



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ALTAMIRA
FACULDADE DE MEDICINA

CRISTIANA PIRES DA SILVA

**EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA NA ÁREA IMUNOPOSITIVA PARA
ASTRÓCITOS NO HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS**

ALTAMIRA

2021

CRISTIANA PIRES DA SILVA

**EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA NA ÁREA IMUNOPOSITIVA PARA
ASTRÓCITOS NO HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina da UFPA, Campus de Altamira, como requisito para obtenção de grau de Bacharelado em Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Suelen Merlo.

ALTAMIRA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586e Silva, Cristiana Pires da
Efeitos da Separação Materna na Área Imunopositiva para
Astrócitos no Hipocampo de Ratos Jovens / Cristiana Pires da
Silva. — 2021.
42 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Suelen Merlo
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de
Medicina, Campus Universitário de Altamira, Universidade Federal
do Pará, Altamira, 2021.

1. Separação Materna. 2. Astrócitos. 3. Hipocampo. I.
Título.

CDD 612.82

CRISTIANA PIRES DA SILVA

**EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA NA ÁREA IMUNOPOSITIVA PARA
ASTRÓCITOS NO HIPOCAMPO DE RATOS JOVENS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para
obtenção do grau de Bacharelado em Medicina pela
Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Profa. Dra. Suelen Merlo.

Aprovado em: 16/10/2021

Conceito: Excelente

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Suelen Merlo
Orientadora

Profa. Dra. Ana Carolina Alves de Oliveira
Examinadora interna - UFPA

Prof. Dr. Luis Antonio Loureiro Maués
Examinador interno - UFPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço... A Deus o ser que nunca me abandonou nessa caminhada. Aos meus pais Adamilson Oliveira da Silva e Creuselina dos Santos Pires que foram os meus primeiros professores e me ensinaram na prática o real significado na palavra amar. À minha irmã Cristiane Pires da Silva por ser minha parceira em todas as situações. Aos meus tios, em especial Adailson Oliveira da Silva por nunca me deixar sonhar sozinha e acreditar no meu potencial e as tias Aldacilea Oliveira, Aldaléa Oliveira e Aldacilene Oliveira por me incentivarem a ir em busca do meu sonho e sempre estarem presente na minha caminhada. À minha pequena Dulce Maria Pires Guimarães por trazer alegria para a minha vida e me apresentar o amor mais puro e real que eu poderia ter na vida. Ao meu noivo Paulo Messias Cardoso por ter paciência, respeito e compreensão diante das minhas escolhas. Ao meu cunhado Flávio Guimarães pelo apoio e incentivo. À minha orientadora e amiga Suelen Merlo por aceitar a missão de me ajudar com o TCC, pela confiança, dedicação e contribuição na minha formação acadêmica. Aos professores Ana Carolina Alves de Oliveira e Luis Antônio Loureiro Maués por aceitarem fazer parte da minha banca avaliadora e pelos ensinamentos desde o início da minha vida acadêmica. Aos meus amigos de curso, em especial Luiz Cláudio Félix por nunca me abandonar e sempre está disposto a me ajudar em tudo que precisar. À minhas amigas, Samara Fernandes, Pâmela Renata e Renata dos Anjos que sempre acompanharam de perto meu amor pela medicina e apesar da distância se fazem presente em minha vida. A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa e no meu processo de formação profissional.

Os sonhos não determinam o lugar em que você vai estar, mas produzem a força necessária para tirá-lo do lugar em que está.

Augusto Cury

Resumo

Introdução: As células gliais constituem a maior parte das células do sistema nervoso, entre essas células destacam-se os astrócitos que desempenham várias funções no sistema nervoso central (SNC) entre as quais destacam-se funções estruturais, vasculares, de sobrevivência neuronal e de plasticidade sináptica, além de ter papel fundamental na regulação da transmissão de informações no sistema nervoso e ser a fonte principal de fatores de crescimento para os neurônios, essas células podem ser identificadas pela expressão da proteína ácida fibrilar da glia (GFAP). O desenvolvimento do cérebro humano, desde as primeiras fases de vida intraútero até a vida adulta, ocorre de maneira gradual e o impacto dos efeitos das experiências precoces vividas está relacionado com a capacidade do indivíduo responder a estímulos ambientais e se adaptar a eles. Experiências caracterizadas como estressantes influenciam de forma negativa o desenvolvimento do cérebro, podendo comprometer a saúde do indivíduo, enquanto ambientes enriquecidos com estímulos induzem o desenvolvimento saudável. Neste sentido, eventos estressores neonatais, como a separação materna (SM), podem promover mudanças estruturais no sistema nervoso e aumentar a predisposição a doenças psiquiátricas. Estudos sugerem que o estresse crônico pode causar alterações hipocampais, impactando na redução no volume, número de células neuronais e gliais, bem como na transmissão sináptica.

Objetivo: Estudar se animais jovens (21 dias) submetidos à SM neonatal apresentam alterações na área imunopositiva para astrócitos no córtex hipocampal. **Metodologia:** Este estudo trata-se de uma pesquisa experimental descritiva de abordagem quantitativa. A pesquisa foi dividida em três fases: 1) experimentos comportamentais: diz respeito ao procedimento de separação materna; 2) experimentos morfológicos: na qual os encéfalos foram fixados, congelados, seccionados e colocados sobre lâminas e em seguida suas secções foram submetidas ao procedimento de imunofluorescência para a proteína GFAP para marcar a área imunopositiva para astrócitos; 3) quantificação estereológica: ocorreu a quantificação da área imunopositiva e da porcentagem marcada para GFAP em regiões específicas do giro denteado, bem como o volume das camadas granular, molecular e hilo do hipocampo de animais jovens. **Resultados:** Não foram observadas mudanças significativas em relação a área e porcentagem GFAP positivas entre os animais submetidos à separação materna e controles nas camadas granular, molecular e hilo do giro denteado hipocampal. Houve redução no volume da camada granular do giro denteado do hipocampo nos animais submetidos à separação materna. Em relação ao volume das camadas molecular e hilo não foram observadas diferenças significativas.

Palavras-Chave:

Separação Materna; Astrócitos; Hipocampo

Abstract

Introduction: Glial cells compose most of the cells in nervous system, among which are highlighted astrocytes. Astrocytes have many functions in the central nervous system (CNS), among which are structural, vascular, neuronal survival and synaptic plasticity functions, also having a fundamental role in regulating the transmission of information in the nervous system and being the main source of growth factors for neurons, these cells can be identified by the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP). The development of the human brain, from the first stages of intrauterine life to adult life, happens gradually and the effects of early experiences impact is related to the individual's ability to respond and adapt to environmental stimuli. Experiences characterized as stressful ones have a negative influence on brain development and can compromise the subject's health, while environments enriched with stimuli induce healthy development. In this regard, stressful neonatal events such as maternal separation (MS), can promote structural changes in the nervous system and increase the predisposition to psychiatric diseases. Studies suggest that chronic stress can cause hippocampal changes, impacting the reduction in volume, number of neuronal and glial cells and in synaptic transmission as well. **Objective:** To study if young animals (21 days) submitted to neonatal MS have changes in the immunopositive area for astrocytes in the hippocampal cortex. **Methodology:** This study is a descriptive experimental research with a quantitative approach. The research was divided into three phases: 1) behavioral experiments: concerns the maternal separation procedure; 2) morphological experiments: in which the brains were pinned, frozen, sectioned and placed on slides, then their sections were subjected to the immunofluorescence procedure for the GFAP protein to mark the immunopositive area for astrocytes; 3) stereological quantification: in order to quantify the immunopositive area and the percentage marked for GFAP in specific regions of the dentate gyrus, such as in the granular and molecular layers, and hippocampus hilum of young animals. **Results:** No significant changes were observed in relation to a positive area and GFAP between animals at separation and controls in the granular, molecular and hippocampal layers. Houve redução no volume da camada granular do giro denteado do hipocampo nos animais submetidos à separação materna. Em relação ao volume das camadas molecular e hilo não foram observadas diferenças significativas. There was a significant reduction in the volume of the granular layer of the dentate gyrus of the hippocampus in animals submitted to maternal separation. Regarding the volume of molecular layers and hilum, no differences were observed.

Keywords:

Maternal Separation; Astrocytes; Hippocampus.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	08
1.1 HISTÓRICO E FUNÇÃO DOS ASTRÓCITOS.....	08
1.2 O PAPEL DOS ASTRÓCITOS NAS SINAPSES.....	09
1.3 A RECAPTAÇÃO DO GLUTAMATO PELOS ASTRÓCITOS.....	10
1.4 OS EFEITOS DOS ESTÍMULOS AMBIENTAIS NO ENCÉFALO.....	11
1.5 SEPARAÇÃO MATERNA.....	12
1.6 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO HIPOCAMPO.....	13
1.7 PROBLEMA.....	17
1.8 HIPÓTESE.....	17
1.9 JUSTIFICATIVA.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 METODOLOGIA.....	20
3.1 TIPO DE PESQUISA.....	20
3.2 LOCAL DA PESQUISA.....	20
3.3 QUESTÕES ÉTICAS.....	20
3.4 COLETA DE DADOS.....	21
3.5 QUANTIFICAÇÃO ESTEREOLÓGICA.....	23
3.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	26
4. RESULTADOS.....	27
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

1. Introdução

1.1 Histórico e Função dos Astrócitos

Ao longo de centenas de anos muito cientistas superaram obstáculos e contribuíram para o desenvolvimento da neurociência, entre os quais estão Golgi e Cajal. Em 1873, Golgi desenvolveu uma solução capaz de corar neurônios e foi possível identificar duas regiões: núcleo da célula e o corpo celular. No final do século XIX (1888) o histologista Ramón y Cajal utilizou a técnica de colocação desenvolvida por Golgi e constatou que o tecido nervoso é constituído por diferentes células que se comunicam entre si e formam as principais estruturas do sistema nervoso. Hoje sabemos que essas distintas células são os neurônios e as células gliais. As células gliais constituem a maior parte das células do sistema nervoso, sendo classificadas segundo a forma, função e localização em micróglia, astrócitos, células de Schwann e oligodendrócitos (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017; GUILLAMÓN-VIVANCOS; GÓMEZ-PINEDO; MATÍAS-GUIU, 2015).

Nesse estudo abordamos especificamente os astrócitos que são as células gliais mais abundantes do cérebro humano. Inicialmente Ramón y Cajal considerou os astrócitos apenas como células de apoio, porém com o passar do tempo, e o desenvolvimento de pesquisas com tecnologias mais avançadas, como o poder de maior resolução do microscópio eletrônico, concluiu-se que essas células desempenham um papel fundamental na transmissão de informações no sistema nervoso (GUILLAMÓN-VIVANCOS; GÓMEZ-PINEDO; MATÍAS-GUIU, 2015). Para manter a homeostase do sistema nervoso central (SNC) os astrócitos desempenham várias funções, entre as quais destacam-se funções estruturais, vasculares, de sobrevivência neuronal e de plasticidade sináptica (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013).

Os pés vasculares dos astrócitos contribuem na formação da barreira hematoencefálica (CARDOSO; BRITES; BRITO, 2010). A barreira hematoencefálica consiste em capilares sanguíneos formados por células endoteliais estreitamente unidas e apoiadas em uma lâmina basal contínua, recobertos pelos pés vasculares dos astrócitos, que tem como objetivo controlar a troca de substâncias entre o sistema nervoso e o sangue. Desse modo, os prolongamentos dos astrócitos formam uma rede de lamelas que possuem papel importante no controle do tônus vascular e na manutenção da barreira hematoencefálica (VIEIRA; SOUSA, 2013).

Os astrócitos representam também a fonte principal de fatores de crescimento para os neurônios. Estudos revelam que astrócitos de determinadas áreas do SNC, como hipocampo, podem colaborar para a plasticidade do sistema nervoso adulto funcionando como célula-tronco e produzindo nichos neurogênicos que ajudam no sustento de progenitores neuronais e gliais (STIPURSKY *et al.*, 2012), podendo estar envolvidos nos processos relacionados a memória e aprendizagem.

