



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Regina Andressa Caetano de Souza

**ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNA EM RATOS WISTAR E PROGRAMAÇÃO DO  
COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO NA FASE ADULTA EM AMBOS OS SEXOS:  
EFEITOS DE DIETAS ACRESCIDAS COM DIFERENTES TIPOS DE ÓLEOS**

Porto Alegre/RS

Outubro, 2023

REGINA ANDRESSA CAETANO DE SOUZA

**ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNA EM RATOS WISTAR E  
PROGRAMAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO NA FASE ADULTA EM  
AMBOS OS SEXOS: EFEITOS DE DIETAS ACRESCIDAS COM DIFERENTES  
TIPOS DE ÓLEOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito obrigatório do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carla Dalmaz

Co-orientadora: Dr<sup>ª</sup>. Randriely Merscher Sobreira de Lima

Porto Alegre/RS

Outubro, 2023

*“Pensava que existia caminho já feitos, mas parece que não os há. O nosso ir faz o caminho.”*

Antônio Machado.

## AGRADECIMENTOS

A finalização deste trabalho representa, para mim, a concretização de um objetivo que por muito tempo pareceu ser algo impossível. Planejar vir para o Rio Grande do Sul e iniciar uma carreira acadêmica através de um mestrado em Neurociências, por um bom tempo, pareceu ser muito distante da minha realidade. Mas aqui estou, não apenas graças ao meu empenho, mas também a pessoas incríveis e à universidade pública.

Nutro respeito e apreço por minha querida orientadora prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Dalmaz, que desde o primeiro contato nos seminários que em razão do período pandêmico, eram realizados em formato virtual, mostrou-se gentil e acessível, mudando o rumo da minha trajetória profissional ao me admitir em seu laboratório, e permitindo-me ser moldada pelo conhecimento fornecido – mais uma típica história de um professor abrindo caminhos. Espero um dia também causar o mesmo impacto na vida um de estudante.

Meus agradecimentos a minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Randriely Merscher, que, mesmo distante, sempre esteve disponível para ajudar-me; com zelo e dedicação forneceu o substrato necessário durante todo o processo de execução desta pesquisa.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação de Neurociências por permitir-me uma formação de qualidade. Por diversas vezes encontrei-me em situações em que tive que lidar com a complexidade dos conteúdos acadêmicos: inúmeros artigos, seminários, pesquisa para conduzir e textos científicos para desenvolver. A complexidade leva-nos a um degrau acima da zona de conforto, e posso dizer, com certeza, que consegui o que vim buscar: uma formação de excelência. Lembro que, nos primeiros dias após a matrícula, em uma aula, a prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lenir, coordenadora do PPG, recomendou que aproveitássemos a grande oportunidade que estávamos tendo. Espero ter aproveitado essa oportunidade, e levo com carinho cada experiência que tive durante o mestrado, tanto em aspectos profissionais como também pessoal. Digo com convicção que a pós-graduação é uma das melhores experiências da minha vida e, no futuro, creio que será interessante lembrar dos anos da juventude vivenciados na universidade.

Agradeço ao meu querido marido, professor Caio Cezar, que nos momentos de incerteza, sobre conseguir entrar na renomada UFRGS, disse que o mundo era meu quintal e que as coisas

poderiam ser acessíveis. Mas o que esperar de um professor senão o talento de expandir nossas mentes? Caio, esta conquista também é sua, obrigada por todo apoio sempre.

Agradeço ainda aos meus queridos pais, Jurandir e Renata Caetano, que dentre todos os valores passados a mim e aos meus irmãos, Andréia e Cesar, ensinaram a lutar, a perseverar e a enfrentar os desafios. Ensinaram ainda o valor da honestidade, e que para crescer não é necessário tirar nada de ninguém, pois o esforço, o tempo e o apoio daqueles que nos amam são ferramentas suficiente para alcançar os objetivos. Obrigada, família, vocês são detentores do meu amor e da minha eterna gratidão.

As minhas queridas amigas Fernanda e Joelma, que por diversas vezes deram-me suporte, tanto acadêmico como emocional. Vocês possuem um caráter admirável, sou muito feliz por tê-las comigo. E por fim, por ter aprendido que é impossível realizar pesquisa sozinha, agradeço a minha equipe de laboratório, os quais foram fundamentais na execução desta dissertação.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 Adversidades no início da vida</b> .....	15
<b>1.2 Estresse</b> .....	17
<b>1.3 Amígdala</b> .....	18
<b>1.4 Mitocôndria</b> .....	19
<b>1.5 Neuroinflamação</b> .....	21
<b>1.6 Astrócitos</b> .....	213
<b>1.7 Memória Emocional</b> .....	25
<b>1.8 Transtorno de Ansiedade</b> .....	26
<b>1.9 Ômega- 3</b> .....	27
<b>1.10 Diferenças sexo-específicas</b> .....	30
<b>2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	31
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	32
<b>3.2. Objetivos Específicos</b> .....	32
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
<b>4.1 Aspectos éticos</b> .....	33
<b>4.2 Delineamento Experimental.</b> .....	333
<b>4.2.1 Linha do Tempo</b> .....	34
<b>4.3 Cuidados na manutenção dos animais</b> .....	355
<b>4.4 Tratamento usando os fatores dieta e separação materna</b> .....	36
<b>4.4.1 Separação materna neonatal</b> .....	36
<b>4.4.2. Dieta</b> .....	36
<b>4.5 Análise do ciclo estral</b> .....	39
<b>4.6 Testes Comportamentais</b> .....	40

4.6.1 Labirinto em Cruz Elevado.....	40
4.6.2 Campo Aberto .....	41
4.6.3 Claro – Escuro .....	422
4.6.4 Supressão da Alimentação pela Novidade.....	43
4.6.5 Medo Condicionado ao Contexto.....	44
4.6.6 Labirinto em Cruz Elevado após o Medo Condicionado ao Contexto.....	45
4.7 Bioquímica.....	46
4.7.1 Neuroinflamação por <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	46
4.7.2 Atividade enzimática da Glutathiona Sintetase.....	47
4.7.3 Medida da Proteína Ácida Fibrilar Glial .....	47
4.7.4 Medida da Proteína B de Ligação ao Cálcio.....	47
4.7.5 Atividade Mitocondrial por citometria de fluxo.....	48
4.8 Estatística.....	49
5. RESULTADOS.....	49
5.1 Consumo da Dieta .....	50
5.2 Peso .....	51
5.3 Comportamento.....	53
5.3.1 Labirinto em Cruz Elevado.....	54
5.3.2 Campo Aberto .....	57
5.3.3 Claro – Escuro .....	59
5.3.4 Supressão da Alimentação pela Novidade .....	59
5.3.5 Medo Condicionado ao Contexto.....	62
5.3.6 Labirinto em Cruz Elevado após Medo condicionado ao Contexto.....	65
5.4 Bioquímica.....	67
5.4.1 Neuroinflamação .....	67
5.4.1.1 Interleucina- 6.....	68

5.4.1.2 Interleucina- 1 $\beta$ .....	68
5.4.1.3 TNF- $\alpha$ .....	69
5.4.2 Função mitocondrial.....	70
5.4.2.1 Massa Mitocindrial.....	70
5.4.2.2 Potencial Mitocondrial .....	71
5.4.2.3 Razão de Massa sobre Potencial .....	72
5.4.3 Marcadores Astrocitários.....	73
5.4.3.1 Glutamina sintetase .....	73
5.4.3.2 Proteína Ácida Fibrilar Glial .....	74
5.6.4 Proteína B de Ligação ao Cálcio .....	74
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE 1- Resultado de testes estatísticos.....</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICE 2- Comparação entre rações, um estudo piloto.....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO 1- Carta de Aprovação do projeto de pesquisa.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO 2- Carta de Aprovação de Adendo.....</b>	<b>112</b>

## RESUMO

A separação materna é um importante modelo de estresse precoce, sobretudo mimetizando os efeitos de negligência e consequentemente favorecendo respostas emocionais na fase adulta. Este trabalho utilizou a separação materna para verificar um possível comportamento do tipo ansioso. Foi observado que o estresse precoce promoveu alterações duradouras em parâmetros neurobiológicos, levando a diferenças significativas, com implicações potenciais para a vulnerabilidade ao comportamento do tipo ansioso. Além disso, o estudo considerou variações sexo-específicas. Motivados por atenuar o comportamento do tipo ansioso programado por separação materna, utilizamos como estratégia de tratamento uma dieta acrescida de ômega – 3- O3 em ratos Wistar, desde o período do desmame até o último dia de vida. Para identificar traços do comportamento do tipo ansioso foram aplicados testes clássicos, tais como labirinto em cruz elevado, campo aberto, entre outros, e nas medidas bioquímicas avaliamos os principais marcadores inflamatórios, atividade de astrócitos e função mitocondrial. No labirinto em cruz elevado, foi possível observar atenuação do comportamento do tipo ansioso em animais que passaram por separação materna- SM e que tiveram a ração O3, e também observamos que os machos realizam mais atividades exploratórias comparados às fêmeas. Esses resultados, contudo, não foram reproduzidos em outros testes comportamentais. No teste do claro, escuro, por exemplo, observa-se comportamento do tipo ansioso apenas em fêmeas que passaram por separação materna, que não foi atenuado por dieta enriquecida em O3. No teste da memória de extinção do medo condicionado, também observa-se que animais SM apresentam mais respostas de congelamento, e a dieta enriquecida em O3 também parece acentuar esse parâmetro. Dentre outros parâmetros analisados, inesperadamente identificamos que machos separados e com dieta ômega-3 apresentavam níveis superiores nas expressão dos marcadores inflamatórios na IL-6, IL-1 $\beta$  e no TNF- $\alpha$ . Do mesmo modo, machos SM que receberam dieta enriquecida em O3 apresentaram menor massa mitocondrial na amígdala; contudo, esse mesmo grupo apresentou aumento da glutamina sintetase nessa estrutura. Nossos dados deixam evidente os efeitos deletérios do estresse precoce ao promover vulnerabilidade ao comportamento do tipo ansioso na fase adulta, e sugerem ainda que efeitos induzidos por intervenções precoces como a SM dependem do tipo de dieta recebida. Tanto em diversos testes

comportamentais, como nas respostas inflamatórias no tecido neuronal da amígdala. Entendemos, contudo, que sejam necessários outros experimentos para uma melhor compreensão dos efeitos de estresse precoce sobre os parâmetros mensurados, e de como a dieta recebida pode interferir nesses resultados.

**Palavras-chave:** Ansiedade, Inflamação, Amígdala, ômega-3, mitocôndria

## ABSTRACT

Maternal separation is an important model of early-life stress, mimicking the effects of neglect and favoring emotional responses in adulthood. This work used maternal separation to verify possible anxiety-like behavior. It was observed that early stress promoted lasting changes in neurobiological parameters, leading to significant differences, with potential implications for vulnerability to anxiety-like disorders. Furthermore, the study considered sex-specific variations. In an attempt to find strategies to prevent the induction of anxious behavior programmed by maternal separation, we used a diet enriched in omega-3 in Wistar rats, from the weaning period until the adulthood. To identify traits of anxiety-like behavior, classic tests were applied, such as the elevated plus maze, open field, among others, and we evaluated biochemical parameters, such as inflammatory and astrocyte markers and mitochondrial function. In the elevated plus maze, we observed attenuation of anxiety-like behavior in animals that had undergone maternal separation and were fed omega-3 diet, and we also observed that males carried out more exploratory activity than females. These results, however, were not reproduced in other behavioral tests. In the light-dark test, for example, anxiety-like behavior was observed only in SM females, which was not attenuated by an O3-enriched diet. In the test evaluating extinction memory, it was observed that SM animals present more freezing responses. O3-enriched diet appears to accentuate this parameter. In the biochemical measurements, we unexpectedly identified that separated males on an omega-3 diet had higher levels of expression of inflammatory markers (IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ). Likewise, SM males that received a diet enriched in O-3 showed lower mitochondrial mass in the amygdala; however, this same group showed an increase in glutamine synthetase in this structure. Our data reinforce the deleterious effects of early stress by promoting vulnerability to anxiety-like behavior in adulthood, and further suggest that effects induced by early interventions such as MS depend on the type of diet received, both in the behavioral tests, and in inflammatory responses in the amygdala. We suggest that further experiments are necessary to better understand the effects of early stress on the parameters measured, and how the diet received can interfere with these results.

