

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BEATRIZ CRISTINA WEIDLE VUADEN

**VULNERABILIDADE, RESILIÊNCIA E O IMPACTO DA EXPOSIÇÃO AO
ESTRESSE NA INFÂNCIA NO DESEMPENHO COGNITIVO NA FASE ADULTA**

Porto Alegre, RS
2024

GRADUAÇÃO



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

BEATRIZ CRISTINA WEIDLE VUADEN

**VULNERABILIDADE, RESILIÊNCIA E O IMPACTO DA EXPOSIÇÃO AO
ESTRESSE NA INFÂNCIA NO DESEMPENHO COGNITIVO
NA FASE ADULTA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado à Escola de Ciências da Saúde e
da Vida da Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Florência Maria Barbé-Tuana

Porto Alegre, RS

2024

BEATRIZ CRISTINA WEIDLE VUADEN

**VULNERABILIDADE, RESILIÊNCIA E O IMPACTO DA EXPOSIÇÃO AO
ESTRESSE NA INFÂNCIA NO DESEMPENHO COGNITIVO
NA FASE ADULTA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado à Escola de Ciências da Saúde e
da Vida da Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Aprovada em: 25 de novembro de 2024

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Elke Bromberg

Prof. Dr. Thiago Wendt Viola

RESUMO

Nas últimas décadas, estudos com animais demonstraram repetidamente que a exposição ao estresse durante o período de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) pode levar a profundas alterações no funcionamento dessa estrutura, impactando de forma negativa funções como a cognição. Descobertas recentes, no entanto, demonstraram que uma pequena parcela dos indivíduos expostos ao estresse na infância tornou-se mais resiliente a ele na idade adulta, com alguns destes apresentando, inclusive, um melhor desempenho em determinados desafios cognitivos quando comparados àqueles que não foram expostos ao estresse. Uma possível explicação para a forma como o estresse nos afeta individualmente foi desenvolvida a partir dos novos conhecimentos gerados por avanços no campo da epigenética. Estudos com roedores mostraram que níveis reduzidos do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em regiões importantes para o aprendizado e memória, como o hipocampo e o córtex pré-frontal, estão relacionados com uma pior performance em desafios cognitivos. Assim, o presente trabalho busca investigar mecanismos epigenéticos que possam estar relacionados às diferenças individuais observadas em animais expostos ao estresse na infância, a fim de contribuir para um melhor entendimento dos processos que resultam no declínio das funções cognitivas. Com essa finalidade, 104 ratos Wistar de ambos os sexos passarão pela separação materna (utilizada como modelo de indução de estresse neonatal) do 1º ao 14º dia de vida após o nascimento. Ao atingirem a idade adulta com 3 meses, estes animais serão submetidos à tarefa de Reconhecimento do Objeto Novo (RON 1), a fim de identificar os indivíduos, do grupo intervenção, com pior e melhor performance cognitiva, quando comparados ao grupo controle. Passados 15 dias, estes animais serão novamente submetidos à tarefa de RON, dessa vez com o objetivo de induzir uma nova fase de consolidação da memória (RON 2). Serão eutanasiados 3 horas após a última sessão de treino. Em seguida, coletaremos amostras de córtex pré-frontal e hipocampo, a partir das quais será feita a análise da expressão de BDNF pelo teste ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), e de diferentes RNAs não codificantes (os quais sabidamente afetam a expressão de BDNF), por qPCR (do inglês, *quantitative Polymerase Chain Reaction*). Espera-se que o conhecimento adquirido através desse estudo possa ajudar a identificar possíveis alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos que visem atenuar ou reverter os efeitos negativos do estresse nos indivíduos mais vulneráveis a ele.

Palavras-Chave: separação materna; cognição; epigenética; expressão gênica; modelo animal.

SUMÁRIO

RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Desenho experimental	13
3.2 Animais	14
3.3 Cálculo do tamanho amostral.....	15
3.4 Exposição ao estresse durante o período de desenvolvimento do SNC pelo método da separação materna	16
3.5 Tarefas comportamentais.....	16
3.6 Análises moleculares.....	17
3.7 Descarte de materiais e resíduos.....	18
3.8 Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS ESPERADOS.....	20
5. CRONOGRAMA	20
6. ORÇAMENTO	21
7. LOCAL DE REALIZAÇÃO.....	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

1.1 A EPIDEMIA DO ESTRESSE

Nas últimas décadas, o número de pessoas que sofrem com estresse patológico e os diferentes tipos de adoecimento desencadeados por ele vem aumentando exponencialmente (Lee, 2024). Da mesma forma, o corpo de trabalhos que buscam investigar as possíveis causas e consequências da exposição prolongada a situações estressantes também cresceu (Kaiser & Feng, 2015). No Reino Unido, estima-se que o número de casos diagnosticados de estresse e condições relacionadas a ele tenha duplicado, aumentando de 829 casos por 100.000 trabalhadores em 1990, para 1.700 casos pelo mesmo número de trabalhadores em 2001/2002 (Salleh, 2008). No mesmo ano, 13,4 milhões de pessoas perderam dias de trabalho por condições atribuídas ao estresse, ansiedade ou depressão, com uma estimativa de 265.000 novos casos de estresse patológico no ano (Salleh, 2008).

Acredita-se que a exposição prolongada ao estresse esteja também relacionada com o aumento de casos de pessoas diagnosticadas com transtornos mentais no mundo todo (Mental Health Foundation, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2019), uma em cada oito pessoas da população mundial, o equivalente a aproximadamente um bilhão de indivíduos, vivem com doenças mentais. Entre os transtornos mais prevalentes estão os transtornos depressivos (compondo 28,9% dos casos) e de ansiedade (31%), ambos considerados doenças relacionadas ao estresse (Lee, 2024).

Apesar da estimativa da OMS (2022) de que 8% das crianças do mundo (idades entre 5 e 9 anos) e 14% dos adolescentes do mundo (idades entre 10 e 19 anos) apresentam algum tipo de transtorno mental, estudos acerca do impacto do estresse experienciado em estágios precoces do desenvolvimento ainda não foram capazes de elucidar os mecanismos moleculares por trás da correlação entre estresse na infância, doenças mentais e desempenho cognitivo.

1.2 IMPACTO DO ESTRESSE EM UM CÉREBRO EM DESENVOLVIMENTO

Entende-se que o desenvolvimento do cérebro humano é moldado por dois principais fatores: genética e experiências de vida. A genética tem sua maior influência durante o período pré-natal, enquanto as experiências de vida influenciam principalmente o desenvolvimento cerebral que ocorre após o nascimento (Bick & Nelson, 2016). Isso acontece pois, apesar dos genes criarem uma tendência a ser seguida durante o período de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), são as experiências ocasionadas por um contato com o meio externo que vão definir se tal tendência genética realmente se concretizará (Bick & Nelson, 2016).

No caso de experiências negativas, o sistema nervoso em desenvolvimento passará por transformações em uma tentativa de se adequar à situação adversa vivida. O estresse na primeira infância (também conhecido como ELS, Early Life Stress) envolve a exposição de um indivíduo, durante o período de desenvolvimento cerebral que se dá até os seis anos de idade,

a circunstâncias ambientais adversas, como a separação dos pais, abuso de substâncias, violência física ou emocional, inanição e negligência (Kessler et al., 2010). Tais experiências levam à ativação de diversos mecanismos de resposta ao estresse, podendo alterar a expressão e liberação de mediadores do estresse e neurotransmissores em regiões cerebrais específicas, cuja interação com as redes neuronais em formação, características desse período, podem levar a alterações estruturais e funcionais permanentes que, por sua vez, estão associadas com consequências negativas para funções cognitivas e emocionais (Chen & Baram, 2016).

De fato, nas últimas décadas, estudos com animais que utilizaram o modelo da separação materna, repetidamente demonstraram que a exposição ao estresse durante o desenvolvimento do SNC pode levar a profundas alterações no funcionamento do sistema nervoso, tais como: aumento dos níveis de hormônios ligados à ansiedade e ao estresse, como o hormônio liberador de corticotrofina (Murgatroyd & Spengler, 2012); alterações nas taxas de neurogênese e apoptose (Mirescu & Gould, 2006); redução na densidade sináptica, assim como no número de neurônios (Lemaire et al., 2006); e diminuição de fatores neurotróficos e enzimas responsáveis pela transdução de sinais importantes para o aprendizado e a cognição em adultos (Kaffman & Meaney, 2007).