Entre as propriedades gerais dos astrócitos maduros ressalta-se a presença de filamentos intermediários (IF) do citoesqueleto celular, os quais são prolongamentos presentes no citoplasma dos astrócitos e possuem como elemento essencial a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013). As principais funções do GFAP estão relacionadas com a manutenção da morfologia dos astrócitos, o controle da migração dessas células e a manutenção da estabilidade de seus processos. Além disso, a superexpressão ou supressão da biossíntese do GFAP refletem alterações na atividade funcional dos astrócitos relacionadas a lesões no SNC, anormalidades metabólicas e neurodegenerativas (TYKHOMYROV; PAVLOVA, NEDZVETSKY, 2016). Atualmente os autoanticorpos anti-GFAP são utilizados em técnicas imunofluorescentes com o objetivo de diagnosticar patologias neurodegenerativas, como o que ocorre em casos de lesões e isquemias, onde o GFAP suprime a proliferação neuronal e a extensão de neuritos, formando uma barreira que protege o tecido afetado e mantém o fluxo sanguíneo. (BRENNER, 2014).

1.2. O Papel dos Astrócitos nas Sinapses

Sabe-se que os astrócitos têm papel importante na organização do SNC dos vertebrados, incluindo o dos humanos. Os astrócitos fazem parte da sinapse tripartida, ou seja, uma sinapse formada por dois neurônios e um astrócito. Essa interação permite que os astrócitos identifiquem a atividade neuronal, podendo influenciar na formação e plasticidade da sinapse, e nos efeitos a longo prazo provocados pelo estresse precoce nos circuitos neuronais. Além de, afeta a captação e o metabolismo de neurotransmissores, fornecendo energia para neurônios dentro de circuitos locais. Manter esse contato astrócito-sinapse é essencial para que o SNC mantenha o seu funcionamento normal, visto que alterações na secreção do fator de proteína astrocítica podem afetar de forma significativa o desenvolvimento e a estabilidade da sinapse. (BLANCO-SUÁREZ; CALDWELL; ALLEN, 2016; FARHY-TSELNICKER; ALLEN, 2018; ÇALIŞKAN; MÜLLER; ALBRECHT, 2020).

As sinapses são essenciais para que ocorra a transferência de informação no SNC, sendo um processo diretamente relacionado a atividades como aprendizado, memória, percepção e cognição, e o que se tem observado em estudos que abordam essa temática é que os astrócitos tem participação em diversas etapas contemplando a formação, eliminação, estabilização e eficácia das sinapses. Além de ser fundamental na modulação do ambiente sináptico, os astrócitos são elementos importantes no desenvolvimento de desordens psiquiátricas, bem como o autismo, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), epilepsia, entre outras (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013).

1.3. A Recaptação do Glutamato pelos Astrócitos

Alterações na recaptação do glutamato pelos astrócitos também têm sido implicadas em muitos distúrbios neurológicos, incluindo esquizofrenia, transtorno do espectro do autismo e doença de Alzheimer. (BLANCO-SUÁREZ; CALDWELL; ALLEN, 2016; FARHY-TSELNICKER; ALLEN, 2018). O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório no SNC dos mamíferos, atuando em receptores ionotrópicos (N-metil-d-aspartato-NMDA, ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxal-4-propiónico-AMPA e cainato-KA) e metabotrópicos (mGluRs). O neurotransmissor glutamato é sintetizado a partir do aminoácido glutamina, pela ação da enzima glutaminase e o seu metabolismo é controlado por receptores presentes nos neurônios pré e pós-sinápticos, e em células da glia. Uma vez liberado na fenda sináptica o glutamato atua em receptores glutamatérgicos, como o NMDA e o AMPA. O glutamato então é retirado da fenda sináptica por um transportador específico encontrado na membrana plasmática dos astrócitos, sendo convertido pela enzima glutamina sintetase em glutamina, a qual é liberada para o meio extracelular por transportadores e pode ser captada e utilizada pelos neurônios para a síntese do neurotransmissor (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017; VALLI; SOBRINHO, 2014).

Os receptores NMDA são expressos em todo o SNC e desempenham papéis essenciais na função sináptica, como plasticidade, aprendizagem e memória. Além de estarem envolvidos na fisiopatologia de vários distúrbios do SNC. Os receptores NMDA localizados nas membranas pós-sinápticas das sinapses excitatórias possuem maior permeabilidade ao íon cálcio do que os receptores AMPA e KA. Quando a membrana pós-sináptica se encontra em repouso o íon magnésio bloqueia os canais de NMDA, impedindo a entrada do íon cálcio para o neurônio a favor de seu gradiente de concentração. (HAUKVIK, *et al.*, 2018). Contudo, o

tempo que o glutamato permanece na fenda sináptica é controlado por receptores que estão nos neurônios pré e pós-sinápticos, e nas células da glia, enfatizando-se o papel do astrócitos neste processo. Quando ocorre falha nesse mecanismo o glutamato aumenta no meio extracelular favorecendo a entrada de cálcio no neurônio o que causa a morte neuronal, mecanismo denominado excitotoxicidade (WEBER; BACKES, 2016). De acordo com a hipótese glutamatérgica para a esquizofrenia, por exemplo, os receptores NMDA tem a sua ativação diminuída no encéfalo (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017). As possíveis causas dessa alteração dos receptores NMDA poderiam estar relacionados a eventos ambientais no início da vida, essa hipótese é conhecida como hipótese do neurodesenvolvimento (NETO; BRESSAN; FILHO, 2007).

1.4. Os Efeitos dos Estímulos Ambientais no Encéfalo

Diamond foi uma das pioneiras no estudo referente a como modificações ambientais podem alterar a morfologia do encéfalo. Seus estudos mostraram que o espessamento cortical e a arborização dendrítica neuronal, por exemplo, poderiam ser modificadas em diversas regiões encefálicas pelo isolamento social e pelo enriquecimento ambiental em ratos de laboratório. Em uma de suas pesquisas constatou que ratos submetidos ao enriquecimento ambiental tinham aumento no espessamento do córtex frontal e occipital quando comparado com o grupo controle (DIAMOND *et al.*, 1987). A partir dos estudos de Diamond diversas pesquisas surgiram e discutiram a relação do ambiente com modificações morfofuncionais encefálicas.

Segundo Polanczyk e Rohde (2013) o desenvolvimento do cérebro humano, desde as primeiras fases de vida intraútero até a vida adulta, ocorre de maneira gradual em complexidade e o impacto dos efeitos das experiências precoces vividas está relacionado com a capacidade do indivíduo responder a estímulos ambientais e se adaptar a eles. Além disso, esses mesmos autores consideram que experiências caracterizadas como estressantes influenciam de forma negativa o desenvolvimento do cérebro, comprometendo no decorrer da vida tanto a saúde mental quanto a saúde física. No entanto, ambientes enriquecidos com estímulos induzem o desenvolvimento saudável assim como a aquisição de habilidades cognitivas e emocionais.

Comassio (2017), em uma pesquisa com ratos jovens, observou que o enriquecimento ambiental pode ser eficiente para reverter alguns danos causados pelo estresse, bem como pela

separação materna. Assim como, pode auxiliar no tratamento de doenças psiquiátricas relacionadas a esse estresse. Em relação a isso, Bear, Connors e Paradiso (2017) destacam que estímulos sensoriais adequados, no início da infância, podem produzir mudanças adaptativas que ajudam a proteger contra o desenvolvimento de doenças mentais ao longo da vida.

Portanto, diversos mecanismos moleculares, celulares e neurobiológicos estão sendo estudados e apontados como mediadores das alterações causadas pelos eventos ambientais estressores no início da vida. Esses eventos podem estar associados a consequências negativas e duradouras que persistem até a vida adulta, gerando tanto alterações estruturais e funcionais do desenvolvimento cerebral, como ao aumento da vulnerabilidade para o desenvolvimento de psicopatologias na vida adulta, apresentando fenótipos específicos, como TDAH, ansiedade e responsividade ao estresse (SILVA, 2017; TRACTENBERG, 2016). Em relação a isso, Schoenfeld (2015) ressalta que eventos negativos no início da vida pós-natal como a separação materna podem reduzir a proliferação celular, neurogênese e geração de novos neurônios, podendo estar relacionados a maior predisposição a transtornos psiquiátricos ao longo da vida. Enquanto os eventos positivos como o enriquecimento ambiental são benéficos a saúde psíquica e aumentam a neurogênese na vida adulta. No entanto, entender quais são as modificações morfofuncionais que ocorrem nesses indivíduos ainda é um longo processo. Nesse sentido, modelos animais que utilizam a separação materna podem contribuir para o entendimento dessas alterações e fornecer informações em relação a etiologia de tais transtornos e auxiliar na prevenção e tratamento.

1.5. Separação Materna

A separação materna periódica entre a mãe e a prole tem sido utilizada em muitos estudos como modelo de estresse pós-natal e essa relação entre o dueto mãe-filho é essencial para manutenção neuro-humoral e de redes sinápticas que, conseqüentemente, influenciam no desenvolvimento emocional (BAUTISTA; DUEÑAS, 2012). Estudos demonstram que ratos que passaram por separação materna neonatal manifestam na fase adulta alta responsividade ao estresse, desencadeando déficits de aprendizado e memória, ansiedade e alterações na expressão de comportamentos (SILVA, 2012).

A partir das pesquisas realizadas com modelos experimentais em animais, pesquisadores tem discutido sobre as possíveis consequências que a separação materna pode ocasionar no

desenvolvimento infantil, podendo aumentar o risco à predisposição de doenças psiquiátricas. Diehl (2014) ressalta o modelo da separação materna em animais de laboratório, como os ratos neonatos que têm sido utilizadas para compreender como os efeitos ambientais adversos modificam a morfofisiologia encefálica e, conseqüentemente, o comportamento, bem como podem levar a predisposição a diversas patologias. As duas primeiras semanas de vida de ratos são caracterizadas como um período crucial para o desenvolvimento neural, considerando a separação materna um fator que pode causar alterações em parâmetros neurobiológicos e comportamentais.

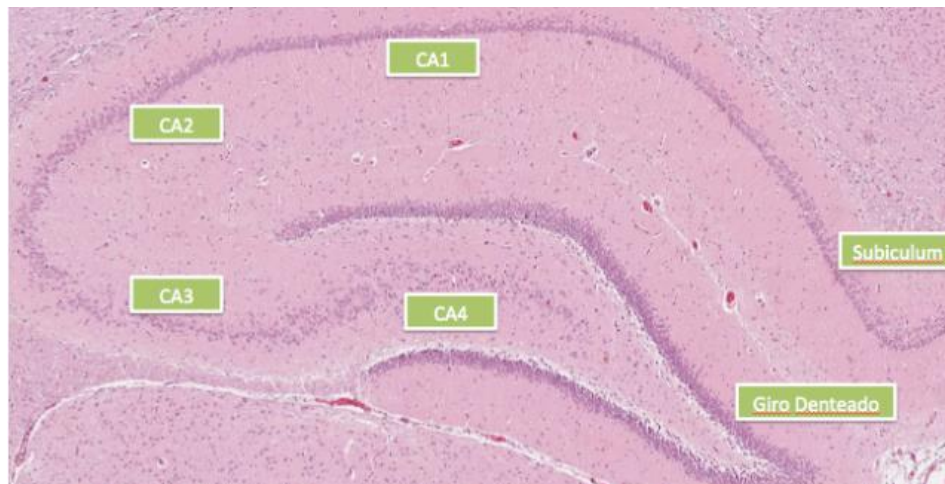
Com relação aos efeitos de experiências estressantes no início da vida Papadopoulou *et al.* (2019) afirmam que são eventos críticos que interferem na plasticidade e no desenvolvimento encefálico, levando a conseqüências em médio e longo prazo. Crianças que sofreram privação materna tendem a apresentar baixo desempenho em tarefas que envolvem memória de trabalho, atenção, planejamento e processos de aprendizagem. Além disso, indivíduos que passaram por tais eventos estão mais suscetíveis a problemas comportamentais na vida adulta, assim como dificuldades de aprendizagem e regulação emocional, abuso de drogas, transtorno de depressão e ansiedade. Os autores também afirmam que os efeitos comportamentais e moleculares dependem da duração, do tipo de privação materna e da predisposição individual. Entre as áreas encefálicas que são susceptíveis aos efeitos do estresse Papadopoulou *et al.* (2019) destaca o hipocampo que apresenta um papel significativo na formação da memória e está associados à questão da ansiedade, medo e processos cognitivos.