**Keywords:** Anxiety, Inflammation, Amygdala, Omega-3, mitochondria

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Descrição da linha temporal do delineamento experimental.
- Figura 2.** Consumo médio de ratos machos ao longo do tempo
- Figura 3.** Consumo médio fêmeas ao longo do tempo
- Figura 4.** Massa corporal ao longo do tempo em machos
- Figura 5.** Massa corporal ao longo do tempo em fêmeas
- Figura 6.** Quantidade de tempo em segundos em que o animal permanece nos braços abertos em machos e fêmeas.
- Figura 7.** *Rearings* em machos e fêmeas
- Figura 8.** HD em machos e fêmeas
- Figura 9.** SAP em machos e fêmeas
- Figura 10.** Campo Aberto tempo centro em machos e fêmeas
- Figura 11.** *Rearings* no Campo Aberto para machos e fêmeas
- Figura 12.** Crossing realizados por machos e fêmeas
- Figura 13.** Gráficos com dados do claro-escuro em machos e fêmeas
- Figura 14.** Gráficos com dados da supressão da alimentação pela novidade em machos e fêmeas.
- Figura 15.** Gráficos com dados do medo contexto referente a extinção dos 4 primeiros minutos e 4 últimos minutos em machos e fêmeas.
- Figura 16.** Gráfico do teste com e sem extinção em machos em machos e fêmeas
- Figura 17.** Dados referente ao labirinto em cruz elevado após o medo condicionado ao contexto em machos e fêmeas.
- Figura 18.** Atividade da Interleucina-6 em machos e fêmeas.
- Figura 19:** Atividade da Interleucina- 1 $\beta$  em machos e fêmeas.
- Figura 20:** Atividade da Fator de Necrose Tumoral-  $\alpha$  em machos e fêmeas.
- Figura 21:** Potencial mitocondrial em animais machos e fêmeas.
- Figura 22:** Razão mitocondrial da massa sobre potencial mitocondrial em machos e fêmeas.
- Figura 23:** Concentração de Glutamina Sintetase por  $\mu\text{mol/h/mg}$  em machos e fêmeas.

**Figura 24:** Concentração de Proteína Ácida Fibrilar Glial por ng/ug em animais machos e fêmeas.

**Figura 25:** Concentração da Proteína B de ligação ao Cálcio em ng/ug em machos e fêmeas.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Preparo das dietas por quilograma

**Tabela 2.** Composição das dietas (conteúdo em 100 gramas)

**Tabela 3.** Composição em porcentagem de gorduras totais dos óleos adicionais à ração padrão.

**Tabela 4.** Informação Nutricionais do óleo de linhaça, quantidade por porção de 13 ml, conforme informação nutricional disponibilizada pelo fabricante.

**Tabela 5.** Informação nutricional do óleo de soja, quantidade por porção de 13 ml, conforme informação nutricional disponibilizada pelo fabricante.

**Tabela 6.** Informação nutricional da ração farelada, conforme informação nutricional disponibilizada pelo fabricante.

**Tabela 7:** Divisão por N por grupo no teste do Labirinto em Cruz Elevado.

**Tabela 8:** Divisão e N por grupo no teste do Campo Aberto.

**Tabela 9:** Divisão e N por grupo no teste do Claro-Escuro.

**Tabela 10:** Divisão e N por grupo no teste da supressão da alimentação pela novidade.

**Tabela 11:** Divisão e N por grupo no teste do medo condicionado ao contexto e Labirinto em Cruz Elevado após a exposição ao choque.

**Tabela 12:** Divisão e N por grupo na medida das Interleucinas- 6, Interleucina-1 $\beta$  e Fator de Necrose Tumoral-  $\alpha$

**Tabela 13:** Divisão e N por grupo na medida das proteínas Glutamina Sintetase, Proteína Ácida Fibrilar Glial , e Proteína B ligada ao Cálcio

**Tabela 14:** Divisão e N por grupo na medida da massa mitocondrial

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Adversidades no início da vida

Adversidades no início da vida podem ter impactos significativos na saúde humana ao longo dos anos (GALLER e RABIONOWITZ, 2014). Essas adversidades podem ser vivenciadas por meio de diversos fatores, como situações de abuso ou agressão (ERHAMWILDA e AFRIANT, 2016), pobreza (BLAIR e RAVER, 2016), morte de um dos pais ou do cuidador principal da criança (FINKELSTEIN, 1988), entre outras condições. Essas condições podem resultar em alterações permanentes no encéfalo, especialmente em indivíduos que estão nos períodos iniciais do desenvolvimento, sobretudo na primeira infância (NELSON e GABARD-DUMAM, 2020). Nesta fase, os indivíduos são particularmente suscetíveis a alterações advindas do ambiente externo (CHAMPAGNE, 2010), o que pode culminar no acometimento de doenças (KUHLMAN et al, 2017).

Experiências aversivas que ocorrem no início da vida têm sido constantemente associadas à vulnerabilidade ao desenvolvimento de uma série de condições psiquiátricas na fase adulta, tais como transtornos de ansiedade (CHABY, ZHANG, LIBERZON, 2017), alimentares (DE LIMA et al, 2020), depressivos (TORRES-BERRÍO, 2022) e transtorno de estresse pós-traumático (AL JOWF, 2022). Há estudos que correlacionam o estresse neonatal também com outras psicopatologias ainda como por exemplo o transtorno afetivo bipolar (TAB) (MARANGONI, HERNANDEZ e FAEDDA, 2016), transtorno do espectro autista (TEA) e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (MANZARI et al, 2016), assim como transtornos de personalidade borderline. Embora para esses últimos componentes genéticos sejam majoritários, experiências estressantes durante o período do desenvolvimento podem ser responsáveis por desencadear os sintomas característicos dos respectivos transtornos (MEYER et al., 2016).

Além das condições psiquiátricas já mencionadas, experiências estressoras no início da vida também têm sido associadas a ideações suicidas (ZATTI et al, 2017), o que torna tal condição extremamente nociva no que diz respeito à saúde pública, dada a quantidade de prejuízos a que esses eventos predispõem os indivíduos. Essa maior vulnerabilidade a transtornos

induzida pelo estresse precoce ocorre em razão da suscetibilidade a alterações que o encéfalo possui nos primeiros anos de desenvolvimento. Entende-se como fase iniciais do desenvolvimento os períodos iniciais da vida, marcados por uma ampla expansão das atividades neuronais e amadurecimento global das estruturas encefálicas (ARCEGO et al, 2016). Dessa forma, o contato com os efeitos já conhecidamente tóxicos causados por experiências aversivas pode modular permanentemente regiões límbicas, tais quais amígdala, hipocampo, córtex cingulado anterior, hipotálamo e núcleo accumbens, que estão ativamente envolvidas nos processos de resposta de medo e preocupações (GRIMM et al, 2014).

Essa condição, quando muito estimulada, pode favorecer uma hiperatividade do eixo Hipotálamo- Pituitária – Adrenal (HPA), hiperatividade da amígdala e redução da ação do hipocampo no controle inibitório da liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), levando o indivíduo a possível hipersensibilidade ao estresse (PURVES et al, 2013). Essa hipersensibilidade a estressores é associada a predisposição de doenças físicas e mentais (BALE, 2006), uma vez que já foi demonstrado que a alta sensibilidade a estressores está associada com o desenvolvimento de transtornos de ansiedade (BALE, 2006). Estima-se que que 30% dos transtornos mentais na fase adulta seja em decorrência de experiências estressoras no início da vida (FRIDMAN et al, 2015).

O modelo de separação materna em animais, é atualmente, o paradigma que mais se assemelha a condições de negligência em humanos. Este modelo experimental é uma técnica muito utilizada em pesquisas pré-clínicas, principalmente aplicado em roedores e primatas não humanos (LIPPARD e NEMEROFF, 2020). Pesquisas com roedores sugerem que a separação materna no período pós-natal precoce (entre os dias pós-natais (DPN) 2 a 15) leva a maior suscetibilidade a comportamentos do tipo ansioso e depressivo, quando comparado com um período posterior (DPN 7 – 20) (ROQUE et al, 2014). Em uma perspectiva translacional, os primeiros dias pós-natais de roedores são equivalentes à vida intrauterina do feto humano (final da gestação), e trabalhos evidenciam que momentos estressantes vivenciados pela mãe podem ser análogos a eventos traumáticos para a criança (HEIM, ENTRINGER e BUSS, 2019), o que demonstra a eficácia do modelo para mimetizar indução de estresse.

## 1.2 Estresse

O estresse é caracterizado principalmente por promover alterações no equilíbrio interno do organismo, conhecido como homeostase. Conceituado inicialmente por Hans Selye em 1936, e após múltiplas pesquisas abordando o tema, hoje entende-se que o efeito do estresse no organismo está relacionado com ativação de diferentes sistemas em resposta a estressores ambientais, como alterações no clima, contato com agentes infecciosos, exercícios físicos intensos, nutrição de baixa qualidade, exposição a ruídos, lugares com superlotação de indivíduos, e uma variedade de fatores onde ocorre principalmente imprevisibilidade por parte de quem o experimenta (KIOUKIA et al, 2002).

A "Síndrome Geral de Adaptação" foi descrita por Hans Selye quando descreveu os eventos que ocorrem em resposta ao estresse, dividindo-os em três fases importantes: Fase de ocorrência de alarme: nesta fase, o organismo percebe o estímulo estressante e inicia a mobilização de recursos para enfrentá-lo. Fase de resistência: durante essa fase, o organismo tenta se adaptar e lidar com o estímulo estressante. Fase de exaustão: o organismo perde gradualmente a capacidade de se adaptar ao estresse. O que pode resultar em consequências negativas para a saúde, pois os recursos do corpo estão esgotados (SELYE, 1978).

No que se refere aos aspectos neuroendócrinos, são percebidas oscilações hormonais envolvidas no processo de resposta a estímulos estressores que servem para preparar o organismo para reagir à ameaça percebida. Tais oscilações compreendem a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) pelo sistema nervo autônomo/vegetativo, ativação do eixo HPA, com a secreção hipotalâmica do CRH, após poucos segundos ocorre a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) em resposta à estimulação pelo CRH da glândula hipófise (também conhecida como pituitária). O ACTH através da circulação sanguínea chega até as glândulas adrenais e estimula a secreção de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores). Essas respostas neuroendócrinas são importantes para a emissão das clássicas respostas a estímulos estressores: luta, fuga, congelamento (*freezing*) (SAPOLSKY, ROMERO, MUNCK e 2000).

A amígdala e o hipocampo são estruturas-chave nas respostas ao estresse, porém executam suas participações de formas distintas. Diante de ameaças vindas do ambiente, o tálamo envia projeções para amígdala basolateral, que as retransmite para o núcleo central da amígdala. Sendo o núcleo central da amígdala ativado ocorrerá o processo fisiológico de resposta ao estresse, com ativação hipotalâmica para o início da atividade do eixo HPA e ativação do sistema nervoso autônomo/vegetativo; projeções à substância cinzenta periaquedutal resultando comportamento de esquiva; ativação de sistemas modulatórios difusos favorecendo o aumento do estado de alerta (BEAR, CONNORS e PARADISO, 2017). Diversos estudos evidenciam ativação excessiva da amígdala em transtornos de ansiedade (BAS-HOOGENDAM et al, 2020), demonstrando desta forma um papel disfuncional e desadaptativo em tais contextos.

O hipocampo por sua vez tem a função de controlar a liberação de CRH, pois possui receptores de glicocorticoides. Após a ativação do eixo HPA e a liberação dos glicocorticoides pela glândula adrenal, o hipocampo recebe estas moléculas através da circulação e sinaliza ao hipotálamo inibindo sua atividade. Contudo, a exposição continuada a glicocorticoides no hipocampo em contextos de estresse crônico pode levar à diminuição das ramificações dendríticas hipocampais e também à morte neuronal, prejudicando desta forma a atividade hipocampal na regulação do eixo HPA (QUEVEDO e IZQUIERDO, 2019), tornando este eixo hiperativado, expondo o organismo a um contexto de sobrecarga alostática e suscetibilidade a diversas doenças (STERLING e EYER, 1988).

### **1.3 Amígdala**

Quando o tema estresse é abordado, a estrutura encefálica conhecida como amígdala não pode ser ignorada, uma vez que possui um aspecto crítico no que tange a emoções e respostas de medo (LEDOUX, 1994). O conjunto de neurônios da amígdala faz parte do sistema límbico e possui a missão adaptativa de identificar potencial perigo e estabelecer projeções com outras áreas, a fim de garantir respostas fisiológicas proporcionais ao perigo detectado. Essas respostas podem resultar em três tipos de comportamentos distintos, conhecidos comumente como luta ou fuga (SKUSE et al, 2003) e também a paralização ou o congelamento (POWER e MCGAUGH, 2002).

Em estudos em humanos que passaram por algum tipo de lesão de áreas límbicas em que a integridade da amígdala foi afetada, é possível identificar uma série de padrões comportamentais desordenados, compondo a conhecida síndrome de Klüver-Bucy, em que, dentre os comportamentos atípicos observados, é possível notar a ausência de medo e da agressividade (BEAR, CONNORS e PARADISO, 2017). Isso evidencia a habilidade evolutiva que esses conjuntos de neurônios exercem para garantir a sobrevivência ao identificar possíveis estressores ambientais (LAMPRECHT et al, 2009).

