



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CARINE HARTMANN DO PRADO

**AS CONSEQUÊNCIAS DOS MAUS-TRATOS NA INFÂNCIA NA
REPROGRAMAÇÃO NEUROIMUNOENDOCRINA EM ADOLESCENTES
SAUDÁVEIS E MODELO ANIMAL DE SEPARAÇÃO MATERNA**

Porto Alegre, 2016

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AS CONSEQUÊNCIAS DOS MAUS-TRATOS NA INFÂNCIA NA
REPROGRAMAÇÃO NEUROIMUNOENDOCRINA EM ADOLESCENTES
SAUDÁVEIS E MODELO ANIMAL DE SEPARAÇÃO MATERNA**

*Tese de Doutorado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e
Molecular da Pontifícia
Universidade Católica do Rio
Grande do Sul como requisito
para obtenção do título de
doutor.*

CARINE HARTMANN DO PRADO

Orientador: Prof. Dr. Moisés Evandro Bauer

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira

Porto Alegre, 2016

“A TAREFA NÃO É VER AQUILO
QUE NINGUÉM VIU, MAS PENSAR
O QUE NINGUÉM AINDA PENSOU
SOBRE AQUILO QUE TODO
MUNDO VÊ”.

Arthur Shopenhauer

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rose e Luiz Tarciso pelo apoio e amor, sempre. Não tenho palavras para descrever tamanha gratidão. Obrigada por tudo, Amo vocês.

Ao meu marido, Marcelo Machado por ser meu maior incentivador, acreditando muitas vezes mais em mim do que eu mesma. Te amo.

Aos meus orientadores Dr Moises E Bauer e Dr Rodrigo Grassi-Oliveira pela confiança depositada em mim na realização desse projeto e por todos os ensinamentos durante os 7 anos em que estou no Laboratório. Obrigada pela oportunidade concedida, serei sempre grata.

À PUCRS e FAPERGS pelo financiamento do projeto e incentivo a pesquisa.

À Dr Heather Brenhouse e colegas de laboratório em Boston por me receberem de forma tão acolhedora.

Às minhas amigas do Laboratório Talita Siara, Laura Petersen, Aline Zaparte e Julia Motta pela amizade construída e por tornarem os dias de trabalho mais divertidos. Agradecimento especial para a Andrea Wieck pela amizade e incentivo diário nos últimos anos. Agradeço também ao Lucas Rizzo que mesmo longe continua muito presente, um grande amigo.

Às amigas que nunca entraram no Laboratório, mas que estiveram ao meu lado sempre e entenderam minha ausência em determinados períodos- Ludmila Queiroz, Maiara Costa Beber, Iriane Prado, Amanda Pires, Sara Moraes, Rafaela Moraes, Camila Hoffmann, Vanessa Moraes, Taissa Pisoni, Nadia Nadalon, Taina Pedroso, Silvia Albano, Patricia Rodrigues e Marina Gehring.

Aos amigos de Boston Ana Laura, Tiana, Nivea, Freedom, Prabarua, Vanessa e Jenn obrigada pela convivência e amizade durante minha estadia em Boston.

LISTA DE ABREVIATURAS

MTI: Maus-tratos na Infância

DM: Depressão Maior

TB: Transtorno Bipolar

TEPT: Transtorno de estresse pós-traumático

GC: Glicocorticoides

SNC: Sistema Nervoso Central

SI: Sistema Imunológico

SE: Sistema Endócrino

PFC: Córtex Pré-frontal

HPA: Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

NF- κ B: Fator de Transcrição Nuclear Kappa-Beta

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

SM: Separação Materna

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral – alfa (Tumour necrose fator-alpha)

IL-6: Interleucina 6

IL-1 β : Interleucina 1-Beta

IL-2: Interleucina 2

IFN- γ : Interferon – gama

IL-10: Interleucina 10

IL-4: Interleucina 4

PCR: Proteína C-reativa

CRH: Hormônio Liberador de Corticotrofina

OMS: Organização Mundial da Saúde

ISPCAN: Sociedade Internacional para a Prevenção do Abuso e da Negligência Infantil

MAPK: Proteína Cinase responsiva à mitogenos

ERK: Proteínas cinase regulada por fatores extracelulares

p38: Proteína cinase ativada por mitogenos p38

DNA: Ácido desoxirribonucleico

CRH: Hormônio Liberador de Corticotrofina

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

RNS: Espécies Reativas de Nitrogênio

SOD: Superoxido Dismutase

CAT: Catalase

GPx: Glutathiona Peroxidase

GST: Glutathiona Transferase

NGF: Fator de crescimento neural

COX-2: Ciclooxygenase-2

DEX: Dexametasona

LPS: Lipopolisacarídeo bacteriano

NK: Células *Natural Killers*

CD: Cluster de diferenciação

PVB: Parvalbumina

RESUMO

A exposição aos maus-tratos na infância (MTI), incluindo diferentes formas de abuso e negligência, está associada com repercussões em longo prazo na saúde do indivíduo. Os primeiros anos de vida de um indivíduo caracterizam-se por rápido desenvolvimento neurobiológico e psicológico, portanto os MTI são considerados importantes fatores de risco para danos psicológicos e aumento da vulnerabilidade para transtornos de humor. Acredita-se que, alterações em mecanismos de resposta ao estresse, incluindo os sistemas neuroendócrino e imunológico/oxidativo, estejam envolvidas neste processo. Diante disto, investigar os efeitos da exposição aos MTI no adolescente saudável pode ajudar a identificar padrões de vulnerabilidade para transtornos de humor na idade adulta. Os objetivos da tese apresentada são: 1) investigar os efeitos neuroimunoendócrinos e oxidativos da exposição aos MTI em adolescentes saudáveis sem transtorno de humor e 2) analisar os efeitos do estresse precoce em modelo animal através do protocolo de separação materna (SM) no desempenho cognitivo e parâmetros imunológicos/oxidativos. Para avaliação do primeiro objetivo, foram recrutados trinta adolescentes saudáveis com histórico de MTI e vinte e sete adolescentes saudáveis sem história de MTI como grupo controle. Amostras de sangue, plasma e cabelo foram obtidas de todos os participantes. Linfócitos foram isolados e estimulados *in vitro* para identificar subtipos linfocitários, citocinas Th1/Th2/Th17, vias de sinalização intracelular MAPKs e NF- κ B, bem como a sensibilidade dos linfócitos ao dexametasona, por citometria de fluxo. Ainda, os níveis de BDNF plasmático e cortisol capilar foram avaliados pela técnica de ELISA. Os adolescentes com MTI apresentaram um aumento na porcentagem das células T ativadas (CD3+CD4+CD25+ e CD3+CD69+) e células T senescentes (CD8CD28- e CD4+CD28-), além de redução em células NK (CD3-CD56+) e células NKT (CD3+CD56+). Além disso, os linfócitos de adolescentes expostos aos MTI apresentaram maior resistência ao glicocorticoide dexametasona *in vitro*. Também evidenciamos alterações em rotas de sinalização intracelular, observada por aumento na fosforilação de ERK1/2 e NF- κ B em células T CD8+, e aumento de citocinas como IL-2, IFN- γ and IL-17 após MTI, confirmando um perfil de ativação imune celular. Aumento dos níveis de cortisol capilar juntamente com a redução das concentrações de BDNF plasmático foi detectado nos adolescentes expostos aos MTI, refletindo os efeitos a longo prazo do estresse crônico em parâmetros neuroendócrinos. Ainda, um desequilíbrio entre os marcadores de dano oxidativo e defesas antioxidantes foi encontrado nos adolescentes com histórico de MTI. Em relação ao segundo objetivo, os resultados do estudo experimental demonstraram que a SM causou alterações de memória, perda de parvalbumina e aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) no plasma de animais adolescentes. Após a intervenção do ambiente enriquecido foi possível reverter os prejuízos de memória e a inflamação causados pela exposição a SM. Concluindo, nossos resultados indicam que a exposição ao estresse durante a infância altera a resposta neuroimunoendócrina e oxidativa em modelo animal e humano. Deste modo, compreender de que forma os MTI modulam o sistema nervoso, endócrino e imune e como estes sistemas interagem entre si para alterar precocemente as respostas fisiológicas da criança e do

adolescente saudável pode auxiliar no aumento de ações preventivas contra o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e transtornos de humor na idade adulta.

Palavras-chave: Maus-tratos na infância, eixo HPA, BDNF, ativação imunológica.

ABSTRACT

Childhood maltreatment (CM) exposure, including physical, sexual and psychological abuse, as well as physical or emotional neglect, is associated to long-term effects on mental health. The individual's earlier years of life are characterized by rapid neurobiological and psychological development; therefore, CM is considered an important risk factor for psychological impairment and increased vulnerability to mood disorders. It is well established that alterations in the stress response systems, such as the immune and neuroendocrine systems are involved in this process. Based on this, investigating the effects of CM exposure in healthy adolescents can help to identify patterns of vulnerability to mood disorders in adulthood. The main objectives are: 1) to investigate the effects of CM exposure in neuroimunoendocrine and oxidative parameters in healthy adolescents without mood disorder; 2) to analyze early life stress effects in an animal model of maternal separation (MS) in cognitive performance, immune and oxidative parameters. The first study recruited thirty healthy adolescents reporting CM and twenty-seven healthy adolescents with no history of CM as control group. Blood, plasma and hair samples were obtained from all participants. Lymphocytes were isolated and stimulated *in vitro* to evaluate lymphocyte subsets, Th1/Th2/Th17 cytokines, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor kappa B (Nfkb) signaling pathways as well as lymphocyte sensitivity to dexamethasone by flow cytometry. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and hair cortisol were assessed with enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Increased percentage of activated T cells (CD3+CD+CD25+ and CD3+CD69+) and senescent T cells (CD8+CD28- and CD4+CD28-), as well as a reduction of NK cells (CD3-CD56+), and NKT cells (CD3+CD56+) were observed in healthy adolescents exposed to CM. Also, it was observed an increase of intracellular signaling through increased phosphorylation of ERK1 / 2 and NF-κB and increased cytokine production, such as IL-2, IFN-γ and IL-17 following CM, suggesting increased cellular activation. Increased hair cortisol levels along with increased lymphocyte resistance to glucocorticoids *in vitro*, as well as low BDNF concentrations were observed in CM, reflecting the

chronic stress effects on neuroendocrine parameters. The second study showed cognitive impairment, loss of parvalbumin and increased pro-inflammatory cytokines (TNF- α) peripherally following MS. The intervention of the enriched environment was effective in reversing memory damage as well as inflammation caused by MS. In conclusion, our results suggest that CM alter neuroimunoendocrine and oxidative responses in both, animal and human models. Thus, the understanding of the underlying mechanisms by which CM modulates the central nervous system, endocrine, and immune system and how these systems interact to alter the physiological responses of children and healthy adolescents, may help to increase preventive actions against the development of chronic inflammatory diseases and mood disorders in adulthood.

Keywords: Childhood maltreatment HPA axis, BDNF, immune activation.

