

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS**

**BEN-HUR SOUTO DAS NEVES**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO E ENDOCANABINOIDE NOS  
DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS PELA PRIVAÇÃO MATERNAL**

**Uruguiana**

**2024**

**BEN-HUR SOUTO DAS NEVES**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO E ENDOCANABINÓIDE NOS  
DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS PELA PRIVAÇÃO MATERNAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas

Orientadora: Profa. Dra. Pâmela Billig Mello-Carpes

Uruguiana, 22 de Abril de 2024.

**Uruguiana**

**2024**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

S518p Souto das Neves, Ben-Hur  
PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO E  
ENDOCANABINOIDE NOS DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS PELA  
PRIVAÇÃO MATERNAL / Ben-Hur Souto das Neves.  
134 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa,  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 2024.  
"Orientação: Pâmela Billig Mello-Carpes".

1. Memória de reconhecimento. 2. Dimorfismos  
sexuais. 3. Area tegmental ventral. 4. Locus coeruleus.  
5. Estresse. I. Título.

**BEN-HUR SOUTO DAS NEVES**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO E ENDOCANABINOIDE NOS DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS PELA PRIVAÇÃO MATERNAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, campus Uruguaiana, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Tese defendida e aprovada em: 22 de abril de 2024

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Pâmela Billig Mello Carpes – Orientadora - Unipampa

---

Prof. Dr. Fernando Benetti - UFRGS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Matté - UFRGS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liane da Silva de Vargas - Unipampa

Dedico este trabalho à **minha família**. Ao meu pai, Sidney, meu apoio incondicional. À minha mãe, Claudia, meu porto seguro. Ao meu irmão, Matheus, meu mais leal e fiel amigo. Vocês são símbolo de amor. Obrigado por me permitirem viver.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Pamela Billig Mello-Carpes** por ser minha guia e fonte de inspiração. Obrigado por compartilhar comigo uma parte da tua trajetória, por todo conhecimento compartilhado e por despertar em mim a paixão pela ciência. Obrigado por me ensinar a aprender.

Às **professoras e professores** do Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – PMPGCF da Unipampa. Vocês foram peça-chave na construção do meu conhecimento e essenciais para minha formação.

Aos **integrantes do Grupo de Pesquisa em Fisiologia – GPFis**, por toda ajuda nos experimentos e pelas discussões científicas. Em especial, as coautoras e coautores dos estudos que compõe essa tese e de estudos paralelos desenvolvidos no GPFis. Sem vocês, nada disso seria possível.

Às minhas **melhores amigas**, Thaila e Caroline Altermann, por serem meus ouvidos e por me mostrarem que amizades improváveis são possíveis. Obrigado por esses 11 anos de amizades, por me apoiarem em todos os momentos e por sempre me dizerem o que eu precisava ouvir, e não o que eu queria.

À minha **ex-namorada**, Caroline, por suportar o insuportável. Obrigado por estar comigo e me apoiar nos momentos que eu mais precisei.

Aos **amigos** que fiz em Uruguaiana, Ana Carolina, Anna Cecília, Bruno, Gabriela, Giulia, Gustavo, Karine, Larissa, Marisele e Pâmella. Obrigado por serem meus amigos dentro e fora da academia. Vou levar a amizade de vocês para o resto da vida.

À minha **nova família**.

Ao meu pai biológico, Marcelo, à minha mãe adotiva Graziela, e às minhas irmãs, Daniela e Manuela.

À minha mãe biológica Antônia e às minhas irmãs Brenda, Muriel e Raquel, e aos meus irmãos, Samuel e Taffarel.

Vocês também fazem parte dessa trajetória.

Muito obrigado a todos pelo **apoio e incentivo**.

## RESUMO

Eventos estressores no início da vida, como a privação materna (PM), levam a déficits de memória que podem persistir até a vida adulta. Alterações moleculares e/ou morfológicas em estruturas importantes para os processos de memória, tais como o hipocampo, área tegmental ventral e *locus coeruleus*, podem explicar os déficits de memória observados em modelos de PM em roedores. Além disso, sistemas de neurotransmissores que modulam os processos de consolidação e persistência da memória de longa duração, tais como os sistemas dopaminérgico e endocanabinóide, podem ser afetados pelo estresse crônico no início da vida. Nesta tese, nós investigamos os efeitos da PM no processo de aprendizagem e memória usando modelos de ratos e camundongos adultos machos e fêmeas. Aqui nós demonstramos que apenas machos submetidos à PM apresentaram déficits de memória de reconhecimento na vida adulta, enquanto as fêmeas parecem não ser afetadas. No entanto, intervenções farmacológicas específicas foram capazes de reverter esses déficits nos machos, de promover a persistência da memória independentemente do sexo ou da exposição à PM. A estimulação farmacológica da área tegmental ventral imediatamente após a aprendizagem foi eficaz na reversão do déficit de memória de reconhecimento em ratos machos, além de promover a persistência da memória em ambos os sexos, independentemente da exposição à PM. Além disso, a estimulação da via dopaminérgica *locus coeruleus* - hipocampo dorsal também mostrou resultados semelhantes, revertendo o déficit de memória em ratos machos e promovendo a persistência da memória em ambos os sexos. No entanto, a manipulação do sistema endocanabinóide através da infusão intraperitoneal de um agonista CB1 não foi eficaz na reversão do déficit de memória espacial induzido pela PM em camundongos machos. Esses resultados ressaltam a importância de considerarmos as diferenças de gênero na resposta ao estresse e na regulação da memória, bem como na avaliação do potencial de intervenções farmacológicas específicas para mitigar os efeitos negativos da privação materna. Esta tese oferece *insights* valiosos acerca dos mecanismos subjacentes aos efeitos da PM aprendizagem e memória, bem como possíveis alvos para o desenvolvimento de tratamentos para problemas de memória relacionados ao estresse.

**Palavras-chave:** Memória de reconhecimento, dimorfismos sexuais, área tegmental ventral, *locus coeruleus*, estresse.

## ABSTRACT

Early life stressful events, such as maternal deprivation (MD), lead to memory deficits that can persist into adulthood. Molecular and/or morphological alterations in structures important for memory processes, such as the hippocampus, ventral tegmental area, and locus coeruleus, may explain the memory deficits observed in rodent models of MD. Additionally, neurotransmitter systems that modulate the long-term memory consolidation and persistence, such as the dopaminergic and endocannabinoid systems, may be affected by early-life chronic stress. In this thesis, we investigated the effects of MD on learning and memory processes using males and female adult rat and mouse models. Here, we demonstrate that only MD males exhibited recognition memory deficits in adulthood, while females appeared to be unaffected. However, specific pharmacological interventions were able to reverse these deficits in males, and to promote memory persistence regardless of gender or MD exposure. Pharmacological stimulation of the ventral tegmental area immediately after learning was effective in reversing recognition memory deficits in male rats and promoting memory persistence in both sexes, regardless of MD exposure. Additionally, stimulation of the dopaminergic locus coeruleus-hippocampal pathway also showed similar results, reversing memory deficits in male rats and promoting memory persistence in both sexes. However, manipulation of the endocannabinoid system through intraperitoneal infusion of a CB1 agonist was not effective in reversing spatial memory deficits induced by MD in male mice. These results highlight the importance of considering gender differences in stress response and memory regulation, as well as in the evaluation of specific pharmacological interventions potential to mitigate the negative effects of maternal deprivation. This thesis offers valuable insights into the underlying mechanisms of MD on learning and memory effects, as well as potential targets for the development of treatments for stress-related memory issues.

**Key words:** Recognition memory, sex differences, ventral tegmental area, locus coeruleus, stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Homeostase e alostase .....	3
<b>Figura 2.</b> Um dos mecanismos fisiológicos desencadeados em eventos estressores .....	5
<b>Figura 3.</b> Principais tarefas de avaliação do aprendizado e memória em roedores. ....	9
<b>Figura 4.</b> Projeções dopaminérgicas da área tegmental ventral (ATV) e do locus coeruleus (LC) para o hipocampo (HP) .....	13
<b>Figura 5.</b> Processos de síntese, liberação, degradação e interação da dopamina com os diferentes receptores. ....	14
<b>Figura 6.</b> Neurotransmissão do sistema endocanabinóide (ECS). ....	16
<b>Figura 7.</b> Período hiporresponsivo ao estresse (SHRP). ....	21
<b>Figura 8.</b> Delineamento experimental do estudo 1. ....	34
<b>Figura 9.</b> Delineamento experimental do estudo 2. ....	36
<b>Figura 10.</b> Delineamento experimental do estudo 3. ....	37
<b>Figura 11.</b> Tarefa de reconhecimento de objetos (RO). ....	41
<b>Figura 12.</b> Objetos utilizados na tarefa de reconhecimento de objetos .....	41
<b>Figura 13.</b> Labirinto Aquático de Morris (LAM). ....	42
<b>Figura 14.</b> Efeitos da PM e da estimulação da área tegmental ventral na consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos (RO) em ratos machos. ....	47
<b>Figura 15.</b> Efeitos da PM e da estimulação da área tegmental ventral na consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos (RO) em ratas fêmeas. ....	50
<b>Figura 16.</b> A PM reduz o ID em ratos machos, e a infusão de NMDA na área tegmental ventral reverte o déficit de memória relacionado ao PM; as fêmeas são resilientes aos efeitos da PM no ID. ....	52
<b>Figura 17.</b> Comparações do Índice de Discriminação de Objetos (ID), considerando o sexo como variável .....	55
<b>Figura 18.</b> Efeitos da PM e da modulação da via dopaminérgica LC-HD na consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratos machos. ....	64
<b>Figura 19</b> Efeitos da PM e da modulação da via LC-HD na consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratas fêmeas. ....	68
<b>Figura 20.</b> PM reduz o ID em ratos machos, e a estimulação da via dopaminérgica LC-HD reverte o déficit de memória relacionado a PM e promove a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratos machos não-PM e PM. ....	70
<b>Figura 21.</b> Ratas fêmeas são resilientes à PM; a estimulação da via dopaminérgica LC-HD promove a persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratas fêmeas PM e não-PM. ....	71
<b>Figura 22.</b> Efeito da infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores canabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2) na aprendizagem espacial de camundongos machos e fêmeas PM e não-PM, na primeira e na segunda semana de treinamento. ....	79

<b>Figura 23.</b> Efeito da infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores canabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2) na aprendizagem espacial de camundongos machos e fêmeas PM e não-PM, ao longo de todo treinamento.....	80
<b>Figura 24.</b> Efeito da PM e da infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores canabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2) na memória espacial de camundongos machos e fêmeas. ....	82
<b>Figura 25.</b> A PM e a infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores canabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2) não afeta a atividade locomotora e exploratória ou comportamento do tipo ansioso de camundongos machos e fêmeas.....	82
<b>Figura 26.</b> A PM e a infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores canabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2) não tem alteram o comportamento do tipo ansioso de camundongos machos e fêmeas PM e não-PM.....	84

## LISTA DE SIGLAS

Sigla	Português	Inglês
<b>2-AG</b>	2-Araquidonoilglicerol	2-Arachidonoylglycerol
<b>ABL</b>	Amígdala Basolateral	<i>Basolateral Amygdala</i>
<b>ACTH</b>	Hormônio Adrenocorticotrófico	<i>Adrenocorticotropin Hormone</i>
<b>AEA</b>	N-Araquidonoil Etanolamina	N-Arachidonoyl ethanolamine
<b>AMG</b>	Amígdala	Amygdala
<b>ANS</b>	Sistema Nervoso Autônomo	<i>Autonomic Nervous System</i>
<b>ATV</b>	Área Tegmental Ventral	<i>Ventral Tegmental Area</i>
<b>BDNF</b>	Fator Neurotrófico Derivado Do Cérebro	Brain Derived Neurotrophic Fator
<b>CA</b>	Campo Aberto	<i>Open Field</i>
<b>CaMKII</b>	Proteína Quinase Dependente De Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina II	<i>Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II</i>
<b>CBD</b>	Canabidiol	Cannabidiol
<b>CBR</b>	Receptores Canabinoides	Cannabinoid Receptors
<b>CORT</b>	Corticosterona/Cortisol	<i>Corticosterone/Cortisol</i>
<b>CPF</b>	Córtex Pré-Frontal	<i>Prefrontal Cortex</i>
<b>CREB</b>	Proteínas Ligantes Ao Elemento Camp	<i>Camp-Response Binding Protein</i>
<b>CRH</b>	Hormônio Liberador De Corticotropina	<i>Corticotropin-Releasing Hormone</i>
<b>DPN</b>	Dias Pós-Natal	<i>Postnatal Day</i>
<b>eCB</b>	Endocanabinoides	Endocannabinoid
<b>ERK</b>	Proteínas Quinases Dependentes De Estímulos Extracelulares	<i>Extracellularly Responsive Kinase</i>
<b>GABA</b>	Ácido Gama-Amino Butírico	Gamma-Amino Butyric Acid
<b>GC</b>	Glicocorticoides	<i>Glucocorticoid</i>
<b>GPCRs</b>	Receptores São Acoplados A Proteína G	G Protein-Coupled Receptors
<b>HP</b>	Hipocampo	<i>Hippocampus</i>
<b>HPA</b>	Eixo Neuroendócrino Hipotálamo-Pituitária-Adrenocortical	<i>Hypothalamo–Pituitary–Adrenocortical Axis</i>
<b>ID</b>	Índice De Discriminação	<i>Discrimination Index</i>
<b>IP3</b>	Trifosfato De Inositol	<i>Inositol Triphosphate</i>
<b>LC</b>	Locus Coeruleus	
<b>LCE</b>	Labirinto Em Cruz Elevado	<i>Elevated Plus Maze</i>
<b>LTP</b>	Potenciação De Longa Duração	Long-Term Potentiation
<b>MAO</b>	Enzima Monoaminaoxidase	Monoamine Oxidase
<b>MC</b>	Mineralocorticoides	<i>Mineralocorticoid</i>
<b>MCD</b>	Memória De Curta Duração	<i>Short-Term Memory</i>
<b>PM</b>	Privação Maternal	<i>Maternal Deprivation</i>
<b>MLD</b>	Memória De Longa Duração	<i>Long-Term Memory</i>

<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucleico Mensageiro	Messenger Ribonucleic Acid
<b>MT</b>	Memória De Trabalho	<i>Working Memory</i>
<b>MWM</b>	Labirinto Aquático Morris	<i>Morris Water Maze</i>
<b>NAPE</b>	N-Araquidonoil Fosfatidiletanolamina	<i>N-Arachidonoyl Phosphatidyl Ethanolamine</i>
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartato	<i>N-Methyl-D-Aspartate</i>
<b>NTS</b>	Núcleo De Trato Solitário	Nucleus Of The Solitary Tract
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol Bifosfato	Phosphatidylinositol Bisphosphate
<b>PKA</b>	Proteína Quinase Dependente De Adenosina 1',5'- Monofosfato Cíclico	<i>Protein Kinase cAMP</i>
<b>PKC</b>	Proteína Quinase Dependente De Ca <sup>2+</sup>	<i>Protein Kinase Ca<sup>2+</sup> -Dependent</i>
<b>POMC</b>	Pró-Opiomelancortina	<i>Pro-Opiomelanocortin</i>
<b>PVN</b>	Núcleo Paraventricular	<i>Paraventricular Nucleus</i>
<b>RO</b>	Reconhecimento De Objetos	<i>Object Recognition</i>
<b>SAM</b>	Eixo Simpático-Adrenomedular	Sympatho-Adrenomedullary Axis
<b>SEC</b>	Sistema Endocanabinóide	Endocannabinoid System
<b>SHRP</b>	Período Hiporreponsivo Ao Estresse	<i>Stress Hyporesponsive Period</i>
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central	<i>Central Nervous System</i>
<b>THC</b>	Δ <sup>9</sup> -Tetraidrocanabidiol	Δ <sup>9</sup> -Tetrahydrocannabinol
<b>VMAT</b>	Transportador Vesicular De Monoaminas	<i>Vesicular Monoamine Transporter</i>

---

## SUMÁRIO

### PARTE I

<b>1. APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
2.1. Mecanismos envolvidos no estresse fisiológico .....	2
2.2. Diferenças sexuais na resposta ao estresse.....	6
2.3. Processo de consolidação e persistência das memórias.....	7
2.4. Sistema dopaminérgico .....	11
2.5. Sistema endocanabinoide .....	15
2.6. O estresse afeta o sistema dopaminérgico e o sistema endocanabinóide.....	18
2.7. Período hiporreponsivo ao estresse.(SHRP).....	20
2.8. O estresse no início da vida .....	23
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
3.1. Justificativa .....	27
3.2. Objetivos.....	30
3.2.1. Objetivo geral.....	30
3.2.2. Objetivos específicos.....	30
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1. Animais.....	32
4.2. Delineamento experimental .....	32
4.2.1. Estudo 1 - Investigação do efeito da estimulação farmacológica da área tegmental ventral nos déficits de memória induzido pela PM.....	32
4.2.2 Estudo 2 - Investigação do efeito da estimulação farmacológica do sistema dopaminérgico da LC-HP nos déficits de memória induzido pela PM.....	34
4.2.3 Estudo 3 – Investigação dos efeitos da manipulação dos sistema endocanabinóide nos déficits de memória induzido pela PM.....	36
4.3. Protocolos experimentais e procedimentos.....	38
4.3.1. Modelo de privação maternal (PM).....	38
4.3.2. Cirurgia estereotáxica.....	38
4.3.3. Infusão das drogas .....	39
4.3.4. Testes de avaliação da memória.....	40
4.3.4.1 Tarefa de reconhecimento de objetos (RO) .....	40
4.3.4.2 Labirinto aquático de Morris (LAM).....	42

4.3.5. Testes de controle comportamental .....	43
4.4. Análise estatística.....	44
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
5.1. Estudo 1.....	47
5.1.1. PM promove déficits de memória reconhecimento de objetos em ratos machos; a infusão de NPMA na área tegmental ventral reverte o déficit de memória relacionado a PM e promove a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratos machos. ....	46
5.1.2. PM não promove déficits de memória de reconhecimento de objetos em ratas; infusão de NMDA na área tegmental ventral promove a persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratas controle e PM .....	49
5.1.3. A PM reduz o ID em ratos machos, e a infusão de NMDA na área tegmental ventral reverte o déficit de memória relacionado a PM; as ratas fêmeas são resilientes ao impacto da PM.....	51
5.1.4. Nem a PM nem a infusão de drogas na área tegmental ventral induz comportamento do tipo ansioso ou altera a atividade locomotora e exploratória.....	59
5.2. Estudo 2.....	64
5.2.1. A PM promove déficits de memória de reconhecimento de objetos em machos; os quais são revertidos pela estimulação da via dopaminérgica LC-HD, além de promover a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratos machos PM e não PM. ....	64
5.2.2. A PM não promove déficits de memória reconhecimento de objetos em ratas fêmeas; a estimulação da via dopaminérgica LC-HD promove a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratas fêmeas submetidas ou não à PM....	67
5.2.3. A PM reduz o ID em ratos machos, e a estimulação da via dopaminérgica LC-HD reverte o déficit de memória relacionado a PM e promove a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratos machos submetidos ou não à DM..	70
5.2.4. Ratas fêmeas são resilientes aos efeitos da PM na memória de reconhecimento de objetos; a estimulação da via dopaminérgica LC-HD promove a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratas submetidas ou não à PM.....	72
5.2.5. A PM não promove alterações no comportamento locomotor e/ou exploratório; a infusão de drogas não induz ansiedade.....	73
5.3. Estudo 3.....	78

5.3.1. A PM não influencia aprendizagem espacial, mas prejudica e memória espacial de camundongos; a infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores endocanabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2) prejudica a aprendizagem espacial de camundongos machos, mas não de fêmeas.....	78
5.3.2. A PM e a manipulação do sistema endocanabinóide não afeta a atividade locomotora e exploratória, e nem induz o comportamento do tipo ansioso em camundongos machos e fêmeas.....	83
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>96</b>
<b>9. CÓPIA DO CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS .....</b>	<b>117</b>
9.1 Anexo 1.....	117
9.2 Anexo 2.....	118

## 1. APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado se dedica a estudar o papel do sistema dopaminérgico e do sistema endocanabinóide nos déficits de memória induzidos pela privação maternal. Para tal, é composta por três estudos principais.

No estudo 1, avaliamos os efeitos da estimulação da área tegmental, um núcleo majoritariamente dopaminérgico, no déficit da consolidação e persistência da memória de reconhecimento induzidos pela privação de cuidados no início da vida em ratos.

No estudo 2, nós avaliamos os efeitos da estimulação de aferências hipocampais dopaminérgicas do *locus coeruleus* no déficit da consolidação e persistência da memória de reconhecimento induzidos pela privação de cuidados no início da vida em ratos.

Já no estudo 3, investigamos o efeito da infusão intraperitoneal de um agonista dos receptores endocanabinóide do tipo 1 e do tipo 2 nos déficits de memória espacial em camundongos submetidos a privação de cuidados no início da vida.

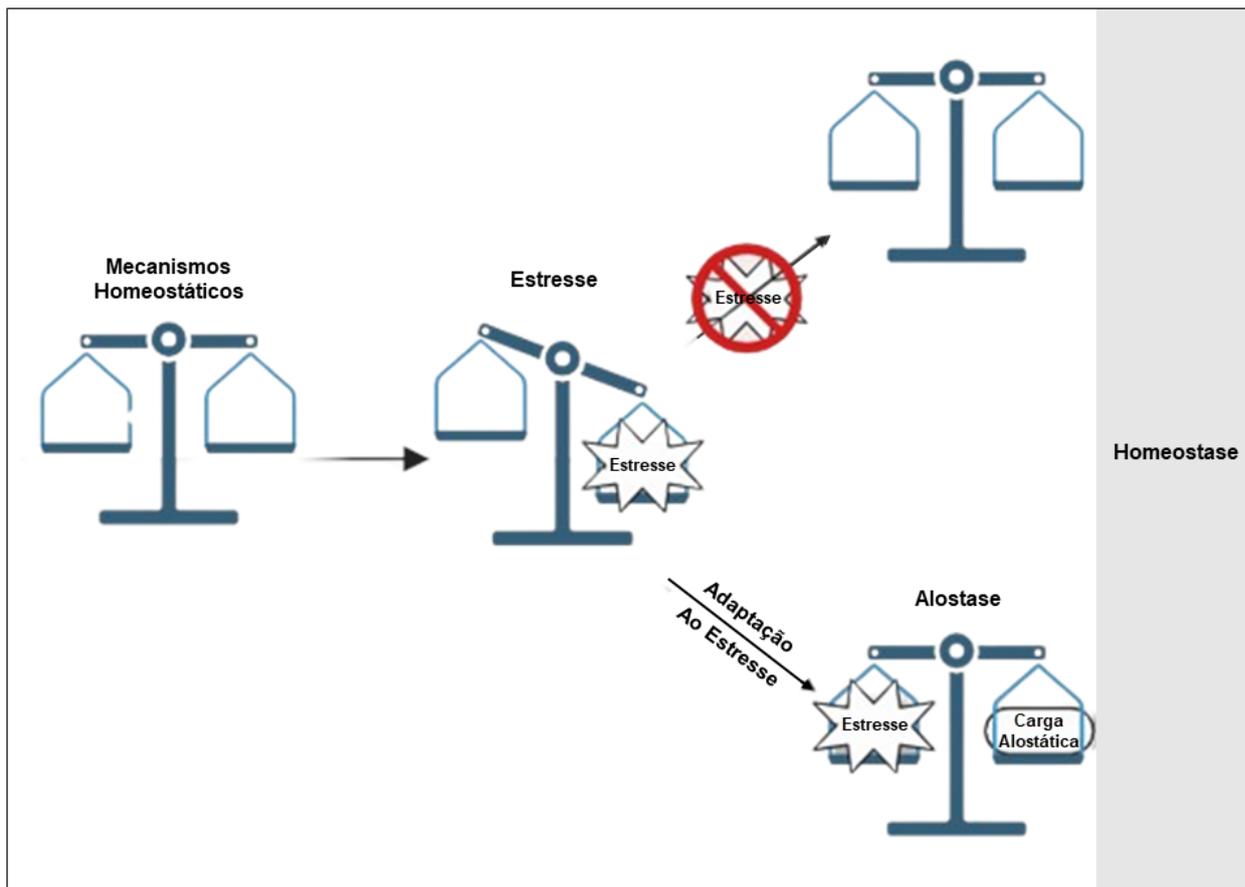
Neste documento apresentamos inicialmente uma Revisão de Literatura, contextualizando o tema do trabalho e os principais achados na área. Na sequência, apresentamos a justificativa e os objetivos dos estudos, seguidos pelos materiais e métodos utilizados. A seguir, a sessão de resultados é apresentada subdividida por estudos, para facilitar o entendimento. Por fim, uma discussão geral sobre os achados fecha o trabalho, juntamente com a conclusão.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Mecanismos envolvidos no estresse fisiológico**

Eventos estressores são experiências, reais ou percebidas, fisiológica e/ou emocionalmente desafiantes para a manutenção de um equilíbrio dinâmico do meio interno (Mcewen; Mirsky; Hatch, 2007). Esses estímulos estressores podem ser de origem físico-químicos, como calor/frio, hipoglicemia e substâncias tóxicas; e/ou origem emocional, como estresse social e exposição a ambiente hostis (Russell; Lightman, 2019; Yaribeygi *et al.*, 2017). A resposta de um organismo a um evento estressor é fundamental para a manutenção da homeostase e para a sua sobrevivência. Os principais mecanismos envolvidos na regulação da homeostase frente a uma situação estressora envolvem respostas de regulação endócrina e autonômica (Ulrich-Lai; Herman, 2009).

As respostas fisiológicas desencadeadas por fatores estressores resultam em ajustes do controle de diversas funções (Mcewen; Mirsky; Hatch, 2007). A manutenção da homeostase pode ocorrer pela eliminação do evento estressor. Por exemplo, uma redução do consumo de sódio em uma dieta pode reduzir os mecanismos fisiológicos desencadeados pelo excesso de sódio no organismo (Mcewen; Mirsky; Hatch, 2007; Yaribeygi *et al.*, 2017). Contudo, a homeostase pode ser mantida mesmo em situações de permanência do evento estressor, um conceito conhecido como alostase (Mcewen; Mirsky; Hatch, 2007; Wen, 1998). Essas situações representam uma sobrecarga para o organismo, redistribuindo e aumentando o gasto energético (McEwen *et al.*, 2006; Wen, 1998). Assim, a depender do evento estressor e da carga alostática mobilizada, o organismo permanece em homeostase (Wen, 1998) (Figura 1).



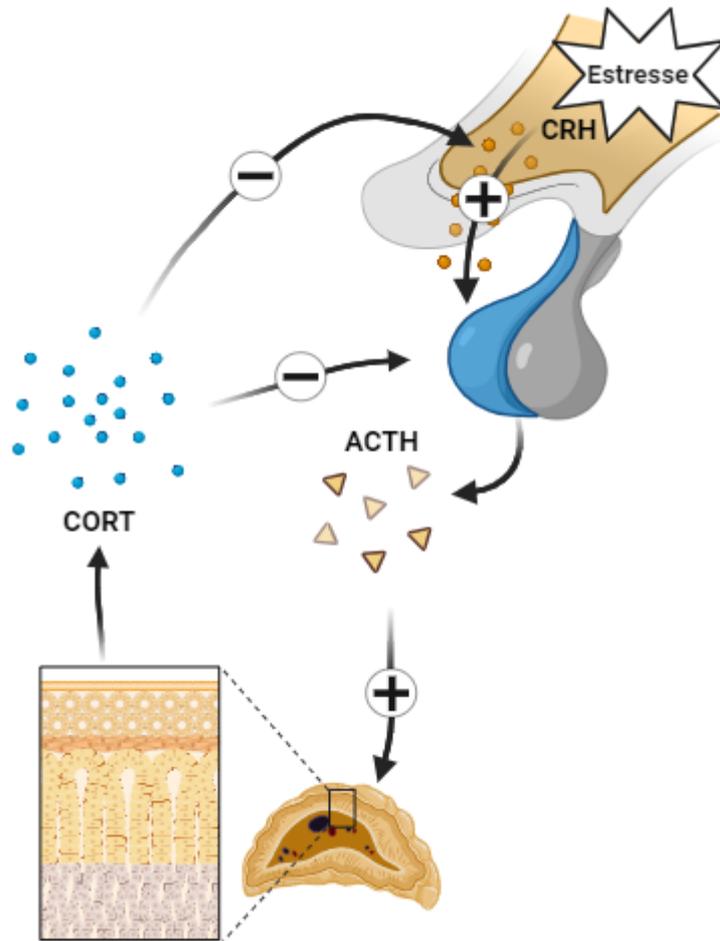
**Figura 1. Homeostase e alostase.** A manutenção da homeostase pode ocorrer pela eliminação do evento estressor ou por mecanismos de resposta em situações de permanência do evento estressor (alostase). Fonte: Adaptada de Antunes-Rodrigues et al. (2005) .

Uma característica importante dos mecanismos alostáticos é que eles não dependem de parâmetros de ajustes, chamados de *set points* (McEwen, 2000; McEwen *et al.*, 2006; Wen, 1998). Tão importante quanto a mobilização dos mecanismos alostáticos na presença de um estímulo estressor, é a desmobilização desses mecanismos quando o estímulo é cessado (McEwen, 2000; McEwen *et al.*, 2006; Wen, 1998). Assim, a mobilização ou a desmobilização inadequada dos mecanismos alostáticos podem levar a uma condição patológica e/ou ameaça a vida.

As informações estressoras (interoceptivas e exteroceptivas) são convertidas em sinais elétricos e chegam a diferentes partes do encéfalo (Ulrich-Lai; Herman, 2009). Estruturas do tronco encefálico, como o núcleo do trato solitário (NTS) recebem aferências que sinalizam alterações homeostáticas (Herman *et al.*, 2003a). O processamento da informação recruta efetores dos sistemas sistema nervoso autonômico (SNA) para manter a integridade fisiológica (Ulrich-Lai; Herman, 2009).

O sistema nervoso autônomo fornece uma resposta imediata à exposição de um evento estressor (Ulrich-Lai; Herman, 2009; Yaribeygi *et al.*, 2017). Por meio do aumento ou redução do tônus simpático/parassimpático, o sistema nervoso autônomo é capaz de, em segundos, provocar alterações no estado fisiológico por meio da inervação direta dos órgãos alvos (McEwen, 2017; Ulrich-Lai; Herman, 2009). Uma questão importante é que o sistema nervoso autônomo tem relação direta com o sistema endócrino, uma vez que o aumento da atividade de neurônios que inervam a células cromafins na medula da glândula suprarrenal, levam a um aumento da produção e liberação de epinefrina na corrente sanguínea (Ulrich-Lai; Herman, 2009; Yaribeygi *et al.*, 2017). Esse mecanismo é chamado de eixo simpático-adrenomedular (SAM).

Situações de desequilíbrio da homeostase detectadas pelo tronco encefálico também ativam o eixo neuroendócrino hipotálamo-pituitária-adrenocortical (HPA) (Herman *et al.*, 2003b; Ulrich-Lai; Herman, 2009). As projeções noradrenérgicas oriundas do núcleo do trato solitário inervam o núcleo paraventricular (PVN, do inglês *paraventricular nucleus*) do hipotálamo, estimulando neurônios parvocelulares a secretarem o hormônio liberador de corticotropina (CRH, do inglês *corticotropin-releasing hormone*) (Charmandari; Tsigos; Chrousos, 2005; Herman *et al.*, 2003a). O hormônio liberador de corticotropina é liberado no sistema porta-hipofisário da eminência mediana do hipotálamo e, ao se ligar a receptores nas células produtoras de pró-opiomelancortina (POMC, do inglês *pro-opiomelanocortin*) na adeno-hipófise, estimula principalmente a produção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH, do inglês *adrenocorticotropin hormone*) (Charmandari; Tsigos; Chrousos, 2005; Herman *et al.*, 2003a). Quando atinge o córtex da glândula suprarrenal, o hormônio adrenocorticotrópico age na zona glomerulosa produtora de mineralocorticoides (MC), na zona fasciculada produtora de glicocorticoides (GC) e na zona reticular produtora de andrógenos (Figura 2).



**Figura 2. Um dos mecanismos fisiológicos desencadeados em eventos estressores.** Eventos estressores desencadeiam respostas fisiológicas ao estresse. Entre elas, a estimulação de neurônios parvocelulares leva a liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH, do inglês *corticotropin-releasing hormone*) no sistema porta-hipofisário da eminência mediana do hipotálamo. O HORMÔNIO LIBERADOR DE CORTICOTROPINA estimula a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *adrenocorticotropin hormone*) na adeno-hipófise. A estimulação da glândula suprarrenal pelo HORMÔNIO ADRENOCORTICOTRÓFICO culmina na liberação de corticosterona/cortisol (CORT) na corrente sanguínea. Fonte: Elaborada próprio autor (2024).

A estimulação de receptores do hormônio adrenocorticotrófico, também denominados de receptores de melanocortina 2 (MC2R, do inglês *melanocortin receptor*), regula a captação de lipoproteínas do plasma e estimula o transporte de colesterol para a mitocôndria (Charmandari; Tsigos; Chrousos, 2005; Joëls; Karst; Sarabdjitsingh, 2018). O resultado desse sistema é a formação e liberação de corticosterona (em animais) ou cortisol (em humanos) - coletivamente chamados de CORT – na corrente sanguínea (Joëls; Karst; Sarabdjitsingh, 2018; Mcewen; Mirsky; Hatch, 2007; Russell; Lightman, 2019). Fisiologicamente, a elevação dos níveis

plasmáticos de glicocorticóides leva a inibição da liberação de hormônio liberador de corticotropina no hipotálamo e hormônio adrenocorticotrópico na adeno-hipófise, caracterizando uma alça de *feedback* negativo (Mcewen; Mirsky; Hatch, 2007; Ulrich-Lai; Herman, 2009).

## **2.2. Diferenças sexuais na resposta ao estresse**

Diferenças entre machos e fêmeas na resposta ao estresse existem em todos os níveis (Bale; Epperson, 2015; Heck; Handa, 2019). Por exemplo, fêmeas não mostram o mesmo padrão de machos no remodelamento neural após a exposição a estresse crônico (Galea *et al.*, 1997). Um interessante estudo mostrou que, após a exposição ao estresse crônico, o remodelamento dendrítico de neurônios da região CA3 do hipocampo (HP) não ocorre em fêmeas, ainda que todas as mensurações hormonais indicassem que as fêmeas estavam experienciando os aspectos hormonais do estresse tanto quanto machos (Galea *et al.*, 1997). Machos e fêmeas também mostram diferenças cognitivas induzidas pelo estresse crônico, uma vez que machos apresentam prejuízo em memórias dependentes do hipocampo, os quais não são observados em fêmeas (Bowman; Zrull; Luine, 2001; Communication *et al.*, 1994). Esses achados sugerem que as diferenças sexuais envolvem sistemas cerebrais que medeiam a forma como machos e fêmeas interpretam estímulos estressores.

Diferenças sexuais importantes são observadas nas projeções de diferentes áreas encefálicas para o núcleo paraventricular, na regulação neuromodulatória de neurônios produtores do hormônio liberador de corticotropina e na diferença da produção de glicocorticóides na glândula suprarrenal (Goel; Bale, 2008; Heck; Handa, 2019). As diferenças que contribuem para a resposta dependente do sexo e para a vulnerabilidade ao estresse ao longo da vida aparecem durante o processo de desenvolvimento e maturação do sistema nervoso central (SNC) e parecem ser guiadas por mudanças em hormônios gonadais (Handa *et al.*, 1994; Walkerf *et al.*, 1986).

Em roedores, tem sido demonstrado que fêmeas submetidas a situações estressoras têm uma resposta neuroendócrina mais intensa, caracterizada por maior liberação de hormônio adrenocorticotrópico e corticosterona quando comparadas com machos (Handa; Weiser, 2014; Iwasaki-Sekino *et al.*, 2009). Após um estresse agudo,

níveis basais de hormônio adrenocorticotrópico e cortisol circulantes demoram mais tempo para serem atingidos em fêmeas, sugerindo uma diferença sexual na regulação do *feedback* negativo do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical (Handa; Weiser, 2014; Viau *et al.*, 2005). Fêmeas também apresentam maior expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA, do inglês *messenger ribonucleic acid*) para a codificação de hormônio liberador de corticotropina no núcleo paraventricular e maior expressão de mRNA para células produtoras de pró-opiomelanocortina na hipófise anterior do que machos após um estresse agudo (Iwasaki-Sekino *et al.*, 2009; Viau *et al.*, 2005).

Alguns mecanismos neurais podem contribuir para explicar a diferença sexual da inibição do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical. Em fêmeas, estruturas límbicas conhecidas por ter atividade inibitória sobre o eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical, como córtex frontal, hipocampo e córtex cingulado, tem uma menor atividade neuronal após um estresse agudo (Figueiredo; Dolgas; Herman, 2002; Karandrea; Kittas; Kittraki, 2000, 2002). Ainda, a expressão de receptores de glicocorticoides e mineralocorticóides na glândula pituitária é menor em fêmeas do que em machos (Turner, 1990). Por outro lado, um evento estressor agudo leva a um aumento de mRNA de receptores de glicocorticoides e mineralocorticoides no hipotálamo de machos, mas não em fêmeas (Karandrea; Kittas; Kittraki, 2002). Interessantemente, a deleção de receptores de glicocorticoides em regiões límbicas que incluem o hipocampo, o córtex pré-frontal (CPF) e amígdala basolateral (ABL) resulta, após um estresse agudo, em desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical em machos, mas não em fêmeas (Solomon *et al.*, 2012).

Essas diferenças nos mecanismos celulares, moleculares e no envolvimento dos circuitos neuroendócrinos relacionados ao estresse podem ajudar a explicar as diferenças sexuais observadas em respostas comportamentais, alterações cognitivas e desenvolvimento de doenças psiquiátricas.

