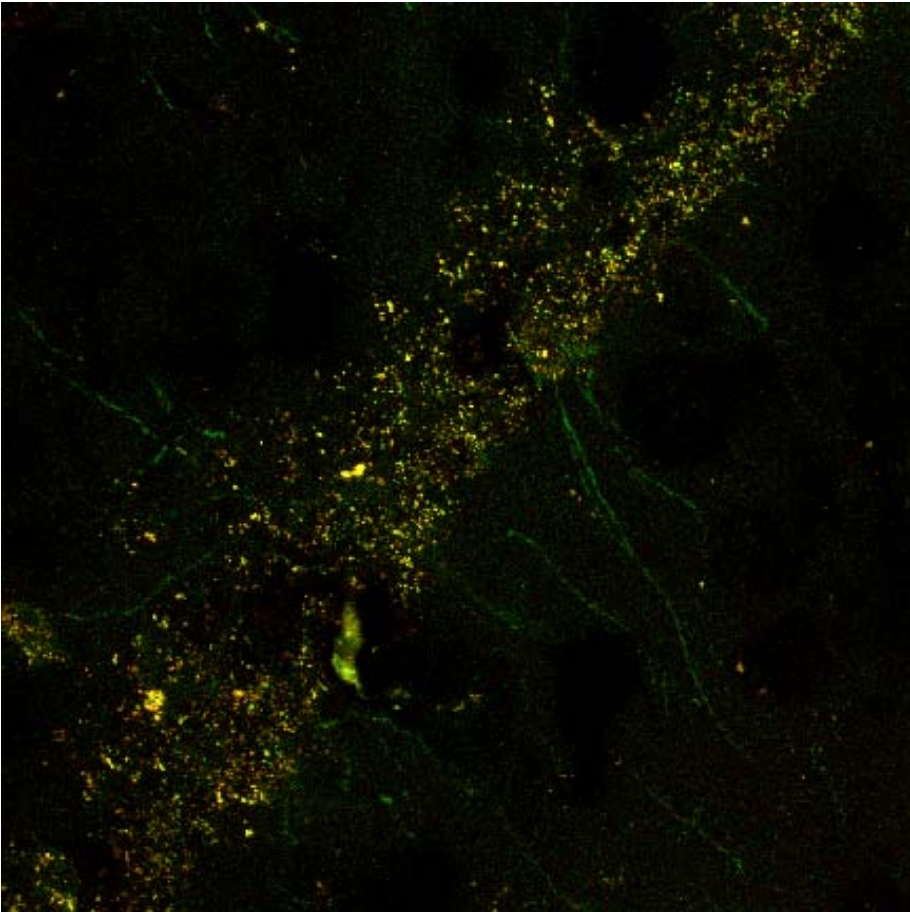
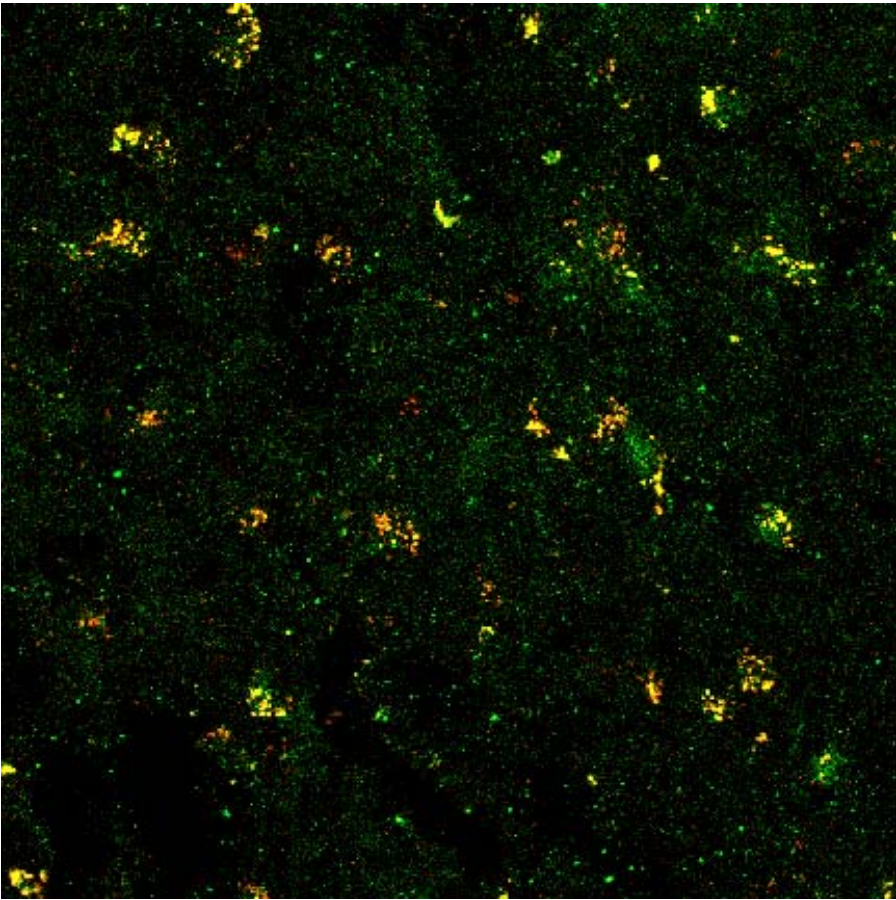
Marcação para receptores D2 de dopamina: pontos verdes