1.6. Estrutura e Função do Hipocampo

O hipocampo é a estrutura do cérebro associada principalmente à memória, faz parte do sistema límbico e está localizado no lobo temporal, especificamente na porção medial do assoalho do corno temporal do ventrículo lateral formando um arco ao redor do mesencéfalo. Recebe e envia informações para o resto do cérebro por meio do córtex entorrinal (YASSA, 2020). O hipocampo é uma estrutura dobrada, é constituído por duas camadas de neurônios, onde uma se dobra sobre a outra. Essas camadas neuronais são denominadas de giro denteado e corno de Ammon. O giro denteado (GD) é formado principalmente por células granulares, sendo considerada uma região trilaminar dividida em camada molecular, camada de células granulares e camada polimórfica (hilo), já o corno de Ammon apresenta neurônios piramidais

e 4 subcampos denominados de CA1, CA2, CA3 e CA4 (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017; OLIVEIRA, 2013), (Figura 1).

Figura 1 - Imagem histológica (hematoxilina-eosina) das principais áreas da formação hipocampal de ratos Wistar.



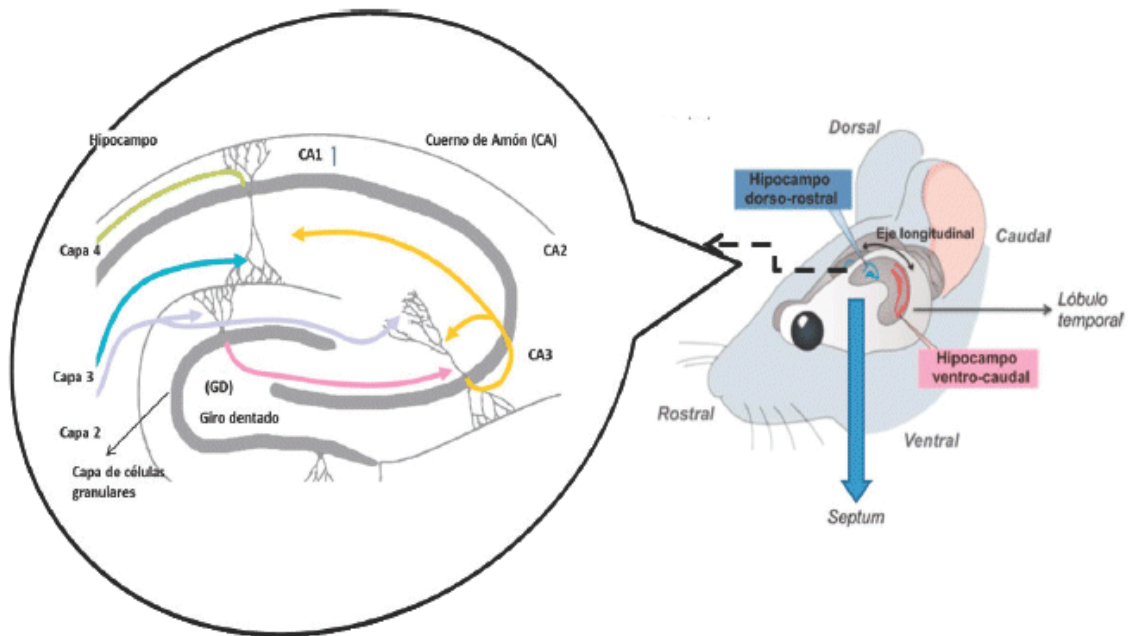
Fonte: BEZERRA, 2017.

Segundo Lorente de Nó (1934 apud SCHENBERG, 2010), a região C4 do corno de ammon é a região de encontro do corno de Ammon com o GD, CA3 é a região proximal ao GD e que recebe projeções das fibras musgosas, CA2 é uma pequena região distinta que divide CA3 e CA1, e CA1 recebe axônios da região CA3 e emite a maioria das eferências do corno de Ammon.

As sub-regiões que formam o hipocampo são conectadas por dois circuitos neurais principais, chamados de trissináptico por envolver três conjuntos de conexões sinápticas e monossináptico que transmite informações diretamente do córtex entorrinal para CA1 (YASSA, 2020) No circuito trissináptico os aferentes vindos externamente, ou seja, de fora do hipocampo, são as fibras perforantes. Os axônios da via perforante seguem até a camada molecular do giro denteado e fazem sinapse com as células granulares. Os neurônios do giro denteado projetam axônios através das fibras musgosas estabelecendo sinapses na região hilar e subcampo CA3. E por sua vez, a partir dos neurônios piramidais de CA3 emergem axônios que se ramificam, um dos ramos projetam seus axônios para fora do hipocampo através do fórnice e o outro enviam colaterais para a região CA1, sendo este último chamado de via colateral de Schaffer, que fazem sinapses com os dendritos de outras células piramidais, cujos

axônios estão projetados para fora do hipocampo (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017; LENT, 2010), (Figura 2).

Figura 2 - Circuito neural do hipocampo.



Fonte: UGARTE; CODINA; ZARATE, 2020.

Estudos sugerem que o giro dentado do hipocampo é rico em receptores de corticosteroides, atuando sobre a regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Este eixo medeia a resposta ao estresse por meio da liberação de hormônios direcionados como os glicocorticóides que tem baixa afinidade pelo cortisol e são ativados quando o estresse atinge seu pico no cérebro, e os mineralocorticóides que constituem a maioria dos receptores de corticosteroides de estresse com alta afinidade para o cortisol e são ativados assim que um estressor aparece (PAPADOPOULOU *et al.*, 2019). O estresse crônico, promovido pela separação materna, por exemplo, provoca modificações na expressão dos receptores para glicocorticóides, reduzindo a retroalimentação negativa do hipocampo sobre o eixo HPA, induzindo ao aumento dos níveis de corticosterona em roedores e cortisol em humanos (SILVA, 2012).

O hipocampo está ligado ao processamento de informações cognitivas e emocionais e essas funções estão distribuídas ao longo do eixo dorsoventral do hipocampo, ou seja, em ratos o hipocampo está dividido em regiões dorsal e ventral, e estas correspondem respectivamente

a divisão posterior e anterior do hipocampo em humanos. (GULYAEVA, 2015; LEE *et al.*, 2019). No que diz respeito a função do hipocampo Fanselow e Dong (2010) ressaltam que o hipocampo dorsal está relacionado com as funções cognitivas, principalmente a memória, enquanto o hipocampo ventral desempenha funções mais relacionadas a emoção, ao afeto e a ansiedade. Além, disso Kheirbek *et al.* (2013), ressaltam que o giro denteado está relacionado não apenas ao aprendizado e a memória, mas também com a fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos, como a ansiedade, e dependendo da localização no eixo dorso-ventral do hipocampo as células controlam características específicas, como por exemplo, a presença de células granulares que controlam características específicas da ansiedade e aprendizagem.

De acordo com Zaverucha-do-Valle (2013) a região de interface entre o hilo e a camada granular, chamada de zona subgranular, produz em torno de 100 a 150 novos neurônios por dia e tais neurônios se diferenciam em neurônios granulares na camada granular. Esses novos neurônios parecem ter uma grande relevância não apenas para aprendizagem e memória, mas também para transtornos de humor. Malberg, Hen e Madsen (2021) observaram que o tratamento crônico com drogas antidepressivas aumenta a neurogênese hipocampal na zona subgranular. Alguns estudos sugerem que o tempo de latência para os efeitos positivos observados clinicamente na utilização de medicamentos antidepressivos é similar ao tempo de maturação e integração funcional dos novos neurônios no giro denteado humano (MALBERG, 2004; ERNST *et al.*, 2006).

Por outro lado, Peng e Bonaguidi (2017) ressaltam que fatores fisiológicos e patológicos podem afetar a geração e sobrevivência de novos neurônios no giro denteado, como o estresse. Diversos trabalhos apontam que elevados níveis de corticosteróides plasmáticos influenciam na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, suprimindo a neurogênese (ODAKA, ADACHI, NUMAKAWA, 2017). Segundo Abbink (2019), adversidades ocorridas na infância na forma de estresse, inflamação ou desnutrição podem aumentar o risco de desenvolver psicopatologia ou problemas cognitivos na idade adulta. Contudo, algumas intervenções podem restaurar a neurogênese e proporcionar efeitos ansiolíticos e antidepressivos, ou seja, podem interferir na progressão de doenças. A partir disso, este trabalho propôs estudar especificamente o giro denteado dorsal, que é a região do hipocampo amplamente estudada nas pesquisas que avaliam a neurogênese hipocampal, e na qual o estresse neonatal da separação materna causa alterações estruturais e bioquímicas no hipocampo, altera funções cognitivas como a memória,

além de afetar o funcionamento biopsíquico. Estudos que analisaram transtornos psiquiátricos em humanos evidenciaram disfunção e redução do volume hipocampal relacionados ao transtorno de humor (BARCH *et al.*, 2019), depressão (RODDY *et al.*, 2019), transtorno de estresse pós-traumático (CHEN *et al.*, 2018), esquizofrenia e transtorno bipolar (HAUKVIK *et al.*, 2018). Portanto, o giro denteado do hipocampo é uma estrutura bastante relevante para estudar os efeitos do estresse crônico sobre o encéfalo.

1.7. Problema

- Os animais submetidos à separação materna (SM) diferem na área imunopositiva para GFAP, na região do giro denteado do hipocampo rostral, em relação aos animais do grupo controle (C)?

1.8. Hipótese

- Hipótese nula: A separação materna não modifica a área imunopositiva para astrócitos em ratos jovens.

$$H_0: C = SM$$

- Hipótese alternativa: A separação materna altera a área imunopositiva para astrócitos em ratos jovens.

$$H_0: C > SM$$

$$H_0: C < SM$$

1.9. Justificativa

A ocorrência de eventos estressantes durante a infância pode aumentar o risco de desenvolvimento de doenças psiquiátricas. O hipocampo é sensível aos efeitos do estresse, sendo um regulador do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A ativação do hipocampo suprime a liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), uma vez que os receptores glicocorticóides hipocampais participam da regulação do eixo HPA por retroalimentação, inibindo a liberação do CRH quando os níveis de cortisol estão elevados (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017).

Pesquisas destacam que o estresse crônico pode causar a degeneração do hipocampo impactando na redução no seu volume. As causas dessa redução podem estar relacionadas com a morte de neurônios, a retração das ramificações e a diminuição do número de células, incluindo astrócitos.

Nesse contexto a separação materna se caracteriza como um fator estressante e tem sido utilizada em alguns estudos como modelo experimental para analisar como efeitos adversos no início da vida podem modificar a morfofisiologia de estruturas encefálicas e, conseqüentemente, o comportamento, destacando a sua possível relação com a predisposição ao desenvolvimento de doenças psiquiátricas. Por outro lado, trabalhos discutem os possíveis benefícios de estímulos ambientais no desenvolvimento neurobiológico e psicológico do indivíduo. Diante do exposto ressalta-se a importância desta pesquisa em avaliar se animais jovens (21 dias) submetidos à separação materna apresentam alterações na área imunopositiva para astrócitos no córtex hipocampal, buscando dessa forma compreender as modificações morfofisiológicas causadas por eventos estressantes ocorridos nas fases iniciais do desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estudar se animais jovens (21 dias) submetidos à separação materna apresentam alterações na área imunopositiva para astrócitos no córtex hipocampal.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a imunorreatividade da proteína acida fibrilar glial (GFAP) no giro denteado do hipocampo de animais submetidos à separação materna.
- Analisar se a separação materna causa alterações na área imunopositiva para GFPA em camadas específicas do giro denteado, como nas camadas granular, molecular e polimórfica do hipocampo de animais jovens.
- Analisar se a separação materna altera o volume de camadas específicas do giro denteado, como nas camadas granular, molecular e polimórfica do hipocampo de animais jovens.