### **2.3. Processo de consolidação e persistência das memórias**

A memória corresponde ao processo de aquisição, retenção e evocação de diferentes tipos de informações (Izquierdo, 2018; Izquierdo *et al.*, 1998). Após a aquisição de uma informação, ocorre o processo de retenção da memória (Izquierdo,

2018; Izquierdo *et al.*, 1998; Klinzing; Niethard; Born, 2019). O tempo de armazenamento de uma informação pelas redes neurais relacionadas a memória pode ser de segundos ou até anos após o processo de aquisição (Izquierdo *et al.*, 1998; Johansen *et al.*, 2011; Klinzing; Niethard; Born, 2019; Tyng *et al.*, 2017). Assim, diferentes regiões do cérebro, em variados graus de complexidade, estão envolvidas nos processos de aquisição, retenção e evocação de diferentes tipos de memórias (Izquierdo *et al.*, 1998; Johansen *et al.*, 2011; Klinzing; Niethard; Born, 2019; Tyng *et al.*, 2017). Essas memórias são armazenadas por meio de modificações da forma ou função das sinapses (Izquierdo *et al.*, 1998; Johansen *et al.*, 2011; Klinzing; Niethard; Born, 2019). Dessa forma, a evocação resulta da reativação das redes sinápticas onde ocorreram essas modificações (Izquierdo *et al.*, 1998; Klinzing; Niethard; Born, 2019)

Em relação ao conteúdo, as memórias podem ser classificadas como procedurais ou como declarativas (Izquierdo, 2018; Izquierdo *et al.*, 1998). As memórias procedurais se referem a habilidades motoras adquiridas, como caminhar, andar de bicicleta ou nadar (Izquierdo, 2018; Izquierdo *et al.*, 1998). Por sua vez, as memórias declarativas podem ser subdivididas em memórias episódicas ou memórias semânticas. As memórias declarativas episódicas se referem as informações sobre eventos pontuais, como dia do aniversário ou qual a refeição do dia anterior (Izquierdo, 2018; Izquierdo *et al.*, 1998). Já as memórias declarativas semânticas se referem a conhecimentos gerais, como conhecimento sobre matemática, física ou história (Izquierdo, 2018; Izquierdo *et al.*, 1998).

Quanto ao tempo, as memórias podem ser classificadas como memória de trabalho (MT), memória de curta duração (MCD) e memória de longa duração (MLD) (Izquierdo *et al.*, 1998; Johansen *et al.*, 2011). A memória de trabalho depende basicamente da atividade elétrica do córtex pré-frontal e é mantida por alguns segundos (Izquierdo *et al.*, 1998; Johansen *et al.*, 2011). A memória de curta duração depende da atividade enzimática no hipocampo, córtex entorrinal e perirrinal, e dura de 1 a 6 horas após o processo de aquisição (Izquierdo *et al.*, 1998). A memória de longa duração é armazenada em diferentes áreas do cérebro, que incluem o hipocampo, amígdala basolateral, estriado e diversas regiões do córtex (Izquierdo *et al.*, 1998; Johansen *et al.*, 2011). A memória de longa duração consolidada pode durar de 6 horas até anos (Izquierdo *et al.*, 1998; Johansen *et al.*, 2011).

Embora haja uma classificação das memórias, tanto em humanos quanto em animais, há uma sobreposição entre os diferentes tipos e subtipos. Assim, uma memória declarativa pode ser de curta ou longa duração; um aprendizado episódico pode fazer parte de uma memória semântica, etc. Em animais, a memória explícita, por exemplo, pode ser classificada em dois subtipos: memórias não associativas; e memórias associativas. Assim, enquanto as tarefas de reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris avaliam o aprendizado associativo, a habituação ao campo aberto avalia a memória não associativa, por exemplo (Quillfeldt, 2015) (Figura 3).



**Figura 3. Principais tarefas de avaliação do aprendizado e memória em roedores.** De forma didática, a memória em animais pode ser dividida em memória explícita e implícita e ambas podem ocorrer por associação ou não. Fonte: Adaptada de Quillfeldt, 2015.

O processo celular de consolidação da memória de longa duração envolve a estimulação de neurônios glutamatérgicos no hipocampo (Izquierdo *et al.*, 1998; Riedel; Platt; Micheau, 2003). Esse processo envolve a estimulação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA, do inglês *N-methyl-D-aspartate*). A entrada de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  é somada liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pelo retículo endoplasmático e ativa a proteína quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina II (CaMKII, do inglês *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*) (Izquierdo *et al.*, 1998; Riedel; Platt; Micheau, 2003). O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  após a ativação dos receptores NMDA também é substrato para a proteína quinase dependente de adenosina 1',5'- monofosfato cíclico (PKA, do do inglês *protein kinase cAMP*)

(Izquierdo *et al.*, 1998; Riedel; Platt; Micheau, 2003), proteína quinase dependente de  $Ca^{2+}$  (PKC, do inglês *protein kinase Ca<sup>2+</sup>-dependent*), e para as proteínas quinases dependentes de estímulos extracelulares (ERK, do inglês *extracellularly responsive kinase*) (Izquierdo *et al.*, 1998; Riedel; Platt; Micheau, 2003). Essas diferentes proteínas migram até o núcleo neuronal para ativar fatores de transcrição, como as proteínas ligantes ao elemento cAMP (CREB, do inglês *cAMP-response binding protein*), cruciais para indução de neuroplasticidade e manutenção da memória de longa duração (Frey; Schroeder; Matthies, 1990; Izquierdo *et al.*, 1998; Riedel; Platt; Micheau, 2003).

A consolidação e persistência de diferentes tipos de memórias também podem ser moduladas por sistemas de neurotransmissores agindo no hipocampo, tais como o sistema dopaminérgico e o sistema endocanabinóide (Akirav, 2011; Rossato *et al.*, 2009).

No hipocampo, o mecanismo de persistência da memória de longa duração envolve, entre outras coisas, a ativação dopaminérgica 12h após a aquisição de uma informação (Izquierdo, 2018; Rossato *et al.*, 2009). A liberação de dopamina na região CA1 do hipocampo a partir de projeções dopaminérgicas de diferentes áreas, tais como a área tegmental ventral (ATV) e o *locus coeruleus* (LC), tem papel fundamental na persistência da memória de longa duração (Kempadoo *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2023; Rossato *et al.*, 2009; Yamasaki; Takeuchi, 2017). No hipocampo, a dopamina age em ativando receptores dopaminérgicos do tipo 1 (D1) e tipo 5 (D5) (Izquierdo *et al.*, 1998; Rossato *et al.*, 2009). Quando esses receptores são estimulados, levam à ativação de PKA e PKC (Neves *et al.*, 2020; Rossato *et al.*, 2009). Há também uma atividade cíclica que envolve o aumento da atividade de conjuntos de proteínas quinases como a ERK e CaMKII no hipocampo (Eckel-Mahan *et al.*, 2008). Esses mecanismos moleculares e celulares levam a síntese e liberação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*) no hipocampo, resultando em um fortalecimento das sinapses hipocâmpais que participam da recente consolidação dessa memória de longa duração e sua persistência (Izquierdo *et al.*, 1998; Riedel; Platt; Micheau, 2003; Rossato *et al.*, 2009). Esse processo parece ser modulado pelo aumento do tônus de vias dopaminérgicas no hipocampo (McNamara *et al.*, 2014; Takeuchi *et al.*, 2016; Yamasaki; Takeuchi, 2017).

## 2.4. O sistema dopaminérgico

O sistema dopaminérgico responde a estímulos ambientais e está envolvido em comportamentos de recompensada ou punição (Bissonette; Roesch, 2016). Além disso, atua na manutenção da memória de trabalho e na regulação de emoções (McNamara *et al.*, 2014). Disfunções de vias dopaminérgicas estão relacionadas a mudanças em comportamentos e o desenvolvimento de doenças neurológicas e psiquiátricas, como a doença de Parkinson, a esquizofrenia e a depressão (Cabana-Domínguez *et al.*, 2022).

Os estímulos para a formação, diferenciação, especialização e estabelecimento de conexões das novas células neurais são reguladas por processos neuroquímicos ao longo do espaço e do tempo (Bissonette; Roesch, 2016; Götz; Huttner, 2005). A neurogênese de células dopaminérgicas durante o desenvolvimento inicia em células progenitoras imaturas, não especializadas, na linha média da placa do tubo neural (Brodski *et al.*, 2003; Ono *et al.*, 2007). Embora a migração e a diferenciação celular sejam críticas, as conexões que o sistema dopaminérgico estabelece determinam quais aspectos funcionais a dopamina é capaz de influenciar (Han *et al.*, 2020). Neurônios dopaminérgicos que se desenvolvem na área tegmental ventral e no *locus coeruleus* têm conexões diretas com o hipocampo e o córtex pré-frontal (Castillo Díaz *et al.*, 2022; Díaz *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2020; Kempadoo *et al.*, 2016).

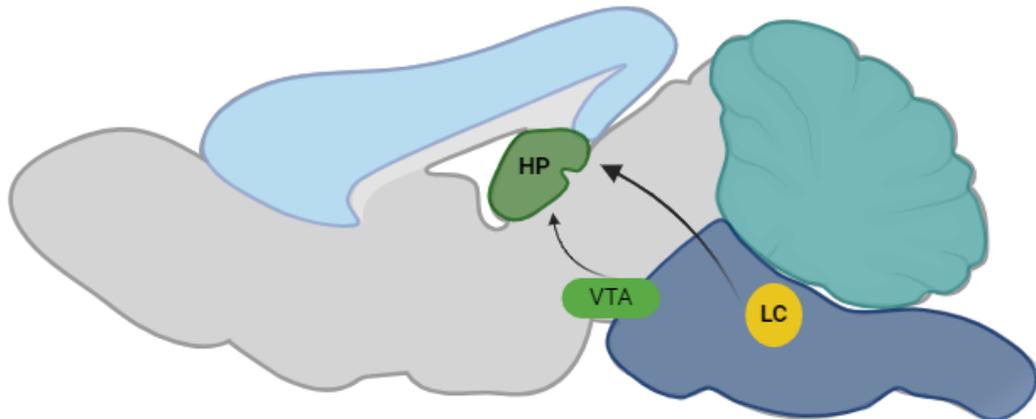
A visão clássica sobre a rede dopaminérgica encefálica compreende 3 vias dopaminérgicas que exercem diferentes funções. A via mesolímbica conecta neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral ao núcleo accumbens e está relacionada aos comportamentos de recompensa e motivação (Jahng *et al.*, 2010; Ledonne; Mercuri, 2017). A via mesolímbica disfuncional está associada a comportamentos do tipo psicose, delírios e alucinações (Jahng *et al.*, 2010). Estudos recentes vêm demonstrando o papel das projeções dopaminérgicas da área tegmental ventral para o hipocampo (Beier *et al.*, 2015; Castillo Díaz *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2020; Lisman; Grace, 2005), assim, a via mesolímbica também tem participação importante na consolidação e persistência da memória de longa duração em diferentes tipos de

memórias (Beier *et al.*, 2015; Castillo Díaz *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2020; Lisman; Grace, 2005).

A via nigroestriatal é composta por neurônios dopaminérgicos oriundos da substância nigra que se projetam para o corpo estriado (Klein *et al.*, 2019; Ledonne; Mercuri, 2017). A via dopaminérgica nigroestriatal está relacionada à aprendizagem e ao controle de movimentos voluntários (Klein *et al.*, 2019; Ledonne; Mercuri, 2017). Os sintomas característicos da doença de Parkinson, como rigidez, bradicinesia e tremores, são devidos, pelo menos em parte, à deficiência de dopamina na via nigroestriatal (Jung, 1996) .

Por fim, a via dopaminérgica mesocortical inclui neurônios situados na área tegmental ventral com projeções para o córtex pré-frontal (Klein *et al.*, 2019; Ledonne; Mercuri, 2017). A conexão ATV-CPF tem papel importante na cognição, tomada de decisão, emoções e no afeto (Klein *et al.*, 2019; Lapish *et al.*, 2007). A disfuncionalidade da via dopaminérgica mesocortical está relacionada a esquizofrenia, depressão, déficit de atenção, problemas de aprendizagem e prejuízo na tomada de decisão (Engert; Pruessner, 2009; Lapish *et al.*, 2007; Ledonne; Mercuri, 2017).

Além da via dopaminérgica mesolímbica, o locus coeruleus também emite projeções dopaminérgicas para o hipocampo (Takeuchi *et al.*, 2016; Yamasaki; Takeuchi, 2017). Apesar de ter sido considerado por muitos anos uma estrutura puramente noradrenérgica, recentemente foi demonstrado que projeções que conectam locus coeruleus e hipocampo também são compostas por neurônios dopaminérgicos (Kempadoo *et al.*, 2016). As via dopaminérgica LC-HP participam da aprendizagem, consolidação e persistência da MEMÓRIA DE LONGA DURAÇÃO (Kempadoo *et al.*, 2016; Takeuchi *et al.*, 2016; Yamasaki; Takeuchi, 2017) (Figura 4).

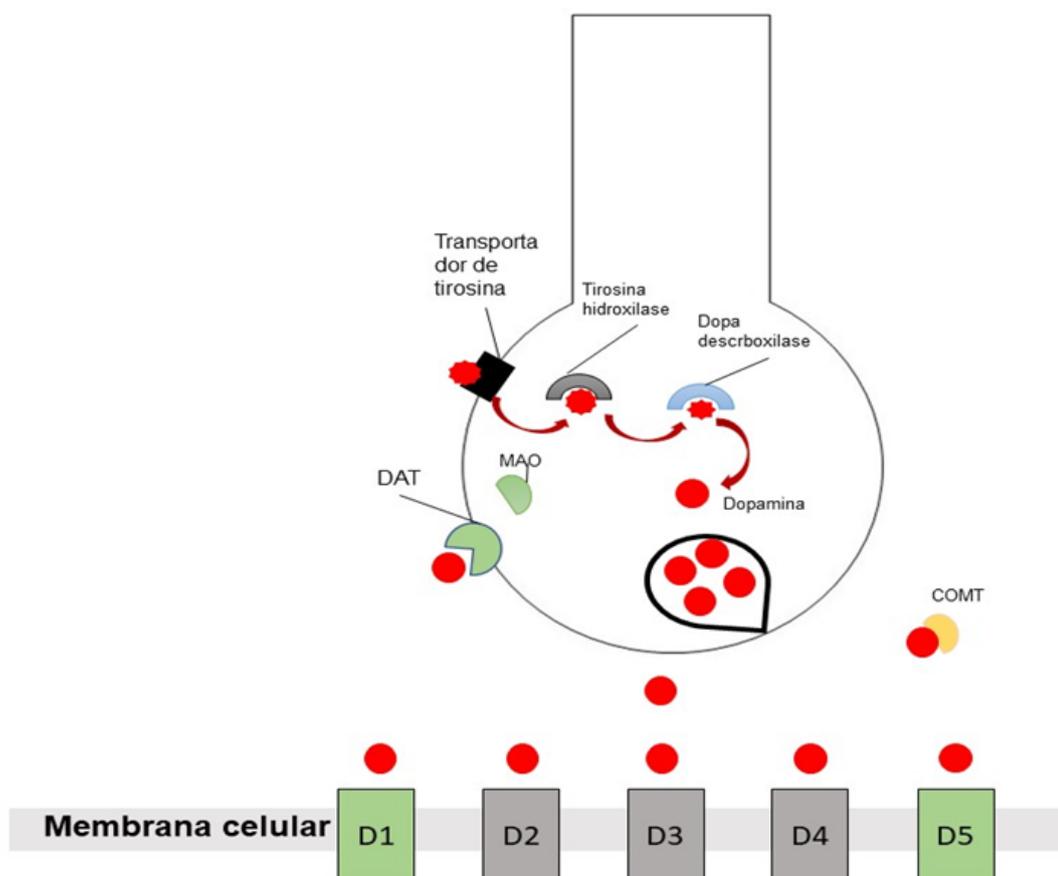


**Figura 4. Projeções dopaminérgicas da área tegmental ventral (ATV) e do locus coeruleus (LC) para o hipocampo (HP) em cérebro de roedor.** Além da vida mesolímbica, que conecta a área tegmental ventral ao o hipocampo (HP), projeções dopaminérgicas oriundas do locus coeruleus (LC) culminam na liberação de dopamina no hipocampo dorsal. Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2024).

A síntese, armazenamento e liberação da dopamina envolve uma maquinaria complexa dentro do terminal pré-sináptico (Meiser; Weindl; Hiller, 2013). Por meio do transportador de tirosina, o aminoácido tirosina do meio extracelular é internalizado (Meiser; Weindl; Hiller, 2013). A enzima tirosina hidroxilase utiliza o aminoácido internalizado como substrato e o converte em L-Dopa (Meiser; Weindl; Hiller, 2013). Esse produto é convertido em dopamina pela dopa descarboxilase (Meiser; Weindl; Hiller, 2013). O empacotamento da dopamina é realizado por um transportador vesicular de monoaminas (VMAT, do inglês *vesicular monoamine transporter*) presente nas vesículas do terminal pré-sináptico (Meiser; Weindl; Hiller, 2013). O influxo de  $Ca^{2+}$  estimula a migração e fusão das vesículas na membrana do terminal pré-sináptico, e libera a dopamina na fenda sináptica (Meiser; Weindl; Hiller, 2013). O terminal pré-sináptico de neurônios dopaminérgicos contém uma bomba de recaptação de dopamina, denominada DAT (Meiser; Weindl; Hiller, 2013), de forma que ela pode ser novamente armazenada em vesículas sinápticas.

A enzima monoaminoxidase (MAO) é responsável pela degradação dopaminérgica no meio intracelular (Meiser; Weindl; Hiller, 2013), enquanto a enzima catecol-O-transferase (COMT) é responsável pela degradação da dopamina no meio extracelular (Meiser; Weindl; Hiller, 2013). Após sua liberação na fenda sináptica, a dopamina fica livre para interagir com seus diferentes tipos de receptores.

Após sua liberação na fenda sináptica, a dopamina fica livre para interagir com seus diferentes tipos de receptores. Atualmente, foram identificados 5 subtipos de receptores dopaminérgicos acoplados a proteína G (Beaulieu; Gainetdinov, 2011; Ledonne; Mercuri, 2017). Os receptores dopaminérgicos podem ser divididos em duas famílias: (a) família D1, na qual fazem parte os receptores dopaminérgicos D1 e D5; (b) família D2, na qual fazem parte os receptores dopaminérgicos D2, D3, D4 (Beaulieu; Gainetdinov, 2011) (Figura 5).



**Figura 5. Processos de síntese, liberação, degradação e interação da dopamina com os diferentes receptores.** A síntese de dopamina requer a captação e transporte de tirosina do meio extracelular para o meio intracelular por uma proteína transmembrana específica (DAT). A tirosina é convertida em dopamina por uma série de reações enzimáticas, envolvendo a ação das enzimas tirosina hidroxilase e dopa descarboxilase. Posteriormente, a dopamina é empacotada em vesículas sinápticas, e, mediante estímulos específicos pode ser liberada na fenda sináptica e interagir com seus diferentes receptores (D1-D5) na membrana pós-sináptica. A dopamina é degradada por duas enzimas, a monoaminoxidase (MAO) no meio intracelular, e a catecol-O-transferase (COMT), no meio extracelular. Fonte: produzida pelo próprio autor (2020).

Essas diferentes proteínas receptoras possuem uma distribuição distinta no cérebro. Por exemplo, receptores D1 e D2 têm altos níveis de expressão no estriado, onde desempenham um papel importante no controle motor (Beaulieu; Gainetdinov, 2011). Já os receptores D3 estão presentes em maiores níveis no núcleo *accumbens* e o tubérculo olfatório (Beaulieu; Gainetdinov, 2011; Sealfon; Olanow, 2000). Maiores densidades dos receptores D4 foram encontradas no córtex frontal e tronco encefálico (Beaulieu; Gainetdinov, 2011; Sealfon; Olanow, 2000). Além disso, receptores D1 e D5 são amplamente distribuídos em estruturas encefálicas relacionadas a processos cognitivos, como o hipocampo, e desempenham papel fundamental dos processos de consolidação e persistência da memória (Furini *et al.*, 2014; Rossato *et al.*, 2009). Embora esses dois tipos de receptores metabotrópicos sejam ativados pela interação com a dopamina, ativam diferentes segundos mensageiros: enquanto os receptores D1 usam a adenilato ciclase como o segundo mensageiro, modulando a PKA, os receptores D5 podem ativar o sistema fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e modulam a atividade da PKC (Felder; Jose; Axelrod, 1989; Furini *et al.*, 2014). Tanto PKA quanto PKC estão envolvidas na consolidação de diferentes tipos de memórias (Izquierdo *et al.*, 2008; Michel; Green; Lyons, 2011).

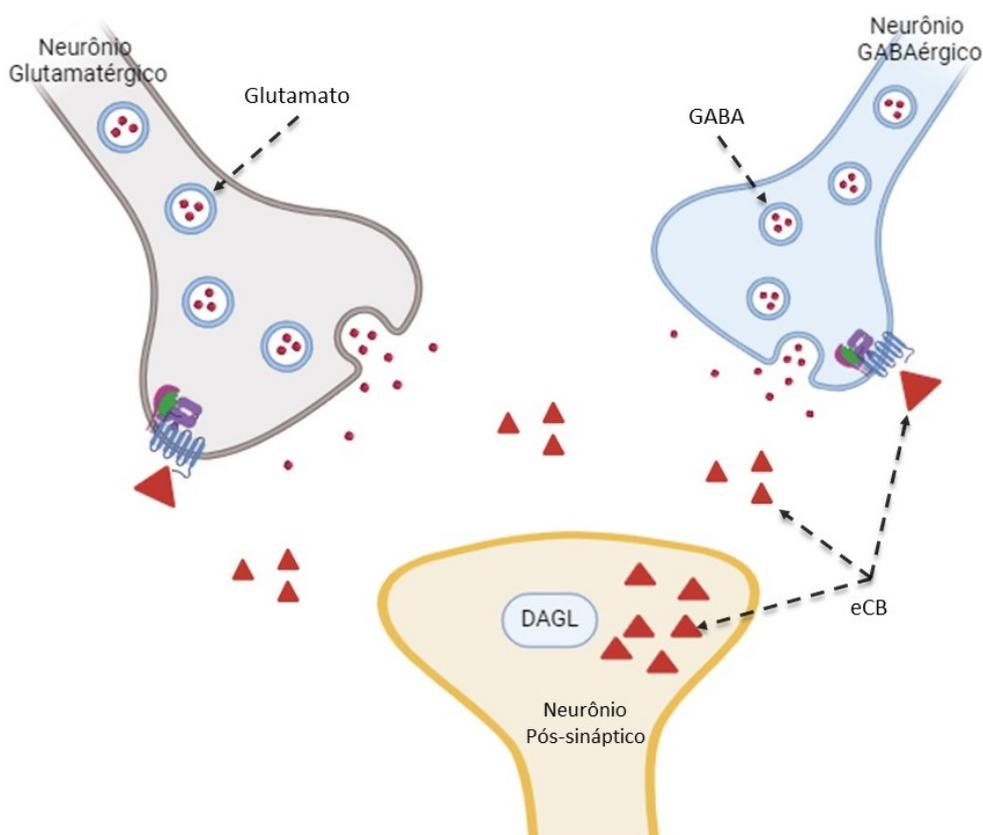
## 2.5. Sistema endocanabinóide

O sistema endocanabinóide (SEC) desempenha um papel importante no desenvolvimento SNC. O sistema endocanabinóide é formado por moléculas endógenas chamadas de endocanabinóides (eCB), pelos seus receptores (CBR) e por proteínas que transportam, sintetizam e degradam os eCB. O  $\Delta^9$ -tetraidrocanabidiol (THC) e o canabidiol (CBD) são duas substâncias exóginas encontradas na cannabis.

Níveis de endocanabinóides são alterados na esquizofrenia e o uso abusivo de cannabis durante a adolescência aumenta o risco de desenvolver esquizofrenia, provavelmente pelos efeitos psicotrópicos do  $\Delta^9$ -tetraidrocanabidiol (Di Forti *et al.*, 2014; D'Souza *et al.*, 2004).

Os receptores canabinóides mais bem caracterizados são do tipo 1 (CB1) e do tipo 2 (CB2). Ambos os receptores são acoplados a proteína G (GPCRs, do inglês *G protein-coupled receptors*) inibitória (Wootten *et al.*, 2018). O sistema nervoso é

particularmente rico em receptores CB1. Em neurônios do sistema nervoso central adulto, os receptores CB1 são mais abundantes em interneurônios que produzem o ácido gama-amino butírico (GABA, do inglês *Gamma-Amino Butyric Acid*) (Kano *et al.*, 2009; Lu; Mackie, 2021). Contudo, os receptores CB1 também podem ser encontrados em neurônios glutamatérgicos, colinérgicos, serotoninérgico e dopaminérgico no cérebro (Shu-Jung Hu; Mackie, 2015). Os receptores CB1 estão presentes em terminais pré-sinápticos (Nyíri *et al.*, 2005), modulando a transmissão sináptica. Quando estimulados, os receptores CB1 inibem o influxo de  $Ca^{2+}$  pelos canais voltagem dependentes de  $Ca^{2+}$  e ativam canais de  $K^+$  pré-sinápticos resultando em depressão da transmissão sináptica (Kano *et al.*, 2009). Assim, a modulação desses canais iônicos regula a força sináptica de neurônios excitatórios e inibitórios para regular processos cognitivos como emoções, memória e recompensa (Meyer; Lee; Gee, 2018) (Figura 4). Por outro lado, os receptores CB2 são expressos em células imunes (Munro; Thomas; Abu-Shaar, 1993), incluindo a micróglia (Cabral; Ferreira; Jamerson, 2015) e tem um papel nos processos inflamatórios (Tanaka; Sackett; Zhang, 2020) (Figura 6).



**Figura 6. Neurotransmissão do sistema endocanabinóide (ECS).** Os receptores do SEC, especialmente o CB1, encontram-se em terminais pré-sinápticos de neurônios GABAérgicos e

glutamatérgicos. Quando endocanabinóides (eCB) são liberados de neurônios pós-sinápticos estimulam receptores canabinóides. Esses receptores são acoplados a proteína G inibitória que reduzem a liberação desses neurotransmissores na fenda sináptica. Fonte: adaptada de Bara, A et. al. (2021) (Bara *et al.*, 2021a).

É importante salientar que os receptores CB1 não são expressos somente no sistema nervoso central, mas também no sistema nervoso periférico, na retina, adipócitos, hepatócitos, células pancreáticas e no trato gastrointestinal (Pacher; Bátkai; Kunos, 2006). Entretanto, receptores CB1 é o principal receptor canabinóides envolvido em diferentes funções no cérebro (Bodor *et al.*, 2005; Cota, 2008; Pacher; Bátkai; Kunos, 2006). As primeiras evidências do papel do sistema endocanabinóide nos processos de aprendizagem e memória vieram de estudos que demonstraram que a o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 resultaram em facilitação da memória na tarefa de reconhecimento social e que a administração de um bloqueador dos receptores CB1 reduz os déficits memória observados em ratos e camundongos idosos (Terranova *et al.*, 1996). Além disso, camundongos geneticamente modificados para não expressarem receptores CB1 não apresentam déficit na aprendizagem na memória espacial (Varvel; Lichtman, 2002) Por outro lado, a administração de um agonista não seletivo dos receptores canabinóides do tipo 1 e tipo 2 (CB1/CB2), denominado WIN-55, no início da idade adulta provoca uma redução no metabolismo em diversas regiões cerebrais, tais como o hipocampo, cerebelo e amígdala. Adicionalmente, a exposição ao WIN-55 durante a idade adulta está correlacionada com déficits na memória espacial e de reconhecimento, sem impactar o comportamento relacionado à ansiedade (Bouter *et al.*, 2023).

Os diferentes receptores canabinóides podem ser ativados por moléculas endógenas, principalmente por sinalizadores lipídicos como o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) e pelo N-araquidonoil etanolamina (AEA) (Devane *et al.*, 1992; Stella; Schweitzer; Plomelli, 1997). A síntese dos endocanabinóides é realizada a partir de ativação de enzimas que quebram lipídios presentes na membrana das células (Di Marzo *et al.*, 1999). Os endocanabinóides são sintetizados a partir de fosfolipídios da camada interna da membrana celular (Adermark; Lovinger, 2007). Uma vez produzidos, os eCB necessitam de um mecanismo para sair das células (Adermark; Lovinger, 2007).

O 2-AG é geralmente produzido pela retirada no trifosfato de Inositol (IP3, do inglês *inositol triphosphate*) do fosfatidilinositol bifosfato (PIP2, do inglês *phosphatidylinositol bisphosphate*) contendo araquidonoil, seguido pela conversão pela diacilglicerol (DAG) lipase (Kohnz; Nomura, 2014). A diacilglicerol lipase está presente em terminais sinápticos (Bisogno *et al.*, 2003). A degradação do 2-AG é geralmente feita pela lipase monoacilglicerol (MAGL, do inglês *monoacylglycerol lipase*), encontrada em terminais pré-sinápticos, ou pela enzima domínio 6 alfa/beta-hidrolase (ABDH6, do inglês *alpha/beta-hydrolase domain containing 6*), presente nos dendritos (Blankman; Simon; Cravatt, 2007; Marrs *et al.*, 2010).

A produção de N-araquidonoil etanolamina parte da hidrólise da N-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE, do inglês *N-arachidonoyl phosphatidyl ethanolamine*) pela NAPE- fosfolipase D (NAPE-PLD). A NAPE-PLD também está presente em terminais pré-sinápticos (Nyilas *et al.*, 2008). A degradação da N-araquidonoil etanolamina é realizada pela hidrolase de amidas de ácidos graxos (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*) (Cravatt *et al.*, 2001).

O sistema endocanabinóide representa um importante sistema de modulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical em adultos (Hill; McEwen, 2010; Morena *et al.*, 2016a; Riebe; Wotjak, 2011). Além disso, estudos demonstram que os endocanabinóides e os receptores canabinóides têm um papel chave nos processos de neurogênese, migração neuronal, alongamento axonal sinaptogênese e poda sináptica (Mulder *et al.*, 2008).

## **2.6. O estresse afeta o sistema dopaminérgico e o sistema endocanabinóide**

O hipocampo é uma estrutura plástica, e bastante suscetível a danos induzidos pelo estresse repetido (Kim; Diamond, 2002). A descoberta de receptores de glicocorticoides e mineralocorticoides no hipocampo, uma região importante para a formação da memória episódica e espacial, tornou-se peça-chave para entender como como estes hormônios circulantes afetam funções cerebrais superiores (Figueiredo; Dolgas; Herman, 2002; Kim; Diamond, 2002; McEwen; Weiss; Schwartz, 1968). Foi demonstrado que o aumento dos níveis de corticosterona circulantes induzido pelo estresse leva a um encolhimento e redução de espinhas dendríticas no hipocampo (Krishnan; Nestler, 2008; McEwen, 2016; McEwen; Weiss; Schwartz, 1968). Os

glicocorticóides podem modular a excitabilidade de neurônios hipocampais, influenciando a magnitude da potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) (de Vargas *et al.*, 2017; Pavlides; Nivón; McEwen, 2002); participar na regulação da neurogênese de neurônios granulares do giro denteado (DG, do inglês *dentate gyrus*), juntamente com aminoácidos excitatórios como NMDA (McEwen, 2016; Reshetnikov *et al.*, 2020); e promover uma atrofia dendrítica induzida pelo estresse na região CA3 do hipocampo, um processo que resulta em prejuízo na aprendizagem de memória espacial (McEwen, 2016, 2017).

Além do hipocampo, neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral também sofrem plasticidade induzida pelo estresse (Douma; de Kloet, 2020). Os receptores de GC são encontrados na área tegmental ventral e podem mediar comportamentos de recompensa (Hensleigh; Pritchard, 2013; Mizoguchi *et al.*, 2021). Interessantemente, Berry *et al.* (2016) demonstraram que a CORT aumenta a sinalização de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA para promover a atividade dopaminérgica da área tegmental ventral (Berry *et al.*, 2016). A área tegmental ventral conecta-se com o hipocampo e tem papel importante na consolidação e persistência de diferentes tipos de memórias (Castillo Díaz *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2020; Lisman; Grace, 2005). O estresse crônico pode causar alterações estruturais que incluem a redução no tamanho de corpos de neurônios dopaminérgicos por redução de fatores neurotróficos, levando a perda de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral (Chu *et al.*, 2007; Sugama; Kakinuma, 2016).

O impacto negativo do estresse também pode ocorrer no *locus coeruleus*, estrutura reconhecidamente moduladora do processo de consolidação de memórias dependentes do hipocampo (Kempadoo *et al.*, 2016; Takeuchi *et al.*, 2016; Yamasaki; Takeuchi, 2017). Apesar das projeções noradrenérgicas para o hipocampo e seu papel nos processos de consolidação de memórias terem sido amplamente estudados nos últimos anos (da Silva de Vargas *et al.*, 2017; Mello-Carpes; Izquierdo, 2013), estudos recentes ressaltam o papel das projeções dopaminérgicas LC-HP no processo de consolidação de diferentes tipos de memórias. Em um estudo recente, Kempadoo *et al.* demonstraram que a maior parte das projeções dopaminérgicas para a região dorsal do hipocampo são oriundas do *locus coeruleus* (Kempadoo *et al.*, 2016). A ativação optogenética de neurônios do *locus coeruleus*, por sua vez, levou à liberação de dopamina no hipocampo dorsal (Kempadoo *et al.*, 2016). Além disso, a

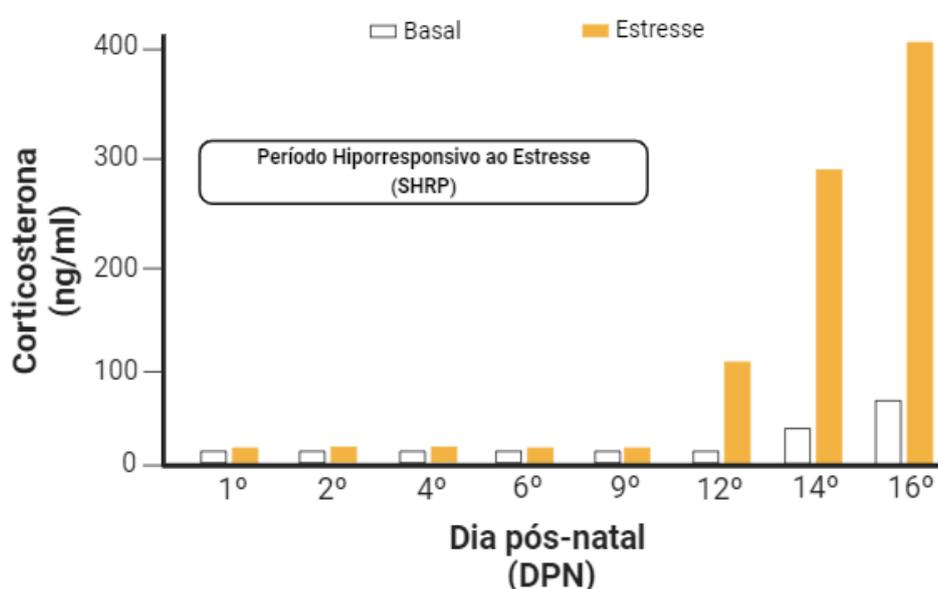
aprendizagem espacial promovida pela ativação de neurônios catecolaminérgicos do locus coeruleus foi prejudicada pela a infusão de um bloqueador de receptores dopaminérgicos D1/D5 no hipocampo (Kempadoo *et al.*, 2016). Receptores de GC são encontrados no locus coeruleus e sua expressão é aumentada mediante uma situação estressora (Li; Han; Shi, 2011); dessa forma, o estresse repetido regula a expressão gênica de receptores de GC no locus coeruleus, bem como a expressão de enzimas importantes para a síntese de dopamina (Makino; Smith; Gold, 2002).

Os endocanabionóides também têm envolvimento em situações de estresse. O SEC desempenha um papel importante em muitas doenças psicopatológicas, tais como depressão e ansiedade (Bortolato *et al.*, 2006; Rubino *et al.*, 2008; Rubino; Zamberletti; Parolaro, 2012). Contudo, dados sobre o impacto da manipulação do SEC ainda são contraditórios. Por exemplo, foi demonstrado que drogas que prolongam a atividade do SEC, por inibir a recaptção ou a degradação de eCB, afetam o comportamento do tipo ansioso em roedores (Haller *et al.*, 2004; Manduca *et al.*, 2015). Por outro lado, estudos mostram que agonistas canabinóides tem efeitos antidepressivo e ansiolítico (Abush; Akirav, 2013; Bortolato *et al.*, 2007; Segev *et al.*, 2014).

## **2.7. Período hiporreponsivo ao estresse (SHRP)**

Os primeiros dias pós-natal (DPN) são importantes para o desenvolvimento do SNC. Em animais experimentais, o período hiporreponsivo ao estresse (SHRP, do inglês *stress hyporesponsive period*) compreende o período do dia pós-natal 4 – 14 em ratos (1 – 12 em camundongos) (Schmidt *et al.*, 2003).

Certos aspetos do comportamento maternal desempenham um papel importante na regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical durante SHRP, tais como os comportamentos de limpeza/lambida (do inglês *licking*) e de alimentação (do inglês *feeding*) (Suchecki; Rosenfeld; Levine, 1993). Durante o SHRP, a interação mãe-filhote suprime os níveis basais de GC (Champagne; Ronald de Kloet; Joëls, 2009; De Kloet *et al.*, 2005) e tem como principal função biológica proteger o desenvolvimento do SNC contra flutuações nos níveis de GC circulantes (Champagne; Ronald de Kloet; Joëls, 2009) (Figura 7).



**Figura 7. Período hiporresponsivo ao estresse (SHRP).** Estudos iniciais demonstraram que os primeiros dias de vida são caracterizados por uma baixa resposta ao estresse. Assim, camundongos submetidos a 30 minutos de estresse (um ambiente com novidade – maravalha nova) não tiveram aumento nos níveis corticosterona circulantes. Fonte: adaptada de Schmidt *et al.* (2003)Schmidt *et al.* (2003)Schmidt *et al.* (2003).