Para tentar explicar como a exposição precoce ao estresse está relacionada com o aparecimento de transtornos e anomalias do SNC na idade adulta, diversas hipóteses foram levantadas, sendo algumas das mais relevantes a Hipótese da Incompatibilidade do Desenvolvimento (Barker, 2004; Bateson et al., 2004; Gluckman et al., 2008; Schmidt, 2011) e a mais recente Hipótese da Incompatibilidade Evolutiva (Li et al., 2018). A primeira, mais conhecida por seu nome original do inglês *Development Match/mismatch Hypothesis* (DMH), teoriza que, pelo fato do cérebro e comportamento serem moldados por experiências vividas no início da vida, quando há uma incompatibilidade entre os desafios enfrentados na infância e aqueles com os quais o indivíduo se depara na idade adulta, essa incompatibilidade leva a um adoecimento que pode ser tanto físico como mental (Hoogland & Ploeger, 2022). A Hipótese da Incompatibilidade Evolutiva (EMH, do inglês *Evolutionary-Mismatch Hypothesis*), por sua vez, afirma que a diferença entre os estressores ambientais experienciados pela nossa espécie ao longo de sua evolução e aqueles com os quais nos deparamos nos tempos modernos (falta de sono, falta de exercício físico e sobrecarga de informações, por exemplo) poderiam estar causando nosso adoecimento (Li et al., 2018).

Ou seja, enquanto a DMH considera as incompatibilidades de desenvolvimento que ocorrem durante o tempo de vida de um indivíduo, a EMH considera as incompatibilidades existentes através de uma escala de tempo evolutiva (Hoogland & Ploeger, 2022). Uma outra hipótese que também deve ser comentada e que, em partes, contraria a hipótese da incompatibilidade do desenvolvimento, é a Hipótese do Estresse Cumulativo (CSH, do inglês *Cumulative-Stress Hypothesis*). Enquanto a Hipótese de Incompatibilidade do Desenvolvimento afirma que a exposição ao estresse na infância pode tornar o indivíduo mais preparado para enfrentar situações estressantes na idade adulta, a Hipótese do Estresse Cumulativo afirma que

a repetida exposição ao estresse ao longo da vida nunca será adaptativa e resultará no aumento do risco do desenvolvimento de doenças (Nederhof & Schmidt, 2012).

Atualmente, as evidências que temos apontam para uma realidade intermediária às teorias apresentadas anteriormente. Apesar do efeito deletério do estresse sobre as funções cognitivas ser um fenômeno que já está bem estabelecido na literatura científica (Chen & Baram, 2016; Mirescu & Gould, 2006; Murgatroyd & Spengler, 2012), novos estudos apontam que, para uma pequena parcela dos indivíduos expostos ao estresse precoce, tal exposição pode torná-los mais resilientes a situações estressantes, com alguns desses indivíduos apresentando, inclusive, um melhor desempenho em determinados desafios cognitivos (Brivio et al., 2020). Importante ressaltar, no entanto, que para a grande maioria dos indivíduos expostos ao estresse no início da vida, tal exposição tem consequências negativas que levam a um possível declínio das funções cognitivas (Rocha et al., 2023). Tais diferenças individuais foram denominadas de tendência à *vulnerabilidade* ou à *resiliência* ao estresse (Daskalakis et al., 2013) e, apesar de avanços na área, os mecanismos responsáveis por essa diferença (assim como os processos por trás dos efeitos deletérios do estresse no geral) ainda não foram elucidados (Franklin et al., 2012). Isso torna a tarefa de identificação dos indivíduos suscetíveis ao estresse mais desafiadora e, como consequência, também dificulta a prevenção de possíveis perdas cognitivas derivadas dessas experiências.

Uma possível explicação para a forma como o estresse nos afeta individualmente, foi desenvolvida a partir dos novos conhecimentos gerados por avanços no campo da epigenética. Segundo o conceito dos três *hits* (*“three hits paradigm”* em inglês), proposto por Daskalakis et al. em 2013, efeitos da exposição ao estresse durante o desenvolvimento do SNC nas funções cognitivas e no comportamento apresentados na idade adulta, podem variar de acordo com: a composição genética do indivíduo (*hit 1*); as condições sob as quais o indivíduo foi exposto ao estresse durante seu desenvolvimento (*hit 2*); e as condições sob as quais o indivíduo foi novamente exposto ao estresse na idade adulta (*hit 3*) (Albuquerque-Filho et al., 2017; Daskalakis et al., 2013).

1.3 ESTRESSE E EPIGENÉTICA

A epigenética pode ser definida como mudanças na expressão de genes que, diferentemente do que ocorre nas mutações, não podem ser atribuídas a alteração na sequência do DNA (Hamilton, 2011). Tais alterações podem se dar através de processos como: metilação de citosinas, modificações pós-translacionais de histonas, modificações na estrutura da cromatina, perda de *imprinting* genômico (processo que regula a expressão gênica ao marcar qual cópia de um gene tem origem materna ou paterna) e RNAs não-codificantes, como microRNAs (Gibney & Nolan, 2010). Fatores ambientais como a dieta, por exemplo, podem alterar o nível e a amplitude de como ocorrem as regulações epigenéticas, fornecendo uma explicação para as correlações encontradas entre estilo de vida e o aumento ou diminuição no risco de doenças (Jirtle & Skinner, 2007).

De fato, cada vez mais têm-se descoberto ligações entre os principais mecanismos de regulação epigenética e os processos patológicos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de diversas doenças (Feinberg, 2008). No contexto do estresse, estudos com roedores mostraram que os animais que obtiveram um pior desempenho cognitivo após passar pelo modelo da separação materna, também apresentaram níveis mais baixos do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF, do inglês *Brain derived Neurotrophic Factor*) em regiões importantes para o aprendizado e memória, como o hipocampo e o córtex pré-frontal (Brivio et al., 2020). O BDNF possui um papel fundamental em mecanismos de plasticidade neural e sináptica (Calabrese et al., 2009; Kowianski et al., 2018), estando envolvido em diferentes estágios de processamento da memória como a aquisição, consolidação, recuperação, extinção, reconsolidação e formação de memórias de curto e longo prazo (Bekinschtein et al., 2014; Lu et al., 2014). É teorizado que os níveis de BDNF em diferentes regiões do cérebro sofrem alterações através de mecanismos epigenéticos decorrentes da modificação de histonas, metilação do DNA e/ou expressão de RNAs não-codificantes como o BDNF-AS o miRNA-124 e miRNA-132 (Daskalakis, et al., 2015; Lubin et al., 2008; McEwen & Akil, 2020), os quais também serão objetos de investigação no presente projeto.

BDNF-AS (do inglês, *Brain-Derived Neurotrophic Factor-Antisense*), é um RNA não codificante de cadeia longa (lncRNA), que ocorre naturalmente no nosso organismo e regula a expressão de BDNF, inibindo-a (Ghafouri-Fard et al., 2021). Esse lncRNA reprime a transcrição de BDNF ao mudar a configuração da cromatina em sua região, consequentemente diminuindo os níveis da proteína endógena de BDNF, assim como sua função (Ghafouri-Fard et al., 2021). O miRNA-124, por sua vez, é um micro RNA que suprime a atividade do BDNF ao degradar transcrições de RNA mensageiro (mRNA) dos receptores de glicocorticoides, os quais potencializam a ação do BDNF através da sua sinalização (De Assis & Murawska-Ciałowicz, 2024). Além disso, demonstrou-se que a supressão da atividade do BDNF pelo miRNA-124 influencia negativamente a plasticidade neuronal em diversas regiões do cérebro, entre elas o hipocampo e o estriado (Chandrasekar & Dreyer, 2009). Por fim, o miRNA-132 (novamente um micro RNA) regula negativamente a expressão de BDNF no nível pós-transcricional, ao se ligar na região 3' (3' UTR) não traduzida do mRNA do BDNF, levando à degradação do mRNA ou à inibição de sua tradução (Wanet et al., 2012).

Estudos recentes demonstraram que a maneira como o estresse influencia a modulação dos níveis de BDNF varia de acordo com sua intensidade e duração (Brivio et al., 2020). Enquanto o estresse crônico leva a uma diminuição nos níveis desse fator (Luoni et al., 2015), eventos de estresse agudo aparentam ter um efeito oposto, elevando a expressão de BDNF de acordo com especificidades anatômicas (Brivio et al., 2018, 2019; Fumagalli et al., 2012; Molteni et al., 2009). No entanto, apesar dos grandes avanços observados no campo da epigenética, poucos estudos se propuseram a investigar os mecanismos responsáveis pelas diferenças na forma como o estresse se manifesta (Brivio et al., 2020), tornando investigações dessa natureza ainda mais importantes para que possamos entender como, exatamente, os processos epigenéticos se relacionam com o desenvolvimento de patologias físicas e mentais.