3. METODOLOGIA

3.1. Tipo de Pesquisa

Este estudo trata-se de uma pesquisa experimental descritiva de abordagem quantitativa. Segundo Lose e Magalhaes (2019) a pesquisa experimental é um valioso procedimento que tem a finalidade de testar hipóteses que estabeleçam relações de causa e efeito entre as variáveis. Para Gil (2008, p. 16), “o método experimental consiste essencialmente em submeter os objetos de estudo à influência de certas variáveis, em condições controladas e conhecidas pelo investigador, para observar os resultados que a variável produz no objeto.”

No que diz respeito a abordagem quantitativa, Vieira (2010) ressalta que essa abordagem utiliza a linguagem matemática para quantificar dados e assim descrever as causas, as consequências e as relações entre os fenômenos.

3.2. Local da Pesquisa

A pesquisa foi dividida em 3 fases e cada uma foi realizada em um local diferente.

- **Fase A:** a fase de experimentos comportamentais foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária do Campus de Castanhal da Universidade Federal do Pará.
- **Fase B:** a fase de experimentos morfológicos foi realizada na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- **Fase C:** a fase de quantificação estereológica foi executada na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Pará, campus Altamira.

3.3. Questões Éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (071.2014). O presente Trabalho de Conclusão de Curso constitui uma porção de um trabalho amplo que analisa os efeitos da separação materna e do enriquecimento ambiental em subtipos de neurônios e células gliais em regiões como o hipocampo e o córtex pré-frontal medial. Todos os animais utilizados na pesquisa foram manipulados de acordo com as leis nacionais e internacionais (Diretriz de Conselho da Comunidade Européia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC) que regem a execução de experimentos com animais de laboratório em condições éticas de trabalho. Os animais foram mantidos em condições padrão, com acesso a

comida e água *ad libitum*, temperatura ambiente em cerca de 22°C e ciclo claro/escuro de 12 horas.

3.4. Coleta de Dados

Durante um período de aproximadamente 100 dias de idade um grupo de ratas Wistar foram colocadas para acasalamento de forma monogâmica no período de 1 semana, e em seguida direcionadas para caixas individuais. Passados 20 dias do acasalamento as ratas foram acompanhadas diariamente com o objetivo de verificar o dia de nascimento dos filhotes, sendo considerado o dia do nascimento como o dia P0. No dia seguinte ao nascimento, P1, observou-se o número de filhotes por ninhada, sendo incluídos no estudo apenas ninhadas entre 7 a 11 filhotes.

A partir do nascimento dos filhotes iniciou-se a primeira fase do estudo, sendo um total de três fases divididas em: **fase a:** experimentos comportamentais; **fase b:** experimentos morfológicos; **fase c:** Quantificação estereológica – as duas primeiras fases foram executadas em parceria com a Faculdade de Medicina Veterinária do Campus de Castanhal da UFPA e a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, respectivamente, e a fase c foi executada neste trabalho.

A fase de Experimentos Comportamentais diz respeito ao procedimento de separação materna. Os filhotes submetidos à separação materna foram separados da mãe e levados a uma sala adjacente. A separação ocorreu entre os dias P1 a P14, 3 horas por dia, das 09:00 às 12:00. Para o procedimento as ninhadas foram mantidas sobre lençol térmico para evitar perda de calor, e depois foram devolvidas às suas respectivas mães, enquanto o grupo controle continuava com suas mães sem haver nenhuma manipulação (Figura 3). No P7 e P14 a maravalha de todas as caixas foram trocadas e os animais pesados. No P21 foi realizado o desmame e os filhotes machos provenientes de uma mesma ninhada, de cada procedimento, foram subdivididos formando os grupos: (1) animais controles e (2) submetidos à separação materna. Posteriormente, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca para retirada dos encéfalos.

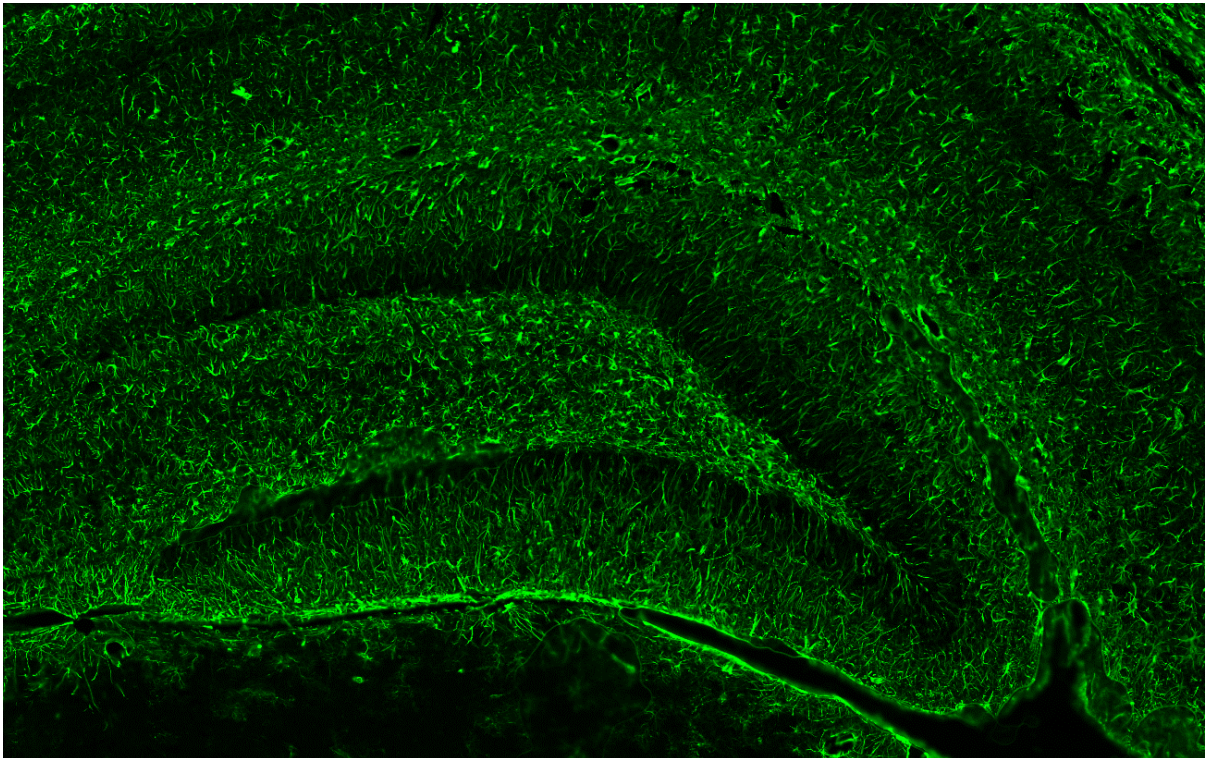
Figura 3 - Ninhada submetida ao procedimento de separação materna.



Fonte: MERLO, 2014.

Na fase de Experimentos Morfológicos os encéfalos foram fixados, congelados e seccionados em criostato (cortes de 30 μ m). As secções foram coletadas, e colocadas sobre lâminas gelatinizadas, de acordo com o SURS (“Systematic uniformly random sampling”), utilizando-se 1 a cada 15 secções, com o objetivo de fazer uma estimativa da área de interesse analisando todo o volume do hipocampo rostral. As lâminas contendo as secções foram submetidas ao procedimento de imunofluorescência para a proteína GFAP (Figura 4) e Parvalbumina, com o objetivo de marcação da área imunopositiva para astrócitos e proteínas ligantes de cálcio, respectivamente, considerando que para essa pesquisa serão utilizadas apenas as imagens com marcações para GFAP. Por fim, os cortes foram observados e suas imagens capturadas com a objetiva de 20x no Olympus VS120 Virtual Slide Microscope, o qual escaneia regiões específicas do hipocampo em alta resolução através da reconstrução bidimensional da estrutura encefálica analisada.

Figura 4 - Imagem com marcações para GFAP.

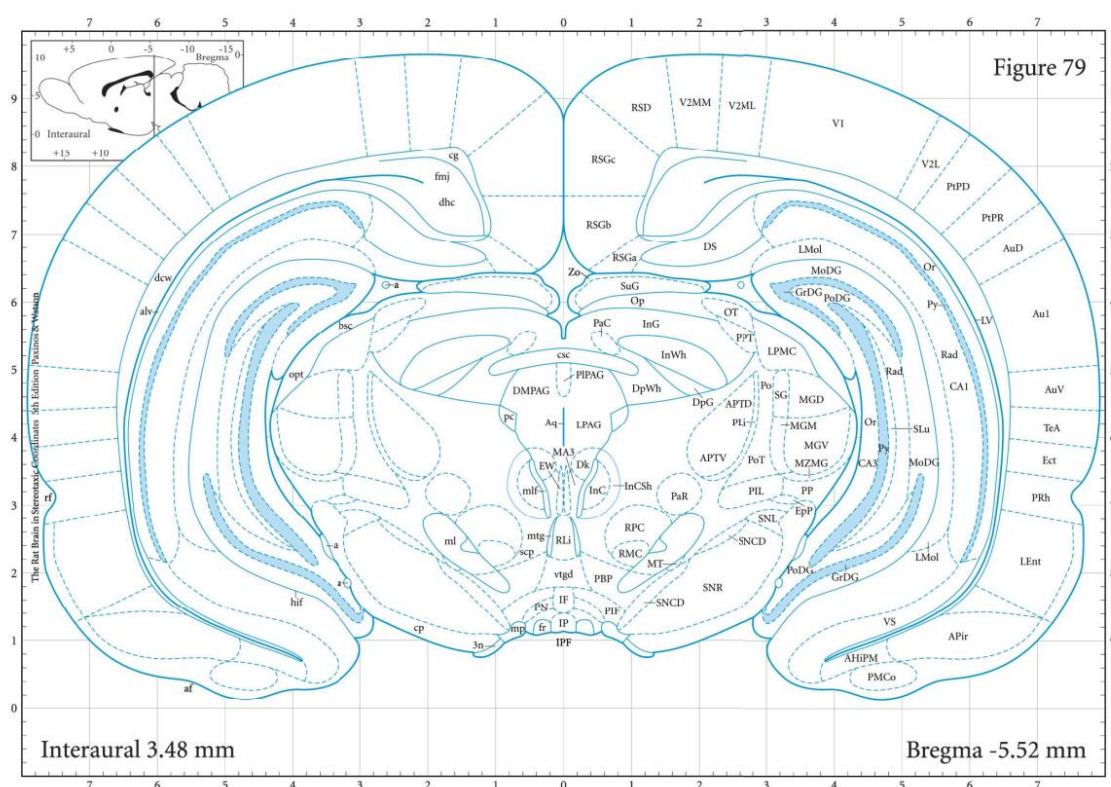
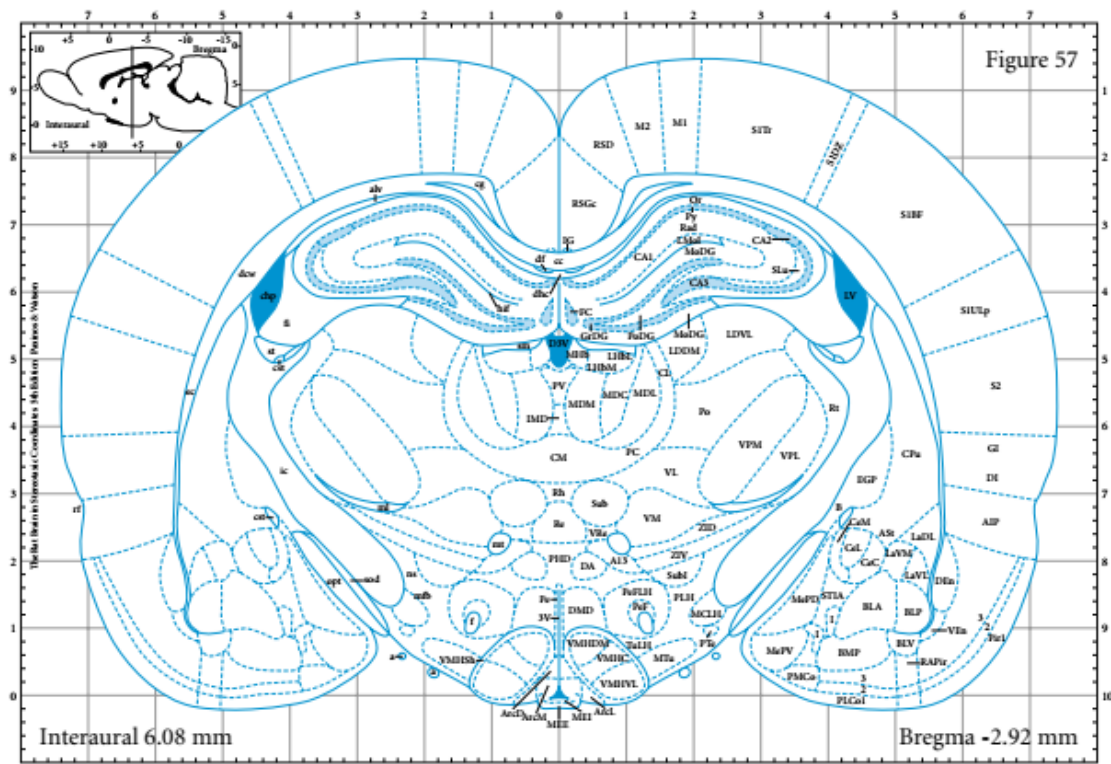


Fonte: Arquivo Pessoal.