Durante o SHRP, o cérebro é um órgão especialmente sensível a flutuações hormonais induzidas pelo estresse. Nesse sentido, um evento estressor pode aumentar a expressão de mRNA para hormônio liberador de corticotropina no núcleo paraventricular dentro de 30 minutos (Smith *et al.*, 1997). O hormônio liberador de corticotropina está envolvido na resposta ao estresse durante o SHRP, tanto a níveis hipotalâmico como em outras regiões límbicas, como a amígdala basolateral e o hipocampo (Brunson *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, [s. d.]; Smith *et al.*, 1997). O

hipocampo exerce um efeito inibitório do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical (Sousa; Cerqueira; Almeida, 2008).

A expressão de receptores de GC no cérebro é relativamente baixa durante o SHRP e gradualmente aumenta até alcançar os níveis adultos após o desmame (Pryce, 2008). Entretanto, a afinidade dos GC pelos seus receptores no hipocampo nesta fase é muito maior do que em adultos (Pryce, 2008). Os GC estão envolvidos na neurogênese, diferenciação e apoptose durante o período de desenvolvimento do cérebro (Almeida *et al.*, [s. d.]; Champagne; Ronald de Kloet; Joëls, 2009). As baixas doses de GC circulantes, devido a interação mãe-filhote durante o SHRP, ajudam a manter um equilíbrio entre proliferação, maturação e eliminação de células gliais e neurais (Almeida *et al.*, [s. d.]; Champagne; Ronald de Kloet; Joëls, 2009).

Durante o SHRP há uma grande produção, proliferação, migração e maturação de células neurais e gliais (Götz; Huttner, 2005; Jin, 2016). Os mecanismos de produção e migração de novos neurônios vêm sendo amplamente estudados nas últimas décadas e podem estender-se ao longo da vida adulta, tanto em animais quanto em humanos (Götz; Huttner, 2005; Jin, 2016; Moreno-Jiménez *et al.*, 2021). O SHRP também é marcado pela mielinização em massa de neurônios a partir da maturação de células progenitoras de oligodendrócitos que formam a bainha de mielina (Cope; Gould, 2019; Lin; Bergles, 2004). A mielina aumenta a velocidade de condução de impulsos nervosos e sintetiza fatores tróficos que influenciam no tamanho e no diâmetro axonal (Cope; Gould, 2019; Lin; Bergles, 2004).

Mudanças anatômicas e funcionais de regiões subcorticais e corticais ocorrem durante todo o SHRP. A maturação de áreas encefálicas como o locus coeruleus, área tegmental ventral e hipocampo também obedece a remodelação sináptica e o aumento da conectividade entre neurônios antes da vida adulta. Assim, qualquer alteração ou estresse durante os primeiros anos de vida pode alterar o processo normal do neurodesenvolvimento, principalmente em áreas relacionadas a cognição (Douma; de Kloet, 2020; Kim; Diamond, 2002; Kurban *et al.*, 2023; Minné; Marnewick; Engel-Hills, 2023).

## 2.8. O estresse no início da vida

Apesar de estudos iniciais demonstrarem que 30 minutos de estresse durante os primeiros dias de vida não alteram os níveis de corticosterona circulante (Schmidt *et al.*, 2003), posteriormente foi demonstrado que o estresse prolongado durante o período neonatal pode levar a uma desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical, com aumento na expressão de mRNA para hormônio adrenocorticotrópico e HORMÔNIO LIBERADOR DE CORTICOTROPINA (Champagne; Ronald de Kloet; Joëls, 2009; Walkerf *et al.*, 1991). Contudo, a magnitude da resposta é significativamente menor do que aquela encontrada em animais fora do SHRP e de adultos (Champagne; Ronald de Kloet; Joëls, 2009; Schmidt *et al.*, 2003; Walkerf *et al.*, 1991).

A respeito do estresse durante o SHRP, restringir a interação mãe-filhote durante o SHRP pode levar a uma função anormal do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical e ao aumento da resposta ao estresse (De Kloet *et al.*, 2005). As alterações endócrinas durante o período sensível de desenvolvimento do SNC acarretam modificações neuroquímicas, principalmente em estruturas do sistema límbico (Kim; Diamond, 2002; Krugers *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, [s. d.]; Smith *et al.*, 1997). Modificações estruturais e funcionais podem ocorrer e se prolongar até a vida adulta e estão relacionadas com uma maior prevalência de transtornos psiquiátricos, como esquizofrenia e depressão, alterações comportamentais e prejuízos cognitivos (Kurban *et al.*, 2023; Radley *et al.*, 2004; Rentesi *et al.*, 2013).

Diferentes protocolos de privação maternal (PM) vêm sendo amplamente usados para investigar os efeitos do estresse no início da vida (Schmidt *et al.*, [s. d.]). Esses protocolos podem variar em intensidade/duração, dependendo da quantidade de horas em que a mãe é separada da ninhada, podendo variar de minutos até 24h; e frequência, representando o número de vezes/dias em que a mãe será separada da ninhada, podendo variar entre 1 dia até 14 ou 21 dias. Em geral, os protocolos que utilizam alta intensidade/duração (ex.: 24h de PM), utilizam uma baixa frequência (ex.: 1 dia de PM). Por outro lado, protocolos que utilizam uma baixa intensidade (ex.: 3h de PM), utilizam uma alta frequência (ex.: 10 dias de PM) (Alves *et al.*, 2020; Marco *et al.*, 2015).

Nesse sentido, separar a mãe da ninhada por 24h resulta em um aumento significativo nos níveis basais de CORT, com a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical ocorrendo de 4 a 8h de ausência maternal (Schmidt *et al.*, [s. d.]). Uma das consequências da separação maternal é aumentar a sensibilidade da glândula adrenal ao hormônio adrenocorticotrópico, uma vez que uma dose menor de hormônio adrenocorticotrópico é necessária para induzir a secreção de CORT (Levine, 2005; Suchecki; Rosenfeld; Levine, 1993). Outro fator importante é que, embora os níveis de hormônio adrenocorticotrópico sejam equivalentes em ninhadas privadas e não privadas do contato maternal, os níveis de CORT são maiores na ninhada privada (Levine, 2005; Suchecki; Rosenfeld; Levine, 1993). Provavelmente, esses efeitos sejam mediados por sinais metabólicos, uma vez que reposição de glicose ou o bloqueio dos receptores de grelina durante a PM previne a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical (Schmidt *et al.*, 2006). Nesse sentido, a PM altera aspectos neuroendócrinos e comportamentais do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical durante a vida adulta, com aumento da hiperatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical após a situação estressora, aumento do comportamento do tipo ansioso e prejuízo cognitivo (Rentesi *et al.*, 2013).

O estresse crônico no início da vida pode promover mudanças no cérebro que podem persistir até a vida adulta (Neves *et al.*, 2020; Sapolskyf; Krey; Mcewen, 1986). Os modelos de PM que utilizam baixa intensidade/duração e alta frequência causam déficits na aprendizagem e na memória de diferentes tarefas que persistem até a vida adulta em ratos machos (Carrazoni *et al.*, 2023; Neves *et al.*, 2020), sem promover alterações na atividade locomotora, exploratória, comportamento do tipo ansioso ou depressivo (Carrazoni *et al.*, 2023; Menezes *et al.*, 2020; Neves *et al.*, 2020). O hipocampo, estrutura altamente requisitada para processos mnemônicos, tem grande quantidade de receptores de glicocorticoides, cuja estimulação crônica pode levar à prejuízos cognitivos (Asem; Rajwa, 2022; Hensleigh; Pritchard, 2013; Magari~os; Mcewen, 1995).

Os prejuízos cognitivos relacionados ao estresse crônico induzido pela PM têm sido relacionados com alterações morfológicas e funcionais em estruturas importantes para os processos cognitivos (Benetti *et al.*, 2015; Janetsian-Fritz *et al.*, 2018; Krugers *et al.*, 2012; Neves *et al.*, 2020; Rentesi *et al.*, 2013). Por exemplo, Benneti et. al. demonstraram que a estimulação de receptores histaminérgicos na amígdala

basolateral (Benetti *et al.*, 2015) e no hipocampo (Benetti *et al.*, 2012b) reverte os déficits de memória aversiva induzidos pela PM.

Estudos recentes também demonstraram o impacto da PM no sistema dopaminérgico hipocampal do córtex pré-frontal (Majcher-Maślanka *et al.*, 2017; Neves *et al.*, 2020). A exposição a GC no período neonatal afeta o desenvolvimento do sistema dopaminérgico e a expressão e a função dos receptores D1 e D5 em diferentes estruturas do cérebro, tais como o córtex pré-límbico e o estriado (Majcher-Maślanka *et al.*, 2017). Como previamente mencionado, a privação de cuidado maternos no início da vida está relacionada à déficits cognitivos e ao desenvolvimento de doenças psiquiátricas como a depressão e esquizofrenia, doenças cuja fisiopatologia parece envolver alterações dopaminérgicas (Dahoun *et al.*, 2019; Pacák; Palkovits, 2001).

O SEC, por sua vez, está em desenvolvimento, principalmente no cérebro fetal, nos estágios iniciais da gravidez (Fernández-Ruiz *et al.*, 2000). No cérebro humano, os receptores CB1 podem ser encontrados já na 14<sup>a</sup> semana de gestação, com expressão em regiões como o córtex, hipocampo e no cerebelo (Mato; Del Olmo; Pazos, 2003). A expressão dos receptores CB1 continua aumentando durante toda a adolescência até atingir altos níveis no início da vida adulta (Herkenham *et al.*, 1990; Mackie, 2005; Wang *et al.*, 2003). Há um aumento da expressão desses receptores nas regiões CA2 e CA3 do hipocampo e na amígdala perto da 20<sup>a</sup> semana fetal (Mato; Del Olmo; Pazos, 2003; Wang *et al.*, 2003).

Além da regulação do estresse e o controle do desenvolvimento neural (Bermudez-Silva *et al.*, 2010; Cota, 2008), o SEC tem papel na neuroproteção e na plasticidade do cérebro (Colangeli *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2010). Pesquisas em animais e humanos sugerem que o estresse no início da vida aumenta o risco de desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse (Levine, 2005; Suárez *et al.*, 2009). Nesse sentido, estudos têm demonstrado que a PM durante o período neonatal leva a alteração na expressão de mRNA dos receptores CB1 em regiões límbicas do cérebro (Suárez *et al.*, 2009; Viveros *et al.*, 2009). Tais efeitos parecem ser dependentes da idade e do sexo (Suárez *et al.*, 2009; Viveros *et al.*, 2009). Em ratos, a PM produz efeitos agudos e de longo prazo no ECS do sistema límbico (Llorente *et al.*, 2008; Marco *et al.*, 2013; McLaughlin *et al.*, 2016). Assim, em animais submetidos a PM, o córtex pré-frontal exibe uma persistente redução de receptores CB1 durante

a adolescência e a vida adulta (Morena *et al.*, 2016a, 2016b). Além disso, Suarez et al. (2009) mostraram que a PM produz uma redução na expressão de receptores CB1 no hipocampo (Suárez *et al.*, 2009).

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

#### 3.1. Justificativa

O processo de desenvolvimento do Sistema Nervoso (SN) continua mesmo após o nascimento. Eventos estressores que ocorrem durante o período deste desenvolvimento geram consequências que persistem ao longo de toda a vida, tanto em animais quanto em humanos (Çalışkan; Müller; Albrecht, 2020; González-Acosta; Rojas-Cerón; Buriticá, 2021; Majcher-Maślanka *et al.*, 2017). Assim, eventos estressores que ocorrem antes do nascimento, tais como infecção intrauterina, pré eclampsia e prematuridade podem acarretar prejuízos significativos no processo de desenvolvimento do SN (Murray *et al.*, 2017), mas os primeiros dias (em animais) ou anos (em humanos) de vida também representam um período sensível no processo de desenvolvimento do sistema nervoso (Tractenberg *et al.*, 2020).

O estresse no início da vida tem sido relacionado ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos durante a vida adulta. Em humanos, os crescentes casos de pessoas que desenvolveram transtornos psiquiátricos na fase adulta têm sido relacionados a um histórico de eventos estressores durante os primeiros anos de vida, tais como negligência, abuso sexual e trauma (Murray *et al.*, 2017; Nemeroff, 2016). Em animais, estudos que utilizam diferentes tipos de estresse têm vinculado alterações morfofuncionais e neuroquímicas com a mudanças comportamentais características de doenças psiquiátricas, tais como depressão e ansiedade (Marco *et al.*, 2015; Murgatroyd *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2021). Além disso, o estresse no início da vida impacta negativamente os processos cognitivos durante a vida adulta (Menezes *et al.*, 2017, 2020; Neves *et al.*, 2015; Sosa *et al.*, 2019).

Um fator importante a ser considerado é que o estresse pode afetar de formas diferentes homens/machos e mulheres/fêmeas (Heller, 1993; Holden, 2005; Kajantie; Phillips, 2006; Simon; Czéh; Fuchs, 2005; Urban *et al.*, 2019). As variações na resposta ao estresse têm sido sugeridas como um fator de risco relevante para problemas de saúde que afetam de forma específica homens e mulheres (Bruce *et al.*, 2005; Heller, 1993). Estudos em humanos têm demonstrado que mulheres submetidas ao estresse são significativamente mais propensas do que homens a desenvolver desordens de ansiedade e comportamento depressivo ao longo da vida

(Bruce *et al.*, 2005; Heller, 1993; Holden, 2005; Lundberg, 2005). Por outro lado, homens parecem ser mais propensos ao uso de drogas e a desenvolver comportamentos agressivos (Holden, 2005; Kajantie; Phillips, 2006; Lundberg, 2005). Assim, pesquisas em animais têm buscado investigar os mecanismos subjacentes ao efeito do estresse em machos e fêmeas (Farrell *et al.*, 2016; Urban *et al.*, 2019; Viveros *et al.*, 2009). Em um estudo recente, Urban *et al.* (2019) demonstraram que o estresse crônico durante a vida adulta promoveu um aumento da ramificação dendrítica da lâmina V do córtex pré-frontal de ratos machos, tendo o efeito oposto em ratas fêmeas (Urban *et al.*, 2019). Além disso, o estresse no início da vida aumenta a neurogênese hipocampal em machos, mas reduz a neurogênese hipocampal em ratas fêmeas submetidas a PM (Oomen *et al.*, 2009).

Diferentes modelos animais foram propostos para mimetizar o estresse durante o período neonatal (Lee; Jung, 2024). Modelos de estresse que limitam a quantidade de material para a confecção do ninho durante os primeiros dias de vida, por exemplo, podem induzir a uma mudança no comportamento materno, levando a um estresse para a ninhada (Lee; Jung, 2024). Modelos de ausência de cuidados no início da vida também representam um potente estressor. Em roedores, modelos de privação maternal que variam de intensidade/duração e frequência têm sido amplamente estudados (Krugers *et al.*, 2012; Marco *et al.*, 2015). Um destes modelos privação maternal (PM) é realizado durante os dez primeiros dias (3 horas/dia), e culmina em alterações da função cognitiva, como o déficit de memória (Benetti *et al.*, 2009, 2012b, 2015; Menezes *et al.*, 2020; Neves *et al.*, 2015, 2020).

Estudos do nosso e de outros grupos de pesquisa mostram que PM leva a modificações neuroquímicas em estruturas encefálicas importante para processos cognitivos, tais como a amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (Benetti *et al.*, 2009, 2012b, 2015; Menezes *et al.*, 2020; Neves *et al.*, 2020). Além disso, modificações morfológicas no córtex pré-frontal, hipocampo e na amígdala também foram encontradas em animais submetidos a PM (Farrell *et al.*, 2016; Humphreys *et al.*, 2019; Murgatroyd *et al.*, 2015). Interessantemente, Sousa, *et al.* (2014) demonstraram que, além dos déficits cognitivos, a PM leva a uma redução da potenciação de longa duração hipocampal em ratos idosos (Sousa *et al.*, 2014). Os prejuízos induzidos pela PM também compreendem alterações em diferentes sistemas de neurotransmissores,

tais como o sistema colinérgico, histaminérgico, dopaminérgico e endocanabinóide (Benetti *et al.*, 2009, 2012b; Neves *et al.*, 2020; Suárez *et al.*, 2009).

Estudos utilizando modelos de PM demonstram que este protocolo promove um desequilíbrio do sistema dopaminérgico em diferentes regiões do cérebro, tais como o córtex pré-frontal, hipocampo e a amígdala (Majcher-Maślanka *et al.*, 2017; Neves *et al.*, 2020; Pascual; Zamora-León, 2007; Romano-López *et al.*, 2016). O sistema dopaminérgico é uma via que desempenha um papel importante em respostas emocionais ao estresse (Hirano *et al.*, 2007). Além disso, o sistema dopaminérgico hipocampal é importante para o processo de consolidação e persistência da memória (Neves *et al.*, 2020; Rossato *et al.*, 2009). Neurônios dopaminérgicos de diferentes estruturas encefálicas, tais como o *locus coeruleus* e a área tegmental ventral, emitem projeções para o hipocampo e participam do processo de consolidação e persistência da memória de longa duração (Castillo Díaz *et al.*, 2022; Kempadoo *et al.*, 2016). Contudo, ainda não está claro se a PM afeta estruturas encefálicas mais baixas com projeções dopaminérgicas para o hipocampo e o quanto isto influenciaria os processos mnemônicos.

Assim, buscamos avaliar os efeitos da estimulação de duas estruturas encefálicas com projeções dopaminérgicas para o hipocampo, a área tegmental ventral e o *locus coeruleus*, em animais com déficits de memória induzido pelo estresse no início da vida. Para tal, utilizamos um modelo animal de estresse neonatal (PM) em ratos. Adicionalmente, realizamos a estimulação farmacológica da área tegmental ventral ou do *locus coeruleus* em animais PM e não-PM e avaliamos o impacto na persistência da memória de longa duração de animais machos e fêmeas.

Da mesma forma, o sistema endocanabinóide parece ter um papel chave como modulador dos processos de consolidação da memória (Kruk-Slomka *et al.*, 2017). No entanto, as pesquisas que utilizam substâncias agonistas ou antagonistas de receptores canabinóides ou de enzimas que produzem ou degradam endocanabinóides mostram resultados contraditórios. Por um lado, compostos que estimulam receptores CB1 e CB2, como o WIN-55, prejudicam a consolidação da memória espacial (Yim *et al.*, 2008). Por outro lado, a infusão de WIN-55 na amígdala basolateral após o treino da esquivia inibitória, melhora a consolidação da memória de longa duração (Campolongo; Trezza, 2012). Também já foi demonstrado que o estresse no início da vida leva a modificações do sistema endocanabinóide (Goldstein

Ferber; Trezza; Weller, 2021; Hill *et al.*, 2019). Mudanças comportamentais, como o aumento do consumo de álcool, e alterações emocionais relacionadas ao comportamento do tipo depressivo e ansioso estão relacionadas a alterações no sistema endocanabinóide induzidas pelo estresse crônico no início da vida (Amancio-Belmont *et al.*, 2020; Portero-Tresserra *et al.*, 2018). A PM leva a uma redução dos endocanabinóides no estriado e no córtex pré-frontal de camundongos (Portero-Tresserra *et al.*, 2018) e a um aumento da expressão de receptores CB1 do núcleo accumbens de ratos (Amancio-Belmont *et al.*, 2020).

Considerando a possível relação entre a PM e o SEC, bem como deste último com os processos memóricos, nesta tese também procuramos avaliar os efeitos da manipulação do sistema endocanabinóide nos déficits de memória induzidos pelo estresse no início da vida. Para tal, utilizamos um modelo animal de estresse neonatal (PM) em camundongos, e realizamos a infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores endocanabinóides, avaliando a memória espacial.

É extremamente importante que pesquisas sejam realizadas para a melhor compreensão do impacto de um evento estressor no início da vida sobre o desenvolvimento dos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide, proporcionando o crescente conhecimento sobre essa temática e ampliando as possibilidades para futuras terapêuticas nesta área.

## **3.2 Objetivos**

### **3.2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste estudo é investigar o envolvimento dos sistemas dopaminérgico e endocanabinóide nos déficits de memórias induzido pela privação materna (PM) em ratos e camundongos.

### **3.2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos desta tese incluem:

- Investigar se o déficit de memória de reconhecimento observado em ratos machos submetidos a PM também ocorre em ratas fêmeas;

- Investigar se estimulação farmacológica da área tegmental ventral imediatamente após a aprendizagem é capaz de reverter o déficit da memória de reconhecimento de ratos machos e ratas fêmeas submetidos a PM;
- Investigar se estimulação farmacológica da área tegmental ventral imediatamente após a aprendizagem é capaz de promover a persistência da memória de reconhecimento de ratos machos e ratas fêmeas submetidos ou não a PM;
- Investigar se estimulação farmacológica da via dopaminérgica *locus coeruleus* – hipocampo imediatamente após a aprendizagem é capaz de reverter o déficit da memória de reconhecimento de ratos machos e ratas fêmeas submetidos a PM;
- Investigar se estimulação farmacológica da via dopaminérgica do *locus coeruleus* – hipocampo imediatamente após a aprendizagem é capaz de promover a persistência da memória de reconhecimento de ratos machos e ratas fêmeas submetidos ou não a PM;
- Investigar se a PM é capaz de induzir déficit de memória espacial em camundongos machos e fêmeas adultos;
- Investigar os efeitos da manipulação do sistema endocanabinóide nos possíveis déficits de memória de camundongos machos e fêmeas submetidos à PM.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Todos os experimentos que compõem esta tese foram realizados em concordância com os Princípios Éticos de Experimentação Animal.

Os estudos 1 e 2 foram realizados na Universidade Federal do Pampa, campus Uruguaiana/RS/Brasil, e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais na instituição de ensino (CEUA/Unipampa – protocolo nº 26/2021; Anexo 1). O estudo 3 foi realizado na Katholieke Universiteit Leuven (KUL), Leuven/Bélgica, e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da KUL (Project No. 034/2023), de acordo com EU Directive 2010/63/EU (Anexo 2).

Nos estudos 1 e 2, 30 ratas Wistar prenhas (15 para cada estudo) de aproximadamente 3 meses (300 - 400g) foram obtidas do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (RS) e alojadas no Biotério Institucional (Unipampa – Uruguaiana/RS). Os animais foram mantidos no Biotério da Unipampa, em ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), em ciclo claro/escuro de 12h, com alimento e água *ad libitum*. Para a realização dos experimentos descritos nos estudos 1 e 2 desta tese, um total de 213 animais (108♀/105♂) oriundos das proles das ratas foram utilizadas.

No estudo 3, camundongas prenhas C57BL/6J (n = 10) de 2-3 meses foram obtidas Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, FR). Os animais foram mantidos no Biotério da KUL, em ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), em ciclo claro/escuro de 12h, com alimento e água *ad libitum*. Para a realização dos experimentos descritos no estudo 3 desta tese, foram utilizados 67 animais (33♀/34♂) oriundos das proles das camundongas.

### 4.2 Delineamento experimental

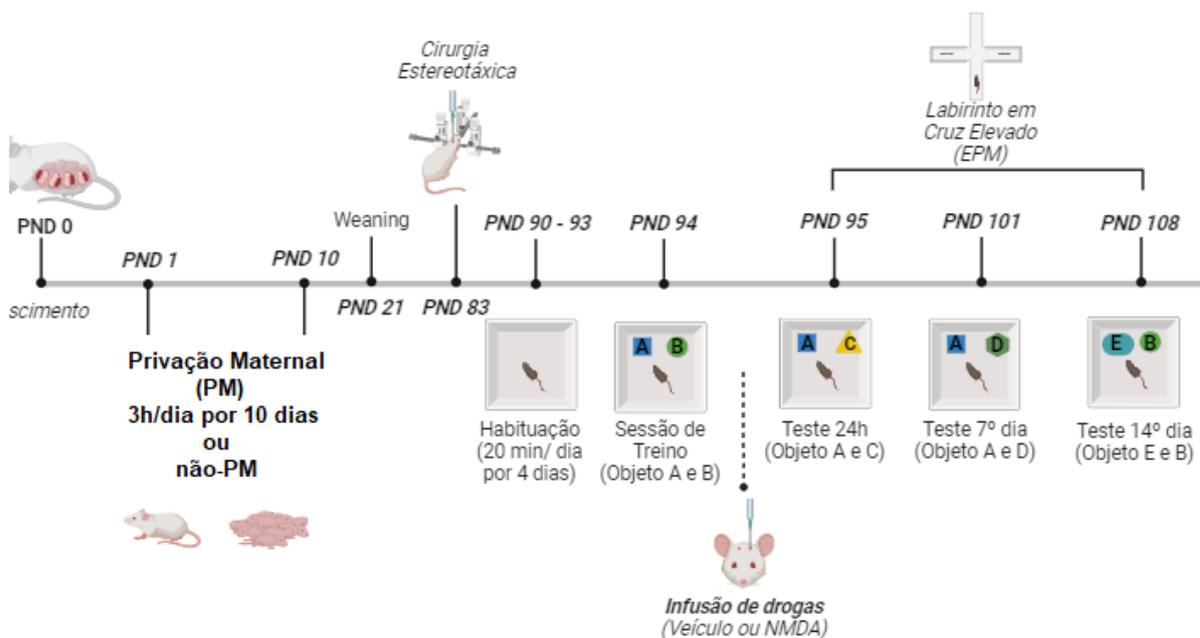
4.2.1 Estudo 1 - Investigação dos efeitos da estimulação farmacológica da área tegmental ventral nos déficits de memória induzido pela PM

Para a realização do estudo 1, 15 ratas Wistar prenhas foram acompanhadas até o dia do nascimento dos filhotes (DPN-0). No primeiro dia após o nascimento (DPN-1) os filhotes foram divididos em 4 grupos, de acordo com os procedimentos a serem adotados ao longo dos experimentos (n = 8 – 12/ grupo/sexo):

- (i) Grupo Controle (n = 9♀ e n = 9♂): ratos que foram treinados na tarefa de reconhecimento de objetos (RO) e, imediatamente após, receberam infusão de solução salina na área tegmental ventral.
- (ii) Grupo PM (n = 12♀ e n = 10♂): ratos que foram submetidos à PM, foram treinados no reconhecimento de objetos e, imediatamente após, receberam infusão de veículo na área tegmental ventral.
- (iii) Grupo NMDA (n = 9♀ e n = 8♂): ratos que foram treinados no reconhecimento de objetos e, imediatamente após, receberam infusão de NMDA, um agonista dos receptores glutamatérgicos NMDA na área tegmental ventral.
- (iv) Grupo PM + NMDA (n = 10♀ e n = 12♂): ratos que foram submetidos ao protocolo PM, foram treinados no reconhecimento de objetos e, imediatamente após, receberam infusão de NMDA na área tegmental ventral.

Após, todos os animais foram submetidos a testes de memória e tarefa de controle comportamental diferentes tempos após o treino no reconhecimento de objetos.

O delineamento experimental do estudo 1 está ilustrado na figura 8.



**Figura 8. Delineamento experimental do estudo 1.** O dia do parto foi considerado dia pós-natal 0 (DPN-0). Do DPN-1 ao DPN-10, metade das ninhadas foi submetida ao protocolo de privação materna (PM). No DP-21, os animais foram desmamados e divididos em diferentes grupos (fêmeas/machos; PM/não PM). No DPN-83, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas na área tegmental ventral (ATV). A avaliação da memória de reconhecimento foi realizada a partir do DPN-90. Após a recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais foram habituados (sessões de habituação) e treinados (sessão de treino) na tarefa de reconhecimento de objetos (RO). Os animais receberam a infusão de NMDA ou veículo na área tegmental ventral imediatamente após a sessão de treino no reconhecimento de objetos. As sessões de teste de reconhecimento de objetos foram realizadas 24 horas (para avaliar a consolidação da memória de reconhecimento de objetos), 7 e 14 dias após a sessão de treino (para avaliar a persistência da memória de reconhecimento de objetos). Um teste comportamental controle, para verificar os níveis de ansiedade (labirinto em cruz elevado – LCE), foi realizado em todos os dias de teste (24 horas, 7 e 14 dias). Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2024).

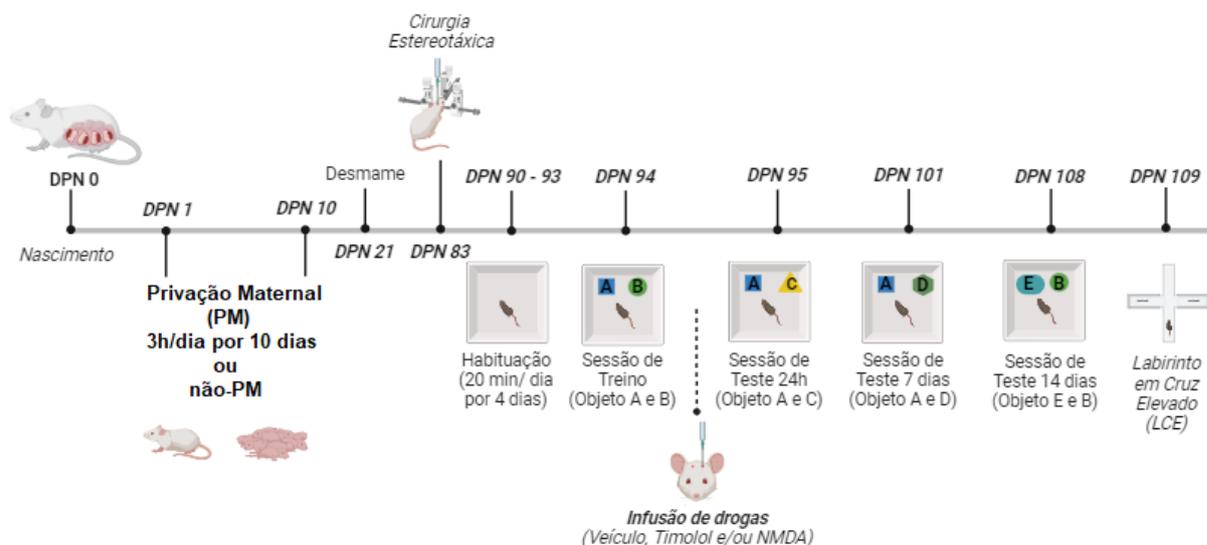
#### 4.2.2 Estudo 2 - Investigação dos efeitos da estimulação farmacológica do sistema dopaminérgico LC-HP nos déficits de memória induzido pela PM

Para o estudo 2, 15 ratas Wistar prenhas que foram acompanhadas até o dia do nascimento dos filhotes (DPN-0). No primeiro dia após o nascimento (DPN-1) os filhotes foram divididos em 6 grupos ( $n = 10 - 13/\text{grupo/sexo}$ ), de acordo com os procedimentos a serem adotados ao longo dos experimentos:

- (i) Grupo Controle (n = 13♀ e n = 12♂): ratos que foram treinados na tarefa de reconhecimento de objetos (RO) e, imediatamente após, receberam infusão de solução salina no hipocampo e no locus coeruleus.
- (ii) Grupo NMDA (n = 11♀ e n = 12♂): ratos que foram treinados no reconhecimento de objetos e, imediatamente após, receberam infusão de solução salina no hipocampo e de NMDA, um agonista dos receptores glutamatérgicos NMDA, no locus coeruleus.
- (iii) Grupo Timolol + NMDA (n = 12♀ e n = 10♂): ratos que foram treinados no reconhecimento de objetos e, imediatamente após, receberam infusão de Timolol, um antagonista dos receptores β-adrenérgicos, no hipocampo e de NMDA no locus coeruleus.
- (iv) Grupo PM (n = 11♀ e n = 12♂): ratos que foram submetidos à PM, foram treinados no reconhecimento de objetos e, imediatamente após, receberam infusão de solução salina no hipocampo e no locus coeruleus.
- (v) Grupo PM + NMDA (n = 10♀ e n = 10♂): ratos que foram submetidos ao protocolo PM, foram treinados no reconhecimento de objetos e, imediatamente após, receberam infusão de solução salina no hipocampo e de NMDA no locus coeruleus.
- (vi) Grupo PM + Timolol + NMDA (n = 11♀ e n = 10♂): ratos que foram submetidos ao protocolo PM, foram treinados no reconhecimento de objetos e, imediatamente após, receberam infusão de Timolol no hipocampo e de NMDA no locus coeruleus.

Após, todos os animais foram submetidos a testes de memória e tarefa de controle comportamental diferentes tempos após o treino no reconhecimento de objetos.

O delineamento experimental do estudo 2 está ilustrado na figura 9.



**Figura 9. Delineamento experimental do estudo 2.** O dia do parto foi considerado dia pós-natal 0 (DPN-0). Do DPN-1 ao DPN-10, metade das ninhadas foi submetida ao protocolo de privação materna (PM). No DPN-21, os animais foram desmamados e divididos aleatoriamente em diferentes grupos (fêmeas/machos; PM/não PM). No DPN-83, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas na região dorsal do hipocampo (HD) e no *locus coeruleus* (LC). A avaliação da memória de reconhecimento foi realizada a partir do DPN-90. Após a recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais foram habituados (sessões de habituação) e treinados (sessão de treino) na tarefa de reconhecimento de objetos (RO). Os animais receberam infusão de NMDA ou veículo (HD/LC) imediatamente após a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos. As sessões de teste no reconhecimento de objetos foram realizadas 24 horas (para avaliar a consolidação da memória de reconhecimento de objetos), 7 e 14 dias após a sessão de treinamento (para avaliar a persistência da memória de reconhecimento de objetos). Para verificar os níveis de ansiedade, foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado (LCE) ao final dos experimentos. Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2024).

#### 4.2.3 Estudo 3 – Investigação dos efeitos da manipulação do sistema endocanabinóide nos déficits de memória induzidos pela PM

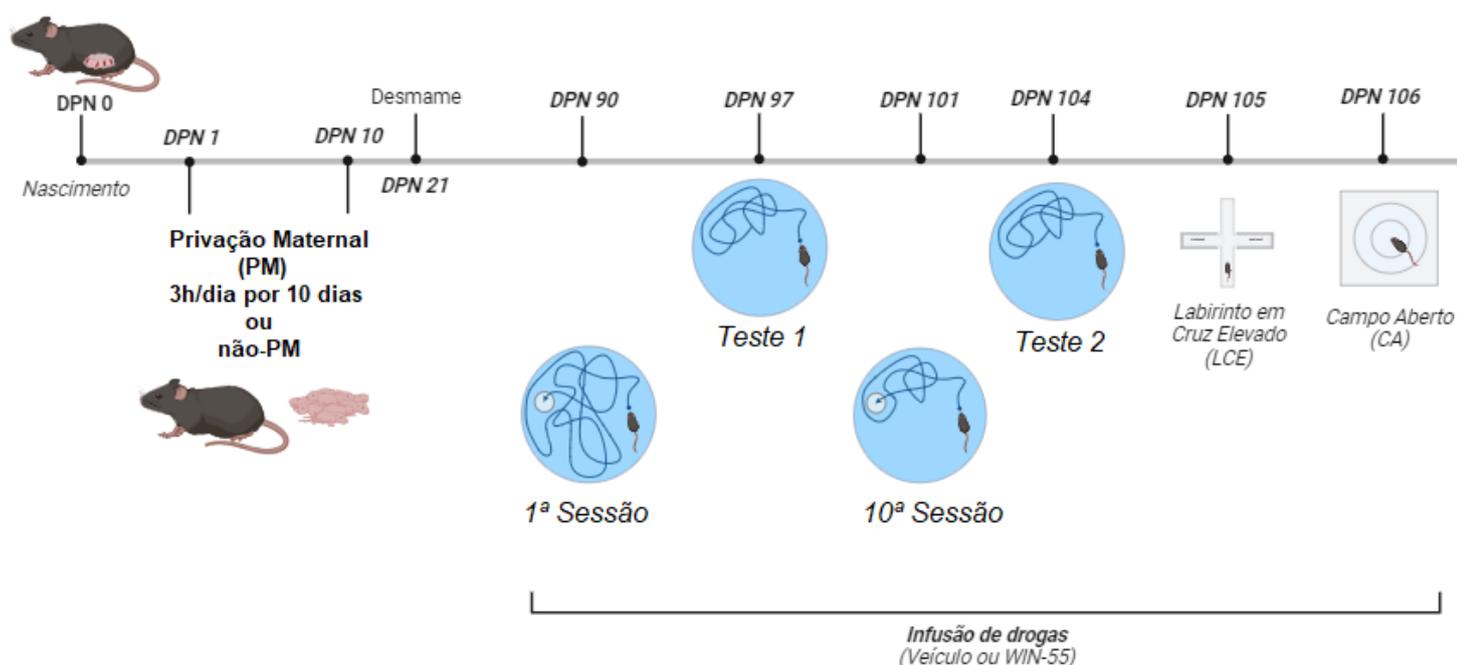
Para o estudo 3, 10 camundongos fêmeas C57BL/6J prenhas foram acompanhadas até o dia do nascimento dos filhotes (DPN-0). No primeiro dia após o nascimento (DPN-1) os filhotes foram divididos em 4 grupos ( $n = 7 - 11$ / grupo/sexo), de acordo com os procedimentos a serem adotados ao longo dos experimentos:

- (i) Grupo Controle ( $n = 7♀$  e  $n = 8♂$ ): camundongos que receberam a infusão intraperitoneal de salina 15 minutos antes de cada tarefa comportamental: teste de memória espacial no Labirinto Aquático de

Morris (LAM), teste de campo aberto (CA) e Labirinto em Cruz Elevado (LCE);

- (ii) Grupo PM ( $n = 12♀$  e  $n = 10♂$ ): camundongos que foram submetidos à PM, e que receberam a infusão intraperitoneal de salina 15 minutos antes de cada tarefa.
- (iii) Grupo NMDA ( $n = 9♀$  e  $n = 8♂$ ): camundongos que receberam a infusão intraperitoneal de WIN-55 (0,5 mg/Kg), um agonista não seletivo dos receptores CB1/CB2, 15 minutos antes de cada tarefa.
- (iv) Grupo PM + NMDA ( $n = 10♀$  e  $n = 12♂$ ): camundongos que foram submetidos ao protocolo PM, e receberam a infusão intraperitoneal de WIN-55 (0,5 mg/Kg), 15 minutos antes de cada tarefa.