SUMÁRIO

RESUMO	5
1. Introdução	9
1.1 <i>Resposta fisiológica ao Estresse</i>	<i>11</i>
1.2 <i>Maus-tratos na Infância e vulnerabilidade a Transtornos de Humor</i>	<i>13</i>
1.3 <i>Maus-tratos na Infância e Reprogramação Neuroendócrina</i>	<i>15</i>
1.4 <i>Maus-tratos na Infância e Alterações Imunológicas</i>	<i>18</i>
1.5 <i>Estresse Oxidativo associado a Doenças</i>	<i>21</i>
1.6 <i>Separação Materna como Modelo Animal de Estresse Precoce</i>	<i>23</i>
2. Considerações finais	27
3. Referências	38

1. Introdução

A exposição aos maus-tratos na infância (MTI), incluindo abusos físico, emocional e/ou sexual, além da negligência, tem sido apontada como um fator de risco relevante para inúmeros desfechos negativos na infância até a entrada da idade adulta. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Sociedade Internacional para a Prevenção do Abuso e da Negligência Infantil (ISPCAN) o termo “maus-tratos infantis” refere-se à violência praticada contra as crianças, em âmbito doméstico, geralmente pelos principais cuidadores em uma relação de responsabilidade e confiança (WHO/ ISPCAN, 2006).

Eventos traumáticos durante os chamados “períodos de sensibilidade do desenvolvimento”, estão associados com o aumento da suscetibilidade e desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, dentre eles a Depressão Maior (DM), Transtorno Bipolar (TB), Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT), e dependência de álcool [1]. De fato, estudos demonstram que os indivíduos que sofreram algum tipo de trauma durante a infância apresentam respostas psiconeuroimunoendócrinas diferentes aos estressores comuns da vida em comparação com indivíduos que não foram expostos ao trauma. Ainda, dados consistentes na literatura sugerem que o abandono, o abuso físico e sexual são considerados de maior impacto para a saúde mental, estando estes intimamente relacionados ao aumento de depressão e tentativa de suicídio em pessoas jovens e adultas [2, 3].

Embora exista essa relação entre MTI e aumento do risco para transtornos mentais, os mecanismos fisiológicos por trás dessa associação permanecem pouco compreendidos, e a grande maioria dos estudos relacionados à MTI e alterações fisiológicas é descrito em indivíduos adultos com algum tipo de transtorno de humor. Além disso, torna-se importante

ressaltar que as consequências da exposição à MTI variam de indivíduo para indivíduo, tendo em vista que alguns indivíduos expostos aos MTI se tornam resilientes ao estresse e não desenvolvem nenhum tipo de transtorno mental.

Acredita-se que alterações neuroendócrinas, como a reprogramação do eixo HPA, durante períodos críticos do desenvolvimento estejam envolvidos nesse processo. O eixo HPA é o principal mecanismo de resposta ao estresse e alterações na sua responsividade, em decorrência de uma carga excessiva de estresse, acarretam no aumento da liberação de glicocorticoides (GC) e subseqüentes reduções de BDNF, resultando em alterações na neuroplasticidade do hipocampo e aumento do risco para transtornos comportamentais [4, 5].

Juntamente com as alterações neuroendócrinas, têm sido observadas alterações imunológicas em decorrência da exposição à MTI. Essa associação pode ser compreendida pelo fato de haver uma relação bidirecional entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imunológico (SI), os quais exercem suas funções através da secreção de mediadores biológicos, incluindo o cortisol e citocinas pró-inflamatórias [6]. A exposição crônica aos efeitos do cortisol pode resultar em redução da sensibilidade dos linfócitos aos GC e acentuar o perfil de ativação imune periférica e central [7-9].

Diante destes achados e devido à escassez de estudos sobre as consequências dos MTI na saúde do adolescente saudável, torna-se importante investigar os efeitos dos MTI na resposta biológica do adolescente sem transtorno de humor, com o objetivo de identificar precocemente possíveis alterações cognitivas, neuroendócrinas e imunológicas/oxidativas decorrentes da exposição à MTI que poderiam implicar no aumento do risco para o desenvolvimento de psicopatologias no adolescente e adulto.

1.1 Resposta fisiológica ao Estresse

O organismo é constantemente desafiado por eventos estressores e precisa, portanto, desenvolver mecanismos para manter o equilíbrio do organismo, ou homeostase. De fato, o estresse (por exemplo, temperatura corporal, pH e estímulos externos) é considerado uma ameaça à homeostase do organismo, que, por fim, pode ser restabelecida através de diversas respostas fisiológicas adaptativas mediadas pelo SNC, endócrino e imunológico [10, 11].

O termo “*stress*” foi primeiramente utilizado por Hans Selye (1936), descrevendo o estresse como uma resposta não específica do organismo frente a agentes ameaçadores de sua integridade (homeostase). Existem quatro tipos de respostas ao estresse descritos na literatura, que consistem em (1) repetidos desafios (por exemplo, o estresse crônico), (2) falhas ao se habituar aos repetidos desafios, (3) não cessar a resposta após o término do desafio, e (4) não exercer uma resposta adequada [12].

Um conceito mais moderno e preciso é a descrição de alostase e carga alostática [12]. Diante de uma situação física ou psicossocial adversa, o indivíduo é obrigado a adaptar-se para manter a sua sobrevivência. Alostase é o termo utilizado para se referir aos processos de adaptação, decorrentes de um estressor agudo, utilizados para a manutenção da estabilidade de um organismo (sua homeostase). Quando a resposta alostática é excessiva, o organismo desenvolve uma “carga alostática” que, por sua vez, está associada a inúmeras morbidades como os distúrbios metabólicos, do crescimento, cardiovasculares, imunológicos e transtornos do humor [13, 14].

Investigações atuais demonstram que exposições crônicas a eventos estressores podem contribuir para perda neuronal em regiões cruciais para a regulação emocional como o sistema

límbico, o hipocampo e a amígdala, aumentando as chances de desenvolvimento de transtornos psiquiátricos e prejuízos cognitivos [15, 16].

Um dos principais mediadores da alostase é o cortisol, produto final da ativação do eixo HPA (Figura 1). Após um evento estressor, o hipotálamo libera o hormônio liberador da corticotrofina (CRH), que induz a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula pituitária, que finalmente estimula a secreção e liberação do glicocorticóide cortisol pelo córtex adrenal [17]. Em níveis elevados, o cortisol interage com seus receptores em múltiplos tecidos, incluindo o eixo HPA, levando a um efeito inibitório à liberação do CRH e ACTH. Situações em que os níveis de cortisol estão alterados podem resultar em alterações imunológicas e estrutura cerebral. Sabe-se que os transtornos de humor e ansiedade são condições responsáveis por afetar diversos mediadores alostáticos, dentre eles o cortisol [12].

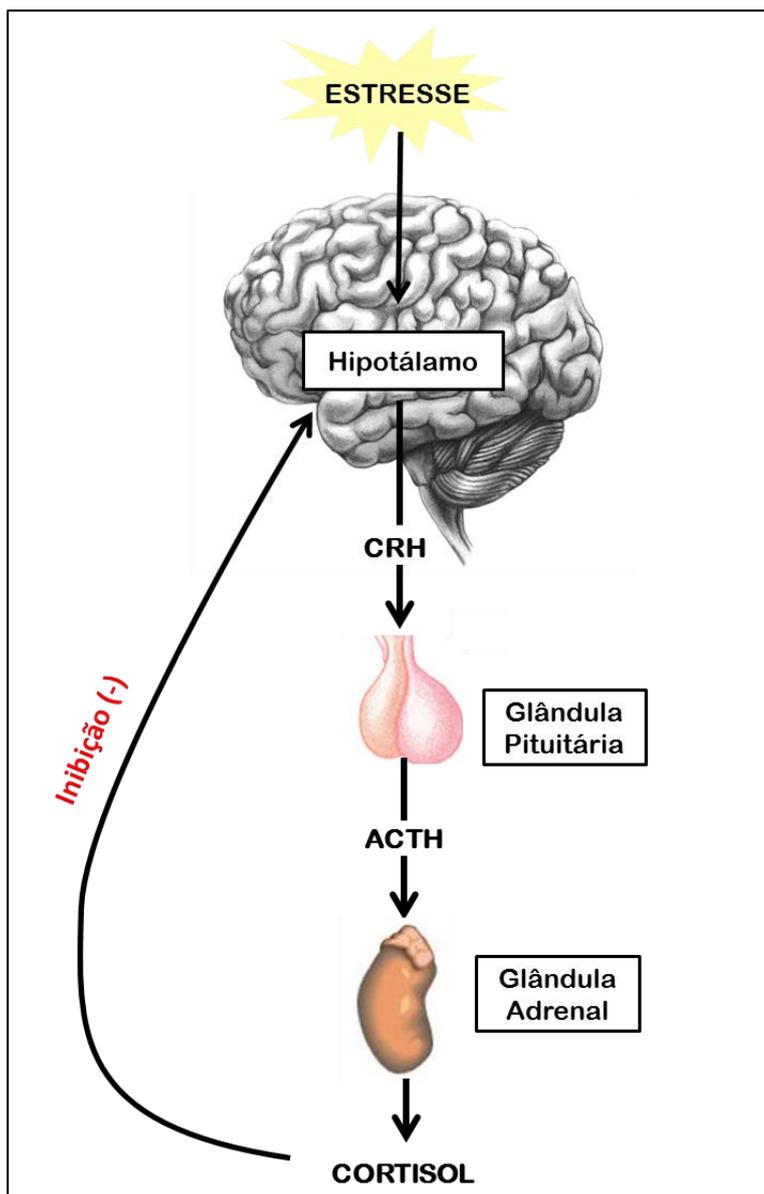


Figura 1. Esquema demonstrativo do funcionamento do Eixo HPA em resposta ao estresse.

1.2 Maus-tratos na Infância e vulnerabilidade a Transtornos de Humor

A grande maioria dos estudos reporta as consequências psicobiológicas dos MTI em indivíduos que já apresentam algum quadro clínico, tornando-se insuficientes os estudos que priorizam identificar padrões de vulnerabilidade em indivíduos que foram expostos a algum tipo de MTI que não tenham ainda desenvolvido qualquer transtorno mental. Além disso, é bem estabelecido que a exposição a traumas durante a infância, assim como características genéticas, desempenha um papel importante na resposta ao estresse a curto, médio e longo

prazo [18], tornando-se necessário a adaptação contínua do organismo frente a situações adversas.

Os primeiros anos de vida de um indivíduo, os chamados períodos de sensibilidade do desenvolvimento, são importantes alvos de estudo para a vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos, já que nestes períodos o SNC e o organismo como um todo estão em pleno desenvolvimento, tornando-se mais suscetíveis aos estressores. Diante disto, o impacto dos MTI durante o desenvolvimento do indivíduo vem sendo estudado de maneira interligada, levando em consideração os diferentes sistemas que compõe o organismo, porém os mecanismos fisiológicos que estão por trás dessa associação são pouco compreendidos [14].

Mais recentemente, constatou-se que juntamente com as alterações neurobiológicas causadas pela exposição aos MTI ocorrem danos psicológicos de grande impacto, implicando numa necessidade de se reconhecer os efeitos dos MTI no desenvolvimento neuropsicobiológico (Figura 2) [19]. Diversas linhas de pesquisas têm sugerido que a exposição a eventos traumáticos no período da infância está associada com alterações na reatividade do eixo HPA e, conseqüentemente, alterações no desenvolvimento cognitivo e neurobiológico, o que levaria a uma maior vulnerabilidade para aumento do risco de transtornos psicológicos e psiquiátricos graves, incluindo DM, TB, TEPT, manifestação de comportamentos suicidas no indivíduo adulto e abuso de drogas [19-23].