1.4 ESTUDOS COM ANIMAIS (PRINCÍPIOS, TÉCNICAS E LIMITAÇÕES)

Estudos pré-clínicos com modelo animal são definidos como pesquisas que utilizam organismos vivos não-humanos na investigação de diversos processos biológicos e patológicos que ocorrem no ser humano (van der Worp et al., 2010). Entre as vantagens do estudo com animais estão a possibilidade de trabalhar com populações geneticamente homogêneas, as quais muitas vezes podem ser acompanhadas durante todo seu ciclo de vida em um tempo relativamente curto (Cattane et al., 2022). O modelo animal de uma patologia representa a versão simplificada de uma situação real, moldada para estudar aspectos possíveis que caracterizam o início e o curso da própria doença, com limitações (van der Worp et al., 2010).

No campo das neurociências, o uso de animais em pesquisas parte do princípio de que os conhecimentos obtidos através da experimentação animal, poderão fornecer informações úteis sobre mecanismos do sistema nervoso presentes também em seres humanos (Cattane et al., 2022). De fato, os modelos animais contribuem significativamente para os grandes avanços obtidos no campo da psiquiatria nos últimos anos (Kaiser & Feng, 2015). Esses permitem que, através da identificação de circuitos neurais desregulados, sistemas neurofisiológicos e alvos moleculares, alcancemos um melhor entendimento de mecanismos biológicos associados com transtornos psiquiátricos (Cattane et al., 2022).

No entanto, como os processos mentais nos seres humanos possuem uma complexidade maior ligada à nossa psicologia, a qual (até onde sabemos) não pode ser replicada nos demais animais, é importante ter em mente que os transtornos psiquiátricos estudados não poderão ser reproduzidos de forma completa, em toda a sua complexidade, no modelo animal. Sendo assim, o objetivo de tais estudos não deve ser imitar na sua totalidade as condições psiquiátricas humanas em animais não-humanos, mas sim alcançar um melhor entendimento dos mecanismos biológicos que estão por trás da patogênese do transtorno e traduzir tais achados para o contexto humano (Cattane et al., 2022).

No contexto do estresse, um dos fatores ambientais mais utilizados no desencadeamento de fenótipos psicopatológicos (Cattane et al., 2022), estudos pré-clínicos devem apresentar os seguintes objetivos: alcançar um melhor entendimento da biologia do estresse e sua desregulação, de forma a esclarecer a fisiopatologia da vulnerabilidade ou resiliência a doenças mentais, e prover modelos comportamentais sofisticados para a descoberta de novos alvos moleculares para testes farmacológicos e novos tratamentos (Bale et al., 2019). Para isso, são utilizados testes comportamentais, os quais permitem ao pesquisador analisar e medir reações comportamentais e emocionais úteis para a investigação em andamento. Testes comportamentais habituais e que serão utilizados nesse projeto serão os seguintes:

1.4.1 Teste do Campo Aberto (TCA): O teste de Campo Aberto é a tarefa comportamental mais utilizada para medir comportamentos exploratórios, atividade locomotora e parâmetros emocionais como ansiedade em animais de laboratório (Võikar & Stanford, 2023). O teste consiste em colocar o animal de experimentação (na maioria das vezes ratos ou camundongos) em uma caixa de proporções iguais a 42 × 42 × 42 cm, dividida por duas linhas

horizontais e duas linhas verticais formando 9 zonas desenhadas diretamente na caixa ou adicionadas posteriormente sobre as imagens gravadas (Kraeuter et al., 2019). É permitido então que o animal explore a caixa livremente por um período que geralmente varia entre 5 e 10 minutos (Barros, 2006). Durante esse tempo é realizada a gravação do teste utilizando uma câmera posicionada acima da caixa de Campo Aberto (Kraeuter et al., 2019). Após o fim do teste, as imagens obtidas são analisadas com o objetivo de avaliar os seguintes fatores: frequência e duração do andar (medidos pelo número de vezes que o animal atravessa com as quatro patas as linhas de demarcação), levantar o corpo (considerado quando o animal se apoia apenas sobre as patas traseiras), *grooming* (ou “se limpar” – contabilizado a partir dos movimentos dirigidos à cabeça ou ao corpo que o animal realiza com as patas dianteiras) e número de bolos fecais (Barros, 2006). A partir desse teste é possível avaliar se o animal possui alguma dificuldade locomotora ou níveis elevados de ansiedade (Võikar & Stanford, 2023).

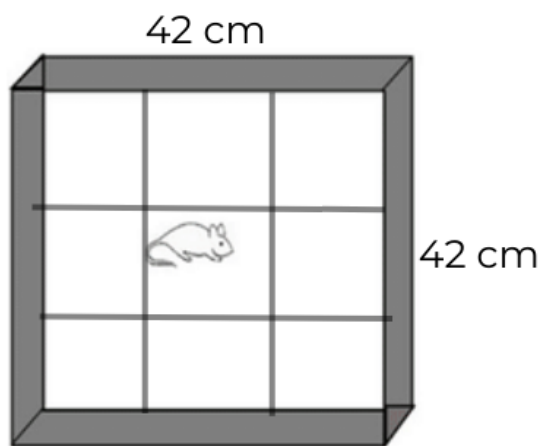


Figura 1: Ilustração da Arena de Campo Aberto. Imagem adaptada de: Mohseni, F., Khaksari, M., Rafeaie, R., Rahimi, K., Norouzi, P., & Garmabi, B. (2021). Apelin 13 improves anxiety and cognition via hippocampal increases BDNF expression and reduction cell death in neonatal alcohol exposed rats. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27, 1351–1362.

1.4.2 Tarefa de Reconhecimento do Objeto Novo (RON): esta tarefa se baseia no instinto exploratório dos ratos, avaliando aspectos de aprendizagem e memória através da capacidade do roedor de reconhecer um objeto novo inserido no ambiente e lembrar de objetos previamente apresentados (Lueptow, 2017). Para isso, o teste possui três fases, cada uma com um intervalo de 24 horas entre elas: (1) a fase de *habituação*, onde é permitido ao roedor explorar a área do Campo Aberto sem a presença de qualquer objeto; (2) a fase de *treino* ou *familiarização*, onde o animal é novamente introduzido à arena de teste, dessa vez contendo dois objetos idênticos, permitindo que os explore por alguns minutos e, por fim, há a fase de *teste* (3), onde um dos objetos presentes na fase de treino é mantido enquanto o outro é substituído por um novo, o animal então é reintroduzido na arena de Campo Aberto. É cronometrado então o tempo que este passa explorando cada objeto (Lueptow, 2017). Em animais saudáveis é esperado que passem mais tempo explorando o objeto novo do que o objeto conhecido, resultados contrários podem indicar prejuízos de memória e/ou aprendizagem (Lueptow, 2017).

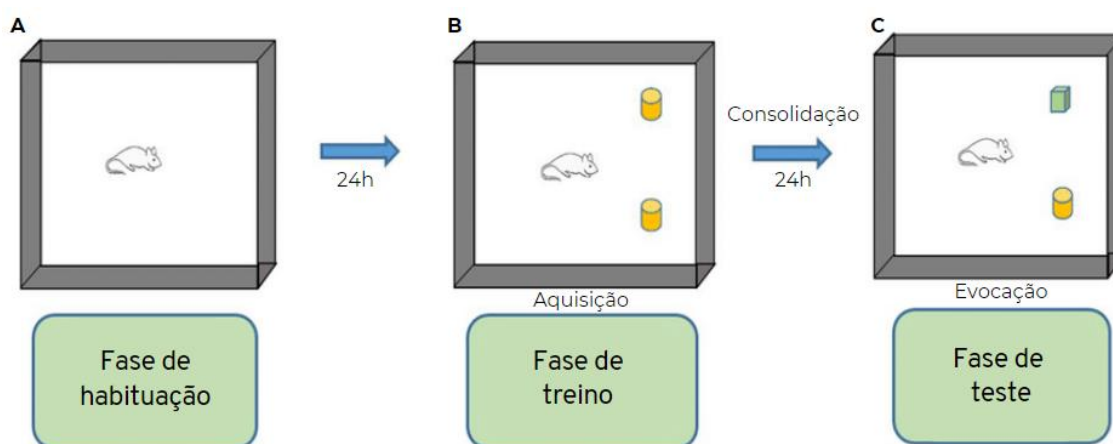


Figura 2: A – Fase de Habituação: o roedor é colocado na arena de Campo Aberto sem a presença de qualquer objeto, é então permitido que ele explore o ambiente livremente por 10 minutos. B – Fase de Treino: 24 horas após a habituação, o roedor é novamente inserido na arena de Campo Aberto, dessa vez contendo dois objetos iguais, e é permitido que o animal explore livremente o ambiente por 10 minutos. É cronometrado o tempo que o rato passa interagindo com cada um dos objetos introduzidos. C – Fase de Teste: 24 horas após a Fase de Treino, um dos objetos presentes na etapa anterior é retirado e substituído por um objeto novo e diferente dos demais. O animal é então reintroduzido à arena de Campo Aberto, onde lhe é permitido explorar livremente o ambiente durante 10 minutos. É cronometrado o tempo que o rato passa explorando cada um dos objetos. Imagem adaptada de: Mohseni, F., Khaksari, M., Rafeiee, R., Rahimi, K., Norouzi, P., & Garmabi, B. (2021). Apelin 13 improves anxiety and cognition via hippocampal increases bdnf expression and reduction cell death in neonatal alcohol exposed rats. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27, 1351–1362. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10173-4>