O delineamento experimental do estudo 3 está ilustrado na figura 10.



**Figura 10. Delineamento experimental do estudo 3.** O dia parto foi considerado dia pós-natal 0 (DPN-0). Do DPN-1 ao DPN-10, metade das ninhadas foi submetida ao protocolo de privação materna (PM). No DPN-21, os animais foram desmamados e divididos em diferentes grupos (fêmeas/machos; PM/não PM). Os testes de memória iniciaram no DPN-90. Inicialmente, realizamos a fase de treinamento da tarefa de LAM, que consistiu de 10 sessões, com 4 *trials* cada sessão. Os testes da memória foram realizados no DPN-97 e no DPN-104. Após os testes de memória, para verificar os níveis de ansiedade, foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado (LCE); e, para avaliar a atividade locomotora e exploratória, foi realizado o teste de campo aberto (CA). Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2024).

## 4.3 Protocolos experimentais e procedimentos

### 4.3.1 Modelo de privação maternal (PM)

Nos três estudos foi utilizado o protocolo de PM com metade das ninhadas obtidas, de forma randomizada. Foram obtidas ratas Wistar fêmeas (estudos 1 e 2) e camundongos fêmeas (estudo 3) prenhas, que foram mantidas em caixas individuais até o dia do parto. O dia do parto foi considerado o dia zero (DPN-0). A partir de então as ninhadas foram divididas.

Nas ninhadas submetidas à PM, no dia seguinte ao parto (DPN-01), a mãe foi retirada da caixa por um período diário de 3 horas, durante 10 dias seguidos (DPN-01 ao 10). Durante este período de PM os filhotes foram mantidos em um ambiente devidamente aquecido (32°C), para manter a temperatura corporal adequada durante o período que a mãe não estava presente, e não foram manipulados pelo experimentador. Ao final de cada sessão as mães foram realocadas ao ambiente original (Benetti *et al.*, 2009).

Os procedimentos foram realizados em ciclo claro, entre as 08h e 16h. Somente após o DPN-11 as caixas dos animais foram limpas normalmente, de acordo com a rotina do laboratório. No DPN-21 os animais foram desmamados e mantidos em caixas limpas com 4 animais cada.

As ninhadas não submetidas à PM não foram manipuladas no período.

### 4.3.2 Cirurgia estereotáxica

Nos estudos 1 e 2, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas guias e posterior infusão de drogas. Para isso, os animais foram previamente anestesiados com ketamina e xilazina, administrados intra-peritonealmente (i.p.), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente.

Para o estudo 1, cânulas guias de calibre 27G (com 9 mm de comprimento) foram implantadas bilateralmente na área tegmental ventral (AP = -4,8; LL = ±1,0, DV = -3,0 mm do bregma). Para o estudo 2, cânulas guias de calibre 27G (com 9 mm de comprimento) foram implantadas na bilateralmente na região dorsal do hipocampo (AP = -4,2 mm; LL = ± 3,0 mm; e DV = -2,0 mm) e no locus coeruleus (AP = -9,7 mm;

LL =  $\pm$  1,3 mm; DV = -3,0 mm). A implantação de cânulas nas diferentes regiões foi de acordo com as coordenadas do atlas de anatomia Paxinos e Watson (Paxinos; Watson, 2014). As cânulas foram fixadas com cimento dentário. O tempo de recuperação pós-cirúrgica foi de 7 dias.

#### 4.3.3 Infusão das drogas

Timolol e NMDA foram adquiridos da Sigma-Aldrich e dissolvidos em solução salina 0,9% (Veículo). O WIN-55 foi adquirido da Sigma-Aldrich e dissolvido em tampão salina-fosfato 0,1M (Veículo). Todas as drogas foram previamente diluídas, armazenadas a -20°C e protegidas da luz até o uso. A escolha das doses foi baseada em estudos prévios que descreveram a seus efeitos na aprendizagem e na memória (An *et al.*, 2024; Lima *et al.*, 2019, 2023).

Para o estudo 1 e 2, as diferentes drogas foram infundidas imediatamente após a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos (RO), durante na janela de consolidação da memória. Para a infusão, nós utilizamos uma seringa Hamilton de 5 $\mu$ l. As drogas foram infundidas bilateralmente, de acordo com os grupos experimentais especificados abaixo.

No estudo 1, para investigar os efeitos da estimulação de neurônios da área tegmental ventral (ATV), nós realizamos a infusão bilateral de um volume de 0,5 $\mu$ l/lado de NMDA (um agonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA) a uma concentração de 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l. Assim, a estimulação de receptores NMDA exerce um efeito excitatório de neurônios da área tegmental ventral (Lima *et al.*, 2023). Uma agulha de 14 mm (30-G) foi encaixada na cânula guia para a infusão de drogas na área tegmental ventral.

No estudo 2, para investigar os efeitos da estimulação da via dopaminérgica do *Locus Coeruleus* para o Hipocampo Dorsal (LC-HD), primeiro nós realizamos a infusão bilateral de um volume de 1 $\mu$ l/lado de Timolol (um antagonista dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos) a uma concentração de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l, na região CA1 do HD. Imediatamente após a infusão de Timolol no HD, nós realizamos a infusão de um volume de 0,5 $\mu$ l de NMDA a uma concentração de 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l no locus coeruleus (Lima *et al.*, 2019, 2023). Essa estratégia farmacológica permite diferenciar os efeitos adrenérgicos e dopaminérgicos da estimulação do locus coeruleus. Uma agulha de 10 mm e 13 mm

(30-G) foram encaixada na cânula guia para a infusão de drogas no hipocampo e no locus coeruleus, respectivamente.

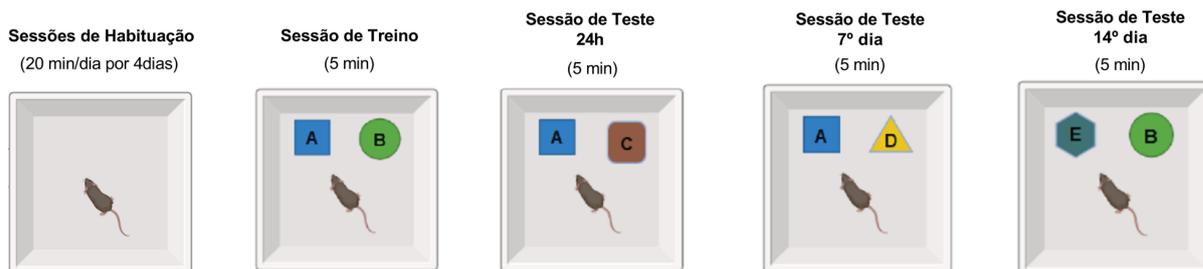
No estudo 3, para investigar os efeitos da manipulação do sistema endocanabinóide na aprendizagem e memória espacial de camundongos, nós realizamos a infusão intraperitoneal de 0,5mg/Kg do WIN-55 (um agonista não seletivo dos receptores canabinóides do tipo 1 e do tipo 2 - CB1/CB2) 15 minutos antes de cada sessão da tarefa do labirinto aquático de Morris (LAM). A infusão também foi realizada 15 minutos antes da tarefa de campo aberto e labirinto em cruz elevado (An *et al.*, 2024)

#### 4.3.4 Testes de avaliação da memória

##### 4.3.4.1 Tarefa de reconhecimento de objetos (RO)

Para os estudos 1 e 2, foram avaliadas a consolidação e a persistência da memória de reconhecimento, através da tarefa de reconhecimento de objetos (RO) (Ennaceur; Delacour, 1988). Essa tarefa baseia-se na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido. Havendo a consolidação ou persistência da uma memória, espera-se que o animal gaste mais tempo explorando o novo objeto. O aparato utilizado consiste em uma caixa de madeira com a parte frontal de vidro transparente (50 x 50 x 50 cm).

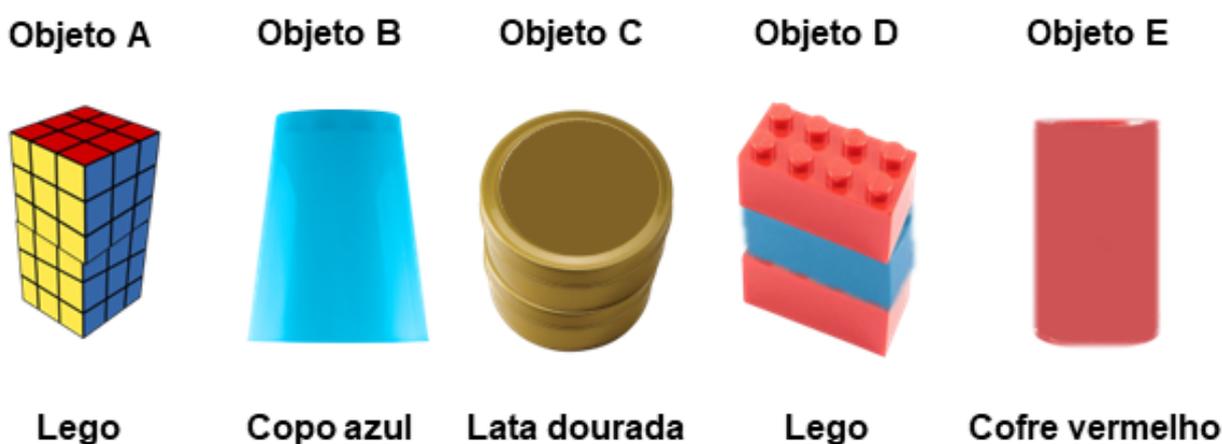
Para o período de habituação ao contexto, foi permitida a livre exploração do aparato 20 minutos por dia, durante 4 dias consecutivos. Para a sessão de treino (aprendizagem), os animais foram colocados novamente no aparato, agora contendo dois objetos diferentes (nominados A e B), e foi permitida a livre exploração por 5 min. Em cada sessão de teste os animais foram novamente colocados para livre exploração dos objetos durante 5 minutos, quando um dos objetos foi mantido e o outro foi substituído por um novo objeto (Figura 11).



**Figura 11. Tarefa de reconhecimento de objetos (RO).** Após habituação ao ambiente, para a sessão de treino (aprendizagem), os animais foram colocados no aparato com dois objetos desconhecidos (nominados A e B) e foi permitida a livre exploração por 5 minutos. A consolidação da memória de longa duração (MLD) foi avaliada 24h após a sessão de treino (Sessão de Teste 24h), utilizando um objeto familiar e um novo. A persistência da memória de longa duração foi avaliada 7 dias (Sessão de Teste 7º dia) e 14 dias (Sessão de Teste 14º dia) após a sessão de treino, sendo, em casa sessão, utilizado um objeto familiar e um novo. Cada sessão de teste durou 5 minutos. Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2024).

Para testar a consolidação da memória de longa duração, os animais foram reintroduzidos no aparato 24h após a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos (Objetos A e C). A persistência da memória de longa duração foi avaliada em sessões de testes realizadas 7 (Objetos A e D) e 14 (Objetos E e B) dias após a sessão de treino (Figura 9).

Todos os objetos e combinações das sessões de treino e testes foram previamente testadas para não garantir que não há preferência por nenhum dos objetos. Os diferentes objetos estão representados na figura 12.

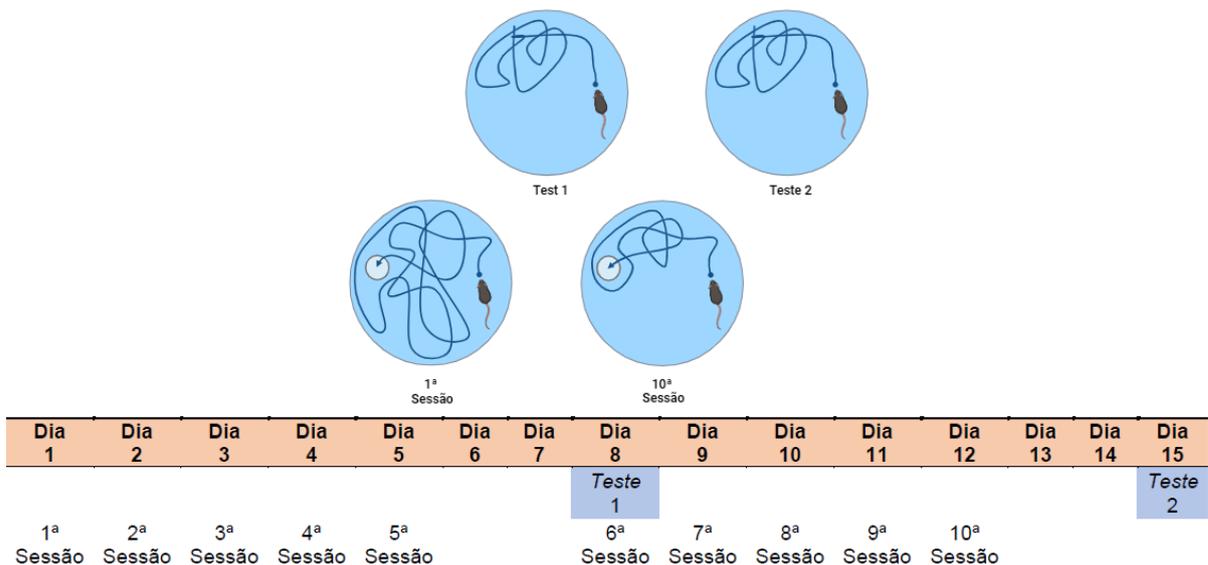


**Figura 12. Objetos utilizados na tarefa de reconhecimento de objetos.** Para a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos, nós utilizamos os objetos A e B. Na sessão de teste 24h, os objetos A e C foram utilizados. Na sessão de teste 7 dias, foram utilizados os objetos A e D. Por fim, os objetos E e B foram utilizados na sessão de teste 14 dias.

O tempo gasto explorando cada objeto foi registrado por um experimentador cego. Os objetos utilizados nas sessões de treino e testes eram de plástico, vidro e outros materiais com as mesmas características, como altura (não superior a 10 cm), profundidade e textura, de forma que os animais não apresentam preferência nata por um dos objetos. A fim de evitar interferências olfativas os objetos e o aparato foram limpados com álcool 70% entre os testes de cada animal.

#### 4.3.4.2 Labirinto aquático de Morris (LAM)

Para o estudo 3, a aprendizagem e a memória espacial de camundongos foi testada utilizando o labirinto aquático Morris (LAM) (Morris, 1981). O LAM foi realizado em uma piscina circular de 150 cm diâmetro cheia de água (opacificada com tinta branca atóxica) mantida a 26°C. Uma plataforma redonda de 15 cm foi escondida 1 cm abaixo da superfície da água em uma posição fixa (Figura 13).



**Figura 13. Labirinto Aquático de Morris (LAM).** O LAM é realizado em uma piscina circular cheia de água opacificada, com uma plataforma escondida em uma posição fixa. Para avaliar a aprendizagem e memória espacial, foram realizadas 10 sessões. Cada sessão da tarefa de LAM consistiu de 4 *trials*. Para cada *trial*, o animal é colocado aleatoriamente em uma das 4 posições iniciais e é contabilizado o tempo que ele leva para chegar à plataforma. A cada 5 dias de treinamento, foi dado dois dias de descanso. Antes da 6ª sessão (*Teste 1*) e dois dias após a 10ª sessão (*Teste 2*), foram realizados os testes de memória espacial. Para a realização dos *Testes*, a plataforma foi removida e foi contabilizado

o tempo que o animal permaneceu no quadrante alvo (quadrante onde estava a plataforma). Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2024).

Cada sessão de treinamento diário consistiu em quatro tentativas (*trials*) de natação para encontrar um refúgio (plataforma), com intervalo de 15 min entre elas, começando aleatoriamente em uma das quatro posições iniciais a cada dia. Os camundongos que não conseguiram encontrar a plataforma em 100 segundos foram guiados até ela. Ao encontrar a plataforma, os animais tiveram que permanecer nela por 30 segundos antes de retornarem às suas gaiolas moradia.

Os camundongos foram treinados para localizar a plataforma durante 10 dias não consecutivos (aquisição). A cada 5 dias de treinamento, foi dado dois dias de descanso. Foi realizado um teste (*Teste 1*) no oitavo dia (antes da 6ª sessão) e um segundo teste (*Teste 2*) no décimo quinto dia (Figura 13). Durante estes *Testes*, a plataforma foi removida da piscina.

Para as sessões de aquisição, a variável analisada foi a média de tempo para encontrar a plataforma nas 4 tentativas diárias. Para as sessões de teste, contabilizamos o tempo de permanência no quadrante alvo (aquele onde estava a plataforma).

#### 4.3.5 Testes de controle comportamental

Os testes de controle comportamental foram realizados para verificar se a PM, cirurgias ou outros procedimentos não interferiram em parâmetros comportamentais que poderiam influenciar os resultados dos testes de memória.

No estudo 1 e 2 o comportamento do tipo ansioso foi avaliado na tarefa de Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para ratos. O LCE consiste em uma plataforma em cruz com 60 centímetros de comprimento em cada braço, posicionada a 70 cm de altura; dois braços contralaterais do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados de braços fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados braços abertos. Cada animal foi colocado no centro do labirinto e foi permitida a livre exploração. O número de entradas e o tempo de permanência nos braços fechados foram registrados durante uma sessão de 5 min. Quanto mais ansioso estiver o animal, maior a tendência de permanência nos braços fechados e

maior o número de entradas nestes braços (Pellow S *et al.*, 1985). Além disso, utilizamos o tempo total de exploração dos dois objetos durante a sessão de treino e as sessões de testes da tarefa de reconhecimento de objetos como um parâmetro para avaliar a atividade exploratória desses animais.

No caso dos camundongos, utilizados no estudo 3, a mesma tarefa foi utilizada, com o mesmo objetivo, mas com algumas adaptações no protocolo, considerando as diferenças entre as espécies. A tarefa foi realizada em um aparato em forma de cruz, com dois braços abertos e dois fechados a 50 cm de altura do nível do solo. O tempo nos braços fechados foi medido durante 10 min. No estudo 3 também avaliamos a atividade locomotora e exploratória e o comportamento ansioso utilizando a tarefa de campo aberto (CA). A tarefa foi realizada em uma arena de Plexiglas transparente (50 × 50 cm). Após 30 min de adaptação ao escuro, os animais foram colocados no canto da arena e a exploração foi gravada por 10 min com uma câmera suspensa e software de rastreamento ANY-maze (Stoelting Co, Illinois, EUA). A distância percorrida e o tempo de permanência no centro do aparato foram considerados.

#### **4.4 Análise estatística**

Em todos os estudos, os dados foram verificados quanto à normalidade da distribuição por meio do teste de Shapiro-Wilk.

Nos estudos 1 e 2, o tempo de exploração (em segundos) de cada objeto na tarefa reconhecimento de objetos foi registrado e convertido em uma porcentagem do tempo total de exploração. O Teste-t de uma amostra foi utilizado para comparar a porcentagem do tempo total de exploração gasto em cada objeto com uma média teórica (50%). Consideramos a capacidade do animal de passar mais de 50% do tempo total explorando o novo objeto como retenção de memória.

Calculamos o Índice de Discriminação (ID) e utilizamos esse índice como parâmetro de memória para a comparação entre grupos. O ID considera o tempo gasto explorando o novo objeto ( $T_{novo}$ , em segundos), o tempo gasto explorando o objeto familiar ( $T_{familiar}$ , em segundos) e o tempo total de exploração de dois objetos ( $T_{total}$ , em segundos) da tarefa de reconhecimento de objetos e foi calculado considerando:

$$\text{Índice de discriminação (ID)} = \frac{T_{novo} - T_{familiar}}{T_{total}}$$

Nos estudos 1 e 2, os dados do ID foram comparados por meio da ANOVA de duas vias, considerando separadamente o sexo masculino ou feminino. Além disso, no estudo 1, os dados do ID também foram comparados por meio da ANOVA de três vias, incluindo o sexo como uma terceira variável.

O tempo total de exploração durante a tarefa de reconhecimento de objetos (testes) e os dados de LCE foram analisados por meio de ANOVA três vias (no estudo 1) e ANOVA de duas vias (no estudo 2). O teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado quando necessário.

No estudo 3, utilizamos o teste ANOVA de medidas repetidas para a avaliação do tempo necessário para encontrar a plataforma de cada sessão de treinamento dos camundongos machos e fêmeas ao longo do tempo. Para a análise dos dados dos dias de teste (*Testes*), nós utilizamos o Teste-t de uma amostra para comparar a média de tempo no quadrante alvo de cada grupo com uma média teórica de 25%.

O tempo de permanência no centro e a distância percorrida no CA foram comparados por meio da ANOVA de três vias. O tempo de permanência nos braços fechados durante o LCE foi analisado por meio de ANOVA três vias, sendo utilizado teste de comparações múltiplas de Tukey quando necessário.

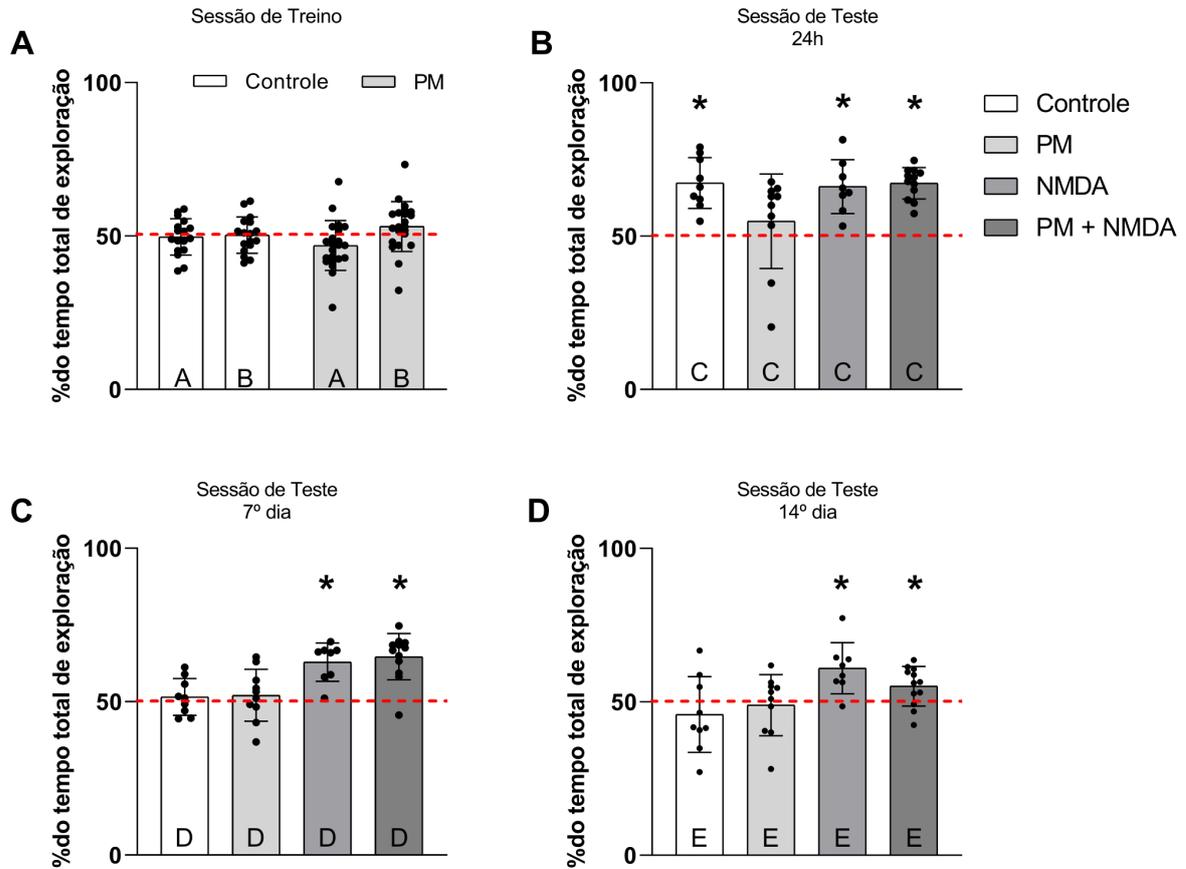
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Estudo 1

5.1.1 A PM promove déficits de memória reconhecimento de objetos em ratos machos; a infusão de NMDA na área tegmental ventral reverte o déficit de memória relacionado ao PM e promove a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratos machos

Utilizamos a tarefa de reconhecimento de objetos para avaliar o envolvimento da área tegmental ventral nos déficits de memória induzidos pela PM em ratos machos. Nesta tarefa, como esperado, durante a sessão de treino, ratos machos de todos os grupos (Controle e PM) exploraram cada um dos objetos (A e B) em cerca de 50% ( $P > 0,05$ ) (Figura 14A).

## Machos



**Figura 14.** Efeitos da PM e da estimulação da área tegmental ventral na consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos (RO) em ratos machos. **A.** Sessão de treinamento de tarefa de reconhecimento de objetos. Ratos machos dos grupos Controle e Privação Maternal (PM) exploraram os dois objetos desconhecidos (denominados A e B) por um período de tempo semelhante (cerca de 50% do tempo total de exploração). **B.** Sessão de teste de 24 horas em ratos machos. Ratos machos dos grupos Controle, NMDA e PM + NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto (denominado C). Ratos machos do grupo PM exploraram objetos familiares (A, não mostrados no gráfico) e novos (C) por um período de tempo semelhante (~50% do tempo total de exploração). **C.** Sessão de teste do 7º dia em ratos machos. Ratos machos dos grupos Controle e PM exploraram os objetos familiares (A, não mostrado no gráfico) e novos (denominados D no teste do 7º dia) por um período de tempo semelhante (~50% do tempo total de exploração). Ratos machos de NMDA e PM+NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto. **D.** Sessão de teste do 14º dia em ratos machos. Ratos machos dos grupos Controle e PM exploraram os objetos familiares (A, não mostrado no gráfico) e novos (denominados E no teste do 14º dia) por um período de tempo semelhante (~50% do tempo total de exploração). Ratos machos dos grupos NMDA e PM+NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto, demonstrando melhora na persistência da memória.

n = 8 - 12/grupo; \*P < 0,05 no teste-t de uma amostra, considerando média teórica de 50%. PM = ratos submetidos a privação maternal; NMDA = ácido N-metil-D-aspartico (agonista de NMDA).

No teste de 24 horas (teste de consolidação da memória), os ratos machos do grupo Controle exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto ( $t_{(8)} = 6,265$ ,  $P = 0,0002$ ; Figura 14B), demonstrando memória preservada. Por outro lado, os ratos machos do grupo PM gastaram uma porcentagem semelhante a 50% do tempo total de exploração explorando o objeto familiar e o novo ( $t_{(9)} = 1,006$ ,  $P = 0,340$ ; Fig. 14B), o que sugere déficits de memória reconhecimento de objetos.

Para investigar se a estimulação farmacológica da área tegmental ventral pode reverter os déficits de memória de reconhecimento relacionados ao PM, infundimos NMDA na área tegmental ventral imediatamente após a sessão de treinamento da tarefa de reconhecimento de objetos. Ratos machos que receberam infusão de NMDA na área tegmental ventral (grupos NMDA e PM + NMDA) após a sessão de aprendizagem exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração o novo objeto ( $t_{(7)} = 5,217$ ,  $P = 0,0012$  para o grupo NMDA;  $t_{(11)} = 11,71$ ,  $P < 0,0001$  para grupo PM + NMDA; Figura 14B), sugerindo que a estimulação farmacológica da área tegmental ventral reverte déficits de memória relacionados à PM em ratos machos.

Para investigar se a estimulação farmacológica da área tegmental ventral imediatamente após a sessão de aprendizagem promove a persistência da memória de reconhecimento, testamos a memória de reconhecimento de objetos 7 e 14 dias após a sessão de treino.

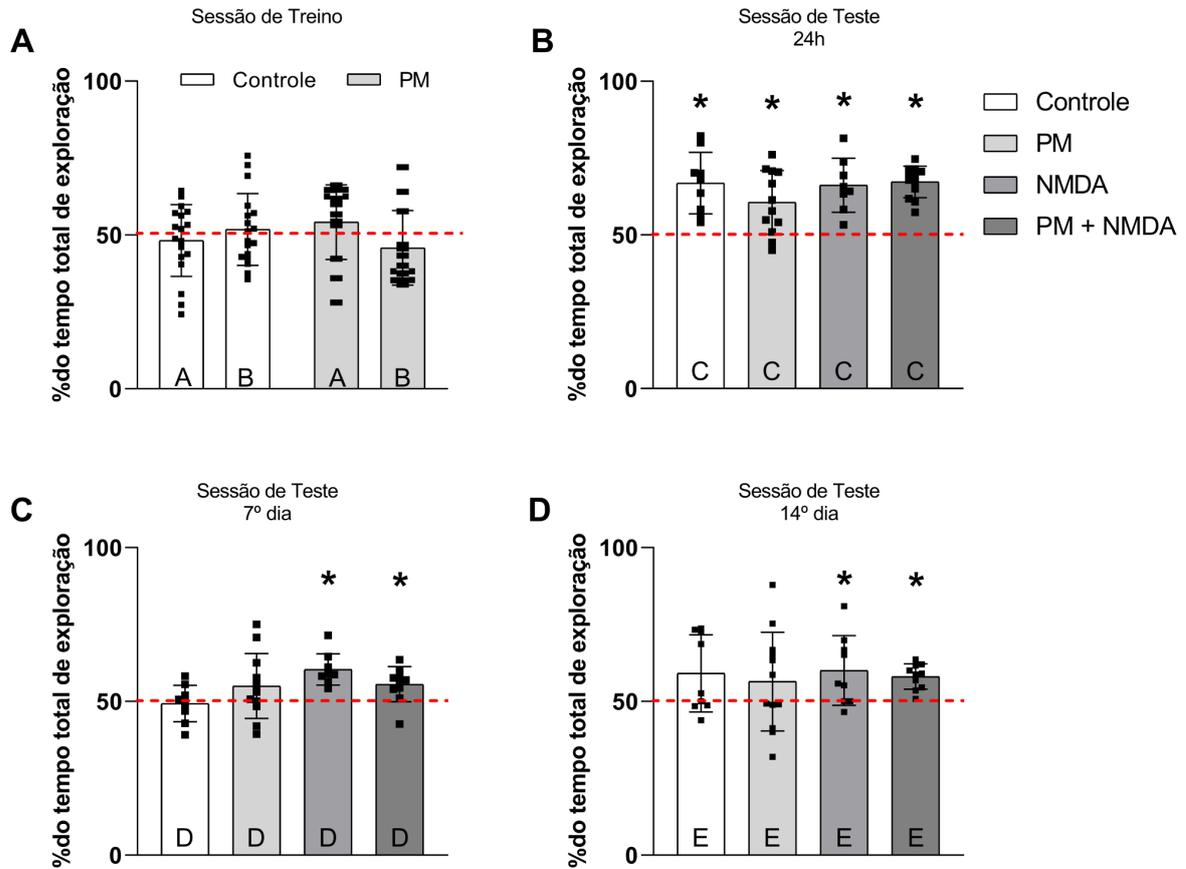
Nos testes de persistência de memória, os ratos machos do grupo Controle exploraram de forma semelhante o objeto familiar e o objeto novo no dia 7 ( $t_{(8)} = 0,7815$ ,  $P = 0,457$ ; objeto D; Figura 14C) e no dia 14 ( $t_{(8)} = 1,008$ ,  $P = 0,3430$ ; objeto E; Figura 14D), sugerindo um esperado esquecimento fisiológico. Os ratos machos do grupo PM exploraram cerca de 50% do tempo total de exploração de cada um dos dois objetos no 7º dia ( $t_{(8)} = 0,778$ ,  $P = 0,4562$ ; objeto D; Figura 10C) e no 14º dia ( $t_{(9)} = 0,3431$ ,  $P = 0,739$ ; objeto E; Figura 14D), o que era esperado, uma vez que os ratos machos do grupo PM não apresentaram consolidação da memória reconhecimento de objetos no teste de 24h. Por outro lado, ratos machos do grupo NMDA exploraram

significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto no dia 7 ( $t_{(7)} = 5,833$ ,  $P = 0,0006$ ; objeto D; Fig. 14C) e no 14º dia ( $t_{(7)} = 3,711$ ,  $P = 0,0075$ ; objeto E; Fig. 14D), demonstrando persistência de memória. Além disso, os ratos machos do grupo PM + NMDA passaram mais tempo explorando o novo objeto no dia 7 ( $t_{(11)} = 6,730$ ,  $P < 0,0001$ ; objeto D; Figura 14C) e no 14º dia de teste ( $t_{(8)} = 2,459$ ,  $P = 0,0394$ ; Figura 14D).

5.1.2 A PM não promove déficits de memória reconhecimento de objetos em ratas; a infusão de NMDA na área tegmental ventral promove a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratas controle e PM

Também, utilizando a tarefa de reconhecimento de objetos, avaliamos o efeito da PM e a estimulação farmacológica de área tegmental ventral em ratas fêmeas. Na tarefa de reconhecimento de objetos, como esperado, durante a sessão de treino, ratas de todos os grupos (Controle e PM) exploraram cada um dos objetos (A e B) em cerca de 50% cada ( $P > 0,05$ ; Figura 15A).

## Fêmeas



**Figura 15. Efeitos da PM e da estimulação da área tegmental ventral na consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos (RO) em ratas fêmeas.** **A.** Sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos (RO). Ratas fêmeas dos grupos Controle e Privação Maternal (PM) exploraram os dois objetos desconhecidos (denominados A e B) por um período de tempo semelhante (cerca de 50% do tempo total de exploração). **B.** Sessão de teste de 24 horas em ratas. Ratas fêmeas de todos os grupos exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto (denominado C). **C.** Sessão de teste do 7º dia em ratas machos. Ratas fêmeas dos grupos Controle e PM exploraram os objetos familiar (A, não mostrado no gráfico) e novo (denominados D no teste do 7º dia) por um período de tempo semelhante (~50% do tempo total de exploração). Ratas fêmeas dos grupos NMDA e PM+NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto. **D.** Sessão de teste do 14º dia em ratas. Ratas fêmeas dos grupos Controle e PM exploraram os objetos familiar (A, não mostrado no gráfico) e novo (denominados E no teste do 14º dia) por um período de tempo semelhante (~50% do tempo total de exploração). Ratas fêmeas dos grupos NMDA e PM+NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto, demonstrando melhora na persistência da memória.  $n = 8 - 12/\text{grupo}$ ;  $*P < 0,05$  no teste t de uma amostra, considerando média teórica de 50%. PM = ratas submetidas a privação maternal; NMDA = ácido N-metil-D-aspartico (agonista de NMDA).

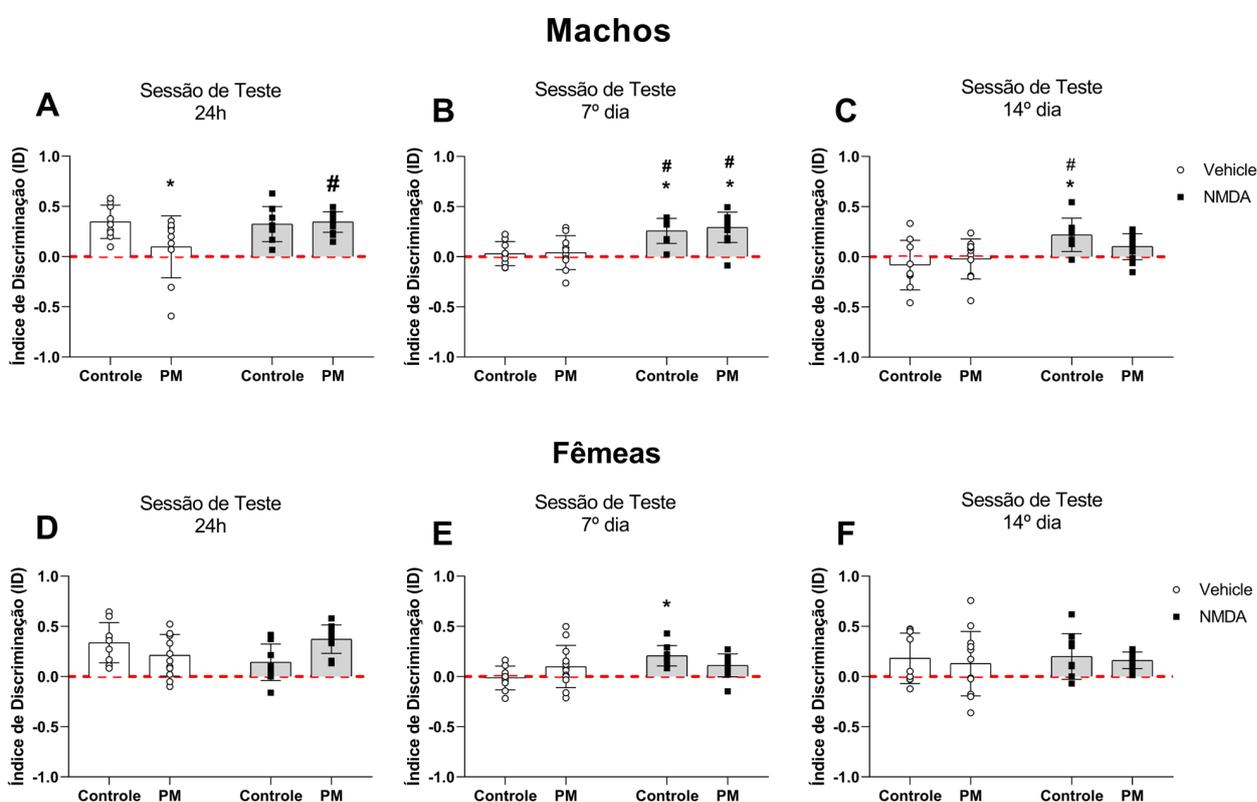
No teste de 24 horas (teste de consolidação), as ratas fêmeas do grupo Controle exploraram mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto ( $t_{(8)} = 5,053$ ,  $P = 0,001$ ; Fig. 15B), demonstrando memória preservada. Ao contrário dos ratos PM machos, as ratas PM fêmeas exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto ( $t_{(11)} = 3,529$ ,  $P = 0,0047$ ; Fig. 15B), sugerindo que o PM pode ter um efeito dependente do sexo. Ratas fêmeas que receberam infusão de NMDA na área tegmental ventral (grupos NMDA e PM + NMDA) após a sessão de treino exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração o novo objeto ( $t_{(8)} = 2,362$ ,  $P = 0,0458$  para o grupo NMDA;  $t_{(9)} = 8,290$ ,  $P < 0,0001$  para grupo PM + NMDA; Figura 15B).