A amígdala está localizada no polo do lobo temporal, próxima ao córtex. O termo “amígdala” deriva da palavra grega para "amêndoa", devido à forma anatômica que possui (PURVES et al, 2013). No encéfalo humano, a amígdala é composta por um complexo de núcleos que geralmente são divididos em três grupos principais: os núcleos basolaterais, os núcleos corticomediais e o núcleo central (LEDOUX, 2007.) A amígdala recebe informações de várias fontes, incluindo o neocórtex presente em todos os lobos do cérebro, bem como as áreas conhecidas como giros hipocampal e cingulado. As informações de todos os sistemas sensoriais são enviadas para a amígdala, com ênfase nos núcleos basolaterais, e cada sistema sensorial tem um padrão de projeções específico para os núcleos da amígdala (ZHANG et al, 2021).

No interior da amígdala, existem conexões que permitem a integração de informações provenientes de diferentes modalidades sensoriais. Duas vias principais conectam a amígdala ao hipotálamo: a via amigdalofugal ventral e a estria terminal. Essas conexões são cruciais para a regulação das respostas emocionais e do sistema nervoso autônomo (BEAR, CONNORS e PARADISO, 2017). De forma vasta, a literatura reporta acerca de lesões no tecido da amígdala, identificando a presença de marcadores inflamatórios ocasionados pelos efeitos deletérios do estresse (POGGI, ALBIEZ e PRYCE, 2022), correlacionando tal evento com comportamentos do tipo ansioso em roedores que passaram por estresse neonatal (DE LIMA MARCOLIN et al, 2012).

#### **1.4 Mitocôndria**

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental nas células quando se trata de produção de energia e regulação de processos celulares (SZEWXZYK e WOJTCZAK, 2002).

As mitocôndrias são as organelas responsáveis pela produção de energia nas células por meio da respiração celular.

Nos neurônios da amígdala, assim como nos neurônios em geral, essa função é de extrema importância, pois tais células consomem enorme quantidade de energia para manter sua atividade. Durante situações de estresse ou ansiedade, os neurônios da amígdala podem ser ativados para processar informações emocionais e desencadear respostas físicas e comportamentais (BURROUGHS e FRENCH, 2007) e isso requer um fornecimento rápido e eficiente de energia, realizado principalmente pelas mitocôndrias (DG, 2000).

Pode-se verificar a função mitocondrial por meio de medidas do potencial e da massa mitocondrial. O potencial mitocondrial se refere ao estado elétrico das mitocôndrias e é essencial para sua função. Quando as mitocôndrias estão saudáveis, seu potencial é mantido de forma adequada, permitindo que elas produzam energia de maneira eficiente (BERNARDI, 1999.) Disfunções mitocondriais que afetam o potencial podem levar a uma produção inadequada de Trifosfato de adenosina (ATP), a molécula de energia das células. O que pode comprometer a capacidade dos neurônios da amígdala de responder efetivamente ao estresse e à ansiedade (BASU et al, 2008; WANG et al, 2022). Este último estudo destaca que a disfunção mitocondrial está relacionada ao desenvolvimento de ansiedade nos períodos iniciais da vida e existe associação com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como por exemplo o Alzheimer.

A massa mitocondrial por sua vez, se refere à quantidade e tamanho das mitocôndrias presentes em uma célula. Neurônios da amígdala altamente ativos podem conter uma maior massa mitocondrial para atender às demandas energéticas. Alterações na massa mitocondrial podem ocorrer em resposta a estímulos ambientais, como estresse crônico, e podem influenciar a função dos neurônios. De forma prática, uma diminuição na massa mitocondrial pode levar a uma redução na produção de energia e afetar a capacidade dos neurônios de regular respostas emocionais (HOLLIS et al, 2015).

Estudos sugerem que disfunções mitocondriais podem estar envolvidas em transtornos de ansiedade, embora a relação seja complexa e ainda não totalmente compreendida (EINAT, YUAN et al, 2005). Disfunções mitocondriais podem resultar em uma menor capacidade do cérebro de regular o estresse e a ansiedade, potencialmente contribuindo para os sintomas do transtorno de ansiedade (CHTOUROU et al, 2015). Desta forma fica evidente que disfunções

mitocondriais podem ter um papel na etiologia dos transtornos de ansiedade (HOLLIS et al, 2015).

### **1.5 Neuroinflamação**

Atividades neuroinflamatórias têm sido constantemente associadas com a manifestação de sintomas psiquiátricos, desde o estresse patológico, que pode ser o grande responsável pelo desenvolvimento de outros sintomas clínicos como o transtornos de ansiedade (PASCUAL, et al, 2015) e de depressão (TROUBAT et al, 2021), até outros tipos de patologias como as doenças neurodegenerativas (KEMPURAJ et al, 2016). Também neste caso já foi observado o aumento da manifestação de sintomas de ansiedade como comorbidade diante de processos inflamatórios em curso na doença de esclerose múltipla (ROSSI et al, 2017).

A inflamação é o desfecho de um intrínseco processo fisiológico orquestrado pela atividade do sistema imunológico, emergindo como um elemento essencial para o funcionamento dos organismos. Sua função principal está na restauração dos danos teciduais, desencadeando cascatas bioquímicas altamente regulada. Comumente, o fenômeno inflamatório se delimita temporalmente, exibindo uma curta duração (BAI et al, 2021) e visa à recuperação do substrato tecidual comprometido. Para isso, ocorre a interação de citocinas e quimiocinas. Estas moléculas atuam como eficazes facilitadoras da mobilização direcionada de neutrófilos e macrófagos, orquestrando sua migração precisa em direção ao epicentro da lesão em questão.

No que diz respeito à atividade imunológica, é importante destacar que a comunicação entre o encéfalo e o sistema imunitário é necessária para a função adequada do Sistema Nervoso Central em todas as fases da vida, desde o desenvolvimento embrionário até o envelhecimento. As células imunitárias que corroboram para o funcionamento natural do encéfalo incluem aquelas que migram para o SNC durante o desenvolvimento embrionário e passam a habitar o parênquima cerebral, e aquelas que são derivadas da circulação sanguínea ou diretamente da medula óssea e chegam no encéfalo em diferentes estágios ao longo da vida (CASTELLANI et al, 2023). Estudos com camundongos indicam que essas células, presentes desde os estágios iniciais do processo embrionário, migram do saco vitelino em direção SNC no DPN 9 (GINHOUX et al, 2010). Essas células desempenham um papel fundamental no

desenvolvimento da microglia, que por sua vez modula a resposta imunológica no encéfalo e regula a neuroinflamação em condições normais, assegurando a homeostase cerebral. No entanto, em situações patológicas, como em hiperativação do sistema imunológico, ou perturbação da homeostase no SNC, processos neuroinflamatórios crônicos podem ser ativados (CASTELLANI et al, 2023).

Existe uma relação entre o funcionamento do eixo HPA e do Sistema Nervoso Autônomo, acionados pelas respostas de estresse, e a ativação do sistema imunológico. Uma ação excessiva da atividade simpática e a redução da atividade parassimpática podem resultar em aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (O'DONOVAN et al, 2010). As citocinas são moléculas pertencentes a um grupo de pequenos peptídeos heterogêneos que afetam a inflamação. Elas têm sido fortemente discutidas no âmbito de situações de estresse, ansiedade e depressão (YIRMIYA et al, 2000; SALIM et al, 2012) e não são poucas as evidências que sustentam mecanismos pelos quais o estresse tem influências na resposta inflamatória (DI GIANNANTONIO et al, 2005). Durante o desempenho natural do sistema imunológico, tal sistema tem a capacidade de detectar sinais de ameaça através do aparecimento de Padrões moleculares Associados a Danos (DAMPs). Os DAMPs são moléculas liberadas pelas células danificadas em resposta a lesões, infecções ou outros tipos de danos celulares, sejam essas lesões causadas pelo estresse ou não. Essas moléculas atuam como sinalizadores para alertar o sistema imunológico sobre a presença de danos e ajudar a iniciar uma resposta inflamatória apropriada (KEYEL et al, 2014.)

Os DAMPS são liberados durante o estresse psicológico, e um mecanismo essencial pelo qual podem provocar uma resposta imunitária é por meio do inflamassoma NLRP3, e que está envolvido na expressão de Interleucina-1Beta (IL-1b). Sabe-se que os DAMPs estimulam o inflamassoma na presença de endotoxina para ativar a caspase-1, que cliva o precursor imaturo da interleucina IL-1b, bem como da IL-18, em suas formas maduras e liberáveis. Esta liberação de IL-1b pode então induzir a produção de outras citocinas inflamatórias que são produzidas durante o estresse. Portanto, os DAMPs e o inflamassoma NLRP3 podem servir como um elo primário pelo qual o estresse é traduzido em sinais de dano que promovem a atividade inflamatória em pacientes expostos a estresse psicológico crônico e trauma (LUHESHI et al, 2012).

A Interleucina-6 (IL-6) é um importante marcador pró-inflamatório e na literatura tem sido constantemente observada uma maior expressividade em transtornos de ansiedade. Estudos que compararam a expressão da IL-6 em indivíduos sem a sintomas de ansiedade com indivíduos que possuem sintomas clínicos que caracterizam o transtorno puderam demonstrar que os participantes clinicamente ansiosos exibiram níveis significativamente mais baixos de cortisol matinal e níveis significativamente mais elevados de IL-6, independentemente da idade, sexo e sintomas depressivos (O'DONOVAN et al, 2010). Foi demonstrado ainda em trabalhos com camundongos que determinados compostos químicos que podem exercer função ansiolítica diminuem a expressão da IL-6 (USHIO, 2022). Esses dados reforçam a presença da IL-6 em contextos pró-inflamatórios onde ocorrem alterações de comportamento em razão de sinais característicos de ansiedade.

Em condições pró-inflamatórias com efeitos neurotóxicos no encéfalo, outra citocina também é constantemente identificada em níveis expressivos em condições que configuram o transtorno de ansiedade. O Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma proteína produzida pelo sistema imunológico em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo infecções, inflamações e em especial o estresse (MARSLAND et al, 2017). Esta proteína desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunitária e na inflamação. Embora não seja diretamente ligada à ansiedade, estudos sugerem que pode haver uma relação indireta entre o TNF-alfa e a ansiedade em humanos (SIMEN et al, 2006) e em estudos com roedores (PATEL et al, 2010). A síntese do TNF- $\alpha$  ocorre principalmente em células do sistema imunológico, como macrófagos e células T ativadas. A produção é estimulada por agentes infecciosos, como bactérias e vírus, bem como por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). Quando esses estímulos ativam as células imunitárias, elas liberam o TNF- $\alpha$ , que então exerce suas funções na resposta imunitária e na regulação da inflamação (SCHÄFFER et al, 2006).

## **1.6 Astrócitos**

Os astrócitos são células gliais do sistema nervoso central que desempenham um papel importante na modulação da atividade neuronal e na manutenção da homeostase no encéfalo. São capazes de detectar e responder a sinais químicos liberados pelos neurônios

e outras células gliais, e podem liberar seus próprios sinais químicos para modular a atividade neuronal (WAHIS et al, 2021), por desempenharem um papel crucial na manutenção do ambiente ao redor dos neurônios podem ainda controlar o metabolismo da glicose e, captar neurotransmissores, particularmente o glutamato, evitando desta forma a excitotoxicidade potencialmente prejudicial (NEWMAN, 2003).

Trabalhos em humanos demonstram que alterações na atividade dos astrócitos e na estrutura da amígdala estão relacionadas com o acometimento de transtornos psiquiátricos, dentre eles, depressão e ansiedade (BOWLEY et al, 2002). A glutamina sintetase (GS), a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a proteína de ligação ao cálcio S100b, são marcadores cruciais da identidade e função dos astrócitos. Essas proteínas são amplamente reconhecidas como biomarcadores confiáveis para caracterizar a população de astrócitos, refletindo a morfologia, atividade metabólica e respostas a estímulos ambientais (DEVAN, JANARDHANAM, 2011; HANSEL, 2009; BRODIE et al, 1998).