Pontos amarelos e/ou laranjas: colocalização de receptores A2A e D2

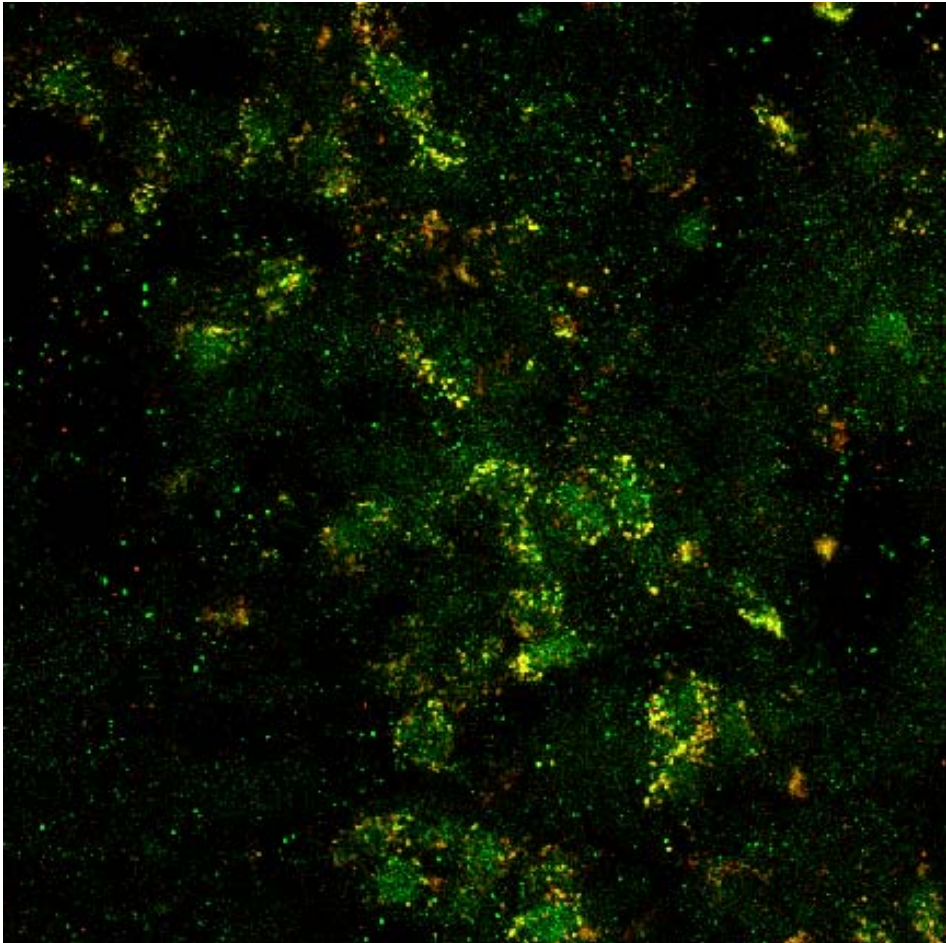
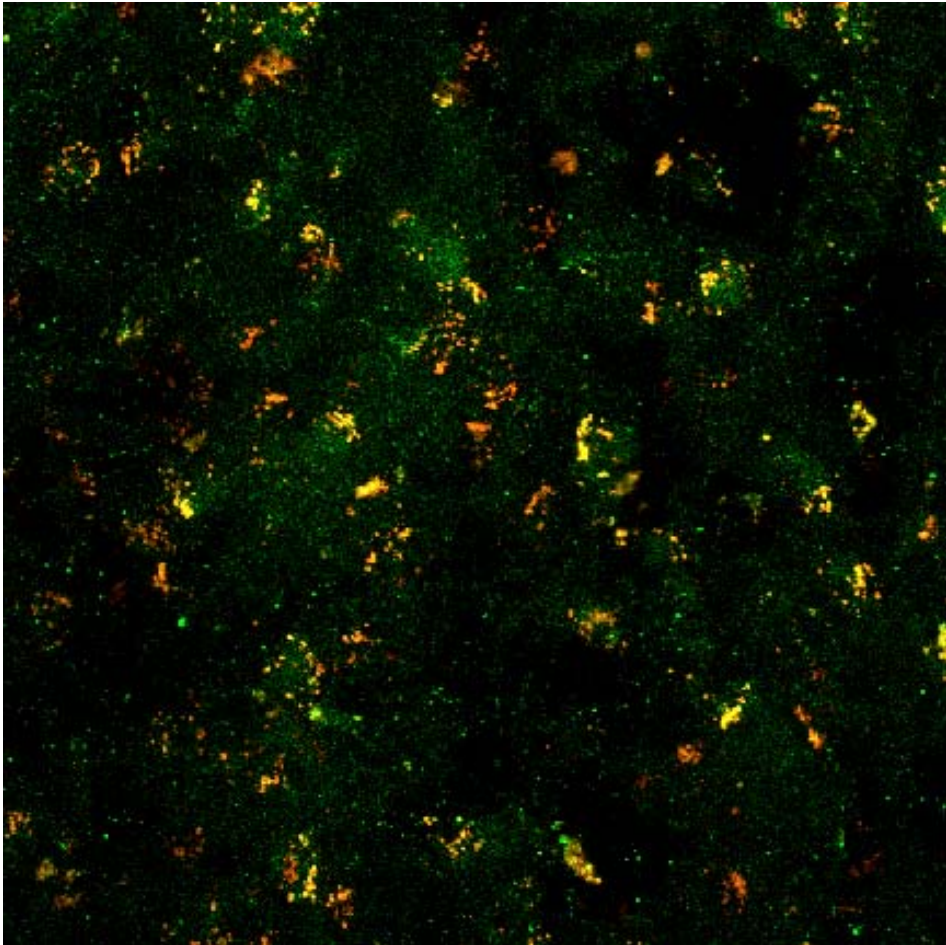
Anexo 1.1 – Estriado e hipocampo do grupo controle