1.5 JUSTIFICATIVA

A investigação da relação entre o estresse vivido durante a infância e a performance cognitiva apresentada na idade adulta, pode contribuir para um melhor entendimento dos processos que resultam no declínio das funções cognitivas. Tal conhecimento pode ajudar a identificar possíveis alvos moleculares ou bioquímicos para o desenvolvimento de fármacos que possam atenuar ou reverter os efeitos negativos do estresse em indivíduos mais vulneráveis a ele. Além disso, o esclarecimento dos mecanismos moleculares por trás das diferenças individuais que levam ao desenvolvimento de uma vulnerabilidade ou resiliência a situações adversas vividas durante o período de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central, pode contribuir na identificação dos indivíduos mais suscetíveis aos efeitos deletérios do estresse, auxiliando no desenvolvimento de intervenções preventivas (podendo estas serem farmacológicas ou terapêuticas). O uso de animais de ambos os sexos, por sua vez, permitirá que sejam feitas comparações entre os resultados obtidos em cada grupo, além de contribuir para diminuir a grande disparidade de dados que temos entre animais do sexo masculino (utilizados na grande maioria dos estudos) e animais do sexo feminino.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da exposição ao estresse, pelo método de separação materna, durante o período inicial do desenvolvimento do Sistema Nervoso Central sobre a performance cognitiva na idade adulta em ratos Wistar de ambos os sexos, identificando grupos de indivíduos com as melhores e piores performances nas tarefas comportamentais para utilizá-los como parâmetros de vulnerabilidade e resiliência.

2.2 Objetivos específicos

- Indução de estresse pelo método de separação materna durante o período de desenvolvimento do SNC em ratos Wistar de ambos os sexos;
- Avaliar os efeitos da exposição ao estresse na memória de reconhecimento de ratos adultos;
- Avaliar se os efeitos da exposição ao estresse foram diferentes em animais machos e fêmeas;
- Avaliar o efeito da exposição ao estresse nos níveis de BDNF presentes no hipocampo e córtex pré-frontal;
- Avaliar o efeito da exposição ao estresse nos níveis de BDNF-AS presentes no hipocampo e córtex pré-frontal;
- Avaliar o efeito da exposição ao estresse nos níveis de miRNA-124 e miRNA-132 presentes no hipocampo e córtex pré-frontal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho Experimental

Os animais, ratos Wistar de ambos os sexos, passarão pela separação materna do 1º ao 14º dia de vida após o nascimento. Ao atingirem a idade adulta com 3 meses, estes animais serão submetidos à tarefa de Reconhecimento do Objeto Novo (RON 1), a fim de identificar quem são os indivíduos com pior e melhor performance cognitiva quando comparados ao grupo controle. Após 14 dias de intervalo, estes animais serão novamente submetidos à tarefa de RON, dessa vez com o objetivo de induzir uma nova fase de consolidação da memória (RON 2). Serão eutanasiados 3 horas após a última sessão de treino. A seguir será feita a coleta das amostras de córtex pré-frontal e hipocampo (regiões envolvidas nos processos de aprendizado e memória). A partir das amostras coletadas, será feita a análise da expressão de BDNF através do teste ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), e de diferentes RNAs não codificantes, os quais sabidamente afetam a expressão de BDNF, por qPCR (do inglês, *quantitative Polymerase Chain Reaction*).

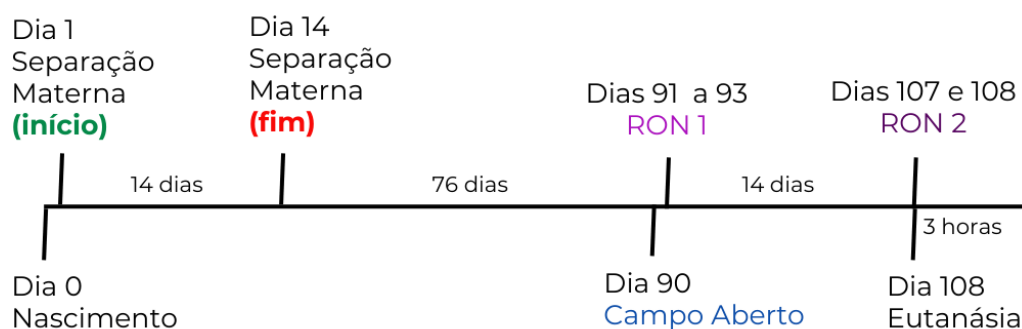


Figura 3: Linha do tempo ilustrando as etapas do experimento com o espaço de tempo entre elas. RON: Tarefa de Reconhecimento do Objeto Novo.

3.2 Animais

Para este experimento serão utilizadas 16 ratas Wistar prenhas. Nosso cálculo amostral sugere um número de 104 filhotes para a realização dos experimentos (ver item 3.3). Os animais serão obtidos através do biotério ligado à instituição onde se realizará o presente projeto. Este número foi calculado considerando que cada ninhada proveniente das fêmeas prenhas será ajustada em 8 filhotes de ambos os sexos, com um valor adicional de 20% caso ocorram situações de perda dos filhotes, como aborto espontâneo ou rejeição das ninhadas. Após o nascimento, os filhotes poderão ser remanejados através da técnica de *cross-fostering*, onde filhotes excedentes são retirados da sua mãe e realocados em ninhadas que não tenham atingido o número desejado de filhotes machos e fêmeas. Esse procedimento deverá ser feito nas primeiras 24 horas de vida dos filhotes e só poderão ser trocados animais nascidos no mesmo dia, de forma a diminuir as chances de rejeição materna.

Cada rata prena será acomodada individualmente em uma caixa de moradia, as quais terão dimensões iguais a 41 cm de comprimento, 34 cm de largura e 18 cm de altura e preenchidas com maravalha limpa. Elas serão trocadas em sua totalidade (fundos, grade e bebedouro) duas vezes por semana, com os animais sendo transferidos para caixas limpas. Após o nascimento, todas as ninhadas serão ajustadas em 8 filhotes de ambos os sexos (4 machos e 4 fêmeas) e mantida com sua respectiva mãe na caixa de moradia em ambiente climatizado (com temperatura de 22°C +/- 1°C) com ciclos claro/escuro de 12 horas, recebendo alimentação comercial e água sem restrição. Os filhotes serão desmamados com 21 dias de vida e acomodados em grupos de 4 ratos por caixa, sendo as mães eutanasiadas após o desmame dos filhotes. O método da eutanásia utilizado para estas ratas será o de sobredosagem do anestésico tiopental (120 mg/kg, intraperitoneal, com volume de injeção de 1,0 mL/Kg - equivalente à 3 vezes a dose terapêutica). Os animais utilizados na pesquisa serão mantidos no biotério até que seja concluída a etapa de experimentação comportamental do projeto.

3.3 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado com base em estudos anteriores que utilizaram as mesmas técnicas para análises comportamentais e moleculares. No que se refere à tarefa comportamental de RON, os trabalhos de Albuquerque-Filho et al. (2017), de Lima et al. (2019) e Pinheiro et al. (2015), demonstraram que é necessário um número mínimo de 12 animais por grupo experimental para que seja possível gerar resultados estatisticamente significativos. Já no que diz respeito às análises moleculares, cada grupo amostral necessita de, no mínimo, 6 animais para que se alcance resultados estatisticamente significativos (Albuquerque-Filho et al., 2017; da Silva et al., 2014, 2018; Pinheiro et al., 2012, 2015). Além disso, considerando achados anteriores de que 30% dos animais expostos à separação materna apresentam uma performance cognitiva superior ao grupo controle (os chamados *superior-learners* ou Aprendedores Superiores) (Albuquerque-Filho et al., 2017; Brivio et al., 2020; Caradonna et al., 2021 e de Lima et al., 2019), para que seja alcançado o número mínimo de 12 indivíduos no grupo experimental dos Aprendedores Superiores, 40 animais de cada sexo (totalizando 80) precisarão passar pela privação materna. Assim, no total será necessário que 104 animais nascidos passem pelo processo da privação materna (12 machos + 12 fêmeas (grupo controle) + 40 machos + 40 fêmeas (grupo intervenção) = 104).