A enzima glutamina sintetase (GS) é predominantemente encontrada no tecido encefálico, rim e fígado, desempenha funções essenciais em cada um desses órgãos. No encéfalo, atua na reciclagem do neurotransmissor glutamato. Quando os neurônios glutamatérgicos liberam o glutamato, este é captado pelos astrócitos, de forma que a GS o converte em glutamina, um aminoácido não tóxico. A glutamina então retorna aos neurônios, onde é novamente metabolizada produzindo glutamato por um processo conhecido como “ciclo glutamato-glutamina”, (HERTZ, 2013). Esse ciclo é documentado em estudos, e estes trazem evidências de que este ciclo, desempenha um papel importante na regulação dos níveis sinápticos de glutamato e amônia, prevenindo assim a neurotoxicidade associada ao excesso desses compostos. Em suma, a atividade da GS é vital para manter a homeostase e proteger contra os efeitos nocivos do glutamato e da amônia no encéfalo (SUAREZ et al, 2002).

A Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) é predominantemente expressa nos astrócitos. Esta proteína desempenha uma gama de funções fundamentais, incluindo manutenção do suporte estrutural, regulação do microambiente químico e iônico cerebral, e participação na reparação de danos teciduais neuronais (ENG, GHIRNIKAR, 1994). A GFAP possui uma relevância específica na arquitetura e atividade funcional dos astrócitos, está intrinsecamente envolvida na organização do citoesqueleto celular, conferindo-lhes

resistência e forma. Adicionalmente, a GFAP exerce um papel significativo na transdução de sinais intracelulares e na resposta a injúrias cerebrais, sendo frequentemente empregada como marcador de patologias ou lesões do SNC (BRODIE, et al, 1998).

A S100b, uma proteína ligante de cálcio, tem sido empregada como um marcador para a ativação glial em uma variedade de distúrbios do SNC. Desempenha papéis cruciais no desenvolvimento normal do encéfalo e possui uma importante capacidade na recuperação após uma lesão (YARDAN et al, 2011). Estudos em pacientes humanos não encontraram uma correlação direta entre os níveis de S100b, a presença de ansiedade e a qualidade de vida. No entanto, é observada uma expressão elevada de S100b nos tecidos da amígdala em pacientes com transtorno de ansiedade, sugerindo que o transtorno de ansiedade, devido à exposição prolongada aos efeitos do estresse, pode levar a lesões teciduais (DYCK et al, 2002). Portanto, avaliar a expressão deste marcador astrocitário pode ser um parâmetro importante na identificação de possíveis disfunções na atividade adequada do SNC.

## **1.7 Memória Emocional**

Experimentos conduzidos com animais e seres humanos sugerem que as memórias relacionadas a eventos emocionais são notavelmente intensas e de longa duração. Isso é especialmente evidente no caso do medo aprendido. Através da socialização ou experiências dolorosas, é possível que animais aprendam a evitar certos comportamentos devido ao medo de sofrer ferimentos. Tal comportamento possui caráter adaptativo em uma perspectiva evolutiva (BEAR, CONNORS e PARADISO, 2017). Por exemplo, se uma criança receber um choque doloroso após colocar um clipe de papel em uma tomada, é altamente provável que essa criança não repita mais este comportamento. As memórias associadas ao medo podem se formar rapidamente e permanecer por um longo período (IZQUIERDO, FURINI e MYSKIW, 2016).

Um exemplo extremo desse fenômeno é o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT), no qual o medo intenso resultante de uma experiência traumática pode afetar negativamente a vida de uma pessoa por muitos anos. Embora acredite-se que a amígdala não seja o principal local de armazenamento da memória, as alterações nas conexões sinápticas da amígdala parecem desempenhar um papel na formação de memórias relacionadas a eventos

emocionais (KOENIGS et al, 2009), e que ocorra no circuito entre amígdala e córtex pré-frontal alterações significativas que mantêm os sintomas do TEPT em curso.

O estresse cumulativo parece intensificar memórias aversivas, dificultando o processo de resiliência em momentos distintos da vida, porém igualmente aversivos. É o que demonstra um trabalho realizado com soldados sobreviventes de guerra, aqueles que passaram por maus tratos na infância tiveram maior suscetibilidade para desenvolver o TEPT ao serem comparados com os que não passaram por situações de estresse grave no início da vida (BONDOLI et al, 2017). Outra pesquisa realizou a comparação entre crianças que passaram por negligência nos períodos iniciais da vida com outras crianças que experimentaram cuidados parentais adequados no período neonatal: em outras fases da vida, foi possível observar que as crianças que não sofreram negligência tiveram um desempenho positivo diante de fatores que envolvessem estresse intenso, ao passo que as negligenciadas na infância foram mais suscetíveis ao desenvolvimento de sintomas de ansiedade, depressão e TEPT, além de notadamente serem adultos agressivos (AL JOWF et al, 2022).

Estudos com ratos que passaram pelo teste do medo condicionado ao contexto, com emprego de choque nas patas, demonstram maiores repostas de sobressalto nesses animais, caracterizando-os com maiores traços do comportamento do tipo ansioso ao serem comparados com animais que não possuíram esta experiência (DIEHL et al, 2014). Como já mencionado anteriormente, a amígdala desempenha um papel crítico na determinação do emocional ao transmitir sinais sensoriais de medo e na regulação da memória e resposta a eventos aversivos (LEDOUX, 2000) e o estresse precoce pode corroborar significativamente para tornar tais memórias mais difíceis de serem extintas. Essa condição pode estar muito presente nos transtornos de ansiedade (LEDOUX e PINE, 2016).

## **1.8 Transtorno de Ansiedade**

Os transtornos de ansiedade são formados por um grande grupo de condições com sintomas variados e fazem parte dos transtornos relacionados ao estresse (SHALEV, 2009). Dentre o grupo de transtornos que os compõe, existem: transtorno de ansiedade de separação, transtorno de ansiedade social, transtorno do pânico, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, mutismo seletivo, fobia específica, transtorno de ansiedade induzido por

substância/medicamento, transtornos de ansiedade especificado e não especificado (APA, 2023). Estes transtornos, embora apresentem características específicas que os caracterizam, compartilham semelhanças, onde o medo e a ansiedade são experimentados de forma intensa e excessivamente perturbadora, sendo o medo relacionado a uma ameaça real ou percebida bem determinada e a ansiedade, à antecipação de uma ameaça futura (APA, 2023).

Os transtornos de ansiedade são os mais comuns a serem diagnosticados e conferem grande perda da qualidade de vida e redução de produtividade aos que desenvolvem tais sintomas (KESSLER et al, 2005; KADRI et al, 2007), Tais transtornos têm tido alta prevalência em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, por exemplo, em torno de um terço da população possui diagnóstico de transtornos relacionados à ansiedade (BARTLETT, SINGH, HUNTER, 2017), e no Brasil em 2017 a Organização Mundial de Saúde afirmou que o país enfrentava uma epidemia de transtornos de ansiedade que o tornava o país mais ansioso do mundo (WHO, 2017). Deve-se observar que esses dados sofreram um grande aumento em razão da situação pandêmica causada pelo novo coronavírus (DE PEDRAZA, GUZI, TIJDENS, 2020).

Diversos estudos em humanos evidenciam que a experiência do estresse, pode levar ao aumento da atividade da amígdala e conseqüentemente a sintomas de ansiedade. É o que foi observado em um trabalho ao utilizar o estresse social como estressor agudo ao colocar os participantes em uma entrevista: o estudo demonstrou, além do aumento da atividade da amígdala e nas projeções para o córtex pré-frontal dorsolateral, houve um aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- $\alpha$  (MUSCATELL et al, 2015). Na condição de estresse crônico são constantemente identificados na literatura níveis elevados de cortisol circulante e maior expressão dos principais marcadores inflamatórios em indivíduos que vivenciaram estresse no início da vida (CHABY, ZHANG e LIBERZON, 2017).

### **1.9 Ômega- 3**

Considerando os efeitos prejudiciais na saúde física e mental resultantes da exposição a processos inflamatórios, estudos científicos vêm buscando identificar compostos com propriedades anti-inflamatórias, e o ácido graxo ômega-3 tem sido associado à redução desses processos inflamatórios, destacando-se como uma possibilidade promissora de pesquisa (MORI e BEILIN, 2004) Esses estudos vêm buscando ainda identificar se estes efeitos podem ser úteis

para atenuar condições psiquiátricas existentes, a partir de estratégias dietéticas (BOZZATELLO et al, 2016).

Ácidos graxos são compostos orgânicos em que a estrutura química contém cadeias de hidrocarbonetos com um grupo carboxila em uma extremidade e um grupo metila na extremidade oposta. O grupo carboxila é reativo e pode estabelecer ligações éster com grupos alcoólicos, por exemplo, glicerol ou colesterol, formando acilgliceróis (e.g., triacilgliceróis, fosfolipídios) e ésteres de colesterol (NELSON e COX, 2002). Os ácidos graxos que possuem ligações duplas em sua cadeia hidrocarbonada são chamadas de ácidos graxos insaturados; um ácido graxo contendo 2 ou mais ligações duplas é chamado de ácido graxo poliinsaturado (AGPI) (CALDER e YAQOUB, 2009).

Um AGPI de cadeia longa em que a primeira ligação dupla na cadeia de hidrocarbonetos, contando-se a partir da metila terminal, está no carbono de número 3, é chamado de ômega-3. A fonte principal de ácidos graxos do tipo ômega 3 é dietética. Tais ácidos são encontrados no leite materno, peixes de água fria e em óleos vegetais (LUZ et al, 2012). Entre os ácidos ômega-3, podemos citar os ácidos graxos eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA). Há muitos anos a comunidade científica discute a importância de uma dieta acrescida com tais elementos para a manutenção adequada da saúde humana devido às suas propriedades nutricionais especiais (INNIS, 2007).

Vários estudos relacionam a suplementação com ômega-3 com taxas menores de mortalidade por terem eles ações protetoras em doenças graves, como doenças cardiovasculares (CALDER, 2004) e inflamação no sistema digestório (CALDER, 2008). Existem também interessantes dados sobre melhora do desempenho da aprendizagem infantil, sugerindo que o ômega-3 pode contribuir satisfatoriamente no período do desenvolvimento humano (HELLAND et al, 2003). Outros estudos ainda indicam remissão de certos sintomas psiquiátricos na fase adulta (FREEMAN et al, 2007).

Em um estudo realizado visando identificar as diferenças entre dietas contendo AGPIs do tipo ômega-3 utilizando diferentes dietas, uma, com menor teor em ômega-3 e outra com quantidades adequadas em roedores que passam por estresse neonatal, foi percebido que os animais que receberam a dieta empobrecida em ômega-3 apresentaram maiores níveis de produção de radicais livres, com alterações nas atividades de enzimas antioxidantes no tecido do hipocampo, e ainda foi observado disfunção mitocondrial desses animais, sobretudo no potencial

mitocondrial (FERREIRA et al, 2015). Esses AGPIs do tipo ômega- 3 podem desempenhar um papel importante na estrutura e função de muitas proteínas de membrana, incluindo enzimas, receptores e moléculas transportadoras que são críticas no período do desenvolvimento do encéfalo, sobretudo para as funções cognitivas (MULDOON et al, 2010).

O tecido encefálico é rico em lipídios (SVENNERHOLM, 1968; BOURRE, 2004), ele possui uma quantidade considerável de AGPIs de cadeia longa, entre eles, ácido araquidônico (ARA) e docosahexaenoico (DHA) (PEET et al, 1998). Nos mamíferos, estes AGPIs são derivados de ácido linoléico e ácido alfa-linolênico, os quais são obtidos principalmente a partir da dieta (SINCLAIR et al, 1975). Estudos identificam possibilidade do ômega-3 agir como um possível neuroprotetor, uma vez que esses componentes são essenciais para o funcionamento adequado das células, de membranas e enzimas a canais iônicos e receptores, promovendo ações de prevenção a processos inflamatórios, como também efeitos anti-inflamatórias (YAN et al, 2013), tendo ainda ações antioxidativas (CHEW et al, 2015). A população ocidental consome pouco ômega-3 comparado ao ômega-6, que é também um grupo de ácidos graxos poli-insaturados, porém com ligação dupla no sexto carbono a partir da metila terminal, um exemplo sendo o ácido araquidônico, citado acima (BHATT et al, 2020). Alguns dados sugerem que os efeitos do ômega- 6 pode ter caráter nocivo se for utilizado em quantidades exageradas.

Por serem as membranas celulares compostas por fosfolipídeos contendo ácidos graxos, esses lipídeos exercem uma influência significativa nas respostas celulares e na função celular, o que é alcançado por meio de diversos mecanismos. Alguns mediadores lipídicos são produzidos a partir dos ácidos graxos liberados dos fosfolipídios da membrana após a ativação celular, destacando-se os eicosanóides formados a partir do ácido ARA. Por meio da modulação da organização da membrana, das jangadas lipídicas, dos segundos mensageiros e dos eicosanóides, os ácidos graxos têm a capacidade de alterar as vias de sinalização intracelular e extracelular, influenciando, em última análise, a expressão gênica, as respostas fisiológicas e metabólicas em diversos tipos celulares e tecidos. Como resultado dessas interações moleculares e celulares, os ácidos graxos desempenham um papel significativo na determinação da saúde, no risco de doenças, na gravidade das doenças e nos resultados clínicos. Isso se torna particularmente evidente no contexto da resposta inflamatória (CALDER et al, 2011).