Dentre os diversos tipos de abusos existentes, o abuso sexual e físico é considerado mais grave ou patogênico do que o abuso verbal ou emocional, porém qualquer tipo de abuso ou negligência infantil pode ser fator de risco para transtornos de personalidade e humor [24]. Além disso, estudos revelam que o desenvolvimento precoce e gravidade da doença dependem da natureza e duração dos maus-tratos, variando desde abuso emocional, físico,

até negligência [25-28]. Deste modo, é de extrema importância caracterizar os MTI como fator de risco para transtornos de humor em decorrência dos efeitos neurobiológicos causados pelo mesmo. A identificação precoce das alterações de biomarcadores em adolescentes saudáveis expostos aos MTI irá aumentar as chances de intervenção precoce ou sucesso no tratamento de indivíduos vulneráveis a transtornos de humor.

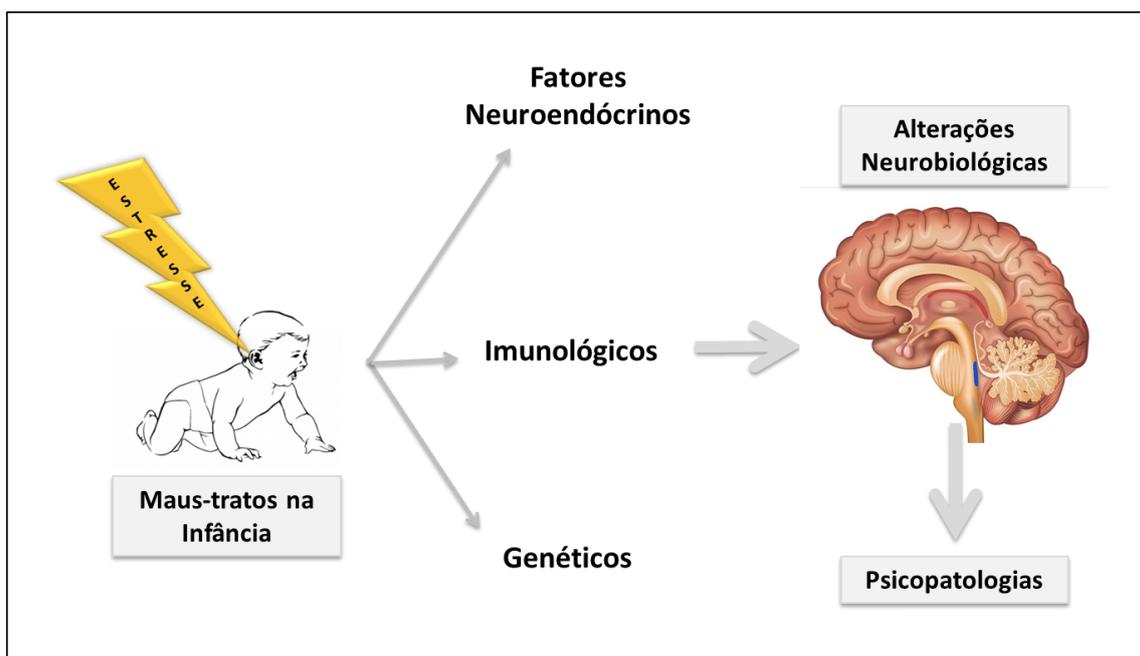


Figura 2. Modelo proposto do impacto dos MTI na modulação de parâmetros neuroimunoendócrinos e genéticos e aumento da vulnerabilidade para desfechos clínicos negativos, incluindo psicopatologias.

1.3 Maus-tratos na Infância e Reprogramação Neuroendócrina

Existem inúmeros estudos reportando hiperfunção do eixo HPA e danos na estrutura cerebral em decorrência dos MTI [14, 29, 30]. Mais especificamente, durante a resposta ao estresse crônico, o organismo é exposto constantemente ao cortisol e citocinas pró-inflamatórias, como resultado da ativação do eixo HPA e sistema imune, respectivamente [31]. Estudos tem demonstrado que a exposição prolongada a altas concentrações de cortisol resulta em uma maior resistência dos linfócitos aos efeitos imunossupressores do mesmo, contribuindo para o aumento da ativação imune e neuroinflamação (Figura 3) [32].

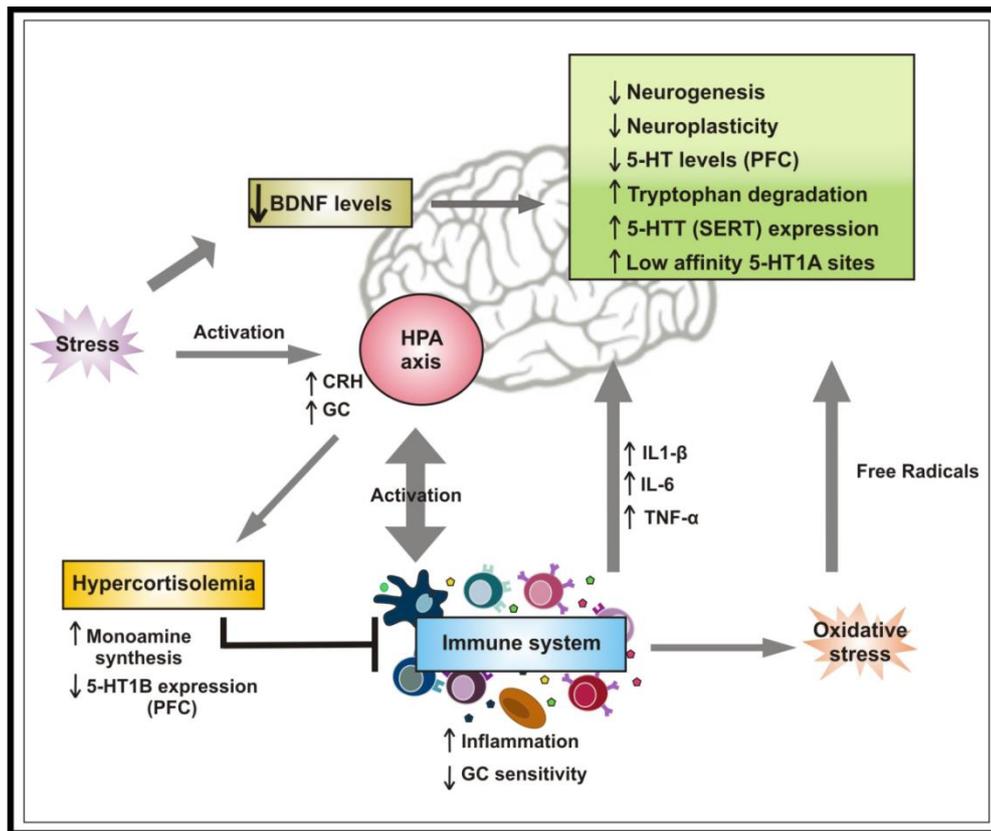


Figura 3. Interação Neuroimunoendócrina durante o estresse. O cérebro é o órgão central na percepção da resposta ao estresse, e exposições excessivas ou repetidas a eventos traumáticos podem contribuir para a ativação do eixo-HPA, que por sua vez regula o sistema imunológico através de mecanismos autonômicos e neuroendócrinos. A exposição ao estresse pode ainda reduzir as concentrações de BDNF, uma neurotrofina diretamente associada com neuroplasticidade. As respostas inflamatórias periféricas podem agir no cérebro através de citocinas pró-inflamatórias, além de produzir estresse oxidativo celular, resultando assim no aumento do risco para condições patológicas [32].

Pesquisas prévias têm demonstrado alterações permanentes na estrutura cerebral após a exposição aos MTI, resultado de diferentes processos inflamatórios centrais e periféricos [29]. Além disso, a idade em que o indivíduo foi exposto ao trauma deve ser levada em consideração, já que neurodesenvolvimento ocorre durante toda a vida. Por exemplo, durante a infância o hipocampo está em constante desenvolvimento e é considerada a região mais vulnerável aos efeitos da exposição ao estresse crônico. Na adolescência, a região de maior desenvolvimento e vulnerabilidade aos efeitos do cortisol é o PFC (córtex pré-frontal), possivelmente gerando uma resposta prolongada de glicocorticoides devido ao estresse. E

durante a idade adulta e envelhecimento, o hipocampo, o PFC e a amígdala são altamente vulneráveis aos efeitos dos hormônios do estresse [33].

Anormalidades na secreção do cortisol, ambos hiper e hipocortisolemia, bem como alterações na sensibilidade aos glicocorticoides são alterações descritas após a exposição ao estresse precoce. O cortisol é o principal hormônio liberado em resposta ao estresse, intimamente associado à função do eixo HPA e modulação de numerosos processos imunes, como por exemplo, a supressão da resposta imune periférica através do controle da produção de citocinas e receptores de células T via NFκB [34, 35]. Um estudo demonstrou níveis elevados de cortisol salivar em crianças vítimas de MTI, correlacionadas positivamente com a duração do trauma e a severidade dos sintomas de TEPT [36]. Em contrapartida, outros estudos têm demonstrado uma redução dos níveis de cortisol salivar em meninas vítimas de abuso sexual reportando TEPT [37], e crianças expostas aos MTI após o protocolo de estresse psicossocial [38]. Além disso, níveis reduzidos de cortisol plasmático foram encontrados em mulheres saudáveis expostas aos MTI após o teste de estimulação com ACTH [20]. Interessantemente, Schalinski e colaboradores (2015) encontraram níveis elevados de cortisol capilar em mulheres reportando MTI e depressão, mas baixos níveis de cortisol salivar, em comparação com mulheres sem história de MTI [39]. A dosagem de cortisol capilar é uma ferramenta relativamente nova, capaz de fornecer uma medida retrospectiva do estresse acumulado em longo prazo, considerado estresse crônico [40, 41].

Níveis alterados de cortisol em decorrência da exposição ao estresse crônico podem influenciar diretamente a expressão de neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain Derived Neurotrophic Factor* – BDNF), através da ação nos receptores de glicocorticoides e mineralocorticoides [19]. O BDNF é considerado a principal neurotrofina do

cérebro, envolvido diretamente na maturação, nutrição, crescimento e integridade neuronal, ao mesmo tempo em que protege o cérebro contra danos causados pelo estresse [42, 43]. Estudos prévios em humanos demonstram redução dos níveis plasmáticos de BDNF em transtornos psiquiátricos, incluindo DM e TB [23, 44, 45], bem como em indivíduos reportando MTI [46]. Níveis aumentados de BDNF também foram reportados em crianças saudáveis expostas a MTI [47]. Resultados similares são observados após separação materna (SM) repetidas vezes durante a infância, um modelo bem estabelecido de estresse precoce em animais, demonstrando níveis reduzidos de BDNF no hipocampo associados a uma redução da plasticidade neuronal e alteração na formação da memória durante o desenvolvimento [48-51].

1.4 Maus-tratos na Infância e Alterações Imunológicas

Atualmente têm surgido diversas evidências de que experiências traumáticas vividas na infância desencadeiam respostas inflamatórias crônicas no indivíduo adulto, desde o momento do trauma e ao longo da vida deste indivíduo, que estão associadas com a etiologia de transtornos do humor e possivelmente com morbidades crônico-inflamatórias [7, 21].