As ratas do grupo Controle exploraram por um tempo similar o objeto familiar e o novo no dia 7 ( $t_{(8)} = 0,361$ ,  $P = 7,273$ ; objeto D; Figura 15C) e no dia 14 ( $t_{(8)} = 2,172$ ,  $P = 0,0617$ ; objeto E; Fig. 15D), sugerindo um esquecimento fisiológico da memória de reconhecimento. As ratas do grupo PM apresentaram o mesmo comportamento no 7º dia ( $t_{(11)} = 1,637$ ,  $P = 0,1299$ ; objeto D; Figura 15C) e no 14º dia ( $t_{(11)} = 1,3387$ ,  $P = 0,1928$ ; objeto E; Fig. 15D). Por outro lado, as ratas do grupo NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto no dia 7 ( $t_{(8)} = 6,156$ ,  $P = 0,0003$ ; objeto D; Fig. 15C) e no dia 14 dia ( $t_{(8)} = 2,649$ ,  $P = 0,0293$ ; objeto E; Fig. 11D), sugerindo persistência de memória. Além disso, as ratas do grupo PM + NMDA passaram mais tempo explorando o novo objeto no dia 7 ( $t_{(9)} = 3,076$ ,  $P < 0,0132$ ; objeto D; Figura 15C) e no 14º dia de teste ( $t_{(9)} = 6,206$ ,  $P = 0,0002$ ; Figura 15D).

5.1.3 A PM reduz o ID em ratos machos, e a infusão de NMDA na área tegmental ventral reverte o déficit de memória relacionado ao PM; as ratas fêmeas são resilientes ao impacto da PM

Nós utilizamos o Índice de Discriminação (ID) de um novo objeto para comparar diferentes grupos. O ID é baseado na diferença de exploração entre um objeto novo e um objeto familiar, dividida pelo tempo total de exploração dos dois objetos. Primeiramente, utilizamos o ID para comparar diferentes grupos, considerando machos e fêmeas separadamente.

Considerando a sessão de teste 24 horas da tarefa de reconhecimento de objetos, a ANOVA de duas vias não revelou efeito da PM ( $F_{(1, 35)} = 3,094$ ;  $P = 0,0873$ ) e infusão de drogas ( $F_{(1, 35)} = 2,985$ ,  $P = 0,0929$ ), mas houve interação entre os fatores ( $F_{(1, 35)} = 4,342$ ,  $P = 0,0445$ ) no ID de ratos machos. O teste de Tukey para múltiplas comparações revelou que os ratos machos PM tiveram um ID menor que o grupo controle ( $q_{(35)} = 3,830$ ,  $P = 0,0487$ ; Figura 16A). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos NMDA e PM + NMDA quando comparados com o grupo Controle ( $P > 0,05$  para todos os grupos; Figura 16A). Por outro lado, o grupo PM + NMDA apresentou ID maior que o grupo PM ( $q_{(35)} = 4,077$ ,  $P = 0,0324$ ; Figura 16A).



**Figura 16. A PM reduz o ID em ratos machos, e a infusão de NMDA na área tegmental ventral reverte o déficit de memória relacionado ao PM; as fêmeas são resilientes aos efeitos da PM no ID. A – C.** Índice de discriminação de um novo objeto nos testes realizados 24h, 7 e 14 dias após a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos em ratos machos. **D – F.** índice de discriminação de um novo objeto os testes realizados 24h, 7 e 14 dias após a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos em ratas.  $n = 8 - 12$ /grupo;  $*P < 0,05$  no teste de Tukey para múltiplas comparações em comparação ao grupo controle.  $\#P < 0,05$  no teste de Tukey para múltiplas comparações em comparação ao grupo PM. PM = ratos machos e fêmeas submetidos a privação materna; NMDA = ácido N-metil-D-aspartico (agonista de NMDA); ID = Índice de Discriminação.

Na sessão de teste 7º dia da tarefa de reconhecimento de objetos, a ANOVA de duas vias não revelou efeito de PM ( $F_{(1, 35)} = 0,2378$ ;  $P = 0,6288$ ). Houve efeito da infusão da droga ( $F_{(1, 35)} = 26,04$ ,  $P < 0,0001$ ), e não houve interação entre os fatores ( $F_{(1, 35)} = 0,07309$ ,  $P = 0,7885$ ) no ID de ratos machos. O teste de Tukey para múltiplas comparações não revelou diferença estatisticamente significativa no ID entre os ratos machos PM e os do grupo Controle ( $q_{(35)} = 0,2166$ ,  $P = 0,9987$ ; Figura 16B). Ratos machos do grupo NMDA e PM + NMDA tiveram um ID maior que o grupo Controle ( $q_{(35)} = 4,554$ ,  $P = 0,0140$ , para o grupo NMDA;  $q_{(35)} = 5,806$ ,  $P = 0,0013$ , para o grupo PM + NMDA; Fig. 16B). Da mesma forma, ratos machos do grupo NMDA e PM + NMDA tiveram um ID maior que o grupo PM ( $q_{(35)} = 4,456$ ,  $P = 0,0168$ , para o grupo NMDA;  $q_{(35)} = 5,747$ ,  $P = 0,0014$ , para o grupo PM + NMDA; Fig. 16B).

Na sessão de teste 14 dias após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos, a ANOVA de duas vias não revelou efeito de PM ( $F_{(1, 35)} = 0,2140$ ;  $P = 0,1494$ ). Houve efeito da infusão da droga ( $F_{(1, 35)} = 12,36$ ,  $P = 0,0012$ ), sem interação entre os fatores ( $F_{(1, 35)} = 2,172$ ,  $P = 0,1494$ ) no ID de ratos machos. O teste de Tukey para múltiplas comparações não revelou diferença estatisticamente significativa no ID entre ratos machos PM e os do grupo controle ( $q_{(35)} = 1,008$ ,  $P = 0,8914$ ; Figura 16C). Ratos machos do grupo NMDA apresentaram ID maior que o grupo Controle ( $q_{(35)} = 4,702$ ,  $P = 0,0107$ ; Figura 16C). Da mesma forma, ratos machos do grupo NMDA tiveram um ID maior que o grupo PM ( $q_{(35)} = 3,841$ ,  $P = 0,0479$ ; Figura 16C). Não houve diferença estatisticamente significativa no ID entre o grupo PM e PM + NMDA ( $q_{(35)} = 2,184$ ,  $P = 0,4230$ ; Figura 16C).

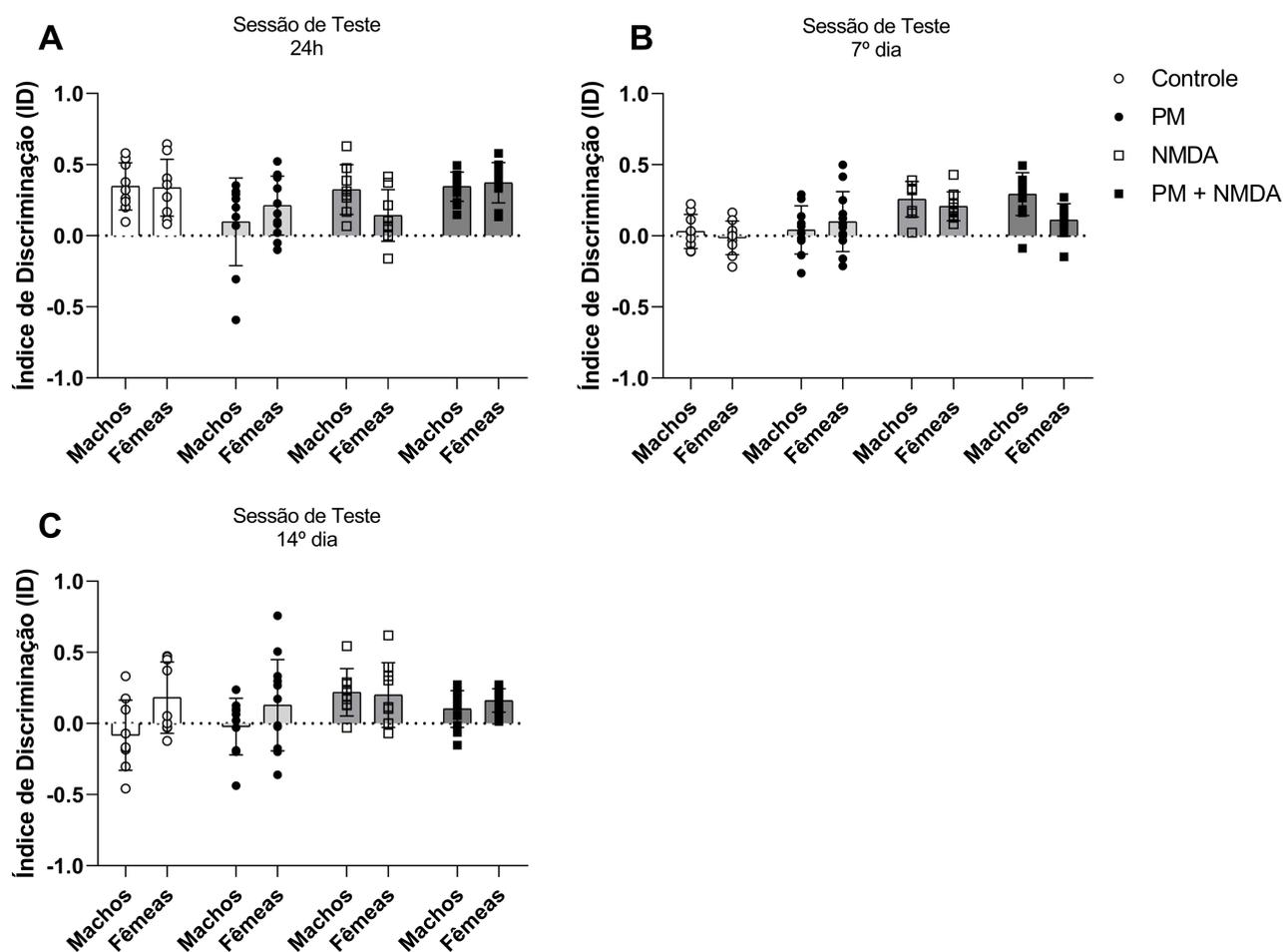
No caso das ratas fêmeas, para a sessão de teste 24h da tarefa de reconhecimento de objetos, a ANOVA de duas vias não revelou efeito da PM ( $F_{(1, 35)} = 0,7631$ ;  $P = 0,3881$ ) ou da infusão de drogas ( $F_{(1, 35)} = 0,0841$ ,  $P = 0,7735$ ) no ID, mas sim interação entre os fatores ( $F_{(1, 35)} = 9,015$ ,  $P = 0,0048$ ). O teste de Tukey para múltiplas comparações não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P > 0,05$  para todos os grupos; Figura 16D).

Na sessão de teste 7º dia da tarefa de reconhecimento de objetos, a ANOVA de duas vias não revelou efeito da PM ( $F_{(1, 36)} = 0,03420$ ,  $P = 0,8543$ ), mas revelou um efeito de infusão de drogas ( $F_{(1, 36)} = 6,049$ ,  $P = 0,0189$ ) e uma interação entre os fatores ( $F_{(1, 36)} = 4,921$ ,  $P = 0,0329$ ) em ratas fêmeas. O teste de Tukey para múltiplas comparações não revelou diferença estatisticamente significativa no ID na

comparação entre as ratas fêmeas PM e as do grupo Controle ( $q_{(36)} = 2,454$ ,  $P = 0,3208$ ; Figura 16E). O grupo NMDA apresentou maior ID quando comparado ao grupo Controle ( $q_{(36)} = 4,469$ ,  $P = 0,016$ ; Figura 16E). Não houve diferença estatisticamente significativa no ID entre o grupo PM e PM + NMDA ( $q_{(36)} = 0,2535$ ,  $P = 0,9979$ ; Figura 16E).

Na sessão de teste 14<sup>o</sup> dia da tarefa de reconhecimento de objetos, a ANOVA de duas vias não revelou efeito de PM ( $F_{(1, 36)} = 0,3558$ ,  $P = 0,5546$ ; Fig. 13F), infusão de drogas ( $F_{(1, 36)} = 0,1095$ ,  $P = 0,7427$ ; Fig. 4F) ou interação entre os fatores ( $F_{(1, 36)} = 0,008950$ ,  $P = 0,9252$ ; Fig. 4F) em ratas fêmeas.

Além da PM e da infusão de drogas, nós consideramos o sexo como fator para comparação do ID. Uma ANOVA de três vias não revelou efeito do sexo no ID na sessão de teste de 24 horas ( $F_{(1, 71)} = 0,2340$ ,  $P = 0,6300$ ; Figura 17A), na sessão de teste do 7<sup>o</sup> dia ( $F_{(1, 71)} = 3,128$ ,  $P = 0,0813$ ; Figura 17B) e na sessão de teste do 14<sup>o</sup> dia ( $F_{(1, 71)} = 0,9609$ ,  $P = 0,3303$ ; Figura 17C). Os resultados da ANOVA de três vias foram detalhados nas tabelas 1, 2 e 3.



**Figura 17. Comparações do Índice de Discriminação de Objetos (ID), considerando o sexo como variável. A – C.** índice de discriminação do objeto novo nos testes realizados 24h (A), 7 (B) e 14 dias (C) após o treino da tarefa de reconhecimento de objetos em ratos machos e fêmeas.  $n = 8 - 12$ /grupo. PM = ratos machos e ratas fêmeas submetidos a privação maternal; NMDA = ácido N-metil-D-aspartico (agonista de NMDA); ID = Índice de Discriminação.

**Tabela 1.** Comparação entre o Índice de Discriminação (ID) no teste 24h (consolidação) entre os diferentes grupos analisados pela ANOVA de três vias.

<b>Vonte da variação</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>	<b>Valor de P</b>
Sexo	F (1, 71) = 0,07831	0,7804
Infusão da droga (Salina vs NMDA)	F (1, 71) = 1,172	0,2827
PM (Não-PM vs. PM)	F (1, 71) = 0,5069	0,4788
Sexo x Infusão da droga (Salina vs NMDA)	F (1, 71) = 2,172	0,1450
Sexo x PM (Não-PM vs PM)	F (1, 71) = 3,574	0,0628
Infusão da droga (Salina vs. NMDA) x PM (não-PM vs. PM)	F (1, 71) = 12,72	0,0007*
Sexo x Infusão da droga (Salina vs. NMDA) x PM (Não-PM vs. PM)	F (1, 71) = 0,2340	0,6300

Teste de Tukey para múltiplas comparações revelou uma diferença estatisticamente significativa no ID entre: grupo machos PM vs. grupo fêmeas PM + NMDA ( $q_{(71)} = 4,495$ ,  $P = 0,0431$ ).

**Table 2.** Comparação entre o Índice de Discriminação (ID) no teste 7º dia entre os diferentes grupos analisados pela ANOVA de três vias.

Vonte da variação	F (DFn, DFd)	Valor de P
Sexo	F (1, 71) = 2,700	0,1047
Infusão da droga (Salina vs NMDA)	F (1, 71) = 28,43	<0,0001*
PM (Não-PM vs, PM)	F (1, 71) = 0,2246	0,6370
Sexo x Infusão da droga (Salina vs NMDA)	F (1, 71) = 3,352	0,0713
Sexo x PM (Não-PM vs PM)	F (1, 71) = 0,04438	0,8338
Infusão da droga (Salina vs, NMDA) x PM (não-PM vs, PM)	F (1, 71) = 1,930	0,1692
Sexo x Infusão da droga (Salina vs, NMDA) x PM (Não-PM vs, PM)	F (1, 71) = 3,128	0,0813

Teste de Tukey para múltiplas comparações revelou uma diferença estatisticamente significativa no ID entre: grupo Controle vs. machos NMDA ( $q_{(71)} = 4,483$ ,  $P = 0,0442$ ); machos Controle vs. machos PM + NMDA ( $q_{(71)} = 5,715$ ,  $P = 0,0032$ ); machos PM vs. machos PM + NMDA ( $q_{(71)} = 5,656$ ,  $P = 0,0037$ ); machos NMDA vs. fêmeas Controle ( $q_{(71)} = 5,388$ ,  $P = 0,0067$ ); machos PM + NMDA vs. fêmeas Controle ( $q_{(71)} = 6,713$ ,  $P = 0,0003$ ); machos PM + NMDA vs. fêmeas PM ( $q_{(71)} = 4,560$ ,  $P = 0,0382$ ); e fêmeas Controle vs. fêmea NMDA ( $q_{(71)} = 4,536$ ,  $P = 0,0399$ ).

**Table 3.** Comparação entre o Índice de Discriminação (ID) no teste 14º dia entre os diferentes grupos analisados pela ANOVA de três vias.

<b>Vonte da variação</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>	<b>Valor de P</b>
Sexo	F (1, 71) = 5,361	0,0235*
Infusão da droga (Salina vs NMDA)	F (1, 71) = 5,859	0,0181*
PM (Não-PM vs. PM)	F (1, 71) = 0,5653	0,4546
Sexo x Infusão da droga (Salina vs NMDA)	F (1, 71) = 3,618	0,0612
Sexo x PM (Não-PM vs PM)	F (1, 71) = 0,03352	0,8552
Infusão da droga (Salina vs. NMDA) x PM (não-PM vs. PM)	F (1, 71) = 0,6922	0,4082
Sexo x Infusão da droga (Salina vs. NMDA) x PM (Não-PM vs. PM)	F (1, 71) = 0,9609	0,3303

Teste de Tukey para múltiplas comparações não revelou diferenças estatisticamente significantes no ID entre os diferentes grupos.

5.1.4 Nem a PM nem a infusão de drogas na área tegmental ventral induz comportamento do tipo ansioso ou altera a atividade locomotora e exploratória

A PM ou a infusão de drogas na área tegmental ventral não causou alterações no número de entradas ou no tempo gasto nos braços fechados no teste LCE ( $P > 0,05$  na comparação dos grupos; Tabela 4). Além disso, a PM ou a infusão de drogas na área tegmental ventral não induziu alteração no comportamento exploratório observado no tempo total de exploração das sessões de treino e testes de reconhecimento de objetos ( $P > 0,05$  em todas as sessões e comparação de grupos; Tabela 5).

**Tabela 4.** A PM, a infusão de drogas ou o sexo não alteram o comportamento do tipo ansioso no labirinto em cruz elevado (LCE) ( $P > 0,05$ ; ANOVA de três vias). Os dados são expressos como média e desvio padrão ( $n = 8-12$ /grupo).

		Controle	PM	NMDA	PM + NMDA	<i>F</i> (DFn, DFd); Valor de <i>P</i>
Teste 24ht						
	Tempo gasto nos braços fechados (s)					
	<i>Machos</i>	72,67 ± 36,73	110,6 ± 61,52	109,375 ± 34,13	102,25 ± 37,71	<i>F</i> (1, 71) = 0,2535; P = 0,6162
	<i>Fêmeas</i>	118,89 ± 54,88	153,75 ± 52,66	132 ± 50,55	144,5 ± 58,87	
	Número de entradas nos braços fechados (n)					
	<i>Machos</i>	6,44 ± 1,59	8,5 ± 3,24	7 ± 2,56	6,5 ± 2,07	<i>F</i> (1, 71) = 0,06207; P = 0,8040
	<i>Fêmeas</i>	6,33 ± 2,74	9 ± 2,8	6,44 ± 2,4	6 ± 1,76	
Teste 7º dia						
	Tempo gasto nos braços fechados (s)					
	<i>Machos</i>	81,33 ± 41,03	90,7 ± 51,09	93,75 ± 39,66	82,58 ± 41,34	<i>F</i> (1, 71) = 0,4293; P = 0,5144
	<i>Fêmeas</i>	125,89 ± 63,92	146,58 ± 50,9	152,89 ± 45,8	124,2 ± 49,56	
	Número de entradas nos braços fechados (n)					
	<i>Machos</i>	6,55 ± 2,4	6,6 ± 2,46	6,5 ± 2,98	7,17 ± 3,27	<i>F</i> (1, 71) = 0,4767; P = 0,4922
	<i>Fêmeas</i>	7,11 ± 2,09	7,5 ± 2,97	8,11 ± 3,29	7,4 ± 2,19	

---

---

Teste 14°

dia

Tempo gasto nos braços  
fechados (s)

<i>Machos</i>	139,89 ± 59,44	119,5 ± 54,08	141,88 ± 57,73	160,33 ± 45,12	F <sub>(1, 71)</sub> = 2,417;
<i>Fêmeas</i>	112,67 ± 33,91	143,42 ± 68,36	171,11 ± 48,65	162,3 ± 65,86	P = 0,1245

Número de entradas nos  
braços fechados (n)

<i>Machos</i>	8,11 ± 3,06	8 ± 3,4	7,5 ± 3,07	7,5 ± 2,61	F <sub>(1, 71)</sub> = 0,1846;
<i>Fêmeas</i>	8,67 ± 3,37	9,92 ± 2,23	7,33 ± 3,5	9,9 ± 3,6	P = 0,6688

---

**Tabela 5.** A PM, infusão de drogas ou o sexo não alteram a Atividade exploratória durante as sessões de treino e testes da tarefa de reconhecimento de objetos (RO) ( $P > 0,05$ ; ANOVA de três vias). Dados são expressos como média e desvio padrão ( $n = 8-12$ /grupo).

Sessão		Controle	PM	NMDA	PM + NMDA	<i>F</i> ( <i>DFn</i> , <i>DFd</i> ); <i>Valor de P</i>
Treino						
	Tempo total de exploração (s)					
	<i>Machos</i>	50,33 ± 10,56	53 ± 22,46	57 ± 15,59	59,75 ± 10,53	<i>F</i> (1, 71) = 0,7901; <i>P</i> = 0,3771
	<i>Fêmeas</i>	39,33 ± 19,7	44,75 ± 19,6	48,11 ± 16,37	68,3 ± 25,11	
Teste 24h						
	Tempo total de exploração (s)					
	<i>Machos</i>	58,22 ± 24,31	55,7 ± 12,98	56,88 ± 14,85	62,92 ± 22,68	<i>F</i> (1, 71) = 0,1600; <i>P</i> = 0,6903
	<i>Fêmeas</i>	56,33 ± 26,22	55,92 ± 25,32	60,89 ± 26,08	61,3 ± 9,1	
Teste de 7º dia						
	Tempo total de exploração (s)					
	<i>Machos</i>	59 ± 8,93	65,5 ± 11,24	59,5 ± 18,54	72,42 ± 18,75	<i>F</i> (1, 71) = 1,244; <i>P</i> = 0,2684
	<i>Fêmeas</i>	66,56 ± 26,76	58,08 ± 27,34	51 ± 18,59	68,8 ± 16,67	
Teste de 14º dia						

---

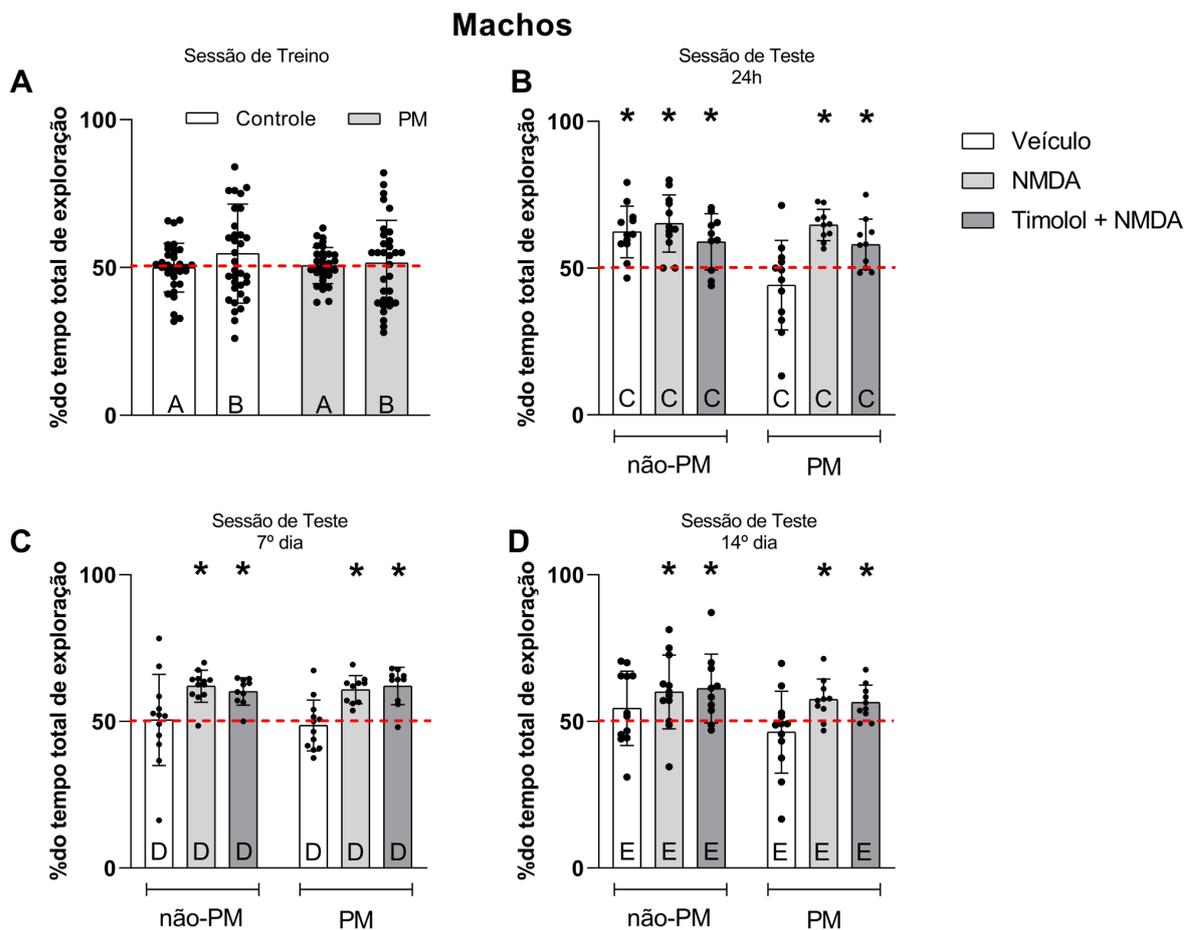
Tempo total de exploração						F (1, 71) = 1,286; P = 0,2606
(s)						
<i>Machos</i>	60,78 ± 20,97	51,7 ± 21,95	45 ± 16,05	68 ± 14,62		
<i>Fêmeas</i>	58,78 ± 21,54	58,67 ± 18,85	53,67 ± 19,53	66,6 ± 13.18		

---

## 5.2 Estudo 2

5.2.1 A PM promove déficits de memória de reconhecimento de objetos em machos; os quais são revertidos pela estimulação da via dopaminérgica LC-HD, além de promover a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratos machos PM e não PM

Utilizamos a tarefa de reconhecimento de objetos para avaliar o envolvimento das projeções dopaminérgicas LC-HD nos déficits de memória induzidos pela PM em ratos machos. Nesta tarefa, como esperado, durante a sessão de treinamento, ratos machos de todos os grupos (Controle e PM) exploraram cada um dos objetos (A e B) por cerca de 50% do tempo total de exploração ( $P > 0,05$ ; Figura 18A).



**Figura 18. Efeitos da PM e da modulação da via dopaminérgica LC-HD na consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratos machos. A.** Sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos (RO). Ratos machos dos grupos Controle e Privação Maternal (PM) exploraram os dois objetos desconhecidos (denominados A e B) por um período de tempo semelhante (cerca de 50% do tempo total de exploração). **B.** Sessão de teste de 24 horas em ratos

machos. Ratos machos dos grupos Controle, NMDA, Timolol + NMDA, PM + NMDA e PM + Timolol + NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto (denominado C). Ratos machos do grupo PM exploraram objetos familiares (A, não mostrados no gráfico) e novos (C) por um período de tempo semelhante (~50% do tempo total de exploração). **C.** Sessão de teste do 7º dia em ratos machos. Ratos machos dos grupos Controle e PM exploraram os objetos familiares (A, não mostrado no gráfico) e novos (denominados D no teste do 7º dia) por um período de tempo semelhante (~50% do tempo total de exploração). Ratos machos de NMDA, Timolol + NMDA, PM + NMDA e PM + Timolol + NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto. **D.** Sessão de teste do 14º dia em ratos machos. Ratos machos dos grupos Controle e PM exploraram os objetos familiares (A, não mostrado no gráfico) e novos (denominados E no teste do 14º dia) por um período de tempo semelhante (~50% do tempo total de exploração). Ratos machos dos grupos NMDA, Timolol + NMDA, PM + NMDA e PM + Timolol + NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto, demonstrando melhora na persistência da memória.  $n = 10 - 12/\text{grupo}$ ;  $*P < 0,05$  no teste t de uma amostra, considerando média teórica de 50%. PM = ratos submetidos a privação materna; NMDA = ácido N-metil-D-aspartico (agonista de NMDA); Timolol = maleato de timolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico).

No teste de 24 horas (consolidação), os ratos machos do grupo Controle exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto ( $t_{(11)} = 4,876$ ,  $P = 0,0005$ ; Figura 18B), demonstrando memória preservada. Por outro lado, os ratos machos do grupo PM gastaram uma porcentagem semelhante a 50% do tempo total de exploração explorando o objeto familiar e o novo no dia do teste ( $t_{(11)} = 1,317$ ,  $P = 0,214$ ; Fig. 18B), o que sugere déficits de memória reconhecimento de objetos.

Para avaliar a participação da via dopaminérgica LC-HD nos déficits de memória induzidos pela DM, realizamos uma abordagem farmacológica em ratos submetidos e não submetidos à PM. Infundimos um agonista do receptor glutamatérgico tipo NMDA (NMDA) para estimular o locus coeruleus, associado à infusão intrahipocampal de um antagonista do receptor noradrenérgico (Timolol) ou veículo (solução salina) imediatamente após a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos (RO). Ratos machos que receberam infusão de NMDA no locus coeruleus (grupos NMDA e PM + NMDA) após a sessão de aprendizagem exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto ( $t_{(11)} = 5,394$ ,  $P = 0,0002$  para o grupo NMDA;  $t_{(9)} = 8,677$ ,  $P < 0,0001$  para o grupo PM + NMDA; Fig. 18B), sugerindo que a estimulação farmacológica no locus coeruleus reverte os déficits de memória relacionados ao PM em ratos machos. Da

mesma forma, ratos machos que receberam infusão de NMDA na infusão de locus coeruleus associada à infusão de Timolol no HD (grupos Timolol + NMDA e PM + Timolol + NMDA) após a sessão de aprendizagem exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto ( $t_{(9)} = 2,953$ ,  $P = 0,016$  para grupo Timolol + NMDA;  $t_{(9)} = 2,956$ ,  $P = 0,0161$  para grupo PM + Timolol + NMDA; Fig. 18B), sugerindo que o efeito da estimulação farmacológica do locus coeruleus na consolidação da memória é via estimulação dopaminérgica HD e não via receptores beta-adrenérgicos.

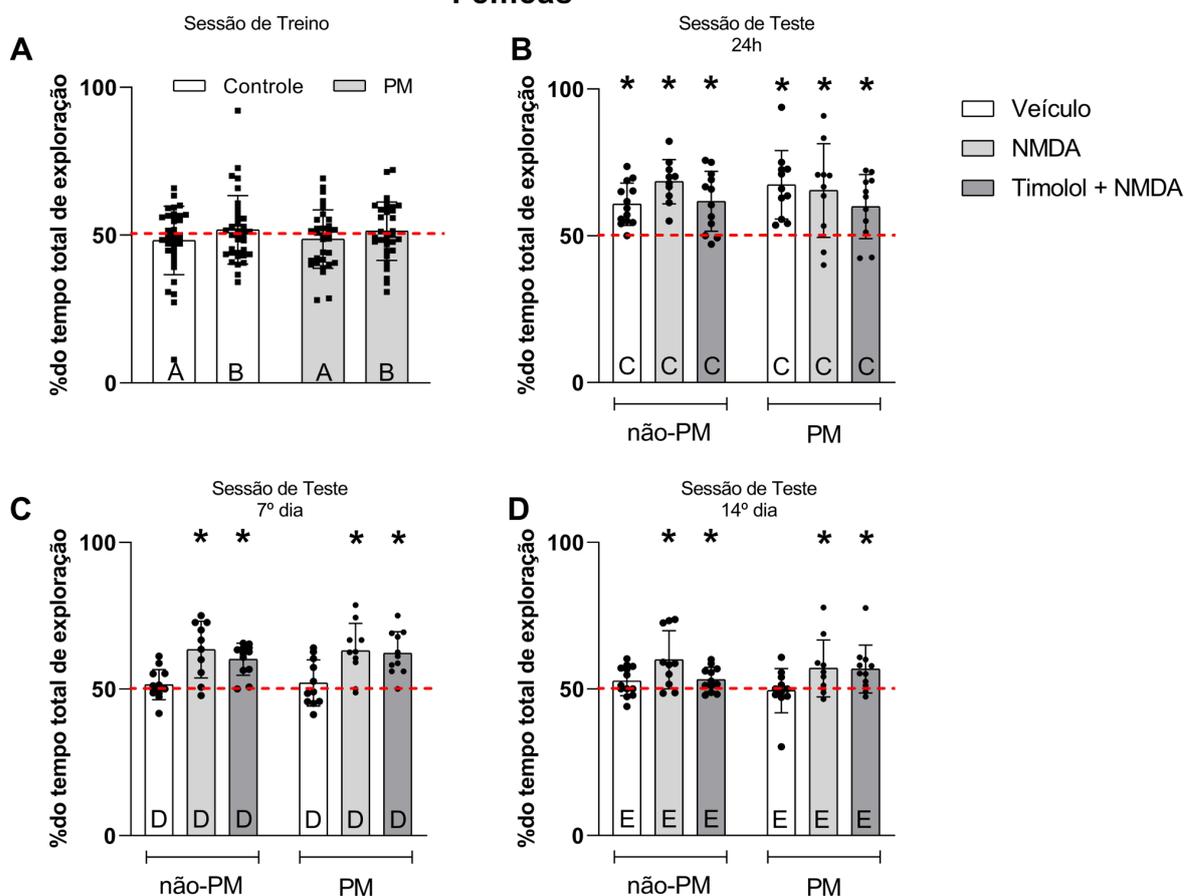
Para investigar se a estimulação da via dopaminérgica LC-HD imediatamente após a sessão de aprendizagem promove a persistência da memória de reconhecimento, testamos a memória reconhecimento de objetos 7 e 14 dias após a sessão de treino. Nos testes de persistência de memória, os ratos machos do grupo Controle exploraram de forma semelhante o objeto familiar e o objeto novo no dia 7 ( $t_{(11)} = 0,115$ ,  $P = 0,9104$ ; objeto D; Figura 18C) e no dia 14 ( $t_{(11)} = 1,212$ ,  $P = 0,250$ ; objeto E; Fig. 18D), sugerindo um esperado esquecimento fisiológico. Os ratos machos do grupo PM exploraram cerca de 50% do tempo total de exploração de cada um dos dois objetos no 7º dia ( $t_{(11)} = 0,547$ ,  $P = 0,595$ ; objeto D; Figura 18C) e no 14º dia ( $t_{(11)} = 0,903$ ,  $P = 0,385$ ; objeto E; Figura 18D), o que era esperado, uma vez que os ratos machos do grupo PM não apresentaram consolidação da memória reconhecimento de objetos no teste de 24h. Por outro lado, ratos machos do grupo NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto no dia 7 ( $t_{(11)} = 7,659$ ,  $P < 0,0001$ ; objeto D; Fig. 18C) e no 14º dia ( $t_{(11)} = 2,756$ ,  $P = 0,018$ ; objeto E; Fig. 18D), demonstrando persistência de memória. Além disso, os ratos machos do grupo PM + NMDA passaram mais tempo explorando o novo objeto no dia 7 ( $t_{(9)} = 7,131$ ,  $P < 0,0001$ ; objeto D; Figura 18C) e no teste do 14º dia ( $t_{(9)} = 3,349$ ,  $P = 0,0085$ ; Figura 18D). Ratos machos que receberam infusão de NMDA no locus coeruleus associada à infusão de Timolol no HD (grupos Timolol + NMDA e PM + Timolol + NMDA) após a sessão de aprendizagem exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto no dia 7 dia ( $t_{(9)} = 6,914$ ,  $P < 0,0001$  para grupo Timolol + NMDA;  $t_{(9)} = 5,976$ ,  $P = 0,0002$  para grupo PM + Timolol + NMDA; Figura 18B) e teste de 14 dias ( $t_{(9)} = 3,011$ ,  $P = 0,0147$  para grupo Timolol + NMDA;  $t_{(9)} = 3,475$ ,  $P = 0,007$  para grupo PM + Timolol + NMDA; Figura 18B).

Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que a dopamina liberada do locus coeruleus para o HD reverte os déficits de memória induzidos pela DM e promove a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratos machos PM e não-PM.

5.2.2 A PM não promove déficits de memória reconhecimento de objetos em ratas fêmeas; a estimulação da via dopaminérgica LC-HD promove a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratas fêmeas submetidas ou não à PM

Utilizamos a tarefa de reconhecimento de objetos para avaliar o envolvimento da via dopaminérgica LC-HP nos déficits de memória induzidos pela PM em ratas fêmeas. Nesta tarefa, como esperado, durante a sessão de treino da tarefa de reconhecimento de objetos, ratas fêmeas de todos os grupos (Controle e PM) exploraram cada um dos objetos (A e B) por cerca de 50% do tempo total de exploração ( $P > 0,05$ ; Figura 19A).