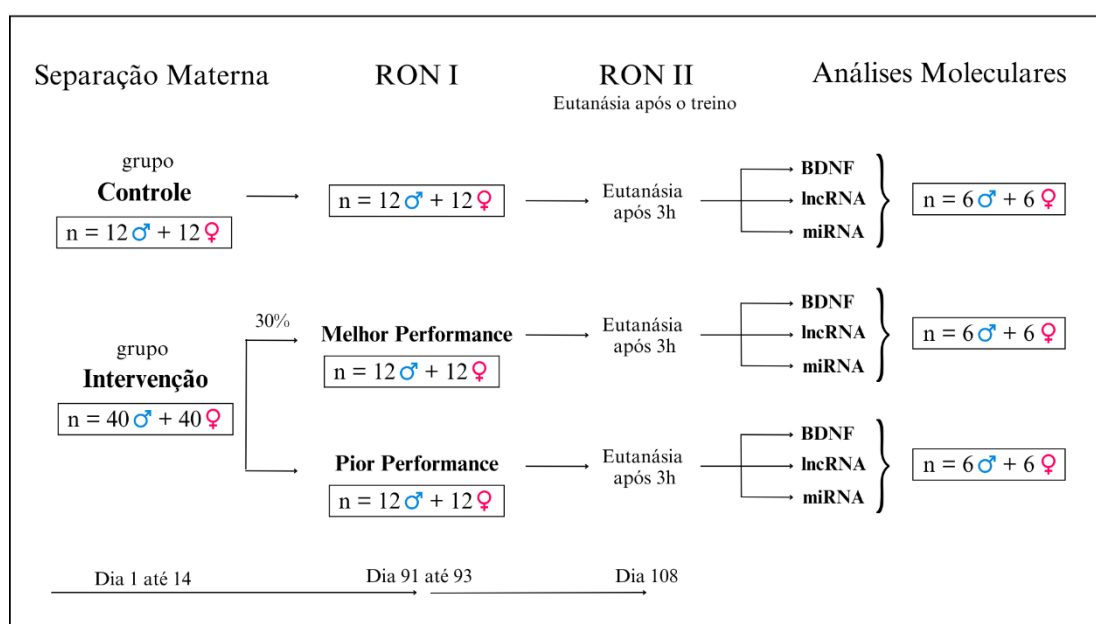


Figura 4: desenho experimental ilustrando os três grupos experimentais com seus respectivos números amostrais.

3.4 Exposição ao estresse durante o período de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central pelo método da separação materna

Os filhotes serão divididos em dois grupos: os que serão manipulados somente para pesagem diária (Grupo Controle) e os que serão privados de suas mães (Grupo Intervenção). Em ambos os grupos, as mães serão retiradas de suas caixas de moradia do 1º ao 14º dia de vida dos filhotes, durante 3 horas nos grupos intervenção e 15 minutos ou menos no grupo controle. Para que seja feita a separação, cada ninhada será colocada individualmente em caixas semelhante à sua caixa de moradia. As caixas com os filhotes serão colocadas sobre uma superfície aquecida (30-33°C) durante todo o período da separação, a fim de evitar hipotermia nas ninhadas. Esse procedimento ocorrerá em uma sala com as mesmas condições de temperatura e luminosidade que a sala onde os outros animais da colônia são mantidos. O grupo controle ficará afastado das suas mães somente durante o período necessário para que sejam pesados, totalizando não mais que 15 minutos por dia e sendo cada filhote manipulado individualmente por um tempo menor que 2 minutos. O grupo intervenção por sua vez, ficará afastado de suas mães por 180 minutos contínuos todos os dias durante 14 dias, durante os quais também serão pesados.

3.5 Tarefas comportamentais

3.5.1 Teste do Campo Aberto (TCA): o teste do Campo Aberto será feito um dia antes da realização da atividade de RON, sendo realizada na mesma caixa onde será feita tal tarefa. Os animais serão colocados no canto esquerdo de uma caixa de campo aberto (caixa de madeira com a face frontal de vidro medindo 42 x 42 x 42 cm) cujo assoalho é dividido em 9 quadrados iguais por linhas pretas. O teste terá duração de 10 minutos e, durante este período, serão registrados a latência de saída do primeiro quadrante, o número de cruzamentos das linhas, o número reações de levantar e limpar e a quantidade de fezes produzidas. Também será analisado o tempo que o animal permanece nos quadrantes centrais do campo aberto. Como descrito na introdução, tais parâmetros são indicativos de alterações na locomoção e níveis de ansiedade dos animais.

3.5.2 Reconhecimento do Objeto Novo (RON): os animais serão submetidos à tarefa de RON 24 horas após a realização do TCA. A tarefa será realizada na mesma caixa utilizada para medir a atividade em campo aberto, com a diferença de ter serragem acrescentada sobre o seu assoalho. No primeiro dia de execução da tarefa, durante a sessão de treino, dois objetos idênticos serão colocados no campo aberto e o animal poderá explorá-los livremente durante 10 minutos. O tempo gasto pelo animal na exploração de cada objeto será registrado, utilizando-se dois cronômetros. Durante a sessão de teste de retenção de memória de longa duração (LTM), realizada 24 h após o treino, o rato será colocado novamente na mesma caixa, onde um dos objetos já familiares utilizado na sessão de treino será substituído por um objeto novo. A sessão de teste terá novamente duração de 10 minutos. Os objetos serão lavados com etanol a 10% entre as sessões de cada animal a fim de evitar o estabelecimento de marcas olfativas que

alterem a preferência dos animais pelos objetos. Um índice de preferência, sendo este calculado a partir da razão da quantidade de tempo gasto explorando qualquer um dos objetos (na sessão de treino) ou o objeto novo (na sessão de teste) sobre o tempo total gasto explorando ambos os objetos, será utilizado como uma medida de memória de reconhecimento. Após o cálculo do índice de preferência, os animais dos grupos separados serão divididos em 2 subgrupos, sendo estes formados da seguinte maneira: 1) os animais com alto índice de retenção da memória (ou seja, aqueles que obtiverem um índice de memória maior ou igual à média do índice obtido no grupo controle na sessão de teste de memória de latência) e 2) os animais com baixo índice de retenção de memória (aqueles que obtiverem um índice de memória menor do que a média do índice obtido no grupo controle no teste de memória de latência).

Duas semanas após a realização do primeiro RON (ou RON 1), um novo teste de Reconhecimento do Objeto Novo será feito (RON 2) com o intuito de induzir uma nova fase de consolidação da memória. Diferente do RON 1, o RON 2 consistirá apenas das etapas de habituação e de treino, sendo os animais eutanasiados 3 horas depois da última etapa. Além disso, serão selecionados de forma aleatória 12 animais (6 machos e 6 fêmeas) de todos os grupos amostrais, sendo esses os únicos que serão submetidos ao RON 2 e cujos cérebros serão utilizados nas análises moleculares. Os demais indivíduos serão eutanasiados pelo método de sobredosagem do anestésico tiopental, de forma idêntica à eutanásia feita para as ratas mães. O período entre o RON 1 e o RON 2 foi estipulado a partir de estudos anteriores, os quais demonstraram que 14 dias é um espaço de tempo suficiente para a realização de um novo teste de Reconhecimento do Objeto Novo (de Lima et al., 2019; Pinheiro et al., 2012).

3.6 Análises moleculares

Os animais submetidos à tarefa de RON serão eutanasiados através do método de decapitação por guilhotina, 3h após terem sido submetidos à segunda sessão de treino. As regiões do córtex pré-frontal e do hipocampo serão dissecadas e um dos hemisférios de cada animal será congelado em nitrogênio líquido para a análise do BDNF (através de ensaio do tipo ELISA), enquanto o outro hemisfério será acondicionado em TRIzol (Invitrogen) para as análises de BDNF-AS, miRNA-124 e mi-R132 (através de ensaio RT-qPCR). As amostras serão mantidas a -80° até o momento da realização dos ensaios moleculares.