Desta forma é importante destacar que as vias relacionadas aos ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega-3 possuem muitas vezes caráter anti-inflamatórios, ao passo que as

vias que envolvem a síntese dos ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega- 6 são frequentemente pró-inflamatórias (BAGGA et al, 2003).

### **1.10 Diferenças sexo-específicas**

Estudos realizados em roedores revelaram que existem diferenças significativas entre machos e fêmeas nos efeitos da separação da mãe durante o período neonatal sobre o comportamento na fase adulta (LEUSSIS et al, 2012). Além disto, respostas relacionadas às experiências ao estresse parecem ser diferentes entre os sexos em momentos distintos da vida (BALE e EPPERSON, 2015), o que torna imprescindível mensurar na pesquisa pré-clínica e clínica as diferentes maneiras como indivíduos de ambos os sexos reagem aos mesmos estímulos. Esses dados podem favorecer a compreensão mais ampla nas perspectivas em saúde, tanto no que tange à saúde quanto à doença (BALE; EPPERSON, 2015).

Encéfalos de ambos os sexos passam por processos especialmente característicos durante o neurodesenvolvimento e são influenciados pela exposição a hormônios nesse período. Em indivíduos do sexo masculino, os níveis de hormônios andrógenos são bem maiores ao serem comparados às fêmeas já logo após o nascimento, o que lhes determina as características masculinas e afeta a diferenciação celular e a conectividade cerebral (efeitos organizacionais). Os esteroides gonadais, ao chegarem ao encéfalo realizam tarefas específicas no processo de proliferação e de morte celular, o que leva ao dimorfismo sexual do encéfalo (MCCARTHY, 2008; ZHANG et al, 2008).

No que tange aspectos de comportamento, são muito consideradas na literatura as diferenças entre os sexos, diferenças essas principalmente marcadas, na fase adulta, pelas oscilações hormonais nas fêmeas (MONTERO-LÓPEZ et al, 2018). Dessa forma, é indispensável que a pesquisa pré-clínica investigue essas marcantes diferenças, e para estudar essas variações, ratas são frequentemente utilizadas como modelo devido à curta duração do ciclo estral. O ciclo estral em ratas dura em média quatro ou cinco dias e é caracterizado por quatro fases: estro, metaestro, diestro e proestro (MARCONDES, BIANCHI, TANNO, 2002).

## 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Além de ser o transtorno de ansiedade o mais comum entre os transtornos psiquiátricos (BARTLETT, SINGH e HUNTER, 2017), também é um dos mais limitantes e que afeta significativamente a qualidade de vida e bem-estar das pessoas que o enfrentam. Nos últimos anos foi possível identificar um crescimento significativo dos níveis de ansiedade nas populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento, particularmente o Brasil, que é considerado o país mais ansioso de mundo desde de 2017 (WHO, 2017). Por outro lado, a exposição a eventos adversos na infância é um fator importante para a susceptibilidade a transtornos de ansiedade. Considerando tais fatores, e a importância de buscar alternativas de neuroproteção em vista do número de crianças que passam por algum tipo de grave adversidade, este trabalho teve a intenção de investigar a hipótese de que o estresse neonatal ative processos de neuroinflamação (MUSCATELL et al, 2015), tornando o indivíduo mais sensível ao estresse, o que poderia tornar o processo de resiliência obtido por meio da extinção da memória aversiva mais difícil (KOENIGS et al, 2009). Consideramos ainda que tais condições poderiam estar relacionadas à alteração da atividade da amígdala e ao desenvolvimento de comportamento do tipo ansioso. Para tal, utilizamos o protocolo de separação materna para mimetizar o estresse no início da vida. Adicionalmente, a pesquisa que foi realizada procurando mensurar se uma suplementação alimentar como uma dieta acrescida em óleo de linhaça (com maior conteúdo de ômega-3) poderia ser utilizada como estratégia para atenuar os efeitos comportamentais e neuroquímicos do estresse precoce. Usamos como controle uma dieta isocalórica contendo óleo de soja, por ser o mais comum à mesa da população brasileira, já que o óleo de soja tem um consumo em torno de 86% a mais ao ser comparado com outros óleos vegetais (NUNES et al, 2007).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar se o estresse precoce predispõe animais a comportamentos do tipo ansioso na idade adulta, e se esse comportamento estaria relacionado a alterações neuroquímicas envolvendo fatores inflamatórios e parâmetros da atividade mitocondrial na amígdala. Por fim, verificar se uma dieta rica em ômega 3 poderia reverter ou atenuar esses efeitos.

#### **3.2. Objetivos Específico**

- 1) Avaliar se a SM induz alterações de ansiedade por meio dos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, teste do claro-escuro, e supressão da alimentação pela novidade.
- 2) Analisar se a SM induz disfunção mitocondrial na amígdala, medindo-se massa e potencial mitocondrial.
- 3) Verificar se a SM induz neuroinflamação na amígdala, analisando marcadores de neuroinflamação (IL-6, IL-1beta, TNF-alfa).
- 4) Verificar se a SM afeta marcadores astrocitários (Proteína ácida fibrilar glial, ou GFAP, S100B e glutamina sintatase, ou GS).
- 5) Verificar se uma dieta rica em ômega-3 iniciada pós-desmame é capaz de reverter ou atenuar os efeitos encontrados.
- 6) Verificar se há diferenças sexo-específicas nas medidas descritas anteriormente.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

A metodologia empregada neste estudo é a usualmente adotada por nosso grupo de pesquisa e seguiu as diretrizes estabelecidas no Princípios de cuidado com animais de laboratório (Publicação do NIH N° 85-23, revisada em 1996) e na Lei AROUCA n° 11.794 de outubro de 2008. Os protocolos experimentais utilizados nesta pesquisa foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS) com o número de registro N° 41511- 2021.

Os procedimentos descritos neste trabalho estão classificados nas seguintes categorias, conforme as diretrizes de Severidade dos Procedimentos Científicos da CEUA desta Universidade: procedimentos de baixa severidade (como separação materna, restrição alimentar (20%) e testes comportamentais); procedimentos de moderada severidade (aplicação do choque na tarefa do medo condicionado ao contexto e restrição alimentar de 20%, bem como coleta de lavado vaginal); e procedimentos sem recuperação (eutanásia).

### **4.2 Delineamento experimental**

Neste trabalho o delineamento experimental (Figura 1) envolveu 2 etapas distintas de experimentos, vários de testes comportamentais e testes bioquímicos. As ninhadas foram separadas entre animais que passaram pelo protocolo de separação materna (SM) e animais que não passaram, sendo chamados de intactos (INT). Nesta pesquisa foram utilizados machos e fêmeas. Os testes comportamentais foram realizados de forma sequencial e no período do início da fase adulta. No caso das fêmeas, ao final de cada avaliação comportamental, também foi analisado o esfregaço vaginal, com o objetivo de verificar se havia padrões de comportamento do tipo ansioso em fases específicas do ciclo. Foi ainda realizada uma comparação entre grupos tratados com dieta intervenção, sendo esta enriquecida em linhaça, rica em ômega-3 (O3), e para a dieta controle foi utilizado o óleo de soja (OS), de modo a que os grupos recebessem dietas isocalóricas.

Amostras da região da amígdala foram coletadas no dia da eutanásia e utilizadas imediatamente (medidas de função mitocondrial) ou mantidas a -80°C para que fosse possível

manter a preservação da estrutura e estas foram utilizadas em técnicas específicas descritas na para identificar presença de neuroinflamação e atividade dos astrócitos no tecido da amígdala.

#### 4.2.1 Linha do tempo



**Figura 1:** Descrição da linha temporal da pesquisa (criada com BioRender.com). **DNP:** dia pós - natal. **SM:** Separação Materna. **INT:** Intacto. **LCE:** Labirinto em Cruz Elevado. **CA:** Campo Aberto. **CE:** Claro-Escuro. **SAN:** Supressão da Alimentação pela Novidade. **MCC:** Medo Condicionado ao Contexto. **IL-6:** Interleucina 6, **IL-1beta:** Interleucina 1 beta. **TNF $\alpha$** - Fator de Necrose Tumoral alfa. **GS:** Glutamina Sintetase. **GFAP:** Proteína Glial Fibrilar ácida.

O dia do nascimento é considerado Dia Pós-Natal (DPN) 0. Desta forma, foram realizadas as padronizações, mantendo o máximo de 8 animais por ninhada, e as caixas foram organizadas entre as que passariam ou não por SM. No DPN1 ocorreu o início da SM que se manteve até o DPN 10. No DPN 21 os animais foram separados por sexo e machos e fêmeas de cada ninhada e aleatoriamente distribuídos segundo a dieta a ser recebida, isto é, enriquecida em óleo de soja (OS) ou de linhaça (O3). Assim, resultaram os grupos Separação Materna óleo de soja (SM OS), Separação Materna ômega- 3 (SM O3), Intactos óleo de soja (INT OS) e Intactos

ômega- 3 (INT O3), e então se iniciou o tratamento com a dieta. A partir do Dia NP 71 ocorreu o início das avaliações comportamentais: DNP 71 com Labirinto em Cruz Elevado (LCE), DNP 72 Campo Aberto (CA), DNP 73 Claro-Escuro (CE), entre os dias 73 e 76 os animais passaram por um período de restrição alimentar de 3 dias, (no dia 1 com 20% de restrição, dia 2 também 20 % de restrição e dia 3 tiveram 80% de restrição), e então no DPN 76 os animais foram expostos ao teste de Supressão da Alimentação pela Novidade (SAN). No DPN 84, treino na tarefa de Medo Condicionado ao Contexto (MCC) no DPN 86, extinção (metade dos animais passaram pela extinção), DPN 88, teste. DPN 91, LCE e no DPN 92 ocorreu a eutanásia. Nos testes bioquímicos foram verificadas a função mitocondrial (usando-se citometria de fluxo), a neuroinflamação (medindo-se as citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por ensaios imunoenzimático) O último teste bioquímico realizado foi a verificação da atividade dos astrócitos, através das proteínas: Proteína de Fibrilar Ácida da Glia - GFAP e Proteína de Ligação ao Cálcio (S100b) e da atividade da glutamina sintetase (GS).

### **4.3 Cuidados na manutenção dos animais**

Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS, em caixas de dimensões 41 x 34 x 21 cm, na medida do possível. Caixas de plexiglas com assoalho recoberto de maravalha autoclavada foram usadas neste estudo, e os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12h (luz das 7h às 19h), com água e ração *ad libitum* e uma temperatura ambiente de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . As caixas disponíveis atualmente no biotério do Departamento de Bioquímica, com altura de 16 cm, eram trocadas na medida da disponibilidade de recursos por caixas que satisfaziam as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (altura mínima de 17,8 cm).

Após o nascimento, as ninhadas foram padronizadas em no máximo 8 filhotes. Os filhotes permaneciam com a mãe até o 21º dia de vida, quando eram desmamados e separados por sexo, mantidos em 3 - 4 animais por caixa. Nesses dias também foi iniciada a introdução da dieta. As mães e possíveis animais excedentes nas ninhadas (após a padronização) ou após o desmame foram submetidos a eutanásia. Do dia do desmame até o DPN 71, período que os procedimentos de avaliação comportamental começaram, as trocas da maravalha das caixas-moradia foram realizadas duas vezes por semana.

Foram utilizados no máximo 2 animais de cada sexo e de cada ninhada para o mesmo tratamento nos experimentos comportamentais e apenas 1 animal de cada sexo e de cada ninhada nos experimentos bioquímicos. Os protocolos experimentais estão descritos abaixo.

#### **4.4 Tratamento usando os fatores dieta e separação materna**

##### **4.4.1 Separação Materna (SM) neonatal**

O dia do nascimento foi considerado DPN 0. Entre os DPN 1 e 10, os filhotes do grupo SM foram separados de suas mães e colocados em uma incubadora com temperatura de 32°C por um período de 3 horas, durante o ciclo claro do dia (entre 12h e 17h). Cada ninhada foi manipulada usando luvas específicas para evitar a transferência de odores entre os ninhos. Ao separar os filhotes de suas mães, eles foram retirados com cuidado de seus ninhos e colocados em recipientes limpos, forrados com toalhas de papel, onde ficaram juntos com seus irmãos durante as 3 horas de tempo separados das mães. Após esse período, os filhotes foram devolvidos para suas respectivas caixas de abrigo. As mães permaneceram na mesma sala da incubadora, permitindo que ouvissem as vocalizações de seus filhotes. Após os 10 dias de SM, os filhotes não foram perturbados, exceto pela limpeza ocasional das caixas de abrigo (ALVES et al., 2022).