Em meio a isso, sabe-se que citocinas pró-inflamatórias liberadas na periferia em decorrência da exposição ao estresse crônico causam profundos efeitos no SNC ao ativar o eixo HPA e alterar o metabolismo de neurotransmissores, produção e liberação de glicocorticoides, neuroplasticidade, entre outras funções [48, 52]. Diversos estudos com animais e humanos demonstram que a infusão sistêmica ou central de citocinas pró-inflamatórias induz sintomas de *sickness behavior*, caracterizado por mudanças de comportamento e mal-estar, incluindo febre, fraqueza, apatia, sentimento de depressão,

anedonia e perda de apetite [53-55]. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, IFN- γ e TNF- α tem sido amplamente descrito em pacientes com DM e TB [56, 57]. De acordo com um estudo longitudinal, crianças saudáveis com 9 anos e níveis mais elevados de IL-6 e PCR apresentaram aumento na incidência de depressão na idade adulta, em comparação com crianças reportando níveis mais reduzidos de IL-6 e PCR, demonstrando associação entre inflamação prévia (infância) e desenvolvimento de transtornos de humor no adulto [58]. Além disso, níveis elevados da PCR foram observados em crianças expostas ao abuso físico e com diagnóstico de depressão [59].

Pesquisas recentes demonstraram níveis elevados de IL-6 e PCR em crianças expostas aos MTI, persistindo tais alterações na adolescência e/ou idade adulta [60, 61]. Outro estudo observou relação significativa entre MTI e níveis basais de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β em adultos saudáveis [62]. Ainda, foram observados níveis plasmáticos elevados da PCR (Proteína C Reativa) e IL-6 em mulheres adultas relatando abuso sexual na adolescência em comparação a mulheres expostas ao abuso sexual durante a infância e/ou mulheres sem a notificação de abuso [63].

Os estudos relacionados aos MTI e alterações em subtipos celulares são bastante escassos. De acordo com Bielas e colaboradores (2012), adultos saudáveis reportando MTI apresentam um aumento da função imune celular, evidenciado através do aumento dos percentuais e números absolutos de células T CD4+ e CD8+ ativadas (HLA-DR+) quando comparados com indivíduos não expostos aos MTI [59]. Similarmente, ao comparar 24 mulheres adultas com histórico de MTI- incluindo 11 que preenchiam os critérios diagnósticos para o TEPT, e 12 controles saudáveis sem história de MTI, foi possível identificar níveis

elevados de células T expressando o marcador de ativação precoce CD45RA em mulheres com diagnóstico de MTI [64].

O aumento da ativação imune observado após a exposição ao estresse crônico pode ser explicado, em parte, pela ativação de múltiplas vias de transdução de sinais intracelulares, incluindo o *Nuclear Fator Kappa B* (NF- κ B) e a *Mitogen-activated Protein kinases* (MAPK). O NF- κ B é um fator de transcrição envolvido na regulação da expressão de centenas de genes ligados a respostas imunes e inflamatórias, ativado através de diferentes estímulos extracelulares, incluindo citocinas pró-inflamatórias, proteínas virais e fatores indutores de estresse. O aumento na atividade do NF- κ B tem sido implicado em reações fisiológicas do organismo e em inúmeras condições patológicas, como doenças autoimunes, transtornos psiquiátricos e câncer [65-67]. Pace e colaboradores (2012) observaram um aumento na atividade de NF- κ B em mulheres com TEPT reportando MTI quando comparadas com controles [68].

No mesmo contexto, a sinalização intracelular via MAPKs, incluindo ERK 1/2 e p38 está envolvida em inúmeros processos da resposta imune, como proliferação celular, diferenciação e apoptose. Estudos em humanos já descreveram alterações em MAPKs em diversas doenças, incluindo câncer e transtornos de humor [67, 69]. Em modelo animal, alterações nesta via também têm sido descritas. Todorovic e colaboradores (2009) relataram uma redução do comportamento depressivo após a inibição da via MAPK/ERK [70].

1.5 Estresse Oxidativo associado a Doenças

O termo *estresse oxidativo* passou a ser utilizado com frequência em 1970, mas suas origens conceituais podem ser observadas desde 1950, a partir de pesquisadores investigando os efeitos da radiação ionizante e dos radicais livres no fenômeno do envelhecimento [71].

O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre o nível sistêmico de moléculas oxidantes, tais como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) e a capacidade do organismo para combater estes níveis com moléculas antioxidantes [72]. Em termos gerais, o estresse oxidativo é definido pela sobrecarga de ROS, que incluem os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\bullet), juntamente com RNS, tais como o óxido nítrico (NO), que causam prejuízos à estrutura das biomoléculas de DNA, carboidratos, lipídios e proteínas, além de outros componentes celulares e/ou a deficiência de moléculas antioxidantes [73]. Os oxidantes são produzidos endogenamente como subprodutos ou metabólitos de diversos distúrbios celulares, incluindo o metabolismo aeróbico na mitocôndria ou as reações mediadas por ciclooxigenases, inibidores da NADPH, e xantina oxidase (XO) [74].

Com o acúmulo de oxidantes, as células desenvolvem uma resposta de estresse para a proteção contra os danos oxidativos, incluindo a regulação positiva de moléculas antioxidantes enzimáticas ou não enzimáticas. Dentre as principais proteínas antioxidantes enzimáticas encontram-se a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Transferase (GST) e Glutathione Redutase (GR), enquanto a defesa antioxidante não enzimática é composta principalmente pelas vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α tocoferol), albumina e ácido úrico [72, 74, 75], provenientes da dieta ou sintetizadas pelo próprio organismo .

Estudos comprovam que o estresse oxidativo está relacionado a condições fisiológicas normais e diversas patologias, tais como o envelhecimento, atividade física intensa, apoptose, câncer, diabetes mellitus, arteriosclerose, doenças inflamatórias e neurodegenerativas. A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, frequentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas. No entanto, o desequilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes conseqüentemente irá induzir danos e morte celular pelos radicais livres [76, 77].

O sistema imune utiliza os efeitos letais de espécies oxidantes, produzindo-as como parte do seu mecanismo de eliminação de agentes patogênicos. Por exemplo, fagócitos ativados podem produzir superóxido e óxido nítrico, e o produto da condensação destas duas espécies, o peroxinitrito, é extremamente bactericida e tóxico, permitindo assim a destruição do patógeno [78]. Pesquisas recentes sugerem que o estresse oxidativo está intimamente relacionado com um estado inflamatório crônico [72, 74, 79]. Marcadores de estresse oxidativo têm sido implicados no desenvolvimento de algumas doenças auto-imunes, doenças inflamatórias crônicas e câncer. Na diabetes, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias induzem a morte mediada pelo estresse de células- β produtoras de insulina [80]. Em doenças inflamatórias crônicas, tais como no pulmão e fígado, ROS é capaz de difundir-se para as células e causar morte celular e inflamação [81].

Citocinas inflamatórias podem induzir a produção de oxidantes, prostaglandinas e ROS mitocondriais por macrófagos, contribuindo assim para as respostas inflamatórias. TNF- α e IL-6 são capazes de promover respostas de fase aguda no fígado, induzindo uma regulação positiva de proteínas como PCR e a opsonização do patógeno. Além disso, o TNF- α estimula a fagocitose mediada por ROS em macrófagos, permitindo a internalização e destruição da

bactéria [74]. Similarmente, a IL-1 β induz respostas inflamatórias e pró-apoptóticas mediadas por fatores tais como prostaglandinas, ROS, NO sintase e NO [82]. Notavelmente, as citocinas pró-inflamatórias podem atuar juntamente com proteínas de estresse e contribuir para a eliminação do agente patogênico, através de células da imunidade inata e/ou adaptativa.

O aumento dos níveis de estresse oxidativo neuronal é capaz de produzir efeitos deletérios sobre a transdução de sinal, a plasticidade e a resistência celular, principalmente por induzir a peroxidação lipídica nas membranas e danos diretos em proteínas e genes. Os neurônios e células da glia são particularmente vulneráveis a processos inflamatórios e estados redox, e são dependentes da manutenção de atividade neurotrófica [79]. Pesquisas recentes tem consistentemente demonstrado que o estresse oxidativo é uma característica comum entre os principais transtornos psiquiátricos, incluindo DM e TB, com evidências de danos no DNA, lipídios e proteínas [83]. Possivelmente, o estresse oxidativo periférico contribui para alterações na permeabilidade da barreira hemato-encefálica, causando toxicidade cerebral [84]. Apesar das evidências dos efeitos deletérios do estresse oxidativo no organismo, não sabemos qual o impacto do trauma recente sobre os marcadores oxidantes e defesas antioxidantes em adolescentes saudáveis.

1.6 Separação Materna como Modelo Animal de Estresse Precoce

Diversas linhas de pesquisas em humanos indicam que a exposição a eventos estressores durante a infância influencia diretamente as funções fisiológicas e contribuem significativamente para tornar o adulto vulnerável a psicopatologias [85, 86]. O mesmo ocorre em pesquisas realizadas com animais, em que o ambiente da relação mãe-filhote nas fases iniciais da vida pode afetar o desenvolvimento neurobiológico e comportamental na vida adulta.

Diferentes modelos experimentais têm sido propostos para estudar os efeitos em longo prazo do estresse precoce no desenvolvimento, dentre eles a estimulação neonatal (EN) e a separação materna (SM), aproximando-se muito aos efeitos dos MTI em humanos [87].

A SM durante o período neonatal é considerada um exemplo bem característico de estresse precoce em animais, estando amplamente associada com alterações na responsividade do eixo HPA e sistema imunológico [87, 88]. Diversas variações do modelo de SM têm sido utilizadas em estudos, incluindo (I) simples separação dos filhotes da mãe por um período de 24h na primeira semana de vida, (II) isolamento social através da separação dos filhotes a partir da mãe e demais filhotes por diversas horas ao dia, e (III) separação materna de todos os filhotes individualmente a partir da mãe por 3-4h nas primeiras duas semanas de vida [89].

Um número crescente de estudos experimentais tem evidenciado alterações relevantes em regiões cerebrais específicas, incluindo o hipocampo, amígdala e PFC após exposição a SM nos primeiros dias de vida, as quais podem estar diretamente associadas com a ativação do eixo HPA e liberação excessiva de moléculas relacionadas ao estresse, como os glicocorticóides e catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), refletindo diretamente na cognição, regulação emocional e função neuroendócrina [90-94]. Por exemplo, níveis reduzidos de neurotrofinas, incluindo o fator de crescimento neural (NGF) e o BDNF, têm sido reportados em animais expostos à manipulação pós-natal, com impacto direto na neurogênese do hipocampo e PFC [95]. No mesmo contexto, estudos prévios têm demonstrado níveis reduzidos de interneurônios positivos para parvalbumina (PVB) no PFC de ratos expostos a SM [96, 97]. Interneurônios expressando a proteína ligante de cálcio PVB referem-se a um subgrupo de

neurônios GABAérgicos do córtex cerebral fundamentais no controle da excitabilidade e correto desenvolvimento cerebral. Alterações e/ou perda de interneurônios contendo PVB têm sido observada em transtornos psiquiátricos, incluindo esquizofrenia [98].

Outra consequência da SM diz respeito às respostas inflamatórias periféricas e centrais. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, incluindo Il-6 e Il-1 beta [99], e comportamentos característicos de ansiedade e depressão [11, 100] são descritos em animais expostos a SM nos primeiros dias de vida, como consequência da excitotoxicidade, estresse oxidativo e inflamação. Além disso, aumento nos níveis de COX-2, um importante mediador da neuroinflamação, foi reportado no PFC de ratos adolescentes expostos a SM, concomitante com aumento dos prejuízos de memória [97].