3.6.1 Teste ELISA: O Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima, conhecido pela sigla ELISA. (do inglês, Enzyme Linked Immunosorbent Assay), é uma técnica amplamente utilizada para a detecção e quantificação de diversos analitos, como peptídeos, proteínas, anticorpos e hormônios, que são previamente adsorvidos em placas. O princípio fundamental do ELISA reside no reconhecimento específico do analito por um anticorpo que está conjugado a uma enzima. O sistema de detecção do ELISA se baseia no desenvolvimento de cor, que ocorre após a adição de um substrato cromogênico à reação. A intensidade da cor gerada é proporcional à quantidade do analito presente, permitindo uma análise quantitativa precisa.

3.6.2 Teste RT-qPCR: O teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction) é uma técnica laboratorial capaz de ampliar fragmentos específicos de DNA em milhões ou até mesmo bilhões de cópias, permitindo uma análise mais detalhada do material estudado. A PCR quantitativa em tempo real (qPCR), por sua vez, tem a capacidade de detectar e quantificar a fluorescência emitida durante cada ciclo de uma reação de PCR, podendo detectar poucas cópias de DNA presentes na amostra. Quando o material genético avaliado é composto por RNA, é necessário, primeiramente, convertê-lo em DNA complementar (cDNA) em uma etapa chamada de transcrição reversa (RT). Assim, RT-qPCR nada mais é que uma técnica de PCR quantitativa em tempo real com uma etapa adicional de transcrição reversa.

Para o presente trabalho, o RNA total da amostra será purificado utilizando-se TRIzol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA será quantificado por espectrofotometria (NanoDrop) e 2 µg de RNA serão utilizados para a síntese de cDNA pela transcriptase reversa, utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de cDNA resultantes serão diluídas 1:20 em água ultrapura tratada com DEPC (Ambion). Os RNAs de interesse serão analisados pelo método Stem-loop. Em resumo, após a purificação do RNA total, 500 ng de RNA serão utilizadas para a transcrição reversa através do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) utilizando-se primers específicos. O cDNA resultante será utilizado para a amplificação por RT-qPCR com o kit GoTaq qPCR and RT-qPCR Systems (Promega), novamente utilizando-se primers específicos. Para a normalização, o cálculo de expressão relativa será realizado através do método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak & Schmittgen, 2001) utilizando-se GAPDH e U6 snRNA (lncRNAs e miRNAs, respectivamente) como controle de expressão constitutiva. As amostras serão analisadas em triplicata e serão usados 10 primers (Tabela 1).

3.7 Descarte de materiais e resíduos

Os tecidos dos animais, assim como suas carcaças e outros resíduos como materiais contaminados e luvas, serão depositados em sacolas brancas para transporte de material infectante. Os materiais perfurocortantes serão descartados em caixas de papelão amarelo, específicas para esse tipo de resíduo (Descarpac®), e identificadas como material infectante. O lixo biológico e materiais perfurocortantes serão recolhidos conforme os protocolos estipulados pela instituição onde será realizado o experimento.

Tabela 1: Relação dos primers utilizados com sua identificação (ID), sequência e referência bibliográfica.

Primer	ID	Sequência	Referência
BDNF-AS F	NC_000068.8	5'-CCGTGAGAAGATCTCATTGGG-3	Qiao et al., 2020
BDNF-AS R		5'-GGGTCACAAGTCACGTAGCA-3	
GAPDH F	NC_086022.1	5'-ACCTTTGGCATTGTGGAAGG-3',	Qiao et al., 2020
GAPDH R		5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'.	
miR-124 F	NC_086033.1	5'-GCGCTAAGGCACGCGGT-3'	Gu et al., 2019
miR-124 R		5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'	
mi-R132 F	NC_086028.1	5'-GCGCGTAACAGTCTACAGCCA-3'	Tong et al., 2021
mi-R-132 R		5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'	
U6 F		5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3'	Gu et al., 2019
U6 R		5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3'	

3.8 Análise estatística

Os resultados comportamentais serão expressos através da média $\pm$ erro padrão e serão analisados através da análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguida pelo teste de post hoc de Tukey quando necessário, a fim de categorizar os animais do grupo separado de acordo com a sua performance cognitiva (Aprendedores Superiores e Inferiores) na tarefa de Reconhecimento do Objeto Novo em relação aos animais que não passaram pela privação materna (grupo controle). Os resultados bioquímicos e moleculares serão expressos através da média $\pm$ erro padrão e serão analisados através da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) ou duas vias (two-way ANOVA), seguida novamente pelo teste de post hoc de Tukey quando necessário. Os dados serão analisados, ainda, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson a fim de determinar uma possível relação entre o índice de reconhecimento do objeto novo e o nível de BDNF, BDNF-AS, miR-124 e miR-132 no córtex pré-frontal e hipocampo. Em todas as comparações, o teste de Levene será utilizado para averiguar a homogeneidade das variâncias e $p < 0,05$ será considerado significativo estatisticamente.

4. RESULTADOS ESPERADOS

Ao final do projeto, espera-se que os resultados obtidos contribuam para um melhor entendimento sobre os processos e mecanismos através dos quais o estresse pode impactar o desempenho cognitivo de um indivíduo que fora exposto a ele no período crítico da infância. É esperado que tal conhecimento possa ajudar na criação de tratamentos farmacológicos ou terapêuticos mais eficientes na atenuação ou reversão dos déficits cognitivos que podem ser desencadeados naqueles mais vulneráveis ao estresse. O entendimento da razão que leva alguns indivíduos a apresentarem um declínio cognitivo enquanto outros não são afetados ou apresentam desempenho cognitivo superior, pode facilitar a identificação dos mais vulneráveis aos efeitos deletérios do estresse, podendo, a partir disso, se pensar em métodos de prevenção focados nesses indivíduos.

5. CRONOGRAMA

Atividades	Meses (2025)											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Revisão bibliográfica												
Elaboração e submissão do formulário para CEUA*.												
Obtenção das fêmeas prenhas e exposição das ninhadas ao estresse no período neonatal (separação materna)												
Período de crescimento dos animais (até a idade adulta)												
Realização das tarefas comportamentais nos animais adultos, eutanásia e preparo das amostras para análise bioquímica/molecular.												
Análise bioquímica/molecular das amostras.												
Análise dos resultados e preparo do manuscrito para publicação												

*Comitê de Ética no Uso de Animais

6. ORÇAMENTO

Itens de dispêndio	Valor (R\$)	Justificativa
Capital		
1 HD externo 2T	400,00	Armazenamento das imagens dos testes comportamentais realizados com os animais experimentais.
1 Câmera filmadora	1.000,00	Registro de vídeo dos testes comportamentais realizados com os animais experimentais.
1 Tripé	100,00	Apoio para a câmera durante o registro de vídeo dos testes comportamentais realizados com os animais experimentais.
1 Caixa de Campo Aberto	1.500,00	Utilizada nos testes de Campo Aberto e de Reconhecimento do Objeto Novo.
1 Labirinto Elevado tipo "Plus" (Elevated Plus Maze)	4.000,00	Utilizado no teste de Labirinto Elevado em Cruz.
Peças de lego avulsas	100,00	Utilizadas no teste de Reconhecimento do Objeto Novo.
1 Termociclador	150.000,00	Utilizado na preparação das amostras de tecido que serão usadas para análises moleculares.
1 Leitora de ELISA	33.150,00	Análise dos níveis de BDNF nas amostras cerebrais adquiridas depois da eutanásia.
1 Lavadora de microplacas	23.000,00	Utilizado na preparação das amostras de tecido que serão usadas para análises moleculares.
1 Centrífuga refrigerada	4.670,00	Utilizado na preparação das amostras de tecido que serão usadas para análises moleculares.
1 Balança de precisão (0,01 mg)	2.600,00	Utilizada para medir o peso dos animais experimentais.
Micropipeta de volume variável (0,1 – 2 µm)	1.040,00	Utilizada na preparação das amostras de tecido que serão usadas para análises moleculares.