3.5 Quantificação Estereológica

A fase de Quantificação Estereológica foi executada neste projeto da seguinte maneira: foram analisadas 1 a cada 15 secções (intervalo de 450 μm), entre os bregmas $\sim 2,92$ a $\sim 5,52$ (figura 5), em ambos os lados do hipocampo, correspondendo ao hipocampo rostral. Sendo quantificadas de 6 a 8 secções por animal do giro denteado, obedecendo os princípios estereológicos mencionados.

Figura 5: A quantificação foi realizada no hipocampo rostral, correspondendo as secções entre os bregmas 2,92 a 5.52, observados na imagem.



Fonte: PAXINOS; WATSON, 2005.

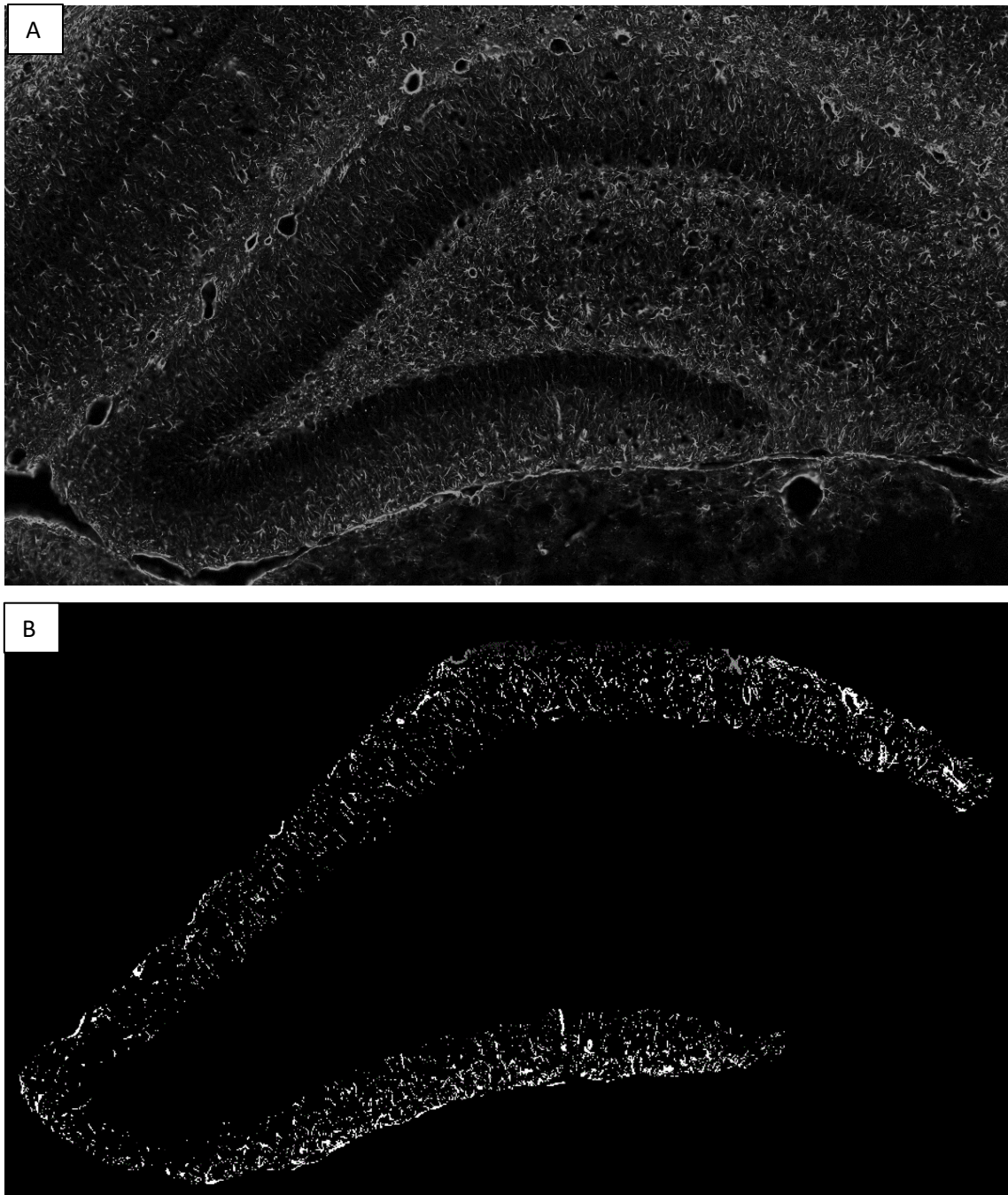
Para extração e quantificação das imagens foi utilizado o software gratuito *ImageJ* (NIH, *National Institutes of Health*), com o qual é possível extrair as imagens e salvá-las no formato TIFF. Para isso o programa foi utilizado da seguinte forma: acessa-se o *Plugin – BIOP – VSI reader*, seleciona-se a área de interesse para extrair a imagem em alta resolução usando o *Extract current ROI*, em seguida a imagem foi salva em *tiff (8 bits)* para reduzir o tamanho da imagem, e os canais separados para as diferentes marcações Parvalbumina e GFAP, considerando que para esse TCC foram utilizadas apenas as imagens com marcações para GFAP. Posteriormente, foi realizada a quantificação da seguinte maneira: primeiramente foi escolhida a imagem, selecionando-se a área de interesse: camada granular, camada molecular ou o hilo. Em seguida, a marcação da área imunopositiva foi selecionada por meio do *Threshold*, e, finalmente a aquisição dos valores foi realizada automaticamente por meio dos comandos *Measure* e *Measure Particles*, que medem a área da estrutura e a área imunopositiva para GFAP (figura 6), respectivamente.

Para a quantificação da área imunopositiva para GFAP foi utilizada a fórmula $A = \sum a.f$ (μm^2); onde, A = área total, $\sum a$ = somatória área imunopositiva para GFAP, f = fração associada ao número de secções analisadas.

Para a quantificação da porcentagem da área GFAP⁺ em relação a área das estruturas a área imunopositiva para GFAP foi dividida pela área das camadas específicas, sendo esse valor convertido em porcentagem, ou seja, multiplicado por 100.

Para a quantificação do volume das camadas foi utilizada a fórmula $V = \sum a.f.e$ (μm^3); onde, V = volumes, $\sum a$ = somatória da área das camadas, f = fração associada ao número de secções analisadas (ou seja, 15), e = espessura do corte (ou seja, 0,20 μm).

Figura 6 - A) representa a marcação imunopositiva para GFAP no hipocampo; B) representa a camada molecular, a região em branco apresenta a área marcada positivamente e imagem de fundo preto área não marcada.



Fonte: arquivo pessoal.

3.6 Análise dos Dados

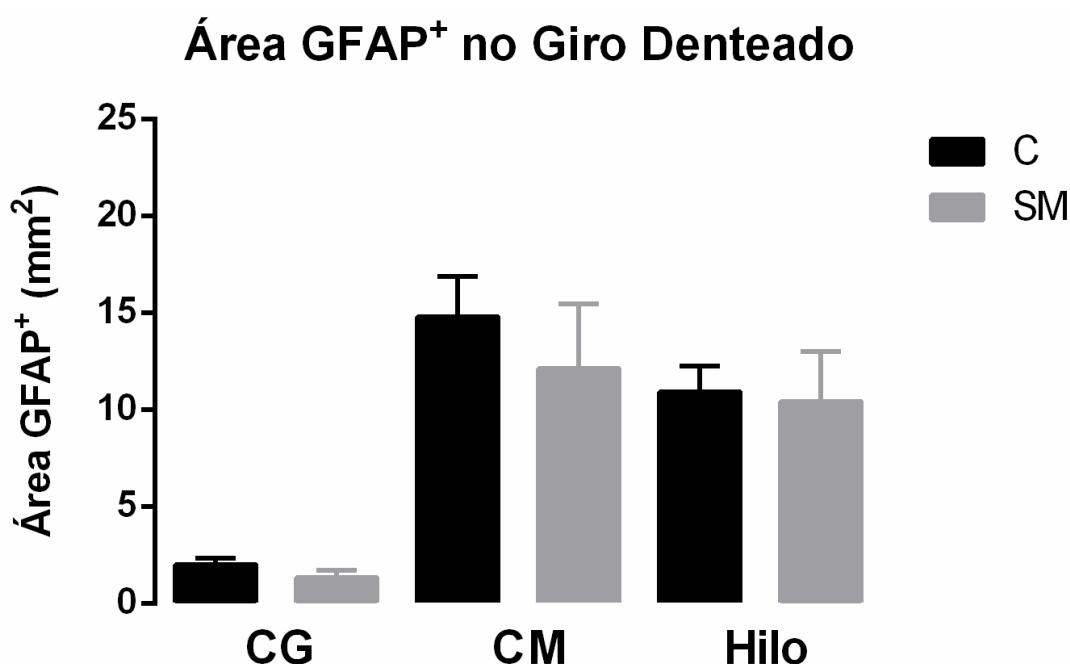
Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. A comparação entre os grupos foi realizada pelo o *teste t*, considerando um nível de significância de $p < 0,05$. Foi utilizado o programa STATISTICA (versão 10.0) para as análises estatísticas e o programa PRISMA (versão 6.0) para os gráficos.

4. RESULTADOS

Na pesquisa animais submetidos ao procedimento da separação materna (SM), conforme descrito anteriormente, foram comparados com animais do grupo controle (C), sendo analisadas a área GFAP positiva, a porcentagem GFAP positiva e o volume das seguintes subregiões do Giro Denteado: Camada Granular (CG); Camada Molecular (CM) e Hilo. Na análise investigou-se a região dorsal do hipocampo que está relacionada aos processos cognitivos, apresentando um papel fundamental nos processos de memória e aprendizagem (BALLESTEROS, 2012). Os dados foram expressos como média +/- erro padrão, e o nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

O **gráfico 1** representa a área imunopositiva para GFAP na região dorsal do hipocampo: CG ($t = 1,17385$; $df = 6$; $p = 0,284933$); CM ($t = 0,572253$; $df = 6$; $p = 0,587935$) e hilo ($t = 0,137280$; $df = 6$; $p = 0,895300$). Os dados foram expressos como média +/- erro padrão, com os seguintes resultados: grupo controle (CG = $1,9800 \pm 0,37287$; CM = $14,8067 \pm 2,07979$; hilo = $10,9100 \pm 1,35237$, $n = 3$) e grupo separação materna (CG = $1,34600 \pm 0,349823$; CM = $12,13600 \pm 3,309644$; hilo = $10,41800 \pm 2,583853$, $n = 5$). Os resultados não sugerem diferenças significativas entre os grupos experimentais controle e separação materna.