Evidências recentes apontam para o envolvimento de mecanismos epigenéticos, incluindo alterações na metilação do DNA e acetilação de histonas no aumento da vulnerabilidade para transtornos psiquiátricos. Além disso, as alterações epigenéticas podem ser resultantes da exposição a estressores ambientais precocemente na vida, capazes de influenciar diretamente os níveis de moléculas envolvidas em diversos processos neurobiológicos, como os glicocorticoides e BDNF [101, 102]. Seo e colaboradores (2016) observaram alterações epigenéticas no gene do BDNF no hipocampo de ratos expostos a SM, concomitante com alterações no fenótipo comportamental [103].

Uma das técnicas descritas na literatura para atenuar e/ou reverter as alterações cognitivas, biológicas e comportamentais resultantes da exposição à SM é a intervenção com um ambiente enriquecido [104, 105]. O ambiente enriquecido é uma estratégia de modificação ambiental, que consiste na exposição de animais a estimulação sensorial e/ou diferentes objetos, geralmente brinquedos, tocas, túneis e plataformas, com a finalidade de

reduzir o estresse e melhorar o bem-estar animal [106, 107]. Neste contexto, estudos tem demonstrado que o ambiente enriquecido aumenta o número de sinapses por neurônios, bem como o desempenho em testes de memória espacial [108, 109]. Ainda, tem sido descrito aumento na expressão de BDNF no hipocampo e plasticidade cerebral após a intervenção do ambiente enriquecido em animais submetidos à separação materna [110].

2. Considerações finais

A presente tese teve por objetivo avaliar o efeito da exposição ao estresse precoce sobre o sistema neuroimunoendócrino em modelo animal e humano. De forma inovadora, nosso estudo levou em consideração mais de um sistema envolvido na resposta ao estresse, incluindo o SNC, o SE e o SI, com o intuito de investigar as consequências da exposição ambiental aos MTI sobre marcadores endócrinos, imunológicos e oxidativos em adolescentes saudáveis. Por meio dessa abordagem, esse estudo possibilitou a análise fisiológica sem o viés da presença de co-morbidades (exemplo, DM e TEPT) nos indivíduos adultos com histórico de MTI. Além disso, o modelo animal permitiu uma análise mais causal dos efeitos da SM durante o desenvolvimento na cognição e marcadores imunológicos e oxidativos. É sabido que a SM é um modelo bem característico de estresse precoce em roedores, refletindo os efeitos dos MTI em humanos e fornecendo suporte aos resultados observados em humanos.

Em indivíduos saudáveis, a exposição ao estresse gera normalmente uma resposta adaptativa, eficaz na manutenção da homeostase do organismo. No entanto, quando o agente estressor se torna crônico, resulta em uma série de respostas fisiológicas de elevado custo energético ao organismo, denominado carga alostática, possuindo efeitos deletérios sobre o mesmo [13]. Dados prévios da literatura demonstram que a exposição ao estresse crônico está associada ao aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, sobretudo em virtude da sua capacidade em gerar um desequilíbrio homeostático no organismo [4, 22].

Mais recentemente, os estudos relacionados ao impacto da exposição a eventos estressores nos primeiros anos de vida do indivíduo (como na infância) têm recebido destaque e

gerado grande interesse por parte dos pesquisadores. Sabe-se que, durante estes períodos de sensibilidade do desenvolvimento, o sistema neuroendócrino e o SI encontram-se em constante maturação e desenvolvimento, tornando a criança mais vulnerável aos estímulos externos e resultando em efeitos mais proeminentes para a saúde do mesmo, quando comparado à ocorrência de estressores de vida durante a adolescência ou idade adulta. Além disso, diversas pesquisas têm demonstrado uma associação entre a exposição aos MTI e o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e transtornos psiquiátricos na vida adulta [1]. Os mecanismos pelos quais ocorre esta associação ainda são pouco compreendidos; no entanto, a hipótese da existência de uma relação bidirecional entre o SNC e o SI em resposta a exposição ao estresse crônico é bastante aceita.

Durante a resposta normal ao estresse, a ativação do eixo HPA resulta na secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP) pelo hipotálamo, os quais induzem a secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) a partir da hipófise, que, por sua vez, estimula a produção de glicocorticoides (cortisol = em humanos; corticosterona = em roedores) pelo córtex adrenal [111]. Os glicocorticoides são capazes de exercer suas funções através de seus receptores em múltiplos tecidos do organismo, incluindo o próprio eixo HPA e o SI, atuando na inibição por *feedback negativo* da produção do ACTH e CRH. Uma vez liberado, a ação anti-inflamatória e imunossupressora do cortisol pode ocorrer de diferentes formas, dentre elas através da modulação da maturação e proliferação de células B e T, inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (Th1) como as citocinas IL-2, IL-6 e o TNF- α , indução da secreção de citocinas anti-inflamatórias (Th2, como a IL-10), além da regulação dos níveis de fatores de transcrição, como o NF- κ B, contribuindo assim para a regulação das respostas imunes.

Em situações de estresse crônico, ocorre uma desregulação dos mecanismos de resposta ao estresse, refletida pelo aumento da secreção e liberação de mediadores biológicos, como citocinas e cortisol, subsequente à ativação do SI e eixo HPA, respectivamente. Devido à permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE), as citocinas pró-inflamatórias provenientes da periferia podem, neste caso, acessar o encéfalo de diversas maneiras, entre elas através da indução de uma resposta inflamatória específica em células endoteliais da BHE, e ativar diferentes tipos de células no SNC, incluindo astrócitos e micróglia, consideradas as principais células imunes encefálicas, que passarão a secretar mediadores inflamatórios localmente, incluindo citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-6, IL-1), reativos intermediários de oxigênio, ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina tipo E₂ (PGE-2), todos envolvidos em processos de neuroinflamação e morte celular [112-114]. Estudos demonstram níveis elevados de PGE-2 no soro, saliva e líquido de pacientes deprimidos [115], e maior secreção de citocinas pró-inflamatórias em adolescentes submetidos aos MTI e reportando depressão [116]. O mesmo ocorre em estudos utilizando modelo animal de estresse crônico, em que o aumento de citocinas pró-inflamatórias centrais e periféricas se correlacionou positivamente com sintomas de ansiedade e depressão [99, 117].

Na presente tese descrevemos uma hiperatividade do eixo HPA, demonstrado por meio do aumento nos níveis de cortisol capilar em adolescentes saudáveis expostos aos MTI. É importante ressaltar que a dosagem de cortisol capilar é um método bastante inovador e eficaz que permite identificar a concentração de cortisol depositada nos fios de cabelo em longo prazo, ao contrário dos principais métodos utilizados como a análise do cortisol salivar e urina que demonstram apenas estados agudos da concentração de cortisol. Como o cabelo cresce em média um centímetro ao mês, a análise de três centímetros de cabelo corresponde ao acúmulo de cortisol dos últimos três meses. Níveis elevados de cortisol têm sido associados com alterações

de funcionalidade do SNC, incluindo redução nas concentrações de BDNF, corroborando com nossos resultados demonstrando níveis diminuídos de BDNF nos adolescentes expostos aos MTI. O BDNF é o principal fator neurotrófico do encéfalo e está envolvido na plasticidade sináptica ao longo da vida, sendo imprescindível para a sobrevivência neuronal [43]. Esses dados parecem ser corroborados por estudos de neuroimagem estrutural que demonstram dano neuronal através da redução do volume do hipocampo e níveis séricos reduzidos de BDNF em pacientes com DM, TB e TEPT. Desta forma, o efeito do cortisol sobre neurotrofinas, como o BDNF, seria uma das possíveis trajetórias envolvidas na patofisiologia do trauma [23, 45, 46]. Além disso, o cortisol é o principal hormônio regulador do SI, interferindo em praticamente todas as etapas das respostas imunológicas, e, gerando, na maioria das vezes, uma imunossupressão [118].

Adicionalmente às alterações referentes ao sistema endócrino, foram identificadas alterações imunes relevantes em diferentes subtipos linfocitários, demonstrando haver, de fato, um desequilíbrio imunológico nos adolescentes submetidos aos MTI em comparação aos adolescentes não traumatizados. Especificamente, detectamos um aumento significativo de células T ativadas (CD3+CD4+CD25+ e CD3+CD69+) e células T senescentes (CD4+CD28- e CD8+CD28-). Dentre as consequências do aumento da ativação imune celular, encontram-se a redução no repertório de células T *naive* e o aumento de células altamente diferenciadas, denominadas células T senescentes. Níveis elevados de células T senescentes em jovens saudáveis submetidos aos MTI comprova a existência de um perfil de imunossenescência precoce nestes indivíduos, caracterizado pelo declínio da função imunológica em decorrência da uma ativação imune persistente, como o estresse crônico psicológico, inflamação crônica e infecções virais persistentes [119]. Ainda, células T senescentes são capazes de produzir grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IFN- γ e TNF- α) e mediadores citotóxicos, gerando um quadro de inflamação crônica de baixo grau, denominado *inflammaging* [120]. Este

processo inflamatório crônico pode gerar múltiplos caminhos que convergem ao aumento da susceptibilidade a inúmeras patologias, incluindo doenças autoimunes, câncer e transtornos de humor, além de agravar o curso da doença por favorecer outras comorbidades. [121]. Os resultados aqui expostos apoiam estudos prévios do nosso grupo que demonstraram níveis elevados de células T senescentes em indivíduos acometidos por Artrite Reumatóide (AR) [122] e TB [123], caracterizando um perfil de senescência prematura nestes indivíduos e contribuindo para o perfil pró-inflamatório e aumento do risco de morbidades relacionadas ao envelhecimento.

Além disso, a exposição ao estresse precoce alterou significativamente a resposta dos linfócitos ao efeito imunossupressor da dexametasona. Interessantemente, observamos uma redução da sensibilidade dos linfócitos a glicocorticoides, neste caso avaliado pela resistência de linfócitos CD3+CD25+ *in vitro* na presença do glicocorticoide dexametasona. Uma das hipóteses para a redução na responsividade aos glicocorticoides é a presença de anormalidade na função de seus receptores na superfície da célula, incluindo os receptores de glicocorticoides (GR) e mineralocorticoides (MR) em decorrência do estresse crônico. A insensibilidade linfocitária ao glicocorticoide pode ser um dos fatores contribuintes para o aumento e manutenção da ativação imune celular e senescência precoce observado nos adolescentes expostos aos MTI.

Por outro lado, identificamos uma redução na porcentagem de células NK e células NKT nos adolescentes expostos aos MTI. Dada a importância das células NK na defesa do organismo contra vírus, bactérias e tumores, reduções em seus níveis estão associadas com maior incidência de câncer e doenças inflamatórias crônicas, patologias muitas vezes observadas em indivíduos com algum quadro de transtorno psiquiátrico [124]. Estudos anteriores demonstraram níveis reduzidos de células NK em indivíduos saudáveis submetidos ao TSST, DM e esquizofrenia [125, 126]. O mesmo foi observado em modelo animal, em que ratos submetidos a SM apresentaram

níveis diminuídos de células NK [127]. Uma das hipóteses para a redução da atividade/concentração de células NK e NKT é o envolvimento dos glicocorticoides liberados em resposta ao estresse. Altas concentrações de glicocorticoides podem, pelo menos em parte, causar alterações epigenéticas em regiões específicas do gene, reduzindo a expressão gênica de moléculas necessárias para a função completa das células NK, como a perforina e granzima B [128].