## Fêmeas



**Figura 19. Efeitos da PM e da modulação da via LC-HD na consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratas fêmeas.** **A.** Sessão de treino de tarefa de reconhecimento de objetos (RO). Ratas fêmeas dos grupos Controle e Privação Maternal (PM) exploraram os dois objetos desconhecidos (denominados A e B) por um período de tempo semelhante (cerca de 50% do tempo total de exploração). **B.** Sessão de teste de 24 horas em ratas fêmeas. Ratas fêmeas de todos os grupos exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto (denominado C). **C.** Sessão de teste do 7º dia em ratas fêmeas. Ratas fêmeas dos grupos Controle e PM exploraram os objetos familiar (A, não mostrado no gráfico) e novo (denominados D no teste do 7º dia) por um período de tempo semelhante (~50% do tempo total de exploração). Ratas fêmeas de NMDA, Timolol + NMDA, PM + NMDA e PM + Timolol + NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto. **D.** Sessão de teste do 14º dia em ratas fêmeas. Ratas fêmeas dos grupos Controle e PM exploraram os objetos familiares (A, não mostrado no gráfico) e novos (denominados E no teste do 14º dia) por um período de tempo semelhante (~50% do tempo total de exploração). Ratas fêmeas dos grupos NMDA, Timolol + NMDA, PM + NMDA e PM + Timolol + NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto, demonstrando melhora na persistência da memória.  $n = 10 - 13/\text{grupo}$ ;  $*P < 0,05$  no teste t de uma amostra, considerando média teórica de 50%. PM = ratas submetidas a privação maternal; NMDA

= ácido N-metil-D-aspartico (agonista de NMDA); Timolol = maleato de timolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico).

As ratas Controle (não-PM) exploraram mais de 50% do tempo total de exploração o novo objeto ( $t_{(12)} = 5,391$ ,  $P = 0,0002$ ; Fig. 19B), demonstrando memória preservada. Ao contrário dos ratos PM machos, as ratas PM fêmeas exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto ( $t_{(10)} = 4,931$ ,  $P = 0,0006$ ; Fig. 19B), sugerindo que o PM pode ter um efeito dependente do sexo. Ratas fêmeas que receberam infusão de NMDA no locus coeruleus (grupos NMDA e PM + NMDA) após a sessão de aprendizagem exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto ( $t_{(9)} = 7,726$ ,  $P < 0,0001$  para o grupo NMDA;  $t_{(9)} = 3,061$ ,  $P = 0,013$  para grupo PM + NMDA; Figura 19B). Ratas fêmeas que receberam infusão de NMDA na infusão de locus coeruleus associada à infusão de Timolol no HD (grupos Timolol + NMDA e PM + Timolol + NMDA) após a sessão de aprendizagem exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto ( $t_{(11)} = 3,984$ ,  $P = 0,002$  para grupo Timolol + NMDA;  $t_{(10)} = 3,034$ ,  $P = 0,012$  para grupo PM + Timolol + NMDA; Figura 19B).

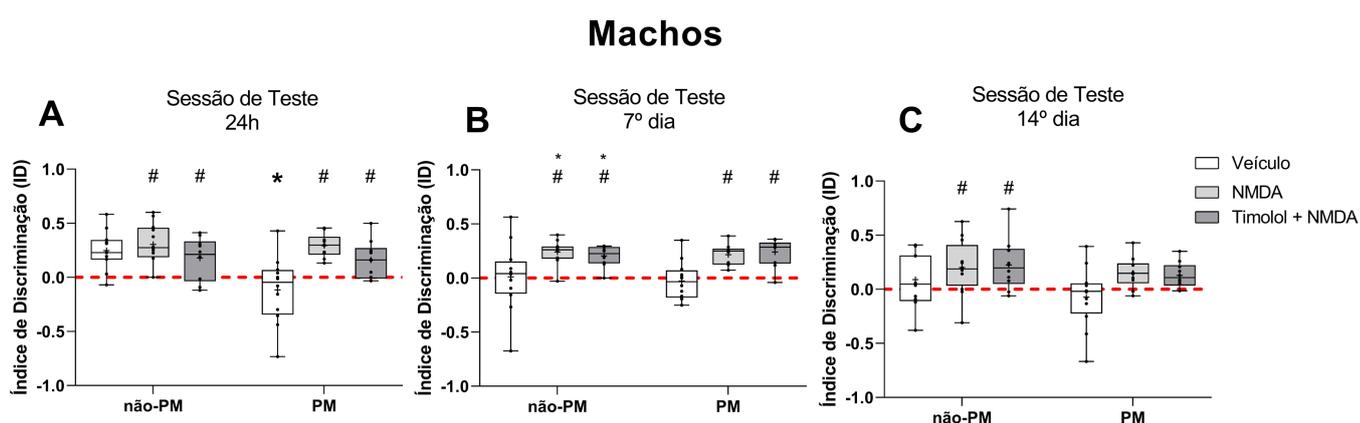
As ratas fêmeas do grupo Controle exploraram o objeto familiar e o objeto novo no dia 7 ( $t_{(12)} = 1,050$ ,  $P = 0,314$ ; objeto D; Figura 3C) e no dia 14 ( $t_{(12)} = 1,944$ ,  $P = 0,075$ ; objeto E; Fig. 19D) de forma semelhante, sugerindo um esquecimento fisiológico da memória de reconhecimento. As ratas fêmeas do grupo PM apresentaram o mesmo comportamento no 7º dia ( $t_{(10)} = 0,861$ ,  $P = 0,409$ ; objeto D; Figura 19C) e no 14º dia ( $t_{(10)} = 0,246$ ,  $P = 0,809$ ; objeto E; Fig. 19D). Por outro lado, as ratas fêmeas do grupo NMDA exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto no dia 7 ( $t_{(9)} = 4,402$ ,  $P = 0,001$ ; objeto D; Fig. 19C) e no dia 14 dia ( $t_{(9)} = 3,176$ ,  $P = 0,011$ ; objeto E; Fig. 19D), sugerindo persistência de memória. Além disso, as ratas do grupo PM + NMDA passaram mais tempo explorando o novo objeto no dia 7 ( $t_{(9)} = 4,379$ ,  $P = 0,001$ ; objeto D; Figura 19C) e no 14º dia de teste ( $t_{(9)} = 2,286$ ,  $P = 0,0481$ ; Figura 19D). Ratas fêmeas que receberam infusão de NMDA no locus coeruleus associada à infusão de Timolol no HD (grupos Timolol + NMDA e PM + Timolol + NMDA) após a sessão de aprendizagem exploraram significativamente mais de 50% do tempo total de exploração do novo objeto no dia 7 dia ( $t_{(11)} = 6,450$ ,  $P < 0,0001$  para grupo Timolol + NMDA;  $t_{(10)} = 5,456$ ,  $P = 0,0003$  para

grupo PM + Timolol + NMDA; Figura 19B) e 14º dia ( $t_{(11)} = 2,700$ ,  $P = 0,020$  para grupo Timolol + NMDA;  $t_{(10)} = 2,764$ ,  $P = 0,020$  para grupo PM + Timolol + NMDA; Figura 19B).

### 5.2.3 A PM reduz o ID em ratos machos, e a estimulação da via dopaminérgica LC-HD reverte o déficit de memória relacionado a PM e promove a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratos machos submetidos ou não à PM

Nós utilizamos o Índice de Discriminação (ID) de um novo objeto para comparar a memória dos diferentes grupos. Primeiramente, comparáramos os diferentes grupos intra-sexo, considerando machos e fêmeas separadamente.

Considerando a sessão de teste 24h, uma ANOVA de duas vias revelou efeito da condição (PM ou não PM) ( $F_{(1,60)} = 6,693$ ;  $P = 0,012$ ) e da infusão de droga (Veículo, NMDA ou Timolol + NMDA) ( $F_{(2, 60)} = 7,501$ ,  $P = 0,001$ ), com interação entre os fatores ( $F_{(2, 60)} = 5,650$ ,  $P = 0,005$ ) no ID de ratos machos. O teste de Tukey para múltiplas comparações revelou que os ratos machos PM tiveram um ID menor que o grupo Controle ( $q_{(60)} = 6,189$ ,  $P = 0,0007$ ; Figura 20A). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos NMDA e Timolol + NMDA quando comparados com o grupo Controle ( $P > 0,05$  para todos os grupos; Figura 4A). Por outro lado, os grupos PM + NMDA ( $q_{(60)} = 6,654$ ,  $P = 0,0001$ ; Figura 20A) e PM + Timolol + NMDA ( $q_{(60)} = 4,502$ ,  $P = 0,0267$ ; Figura 20A) tiveram maior ID do que o grupo PM.



**Figura 20. A PM reduz o ID em ratos machos, e a estimulação da via dopaminérgica LC-HD reverte o déficit de memória relacionado à PM e promove a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratos machos não-PM e PM. A – C. Índice de discriminação de objeto novo nos testes realizados 24h, 7 e 14 dias após o treinamento em ratos machos. n = 10 -**

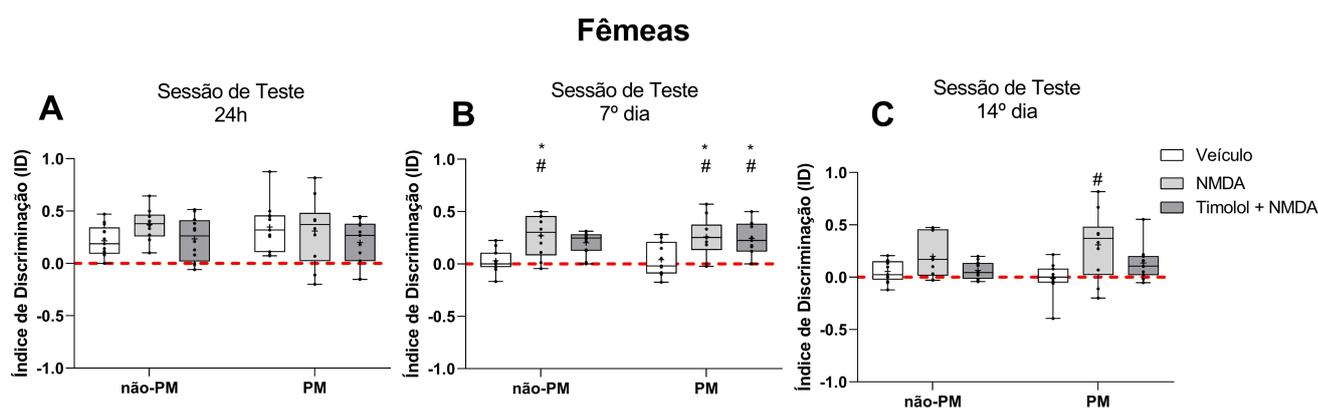
12/grupo; \*P < 0,05 no teste de comparações múltiplas de Tukey comparado ao grupo Controle. #P < 0,05 no teste de Tukey para múltiplas comparações em comparação ao grupo PM (Veículo). PM = ratos submetidos a privação maternal; NMDA = ácido N-metil-D-aspartico (agonista de NMDA); Timolol = maleato de timolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico); ID = Índice de Discriminação.

Na sessão de teste de reconhecimento de objetos realizada no 7º dia, a ANOVA de duas vias não revelou efeito da condição (PM ou não-PM) ( $F_{(1, 60)} = 0,035$ ;  $P = 0,850$ ). Porém, houve efeito da infusão de drogas (Veículo, NMDA ou Timolol + NMDA) ( $F_{(2, 60)} = 13,71$ ,  $P < 0,0001$ ), sem interação entre os fatores ( $F_{(2, 60)} = 0,276$ ,  $P = 0,759$ ) no ID de ratos machos. O teste de Tukey para múltiplas comparações revelou que os ratos machos PM não tiveram diferença estatisticamente significativa no ID em comparação ao grupo Controle ( $q_{(60)} = 0,748$ ,  $P = 0,994$ ; Figura 20B). Ratos machos do grupo NMDA e Timolol + NMDA tiveram ID maior que o grupo Controle ( $q_{(60)} = 4,565$ ,  $P = 0,023$ , para o grupo NMDA;  $q_{(60)} = 4,366$ ,  $P = 0,034$ , para o grupo Timolol + NMDA; Figura 20B). Da mesma forma, ratos machos do grupo PM + NMDA e PM + Timolol + NMDA tiveram um ID maior que o grupo PM ( $q_{(60)} = 4,611$ ,  $P = 0,021$ , para o grupo PM + NMDA;  $q_{(60)} = 5,079$ ,  $P = 0,008$ , para grupo PM + Timolol + NMDA; Figura 20B).

Na sessão de teste de 14º dia do reconhecimento de objetos, a ANOVA de duas vias não revelou efeito da condição (PM ou não-PM) ( $F_{(1, 60)} = 3,371$ ;  $P = 0,071$ ). No entanto, houve efeito da infusão de drogas (Veículo, NMDA ou Timolol + NMDA) ( $F_{(2, 60)} = 4,214$ ,  $P = 0,019$ ), sem interação entre os fatores ( $F_{(2, 60)} = 0,347$ ,  $P = 0,708$ ) no ID de ratos machos. O teste de Tukey para múltiplas comparações revelou que os ratos machos PM não tiveram diferença estatisticamente significativa no ID em comparação ao grupo controle ( $q_{(60)} = 1,975$ ,  $P = 0,502$ ; Figura 20C). Ratos machos dos grupos NMDA e Timolol + NMDA tiveram ID maior que o grupo PM ( $q_{(60)} = 4,199$ ,  $P = 0,046$ , para o grupo NMDA;  $q_{(60)} = 4,340$ ,  $P = 0,036$  para o grupo Timolol + NMDA; Figura 20C).

#### 5.2.4 Ratas fêmeas são resilientes aos efeitos da PM na memória de reconhecimento de objetos; a estimulação da via dopaminérgica LC-HD promove a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratas submetidas ou não à PM

Na sessão de teste de reconhecimento de objetos realizada 24 horas após o treino (consolidação), a ANOVA de duas vias não revelou efeito da condição (PM ou não PM) ( $F_{(1, 61)} = 0,054$ ;  $P = 0,816$ ) ou da infusão de drogas (Veículo, NMDA ou Timolol + NMDA) ( $F_{(2, 61)} = 1,719$ ,  $P = 0,187$ ), mas sim interação entre os fatores ( $F_{(2, 61)} = 1,317$ ,  $P = 0,027$ ) no ID de ratas fêmeas. O teste de Tukey para múltiplas comparações não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P > 0,05$  para todos os grupos; Figura 21A).



**Figura 21. Ratas fêmeas são resilientes à PM; a estimulação da via dopaminérgica LC-HD promove a persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratas fêmeas PM e não-PM. A – C.** Índice de discriminação de objeto novo nos testes realizados 24h, 7 e 14 dias após a sessão de treino em ratas fêmeas.  $n = 10 - 13$ /grupo; \* $P < 0,05$  no teste de Tukey para múltiplas comparações em comparação ao grupo controle. # $P < 0,05$  no teste de Tukey para múltiplas comparações em comparação ao grupo PM (Veículo). PM = ratas submetidas a privação maternal; NMDA = ácido N-metil-D-aspartático (agonista de NMDA); Timolol = maleato de timolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico); ID = Índice de Discriminação.

Na sessão de teste de reconhecimento de objetos realizada no 7º dia, uma ANOVA de duas vias não revelou efeito da condição (PM ou não-PM) ( $F_{(1, 61)} = 0,1464$ ,  $P = 0,703$ ), mas sim da infusão de drogas (Veículo, NMDA ou Timolol + NMDA) ( $F_{(2, 61)} = 14,98$ ,  $P < 0,0001$ ), sem interação entre fatores ( $F_{(2, 61)} = 0,1504$ ,  $P = 0,860$ ) em ratas. O teste de Tukey para múltiplas comparações revelou que as ratas PM não

apresentaram diferença significativa no ID em comparação ao grupo Controle ( $q_{(61)} = 0,265$ ,  $P > 0,999$ ; Figura 21B). O grupo NMDA apresentou maior ID quando comparado ao grupo Controle ( $q_{(61)} = 5,569$ ,  $P = 0,004$ ; Figura 21B). Houve diferença no ID entre o grupo PM e o grupo PM + NMDA ( $q_{(61)} = 4,712$ ,  $P = 0,017$ ; Figura 21B) e o grupo PM e o grupo PM + Timolol + NMDA ( $q_{(61)} = 4,466$ ,  $P = 0,028$ ; Figura 21B).

Na sessão de teste realizadas com as ratas 14 dias após o treino de reconhecimento de objetos, a ANOVA de duas vias não revelou nenhum efeito da condição (PM ou não PM) ( $F_{(1, 61)} = 0,775$ ,  $P = 0,392$ ; Fig. 21C), mas revelou um efeito da infusão da droga (Veículo, NMDA ou Timolol + NMDA) ( $F_{(2, 61)} = 9,357$ ,  $P = 0,0003$ ; Fig. 21C), sem interação entre os fatores ( $F_{(2, 61)} = 1,501$ ,  $P = 0,230$ ; Figura 21C). O teste de Tukey para múltiplas comparações revelou que as ratas PM não apresentaram diferenças em comparação ao grupo Controle ( $q_{(61)} = 1,266$ ,  $P = 0,946$ ; Figura 21C). O grupo PM + NMDA apresentou maior ID quando comparado ao grupo PM ( $q_{(61)} = 5,796$ ,  $P = 0,001$ ; Figura 21C).

#### 5.2.5 A PM não promove alterações no comportamento locomotor e/ou exploratório; a infusão de drogas não induz ansiedade

A PM ou Infusão de drogas (HD e/ou locus coeruleus) não causou alterações tempo gasto nos braços fechados no teste LCE ( $P > 0,05$  na comparação de todos os grupos; Tabela 6). A ANOVA de duas vias revelou um efeito da condição (PM ou não-PM) ( $F_{(1, 60)} = 0,02504$ ;  $P = 0,8748$ ), mas não revelou efeito da infusão de drogas (Salina ou NMDA) em ratas fêmeas. O teste de Tukey para múltiplas comparações não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P > 0,05$  para todas as comparações entre os grupos).

**Tabela 6.** A PM ou a infusão de drogas não alteram o comportamento do tipo ansioso no labirinto em cruz elevado (LCE) ( $P > 0,05$ ; ANOVA de duas vias). Os dados são expressos como média e desvio padrão ( $n = 10-13$ /grupo).

	Controle	NMDA	Timolol + NMDA	PM	PM + NMDA	PM + Timolol + NMDA	Condição (PM ou não-PM) <i>F</i> (DFn. DFd); Valor de <i>P</i>	Infusão da droga <i>F</i> (DFn. DFd); Valor de <i>P</i>
Tempo gasto nos braços fechados (s)								
<i>Machos</i>	158,9 ± 63,5	187,3 ± 59,3	163,8 ± 57,6	172,8 ± 56,9	163,4 ± 47,5	118,3 ± 50,9	<i>F</i> (1, 60) = 1,752 <i>P</i> = 0,1906	<i>F</i> (2, 60) = 2,028 <i>P</i> = 0,1405
<i>Fêmeas</i>	203,5 ± 53,4	210,8 ± 48,9	210,8 ± 48,9	190,6 ± 57,0	193,5 ± 56,2	220,8 ± 60,8	<i>F</i> (1, 61) = 0,2450 <i>P</i> = 0,6225	<i>F</i> (2, 61) = 0,6883 <i>P</i> = 0,5064
Número de entradas nos braços fechados (n)								
<i>Machos</i>	8,2 ± 3,3	8,5 ± 3,8	7 ± 4,02	8,9 ± 2,9	7,3 ± 2,1	8 ± 3,01	<i>F</i> (1, 60) = 0,02504 <i>P</i> = 0,8748	<i>F</i> (2, 60) = 0,6152 <i>P</i> = 0,5439
<i>Fêmeas</i>	9,2 ± 3,8	7 ± 3,6	9,25 ± 3,01	9,09 ± 2,7	10,2 ± 1,8	8,3 ± 2,9	<i>F</i> (1, 61) = 0,9111 <i>P</i> = 0,3436	<i>F</i> (2, 61) = 0,1863 <i>P</i> = 0,8305

Em relação ao tempo total de exploração dos dois objetos, a ANOVA de duas vias não revelou efeito da condição (PM vs não PM) no tempo total de exploração na tarefa de reconhecimento de objetos ( $P > 0,05$  em todas as sessões e comparação de grupos; Tabela 7), mas revelou um efeito da infusão de drogas (Salina vs NMDA vs Timolol + NMDA) em machos no tempo total de exploração no teste 24h ( $F_{(2, 60)} = 3,797$ ;  $P = 0,0280$ ) e no teste de 7º dia ( $F_{(2, 60)} = 3,919$ ;  $P = 0,0251$ ). Contudo, o teste de Tukey para múltiplas comparações não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P > 0,05$  para todas as comparações; Tabela 7).

**Tabela 7.** A PM ou a infusão de drogas não alterou a Atividade exploratória na tarefa de reconhecimento de objetos (RO) ( $P > 0,05$ ; ANOVA de duas vias). Os dados são expressos em média e desvio padrão ( $n = 8-12$ /grupo).

Sessão	Controle	NMDA	Timolol + NMDA	PM	PM + NMDA	PM + Timolol + NMDA	Condição (PM ou não-PM) $F (DFn, DFd)$ ; Valor de $P$	Infusão de droga $F (DFn, DFd)$ ; Valor de $P$	
Treino									
	Tempo total de exploração (s)								
	<i>Machos</i>	57,5 ± 14,5	54,7 ± 15,7	51,3 ± 21,1	54,08 ± 16,0	43,9 ± 11,6	56 ± 13,2	$F_{(1, 60)} = 0,6782$ ; $P = 0,4135$	$F_{(2, 60)} = 0,9989$ ; $P = 0,3743$
	<i>Fêmeas</i>	57,3 ± 21,0	40,6 ± 19,0	48,6 ± 22,1	35,5 ± 24,6	42,1 ± 15,1	44,7 ± 13,8	$F_{(1, 61)} = 2,792$ ; $P = 0,0998$	$F_{(2, 61)} = 0,4901$ ; $P = 0,6149$
Teste 24h									
	Tempo total de exploração (s)								
	<i>Machos</i>	53 ± 14,6	42,9 ± 18,1	39 ± 16,9	53,3 ± 20,4	48,3 ± 14,7	38 ± 19,7	$F_{(1, 60)} = 0,1302$ ; $P = 0,7194$	$F_{(2, 60)} = 3,797$ ; $P = 0,0280^*$
	<i>Fêmeas</i>	47,8 ± 24,3	41,5 ± 30,4	42,7 ± 18,5	44,0 ± 15,2	34,6 ± 17,7	39,4 ± 17,2	$F_{(1, 61)} = 0,8148$ ; $P = 0,3702$	$F_{(2, 61)} = 0,7892$ ; $P = 0,4587$

---



---

Teste 7°

dia

Tempo  
total de  
exploração  
(s)

<i>Machos</i>	49,8 ± 8,1	35,08 ± 13,5	39,6 ± 11,6	46,75 ± 16,1	47,4 ± 11,7	36,7 ± 11,3	F (1, 60) = 0,4729; P = 0,4943	F (2, 60) = 3,919; P = 0,0251*
<i>Fêmeas</i>	49,1 ± 22,6	46,3 ± 25,8	47,5 ± 17,02	57,1 ± 18,4	47,01 ± 23,3	45,8 ± 21,7	F (1, 61) = 0,1980; P = 0,6579	F (2, 61) = 0,7050; P = 0,4980

Teste  
14° dia

Tempo  
total de  
exploração  
(s)

<i>Machos</i>	45,3 ± 20,9	43,75 ± 23,6	41,4 ± 20,2	41,8 ± 18,5	45,9 ± 8,9	54,5 ± 9,7	F (1, 60) = 0,7504; P = 0,3898	F (2, 60) = 0,3230; P = 0,7252
<i>Fêmeas</i>	51,07 ± 22,1	52,3 ± 20,7	51,9 ± 13,9	52,8 ± 11,7	39,4 ± 12,8	53,4 ± 19,35	F (1, 61) = 0,5737; P = 0,4517	F (2, 61) = 0,9881; P = 0,3781

---

\*Teste de Tukey para múltiplas comparações não revelou diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos (P > 0,05 para comparação entre todos os grupos).

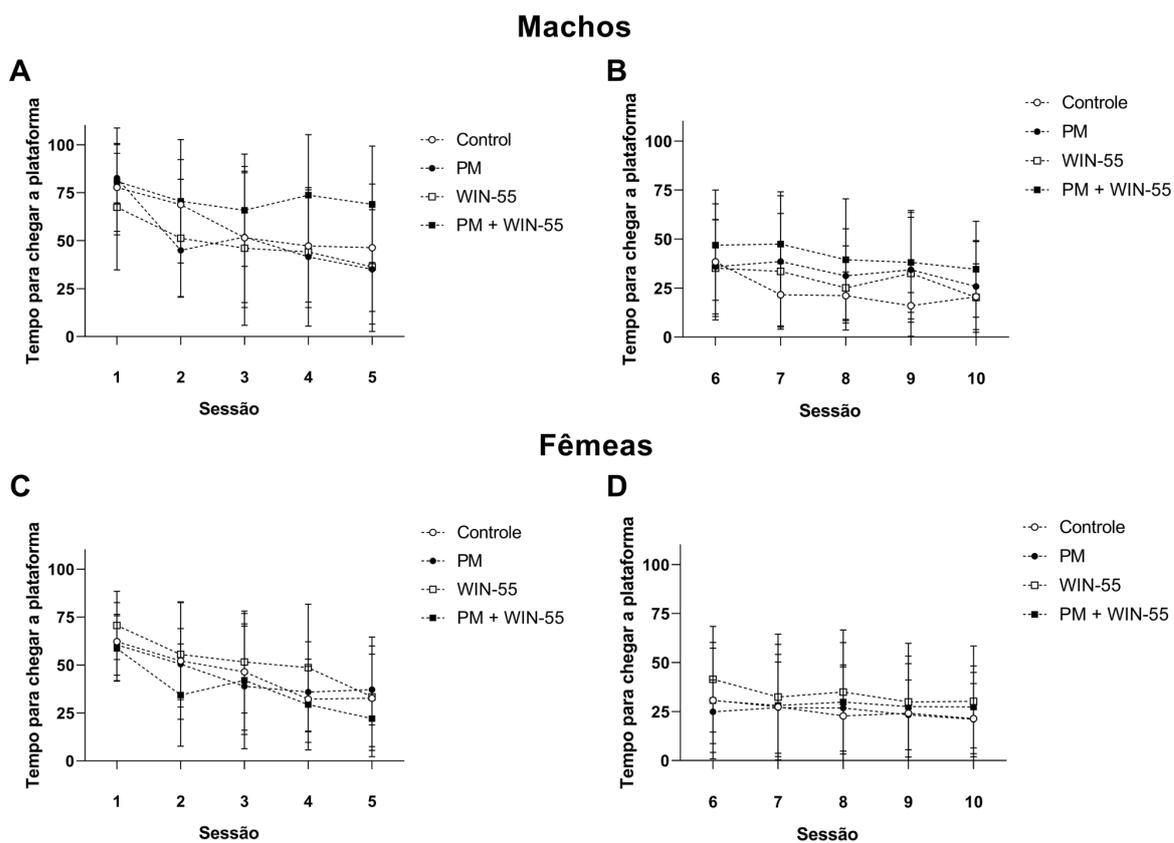
### 5.3 Estudo 3

5.3.1 A PM não influencia aquisição da memória espacial, mas prejudica a memória espacial de camundongos; a infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores endocanabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2) prejudica a aprendizagem espacial de camundongos machos, mas não de fêmeas

Para investigar se a manipulação do sistema endocanabinóide modula a aquisição da memória espacial, nós realizamos a infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores endocanabinóide do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2), o WIN-55, ou salina, 15 minutos antes de cada sessão de treinamento (formada por 4 *trials* de no máximo 100 segundos, com 15 minutos de intervalo entre os *trials*). Nós utilizamos a ANOVA de medidas repetidas para comparação intragrupos ao longo do tempo.

Primeiro, nós fizemos a comparação do tempo para chegar à plataforma entre o primeiro e a quinta dia de treinamento; e entre o sexto e o décimo dia de treinamento.

Em relação aos camundongos machos, a ANOVA de medidas repetidas não revelou efeito dos diferentes grupos ( $F_{(3, 30)} = 1,412$ ;  $P = 0,258$ ). Porém, houve efeito do tempo ( $F_{(2,615, 78,56)} = 12,34$ ;  $P < 0,0001$ ), sem a interação entre os fatores ( $F_{(12, 120)} = 1,226$ ;  $P = 0,273$ ; Figura 22A) no tempo para encontrar a plataforma entre o primeiro e o quinto dia de treinamento. O teste de Tukey para múltiplas comparações não revelou diferença estatisticamente significativa intra-grupos. Além disso, a ANOVA de medidas repetidas não revelou efeito dos diferentes grupos ( $F_{(3, 30)} = 0,9198$ ;  $P = 0,4432$ ). Porém, houve efeito do tempo ( $F_{(2,663, 79,88)} = 5,089$ ,  $P = 0,0040$ ), sem a interação entre os fatores ( $F_{(12, 120)} = 0,7733$ ;  $P = 0,6767$ ; Figura 22B) no tempo para encontrar a plataforma entre o primeiro e o quinto dia de treinamento. O teste de Tukey para múltiplas comparações não revelou diferença estatisticamente significativa intra-grupos.



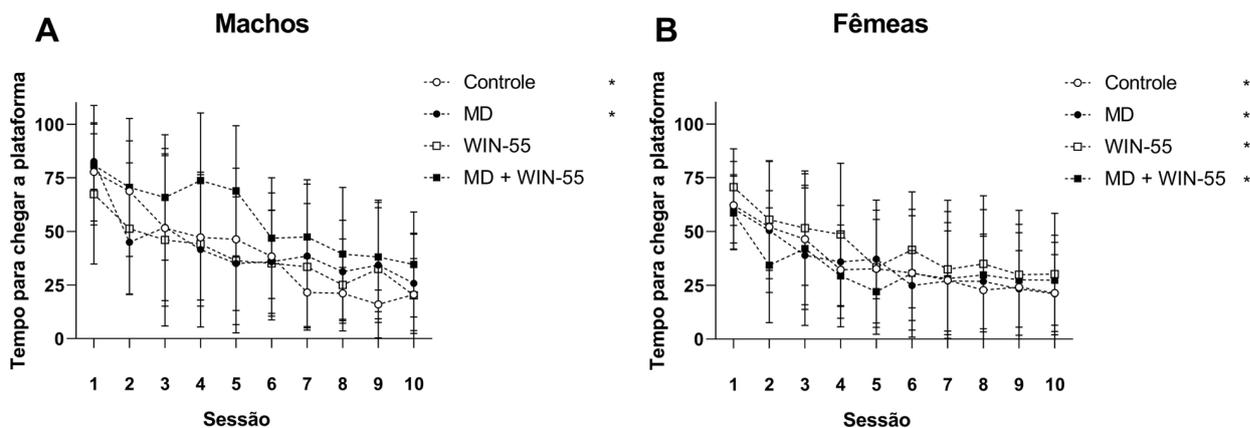
**Figura 22.** Efeito da infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores canabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2) na aquisição espacial de camundongos machos e fêmeas PM e não-PM, na primeira e na segunda semana de treinamento. Tempo gasto para achar a plataforma ao longo de 10 dias de treinamento no labirinto aquático de Morris (LAM). Diferença estatisticamente significativa foram observadas entre a 1<sup>a</sup> e a 5<sup>a</sup>; e entre a 6<sup>a</sup> e a 10<sup>a</sup> sessão (\*  $P < 0,05$ )

Em relação aos camundongas fêmeas, a ANOVA de medidas repetidas não revelou efeito dos diferentes grupos ( $F_{(3, 39)} = 1,316$ ;  $P = 0,2828$ ). Porém, houve efeito do tempo ( $F_{(3,282, 128,0)} = 16,14$ ;  $P < 0,0001$ ), ou a interação entre os fatores ( $F_{(12, 156)} = 0,5552$ ;  $P = 0,8748$ ; Figura 22C) no tempo para encontrar a plataforma. Além disso, a ANOVA de medidas repetidas não revelou efeito dos diferentes grupos ( $F_{(3, 39)} = 0,3721$ ;  $P = 0,7736$ ). Não houve efeito do tempo ( $F_{(2,821, 110,0)} = 1,497$ ;  $P = 0,2213$ ), e nem houve a interação entre os fatores ( $F_{(12, 156)} = 0,2996$ ;  $P = 0,9887$ ; Figura 22D) no tempo para encontrar a plataforma entre o primeiro e o quinto dia de treinamento. O teste de Tukey para múltiplas comparações não revelou diferença estatisticamente significativa intra-grupos.

Posteriormente, nós fizemos a comparação do tempo para chegar à plataforma entre o primeiro e o décimo dia de treinamento.

Em relação aos camundongos machos, a ANOVA de medidas repetidas não revelou efeito dos diferentes grupos ( $F_{(3, 30)} = 1,068$ ;  $P = 0,337$ ). Porém, houve efeito do tempo ( $F_{(1.991, 59.72)} = 26,70$ ,  $P < 0,0001$ ), sem interação entre os fatores ( $F_{(27, 270)} = 1,314$ ,  $P = 0,142$ ) no tempo para encontrar a plataforma.

Como esperado, os camundongos machos do grupo Controle levaram menos tempo para chegar na plataforma na 10ª sessão de treinamento do que na 1ª sessão ( $q_{(7)} = 12,40$ ;  $P = 0,0009$ ; Figura 19A), sugerindo uma aquisição da memória espacial preservada. Animais do grupo PM também levaram menos tempo para encontrar a plataforma na 10ª sessão de treinamento do que na 1ª sessão ( $q_{(9)} = 11,37$ ;  $P = 0,005$ ; Figura 22A), sugerindo que a PM não é capaz de induzir déficit de aquisição da memória espacial em camundongos machos. Por outro lado, camundongos machos que receberam a infusão intraperitoneal do WIN-55 tiveram déficit de aquisição da memória espacial ( $q_{(7)} = 5,5520$ ;  $P = 0,0806$ , para o grupo WIN-55;  $q_{(7)} = 5,303$ ;  $P = 0,0984$ , para o grupo PM+WN-55; Figura 23A).



**Figura 23. Efeito da infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores canabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2) na aquisição espacial de camundongos machos e fêmeas PM e não-PM, ao longo de todo o treinamento. A e B.** Tempo gasto para achar a plataforma ao longo de 10 dias de treinamento no labirinto aquático de Morris (LAM). Diferença estatisticamente significativa foram observadas entre a 1ª e a 10ª sessão (\*  $P < 0,05$ )

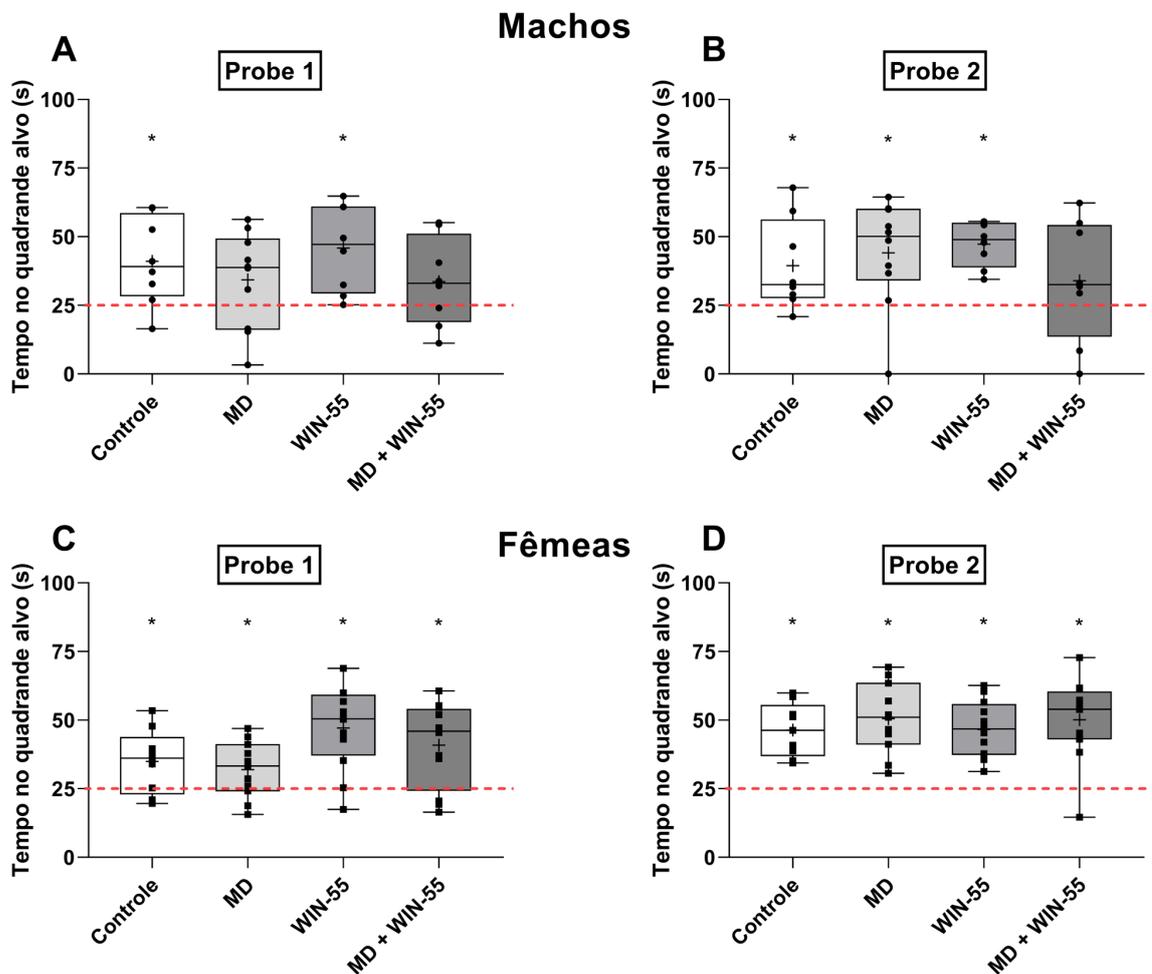
Em relação aos camundongos fêmeas, a ANOVA de medidas repetidas não revelou efeito dos diferentes grupos ( $F_{(3, 39)} = 0,629$ ;  $P = 0,600$ ). Porém, houve efeito do tempo ( $F_{(2.384, 92.98)} = 18,64$ ,  $P < 0,0001$ ), sem interação entre os fatores ( $F_{(27, 351)} = 0,633$ ,  $P = 0,923$ ) no tempo para encontrar a plataforma.