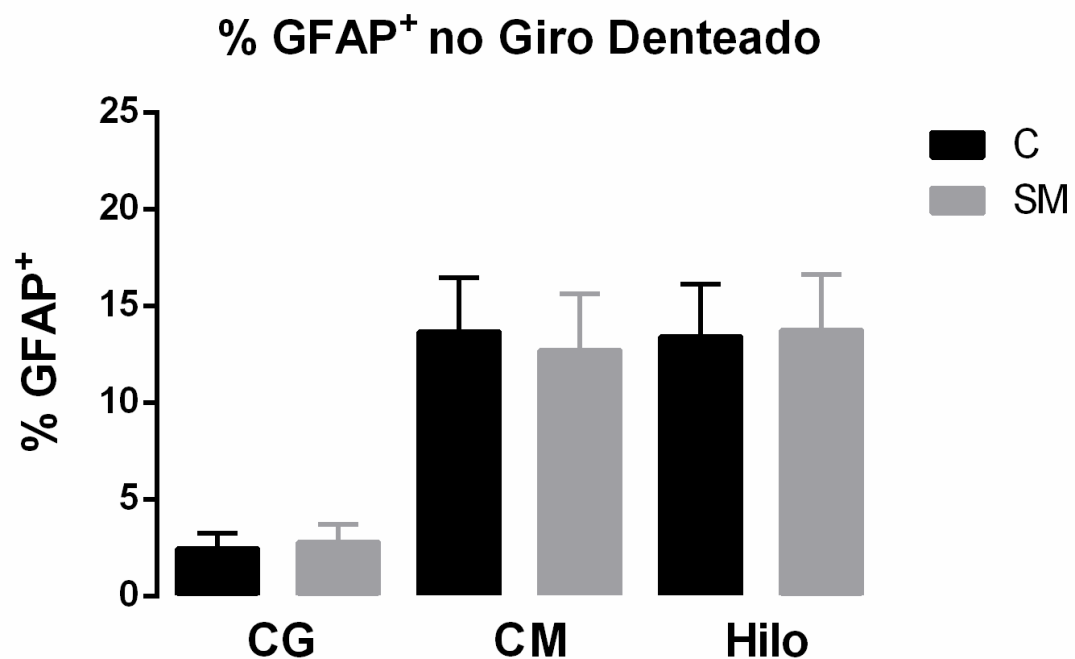
Gráfico 1 - representa a área imunopositiva para GFAP no hipocampo dorsal nas três camadas analisadas. Os resultados não sugerem diferenças significativas entre os grupos experimentais.



Fonte: arquivo pessoal.

O **gráfico 2** representa a porcentagem da área marcada positivamente para GFAP no giro denteado em relação a área das três camadas analisadas: CG ($t = -0,260630$; $df = 6$; $p = 0,803092$); CM ($t = 0,220341$; $df = 6$; $p = 0,832912$); hilo ($t = -0,299957$; $df = 6$; $p = 0,774330$). Os dados foram expressos como média +/- erro padrão, com os seguintes resultados: grupo controle (% CG = $2,4667 \pm 0,76564$; % CM = $13,6800 \pm 2,75768$; % hilo = $13,4333 \pm 2,69759$) e grupo separação materna (% CG = $2,80800 \pm 0,888214$; % CM = $12,71400 \pm 2,920631$; % hilo = $14,86000 \pm 3,246791$). Os resultados não sugerem diferenças significativas entre os grupos experimentais.

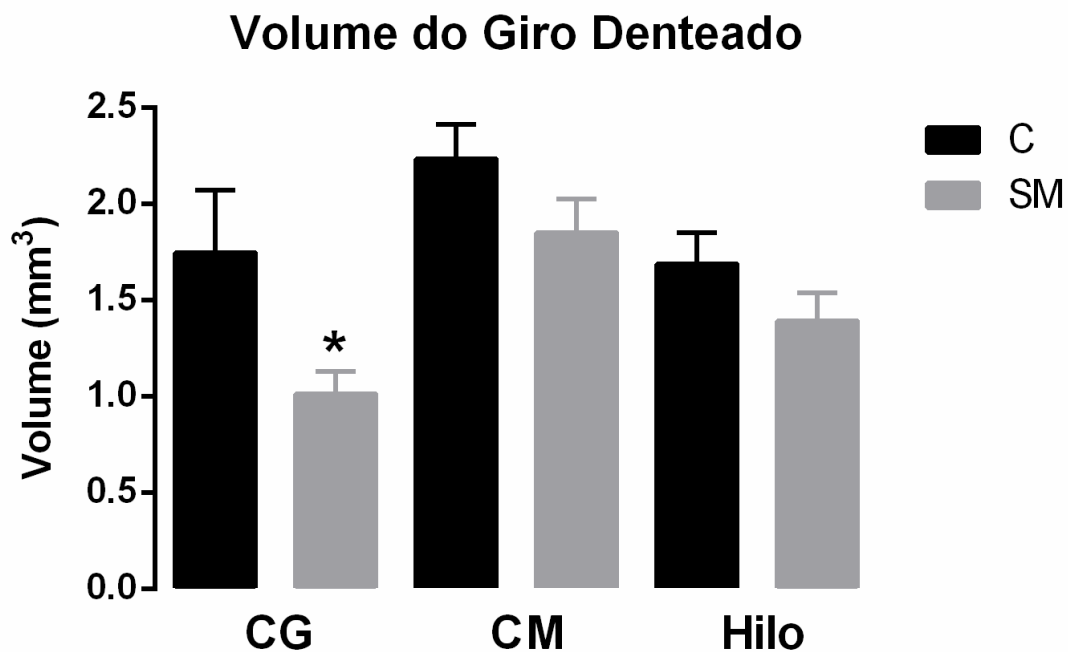
Gráfico 2 - representa a porcentagem da área marcada positivamente para GFAP no giro denteado em relação a área marcada para GFAP das três camadas analisadas. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais analisados.



Fonte: arquivo pessoal.

O **gráfico 3** representa o volume das camadas analisadas: CG ($t = 2,590211$; $df = 6$; $p = 0,041200$); CM ($t = 1,427971$; $df = 6$; $p = 0,203216$) e hilo ($t = 1,278371$; $df = 6$; $p = 0,248341$). Os dados foram expressos como média +/- erro padrão, com os seguintes resultados: grupo controle (CG = $1,7471 \pm 0,32693$; CM = $2,2342 \pm 0,17735$; hilo = $1,6895 \pm 0,17735$) e grupo separação materna (CG = $1,01364 \pm 0,114164$; CM = $1,85008 \pm 0,176821$; hilo = $1,39364 \pm 0,148713$). Os resultados sugerem que os animais submetidos à separação materna tiveram redução no volume da camada granular em relação aos controles. Na camada molecular e no hilo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Gráfico 3 - apresenta o volume das camadas granular, molecular e hilo do giro denteado. Observou-se redução no volume na camada granular do hipocampo de animais submetidos à separação materna. Na camada molecular e no hilo não foram observadas diferenças significativas.



Fonte: arquivo pessoal.

5. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm utilizado modelos animais para investigar os efeitos que os eventos adversos no início da vida podem causar a curto e longo prazo no encéfalo de roedores. A separação materna simula eventos estressantes neonatais (ALVES, 2020). Corroborando com esses estudos há pesquisas que utilizam neuroimagem ou tecidos pós-morte para avaliar as alterações no encéfalo de humanos, correlacionando tais alterações com os transtornos neurológicos e psiquiátricos apresentados pelo grupo estudado. Os resultados obtidos nesses estudos podem ajudar a compreender as alterações morfológicas, bioquímicas e comportamentais apresentadas em determinadas patologias. No entanto esses resultados dependem da idade e sexo do grupo de estudo, do tempo que estão submetidos ao estresse, da região analisada, da dieta oferecida, dos estímulos ambientais que estão submetidos, entre outros fatores.

O presente estudo analisou a área GFAP positiva, a porcentagem GFAP positiva e o volume da Camada Granular (CG), Camada Molecular (CM) e Hilo do Giro Denteado Dorsal do Córtex Hipocampal de animais jovens submetidos a separação materna. As três camadas analisadas apresentam diferenças morfofuncionais importantes: CM é a camada mais externa, caracterizada pela relativa ausência de corpos celulares, sendo basicamente ocupada por dendritos das células granulares, células gliais, e as extremidades dos axônios dos neurônios provenientes do córtex entorrinal; a CG é a principal camada de alta densidade de neurônios, caracterizada pela presença de neurônios com corpos relativamente pequenos, sua localização permite a projeção de dendritos para a camada molecular e o envio de axônios para a camada CA3 hipocampal e, a partir desta, direcionam-se para CA1 pelos feixes colaterais de Schaffer, tendo por fim o circuito completado por projeções para o subículo e córtex entorrinal; o Hilo é uma camada de células polimórficas, tais células estão situadas na região interna do GD, é uma área de transição para os axônios das células granulares que se dirigem para a camada molecular hipocampo (HIGA, 2017). Assim, a expressão de GFAP varia entre as regiões analisadas. Comassio (2017) observou que a proteína GFAP é mais expressa na camada molecular do que na camada granular do hipocampo, consistente com os achados morfológicos observados.

Em relação a área e porcentagem GFAP positivas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais nas três camadas analisadas. Musholt e

colaboradores (2009) observaram uma redução no número de células GFAP positivas no córtex pré-frontal medial de animais com 14 dias de idade submetidos à separação materna única com duração de 1 ou 6 horas aproximadamente 24 horas antes de seu sacrifício. Na camada CA1 do hipocampo não foram identificadas diferenças entre os grupos experimentais. Comassio (2017) não observou diferenças significativas na expressão da proteína GFAP em animais controle ou submetidos à separação materna, num protocolo experimental similar ao do presente estudo, quando analisados com aproximadamente 60 dias de vida. Banqueri e colaboradores (2019) compararam ratos adultos (100 dias de vida) controle com ratos submetidos à separação materna neonatal 4 horas diárias do 1º ao 21º dia pós-natal. Os autores observaram redução no número de células GFAP positivas no córtex pré-límbico, córtex cingulado, estriado dorsal, núcleo accumbens, giro denteado e camadas CA3 e CA1 do hipocampo.

As diferenças observadas entre os trabalhos podem estar relacionadas com as diferenças entre os protocolos experimentais, bem como idade de análise do encéfalo dos animais. Nesse sentido Silva (2017) estudou a ativação de GFAP em tecido cerebral em diferentes fases do desenvolvimento (infância, adolescência, adultos jovens e adultos) de ratos Wistas submetidos à privação dos cuidados maternos. Foi observado que os níveis de células imunopositivas de GFAP diminuíram nos estágios iniciais de desenvolvimento, mas foram aumentando em períodos tardios, sugerindo que a privação materna pode afetar a expressão das células astrocíticas e microglias. Réus (2018) obteve resultados semelhantes ao que foi apresentado por Silva (2017), investigou os marcadores de microglia e ativação de astrócitos em ratos submetidos a separação materna no início da vida, sendo realizadas avaliações nos dias 10, 20, 30, 40 e 60 dias pós-natal, e constatou que o nível de células imunopositivas para GFAP diminuíram nos estágios iniciais da vida, mas se elevaram nos períodos de desenvolvimento posteriores. E na fase adulta foi observado comportamento semelhante ao depressivo ressaltando que estresse no início da vida induz uma resposta negativa no desenvolvimento de ratos.

Por outro lado, Baudista e Dueñas (2012) estudaram não apenas os efeitos da separação materna, mas também a sua relação com o período de amamentação em diferentes sexos. Os autores observaram aumento de astrócitos marcados com GFAP no córtex pré-frontal de machos separados e uma marcação inferior nas fêmeas. No hipocampo e na área pré-óptica, houve diminuição apenas nos machos separados e não ocorreu diferenças no núcleo

paraventricular ou amígdala. Assim, a separação materna durante a amamentação induziu mudanças permanentes no número de astrócitos em diferentes áreas do cérebro em ambos os sexos. O presente trabalho apenas analisou os efeitos da separação materna em animais do sexo masculino.

Em modelos de estresse neonatal em roedores, Oreland e colaboradores (2010) observaram que a separação materna de 360 minutos diários do 1º ao 21º dia pós-natal aumenta o número e a densidade de neurônios granulares no giro denteado comparados a ratos controle, ambos os grupos sacrificados com 22 dias de vida. Os autores não observaram diferenças significativas no volume do giro denteado.