Em paralelo às alterações em subtipos linfocitários, foram identificadas alterações nos níveis de citocinas inflamatórias produzidas por linfócitos. Especificamente, observamos no grupo submetido aos MTI um aumento na secreção de citocinas inflamatórias IL-2, IL-4 e IL-17 no sobrenadante de linfócitos estimulados in vitro. A principal vantagem dessa técnica em relação à dosagem de citocinas no soro/plasma é a capacidade de identificação das fontes produtoras das citocinas e ausência de efeitos de outros sistemas produtores de citocinas (tecido adiposo). Estes resultados são suportados pelo estudo experimental demonstrando níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) periféricamente nos animais machos submetidos a SM em comparação aos animais controles. Ainda, com a intervenção do ambiente enriquecido foi possível reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e reverter os danos de memória causados pela SM, sugerindo o envolvimento de citocinas inflamatórias provenientes da periferia em processos cognitivos. É bem estabelecido que o desbalanço na resposta pró e anti-inflamatória (Th1/Th2) possui efeitos deletérios na periferia e no SNC, uma vez que as citocinas inflamatórias produzidas periféricamente podem acessar o encéfalo e ativar neurônios e células da glia, capazes de secretar diferentes mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, radicais livres, e óxido nítrico. No encéfalo, os mediadores inflamatórios contribuem para danos neuronais de diversas maneiras, incluindo a estimulação da produção excessiva de CRH e ativação da enzimaIDO, reduzindo a disponibilidade de

serotonina e aumento na liberação de glutamato no estriado e no córtex, contribuindo para alterações comportamentais [129].

Na tentativa de recuperar o equilíbrio homeostático do organismo após inúmeras exposições ao estresse concomitante com a ativação de diferentes sistemas, pode ocorrer a produção excessiva de compostos oxidantes e a redução na capacidade de reparo dos mecanismos de defesa antioxidante do organismo, gerando assim estresse oxidativo, responsável por danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas [130]. Diversas evidências científicas tem demonstrado dano oxidativo por meio do aumento da carbonilação proteica e peroxidação lipídica em inúmeras patologias, incluindo câncer, doenças autoimunes, transtornos de humor, entre outras [131, 132]. O encéfalo é altamente sensível ao estresse oxidativo devido ao alto consumo de oxigênio e capacidade reduzida de regeneração celular e enzimas antioxidantes. Uma das fontes de ROS no SNC é a NOX-2, expressa em uma variedade de células cerebrais e ativada por diferentes estímulos, como os fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, estresse celular, entre outros. A ativação de NOX-2 em decorrência da neuroinflamação resulta em produção excessiva de ROS e dano neuronal, contribuindo para o desenvolvimento de diversas condições patológicas, incluindo transtornos de humor e doenças neurodegenerativas [133, 134]. Estudos clínicos descreveram estresse oxidativo na mitocôndria e no DNA das células cerebrais [135], bem como níveis elevados de ROS juntamente com aumento das defesas antioxidantes em pacientes com TB e DM [136, 137]. Comparados aos controles, os adolescentes expostos aos MTI apresentaram níveis plasmáticos elevados de SOD e razão SOD/GPx, redução da capacidade antioxidante (TRAP) e aumento da carbonilação proteica. A SOD é uma enzima antioxidante que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de oxigênio e oxigênio. Por sua vez, a GPx evita o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, convertendo os mesmos em água [77]. Os resultados observados em nosso estudo sugerem que

o aumento da atividade de SOD representa uma resposta adaptativa do organismo para compensar o aumento da produção de radicais superóxido e carbonilação proteica. Além disso, o aumento da razão SOD/GPx pode ser considerado prejudicial para o organismo, uma vez que a redução dos níveis de GPx resulta no acúmulo de peróxido de hidrogênio, o qual é altamente lesivo para o organismo. Ainda, estudos apontam para o papel de ROS como segundos mensageiros na ativação de algumas vias de sinalização, incluindo MAPK e NF- κ B via TNF- α e IL-1, afetando diretamente as respostas imunes celulares [138]. De fato, a ativação de NF- κ B pode induzir a expressão de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo e inflamação, contribuindo para o processo de neurotoxicidade. Em contrapartida, ao investigar marcadores de estresse oxidativo no PFC de animais expostos e não expostos a SM não detectamos diferenças significativas entre os grupos, porém, uma tendência para uma correlação positiva entre os níveis de carbonilação proteica e danos de memória foi observada, demonstrando haver uma relação entre dano oxidativo e prejuízos cognitivos nos animais estudados. Juntamente com maior prejuízo de memória (machos e fêmeas), os animais submetidos a SM apresentaram redução de interneurônios contendo PVB (apenas machos) no PFC. A PVB é uma proteína ligante de cálcio encontrada em um subconjunto de interneurônios GABAérgicos e envolvida diretamente na plasticidade sináptica. Um dos fatores colaboradores para a redução da expressão de marcadores GABAérgicos e perda da capacidade inibitória dos interneurônios contendo PVB é o estresse oxidativo, uma vez que o cérebro é altamente vulnerável ao dano oxidativo [139, 140]. No entanto, como descrito acima, não identificamos diferenças significativas nos níveis de marcadores de estresse oxidativo no estudo experimental, sugerindo o envolvimento de outros mecanismos na redução dos níveis de PVB no PFC.

Até o momento, os resultados apresentados confirmam a nossa hipótese inicial de que exposição crônica a estressores precocemente na vida causa alterações fisiológicas relevantes,

demonstrado pelo aumento da atividade celular, perfil pró-inflamatório e dano oxidativo, caracterizando um quadro de desequilíbrio imunológico e redox, tornando estes adolescentes mais vulneráveis a diferentes doenças na vida adulta. Ainda, observamos através do uso de modelo animal que, intervenções precoces como o ambiente enriquecido, pode, em parte, minimizar os danos causados pela exposição ao estresse crônico nos primeiros dias de vida. O mesmo se reflete em humanos, uma vez que medidas preventivas e intervenções psicológicas são estratégias conhecidas e aplicadas para amenizar os danos psicológicos decorrentes da exposição ao trauma.

Sabe-se que diversos mecanismos podem estar envolvidos com o aumento da ativação imune, no entanto, alterações em rotas intracelulares associadas com processos de ativação linfocitária, dentre elas as MAPKs e o NF- κ B são fortes candidatos. As MAPK ERK 1/2 e p38 participam de uma diversidade de processos biológicos, incluindo proliferação, diferenciação, bem como inflamação e apoptose, respectivamente [141]. Além disso, pesquisas atuais sugerem o envolvimento das MAPK na patofisiologia de diversas doenças, incluindo os transtornos de humor, devido sua função de regulação do desenvolvimento e neuroplasticidade do SNC, porém os dados são ainda bastante escassos e controversos [67, 69]. De acordo com um estudo publicado anteriormente pelo nosso grupo, um aumento de p-ERK1/2 em células CD4+ e CD8+ foi observado em mulheres acometidas por TB [123]. Em estudos experimentais também já foram descritas alterações na sinalização via MAPK, incluindo redução de p-ERK após exposição a SM [142] e estresse crônico social [143], como aumento de p-ERK após SM [144]. Especificamente, verificamos neste estudo aumento significativo nos níveis de p-ERK em linfócitos T CD8+ de adolescentes submetidos aos MTI, mas não em linfócitos TCD4+. Porém, como descrito previamente, detectamos por meio de imunofenotipagem um aumento da porcentagem de células T CD4+ associadas à ativação e senescência celular, sugerindo que outras

rotas de sinalização intracelular estejam envolvidas na ativação das células T CD4+, como por exemplo, JAK e STAT. O aumento de p-ERK em células T CD8+ de adolescentes expostos aos MTI juntamente com a maior resistência dos linfócitos aos glicocorticoides pode estar contribuindo de forma significativa para o perfil imune ativado e estresse oxidativo observado neste grupo.

Levando em consideração o exposto, concluímos que a sobrecarga alostática em decorrência da exposição a fatores ambientais negativos, como os MTI, resulta em importantes alterações endócrinas, de parâmetros oxidativos e imunológicas no adolescente saudável, o que pode torná-lo mais suscetível a doenças inflamatórias crônicas e transtornos psiquiátricos na idade adulta. Durante os períodos críticos do desenvolvimento, os diferentes sistemas que compõe o organismo estão ainda imaturos e em pleno desenvolvimento, motivo pelo qual as consequências da exposição aos MTI são mais proeminentes para a saúde do indivíduo, em comparação com a ocorrência de traumas na adolescência ou na idade adulta. Em nosso estudo, conseguimos demonstrar pela primeira vez a existência de uma hiperatividade do eixo HPA concomitante com um desequilíbrio imunológico e oxidativo nos adolescentes saudáveis expostos aos MTI. Estes resultados foram sustentados com um estudo experimental, demonstrando que a SM durante o desenvolvimento foi responsável por gerar alterações no SNC e SI, incluindo a redução dos níveis de parvalbumina, prejuízos de memória e aumento de citocinas pró-inflamatórias. Interessantemente, a intervenção de um ambiente enriquecido resultou na reversão do perfil-pró-inflamatório e redução dos prejuízos de memória. Portanto, nossos resultados indicam que a exposição a fatores ambientais negativos na infância altera os principais mecanismos de resposta ao estresse, resultando em uma sobrecarga alostática com efeitos duradouros e prejudiciais para a saúde do indivíduo. As alterações biológicas apresentadas pelos adolescentes saudáveis submetidos aos MTI apontam para a importância de

mais estudos, sobretudo para a identificação de padrões de vulnerabilidade específicos a diferentes patologias na vida adulta, incluindo os transtornos humor.

Apesar de o desenho experimental deste estudo demonstrar diversas alterações biológicas relevantes, o mesmo foi incapaz de elucidar, com uma maior riqueza de detalhes, o desenvolvimento ou não de algum tipo de transtorno de humor nos adolescentes estudados, e desperta a necessidade para a realização de estudos longitudinais com estes adolescentes vulneráveis. Além disso, seria interessante maiores pesquisas com modelo animal de SM com o intuito de verificar os efeitos do SI (por exemplo, citocinas) e do SE (por exemplo, cortisol) sobre o SNC. Uma das abordagens possíveis seria por meio do bloqueio de citocinas e/ou cortisol no momento da exposição ao evento estressor, com a finalidade de avaliar se a intervenção precoce seria capaz de atenuar as alterações biológicas e cognitivas observadas neste estudo.