Anexo 1.2 – estriado e hipocampo do grupo submetido a separação por 10 minutos

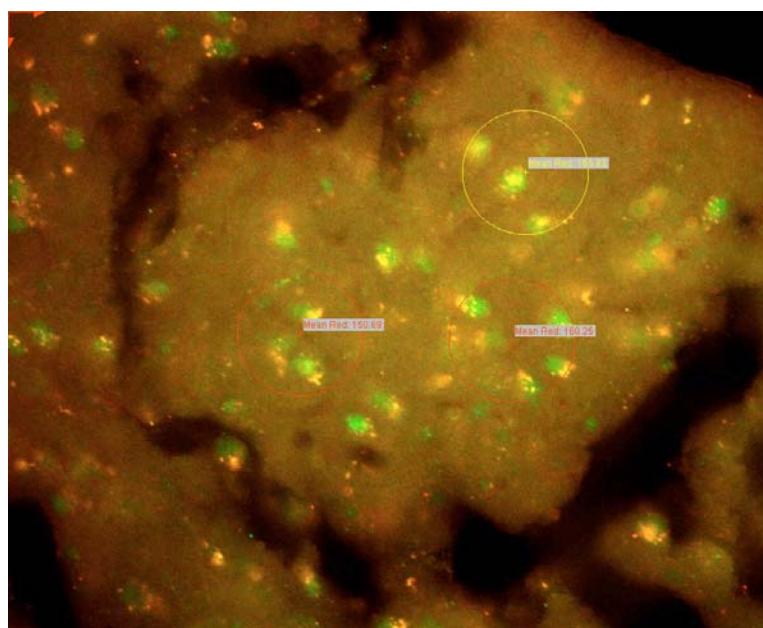
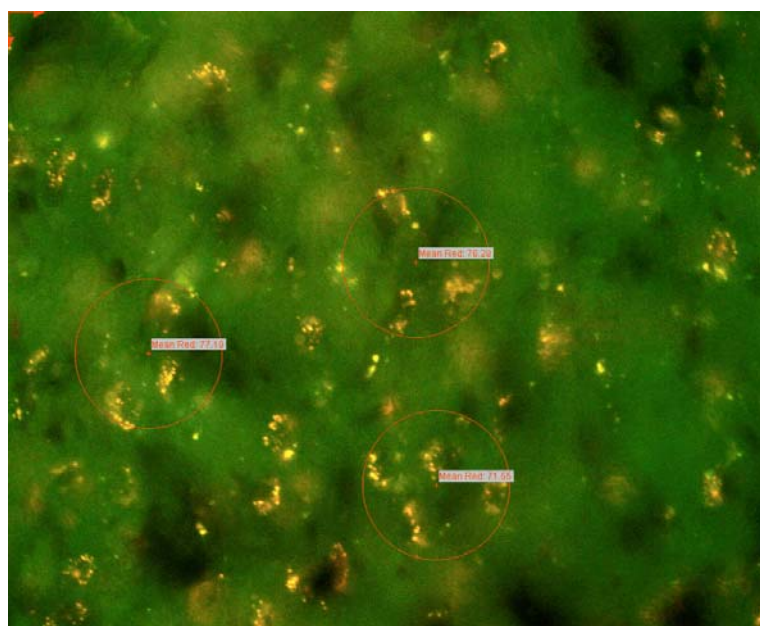


Anexo 1.3 – Estriado e hipocampo das genitoras submetidas a separação por 3 horas