Estudos sugerem que o estresse neonatal provoque maturação acelerada do hipocampo de camundongos machos. Foi observado um aumento nos níveis de corticosterona, na densidade de células parvalbumina positivas (uma proteína ligante de cálcio associada a maturação neuronal) e em outros marcadores de maturidade sináptica nos animais submetidos ao estresse neonatal. Por outro lado, foi observada redução na marcação para Ki-67 (um marcador de proliferação celular) e de doublecortina (marcador de neuroblastos) nesses mesmos animais (BATH; MANZANO-NIEVES; GOODWILL, 2016). Suri e colaboradores (2013) observaram que a separação materna influencia no número de células doublecortinas positivas dependendo da idade de sacrifício dos animais. Os animais submetidos ao estresse neonatal possuem aumento do número de células doublecortina positivas quando analisados aos 21 dias de vida, aos 2 meses não são observadas diferenças significativas, e aos 3 meses de vida foi observada redução no número celular.

Ruiz e colaboradores (2018) analisaram o efeito da separação materna em ratos de 4 e 10 meses de idade. Os autores observaram que os animais analisados com 10 meses de idade apresentam alterações no comportamento associadas à depressão, bem como possuem maior risco de obesidade. Os animais analisados com 4 meses de idade apresentam redução na neurogênese apenas no hipocampo dorsal, enquanto que os animais com 10 meses apresentam redução na neurogênese no hipocampo dorsal e ventral. Em conjunto, esses trabalhos sugerem que a separação materna influencia na maturação hipocampal, a qual é influenciada pelas células gliais, bem como demonstram a importância do estudo do hipocampo dorsal em animais mais jovens.

No presente trabalho observamos redução do volume da camada granular do hipocampo nos animais submetidos à separação materna em comparação com o grupo controle, mas não encontramos diferenças significativas na camada molecular e no hilo. Deste modo, a partir dos resultados observados nesta pesquisa e dos trabalhos da literatura podemos sugerir que essa redução no volume da camada granular poderia estar relacionada principalmente a uma redução nos neurônios granulares causados pelo estresse neonatal, o que poderia estar relacionado com a redução na neurogênese no giro denteado.

Em relação aos trabalhos em humanos, Tannous *et al.* (2018) analisaram o volume hipocampal em imagens de ressonância magnética de crianças de 8 a 18 anos. Os autores constataram que crianças com transtorno de humor apresentam volume reduzido na região CA1, CA4 direito e subículo direito, bem como na camada de células granulares e camada molecular do giro denteado do hipocampo. Humphreys *et al.* (2019), analisaram por meio de entrevistas e imagens de ressonância magnética as influências da exposição de experiências estressantes no hipocampo de 78 adolescentes entre 9 e 13 anos, considerando a idade de início e a gravidade de tais eventos, e constataram que o período sensível está associado ao início do estresse na primeira infância (até 5 anos de idade) na qual foi observada redução do volume do hipocampo. Cobb *et al.* (2016) também evidenciou redução no volume do hipocampo pós-morte de 17 indivíduos com transtorno depressivo em uso ou não de antidepressivos, essa redução de volume era proporcional ao tempo de doença. Os autores utilizaram GFAP para analisar a expressão de astrócitos no hipocampo e observaram redução significativa da densidade de astrócitos no hilo dos indivíduos que não faziam uso de medicação, com área imunopositiva para GFAP significativamente diminuída no giro denteado das mulheres quando comparada com homens. Essa redução pode estar relacionada com a redução da expressão de sinapses e captação do glutamato.

Li Y *et al.* (2019) realizaram um estudo comparando dados humanos e modelos animais para assim investigar as causas e consequências das mudanças morfofuncionais do hipocampo. De acordo com esse estudo os déficits hipocampais são prevalentes em ambos os modelos utilizados e, alguns fatores genéticos e ambientais podem favorecer a ocorrência de distúrbios do neurodesenvolvimento, considerando que o hipocampo apresenta altos níveis de plasticidade

sináptica dependente da atividade e neurogênese vitalícia. Além disso, o hipocampo apresenta grande sensibilidade aos efeitos comportamentais associados as suas diferentes sub-regiões.

Esses dados em conjunto demonstram que os efeitos da separação materna são dependentes do protocolo de estresse neonatal, da idade do animal e das regiões analisadas. No presente trabalho analisamos o hipocampo de animais submetidos à separação materna do 1º ao 14º dia pós-natal, durante 3 horas diárias, sendo os encéfalos analisados no 21º dia pós-natal. Não observamos diferenças significativas, como mencionado, na área na porcentagem GFAP positivas entre os grupos experimentais, mas observamos redução exclusivamente no volume da camada granular do giro denteado destes animais. Em relação a importância do modelo animal utilizado nesse estudo, Silva *et al.* (2012) destaca que pesquisas que utilizam o modelo animal, principalmente roedores, possibilitam um comparativo entre os fenótipos comportamentais dos animais e do ser humano tornando-se uma ferramenta de grande importância no auxílio da determinação da etiologia de transtornos psiquiátricos. Em relação a isso, Mosini, Massinhani e Calió (2018) afirmam que o estudo em modelos animais auxilia a comunidade científica a compreender os mecanismos que alteram a função neural para assim propor terapias que beneficiem indivíduos com doenças neurológicas. Semelhante ao que foi realizado nessa pesquisa, Fieis e Magalhaes (2010) ressaltam que o estudo em modelo animal permite a análise de regiões cerebrais específicas em resposta a estímulos variados e que somado ao avanço das tecnologias esse método tornou-se uma ferramenta de grande significado no estudo de doenças psiquiátricas.

Por fim, os dados em conjunto apresentados neste trabalho corroboram com a hipótese do neurodesenvolvimento a qual determina o processo de desenvolvimento encefálico partir das interações celulares, considerando que o giro dentado do hipocampo é uma região onde a neurogênese persiste até a idade adulta e a camada de células granulares dessa região contém neurônios gerados nas diferentes fases de desenvolvimento (embrionária, pós-natal inicial e adulta). (HOCHGERNER *et al.*, 2018). Os neurônios gerados na fase adulta são um ponto central no que diz respeito a função do hipocampo e a plasticidade cerebral (MONGT; SCHINDER, 2011). De acordo com Peng e Bonaguidi (2017) a neurogênese hipocampal adulta está relacionada ao aprendizado, a memória e ao processamento emocional, como estresse e depressão, sendo muito influenciada pelo ambiente local e extrínseco. As células gliais tem um papel extremamente importante na regulação da neurogênese hipocampal, através da liberação

de fatores derivados das células gliais e da regulação glutamatérgica dos contatos sinápticos, influenciando no funcionamento hipocampal (ARAKI; IKEGAYA; KOYAMA, 2021).

6. CONCLUSÃO

Não foram observadas mudanças significativas em relação a área e porcentagem GFAP positivas entre os animais submetidos à separação materna e controles nas camadas granular, molecular e hilo do giro denteado hipocampal.

Houve redução no volume da camada granular do giro denteado do hipocampo nos animais submetidos à separação materna. Em relação ao volume das camadas molecular e hilo não foram observadas diferenças significativas.

REFERÊNCIAS

ABBINK, M.R. *et al.* The involvement of astrocytes in early-life adversity induced programming of the brain. 0073. **Glia**. 2019 Sep;67(9):1637-1653. doi: 10.1002/glia.23625. Epub 2019 Apr 30. PMID: 31038797; PMCID: PMC6767561.

ALVES, L. J. **Efeitos da Separação Materna na Fase Neonatal sobre a Frustração em Ratos**. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2020. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10183/220509> >. Acesso em: 03 nov. 2021.

ARAKI, T.; IKEGAYA, Y.; KOYAMA, R. Os efeitos dos fatores derivados da microglia e dos astrócitos na neurogênese na saúde e na doença. **European Journal of Neuroscience**, 54 (5), 2021. 5880 - 5901. <https://doi.org/10.1111/ejn.14969>

BALLESTEROS, C. I. **Participação do hipocampo dorsal e ventral nas reações de defesa produzidas pelo condicionamento contextual de medo e pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal**. Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Psicologia, 2012. Disponível em: < http://ppg.psi.puc-rio.br/uploads/uploads/1969-12-31/2012_dda82b18018a072b56edd1d0a1189487.pdf>. Acesso: 03 out. 2021.

BANQUERI, M.; MÉNDEZ, M.; GÓMEZ-LÁZARO, E.; ARIAS, J. L. Early life stress by repeated maternal separation induces long-term neuroinflammatory response in glial cells of male rats. **Stress**, (2019), 1–8. doi:10.1080/10253890.2019.1604666.

BARCH, D.M. *et al.* Hippocampal volume and depression among young children. **Psychiatry Res Neuroimaging**. 2019 Jun 30;288:21-28. doi: 10.1016/j.psychresns.2019.04.012. Epub 2019 Apr 30. PMID: 31071541; PMCID: PMC6550342.

BATH, K.G.; MANZANO-NIEVES, G.; GOODWILL, H. Early life stress accelerates behavioral and neural maturation of the hippocampus in male mice. **Horm. Behav.** 2016. V. 82, p. 64-71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.04.010>.

BAUTISTA, E.; DUEÑAS, Z. Maternal separation during breastfeeding induces changes in the number of cells immunolabeled to GFAP. **Psychology & Neuroscience** [online]. 2012, v. 5, n. 2 [Accessed 3 October 2021], pp. 207-213. Available from: <<https://doi.org/10.3922/j.psns.2012.2.11>>. Epub 19 Apr 2013. ISSN 1983-3288. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2012.2.11>.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências**: Desvendando o Sistema Nervoso. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

BEZERRA, T. S. **Complicações neurológicas decorrentes da hipóxia isquêmica encefálica induzida experimentalmente por nitrito de sódio**. 2017. 79 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) — Universidade de Brasília, Brasília, 2017. Disponível em: < <http://repositorio.unb.br/handle/10482/23948>>. Acesso em: 9 out. 2021.

BLANCO-SUÁREZ, E.; CALDWELL, A.L.; ALLEN, N.J. Role of astrocyte-synapse interactions in CNS disorders. **J Physiol.** 2017, Mar.15;595(6):1903-1916. doi: 10.1113/JP270988. Epub, 2016. Aug 8. PMID: 27381164; PMCID: PMC5350444.

BRENNER M. Role of GFAP in CNS injuries. **Neurosci Lett.** 2014 Apr 17; 565: 7-13. doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.055. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24508671; PMCID: PMC4049287.

ÇALIŞKAN, G; MÜLLER, A.; ALBRECHT, A. Long-Term Impact of Early-Life Stress on Hippocampal Plasticity: Spotlight on Astrocytes. **Int J Mol Sci.** 2020 Jul 15; 21(14):4999. doi: 10.3390/ijms21144999. PMID: 32679826; PMCID: PMC7404101.

CARDOSO, F. L; BRITES, D.; BRITO, M. A. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. **Rev. Brain Res.** 2010 Sep 24;64(2):328-63. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.05.003. Epub 2010 May 26. PMID: 20685221.

CHEN, L.W. *et al.* Smaller hippocampal CA1 subfield volume in posttraumatic stress disorder. **Depress Anxiety.** 2018 Nov;35(11):1018-1029. doi: 10.1002/da.22833. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30256497; PMCID: PMC6261348.

COBB, J.A. *et al.* Density of GFAP-immunoreactive astrocytes is decreased in left hippocampi in major depressive disorder. **Neuroscience.** 2016 Mar 1;316:209-20. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.12.044. Epub 2015 Dec 30. PMID: 26742791; PMCID: PMC4836620.

COMASSIO, P. M. **Separação materna e enriquecimento ambiental: envolvimento de células da glia, transportadores e receptores de glutamato no hipocampo de ratos jovens.** 2017. Dissertação (Mestrado em Neurologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Ribeirão Preto, 2017. doi:10.11606/D.17.2018.tde-25042018-152353. Acesso em: 08 ago. 2018.

DIAMOND, M. C; GREER, E.R; YORK, A.; LEWIS, D.; BARTON, T.; LIN, J. Rat cortical morphology following crowded-enriched living conditions. **Exp. Neurol.**; 96: 241-247, 1987.

DIEHL, L.A. **Efeitos duradouros da separação materna sobre parâmetros cognitivos, respostas emocionais e alterações neuroquímicas em ratos.** Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/97871>>. Acesso em: 05 de ago. 2018.

ERNST C1, OLSON AK, PINEL JP, LAM RW, CHRISTIE BR. Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis? **J Psychiatry Neurosci.** 31(2): 84-92, 2006.