3. Referências

1. Teicher, M.H., et al., *The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment*. Neurosci Biobehav Rev, 2003. **27**(1-2): p. 33-44.
2. Hovens, J.G., et al., *Impact of childhood life events and childhood trauma on the onset and recurrence of depressive and anxiety disorders*. J Clin Psychiatry, 2015. **76**(7): p. 931-8.
3. Fergusson, D.M., J.M. Boden, and L.J. Horwood, *Exposure to childhood sexual and physical abuse and adjustment in early adulthood*. Child Abuse Negl, 2008. **32**(6): p. 607-19.
4. Heim, C. and E.B. Binder, *Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics*. Exp Neurol, 2012. **233**(1): p. 102-11.
5. Tyrka, A.R., et al., *Interaction of Childhood Maltreatment with the Corticotropin-Releasing Hormone Receptor Gene: Effects on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Reactivity*. Biological Psychiatry, 2009. **66**(7): p. 681-685.
6. McEwen, B.S. and I.N. Karatsoreos, *Sleep Deprivation and Circadian Disruption: Stress, Allostasis, and Allostatic Load*. Sleep Med Clin, 2015. **10**(1): p. 1-10.
7. Bielas, H., et al., *Increased number of activated T cells in lymphocyte subsets of maltreated children: Data from a pilot study*. Journal of Psychosomatic Research, 2012. **73**(4): p. 313-318.
8. Roque, S., et al., *The behavioral and immunological impact of maternal separation: a matter of timing*. Front Behav Neurosci, 2014. **8**: p. 192.
9. Coelho, R., et al., *Childhood maltreatment and inflammatory markers: a systematic review*. Acta Psychiatr Scand, 2014. **129**(3): p. 180-92.
10. Chrousos, G.P., *Stress and disorders of the stress system*. Nat Rev Endocrinol, 2009. **5**(7): p. 374-81.
11. Juster, R.P., B.S. McEwen, and S.J. Lupien, *Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition*. Neurosci Biobehav Rev, 2010. **35**(1): p. 2-16.
12. McEwen, B.S., *Protective and damaging effects of stress mediators*. N Engl J Med, 1998. **338**(3): p. 171-9.

13. McEwen, B.S., *Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **933**: p. 265-77.
14. Frodl, T. and V. O'Keane, *How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans*. Neurobiol Dis, 2013. **52**: p. 24-37.
15. Heim, C., et al., *Altered pituitary-adrenal axis responses to provocative challenge tests in adult survivors of childhood abuse*. Am J Psychiatry, 2001. **158**(4): p. 575-81.
16. Savitz, J., et al., *Genotype and childhood sexual trauma moderate neurocognitive performance: a possible role for brain-derived neurotrophic factor and apolipoprotein E variants*. Biol Psychiatry, 2007. **62**(5): p. 391-9.
17. Peeters, B., et al., *The HPA axis response to critical illness: New study results with diagnostic and therapeutic implications*. Mol Cell Endocrinol, 2015. **408**: p. 235-40.
18. McEwen, B.S., *Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators*. Eur J Pharmacol, 2008. **583**(2-3): p. 174-85.
19. Shalev, I., et al., *BDNF Val66Met polymorphism is associated with HPA axis reactivity to psychological stress characterized by genotype and gender interactions*. Psychoneuroendocrinology, 2009. **34**(3): p. 382-8.
20. Heim, C., et al., *Altered pituitary-adrenal axis responses to provocative challenge tests in adult survivors of childhood abuse*. American Journal of Psychiatry, 2001. **158**(4): p. 575-581.
21. Danese, A. and B.S. McEwen, *Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load, and age-related disease*. Physiol Behav, 2012. **106**(1): p. 29-39.
22. Grassi-Oliveira, R., M. Ashy, and L.M. Stein, *Psychobiology of childhood maltreatment: effects of allostatic load?* Rev Bras Psiquiatr, 2008. **30**(1): p. 60-8.
23. Machado-Vieira, R., et al., *Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode*. Biol Psychiatry, 2007. **61**(2): p. 142-4.
24. Sfoggia, A., M.A. Pacheco, and R. Grassi-Oliveira, *History of childhood abuse and neglect and suicidal behavior at hospital admission*. Crisis, 2008. **29**(3): p. 154-8.
25. Kaminer, D., S. Seedat, and D.J. Stein, *Post-traumatic stress disorder in children*. World Psychiatry, 2005. **4**(2): p. 121-5.

26. Dube, S.R., et al., *Childhood abuse, household dysfunction, and the risk of attempted suicide throughout the life span: findings from the Adverse Childhood Experiences Study*. JAMA, 2001. **286**(24): p. 3089-96.
27. Battle, C.L., et al., *Childhood maltreatment associated with adult personality disorders: findings from the Collaborative Longitudinal Personality Disorders Study*. J Pers Disord, 2004. **18**(2): p. 193-211.
28. Tyrka, A.R., et al., *Childhood maltreatment and adult personality disorder symptoms: influence of maltreatment type*. Psychiatry Res, 2009. **165**(3): p. 281-7.
29. Nowacka, M. and E. Obuchowicz, *BDNF and VEGF in the pathogenesis of stress-induced affective diseases: An insight from experimental studies*. Pharmacol Rep, 2013. **65**(3): p. 535-46.
30. Kuhlman, K.R., et al., *Age of Trauma Onset and HPA Axis Dysregulation Among Trauma-Exposed Youth*. J Trauma Stress, 2015. **28**(6): p. 572-9.
31. Harbuz, M.S., A.J. Chover-Gonzalez, and D.S. Jessop, *Hypothalamo-pituitary-adrenal axis and chronic immune activation*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **992**: p. 99-106.
32. Wieck, A., H. Brenhouse, and S. Andersen, *Developmental Influences of 5-HT on Depression: Roles of BDNF, Stress, and Inflammatory Processes*. In: Frank Scott Hall. (Org.). *Serotonin: Biosynthesis, Regulation and Health Implications*. 1 ed2013: NOVA.
33. Lupien, S.J., et al., *Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(6): p. 434-45.
34. Kirschbaum, C., C.J. Strasburger, and J. Langkrar, *Attenuated cortisol response to psychological stress but not to CRH or ergometry in young habitual smokers*. Pharmacol Biochem Behav, 1993. **44**(3): p. 527-31.
35. Padgett, D.A. and R. Glaser, *How stress influences the immune response*. Trends in Immunology, 2003. **24**(8): p. 444-448.
36. De Bellis, M.D., et al., *A.E. Bennett Research Award. Developmental traumatology. Part I: Biological stress systems*. Biol Psychiatry, 1999. **45**(10): p. 1259-70.
37. King, J.A., et al., *Early sexual abuse and low cortisol*. Psychiatry Clin Neurosci, 2001. **55**(1): p. 71-4.
38. Ouellet-Morin, I., et al., *Blunted Cortisol Responses to Stress Signal Social and Behavioral Problems Among Maltreated/Bullied 12-Year-Old Children*. Biological Psychiatry, 2011. **70**(11): p. 1016-1023.

39. Schalinski, I., et al., *The Cortisol Paradox of Trauma-Related Disorders: Lower Phasic Responses but Higher Tonic Levels of Cortisol Are Associated with Sexual Abuse in Childhood*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0136921.
40. Raul, J.S., et al., *Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair*. Clin Biochem, 2004. **37**(12): p. 1105-11.
41. Kirschbaum, C., et al., *Hair as a retrospective calendar of cortisol production-Increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy*. Psychoneuroendocrinology, 2009. **34**(1): p. 32-37.
42. Calabrese, F., et al., *Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity*. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2014. **8**.
43. Shimizu, E., et al., *Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants*. Biological Psychiatry, 2003. **54**(1): p. 70-75.
44. Thakker-Varia, S. and J. Alder, *Neuropeptides in depression: role of VGF*. Behav Brain Res, 2009. **197**(2): p. 262-78.
45. Karege, F., et al., *Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients*. Psychiatry Res, 2002. **109**(2): p. 143-8.
46. Grassi-Oliveira, R., et al., *Low plasma brain-derived neurotrophic factor and childhood physical neglect are associated with verbal memory impairment in major depression--a preliminary report*. Biol Psychiatry, 2008. **64**(4): p. 281-5.
47. Bucker, J., et al., *Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in school-aged children with early trauma*. Acta Psychiatrica Scandinavica, 2015. **131**(5): p. 360-368.
48. Dimatelis, J.J., et al., *Methamphetamine reversed maternal separation-induced decrease in nerve growth factor in the ventral hippocampus*. Metab Brain Dis, 2014. **29**(2): p. 433-9.
49. Xue, X., et al., *Maternal separation induces alterations in reversal learning and brain-derived neurotrophic factor expression in adult rats*. Neuropsychobiology, 2013. **68**(4): p. 243-9.
50. Ognibene, E., et al., *The effect of early maternal separation on brain derived neurotrophic factor and monoamine levels in adult heterozygous reeler mice*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008. **32**(5): p. 1269-76.
51. Roceri, M., et al., *Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus*. Mol Psychiatry, 2002. **7**(6): p. 609-16.

52. Kim, Y.K., et al., *Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2007. **31**(5): p. 1044-53.
53. Dantzer, R., et al., *Cytokines and sickness behavior*. Neuroimmunomodulation, 1998. **840**: p. 586-590.
54. Musselman, D.L., et al., *Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa*. N Engl J Med, 2001. **344**(13): p. 961-6.
55. Capuron, L. and A.H. Miller, *Cytokines and psychopathology: lessons from interferon-alpha*. Biol Psychiatry, 2004. **56**(11): p. 819-24.
56. Ortiz-Dominguez, A., et al., *Immune variations in bipolar disorder: phasic differences*. Bipolar Disord, 2007. **9**(6): p. 596-602.
57. O'Brien, S.M., et al., *Cytokine profiles in bipolar affective disorder: focus on acutely ill patients*. J Affect Disord, 2006. **90**(2-3): p. 263-7.
58. Khandaker, G.M., et al., *Association of serum interleukin 6 and C-reactive protein in childhood with depression and psychosis in young adult life: a population-based longitudinal study*. JAMA Psychiatry, 2014. **71**(10): p. 1121-8.
59. Bielas, H., et al., *Increased number of activated T cells in lymphocyte subsets of maltreated children: data from a pilot study*. J Psychosom Res, 2012. **73**(4): p. 313-8.
60. Danese, A., et al., *Biological embedding of stress through inflammation processes in childhood*. Mol Psychiatry, 2011. **16**(3): p. 244-6.
61. Slopen, N., et al., *Childhood adversity and inflammatory processes in youth: a prospective study*. Psychoneuroendocrinology, 2013. **38**(2): p. 188-200.
62. Hartwell, K.J., et al., *Association of elevated cytokines with childhood adversity in a sample of healthy adults*. J Psychiatr Res, 2013. **47**(5): p. 604-10.
63. Bertone-Johnson, E.R., et al., *Inflammation and early-life abuse in women*. Am J Prev Med, 2012. **43**(6): p. 611-20.
64. Lemieux, A., C.L. Coe, and M. Carnes, *Symptom severity predicts degree of T cell activation in adult women following childhood maltreatment*. Brain Behav Immun, 2008. **22**(6): p. 994-1003.
65. Xia, Y., S. Shen, and I.M. Verma, *NF-kappaB, an active player in human cancers*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(9): p. 823-30.
66. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.

67. Wieck, A., et al., *Differential neuroendocrine and immune responses to acute psychosocial stress in women with type 1 bipolar disorder*. Brain Behav Immun, 2013. **34**: p. 47-55.
68. Pace, T.W., et al., *Increased peripheral NF-kappaB pathway activity in women with childhood abuse-related posttraumatic stress disorder*. Brain Behav Immun, 2012. **26**(1): p. 13-7.
69. Kamiyama, M., I. Naguro, and H. Ichijo, *In vivo gene manipulation reveals the impact of stress-responsive MAPK pathways on tumor progression*. Cancer Sci, 2015. **106**(7): p. 785-96.
70. Todorovic, C., et al., *Suppression of the MEK/ERK signaling pathway reverses depression-like behaviors of CRF2-deficient mice*. Neuropsychopharmacology, 2009. **34**(6): p. 1416-26.
71. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
72. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
73. Nunes, S.O., et al., *The shared role of oxidative stress and inflammation in major depressive disorder and nicotine dependence*. Neurosci Biobehav Rev, 2013. **37**(8): p. 1336-1345.
74. Muralidharan, S. and P. Mandrekar, *Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation*. J Leukoc Biol, 2013.
75. Yao, J.K. and M.S. Keshavan, *Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(7): p. 2011-35.
76. Sies, H., *Oxidative stress: from basic research to clinical application*. Am J Med, 1991. **91**(3C): p. 31S-38S.
77. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Exp Physiol, 1997. **82**(2): p. 291-5.
78. Nathan, C. and M.U. Shiloh, *Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8841-8.
79. Pedrini, M., et al., *Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity*. J Psychiatr Res, 2012. **46**(6): p. 819-24.