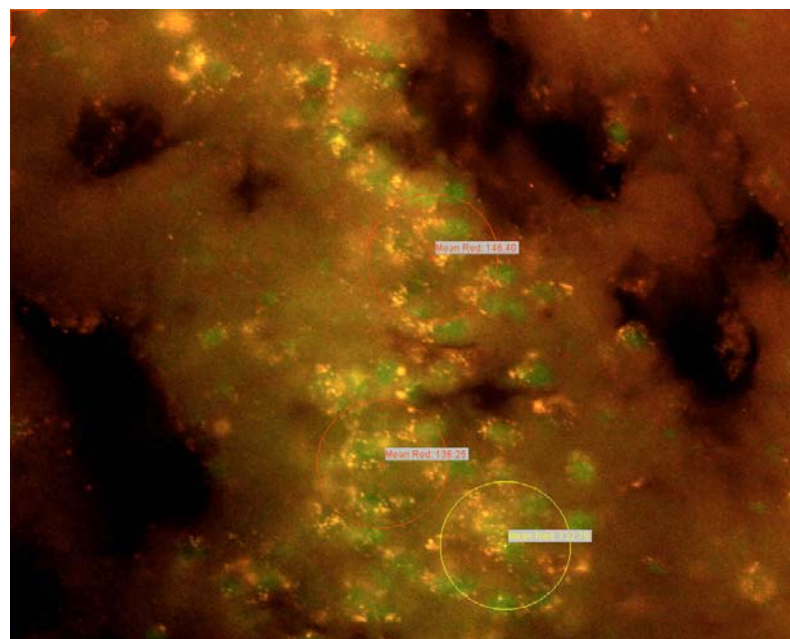
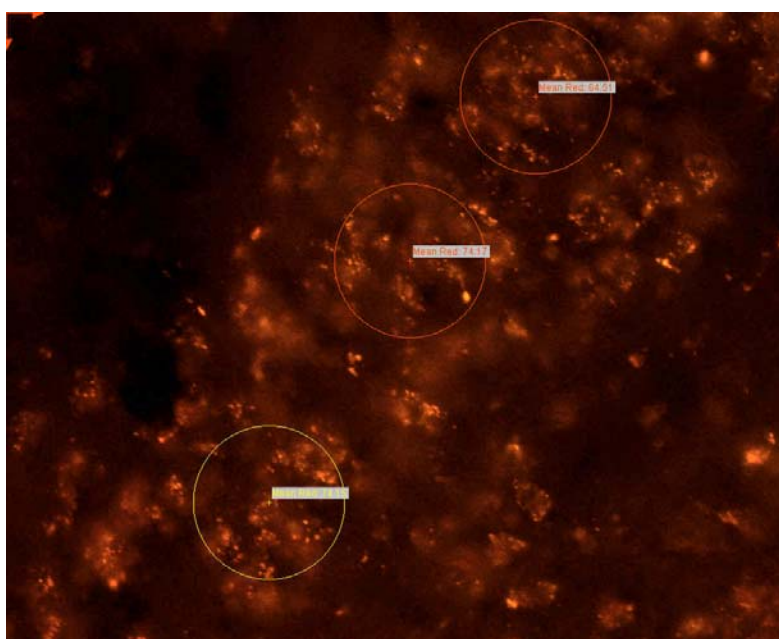


Anexo 2 – Fotos de imunohistoquímica realizada com microscópio invertido de fluorescência (Olympus FV1000), Três áreas aleatórias por região de interesse (300 μm^2) (hipocampo e estriado dorsolateral) foram escolhidas