Os animais intactos (grupo controle) não foram submetidos a nenhuma intervenção específica durante os primeiros dias de vida, a não ser pela limpeza das caixas moradia, que consiste na remoção da maravalha suja da parte da caixa moradia distante do ninho e na substituição por maravalha limpa. A maravalha próxima à área do ninho foi preservada ao longo do período que vai desde o nascimento até o desmame dos animais (DIEHL et al., 2007).

##### **4.6.2 Dieta**

A introdução alimentar ocorreu imediatamente após o desmame (DPN 21). Cada grupo (intacto ou SM) foi subdividido em dieta controle, em que a fonte nutricional era uma dieta padrão comumente utilizada no biotério do Departamento de Bioquímica de nome comercial: Nuvilab®, incorporada com 4% de óleo de soja (Primor®). Neste trabalho, foi decidido o uso de óleo de soja para a ração controle por este alimento ser muito consumido no Brasil. Para a dieta

intervenção, a ração padrão foi acrescida com óleo de linhaça (Pazze®, rico em ômega-3). Neste caso, a dieta resultante conteve 1% a mais em  $\Omega$ -3 (de Lima, comunicação pessoal), resultando em 8% de gordura em cada dieta (as dietas eram, portanto, isocalóricas e ambas possuíam a mesma textura e o mesmo conteúdo de gordura). As tabelas de 1 a 6 abaixo possuem informações nutricionais e preparo das respectivas dietas.

### Preparo das dietas por kg

Dieta	Ração Farelada (g)	Óleo de Soja (ml)	Óleo de Linhaça (ml)
Ômega-3	960 g	24,5 ml	18,5 ml de L
Óleo de Soja	960 g	43 ml	-

**Tabela 1**

### Composição das dietas (conteúdo em 100g)

Dieta	Kcal	Proteína total (g)	Carboidratos (g)	Gorduras (g)
Ômega-3	325.2	21.1	42.52	7.84
Controle	325.2	21.1	42.52	7.84

**Tabela 2**

### Composição (em porcentagem das gorduras totais) dos óleos adicionados à ração padrão

Composição	Óleo de linhaça	Óleo de Soja
Saturados	51,024	51,136
N9	39,4891538	32,208
N7		1,632
N6	26,0931538	12,792
N3	13,7885384	2,392

**Tabela 3**

**Informações Nutricionais do óleo de linhaça, quantidade por porção de 13ml, conforme informação nutricional disponibilizada pelo fabricante**

Valor Calórico	126kcal/529 kj
Carboidratos	0g
Proteínas	0g
Gorduras Totais	14g
Gorduras Saturadas	1,3g
Linolênico (ômega-3)	7g
Linolênico (ômega-6)	2g
Oleico (ômega-9)	2g
Gorduras Trans	0g
Fibra Alimentar	0g
Colesterol	0mg
Sódio	0mg

**Tabela 4**

**Informação Nutricional do Óleo de Soja, quantidade por porção de 13 ml, conforme informação nutricional disponibilizada pelo fabricante**

Valor energético	108 kcal = 45kj
Carboidratos	0g
Proteínas	0g
Gorduras totais	12g
Gorduras Saturadas	2,1g
Gorduras trans	0g
Gorduras monoinsaturadas	3,2g
Gorduras poinsaturadas	6,7g
Omega-3	0,7
Omega-6	6,0g
Colesterol	0mg
Fibra alimentar	0g
Sódio	0 mg

**Tabela 5**

**Informação nutricional da ração farelada, conforme informação nutricional disponibilizada pelo fabricante**

**COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO:**

Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, óleo vegetal, carbonato de cálcio, fosfato bicalcico, cloreto de sódio (sal comum), vitamina A, vitamina 03, vitamina E, vitamina k3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, doreto de colina, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

**NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DE PRODUTO:**

UMIDADE (máx) 125 g/kg

PROTEÍNA BRUTA (min) 220 g/kg

EXTRATO ETÉRE (min) 40 g/kg

MATERIAL MINERAL (máx) 90 g/kg

FIBRA BRUTA (máx) 70 g/kg

CÁLCIO (min-máx) 10-14 g/kg

FÓSFORO (min) 8.000 mg/kg

VITAMINAS: vitamina a (min) 13.000 uv/kg; vitamina d3 (min) 2.000 uv/kg; vitamina e (min) 34 uv/kg, vitamina k3 (min) 3 mg/kg; vitamina b1 (min) 5 mg/kg; vitamina b2 (min) 6 mg/kg; vitamina b6 (min) 7 mg/kg; vitamina b12 (min) 22 mcg/kg; niacina (min) 50 mg/kg; pantotenato de cálcio (min) 20 mg/kg; ácido fólico (min) 1 mg/kg; biotina (min) 0,05 mg/kg; colina (min) 1.900 mg/kg. MINERAIS: sódio (min) 2.700 mg/kg; ferro (min) 50 mg/kg; manganês (min) 60 mg/kg; zinco (min) 60 mg/kg; cobre (min) 10 mg/kg; iodo (min) 2 mg/kg; selenito (min) 0,05 mg/kg; cobalto (min) 1,5 mg/kg; flúor (máx) 80 mg/kg. AMINOÁCIDOS: lisina (min) 12 g/kg; metionina (min) 4.000 mg/kg. ADITIVOS: BHT 100 mg/kg.

**Tabela 6**

#### **4.5 Análise do ciclo estral**

Para verificação da fase do ciclo estral (estro, metaestro, diestro e proestro) em que as fêmeas se encontravam, foi coletado o lavado vaginal por pesquisador treinado, utilizando uma

pipeta com ponteira de polietileno, de ponta romba, contendo 40 µl de solução salina 0,9%. Durante a coleta, a ponta da ponteira é introduzida no orifício vaginal, na sequência a solução salina é injetada, aspirada e colocada em uma lâmina previamente identificada para a visualização ao microscópio, com magnificação de 10 a 40 vezes (MARCONDES *et al*, 2001).

Tal procedimento é indispensável devido às oscilações hormonais peculiares à fisiologia das fêmeas (FRYE, PETRALIA, RHODES, 2000). O ciclo estral foi analisado após os testes comportamentais e também antes da eutanásia, testes comportamentais programadas entre os dias DPN 71 – 92, e a fase utilizada como co-variável na análise estatística.

## **4.6 Testes Comportamentais**

### **4.6.1 Labirinto em Cruz Elevado – LCE**

Os animais no DPN 71 foram expostos ao **Labirinto em Cruz Elevado** (LCE). Este aparato é uma estrutura em madeira em formato de cruz, elevado do chão (50 cm) consistindo em quatro braços (braços medindo 50x15cm), sendo o centro uma plataforma quadrada de 10 cm. Dois dos braços são opostos um ao outro, sem as laterais (braços abertos); os outros dois braços (braços fechados) têm paredes de 49 cm de altura (PELLOW, 1986). Este aparato também procura mensurar a capacidade exploratória, a motivação do animal em se locomover ao longo de todo o ambiente, ou temor em explorar partes específicas, como por exemplo os braços abertos do aparato, comportamento este (a redução nesse tempo de exploração) que pode ser designado como do tipo ansioso. O teste foi realizado por 5 minutos, no qual o animal pode explorar livremente o aparato, (ARCEGO *et al*, 2013). Além da quantidade em tempo em que os animais permaneceram no centro do aparato, nos braços fechados e abertos, foi contabilizada, nos braços fechados, a quantidade de respostas de orientação (*rearings*), que se refere ao comportamento do animal de se sustentar sobre as patas traseiras, erguendo a parte anterior do seu corpo para investigar o ambiente (DA SILVA *et al*, 1996). De modo semelhante, nos braços abertos foi analisada a frequência de “mergulhos” (*head Dippings*, HD), outra medida exploratória em que o animal inclina-se para baixo e para fora do braço aberto (FERNANDES, FILE, 1996). Por último, também foi coletada a frequência de avaliações de risco (*Stretch- Attend Posture* – SAP), em que o animal alonga o tronco esticando as patas dianteiras para o centro do aparato enquanto

as patas traseiras permanecem no braço fechado (ALBRECHET-SOUZA, et al, 2007). A Tabela 7 identifica o N utilizado neste comportamento.

#### **Divisão e N por grupo no teste Labirinto em Cruz Elevado**

<b>Grupo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Nº animais</b>
SM O3	MACHOS	32
SM OS	MACHOS	28
INT O3	MACHOS	28
INT OS	MACHOS	21
SM O3	FÊMEAS	18
SM OS	FÊMEAS	20
INT O3	FÊMEAS	23
INT OS	FÊMEAS	24

**Tabela 7**

#### **4.6.2 Campo Aberto**

No DPN 72, os animais foram submetidos ao teste do Campo Aberto, com objetivo de avaliar a capacidade locomotora e exploratória dos animais e o tempo explorando o centro e a periferia do aparato, com a finalidade de verificar atividade motora e parâmetros que possam indicar comportamentos do tipo ansioso. Este aparato consiste em uma arena quadrada (50 x 50 x 50 cm) sendo o assoalho dividido em 16 retângulos. Cada animal foi colocado delicadamente no campo aberto, podendo explorá-lo livremente por 5 minutos. Foram registrados o número de cruzamentos entre os retângulos e o número de *Rearings* (LAMPREA et al, 2008), assim como o tempo na periferia e na área central. A arena foi limpa com álcool 70% após cada rato ser retirado, para evitar interferências olfativas para que não haja interferências nos testes subsequentes (BONINI et al, 2006). A Tabela 8 identifica o N utilizado neste comportamento.

#### **Divisão e N por grupo no teste do campo aberto**

Grupo	Sexo	Nº animais
SM O3	MACHOS	18
SM OS	MACHOS	20
INT O3	MACHOS	23
INT OS	MACHOS	24
SM O3	FÊMEAS	36
SM OS	FÊMEAS	22
INT O3	FÊMEAS	27
INT OS	FÊMEAS	21

**Tabela 8**

#### **4.6.3 Claro – Escuro**

O teste claro/escuro, foi realizado no DPN 73. O aparato consiste em dois compartimentos, um deles escuro (21x16x25cm; iluminação: em torno de 25 Lux), e o outro compartimento é feito de Policloreto de Vinila (PVC) branco (21x30x25cm; iluminação: 300 Lux) conectados por uma pequena abertura. O animal foi colocado no centro do compartimento claro, e seu comportamento analisado durante 5 minutos. Avaliamos o tempo de permanência em cada ambiente e o número de vezes em que os animais realizavam transições entre os ambientes. Por serem os roedores animais noturnos, possuem preferência por ambientes com menor claridade. Permanências e transições para o ambiente claro podem ser consideradas como uma redução nos níveis de ansiedade (ARCEGO et al, 2013). A Tabela 9 identifica o N utilizado neste comportamento.

#### **Divisão e N por grupo no teste do Claro-Escuro**

Grupo	Sexo	Nº animais
SM O3	MACHOS	22
SM OS	MACHOS	20
INT O3	MACHOS	20
INT OS	MACHOS	23
SM O3	FÊMEAS	29

SM OS	FÊMEAS	25
INT O3	FÊMEAS	23
INT OS	FÊMEAS	30

**Tabela 9**

#### **4.6.4 Supressão da Alimentação pela Novidade (SAN)**

O teste da supressão da alimentação pela novidade foi baseado no modelo empregado por (ARCEGO et al, 2020), porém com adaptações realizadas por nosso grupo de pesquisa sendo realizado no DPN 76. O teste tem o objetivo de avaliar a latência em que os animais, após um período de restrição alimentar, iniciam o consumo de alimento a eles disponível em um ambiente novo e a quantidade que consumem. Todos os animais passaram por um período de restrição alimentar de 3 dias consecutivos, sendo o primeiro e o segundo dia com a respectiva dieta reduzida em 20%, e no terceiro dia em 80%, e na tarde do quarto dia, o teste foi realizado.

Antes do início da restrição alimentar, os animais foram habituados com um cereal, conhecido comercialmente como *Froot loops*®, e foi garantido que todos os animais tivessem acesso ao cereal por cinco dias consecutivos, após isso foi realizado o período de restrição alimentar e suspenso o oferecimento de *Froot loops* nas caixas/moradias. No dia do teste, os animais eram colocados em um aparato, em cujo centro havia 10 cereais, estes anteriormente, pesados pelos pesquisadores (o peso variava de 3,789g a 4,897g, balança analítica). O centro era iluminado a 150 Lux. Para que fosse possível mimetizar um ambiente de novidade foi utilizado o campo aberto redondo, confeccionado por Fibras de Média Densidade – MDF, com base de 90cm de diâmetro e 90cm de altura. Os animais que saíam do aparato eram isolados para que não tivessem contato com os animais que ainda não tinham passado pelo teste, para que estes não tivessem acesso ao odor ou a resquícios de alimento comumente presente nas vibrissas dos roedores. O teste tinha duração de 10 minutos (CHEE, MENARD, 2013). Antes da realização do teste do medo condicionado ao contexto, os animais foram deixados em período de repouso por 7 dias para que a restrição alimentar que vivenciaram na tarefa da supressão da alimentação pela novidade, não fosse um viés no próximo teste a ser realizado. A Tabela 10 identifica o N utilizado neste comportamento.