Itens de dispêndio	Valor (R\$)	Justificativa
Capital		
Micropipeta de volume variável (10 – 100 µm)	400,00	Utilizada na preparação das amostras de tecido que serão usadas para análises moleculares.
Micropipeta de volume variável (100 – 1000 µm)	400,00	Utilizada na preparação das amostras de tecido que serão usadas para análises moleculares.
pHmetro	2.000,00	Utilizado na preparação das amostras de tecido que serão usadas para análises moleculares.
Agitador magnético com aquecimento	1.000,00	Utilizado na preparação das amostras de tecido que serão usadas para análises moleculares.
Guilhotina para ratos EB-271	1.500,00	Utilizada para a eutanásia dos animais experimentais.
2 bisturis cirúrgicos + 1 caixa de lâminas tamanho 1 (100 unidades).	90,00	Utilizado para a dissecação do cérebro e remoção das partes de interesse após a eutanásia. Obs: R\$ 20,00 cada bisturi + R\$ 50,00 caixa com lâminas.
2 Espátulas Duplas com Cabo Oitavado.	40,00	Utilizado para a dissecação do cérebro e remoção das partes de interesse após a eutanásia. Obs: R\$ 20,00 cada.
Custeio		
3 BDNF ELISA Kit (Millipore)	15.840,00	Quantificação do BDNF por ELISA nas amostras cerebrais
TRIzol 100ml (Invitrogen)	1.050,00	Extração do RNA das amostras de cerebrais.
2 High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems - Life Technology)	5.100,00	Quantificação do BDNF-AS, do miR-124 e do miR-132 por RT-qPCR nas amostras cerebrais.
2 Super Kit Taq DNA Polimerase 5 U/ul (500U) + dNTP mix 10 mM (1ml) (Quatro G)	1.276,00	Quantificação do BDNF-AS, do miR-124 e do miR-132 por RT-qPCR nas amostras cerebrais
6 Ladder 100 pb - 500 uL 100 reações (Quatro G)	2.280,00	Quantificação do BDNF-AS e do miR-124 por RT-qPCR nas amostras cerebrais.

Itens de dispêndio	Valor (R\$)	Justificativa
Custeio		
Primers (IDT) BDNF-AS F 5'-CCGTGAGAAGATcTcATTGGG-3' BDNF AS R 5'-GGGTCACAAGTCACGTAGCA-3' miR-124 F F5'-GCGCTAAGGCACGCGGT-3' miR-124 R 5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3' miR-132 F 5'-GCGCGTAACAGTCTACAGCCA-3' miR-132 R 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' U6 snRNA F 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3' U6 snRNA R 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3' GAPDH F 5'-ACCTTTGGCATTGTGGAAGG-3' GAPDH R 5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3	500,00	Quantificação do BDNF-AS, do miR-124 e do miR-132, por RT-qPCR nas amostras cerebrais.
2 Loading Buffer Gel Red + Xilenocianol (4 X 1 mL) (Quatro G)	190,00	Quantificação do BDNF-AS, do miR-124 e do miR-132 por RT-qPCR nas amostras cerebrais.
Microtubo PCR 200 ul Tampa Chata Transparente 1000 Un/pct (KASVI)	403,00	Quantificação do BDNF-AS, do miR-124 e do miR-132 por RT-qPCR nas amostras cerebrais
Microtubo Centrif. Baixa Retenção 1,5ml Graduado Transp. 250 Un/pct (KASVI)	1.570,00	Análise bioquímica e molecular
Microamp Fast Optical 96-Well Reaction Plate 0.1 mL 10 PLACAS (Applied Biosystems - Life Technology)	270,00	Quantificação do BDNF-AS, do miR-124 e do miR-132 por RT-qPCR nas amostras cerebrais
Selante adesivo p/ Tempo Real 100/CX (Axygen)	640,00	Quantificação do BDNF-AS, do miR-124 e do miR-132 por RT-qPCR nas amostras cerebrais.
Valor Total: R\$ 256.109,00*		

* O Laboratório de Disfunções da Memória, onde o trabalho será realizado, conta com todos os equipamentos citados para capital, assim como com recursos necessários para a aquisição dos itens de custeio.

7. LOCAL DE REALIZAÇÃO

Esse projeto será executado no Laboratório de Disfunções da Memória da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, coordenado pelas professoras Dra. Nadja Schroder e Dra. Maria Noemia Martins de Lima, que conta com todos os recursos financeiros e de infraestrutura para a sua completa realização.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque-Filho, M. O., de Freitas, B. S., Garcia, R. C., Crivelaro, P. C., Schröder, N., & de Lima, M. N. (2017). Dual influences of early-life maternal deprivation on histone deacetylase activity and recognition memory in rats. *Neuroscience*, 344, 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.12.054>

Barros, H. M. T. (2006). Modelos para estudo de locomoção e exploração em roedores. In E. L. Rhoden, & C. R. Rhoden (Eds.), *Princípios e Técnicas em Experimentação Animal* (pp. 87–94). UFRGS Editora.

Barker, D. J. P. (2004). The developmental origins of adult disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 23(sup6), 588S–595S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719428>

Bateson, P., Barker, D., Clutton-Brock, T., Deb, D., D'Udine, B., Foley, R. A., Gluckman, P., Godfrey, K., Kirkwood, T., Lahr, M. M., McNamara, J., Metcalfe, N. B., Monaghan, P., Spencer, H. G., & Sultan, S. E. (2004). Developmental plasticity and human health. *Nature*, 430, 419–421. <https://doi.org/10.1038/nature02725>

Bekinschtein, P., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2014). BDNF and memory processing. *Neuropharmacology*, 76 (Pt C), 677–683. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.024>

Bick, J., & Nelson, C. A. (2016). Early adverse experiences and the developing brain. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 177–196. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.252>

Brivio, P., Corsini, G., Riva, M. A., & Calabrese, F. (2019). Chronic vortioxetine treatment improves the responsiveness to an acute stress acting through the ventral hippocampus in a glucocorticoid-dependent way. *Pharmacological Research*, 142, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.02.006>

Brivio, P., Sbrini, G., Peeva, P., Todiras, M., Bader, M., Alenina, N., & Calabrese, F. (2018). TPH2 deficiency influences neuroplastic mechanisms and alters the response to an acute stress in a sex specific manner. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 389. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00389>

Brivio, P., Sbrini, G., Riva, M. A., & Calabrese, F. (2020). Acute stress induces cognitive improvement in the Novel Object Recognition task by transiently modulating bdnf in the prefrontal cortex of male rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 40(6), 1037–1047. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00793-7>

- Calabrese, F., Molteni, R., Racagni, G., & Riva, M. A. (2009). Neuronal plasticity: A link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 34 (Suppl 1), S208–S216. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.014>
- Caradonna, S. G., Zhang, T. Y., O'Toole, N., Shen, M. J., Khalil, H., Einhorn, N. R., Wen, X., Parent, C., Lee, F. S., Akil, H., Meaney, M. J., McEwen, B. S., & Marrocco, J. (2021). Genomic modules and intramodular network concordance in susceptible and resilient male mice across models of stress. *Neuropsychopharmacology*, 47(5), 987–999. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01219-8>
- Cattane, N., Vernon, A. C., Borsini, A., Scassellati, C., Endres, D., Capuron, L., Tamouza, R., Benros, M. E., Leza, J. C., Pariante, C. M., Riva, M. A., & Cattaneo, A. (2022). Preclinical animal models of mental illnesses to translate findings from the bench to the bedside: Molecular brain mechanisms and peripheral biomarkers associated to early life stress or immune challenges. *European Neuropsychopharmacology*, 58, 55–79. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2022.02.002>
- Chandrasekar, V., & Dreyer, J. L. (2009). MicroRNAs MiR-124, Let-7d and MiR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 42(4), 350–362. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.08.009>
- Chen, Y., & Baram, T. (2016). Toward understanding how early-life stress reprograms cognitive and emotional brain networks. *Nature*, 41(1), 197–206. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.181>
- da Silva, V. K., de Freitas, B. S., da Silva-Dornelles, A., Nery, L. R., Falavigna, L., Ferreira, R. D., Bogo, M. R., Hallak, J. E., Zuardi, A. W., Crippa, J. A., & Schröder, N. (2014). Cannabidiol normalizes caspase 3, synaptophysin, and mitochondrial fission protein DNMI1L expression levels in rats with brain iron overload: Implications for neuroprotection. *Molecular Neurobiology*, 49(1), 222–233. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8514-7>
- da Silva, V. K., de Freitas, B. S., Dornelles, V. C., Kist, L. W., Bogo, M. R., Silva, M. C., Streck, E. L., Hallak, J. E., Zuardi, A. W., Crippa, J. A. S., & Schröder, N. (2018). Novel insights into mitochondrial molecular targets of iron-induced neurodegeneration: Reversal by cannabidiol. *Brain Research Bulletin*, 139, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.01.014>
- Daskalakis, N. P., Bagot, R. C., Parker, K. J., Vinkers, C. H., & de Kloet, E. R. (2013). The three-hit concept of vulnerability and resilience: Toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9), 1858–1873. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.06.008>
- Daskalakis, N. P., De Kloet, E. R., Yehuda, R., Malaspina, D., & Kranz, T. M. (2015). Early life stress effects on glucocorticoid-BDNF Interplay in the hippocampus. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8, 68. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00068>
- De Assis, G. G., & Murawska-Ciałowicz, E. (2024). BDNF Modulation by microRNAs: An update on the experimental evidence. *Cells*, 13(10), 880. <https://doi.org/10.3390/cells13100880>
- de Lima, M. N., de Freitas, B. S., Rapach, K. C. R., Freymuth, M. A., Silva, R. B. M., & Schroder, N. (2019) *Influence of maternal deprivation on recognition memory and global DNA methylation in adult rats: How epigenetics modulation can contribute to vulnerability or resilience to stress*. In: Anais do 49th Society for Neuroscience Annual Meeting, Chicago, USA.