por animal e a fluorescência quantificada utilizando o programa Cell M (Olympus). Pontos verdes = receptores D2 / Pontos vermelhos = receptores A2A / Pontos amarelos = colocalização de receptores

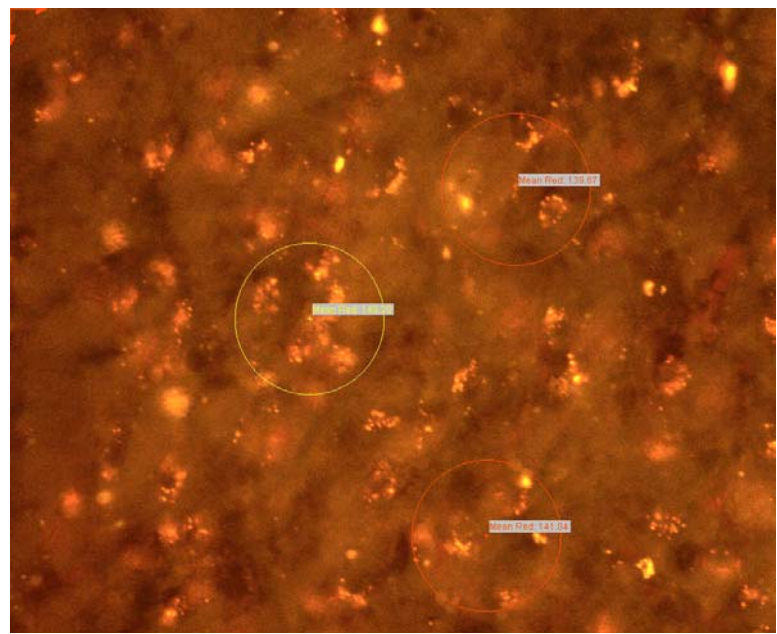
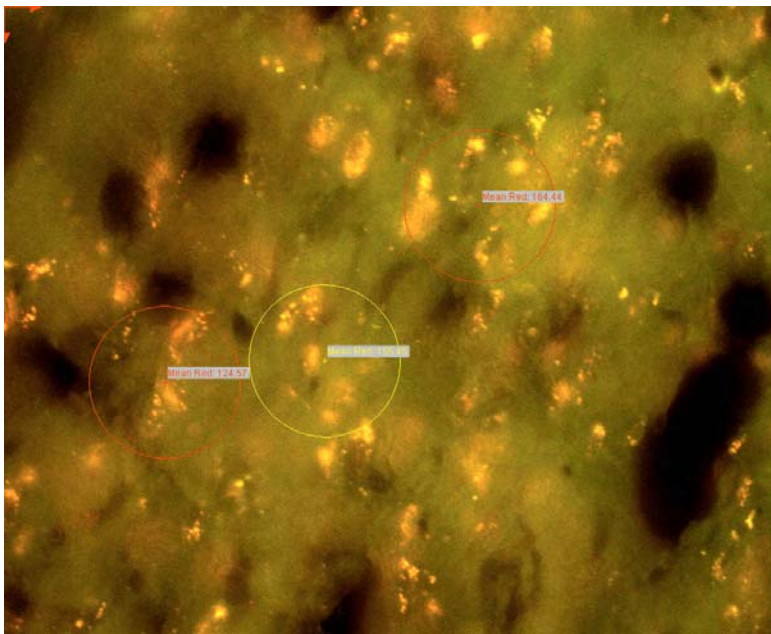
Controle estriado