## Divisão e N por grupo no teste da Supressão da Alimentação pela Novidade

Grupo	Sexo	N° animais
SM O3	MACHOS	22
SM OS	MACHOS	21
INT O3	MACHOS	23
INT OS	MACHOS	20
SM O3	FÊMEAS	29
SM OS	FÊMEAS	26
INT O3	FÊMEAS	29
INT OS	FÊMEAS	23

**Tabela 10**

### 4.6.5 Medo Condicionado ao Contexto

A tarefa de condicionamento do medo, realizada no DPN 84, consistiu em expor o animal em uma câmara de Plexiglas iluminada (200 mm x 75 mm), tendo como piso uma grelha de barras de aço inoxidável com calibre 0,1 cm e espaçadas em 1,0 cm entre si (DIEHL et al, 2014) O teste foi realizado com 3 exposições dos animais ao mesmo contexto com um intervalo de 48 horas entre uma exposição e outra, a fim de garantir a consolidação da memória (TSE et al. 2007). No primeiro dia, sessão de treino, foi realizada a aplicação de dois períodos de choque de 0,6 mA nas patas dos animais, cada período possui 2 aplicações de choque, com intervalo de 2 segundos entre eles. Os animais permaneceram na caixa por um tempo de 4 minutos e foi contabilizado o comportamento de congelamento dos animais no minuto 1 e no minuto 4. O primeiro choque foi efetuado no minuto 2 e o segundo no minuto 2:30. No segundo dia, apenas a metade de cada grupo foi exposta novamente à câmara, com o objetivo de realizar a extinção da memória aversiva adquirida do primeiro dia de treino. Os animais permaneceram no ambiente por um período de 30 min, e foi contado a duração do comportamento de congelamento minuto a minuto. No terceiro dia de teste, todos os animais foram outra vez expostos ao ambiente em que houve a aquisição da memória aversiva por um período de 4 minutos, o comportamento de congelamento novamente foi verificado minuto a minuto. Foi após realizada a comparação entre o comportamento de congelamento pelos animais que passaram e os que não passaram pela

extinção. Esse comportamento (*freezing*) é definido como a cessação de todos os movimentos, com exceção dos movimentos relacionados à respiração e postura corporal, onde o animal permanece paralisado (McAllister et al, 1971). O comportamento de *freezing* foi usado como uma medida comportamental de defesa em resposta ao estímulo condicionado. A Tabela 11 identifica o N utilizado neste comportamento.

**Divisão e N por grupo no teste do medo condicionado ao contexto e LCE após a exposição ao choque**

<b>Grupo</b>	<b>Sexo</b>	<b>N° animais</b>
SM O3	MACHOS	24
SM OS	MACHOS	21
INT O3	MACHOS	20
INT OS	MACHOS	18
SM O3	FÊMEAS	26
SM OS	FÊMEAS	21
INT O3	FÊMEAS	24
INT OS	FÊMEAS	25

**Tabela 11**

**4.8.6 Labirinto em Cruz Elevado após o Medo Condicionado ao Contexto**

Considerando a hipótese de que a exposição ao estresse no início na vida promove maior sensibilidade ao estresse, facilitando o desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso na fase adulta, após a aplicação do choque nas patas para a tarefa do medo condicionado ao contexto, decidimos aplicar novamente o LCE para identificar traços do comportamento do tipo ansioso após a exposição ao medo condicionado.

Dessa forma, no DPN 91 foi realizado a tarefa do Labirinto em Cruz Elevado conforme descritos acima, (PELLOW, 1986; DA SILVA, et al,1996; FERNANDES, FILE, 1996; RECHET-SOUZA et al, 2007). Descrição na tabela 11.

## 4.7 Bioquímica

Para obtenção das amostras para as análises bioquímicas, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação. A eutanásia foi realizada por um pesquisador experiente e os encéfalos foram retirados e a amígdala dissecada. As medidas de função mitocondrial foram realizadas imediatamente, e para as demais avaliações bioquímicas as amostras foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

### 4.7.1 Neuroinflamação por Ensaio Imunoenzimático- ELISA

Fatias da amígdala foram homogeneizadas em solução tampão fosfato salino (PBS) contendo (em mM) 50 NaCl, 18  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 83  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.4, com 1 mM etilenoglicol-bis (2-aminoetiléter) -N, N, N' 1 mM, N'-ácido tetraacético (EGTA) e 1 mM fluoreto de fenilmetil-sulfonil 1 mM (PMSF), seguido de centrifugação a 1000 X g por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . As citocinas foram medidas em sobrenadantes por ELISA, usando kits comerciais (R&D Systems) para  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram expressos em pg/mg de proteína (VIZUETE et al, 2023).

#### Divisão e N por grupo na medida das Interleucinas 6, 1 $\beta$ e $\text{TNF}\alpha$

Grupos	Sexo	IL-6	IL-1 $\beta$	$\text{TNF}\alpha$
SM O3	Macho	5	5	5
SM OS	Macho	5	6	6
INT O3	Macho	7	7	7
INT OS	Macho	5	5	5
SM O3	Fêmeas	6	6	7
SM OS	Fêmeas	6	6	7
INT O3	Fêmeas	7	6	6
INT OS	Fêmeas	5	6	6

**Tabela 12**

#### **4.7.2 Atividade enzimática da Glutamina Sintetase (GS)**

Foi realizado o ensaio enzimático para glutamina sintetase (GS), conforme descrito anteriormente (Minet et al., 1997), com modificações. Brevemente, fatias da amígdala foram homogeneizadas em tampão imidazol 50 mM. Os homogeneizados foram então incubados com (mM): 50 imidazol 50 hidroxilamina 100 L-glutamina 25 arseniato de sódio dibásico heptahidratado, 0,2 ATP, 2 cloreto de manganês, pH 6,2 por 15 min a 37 °C. As reações foram finalizadas pela adição de 0,2 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,370 M, 200 ácido tricloroacético mM e HCl 670 mM. Após centrifugação, a absorbância do sobrenadante foi medida a 530 nm. A curva padrão do ácido  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. EUA) variou de 0,1 a 10 mmol/mL. A atividade de GS foi expressa como  $\mu\text{mol/h/mg}$  de proteína.

#### **4.7.3 Medida da GFAP**

O conteúdo da proteína glial fibrilar ácida- GFAP na amígdala foi medido por ELISA, como descrito anteriormente (TRAMONTINA et al., 2007). Amostras de tecido foram diluídas em tampão fosfato (70 ng de proteína total/100  $\mu\text{L}$  de amostra), e incubadas por 12-18h a 4 °C. Após serem lavados, os poços foram incubados com um anticorpo policlonal anti-GFAP (Dako, Carpinteria, CA, EUA) de coelho por 2 h, seguido de lavagem e nova incubação com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1 h, em temperatura ambiente. Após nova lavagem, a cor desenvolvida na reação com o-fenilenediamina (OPD) foi medida a 492 nm. A curva padrão da GFAP (Calbiochem, San Diego, CA, EUA) variou de 0,1 a 10 ng/mL. Dados foram expressos em ng/mg de proteína.

#### **4.7.4 Medida da S100B**

Para as medidas da proteína B de ligação ao cálcio, as fatias foram homogeneizadas em PBS com EGTA 1 mM e fenilmetilsulfonil-fluoreto (PMSF) 1 mM. Os conteúdos de S100B foram medidos por ELISA, conforme descrito anteriormente (LEITE et al., 2008). Resumidamente, 50  $\mu\text{L}$  de amostra e 50  $\mu\text{L}$  de tampão Tris foram incubados por 2 h em uma placa de microtitulação que foi previamente revestida com anti-S100B SH-B1 monoclonal

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. EUA). O anti-S100 policlonal (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi incubado durante 30 min e o anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase foi então adicionado durante mais 30 min. A reação de cor com OPD foi medida a 492 nm. A curva S100B padrão variou de 0,02 a 10 ng/mL. Os dados foram expressos em ng/mg de proteína.

#### **Divisão e N por grupo na medida das proteínas GS, GFAP e S100b**

<b>Grupos</b>	<b>Sexo</b>	<b>GS</b>	<b>GFAP</b>	<b>S100b</b>
SM O3	Macho	7	11	11
SM OS	Macho	7	8	8
INT O3	Macho	4	7	7
INT OS	Macho	5	7	7
SM O3	Fêmeas	8	6	6
SM OS	Fêmeas	6	7	7
INT O3	Fêmeas	6	8	8
INT OS	Fêmeas	7	9	9

**Tabela 13**

#### **4.7.5 Atividade Mitocondrial por citometria de fluxo**

Para citometria de fluxo, 30 mg de tecido fresco da amígdala foram dissociados com uma pipeta Pasteur em solução tamponada com fosfato. Foi usada uma solução (PBS) pH 7,4, contendo 1 mg% de colagenase IV e 0,5 mg% de DNase e centrifugado à 3000 rpm. O tecido dissociado foi filtrado, suspenso em PBS e depois incubado com sondas fluorescentes, usando MitoTracker® (Invitrogen®) verde (para massa mitocondrial) e vermelho (para potencial mitocondrial). Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra em um citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences). A intensidade da fluorescência foi registrada e analisada usando FlowJo®.

#### **Divisão e N por grupo na medida da Massa Mitocondrial Potencial Mitocondrial e Razão Mitocondrial de massa sobre potencial**

<b>Grupos</b>	<b>Sexo</b>	<b>Massa Mitocondrial</b>	<b>Potencial Mitocondrial</b>	<b>Razão</b>
SM O3	Macho	5	5	5
SM OS	Macho	6	6	6
INT O3	Macho	10	11	10
INT OS	Macho	6	6	6
SM O3	Fêmeas	9	9	9
SM OS	Fêmeas	11	11	11
INT O3	Fêmeas	11	11	10
INT OS	Fêmeas	6	6	6

**Tabela 14**

#### **4.7.6 Determinação de proteínas**

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método de Lowry por kit BCA Thermo Scientific para as citocinas IL-6, IL-1  $\beta$  e TNF $\alpha$ , assim como para GFAP e S100B como descrito em LOWRY et al., 1951).

#### **4.10 Análises Estatísticas**

Para as análises estatísticas foi utilizado o *software* SPSS IBM versão 21, estas ocorreram por ANOVA de três vias, considerando SM, dieta e sexo, considerando os aspectos de: Separação Materna, Dieta e Sexo. Após isso foi aplicado post-hoc de Tukey. O ciclo estral foi usado como co-variável. Diferenças foram consideradas significativas se  $p \leq 0,05$ . Foram utilizados ainda testes não-paramétricos para os comportamentos do Campo Aberto, Claro-Escuro, Supressão da alimentação pela novidade e Memória. Para os testes do Labirinto em Cruz Elevado e nas medidas bioquímicas foram utilizadas medidas paramétricas. As confecções dos gráficos foram a partir da utilização do *Software GraphPad/Prisma* versão 10.

## **5. RESULTADOS**

## 7. CONCLUSÃO

Ao longo deste trabalho foi possível identificar no teste do labirinto em cruz elevado, aumento do comportamento do tipo ansioso em animais SM em razão do tempo observado nos braços abertos, com um possível efeito do ômega-3 atenuando esse comportamento, contudo outros testes não mostraram o mesmo tipo de desfecho. Diferenças marcantes entre os sexos foram observadas em várias medidas, tanto na resposta a fatores comportamentais como também nas medidas bioquímicas. Essas diferenças são consistentes com descobertas da literatura científica em humanos e em estudos pré-clínicos. E concluímos ainda que nossos resultados sugerem que animais machos e fêmeas exibem expressões significativamente diferentes de comportamento ansioso em testes comportamentais. Além disso, a dieta acrescida com ômega-3 parece ter efeitos variados no comportamento do tipo ansioso em diferentes testes.

As medições de citocinas inflamatórias na amígdala revelaram interações complexas entre sexo, estresse materno e dieta. Surpreendentemente, machos que receberam a dieta acrescida em ômega-3 mostraram níveis mais elevados de citocinas inflamatórias. As análises da função mitocondrial indicaram uma redução na massa mitocondrial na amígdala de machos submetidos ao estresse materno precoce e alimentados com a dieta acrescida ômega-3. A funcionalidade mitocondrial, no entanto, não foi afetada, e hipotetizamos que este evento esteja relacionado com mitofagia ou simplesmente redução da mitogênese. Os marcadores de astrócitos, como a atividade da glutamina-sintetase e os níveis de S100B, mostraram aumentos em resposta ao estresse materno precoce e à dieta acrescida com ômega-3, sugerindo possíveis implicações nos processos de regulação do metabolismo e do neurotransmissor.