80. Pirot, P., D.L. Eizirik, and A.K. Cardozo, *Interferon-gamma potentiates endoplasmic reticulum stress-induced death by reducing pancreatic beta cell defence mechanisms*. *Diabetologia*, 2006. **49**(6): p. 1229-36.
81. Jaeschke, H., *Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011. **26 Suppl 1**: p. 173-9.
82. Yang, D., et al., *Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells*. *Exp Eye Res*, 2007. **85**(4): p. 462-72.
83. Berk, M., et al., *Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2011. **35**(3): p. 804-17.
84. Magalhaes, P.V., et al., *Peripheral oxidative damage in early-stage mood disorders: a nested population-based case-control study*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2012. **15**(8): p. 1043-50.
85. McCrory, E., S.A. De Brito, and E. Viding, *The impact of childhood maltreatment: a review of neurobiological and genetic factors*. *Front Psychiatry*, 2011. **2**: p. 48.
86. Pace, T.W., et al., *Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress*. *Am J Psychiatry*, 2006. **163**(9): p. 1630-3.
87. Teicher, M.H., A. Tomoda, and S.L. Andersen, *Neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment: are results from human and animal studies comparable?* *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1071**: p. 313-23.
88. Lehmann, J. and J. Feldon, *Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing?* *Rev Neurosci*, 2000. **11**(4): p. 383-408.
89. Haller, J., et al., *Effects of adverse early-life events on aggression and anti-social behaviours in animals and humans*. *J Neuroendocrinol*, 2014. **26**(10): p. 724-38.
90. Seidel, K., et al., *Repeated neonatal separation stress alters the composition of neurochemically characterized interneuron subpopulations in the rodent dentate gyrus and basolateral amygdala*. *Dev Neurobiol*, 2008. **68**(9): p. 1137-52.
91. Veenema, A.H., *Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: what can we learn from animal models?* *Front Neuroendocrinol*, 2009. **30**(4): p. 497-518.
92. Loi, M., et al., *Age- and sex-dependent effects of early life stress on hippocampal neurogenesis*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014. **5**: p. 13.

93. MacQueen, G.M., et al., *Desipramine treatment reduces the long-term behavioural and neurochemical sequelae of early-life maternal separation*. Int J Neuropsychopharmacol, 2003. **6**(4): p. 391-6.
94. Brenhouse, H.C., J.L. Lukkes, and S.L. Andersen, *Early life adversity alters the developmental profiles of addiction-related prefrontal cortex circuitry*. Brain Sci, 2013. **3**(1): p. 143-58.
95. Roceri, M., et al., *Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions*. Biol Psychiatry, 2004. **55**(7): p. 708-14.
96. Wieck, A., S.L. Andersen, and H.C. Brenhouse, *Evidence for a neuroinflammatory mechanism in delayed effects of early life adversity in rats: relationship to cortical NMDA receptor expression*. Brain Behav Immun, 2013. **28**: p. 218-26.
97. Brenhouse, H.C. and S.L. Andersen, *Nonsteroidal anti-inflammatory treatment prevents delayed effects of early life stress in rats*. Biol Psychiatry, 2011. **70**(5): p. 434-40.
98. Lewis, D.A., T. Hashimoto, and D.W. Volk, *Cortical inhibitory neurons and schizophrenia*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(4): p. 312-24.
99. Hennessy, M.B., et al., *Proinflammatory activity and the sensitization of depressive-like behavior during maternal separation*. Behav Neurosci, 2011. **125**(3): p. 426-33.
100. Vetulani, J., *Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition*. Pharmacol Rep, 2013. **65**(6): p. 1451-61.
101. Champagne, F.A., *Early Adversity and Developmental Outcomes: Interaction Between Genetics, Epigenetics, and Social Experiences Across the Life Span*. Perspect Psychol Sci, 2010. **5**(5): p. 564-74.
102. Roth, T.L., et al., *Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene*. Biol Psychiatry, 2009. **65**(9): p. 760-9.
103. Seo, M.K., et al., *Early life stress increases stress vulnerability through BDNF gene epigenetic changes in the rat hippocampus*. Neuropharmacology, 2016. **105**: p. 388-397.
104. Hannan, A.J., *Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2014. **40**(1): p. 13-25.
105. Vivinetto, A.L., M.M. Suarez, and M.A. Rivarola, *Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment*. Behav Brain Res, 2013. **240**: p. 110-8.

106. Grinan-Ferre, C., et al., *Environmental Enrichment Improves Behavior, Cognition, and Brain Functional Markers in Young Senescence-Accelerated Prone Mice (SAMP8)*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(4): p. 2435-50.
107. Francis, D.D., et al., *Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity*. J Neurosci, 2002. **22**(18): p. 7840-3.
108. Leggio, M.G., et al., *Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat*. Behav Brain Res, 2005. **163**(1): p. 78-90.
109. Moncek, F., et al., *Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats*. J Neuroendocrinol, 2004. **16**(5): p. 423-31.
110. Hui, J.J., et al., *Hippocampal neurochemistry is involved in the behavioural effects of neonatal maternal separation and their reversal by post-weaning environmental enrichment: a magnetic resonance study*. Behav Brain Res, 2011. **217**(1): p. 122-7.
111. Jawahar, M.C., et al., *Epigenetic alterations following early postnatal stress: a review on novel aetiological mechanisms of common psychiatric disorders*. Clin Epigenetics, 2015. **7**: p. 122.
112. Smith, J.A., et al., *Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases*. Brain Res Bull, 2012. **87**(1): p. 10-20.
113. Banks, W.A., *The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology*. Neurol Clin, 2006. **24**(3): p. 413-9.
114. Ekdahl, C.T., et al., *Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13632-7.
115. Muller, N. and M.J. Schwarz, *The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(11): p. 988-1000.
116. Miller, G.E. and S.W. Cole, *Clustering of Depression and Inflammation in Adolescents Previously Exposed to Childhood Adversity*. Biological Psychiatry, 2012. **72**(1): p. 34-40.
117. Tang, M.M., et al., *Hippocampal neurogenesis dysfunction linked to depressive-like behaviors in a neuroinflammation induced model of depression*. Physiol Behav, 2016. **161**: p. 166-73.
118. Oray, M., et al., *Long-term side effects of glucocorticoids*. Expert Opin Drug Saf, 2016. **15**(4): p. 457-65.
119. Pawelec, G., et al., *Cytomegalovirus and human immunosenescence*. Rev Med Virol, 2009. **19**(1): p. 47-56.

120. Simpson, R.J., *Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: can exercise "make space"?* Exerc Sport Sci Rev, 2011. **39**(1): p. 23-33.
121. Pawelec, G., *Immunity and ageing in man.* Exp Gerontol, 2006. **41**(12): p. 1239-42.
122. Petersen, L.E., et al., *Premature Immunosenescence Is Associated with Memory Dysfunction in Rheumatoid Arthritis.* Neuroimmunomodulation, 2015. **22**(3): p. 130-137.
123. do Prado, C.H., et al., *Reduced regulatory T cells are associated with higher levels of Th1/TH17 cytokines and activated MAPK in type 1 bipolar disorder.* Psychoneuroendocrinology, 2013. **38**(5): p. 667-76.
124. Miller, G.E., E. Chen, and K.J. Parker, *Psychological Stress in Childhood and Susceptibility to the Chronic Diseases of Aging: Moving Toward a Model of Behavioral and Biological Mechanisms.* Psychological Bulletin, 2011. **137**(6): p. 959-997.
125. Karpinski, P., et al., *Reduced number of peripheral natural killer cells in schizophrenia but not in bipolar disorder.* Brain Behav Immun, 2016. **54**: p. 194-200.
126. Bellingrath, S., N. Rohleder, and B.M. Kudielka, *Healthy working school teachers with high effort-reward-imbalance and overcommitment show increased pro-inflammatory immune activity and a dampened innate immune defence.* Brain Behav Immun, 2010. **24**(8): p. 1332-9.
127. Nakamura, T., et al., *Maternal separation in early life impairs tumor immunity in adulthood in the F344 rat.* Stress, 2011. **14**(3): p. 335-43.
128. Eddy, J.L., et al., *Glucocorticoids regulate natural killer cell function epigenetically.* Cell Immunol, 2014. **290**(1): p. 120-30.
129. Wyss-Coray, T. and L. Mucke, *Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword.* Neuron, 2002. **35**(3): p. 419-32.
130. Halliwell, B., *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life.* Plant Physiol, 2006. **141**(2): p. 312-22.
131. Halliwell, B., *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* J Neurochem, 2006. **97**(6): p. 1634-58.
132. Salazar-Ramiro, A., et al., *Role of Redox Status in Development of Glioblastoma.* Front Immunol, 2016. **7**: p. 156.
133. Cahill-Smith, S. and J.M. Li, *Oxidative stress, redox signalling and endothelial dysfunction in ageing-related neurodegenerative diseases: a role of NADPH oxidase 2.* Br J Clin Pharmacol, 2014. **78**(3): p. 441-53.

134. Li, J.M., et al., *Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha*. *Circ Res*, 2002. **90**(2): p. 143-50.
135. Aruoma, O.I., M. Grootveld, and T. Bahorun, *Free radicals in biology and medicine: from inflammation to biotechnology*. *Biofactors*, 2006. **27**(1-4): p. 1-3.
136. Frey, B.N., et al., *Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2007. **31**(1): p. 283-5.
137. Andreazza, A.C., et al., *Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients*. *J Psychiatr Res*, 2007. **41**(6): p. 523-9.
138. Zhang, J., et al., *ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling*. *Oxid Med Cell Longev*, 2016. **2016**: p. 4350965.
139. Jiang, Z., et al., *Social isolation exacerbates schizophrenia-like phenotypes via oxidative stress in cortical interneurons*. *Biol Psychiatry*, 2013. **73**(10): p. 1024-34.
140. Schiavone, S., et al., *Involvement of NOX2 in the development of behavioral and pathologic alterations in isolated rats*. *Biol Psychiatry*, 2009. **66**(4): p. 384-92.
141. Cowan, K.J. and K.B. Storey, *Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress*. *J Exp Biol*, 2003. **206**(Pt 7): p. 1107-15.
142. Dimatelis, J.J., et al., *Female rats are resistant to developing the depressive phenotype induced by maternal separation stress*. *Metab Brain Dis*, 2016. **31**(1): p. 109-19.
143. Iio, W., et al., *Effects of chronic social defeat stress on MAP kinase cascade*. *Neurosci Lett*, 2011. **504**(3): p. 281-4.
144. Park, H.J., et al., *Increased activation of synapsin 1 and mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinase in the amygdala of maternal separation rats*. *CNS Neurosci Ther*, 2014. **20**(2): p. 172-81.