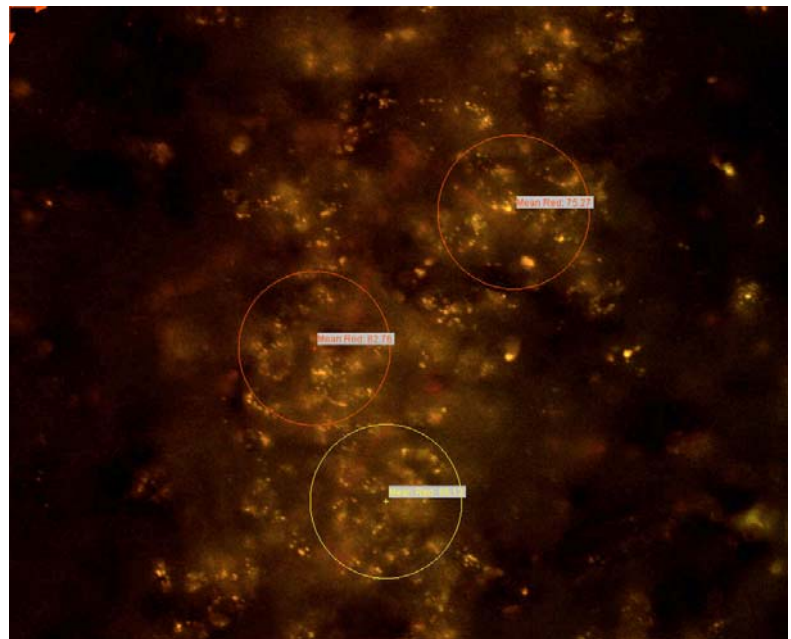
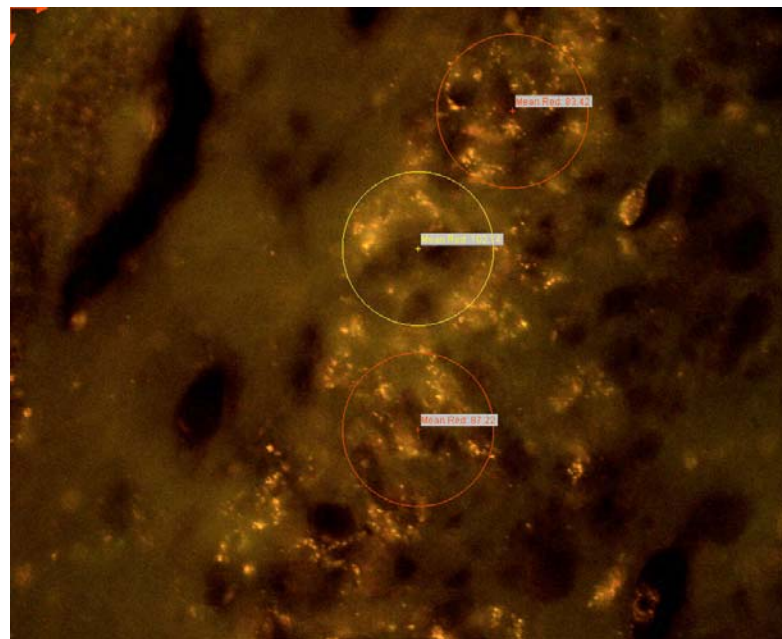
Controle hipocampo