Os camundongos fêmeas de todos os grupos levaram menos tempo para achar a plataforma na 10ª sessão de treinamento do que na 1ª sessão ( $q_{(9)} = 6,817$ ;  $P = 0,0183$ , para o grupo Controle;  $q_{(9)} = 65142$ ;  $P = 0,0342$ , para o grupo PM;  $q_{(11)} = 7,179$ ;  $P = 0,0082$ , para o grupo WIN-55; e  $q_{(10)} = 6,245$ ;  $P = 0,0260$ ; Figura 23B), sugerindo preservada aquisição da memória espacial.

Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que a PM não é capaz de induzir o déficit de aprendizagem espacial em camundongos machos e fêmeas. Por outro lado, a modulação do sistema endocanabinóide é capaz de levar a um prejuízo da aprendizagem espacial de camundongos machos, submetidos ou não a PM, efeito não observado em camundongos fêmeas.

Nós testamos a memória espacial de camundongos machos e fêmeas antes da 6ª sessão (*Teste 1*) e dois dias após a 10ª sessão de aprendizagem (*Teste 2*). O tempo total de cada *Teste* foi de 100 segundos. Utilizamos o Teste-t de uma amostra para comparar o percentual de tempo de permanência no quadrante alvo (onde antes estava a plataforma) de cada grupo com uma média teórica de 25%.

Camundongos machos do grupo Controle permanecem significativamente mais tempo no quadrante alvo quando comparado com a média teórica de 25% ( $t_{(7)} = 2,845$ ,  $P = 0,0249$ ; Figura 24A). Por outro lado, a porcentagem de tempo que o grupo PM permanece no quadrante alvo não difere de 25% ( $t_{(9)} = 1,669$ ,  $P = 0,1294$ ; Figura 24A). Camundongos machos do grupo WIN-55 passaram mais tempo do quadrante alvo ( $t_{(7)} = 3,755$ ,  $P = 0,0071$ ; Figura 23A). Já para o grupo PM + WIN-55, a porcentagem de tempo no quadrante alvo não difere de 25% ( $t_{(7)} = 1,517$ ,  $P = 0,1731$ ; Figura 24A).



**Figura 24.** Efeito da PM e da infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores endocanabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2), o WIN-55, na memória espacial de camundongos machos e fêmeas. **A – D.** Tempo de permanência no quadrante alvo comparado com uma média teórica de 25%. \*  $P < 0,05$  para comparação com uma média teórica de 25% pelo Test t de uma amostra).

No *Teste 2*, camundongos machos do grupo Controle, PM e WIN-55 passaram uma porcentagem de tempo maior no quadrante alvo quando comparado com uma média teórica de 25% ( $t_{(7)} = 2,452$ ,  $P = 0,0440$ , para o grupo Controle;  $t_{(9)} = 3,108$ ,  $P = 0,0126$ , para o grupo PM; e  $t_{(7)} = 7,756$ ,  $P = 0,0001$ , para o grupo WIN-55; Figura 24B). Por outro lado, camundongos machos do grupo PM + WIN-55 permanecem por um tempo similar a 25% no quadrante alvo ( $t_{(7)} = 1,155$ ,  $P = 0,2861$ ; Figura 24A)

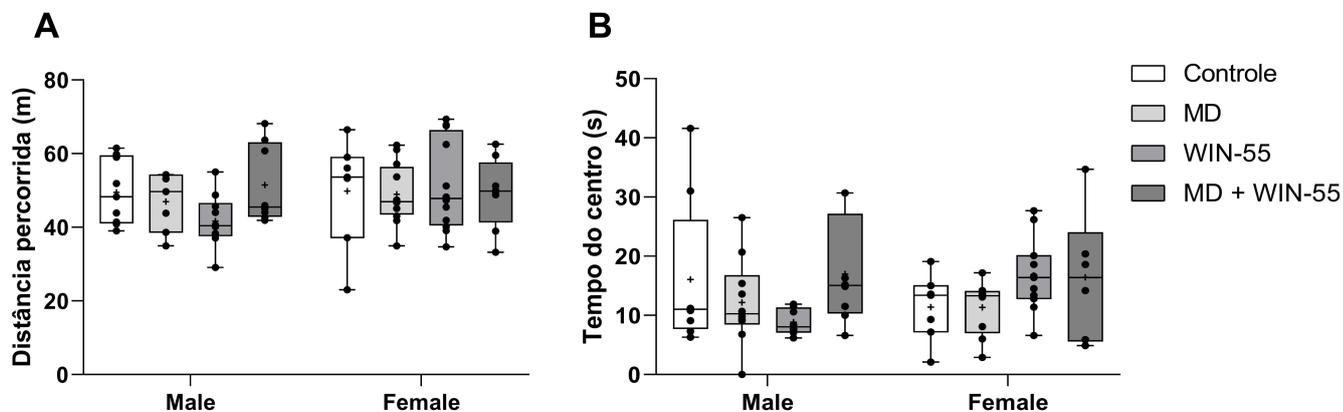
No *Teste 1*, camundongos fêmeas de todos os grupos permaneceram mais de 25% do tempo total no quadrante alvo ( $t_{(8)} = 2,590$ ;  $P = 0,0321$ , para o grupo Controle;

$t_{(10)} = 2,250$ ;  $P = 0,0481$ , para o grupo PM;  $t_{(11)} = 5,130$ ;  $P = 0,0003$ , para o grupo WIN-55;  $t_{(11)} = 3,646$ ;  $P = 0,0039$ , para o grupo PM+WIN-55; Figura 24C).

Resultados semelhantes foram observados no *Teste 2*, onde camundongas fêmeas de todos os grupos permaneceram uma porcentagem de tempo maior do que 25% do tempo total no quadrante alvo ( $t_{(8)} = 6,660$ ;  $P = 0,0002$ , para o grupo Controle;  $t_{(10)} = 6,634$ ;  $P < 0,0001$ , para o grupo PM;  $t_{(11)} = 7,359$ ;  $P < 0,0001$ , para o grupo WIN-55;  $t_{(11)} = 5,889$ ;  $P < 0,0001$ , para o grupo PM+WIN-55; Figura 24C).

5.3.2 A PM e a manipulação do sistema endocanabinóide não afeta a atividade locomotora e exploratória, e nem induz o comportamento do tipo ansioso em camundongos machos e fêmeas

Considerando a distância percorrida na tarefa de CA, uma ANOVA de três vias não revelou efeito da PM ( $F_{(1, 65)} = 0,2066$ ;  $P = 0,6509$ ), da infusão das drogas ( $F_{(1, 65)} = 0,02414$ ,  $P = 0,8770$ ) ou do sexo ( $F_{(1, 65)} = 0,9912$ ,  $P=0,3231$ ) (Figura 25).



**Figura 25. A PM e a infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores canabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2), O WIN-55, não afetam a atividade locomotora e exploratória ou o comportamento tipo ansioso de camundongos machos e fêmeas. A.** Distância percorrida durante 10 minutos da tarefa de campo aberto (CA) **B.** Tempo gasto no centro do aparato de CA.

Também não foi verificado efeito da PM ( $F_{(1, 59)} = 0,2569$ ,  $P = 0,6142$ ), da infusão de droga ( $F_{(1, 59)} = 1,067$ ,  $P=0,3058$ ) ou do sexo ( $F_{(1, 59)} = 0,05768$ ,  $P=0,8110$ ) no tempo de permanência no centro do CA (Figura 25B).

No teste de LCE, a ANOVA de três vias não revelou efeito da PM ( $F_{(1, 56)} = 0,2512$ ;  $P=0,6182$ ), da infusão de droga ( $F_{(1, 56)} = 2,509$ ,  $P=0,1188$ ), ou do sexo ( $F_{(1, 56)} = 1,749$ ;  $P=0,1914$ ) no tempo de permanência nos braços fechados (Figura 26).

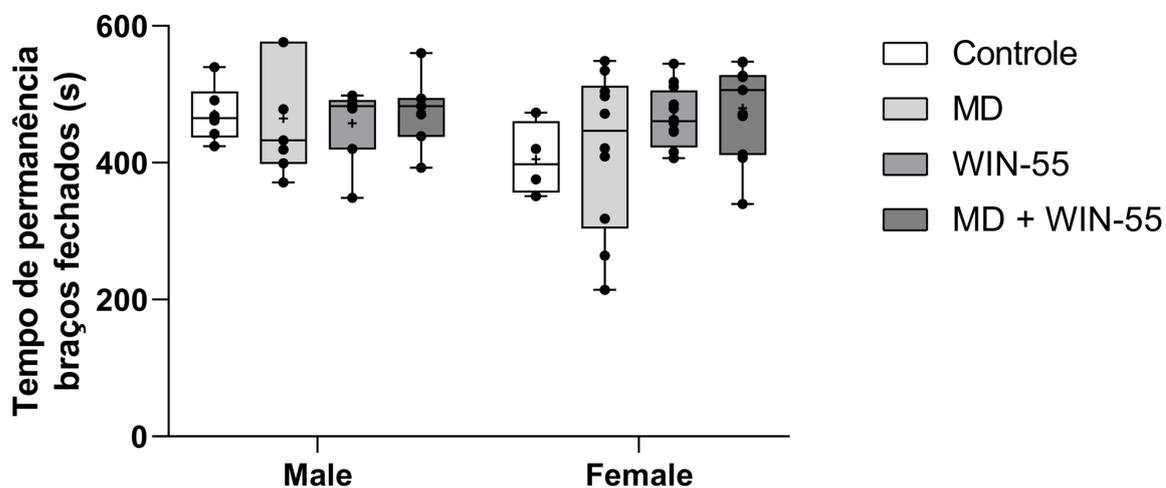


Figura 26. A PM e a infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores canabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB1/CB2), O WIN-55, não alteram o comportamento do tipo ansioso de camundongos machos e fêmeas. Tempo de permanência nos braços fechados ao longo de 10 minutos.

## 6 DISCUSSÃO

No primeiro estudo que compõe esta tese, nós examinamos os efeitos da privação maternal (PM) na memória de reconhecimento e a modulação da memória pela área tegmental ventral (ATV) em ratos machos e fêmeas, usando uma estratégia farmacológica para estimular os neurônios área tegmental ventral imediatamente após o aprendizado. Uma das novidades que demonstramos nesse estudo é que ratos machos parecem mais suscetíveis ao estresse da PM, apresentando um déficit de memória de reconhecimento de objetos durante a idade adulta. Em contraste, as ratas parecem ser mais resistentes ao estresse no início da vida, uma vez que não demonstram déficits detectáveis de memória reconhecimento de objetos na vida adulta. Outra novidade do primeiro estudo é que a infusão de um agonista do receptor glutamatérgico tipo NMDA na área tegmental ventral reverte os déficits de memória induzidos pela PM em ratos machos e promove a persistência da memória tanto em machos quanto em fêmeas.

No segundo estudo desta tese, nós confirmamos os efeitos da PM na memória de reconhecimento de objetos (RO). Também confirmamos que as ratas parecem ser mais resistentes ao estresse no início da vida, uma vez que a PM não afetou a consolidação da memória de longa duração (MLD). A principal diferença entre este e o primeiro estudo da tese é que no segundo estudo nós investigamos o papel modulatório da memória de reconhecimento de objetos do sistema dopaminérgico da via *Locus Coeruleus* (LC)-HD. Verificamos que a estimulação da via dopaminérgica LC-HD é capaz de reverter o déficit de memória induzido pela PM, além de promover a persistência da memória em ratos fêmeas e machos PM e não-PM.

Por fim, no terceiro estudo investigamos se o mesmo protocolo de PM utilizado em ratos também induz déficit de memória em camundongos machos e fêmeas. Além disso, investigamos se a infusão intraperitoneal de um agonista não seletivo dos receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) e do tipo 2 (CB2), o WIN-55, é capaz de modular a memória espacial de camundongos. Corroborando com os primeiros dois estudos em ratos, mostramos que a PM induziu um déficit de memória espacial em camundongos machos no primeiro teste (*Teste 1*). Por outro lado, camundongos fêmeas não apresentaram tal déficit de memória (*Teste 1*). No segundo teste, machos e fêmeas PM e não-PM infundidos com salina demonstraram memória da tarefa.

Curiosamente, nós demonstramos que a manipulação do sistema endocanabinóide não tem efeitos em camundongos machos e fêmeas não-PM, mas piora a memória de camundongos machos submetidos a PM tanto no *Teste 1* quanto no *Teste 2*, sugerindo em efeito somatório da PM e da estimulação dos receptores CB1/CB2. Além disso, camundongos fêmeas PM infundidas com WIN-55 não apresentam déficit de memória espacial no *Teste 1* e *Teste 2*.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado o impacto do estresse no início da vida em diferentes tipos de memória (Carrazoni *et al.*, 2023; Menezes *et al.*, 2017, 2020; Neves *et al.*, 2015, 2020; Sosa *et al.*, 2019). Recentemente, nós demonstramos que a PM leva a um déficit de memória reconhecimento de objetos em ratos machos que persiste na idade adulta (Menezes *et al.*, 2020; Neves *et al.*, 2020). Apesar dos efeitos da PM serem descritos na literatura científica há alguns anos, a maioria desses estudos se propõe a discutir esses efeitos em animais (ratos ou camundongos) machos (Benetti *et al.*, 2009; Neves *et al.*, 2015, 2020). Os estudos que utilizam animais fêmeas são poucos (Carrazoni *et al.*, 2023; Oomen *et al.*, 2011). Dessa forma, os resultados da nossa tese contribuem para esse aspecto, uma vez que nós demonstramos que ratas fêmeas adultas não apresentam déficit de memória reconhecimento de objetos induzido pela PM. Nossos dados sugerem que ratas podem ser resilientes ao estresse no início da vida. Curiosamente, dados recentes do nosso grupo demonstram que ratas pré-púberes (DPN-22) submetidas ao mesmo protocolo de PM apresentavam déficit de memória reconhecimento de objetos (Carrazoni *et al.*, 2023).

Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que na puberdade e/ou em uma fase posterior, uma mudança na plasticidade cerebral em ratas pode reverter os déficits de memória de reconhecimento relacionados à PM. Sabe-se que os hormônios sexuais, como o estrogênio e a progesterona, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de estruturas neurais relacionadas à consolidação e persistência da memória, como o hipocampo (Lupu; Cediél Ulloa; Rüegg, 2023). Como o estrogênio e a progesterona influenciam a proliferação, diferenciação e crescimento dendrítico das células do hipocampo (He, 2022; Lupu; Cediél Ulloa; Rüegg, 2023), é possível que a ação desses hormônios possa ser um fator para que o déficit de memória relacionado à PM observado nas ratas mais jovens não persista na vida adulta.

Sabendo que o hormônio circulante no momento da aquisição de uma informação ou na evocação de uma memória pode influenciar no resultado, uma limitação a ser considerada é que é que nós optamos por não fazer o controle do ciclo estral em ratas e camundongos fêmeas. A manipulação frequente desses animais (durante as sessões de treino e testes) para a dosagem direta ou indireta de hormônios poderia atuar como um fator estressor, podendo distorcer os resultados obtidos, uma vez que hormônios relacionados ao estresse também têm impacto sobre a consolidação e evocação da memória (de Quervain; Margraf, 2008; De Quervain; Schwabe; Roozendaal, 2016). Outra questão importante a ser levantada é que hormônios gonadais masculinos também têm impacto em processos mnemônicos (Wagner *et al.*, 2018), porém a flutuação dos níveis plasmáticos desses hormônios não são é considerada em pesquisas que utilizam somente machos para avaliar a memória. Apesar disso, nossos resultados abrem uma janela de oportunidades para a investigação dos efeitos de hormônios gonadais masculinos e femininos nos déficits de memória e/ou na resiliência ao estresse no início da vida.

A consolidação da memória de longa duração envolve a ativação direta de receptores glutamatérgicos no hipocampo (Izquierdo *et al.*, 2006). No entrando, outros sistemas neurotransmissores vêm sendo investigados como moduladores do processo de consolidação da memória de longa duração (Benetti *et al.*, 2009, 2012b; McNamara *et al.*, 2014; Neves *et al.*, 2020). O sistema dopaminérgico hipocampal tem um importante efeito modulador da memória (McNamara *et al.*, 2014). A ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D1 leva ao aumento do BDNF no hipocampo (Williams; Undieh, 2009), uma proteína crucial na plasticidade neural necessária para o armazenamento da memória de longa duração (Bekinschtein *et al.*, 2007). Em um estudo recente, nós demonstramos que a estimulação de receptor dopaminérgicos do tipo D1 no hipocampo promove a persistência da memória de longa duração de reconhecimento de objetos por no mínimo 21 dias após a aprendizagem (Neves *et al.*, 2020). Além disso, nesse mesmo estudo, demonstramos que essa manipulação farmacológica imediatamente após a sessão de aprendizagem reverte o déficit de memória relacionado à PM em ratos machos, promovendo a melhora da memória reconhecimento de objetos (Neves *et al.*, 2020). Assim, já demonstramos que a manipulação do sistema dopaminérgico do hipocampo melhora a memória em ratos machos com PM (Neves *et al.*, 2020).

Dados prévios apoiam a ideia de que o sistema dopaminérgico é crucial para a consolidação e persistência da memória de longa duração (McNamara *et al.*, 2014; Yamasaki; Takeuchi, 2017). Além disso, apresentamos evidências reforçadoras de que a PM afeta o processo de aprendizagem, pelo menos em ratos machos, provavelmente envolvendo alterações no funcionamento do sistema dopaminérgico (Mahmoodkhani *et al.*, 2022; Majcher-Maślanka *et al.*, 2017). Uma questão que ainda permanece pouco explorada é se outras estruturas encefálicas com projeções dopaminérgicas para o HIPOCAMPO - além da área tegmental ventral (Han *et al.*, 2020; Lisman; Grace, 2005), o locus coeruleus, por exemplo (Kempadoo *et al.*, 2016; Yamasaki; Takeuchi, 2017), podem ser afetadas estrutural e/ou funcionalmente pela a PM. Em animais adultos, o estresse crônico leva à perda de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral e no hipotálamo (Sugama; Kakinuma, 2016). Nesse sentido, é provável que o estresse crônico no início da vida, como o induzido pela PM, afete o desenvolvimento da área tegmental ventral e induza alterações em longo prazo. Assim, com base em estratégias farmacológicas, nós decidimos investigar os efeitos da estimulação dessas duas estruturas encefálicas.

Conforme relatado, no primeiro estudo verificamos que a estimulação farmacológica da área tegmental ventral reverte os déficits de memória induzidos pela PM em ratos machos e que a infusão de NMDA na área tegmental ventral promove a persistência da memória reconhecimento de objetos por até 14 dias após o aprendizado nos animais controle e PM, tanto em ratos machos quanto fêmeas. Esses dados sugerem que, pelo menos em parte, a PM afeta a área tegmental ventral e/ou a rede dopaminérgica. Sabe-se que a infusão de NMDA na área tegmental ventral também leva ao aumento da dopamina no núcleo accumbens até 120 minutos após a infusão (Westerink; Kwint; DeVries, 1996). Considerando que a PM leva a uma alteração do sistema dopaminérgico (Neves *et al.*, 2020) e que a estimulação da área tegmental ventral pode levar ao aumento da dopamina em estruturas do sistema límbico (McNamara *et al.*, 2014), propomos que a estimulação farmacológica da área tegmental ventral utilizada em nosso estudo reverteu o déficit de memória de reconhecimento de objetos ao aumentar a liberação de dopamina no hipocampo, modulando a memória e promovendo sua persistência.

Assim como no primeiro estudo dessa tese, outros estudos comportamentais em roedores, usando manipulação farmacológica dos receptores dopaminérgicos

D1/D5 do hipocampo, forneceram sugestões iniciais de que a área tegmental ventral seria a fonte exclusiva de dopamina hipocampal (Lisman; Grace, 2005). Contudo, Kempadoo et al. (Kempadoo *et al.*, 2016) mostraram recentemente que a principal fonte de dopamina para o hipocampo dorsal provém do *locus coeruleus*, com poucas projeções provenientes da área tegmental ventral (Kempadoo *et al.*, 2016). Além disso, mostraram que a ativação optogenética do locus coeruleus aumenta a taxa de aprendizagem espacial e memória e que este efeito é dependente da ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D1 e não noradrenérgicos (Kempadoo *et al.*, 2016).

Dessa forma, uma questão surge: Poderiam estas poucas projeções da área tegmental ventral - hipocampo dorsal (LC-HD) serem as únicas responsáveis pelos efeitos na consolidação e persistência da memória de longa duração? Recentemente nós publicamos um estudo demonstrando que a estimulação farmacológica tanto da área tegmental ventral quanto do *locus coeruleus* é capaz de promover a persistência da memória reconhecimento de objetos (Lima *et al.*, 2023). Assim, no segundo estudo que compõe essa tese, nós investigamos o papel do locus coeruleus, e demonstramos que a estimulação locus coeruleus, uma estrutura até pouco tempo considerada como tendo projeções puramente noradrenérgicas para o hipocampo, promove a persistência da memória reconhecimento de objetos por até 14 dias após o aprendizado em animais controle, tanto em ratos machos quanto fêmeas, independentemente da ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos hipocampais. Adicionalmente, demonstramos que a estimulação do locus coeruleus reverte os déficits de memória induzidos pela PM em ratos machos e promove a persistência da memória tanto em machos quanto em fêmeas, além de promover uma melhora memória de reconhecimento de objetos em animais controle. Nossos dados corroboram com a ideia apresentada em publicações prévias acerca da importante função do sistema dopaminérgico e seus receptores, e a possibilidade de modulação da memória a partir da ativação dopaminérgica hipocampal (Neves *et al.*, 2020).

É importante destacar que a composição celular da área tegmental ventral e do *locus coeruleus* é heterogênea. Projeções dopaminérgicas da área tegmental ventral têm como destinos regiões encefálicas, tais como amígdala, hipocampo, substância cinzenta periaquedutal, tubérculo olfatório, córtex pré-frontal e *locus coeruleus* (Morales; Margolis, 2017). Por outro lado, projeções GABAérgicas oriundas da área tegmental ventral parecem ser destinadas a inervar interneurônios colinérgicos do

núcleo accumbens e neurônios glutamatérgicos da habênula lateral (Morales; Margolis, 2017). Além disso, neurônios glutamatérgicos dessa região parecem se conectar com neurônios glutamatérgicos da habênula lateral e com interneurônios GABAérgicos do núcleo accumbens (Morales; Margolis, 2017). Assim, é provável que a infusão do agonista glutamatérgico NMDA na área tegmental ventral realizada no estudo 1, também estimule neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos dessa região. Contudo, apenas as projeções dopaminérgicas oriundas da área tegmental ventral têm conexões com estruturas importantes para a consolidação e persistência da memória, tais como o hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala (Beier *et al.*, 2015; Morales; Margolis, 2017). Além disso, a estimulação farmacológica da área tegmental ventral aumenta os níveis de dopamina no hipocampo, processo essencial para a modulação da memória de longa duração (Castillo Díaz *et al.*, 2022; Lisman; Grace, 2005).

As projeções noradrenérgicas do locus coeruleus para diferentes estruturas encefálicas têm sido amplamente estudadas há anos (Waterhouse; Navarra, 2019). Especialmente, projeções noradrenérgicas oriundas do locus coeruleus têm conexões com o hipocampo e desempenham um papel importante na consolidação das memórias (Eschenko; Mello-Carpes; Hansen, 2017; Lima *et al.*, 2019). Contudo, recentemente demonstrou-se que projeções que conectam locus coeruleus ao hipocampo também são compostas por neurônios dopaminérgicos (Kempadoo *et al.*, 2016). Além disso, Kempadoo *et al.* (2016) demonstraram que a estimulação do *locus coeruleus* aumenta os níveis de dopamina hipocampal, além de promover a aprendizagem e a memória espacial (Kempadoo *et al.*, 2016). Além disso, esses autores demonstraram que a estimulação optogenética do locus coeruleus associada ao bloqueio dos receptores dopaminérgicos no hipocampo promove um déficit na consolidação da memória espacial (Kempadoo *et al.*, 2016), o que não observado quando a estimulação optogenética do locus coeruleus é associada ao bloqueio dos receptores adrenérgicos (Kempadoo *et al.*, 2016). Esses dados corroboram com os resultados encontrados no estudo 2 que compõe essa tese.

Estudos recentes demonstraram que o estresse crônico leva a alterações morfofuncionais do locus coeruleus (Kurban *et al.*, 2023; Minné; Marnewick; Engel-Hills, 2023) e que essas mudanças estão relacionadas a diversas neuropatologias, tais como Alzheimer e depressão (Kurban *et al.*, 2023; Minné; Marnewick; Engel-Hills,

2023). Takahashi et al. (Takahashi; Turner; Kalin, 1992) demonstraram que o animais que foram submetidos ao estresse no período pré-natal, apresentavam concentração reduzida de norepinefrina e dopamina no locus coeruleus na idade adulta (Takahashi; Turner; Kalin, 1992). Nesse sentido, parece que o estresse induzido pela PM provavelmente prejudica o desenvolvimento do locus coeruleus, levando a alterações estruturais e funcionais a longo prazo.

É importante ressaltar que o bloqueio dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos no hipocampo dorsal, neste estudo associado à estimulação de locus coeruleus, não foi capaz de impedir a consolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos em ratos, tanto machos quanto fêmeas. Considerando que nosso conjunto de dados sugere que a PM afeta, pelo menos em parte, a rede dopaminérgica LC-HD, propomos que a estimulação farmacológica da locus coeruleus leve a um aumento na atividade dos neurônios dopaminérgicos, já que o bloqueio dos principais receptores noradrenérgicos do hipocampo dorsal não impede a melhoria da memória. Assim, o aumento da concentração de dopamina no hipocampo dorsal, associado à ativação dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 (Neves *et al.*, 2020), reverteria os déficits de memória induzidos pela PM, além de promover a persistência da memória reconhecimento de objetos em ratos machos e fêmeas.

Apesar de, nos últimos anos, termos focamos uma série de trabalhos do nosso grupo no estudo do papel dos sistemas catecolaminérgicos na modulação da memória de animais PM e não PM (da Silva de Vargas *et al.*, 2017; Eschenko; Mello-Carpes; Hansen, 2017; Lima *et al.*, 2023; Mello-Carpes *et al.*, 2016; Neves *et al.*, 2020), reconhecemos o papel importante desempenhado por outros sistemas de neurotransmissores. Em modelos de PM, outros grupos vêm desenvolvendo pesquisas que revelam o papel de diferentes sistemas de neurotransmissores (Benetti *et al.*, 2009, 2012a, 2015). Por exemplo, a administração oral de inibidores da enzima que degrada a acetilcolina, a acetilcolinesterase, reverte os déficits de memória de longa duração de reconhecimento de objetos induzidos pela PM. Além disso, a PM também causa alteração do sistema histaminérgico no hipocampo e na amígdala basolateral (Benetti *et al.*, 2012a, 2015). Benetti et al. (2012), demonstraram que a infusão de um inibidor da enzima que inativa a histamina, a histamina N-metiltransferase, ou a estimulação direta de receptores histaminérgicos do tipo 2 (H2) no hipocampo, é capaz de reverter os déficits de memória aversiva induzidos pela PM

(Benetti *et al.*, 2012a). A mesma estratégia farmacológica foi utilizada para demonstrar que a inibição da histamina N-metiltransferase ou a estimulação de receptores histaminérgicos do tipo 3 (H3) na amígdala basolateral reverte os déficits de memória aversiva induzidos pela PM (Benetti *et al.*, 2015). Esses dados sugerem que, além do sistema dopaminérgico, os sistemas colinérgicos e histaminérgicos estão envolvidos nos déficits de diferentes tipos de memórias induzidos pela PM.

Nas últimas décadas, a descoberta dos receptores canabinóides, dos seus ligantes lipídicos endógenos (endocanabinóides, eCB) e da maquinaria para sintetizar e degradar os endocanabinóides levou à identificação de um sistema de sinalização endógeno (Devane *et al.*, 1992; Matsuda *et al.*, 1990; Mechoulam *et al.*, 1995). Desde então, o sistema endocanabinóide (SEC) tem ganhado interesse como elemento importante na fisiologia e nos processos de aprendizagem e memória (Drumond; Madeira; Fonseca, 2017; Kruk-Slomka *et al.*, 2017). Assim, no terceiro estudo que compõe essa tese, nos propomos a investigar os efeitos da manipulação do SEC na modulação da memória de animais submetidos ou não à PM.

A maioria dos estudos que manipulam o sistema endocanabinóide para investigar os efeitos na aprendizagem e na memória utilizam a ativação ou inibição de receptores CB1 (Haller *et al.*, 2004; Yim *et al.*, 2008). Os receptores CB1 são constituídos de uma proteína de membrana acoplada a proteína G (GPCR), sendo expressos em diversas partes do cérebro, incluindo aquelas relacionadas aos processos de aprendizagem e memória (Marsicano; Lafenêtre, 2009). Uma característica importante desses receptores é que, geralmente, eles são expressos em terminais pré-sinápticos (Freund; Katona; Piomelli, 2003). Por serem acoplados a proteína G inibitória, a ativação desses receptores leva a uma hiperpolarização dos neurônios, causando uma redução da liberação de neurotransmissores (Freund; Katona; Piomelli, 2003). Em geral, esses receptores são estimulados por endocanabinóides, tais como o 2-AG e a AEA, produzidos em neurônios pós-sinápticos que agem retrogradamente (Kano *et al.*, 2009; Shu-Jung Hu; Mackie, 2015).

Descoberto no hipocampo e no cerebelo, esse modo de sinalização está longe de ser simples (Wilson; Nicoll, 2001). A complexidade da sinalização do SEC via receptores CB1 deriva do fato de que a modulação da liberação pode ocorrer em sistemas de neurotransmissores que têm efeitos muito diferentes e até mesmo opostos (Bara *et al.*, 2021b; Kano *et al.*, 2009). Por exemplo, endocanabinóides ou

substâncias exógenas agonistas dos receptores CB1 podem regular tanto a transmissão GABAérgica inibitória quanto a glutamatérgica excitatória nas mesmas regiões cerebrais (Bara *et al.*, 2021b; Kano *et al.*, 2009; Lu; Mackie, 2021). Assim, o SEC pode modular vários aspectos da sinalização neuronal ao mesmo tempo.

Diversos componente exógenos têm sido utilizados para investigar os efeitos da manipulação dos SEC nos processos de aprendizagem e memória. Agonistas canabinóides são bem conhecidos por induzir alterações na memória de trabalho (MT) e na memória de curta duração (MCD) (Ranganathan; D'Souza, 2006). Apesar disso, os dados quanto a prejuízo ou melhora da memória ainda são bastante discrepantes. Por exemplo, em ratos, a memória de trabalho é prejudicada por agonistas exógenos (Deadwyler; Goonawardena; Hampson, 2007; Deadwyler; Hampson, 2008). Contudo, Carter and Wang (2007) recentemente sugeriram que a ativação fisiológica do SEC poderia ser benéfica para os mecanismos da memória de trabalho (Carter; Wang, 2007).

Em linha com os achados do terceiro estudo que compõe essa tese, realizado com camundongos, Litcham (2000) mostrou que a administração de um antagonista dos receptores CB1 (Rimonabant) antes da fase de aquisição poderia melhorar a performance da memória espacial em ratos (Lichtman, 2000). Nós verificamos que, no caso dos camundongos machos, que apresentam déficits de memória espacial induzidos pela PM, a infusão de um agonista endocanabinoide não foi capaz de reverter os déficits de memória, e no segundo teste, ainda promoveu piora da memória quando associada à PM. Estudo prévio também demonstrou que o bloqueio farmacológico de receptores CB1 resultou em facilitação da memória olfatória e reduziu os déficits de memória induzido pelo envelhecimento de ratos e camundongos (Terranova *et al.*, 1996). Por outro lado, nós sugerimos que esses mecanismos podem ser dependentes do sexo, e ainda precisam de melhor investigados.

Outra questão importante acerca do sistema endocanabinóide é que ele pode ser afetado pelo o estresse no início da vida, o que explicaria os efeitos da PM. Foi demonstrado que a PM (24h) induz uma redução na expressão de receptores CB1 no hipocampo de ratos (mais acentuado em machos do que em ratas fêmeas) com 13 dias de vida (Suárez *et al.*, 2009). Ratas fêmeas também exibiram maior densidade de receptores CB1 na região CA3 do hipocampo do que machos (Suárez *et al.*, 2009). Além disso, um interessante estudo realizado por Marco *et. al.* (2014) demonstrou que

ratos machos submetidos a um protocolo PM agudo (24h) tem uma redução na expressão de genes de enzimas que sintetizam eCB (NAPE-PLD e DAGL) no hipocampo quando adolescentes (DPN-46) (Marco *et al.*, 2014). O efeito oposto é observado em ratas fêmeas submetidas a PM (Marco *et al.*, 2014). Esses dados sugerem que o SEC é sensível ao estresse no início da vida a nível de expressão gênica de maneira sexo-dependente e essas mudanças já são evidentes durante a adolescência. Estes dados prévios nos auxiliam a explicar o dimorfismo sexual observado nos nossos resultados, já que fêmeas não apresentaram alterações da memória espacial a partir da PM ou da modulação endocanabinóide, contudo, serão necessários mais estudos para investigar os mecanismos subjacentes a esses efeitos.

É importante destacar que, ao longo dos 3 estudos que compõem esta tese, testes de controle comportamental foram realizados. A intenção foi avaliar aspectos comportamentais adjacentes, tais como comportamento do tipo ansioso, exploratório e locomotor, que poderiam alterar os resultados dos testes de memória devido a fatores extra-mnemônicos. Nestes testes, nenhuma alteração foi observada, e pouco ou nenhuma diferença entre os grupos foi observada.

## 7 CONCLUSÕES

O conjunto de resultados apresentados nesta tese confirma que o sistema dopaminérgico influencia a consolidação e persistência da memória de longo prazo e é capaz de modular os déficits de memória induzidos pela PM em ratos machos; por outro lado, o sistema endocanabinoide parece ter um papel mais complexo, e um efeito sexo-depende em animais submetidos à PM.

Além disso, apresentamos evidências de que:

- a PM afeta de forma diferente o processo de aprendizagem de machos e fêmeas, sendo que, em animais adultos submetidos à PM (ratos e camundongos), apenas machos apresentam déficit de memória;
- a estimulação farmacológica da área tegmental ventral imediatamente após a aprendizagem é capaz de reverter o déficit da memória de reconhecimento de ratos machos submetidos a PM;
- a estimulação farmacológica da área tegmental ventral imediatamente após a aprendizagem é capaz de promover a persistência da memória de reconhecimento de ratos machos e ratas fêmeas submetidos ou não a PM;
- a estimulação farmacológica da via dopaminérgica *locus coeruleus* – hipocampo dorsal imediatamente após a aprendizagem é capaz de reverter o déficit da memória de reconhecimento de ratos machos submetidos a PM;
- a estimulação farmacológica da via dopaminérgica do *locus coeruleus* – hipocampo dorsal imediatamente após a aprendizagem é capaz de promover a persistência da memória de reconhecimento de ratos machos e ratas fêmeas submetidos ou não a PM;
- a manipulação do sistema endocanabinóide através da infusão intraperitoneal de um agonista CB1 não é capaz de reverter o déficit de memória especial induzido pela PM em camundongos machos.

Dessa forma, podemos concluir que o sistema dopaminérgico e endocanabinóide podem ser afetados pela privação de cuidados no início da vida, induzindo um déficit de memória durante a vida adulta, e que tal efeito é sexo-dependente.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUSH, H.; AKIRAV, I. Cannabinoids ameliorate impairments induced by chronic stress to synaptic plasticity and short-term memory. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 38, n. 8, 2013.
- ADERMARK, L.; LOVINGER, D. M. Retrograde endocannabinoid signaling at striatal synapses requires a regulated postsynaptic release step. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 104, n. 51, 2007.
- AKIRAV, I. The role of cannabinoids in modulating emotional and nonemotional memory processes in the hippocampus. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], n. JUNE, 2011.
- ALMEIDA, O. F. X. *et al.* **Subtle shifts in the ratio between pro-and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate.** [S. l.: s. n.], [s. d.].
- ALVES, R. L. *et al.* **Maternal separation effects on mother rodents' behaviour: A systematic review.** [S. l.: s. n.], 2020.
- AMANCIO-BELMONT, O. *et al.* Maternal separation plus social isolation during adolescence reprogram brain dopamine and endocannabinoid systems and facilitate alcohol intake in rats. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 164, 2020.
- AN, D. *et al.* The Sobering Sting: Oleoyl Serotonin Is a Novel *Stephanoconus* Snail Venom-Derived Antagonist of Cannabinoid Receptors That Counteracts Learning and Memory Deficits. **Biomedicines**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 454, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9059/12/2/454>.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. *et al.* Neuroendocrinologia básica e aplicada. *In*: NEUROENDOCRINOLOGIA BÁSICA E APLICADA. [S. l.: s. n.], 2005. p. 611.
- ASEM, E. K.; RAJWA, B. Impact of combination of short-lecture and group-discussion on the learning of physiology by non-major undergraduates. **Advances in Physiology Education**, [s. l.], 2022.
- BALE, T. L.; EPPERSON, C. N. **Sex differences and stress across the lifespan.** [S. l.]: Nature Publishing Group, 2015.
- BARA, A. *et al.* **Cannabis and synaptic reprogramming of the developing brain.** [S. l.]: Nature Research, 2021a.