- Feinberg, A. P. (2008). Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *Jama*, 299(11), 1345–1350. <https://doi.org/10.1001/jama.299.11.1345>
- Franklin, T. B., Saab, B. J., & Mansuy, I. M. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron*, 75(5), 747–761. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.016>
- Fumagalli, F., Calabrese, F., Luoni, A., Bolis, F., Racagni, G., & Riva, M. A. (2012). Modulation of BDNF expression by repeated treatment with the novel antipsychotic lurasidone under basal condition and in response to acute stress. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15(2), 235–246. <https://doi.org/10.1017/S1461145711000150>
- Ghafouri-Fard, S., Khoshbakht, T., Taheri, M., & Ghanbari, M. (2021). A concise review on the role of BDNF-AS in human disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, e112051.
- Gibney, E. R., & Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105(1), 4–13. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.54>
- Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Cooper, C., & Thornburg, K. L. (2008). Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England Journal of Medicine*, 359, 61–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708473>
- Gu, Z., Pan, J., & Chen, L. (2019). MiR-124 suppression in the prefrontal cortex reduces depression-like behavior in mice. *Bioscience Reports*, 39(9), BSR20190186. <https://doi.org/10.1042/BSR20190186>
- Hamilton, J. P. (2011). Epigenetics: Principles and practice. *Digestive Diseases*, 29(2), 130–135. <https://doi.org/10.1159/000323874>
- Hoogland, M., & Ploeger, A. (2022). Two different mismatches: Integrating the developmental and the evolutionary-mismatch hypothesis. *Perspectives on Psychological Science*, 17(6), 1737–1745. <https://doi.org/10.1177/17456916221078318>
- Jirtle, R. L., & Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 253–262. <https://doi.org/10.1038/nrg2045>
- Kaffman, A., & Meaney, M. J. (2007). Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: Clinical and research implications of molecular insights. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 48(3-4), 224–244. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2007.01730.x>
- Kaiser, T., & Feng, G. (2015). Modeling psychiatric disorders for developing effective treatments. *Nature Medicine*, 21, 979–988. <https://doi.org/10.1038/nm.3935>
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Open Field Test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. *Methods in Molecular Biology*, 1916, 99–103. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9
- Lee, S. H., & Jung, E. M. (2024). Adverse effects of early-life stress: Focus on the rodent neuroendocrine system. *Neural Regeneration Research*, 19(2), 336–341. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.377587>
- Li, N. P., van Vugt, M., & Colarelli, S. M. (2018). The evolutionary mismatch hypothesis: Implications for psychological science. *Current Directions in Psychological Science*, 27(1), 38–44. <https://doi.org/10.1177/0963721417731378>

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, B., Nagappan, G., & Lu, Y. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. In: G. Lewin, & B. Carter (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, 220, (pp. 223–250). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_9
- Lubin, F. D., Roth, T. L., & Sweatt, J. D. (2008). Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *The Journal of Neuroscience*, 28(42), 10576–10586. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1786-08.2008>
- Lueptow, L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the investigation of learning and memory in mice. *JoVE*, 126, e55718. <https://doi.org/10.3791/55718>
- Luoni, A., Macchi, F., Papp, M., Molteni, R., & Riva, M. A. (2015). Lurasidone exerts antidepressant properties in the chronic mild stress model through the regulation of synaptic and neuroplastic mechanisms in the rat prefrontal cortex. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(4), pyu061. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu061>
- McEwen, B. S., & Akil, H. (2020). Revisiting the stress concept: Implications for affective disorders. *The Journal of Neuroscience*, 40(1), 12–21. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0733-19.2019>
- Mirescu, C., & Gould, E. (2006). Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*, 16(3), 233–238. <https://doi.org/10.1002/hipo.20155>
- Mohseni, F., Khaksari, M., Razaiee, R., Rahimi, K., Norouzi, P., & Garmabi, B. (2021). Apelin 13 improves anxiety and cognition via hippocampal increases bdnf expression and reduction cell death in neonatal alcohol exposed rats. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27, 1351–1362. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10173-4>
- Molteni, R., Calabrese, F., Cattaneo, A., Mancini, M., Gennarelli, M., Racagni, G., & Riva, M. A. (2009). Acute stress responsiveness of the neurotrophin BDNF in the rat hippocampus is modulated by chronic treatment with the antidepressant duloxetine. *Neuropsychopharmacology*, 34(6), 1523–1532. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.208>
- Murgatroyd, C., & Spengler, D. (2012). Genetic variation in the epigenetic machinery and mental health. *Current Psychiatry Reports*, 14(2), 138–149. <https://doi.org/10.1007/s11920-012-0255-1>
- Nederhof, E., & Schmidt, M. V. (2012). Mismatch or cumulative stress: Toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiology & Behavior*, 106(5), 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.12.008>
- Pinheiro, R. M., de Lima, M. N., Fries, G. R., Garcia, V. A., Presti-Torres, J., Hallmenschlager, L. H., Alcalde, L. A., Roesler, R., Andersen, M. L., Quevedo, J., Kapczinski, F., & Schröder, N. (2012). Early life stress exacerbates cognitive dysfunction induced by d-amphetamine: Amelioration by valproic acid. *Journal of Neural Transmission*, 119(6), 627–637. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0754-y>

- Pinheiro, R. M., de Lima, M. N., Portal, B. C., Busato, S. B., Falavigna, L., Ferreira, R. D., Paz, A. C., de Aguiar, B. W., Kapczinski, F., & Schröder, N. (2015). Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: Effects of valproic acid and topiramate. *Journal of Neural Transmission*, 122(5), 709–719. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1303-2>
- Qiao, L. X., Zhao, R. B., Wu, M. F., Zhu, L. H., & Xia, Z. K. (2020). Silencing of long non-coding antisense RNA brain-derived neurotrophic factor attenuates hypoxia/ischemia-induced neonatal brain injury. *International Journal of Molecular Medicine*, 46(2), 653–662. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4625>
- Rocha, F. R. D., Gonçalves, R. C., Prestes, G. D. S., Damásio, D., Goulart, A. I., Vieira, A. A. D. S., Michels, M., Rosa, M. I. D., Ritter, C., & Dal-Pizzol, F. (2023). Biomarkers of neuropsychiatric dysfunction in intensive care unit survivors: A prospective cohort study. *Critical Care Science*, 35(2), 147–155. <https://doi.org/10.5935/2965-2774.20230422-en>
- Rinaldi A. (2022). *OMS coloca o estresse ocupacional como um fator social*. Gov.br. <https://www.gov.br/fundacentro/pt-br/comunicacao/noticias/noticias/2007/7/oms-coloca-o-estresse-ocupacional-como-um-fator-social>
- Salleh, M. R. (2008). Life event, stress and illness. *The Malaysian Journal of Medical Sciences*, 15(4), 9–18. PMID: PMC3341916
- Schmidt, M. V. (2011). Animal models for depression and the mismatch hypothesis of disease. *Psychoneuroendocrinology*, 36, 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.07.001>
- Tong, L., Li, M. D., Nie, P. Y., Chen, Y., Chen, Y. L., & Ji, L. L. (2021). miR-132 downregulation alleviates behavioral impairment of rats exposed to single prolonged stress, reduces the level of apoptosis in PFC, and upregulates the expression of MeCP2 and BDNF. *Neurobiology of Stress*, 14, e100311. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100311>
- van der Worp, H. B., Howells, D. W., Sena, E. S., Porritt, M. J., Rewell, S., O'Collins, V., & Macleod, M. R. (2010). Can animal models of disease reliably inform human studies?. *PLoS Medicine*, 7(3), e1000245. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000245>
- Võikar, V., & Stanford, S. C. (2023). The Open Field Test. In: J. Harro (Ed.), *Psychiatric Vulnerability, Mood, and Anxiety Disorders*, 190, pp. 9–29. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2748-8_2
- Wanet, A., Tacheny, A., Arnould, T., & Renard, P. (2012). miR-212/132 expression and functions: Within and beyond the neuronal compartment. *Nucleic Acids Research*, 40(11), 4742–4753, <https://doi.org/10.1093/nar/gks151>
- World Health Organization. (2013) *Guidelines for the management of conditions specifically related to stress*. ISBN: 9789241505406



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