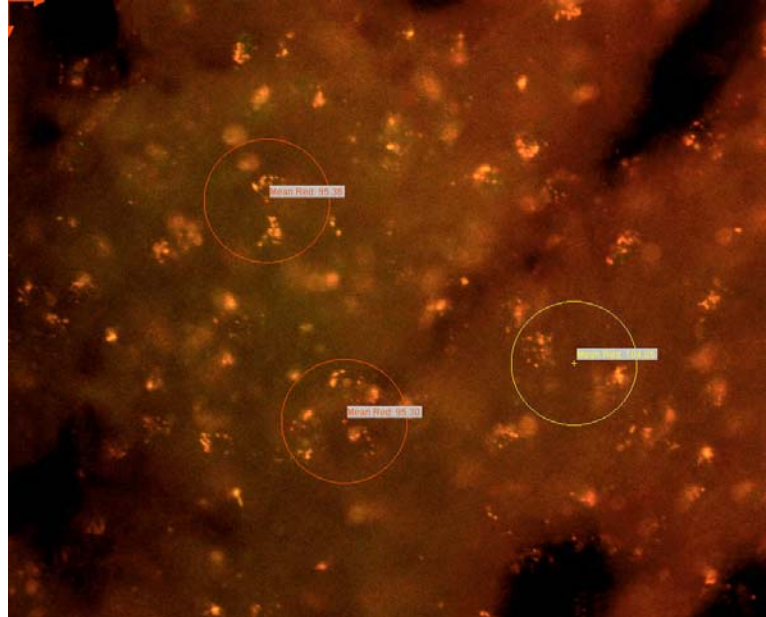
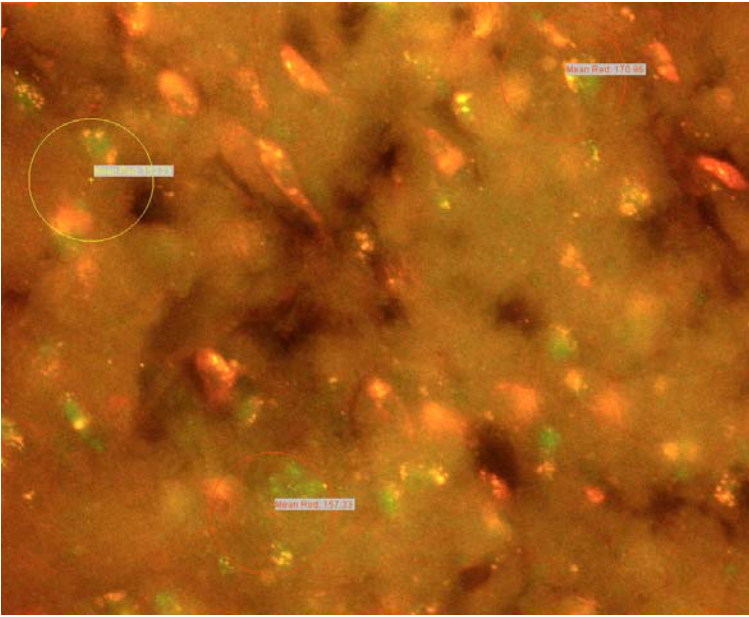
Separado 10 minutos - estriado



Separado 10 minutos - hipocampo



Separado 3 horas - estriado



Separado 3 horas - hipocampo