FANSELOW, M.S.; DONG, H.W. Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures? **Neuron.** 2010; 65 (1): 7-19. doi: 10.1016 / j.neuron. 2009.11.031. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2822727/#R11>>. Acesso em: 28 jan. 2021.

FARHY-TSELNICKER, I.; ALLEN; N. J. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. **Neural Dev.** 2018;13(1):7. Published 2018 May 1. doi:10.1186/s13064-018-0104-y.

FIEIS, G.R.; MAGALHAES, P.V. A pesquisa básica na Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul. **Rev. psiquiatr.** Rio Grande do Sul 32 (2), 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101-81082010000200001>

GIL, A. C. **Métodos e técnicas de pesquisa social**. 6. ed. São Paulo: Atlas, 2008.

GOMES, F.C.A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**. São Paulo, v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013. Disponível em: < https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142013000100006 >. Acesso em: 26 de jan. 2018.

GULYAEVA, N.V. Hipocampo Ventral, Estresse e psicopatologia: implicações translacionais. **Neurochem. J.** 9, 85–94 (2015). <https://doi.org/10.1134/S1819712415020075>.

GUILLAMÓN-VIVANCOS, T.; GÓMEZ-PINEDO, U.; MATÍAS-GUIU, J. Astrocytes in Neurodegenerative Diseases (I): Function and Molecular Description. **Neurologia**. 2015 Mar;30(2):119-29. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nrl.2012.12.007. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23465689.

HAUKVIK, U.K. *et al.* Neuroimaging hippocampal subfields in schizophrenia and bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis. **J Psychiatr Res.** 2018 Sep; 104:217-226. doi: 10.1016/j.jpsychires.2018.08.012. Epub 2018 Aug 7. PMID: 30107268.

HIGA, G. S. V. **Caracterização de conexinas neuronais no desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos**. 2017. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. doi:10.11606/T.42.2018.tde-14032018-102718. Acesso em: 2021-10-16.

HOCHGERNER, H.; ZEISEL, A.; LÖNNERBERG, P.; LINNARSSON, S. Conserved properties of dentate gyrus neurogenesis across postnatal development revealed by single-cell RNA sequencing. **Nat Neurosci.** 2018 Feb; 21(2):290-299. doi: 10.1038/s41593-017-0056-2. Epub 2018 Jan 15. PMID: 29335606.

HUMPHREYS, K.L. *et al.* Evidence for a sensitive period in the effects of early life stress on hippocampal volume. **Dev Sci.** 2019 May;22(3):e12775. doi: 10.1111/desc.12775. Epub 2018 Dec 26. PMID: 30471167; PMCID: PMC6469988.

KHEIRBEK, M.A. *et al.* Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. **Neuron.** 2013 Mar 6;77(5):955-68. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.038. PMID: 23473324; PMCID: PMC3595120.

KHEIRBEK, M.A. Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. **Neuron.** 2013 Mar 6;77(5):955-68. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.038. PMID: 23473324; PMCID: PMC3595120.

LEE S.L.; LEW, D.; WICKENHEISSER, V.; MARKUS, E.J. Interdependence between dorsal and ventral hippocampus during spatial navigation. **Brain Behav.** 2019 Oct; 9(10): e01410. doi: 10.1002/brb3.1410. Epub 2019 Sep 30. PMID: 31571397; PMCID: PMC6790314.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios?** Conceitos fundamentais de neurociência, Atheneu, 2ed., 2010.

LI, Y.; SHEN, M.; STOCKTON, M., ZHAO, X. Hippocampal deficits in neurodevelopmental disorders. **Neurobiol Learn Mem.** 2019 Nov; 165:106945. doi: 10.1016/j.nlm.2018.10.001. Epub 2018 Oct 12. PMID: 30321651; PMCID: PMC6461531.

LOSE, A. D.; MAGALHAES, L.B.S. **Metodologia do trabalho científico:** Elaboração de projeto. Salvador: UFBA, 2019.

MALBERG, J.E. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. **Rev. Psychiatr. Neurosci.** 29: 196-205, 2004.

MALBERG, J.E.; HEN. R.; MADSEN, T.M. Adult Neurogenesis and Antidepressant Treatment: The Surprise Finding by Ron Duman and the Field 20 Years Later. **Biol Psychiatry.** 2021 Jul 15;90(2):96-101. doi: 10.1016/j.biopsych.2021.01.010. Epub 2021 Jan 23. PMID: 33771348.

MERLO, SUÉLEN. **Neurogênese e plasticidade sináptica no Hipocampo de ratos submetidos à separação materna e enriquecimento ambiental.** 172p. Tese (Doutor em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

MONGIAT, L.A.; SCHINDER, A.F. Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. **Eur J Neurosci.** 2011 Mar;33(6):1055-61. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07603.x. PMID: 21395848.

MOSINI, A.C.; MASSINHANI, F.H.; CALIÓ, M.L. Uso de Modelos Animais no Estudo de Doenças Neurológicas. R. Soc. bras. Ci. **Anim. Lab.** 6(2): 95-101, dez. 2018. Disponível em: <https://www.sbcal.org.br/download/download?ID_DOWNLOAD=91>. Acesso em: 16 out. 2021.

MUSHOLT, K. *et al.* Neonatal separation stress reduces glial fibrillary acidic protein- and S100beta-immunoreactive astrocytes in the rat medial precentral cortex. **Dev Neurobiol.** 2009 Mar;69(4):203-11. doi: 10.1002/dneu.20694. PMID: 19137572.

ODAKA, H.; ADACHI, N.; NUMAKAWA, T. Impact of glucocorticoid on neurogenesis. **Neural Regen Res.** 2017; 12 (7): 1028-1035. doi: 10.4103 / 1673-5374.211174

OLIVEIRA, A.C.A. **Redução do volume hipocampal, perda neuronal e alterações gliais em ratos expostos cronicamente ao etanol da adolescência à fase adulta.** Dissertação (mestrado em Neurociências e Biologia Celular) – Universidade Federal do Pará, 2013. Disponível em: <http://repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/4503/1/Dissertacao_ReducacaoVolumeHipocampal.pdf>. Acesso em: 03 out. 2021.

ORELAND, S.; NYLANDER, I.; PICKERING, C. Prolonged maternal separation decreases granule cells number in the dentate gyrus of 3-week-old male rats. **Int J Dev Neurosci;** 28(2):139-144, 2010.

PAPADOPOULOU, Z. *et al.* Stressful Newborn Memories: Pre-Conceptual, *In Utero*, and Postnatal Events. **Psychiatry.** 2019. 10: 220. doi: 10.3389 / fpsyt.2019.00220

PAXINOS G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 5.ed. London: Elsevier, 2005.

PENG, L.; BONAGUIDI, M.A. *Função e disfunção da neurogênese hipocampal adulta na regeneração e na doença*. **The American Journal of Pathology**, 2017, S0002944017305916. doi:10.1016/j.ajpath.2017.09.004.

POLANCZYK, G.V; ROHDE, L.A. Psiquiatria do desenvolvimento. In: EIZIRIK, C. L; BASSOLS, A. M. **O ciclo da vida humana: uma perspectiva psicodinâmica**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p.53-57.

RÉUS, G.Z. *et al.* A privação materna precoce induz a ativação microglial, altera a imunorreatividade da proteína ácida fibrilar glial e a indoleamina 2,3-dioxigenase durante o desenvolvimento de ratos filhotes. **Mol Neurobiol**. 56, 1096-1108 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1161-2>

RODDY, D.W. The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression. **Biol Psychiatry**. 2019 Mar 15;85(6):487-497. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.08.021. Epub 2018 Sep 6. PMID: 30528746.

RUIZ, R. *et al.* Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. **Psychoneuroendocrinology**, 96(300), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.012>

SCHENBERG, E. E. **Caracterização eletrofisiológica da circuitaria hipocampal durante o ciclo sono-vigília do rato**. 2010. Tese (Doutorado em Neurociências e Comportamento) - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. doi:10.11606/T.47.2010.tde-08092010-144121. Acesso em: 28 jan. 2021.

SCHOENFELD, T., CAMERON, H. Adult Neurogenesis and Mental Illness. **Neuropsychopharmacol** 40, 113-128 (2015). <https://doi.org/10.1038/npp.2014.230>

SILVA, L.C. *et al.* O Uso de Animais de Laboratório como Modelos Experimentais para o Estudo de Transtornos Psiquiátricos. **RESBCAL**, São Paulo, v.1 n.3, p. 270-278, jul./ago./set. 2012. Disponível em: < <https://www.sbcal.org.br/old/upload/arqupload/artigo9numero3-8e02e.pdf>>. Acesso em: 16 out. 202.

SILVA, M. C. **Estresse por separação materna: estudo do comportamento alimentar em ratos**. Recife, 2012. 107 f.: Tese (doutorado) - UFPE, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2012. Disponível em: < <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/12061>>. Acesso em: 31 jan. 2021.

SILVA, R. H. **Estudo de marcadores gliais e da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase em ratos submetidos à privação materna**. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017. Disponível em: < <http://repositorio.unesc.net/bitstream/1/5682/1/RITELE%20HERNANDEZ%20DA%20SILVA.pdf>>. Acesso 01 out. 2021.

STIPURSKY, J; SPOHR, T.C; SOUSA, V.O. GOMES, F.C. Neuron-astroglial interactions in cell-fate commitment and maturation in the central nervous system. **Neurochem Res.** 2012. Nov;37(11):2402-18. doi: 10.1007/s11064-012-0798-x. Epub 2012 May 22. PMID: 22614925.

SURI, D.; VAIDYA, V. A. Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. **Neuroscience** 239: 196-213, 2013.

TANNOUS, J. *et al.* Hippocampal subfield volumes in children and adolescents with mood disorders. *J Psychiatr Res.* 2018 Jun;101:57-62. doi: 10.1016/j.jpsychires.2018.03.003. Epub 2018 Mar 12. PMID: 29550609.

Tykhomyrov, A.A., Pavlova, AS & Nedzvetsky, VS Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): no 45º aniversário da sua descoberta. **Neurophysiology** 48, 54–71 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11062-016-9568-8> acesso- 05.10.21

TRACTENBERG, S. G. **Efeitos da separação materna nos comportamentos tipo ansiedade em camundongos adultos.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Psicologia, PUCRS. Porto Alegre, 2016. 151 f. Disponível em: < <http://tede2.pucrs.br/tede2/handle/tede/6586#preview-link0>>. Acesso em 05 out. 2021.

UGARTE, V.C.; CODINA, A.B.; ZARATE, S. G. Estudio Anatómico Del Hipocampo como Una de Las Regiones de Neurogénesis Más Relevante. **Rev Cient Cienc Méd**, Cochabamba, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2020. Disponible en <http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332020000200013&lng=es&nrm=iso>. accedido en 3 OUT. 2021.

VALLI, L. G.; SOBRINHO, J. A. Mecanismo de Ação do Glutamato no Sistema Nervoso Central e a Relação com Doenças Neurodegenerativas. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria.** 2014 Jan/Abr;18(1):58-67. Disponível em: < <https://www.revneuropsiq.com.br/rbnp/article/download/34/27>>. Acesso em: 11 fev. 2021.

VIEIRA, J.G.S. **Metodologia de Pesquisa Científica na Prática.** Curitiba: Editora FacI, 2010.

VIEIRA, G.D; SOUSA, C.M. Aspectos celulares e fisiológicos da Barreira Hematoencefálica e a sua relação com as doenças neurodegenerativas. **Journal of Health & Biological Sciences**, v1, n4, p. 166-170, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v1i4.2013>.

WEBER, A. V.; BACKES, L. T. H. Excitotoxicidade Glutamatérgica na Doença de Huntington. **Rev. Cont. Saúde**, 2016, 16, 96-103. DOI: <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2016.31.96-103>

YASSA, M. A. Hippocampus. **Encyclopedia Britannica**, 30 Oct. 2020, <https://www.britannica.com/science/hippocampus>. Accessed 5 October 2021.

ZAVERUCHA-DO-VALLE, C. *et al.* Resident neural stem cells. In: **Resident Neural Stem Cells.** Elsevier, 2013. p.69–87. doi:10.1016/b978-0-12-416012-5.00004-9.