BARA, A. *et al.* **Cannabis and synaptic reprogramming of the developing brain.** [S. l.]: Nature Research, 2021b.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R. **The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors.** [S. l.: s. n.], 2011.

BEIER, K. T. *et al.* Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. **Cell**, [s. l.], v. 162, n. 3, p. 622–634, 2015.

BEKINSCHTEIN, P. *et al.* Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus. **Neuron**, [s. l.], v. 53, n. 2, 2007.

BENETTI, F. *et al.* Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 27, n. 1, 2009.

BENETTI, F. *et al.* Histamine acting on the basolateral amygdala reverts the impairment of aversive memory of rats submitted to neonatal maternal deprivation. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 278, p. 83–89, 2015.

BENETTI, F. *et al.* Histamine reverses a memory deficit induced in rats by early postnatal maternal deprivation. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 54–58, 2012a.

BENETTI, F. *et al.* Histamine reverses a memory deficit induced in rats by early postnatal maternal deprivation. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 54–58, 2012b. Disponível em: Acesso em: 25 jul. 2023.

BERMUDEZ-SILVA, F. J. *et al.* **The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: The end or a new beginning?** [S. l.: s. n.], 2010.

BERRY, J. N. *et al.* Corticosterone enhances N-methyl-d-aspartate receptor signaling to promote isolated ventral tegmental area activity in a reconstituted mesolimbic dopamine pathway. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 120, p. 159–165, 2016.

BISOGNO, T. *et al.* Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 163, n. 3, 2003.

BISSONETTE, G. B.; ROESCH, M. R. **Development and function of the midbrain dopamine system: What we know and what we need to.** [S. l.: s. n.], 2016.

BLANKMAN, J. L.; SIMON, G. M.; CRAVATT, B. F. A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. **Chemistry and Biology**, [s. l.], v. 14, n. 12, 2007.

BODOR, Á. L. *et al.* Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: Laminar differences and involvement of specific interneuron types. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 25, n. 29, 2005.

BORTOLATO, M. *et al.* Antidepressant-like Activity of the Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor URB597 in a Rat Model of Chronic Mild Stress. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 62, n. 10, 2007.

BORTOLATO, M. *et al.* Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 31, n. 12, 2006.

BOUTER, C. *et al.* Chronic exposure to a synthetic cannabinoid alters cerebral brain metabolism and causes long-lasting behavioral deficits in adult mice. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 130, n. 8, 2023.

BOWMAN, R. E.; ZRULL, M. C.; LUINE, V. N. **Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats** *Brain Research*. [S. l.: s. n.], 2001. Disponível em: [www.elsevier.com/locate/bres](http://www.elsevier.com/locate/bres). .

BRODSKI, C. *et al.* Location and size of dopaminergic and serotonergic cell populations are controlled by the position of the midbrain-hindbrain organizer. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 10, 2003.

BRUCE, S. E. *et al.* Influence of psychiatric comorbidity on recovery and recurrence in generalized anxiety disorder, social phobia, and panic disorder: A 12-year prospective study. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 162, n. 6, 2005.

BRUNSON, K. L. *et al.* **Neurobiology of the stress response early in life: evolution of a concept and the role of corticotropin releasing hormone** *Molecular Psychiatry*. [S. l.: s. n.], 2001. Disponível em: [www.nature.com/mp](http://www.nature.com/mp). .

CABANA-DOMÍNGUEZ, J. *et al.* Comprehensive exploration of the genetic contribution of the dopaminergic and serotonergic pathways to psychiatric disorders. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2022.

CABRAL, G. A.; FERREIRA, G. A.; JAMERSON, M. J. Endocannabinoids and the immune system in health and disease. *In: ENDOCANNABINOIDS*. [S. l.: s. n.], 2015.

ÇALIŞKAN, G.; MÜLLER, A.; ALBRECHT, A. **Long-term impact of early-life stress on hippocampal plasticity: Spotlight on astrocytes**. [S. l.]: MDPI AG, 2020.

CAMPOLONGO, P.; TREZZA, V. The endocannabinoid system: A key modulator of emotions and cognition. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], n. OCTOBER 2012, 2012.

CARRAZONI, G. S. *et al.* Starting maternal exercise, unlike reducing the intensity of exercise during pregnancy, prevents memory deficits in female offspring subject to maternal deprivation. **Brain Research**, [s. l.], v. 1808, 2023.

CARTER, E.; WANG, X. J. Cannabinoid-mediated disinhibition and working memory: Dynamical interplay of multiple feedback mechanisms in a continuous attractor model of prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, [s. l.], v. 17, n. SUPPL. 1, 2007.

CASTILLO DÍAZ, F. *et al.* Dopamine neurotransmission in the VTA regulates aversive memory formation and persistence. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 253, 2022.

CHAMPAGNE, D. L.; RONALD DE KLOET, E.; JOËLS, M. Fundamental aspects of the impact of glucocorticoids on the (immature) brain. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 136–142, 2009.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. **Endocrinology of the stress response**. [S. l.: s. n.], 2005.

CHU, N. ning *et al.* Peripheral electrical stimulation reversed the cell size reduction and increased BDNF level in the ventral tegmental area in chronic morphine-treated rats. **Brain Research**, [s. l.], v. 1182, n. 1, p. 90–98, 2007.

COLANGELI, R. *et al.* The FAAH inhibitor URB597 suppresses hippocampal maximal dentate afterdischarges and restores seizure-induced impairment of short and long-term synaptic plasticity. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017.

COMMUNICATION, S. *et al.* **BRAIN RESEARCH Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance**Brain Research. [S. l.]: ELSEVIER, 1994.

COPE, E. C.; GOULD, E. **Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix**. [S. l.: s. n.], 2019.

COTA, D. The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *In:* , 2008. **Journal of Neuroendocrinology**. [S. l.: s. n.], 2008.

CRAVATT, B. F. *et al.* Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 98, n. 16, 2001.

DA SILVA DE VARGAS, L. *et al.* One-single physical exercise session after object recognition learning promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 329, p. 120–126, 2017. Disponível em: Acesso em: 20 jul. 2023.

DAHOUN, T. *et al.* The relationship between childhood trauma, dopamine release and dexamphetamine-induced positive psychotic symptoms: a [11C]-(+)-PHNO PET study. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019.

DE KLOET, E. R. *et al.* Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *In:* , 2005. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2005. p. 271–281.

DE QUERVAIN, D. J. F.; MARGRAF, J. **Glucocorticoids for the treatment of post-traumatic stress disorder and phobias: A novel therapeutic approach**. [S. l.: s. n.], 2008.

DE QUERVAIN, D.; SCHWABE, L.; ROOZENDAAL, B. **Stress, glucocorticoids and memory: Implications for treating fear-related disorders**. [S. l.: s. n.], 2016.

DE VARGAS, L. da S. *et al.* Methylprednisolone as a memory enhancer in rats: Effects on aversive memory, long-term potentiation and calcium influx. **Brain Research**, [s. l.], v. 1670, 2017.

DEADWYLER, S. A.; GOONAWARDENA, A. V.; HAMPSON, R. E. Short-term memory is modulated by the spontaneous release of endocannabinoids: Evidence from hippocampal population codes. **Behavioural Pharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 5–6, 2007.

DEADWYLER, S. A.; HAMPSON, R. E. Endocannabinoids modulate encoding of sequential memory in the rat hippocampus. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 198, n. 4, 2008.

DEVANE, W. A. *et al.* Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. **Science**, [s. l.], v. 258, n. 5090, 1992.

DI FORTI, M. *et al.* Daily use, especially of high-potency cannabis, drives the earlier onset of psychosis in cannabis users. **Schizophrenia Bulletin**, [s. l.], v. 40, n. 6, 2014.

DI MARZO, V. *et al.* Metabolism of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: An historical overview and some recent developments. *In:* , 1999. **Lipids**. [S. l.: s. n.], 1999.

DÍAZ, F. C. *et al.* Activation of D1/5 dopamine receptors in the dorsal medial prefrontal cortex promotes incubated-like aversive responses. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 11, 2017.

DOUMA, E. H.; DE KLOET, E. R. **Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2020.

DRUMOND, A.; MADEIRA, N.; FONSECA, R. Endocannabinoid signaling and memory dynamics: A synaptic perspective. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 138, 2017.

D'SOUZA, D. C. *et al.* The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: Implications for psychosis. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 29, n. 8, 2004.

ECKEL-MAHAN, K. L. *et al.* Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: Implications for memory persistence. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 11, n. 9, 2008.

ENGERT, V.; PRUESSNER, J. Dopaminergic and Noradrenergic Contributions to Functionality in ADHD: The Role of Methylphenidate. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 6, n. 4, 2009.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 31, n. 1, 1988.

ESCHENKO, O.; MELLO-CARPES, P. B.; HANSEN, N. **New Insights into the Role of the Locus Coeruleus-Noradrenergic System in Memory and Perception Dysfunction**. [S. l.: s. n.], 2017.

FARRELL, M. R. *et al.* Sex-specific effects of early life stress on social interaction and prefrontal cortex dendritic morphology in young rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 310, p. 119–125, 2016.

FELDER, C. C.; JOSE, P. A.; AXELROD, J. The dopamine-1 agonist, SKF 82526, stimulates phospholipase-C activity independent of adenylate cyclase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 248, n. 1, 1989.

FERNÁNDEZ-RUIZ, J. *et al.* **The endogenous cannabinoid system and brain development.** [S. l.: s. n.], 2000.

FIGUEIREDO, H. F.; DOLGAS, C. M.; HERMAN, J. P. **Stress Activation of Cortex and Hippocampus Is Modulated by Sex and Stage of Estrus.** [S. l.: s. n.], 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article/143/7/2534/2989414>. .

FREUND, T. F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. **Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling.** [S. l.: s. n.], 2003.

FREY, U.; SCHROEDER, H.; MATTHIES, H. Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. **Brain Research**, [s. l.], v. 522, n. 1, p. 69–75, 1990. Disponível em: Acesso em: 25 jul. 2023.

FURINI, C. R. G. *et al.* D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 271, 2014.

GALEA, L. A. M. *et al.* **SEX DIFFERENCES IN DENDRITIC ATROPHY OF CA3 PYRAMIDAL NEURONS IN RESPONSE TO CHRONIC RESTRAINT STRESS** **Neuroscience**. [S. l.: s. n.], 1997.

GOEL, N.; BALE, T. L. Organizational and activational effects of testosterone on masculinization of female physiological and behavioral stress responses. **Endocrinology**, [s. l.], v. 149, n. 12, 2008.

GOLDSTEIN FERBER, S.; TREZZA, V.; WELLER, A. Early life stress and development of the endocannabinoid system: A bidirectional process in programming future coping. *In:* , 2021. **Developmental Psychobiology**. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2021. p. 143–152.

GONZÁLEZ-ACOSTA, C. A.; ROJAS-CERÓN, C. A.; BURITICÁ, E. **Functional Alterations and Cerebral Variations in Humans Exposed to Early Life Stress.** [S. l.: s. n.], 2021.

GÖTZ, M.; HUTTNER, W. B. **The cell biology of neurogenesis.** [S. l.: s. n.], 2005.

HALLER, J. *et al.* Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. 7, 2004.

HAN, Y. *et al.* Excitatory VTA to DH projections provide a valence signal to memory circuits. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2020.

HANDA, R. J. *et al.* Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 28, n. 4, 1994.

HANDA, R. J.; WEISER, M. J. **Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis**. [S. l.: s. n.], 2014.

HE, Z. Selective effects of perinatal estrogen on proliferation and new neurons in hippocampus and piriform cortex of rats at weaning. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 91, 2022.

HECK, A. L.; HANDA, R. J. **Sex differences in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis’ response to stress: an important role for gonadal hormones**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2019.

HELLER, W. Gender differences in depression: perspectives from neuropsychology. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 29, n. 2–3, p. 129–143, 1993. Disponível em: Acesso em: 13 mar. 2024.

HENSLEIGH, E.; PRITCHARD, L. M. Glucocorticoid receptor expression and sub-cellular localization in dopamine neurons of the rat midbrain. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 556, p. 191–195, 2013.

HERKENHAM, M. *et al.* Cannabinoid receptor localization in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 87, n. 5, 1990.

HERMAN, J. P. *et al.* Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 24, n. 3, 2003a.

HERMAN, J. P. *et al.* Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 151–180, 2003b.

HILL, M. N. *et al.* Early life stress alters the developmental trajectory of corticolimbic endocannabinoid signaling in male rats. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 146, 2019.

HILL, M. N.; MCEWEN, B. S. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 791–797, 2010.

HIRANO, S. *et al.* Involvement of dopamine D1 receptors and  $\alpha$ 1-adrenoceptors in the antidepressant-like effect of chlorpheniramine in the mouse tail suspension test. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 562, n. 1–2, 2007.

HOLDEN, C. **Sex and the suffering brain**. [S. l.: s. n.], 2005.

HUMPHREYS, K. L. *et al.* Evidence for a sensitive period in the effects of early life stress on hippocampal volume. **Developmental Science**, [s. l.], v. 22, n. 3, 2019.

IWASAKI-SEKINO, A. *et al.* Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological stress in rats. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 226–237, 2009.

IZQUIERDO, I. *et al.* Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 29, n. 9, 2006.

IZQUIERDO, I. *et al.* **Mechanisms for memory types differ [8]**. [S. l.: s. n.], 1998.

IZQUIERDO, I. **Memória: Iván Izquierdo**. [S. l.]: Artmed, 2018.

IZQUIERDO, I. *et al.* The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 80, n. 1, 2008.

JAHNG, J. W. *et al.* Mesolimbic dopaminergic activity responding to acute stress is blunted in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. **Neuroscience**, [s. l.], v. 171, n. 1, 2010.

JANETSIAN-FRITZ, S. S. *et al.* Maternal deprivation induces alterations in cognitive and cortical function in adulthood. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018.

JIN, X. **The role of neurogenesis during development and in the adult brain**. [S. l.: s. n.], 2016.

JOËLS, M.; KARST, H.; SARABDJITSINGH, R. A. **The stressed brain of humans and rodents**. [S. l.]: Blackwell Publishing Ltd, 2018.

JOHANSEN, J. P. *et al.* **Molecular mechanisms of fear learning and memory**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2011.

JUNG, A. Development of striatal dopaminergic function. III: Pre- and postnatal development of striatal and cortical mRNAs for the neurotrophin receptors trkBTK+ and trkC and their regulation by synaptic dopamine. **Developmental Brain Research**, [s. l.], v. 94, n. 2, 1996.

KAJANTIE, E.; PHILLIPS, D. I. W. **The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress.** [S. l.: s. n.], 2006.

KANO, M. *et al.* **Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission.** [S. l.: s. n.], 2009.

KARANDREA, D.; KITTAS, C.; KITRAKI, E. Contribution of sex and cellular context in the regulation of brain corticosteroid receptors following restraint stress. **Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 71, n. 6, 2000.

KARANDREA, D.; KITTAS, C.; KITRAKI, E. Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. **Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 75, n. 4, 2002.

KEMPADOO, K. A. *et al.* Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 113, n. 51, p. 14835–14840, 2016.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 453–462, 2002.

KLEIN, M. O. *et al.* **Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases.** [S. l.: s. n.], 2019.

KLINZING, J. G.; NIETHARD, N.; BORN, J. **Mechanisms of systems memory consolidation during sleep.** [S. l.: s. n.], 2019.

KOHNZ, R. A.; NOMURA, D. K. **Chemical approaches to therapeutically target the metabolism and signaling of the endocannabinoid 2-AG and eicosanoids.** [S. l.: s. n.], 2014.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. **The molecular neurobiology of depression.** [S. l.]: Nature Publishing Group, 2008.

KRUGERS, H. J. *et al.* Maternal deprivation and dendritic complexity in the basolateral amygdala. *In:* , 2012. **Neuropharmacology**. [S. l.: s. n.], 2012. p. 534–537.

KRUK-SLOMKA, M. *et al.* **Endocannabinoid System: the Direct and Indirect Involvement in the Memory and Learning Processes—a Short Review.** [S. l.: s. n.], 2017.

KURBAN, N. *et al.* Chronic stress-induced elevation of melanin-concentrating hormone in the locus coeruleus inhibits norepinephrine production and associated with

depression-like behaviors in rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], 2023.

LAPISH, C. C. *et al.* **The ability of the mesocortical dopamine system to operate in distinct temporal modes.** [S. l.: s. n.], 2007.

LEDONNE, A.; MERCURI, N. B. Current concepts on the physiopathological relevance of dopaminergic receptors. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 11, 2017.

LEE, S. H.; JUNG, E. M. **Adverse effects of early-life stress: Focus on the rodent neuroendocrine system.** [S. l.: s. n.], 2024.

LEVINE, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 30, n. 10, p. 939–946, 2005.

LI, M.; HAN, F.; SHI, Y. Expression of locus coeruleus mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in rats under single-prolonged stress. **Neurological Sciences**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 625–631, 2011.

LICHTMAN, A. H. SR 141716A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 404, n. 1–2, 2000.

LIMA, K. R. *et al.* Acute physical exercise improves recognition memory via locus coeruleus activation but not via ventral tegmental area activation. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 272, p. 114370, 2023. Disponível em: Acesso em: 20 jan. 2024.

LIMA, K. R. *et al.* Noradrenergic and dopaminergic involvement in novelty modulation of aversive memory generalization of adult rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 371, 2019.

LIN, S. C.; BERGLES, D. E. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2004.

LISMAN, J. E.; GRACE, A. A. The Hippocampal-VTA Loop: Controlling the Entry of Information into Long-Term Memory. **Neuron**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 703–713, 2005. Disponível em: Acesso em: 21 fev. 2023.

LLORENTE, R. *et al.* Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: A possible role for the endocannabinoid system. **Developmental Neurobiology**, [s. l.], v. 68, n. 11, 2008.

LU, H. C.; MACKIE, K. **Review of the Endocannabinoid System.** [S. l.]: Elsevier Inc., 2021.

LUNDBERG, U. Stress hormones in health and illness: The roles of work and gender. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 30, n. 10, 2005.

LUPU, D.-I.; CEDIEL ULLOA, A.; RÜEGG, J. Endocrine Disrupting Chemicals and Hippocampal Development: The Role of Estrogen and Androgen Signalling. **Neuroendocrinology**, [s. l.], p. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000531669>.

MACKIE, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. **Handbook of Experimental Pharmacology**, [s. l.], v. 168, 2005.

MAGARILLOS, A. M.; MCEWEN, B. S. **STRESS-INDUCED ATROPHY OF APICAL DENDRITES OF HIPPOCAMPAL CA3c NEURONS: INVOLVEMENT OF GLUCOCORTICOID SECRETION AND EXCITATORY AMINO ACID RECEPTORS** *Neuroscience*. [S. l.: s. n.], 1995.

MAHMOODKHANI, M. *et al.* Developmental effects of early-life stress on dopamine D2 receptor and proteins involved in noncanonical D2 dopamine receptor signaling pathway in the prefrontal cortex of male rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 3, 2022.

MAJCHER-MAŚLANKA, I. *et al.* The effects of early-life stress on dopamine system function in adolescent female rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 57, p. 24–33, 2017.

MAKINO, S.; SMITH, M. A.; GOLD, P. W. **Regulatory role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor mRNA levels on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus during repeated immobilization stress** *Brain Research*. [S. l.: s. n.], 2002. Disponível em: [www.elsevier.com/locate/bres](http://www.elsevier.com/locate/bres).

MANDUCA, A. *et al.* Distinct roles of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol in social behavior and emotionality at different developmental ages in rats. **European Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 25, n. 8, 2015.

MARCO, E. M. *et al.* Consequences of early life stress on the expression of endocannabinoid-related genes in the rat brain. **Behavioural Pharmacology**, [s. l.], v. 25, n. 5–6, p. 547–556, 2014.

MARCO, E. M. *et al.* Emotional, endocrine and brain anandamide response to social challenge in infant male rats. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 38, n. 10, 2013.

MARCO, E. M. *et al.* **The maternal deprivation animal model revisited**. [S. l.: s. n.], 2015.

MARRS, W. R. *et al.* The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 8, 2010.

MARSICANO, G.; LAFENÊTRE, P. **Roles of the Endocannabinoid system in learning and memory**. [S. l.]: Springer Verlag, 2009.

MATO, S.; DEL OLMO, E.; PAZOS, A. Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 9, 2003.

MATSUDA, L. A. *et al.* Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, [s. l.], v. 346, n. 6284, 1990.

MCEWEN, B. S. **Allostasis and Allostatic Load: Implications for Neuropsychopharmacology** *Neuropsychopharmacology*. [S. l.: s. n.], 2000.

MCEWEN, B. S. **Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress**. [S. l.]: SAGE Publications Inc., 2017.

MCEWEN, B. S. *et al.* **Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain** *Dialogues Clin Neurosci*. [S. l.: s. n.], 2006. Disponível em: [www.dialogues-cns.org](http://www.dialogues-cns.org). .

MCEWEN, B. S. **Stress-induced remodeling of hippocampal CA3 pyramidal neurons**. [S. l.: s. n.], 2016.

MCEWEN, B. S.; MIRSKY, A. E.; HATCH, M. M. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. [s. l.], 2007. Disponível em: [www.prv.org](http://www.prv.org).

MCEWEN, B. S.; WEISS, J. M.; SCHWARTZ, L. S. **Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain [18]**. [S. l.: s. n.], 1968.

MCLAUGHLIN, R. J. *et al.* Inhibition of anandamide hydrolysis dampens the neuroendocrine response to stress in neonatal rats subjected to suboptimal rearing conditions. **Stress**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2016.

MCNAMARA, C. G. *et al.* Dopaminergic neurons promote hippocampal reactivation and spatial memory persistence. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 1658–1660, 2014.

MECHOULAM, R. *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 50, n. 1, 1995.

MEISER, J.; WEINDL, D.; HILLER, K. **Complexity of dopamine metabolism**. [S. l.: s. n.], 2013.

MELLO-CARPES, P. B. *et al.* Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 127, 2016.

MELLO-CARPES, P. B.; IZQUIERDO, I. The nucleus of the solitary tract→nucleus paragigantocellularis→locus coeruleus→CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 100, 2013.

MENEZES, J. *et al.* Green tea protects against memory deficits related to maternal deprivation. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 182, p. 121–127, 2017.

MENEZES, J. *et al.* Maternal deprivation impairs memory and cognitive flexibility, effect that is avoided by environmental enrichment. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 381, 2020.

MEYER, H. C.; LEE, F. S.; GEE, D. G. **The Role of the Endocannabinoid System and Genetic Variation in Adolescent Brain Development**. [S. l.: s. n.], 2018.

MICHEL, M.; GREEN, C. L.; LYONS, L. C. PKA and PKC are required for long-term but not short-term in vivo operant memory in *Aplysia*. **Learning and Memory**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2011.

MINNÉ, D.; MARNEWICK, J. L.; ENGEL-HILLS, P. Early Chronic Stress Induced Changes within the Locus Coeruleus in Sporadic Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer research**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 301–317, 2023. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/37872793>.

MIZOGUCHI, A. *et al.* Glucocorticoid receptor signaling in ventral tegmental area neurons increases the rewarding value of a high-fat diet in mice. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2021.

MORALES, M.; MARGOLIS, E. B. **Ventral tegmental area: Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour**. [S. l.: s. n.], 2017.

MORENA, M. *et al.* **Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2016a.

MORENA, M. *et al.* **Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2016b.

MORENO-JIMÉNEZ, E. P. *et al.* Evidences for adult hippocampal neurogenesis in humans. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 41, n. 12, 2021.

MORRIS, R. G. M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**, [s. l.], v. 12, n. 2, 1981.

MULDER, J. *et al.* Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 105, n. 25, 2008.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, [s. l.], v. 365, n. 6441, 1993.

MURGATROYD, C. A. *et al.* Early life social stress induced changes in depression and anxiety associated neural pathways which are correlated with impaired maternal care. **Neuropeptides**, [s. l.], v. 52, 2015.

MURRAY, R. M. *et al.* 30 Years on: How the Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia Morphed into the Developmental Risk Factor Model of Psychosis. **Schizophrenia Bulletin**, [s. l.], v. 43, n. 6, 2017.

NEMEROFF, C. B. **Paradise Lost: The Neurobiological and Clinical Consequences of Child Abuse and Neglect**. [S. l.: s. n.], 2016.

NEVES, B. H. S. *et al.* On the role of the dopaminergic system in the memory deficits induced by maternal deprivation. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 173, 2020.

NEVES, B. H. *et al.* Physical exercise prevents short and long-term deficits on aversive and recognition memory and attenuates brain oxidative damage induced by maternal deprivation. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 152, p. 99–105, 2015.

NYILAS, R. *et al.* Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 28, n. 5, 2008.

NYÍRI, G. *et al.* CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. **Neuroscience**, [s. l.], v. 136, n. 3, 2005.

ONO, Y. *et al.* Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: Midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. **Development**, [s. l.], v. 134, n. 17, 2007.

OOMEN, C. A. *et al.* Early maternal deprivation affects dentate gyrus structure and emotional learning in adult female rats. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 214, n. 1, p. 249–260, 2011.

OOMEN, C. A. *et al.* Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2009.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 502–548, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/edrv.22.4.0436>.

PACHER, P.; BÁTKAI, S.; KUNOS, G. **The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy**. [S. l.: s. n.], 2006.

PASCUAL, R.; ZAMORA-LEÓN, S. P. Effects of neonatal maternal deprivation and postweaning environmental complexity on dendritic morphology of prefrontal pyramidal neurons in the rat. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 471–479, 2007.

PAVLIDES, C.; NIVÓN, L. G.; MCEWEN, B. S. Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. **Hippocampus**, [s. l.], v. 12, n. 2, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* Seventh Edition. **Elsevier Academic Press**, [s. l.], v. 170, 2014.

PELLOW S *et al.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 14, 1985.

PORTERO-TRESSERRA, M. *et al.* Maternal separation increases alcohol-drinking behaviour and reduces endocannabinoid levels in the mouse striatum and prefrontal cortex. **European Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 28, n. 4, 2018.

PRYCE, C. R. **Postnatal ontogeny of expression of the corticosteroid receptor genes in mammalian brains: Inter-species and intra-species differences**. [S. l.: s. n.], 2008.

QUILLFELDT, J. A. Behavioral methods to study learning and memory in rats. *In: RODENT MODEL AS TOOLS IN ETHICAL BIOMEDICAL RESEARCH*. [S. l.: s. n.], 2015.

RADLEY, J. J. *et al.* Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. **Neuroscience**, [s. l.], v. 125, n. 1, p. 1–6, 2004.

RANGANATHAN, M.; D'SOUZA, D. C. **The acute effects of cannabinoids on memory in humans: A review.** [S. l.: s. n.], 2006.

RENTESE, G. *et al.* Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 244, p. 29–37, 2013.

RESHETNIKOV, V. *et al.* Repeated and single maternal separation specifically alter microglial morphology in the prefrontal cortex and neurogenesis in the hippocampus of 15-day-old male mice. **NeuroReport**, [s. l.], v. 31, n. 18, 2020.

RIEBE, C. J.; WOTJAK, C. T. **Endocannabinoids and stress.** [S. l.: s. n.], 2011.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. **Glutamate receptor function in learning and memory.** [S. l.: s. n.], 2003.

ROMANO-LÓPEZ, A. *et al.* Maternal separation and early stress cause long-lasting effects on dopaminergic and endocannabinergic systems and alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and frontal cortex in rats. **Developmental Neurobiology**, [s. l.], v. 76, n. 8, 2016.

ROSSATO, J. I. *et al.* Dopamine controls persistence of long-term memory storage. **Science**, [s. l.], v. 325, n. 5943, 2009.

RUBINO, T. *et al.* Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, [s. l.], v. 18, n. 6, 2008.

RUBINO, T.; ZAMBERLETTI, E.; PAROLARO, D. **Adolescent exposure to cannabis as a risk factor for psychiatric disorders.** [S. l.: s. n.], 2012.

RUSSELL, G.; LIGHTMAN, S. **The human stress response.** [S. l.]: Nature Publishing Group, 2019.

SAPOLSKYF, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. **The Neuroendocrinology of Stress and Aging: The Glucocorticoid Cascade Hypothesis\***. [S. l.: s. n.], 1986.

SCHMIDT, M. V. *et al.* Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. **Journal of Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 18, n. 11, p. 865–874, 2006.

SCHMIDT, M. *et al.* **The Dynamics of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis During Maternal Deprivation.** [S. l.: s. n.], [s. d.].

SCHMIDT, M. *et al.* The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 125–132, 2003.

SEALFON, S. C.; OLANOW, C. W. **Dopamine receptors: From structure to behavior**. [S. l.: s. n.], 2000.

SEGEV, A. *et al.* Cannabinoid receptor activation prevents the effects of chronic mild stress on emotional learning and LTP in a rat model of depression. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 39, n. 4, 2014.

SHU-JUNG HU, S.; MACKIE, K. Distribution of the endocannabinoid system in the central nervous system. *In*: HANDBOOK OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY. [S. l.: s. n.], 2015. v. 231.

SIMON, M.; CZÉH, B.; FUCHS, E. Age-dependent susceptibility of adult hippocampal cell proliferation to chronic psychosocial stress. **Brain Research**, [s. l.], v. 1049, n. 2, 2005.

SMITH, M. A. *et al.* **Maternal Deprivation and Stress Induce Immediate Early Genes in the Infant Rat Brain**. [S. l.: s. n.], 1997.

SOLOMON, M. B. *et al.* Deletion of forebrain glucocorticoid receptors impairs neuroendocrine stress responses and induces depression-like behavior in males but not females. **Neuroscience**, [s. l.], v. 203, 2012.

SOSA, P. M. *et al.* Maternal Deprivation Induces Memory Deficits That Are Reduced by One Aerobic Exercise Shot Performed after the Learning Session. **Neural Plasticity**, [s. l.], v. 2019, 2019.

SOUSA, V. C. *et al.* Maternal separation impairs long term-potential in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 35, n. 7, 2014.

SOUSA, N.; CERQUEIRA, J. J.; ALMEIDA, O. F. X. **Corticosteroid receptors and neuroplasticity**. [S. l.: s. n.], 2008.

STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PLOMELLI, D. A second endogenous' cannabinoid that modulates long-term potentiation. **Nature**, [s. l.], v. 388, n. 6644, 1997.

SUÁREZ, J. *et al.* Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB1 and CB2 cannabinoid receptors of neonatal rats. **Hippocampus**, [s. l.], v. 19, n. 7, 2009.

SUCHECKI, D.; ROSENFELD, P.; LEVINE, S. **Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking** **Brain Research**. [S. l.: s. n.], 1993.

SUGAMA, S.; KAKINUMA, Y. Loss of dopaminergic neurons occurs in the ventral tegmental area and hypothalamus of rats following chronic stress: Possible pathogenetic loci for depression involved in Parkinson's disease. **Neuroscience Research**, [s. l.], v. 111, p. 48–55, 2016.

TAKAHASHI, L. K.; TURNER, J. G.; KALIN, N. H. Prenatal stress alters brain catecholaminergic activity and potentiates stress-induced behavior in adult rats. **Brain Research**, [s. l.], v. 574, n. 1–2, 1992.

TAKEUCHI, T. *et al.* Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. **Nature**, [s. l.], v. 537, n. 7620, 2016.

TANAKA, M.; SACKETT, S.; ZHANG, Y. **Endocannabinoid Modulation of Microglial Phenotypes in Neuropathology**. [S. l.: s. n.], 2020.

TERRANOVA, J. P. *et al.* Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 126, n. 2, 1996.

TRACTENBERG, S. G. *et al.* Vulnerable and resilient cognitive performance related to early life stress: The potential mediating role of dopaminergic receptors in the medial prefrontal cortex of adult mice. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 13–27, 2020.

TURNER, B. B. Sex difference in glucocorticoid binding in rat pituitary is estrogen dependent. **Life Sciences**, [s. l.], v. 46, n. 19, 1990.

TYNG, C. M. *et al.* **The influences of emotion on learning and memory**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2017.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. **Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses**. [S. l.: s. n.], 2009.

URBAN, K. R. *et al.* Age- and sex-dependent impact of repeated social stress on morphology of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. **Neurobiology of Stress**, [s. l.], v. 10, 2019.

VARVEL, S. A.; LICHTMAN, A. H. Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 301, n. 3, 2002.

VIAU, V. *et al.* Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat. **Endocrinology**, [s. l.], v. 146, n. 1, 2005.

- VIVEROS, M. P. *et al.* Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 34, n. SUPPL. 1, 2009.
- WAGNER, B. A. *et al.* Effects of testosterone dose on spatial memory among castrated adult male rats. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 89, 2018.
- WALKERF, C.-D. *et al.* **Ontogeny of the Stress Response in the Rat: Role of the Pituitary and the Hypothalamus\***. [S. l.: s. n.], 1986.
- WALKERF, C.-D. *et al.* **The Pituitary-Adrenocortical System of Neonatal Rats Is Responsive to Stress throughout Development in a Time-Dependent and Stressor-Specific Fashion\***. [S. l.: s. n.], 1991.
- WANG, X. *et al.* Preferential limbic expression of the cannabinoid receptor mRNA in the human fetal brain. **Neuroscience**, [s. l.], v. 118, n. 3, 2003.
- WATERHOUSE, B. D.; NAVARRA, R. L. **The locus coeruleus-norepinephrine system and sensory signal processing: A historical review and current perspectives**. [S. l.: s. n.], 2019.
- WEN, B. M. Stress, adaptation, and disease allostasis and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 840, 1998.
- WESTERINK, B. H. C.; KWINT, H. F.; DEVRIES, J. B. The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: A dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of the rat brain. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 8, 1996.
- WILLIAMS, S. N.; UNDIH, A. S. Dopamine D1-like receptor activation induces brain-derived neurotrophic factor protein expression. **NeuroReport**, [s. l.], v. 20, n. 6, 2009.
- WILSON, R. I.; NICOLL, R. A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. **Nature**, [s. l.], v. 410, n. 6828, 2001.
- WOOTTEN, D. *et al.* **Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors**. [S. l.: s. n.], 2018.
- WU, C. S. *et al.* Requirement of cannabinoid CB1 receptors in cortical pyramidal neurons for appropriate development of corticothalamic and thalamocortical projections. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 32, n. 5, 2010.
- YAMASAKI, M.; TAKEUCHI, T. **Locus Coeruleus and Dopamine-Dependent Memory Consolidation**. [S. l.: s. n.], 2017.
- YARIBEYGI, H. *et al.* **The impact of stress on body function: A review**. [S. l.]: Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, 2017.

YIM, T. T. *et al.* Post-training CB1 cannabinoid receptor agonist activation disrupts long-term consolidation of spatial memories in the hippocampus. **Neuroscience**, [s. l.], v. 151, n. 4, 2008.

ZHANG, Q. *et al.* Prolonged maternal separation alters neurogenesis and synaptogenesis in postnatal dentate gyrus of mice. **Bipolar Disorders**, [s. l.], v. 23, n. 4, 2021.

## 9 CÓPIA DO CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS (CEUA).

### 9.1 Anexo 1 – Certificado CEUA dos estudos 1 e 2.



#### CERTIDÃO

#### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA:026/2021

Título: Alterações em estruturas encefálicas relacionadas à modulação dopaminérgica da memória de longa duração em animais submetidos à privação materna

Data da aprovação: 16/07/2021

Período de vigência do projeto: 30/12/2024

Pesquisadores(a): Pâmela Billig Mello Carpes

Campus: Uruguaiiana

Telefone: (55) 99661-2454

E-mail: [pamelacarpes@unipampa.edu.br](mailto:pamelacarpes@unipampa.edu.br)

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa
Espécie / Linhagem / Raça	Ratos Wistar/ Fêmeas Prenhes e Prole
Nº de animais	Fêmeas prenhes: 56 Prole: 180 machos e 180 fêmeas
Peso / Idade	Fêmeas prenhes: 500g / 3-4 meses Prole: 400g / 0-4 meses
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério da Universidade Federal de Pelotas/RS



Assinado eletronicamente por CATIA ALINE VEIVERBERG, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR, em 19/07/2021, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0572200 e o código CRC B03A4595.

## 9.2 Anexo 2 – Certificado CEUA do estudo 3.

The screenshot displays a web application interface with a mobile navigation menu on the left and a main content area on the right. The mobile menu includes options like Home, Project application, Animal Orders, Animal Management, Compliance Support, Billing, Tasks, Reports, Master Data, Switch to mobile, and Help. The main content area shows a workflow history table for a project.

**Project Title:** PPL: 034/2023 "Behavioral evaluation of maternal deprivation: influence of the endocannabinoid system", (v.26.0), Approved/Approved

Review	Attachments	Action	Workflow
0.6.0		Submit	14-Nov-2022
0.7.0		Revision after Eligibility	15-Nov-2022
0.8.0		Submit to PI after EC revision	15-Dec-2022
0.9.0		Submit	15-Dec-2022
0.10.0		Revision after Eligibility	15-Dec-2022
0.11.0		Submit to PI after EC revision	16-Dec-2022
0.12.0		Submit	16-Dec-2022
0.13.0		EC Secretary	19-Dec-2022
0.14.0		EC members review	03-Jan-2023
0.15.0		EC Secretary	17-Jan-2023
0.16.0		Revision after EC	19-Jan-2023
0.17.0		Submit to PI after EC revision	02-Feb-2023
0.18.0		Revision after EC	02-Feb-2023
0.19.0		Submit to PI after EC revision	02-Feb-2023
0.20.0		Revision after EC	02-Feb-2023
0.21.0		Submit to PI after EC revision	03-Feb-2023
0.22.0		EC Secretary	03-Feb-2023
0.23.0		EC members review	23-Feb-2023
0.24.0		EC Secretary	23-Mar-2023
0.25.0		EC president	23-Mar-2023
1.0.0		Approved	24-Mar-2023

**Workflow history**

None of the comments were addressed. No adjusted NTS or flowchart was uploaded as attachment in Tick...

Revised version, ready to submit

voor ECO meeting van 17 januari 2023

Beste Rudi  
De ECO heeft nog een aantal vragen bij jullie project. Alvast bedankt om deze te beantw...

Answers to EC remarks included in attachment

antwoorden van de onderzoekers

klaar voor approval