Desta forma, nossos dados expressam a importância de considerar as diferenças entre os sexos ao investigar parâmetros comportamentais, bioquímicos e fisiológicos em roedores submetidos a estresse materno precoce e efeitos diferentes dietas. As descobertas indicam complexas interações entre estresse, dieta e sexo, fornecendo insights valiosos para a compreensão dos mecanismos subjacentes aos transtornos de ansiedade e dos efeitos do ômega-3 nessas condições, e sugerem cautela no uso de dieta enriquecida em ômega-3, pois, a despeito de sólidas evidências quanto a seu uso em situações de neuroinflamação, observa-se que, em

animais com história de adversidades precoces, particularmente nos machos, tal dieta pode não ser benéfica.

Esta pesquisa buscou diferentes fatores relacionados ao comportamento do tipo ansioso, tanto na aplicação de diversos testes comportamentais, como na verificação de possibilidade inflamatória no tecido neuronal da amígdala considerando os principais marcadores inflamatórios, função mitocondrial e mensuração da atividade dos astrócitos, identificando pelo menos três importantes marcadores destes, e ainda tais mensurações foram realizadas em ambos os sexos. Contudo, destacamos ainda que mais pesquisas são necessárias para compreender de forma mais ampla essas interações e seus impactos no comportamento do tipo ansioso.

## **8. PERSPECTIVAS**

Considerando os efeitos inflamatórios identificados tanto na expressão das citocinas pró-inflamatórias como na atividade dos astrócidos, em machos que consumiam dieta acrescida com ômega-3, acreditamos ser interessante tentar identificar os fatores responsáveis por tais efeitos especificamente em machos, e ainda identificar se as alterações na massa mitocondrial sejam fruto de mitofagia.

Uma vez que nossos dados possuem expressão significativa de inflamação, também julgamos ser necessário identificar as espécies reativas de oxigênio e as principais enzimas relacionadas, tais como: catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase.

## 9. REFERÊNCIAS

- ALBRECHET-SOUZA, Lucas et al. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 267-273, 2007.
- AL JOWF, Ghazi I. et al. A public health perspective of post-traumatic stress disorder. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 11, p. 6474, 2022.
- AUGUST, Pauline Maciel et al. Maternal polyphenol intake impairs cerebellar redox homeostasis in newborn rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 2066-2076, 2022.
- ARAYA-CALLÍS, Carolina et al. Chronic psychosocial stress and citalopram modulate the expression of the glial proteins GFAP and NDRG2 in the hippocampus. **Psychopharmacology**, v. 224, p. 209-222, 2012.
- ALVES, Joelma et al. Effects of early life adversities upon memory processes and cognition in rodent models. **Neuroscience**, v. 497, p. 282-307, 2022.
- ALSHULER LL, ABULSEOUT OA, FOLAND-ROSS L, et al. Amygdala astrocyte reduction in subjects with major depressive disorder but not bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2010;12:541–9.
- ARCEGO, Danusa Mar et al. Stress during the pre-pubertal period leads to long-term diet-dependent changes in anxiety-like behavior and in oxidative stress parameters in male adult rats. **Neurochemical research**, v. 38, n. 9, p. 1791-1800, 2013.
- ARCEGO, Danusa Mar et al. Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: Interplay of these factors changes these effects. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 50, p. 16-25, 2016.
- ARCEGO, Danusa Mar et al. Chronic high-fat diet affects food-motivated behavior and hedonic systems in the nucleus accumbens of male rats. **Appetite**, v. 153, p. 104739, 2020.
- BAI, Renren et al. Discovery of natural anti-inflammatory alkaloids: Potential leads for the drug discovery for the treatment of inflammation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 213, p. 113165, 2021.
- BAS-HOOGENDAM, Janna Marie et al. Amygdala hyperreactivity to faces conditioned with a social-evaluative meaning—a multiplex, multigenerational fMRI study on social anxiety endophenotypes. **NeuroImage: Clinical**, v. 26, p. 102247, 2020.
- BANDOLI, Gretchen et al. Childhood adversity, adult stress, and the risk of major depression or generalized anxiety disorder in US soldiers: a test of the stress sensitization hypothesis. **Psychological medicine**, v. 47, n. 13, p. 2379-2392, 2017.
- BAGGA, Dilprit et al. Differential effects of prostaglandin derived from  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 4, p. 1751-1756, 2003.
- BARTLETT, Andrew A.; SINGH, Rumani; HUNTER, Richard G. Anxiety and epigenetics. *Neuroepigenomics in Aging and Disease*, p. 145-166, 2017.
- BEAR, Mark F.; CONNORS, Barry W.; PARADISO, Michael A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. Artmed editora, 2017.
- BERNARDI, Paolo. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. **Physiological reviews**, v. 79, n. 4, p. 1127-1155, 1999.

BHATT, Deepak L.; BUDOFF, Matthew J.; MASON, R. Preston. A revolution in omega-3 fatty acid research. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 76, n. 18, p. 2098-2101, 2020.

BLAIR, Clancy; RAVER, C. Cybele. Poverty, stress, and brain development: New directions for prevention and intervention. **Academic pediatrics**, v. 16, n. 3, p. S30-S36, 2016.

BONINI, J. S. et al. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. **Hormones and Behavior**, v. 50, n. 2, p. 308–313, 1 ago. 2006.

BOURRE, J. M. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. **J Nutr**, v. 8, p. 163-174, 2004.

BOWLEY, Michael P. et al. Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. **Biological psychiatry**, v. 52, n. 5, p. 404-412, 2002.

BRODIE, Chaya et al. Differential role of specific PKC isoforms in the proliferation of glial cells and the expression of the astrocytic markers GFAP and glutamine synthetase. **Molecular brain research**, v. 56, n. 1-2, p. 108-117, 1998.

BUSCHERT, Jens et al. S100B overexpression increases behavioral and neural plasticity in response to the social environment during adolescence. **Journal of psychiatric research**, v. 47, n. 11, p. 1791-1799, 2013.

BURROUGHES, Stephanie; FRENCH, Denise. Depression and anxiety: role of mitochondria. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 18, n. 1, p. 34-41, 2007.

CASTELLANI, Giulia et al. Transforming the understanding of brain immunity. **Science**, v. 380, n. 6640, p. eabo7649, 2023.

CHABY, Lauren E.; ZHANG, Li; LIBERZON, Israel. The effects of stress in early life and adolescence on posttraumatic stress disorder, depression, and anxiety symptomatology in adulthood. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 14, p. 86-93, 2017.

CALDER, Philip C. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. **Clinical science**, v. 107, n. 1, p. 1-11, 2004.

CALDER, Philip C. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 8, p. 885-897, 2008.

CALDER, Philip C.; YAQOOB, Parveen. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Postgraduate medicine**, v. 121, n. 6, p. 148-157, 2009.

CHABY, Lauren E.; ZHANG, Li; LIBERZON, Israel. The effects of stress in early life and adolescence on posttraumatic stress disorder, depression, and anxiety symptomatology in adulthood. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 14, p. 86-93, 2017.

CHAMPAGNE, Frances A. Early adversity and developmental outcomes: Interaction between genetics, epigenetics, and social experiences across the life span. **Perspectives on Psychological Science**, v. 5, n. 5, p. 564-574, 2010.

CHEE, San-San A.; MENARD, Janet L. The histaminergic H1, H2, and H3 receptors of the lateral septum differentially mediate the anxiolytic-like effects of histamine on rats' defensive behaviors in the elevated plus maze and novelty-induced suppression of feeding paradigm. **Physiology & behavior**, v. 116, p. 66-74, 2013.

CHEW, Emily Y. et al. Effect of omega-3 fatty acids, lutein/zeaxanthin, or other nutrient supplementation on cognitive function: the AREDS2 randomized clinical trial. **Jama**, v. 314, n. 8, p. 791-801, 2015.

CHTOUROU, Yassine et al. Naringenin mitigates iron-induced anxiety-like behavioral impairment, mitochondrial dysfunctions, ectonucleotidases and acetylcholinesterase alteration activities in rat hippocampus. **Neurochemical Research**, v. 40, p. 1563-1575, 2015.

DANIELS, W. M. U. et al. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH

response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. **Metabolic brain disease**, v. 19, n. 1, p. 3-14, 2004.

CHUNG, Fan et al. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon- $\gamma$ . **Mediators of inflammation**, v. 10, p. 51-59, 2001.

DA SILVA, Nelci Lopes et al. Individual housing from rearing modifies the performance of young rats on the elevated plus-maze apparatus. **Physiology & Behavior**, v. 60, n. 6, p. 1391-1396, 1996.

DE LIMA, Randriely Merscher Sobreira et al. Early life stress and the programming of eating behavior and anxiety: Sex-specific relationships with serotonergic activity and hypothalamic neuropeptides. **Behavioural brain research**, v. 379, p. 112399, 2020.

DE LIMA MARCOLIN, Marina et al. Effects of early life interventions and palatable diet on anxiety and on oxidative stress in young rats. **Physiology & behavior**, v. 106, n. 4, p. 491-498, 2012.

DE PEDRAZA, Pablo; GUZI, Martin; TIJDENS, Kea. **Life Dissatisfaction and Anxiety in COVID-19 pandemic**. MUNI ECON Working Paper, 2020.

DEVAN, S.; JANARDHANAM, V. A. Effect of Naringenin on metabolic markers, lipid profile and expression of GFAP in C6 glioma cells implanted rat's brain. **Annals of Neurosciences**, v. 18, n. 4, p. 151, 2011.

DG, Nicholls. Mitochondria and neuronal survival. **Physiol Rev**, v. 80, p. 315-360, 2000.

DIEHL, Luisa A. et al. Contextual fear conditioning in maternal separated rats: the amygdala as a site for alterations. **Neurochemical research**, v. 39, n. 2, p. 384-393, 2014.

DIEHL, Luisa Amalia et al. Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. **Brain research**, v. 1144, p. 107-116, 2007.

DINCHEVA I, YANG J, LI A, et al.,. Effect of Early-Life Fluoxetine on Anxiety-Like Behaviors in BDNF Val66Met Mice. *Am J Psychiatry*. 2017 Dec 1;174(12):1203-1213. doi: 10.1176/appi.ajp.2017.15121592. Epub 2017 Oct 31. PMID: 29084453; PMCID: PMC5711544.

DSM -5 –TR- Editora: **Artmed Editora LTDA**, Edição: **5**, Local de Publicação: Porto Alegre, Ano de Publicação: 2023.

DYCK, Richard H. et al. Enhanced epileptogenesis in S100B knockout mice. **Molecular brain research**, v. 106, n. 1-2, p. 22-29, 2002.

DONNER, Nina C.; LOWRY, Christopher A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 465, p. 601-626, 2013.

ENGLUND, Jonas et al. Downregulation of kainate receptors regulating GABAergic transmission in amygdala after early life stress is associated with anxiety-like behavior in rodents. **Translational psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021.

ERHAMWILDA, Erhamwilda; AFRIANTI, Nurul. Analysis on Early Childhood Sexual Abuse and the Implications in Islamic Education. **Jurnal Pendidikan Islam UIN Sunan Gunung Djati**, v. 2, n. 1, p. 105-126, 2016.

ENG, Lawrence F.; GHIRNIKAR, Roopa S. GFAP and astrogliosis. **Brain pathology**, v. 4, n. 3, p. 229-237, 1994.

HEIM, Christine M.; ENTRINGER, Sonja; BUSS, Claudia. Translating basic research knowledge on the biological embedding of early-life stress into novel approaches for the developmental programming of lifelong health. **Psychoneuroendocrinology**, v. 105, p. 123-137, 2019.

KUHLMAN, Kate Ryan et al. Developmental psychoneuroendocrine and psychoneuroimmune pathways from childhood adversity to disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 80, p. 166-184, 2017.

FERNANDES, Cathy; FILE, Sandra E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 31-40, 1996.

FERREIRA, Charles Francisco et al. Mitochondrial and oxidative stress aspects in hippocampus of rats submitted to dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency after exposure to early stress. **Neurochemical research**, v. 40, p. 1870-1881, 2015.

FINKELSTEIN, Harris. The long-term effects of early parent death: A review. **Journal of Clinical Psychology**, v. 44, n. 1, p. 3-9, 1988.

FREEMAN, Marlene P. et al. " Omega-3 fatty acids: Evidence basis for treatment and future research in psychiatry": Correction. 2007.

FRIEDMAN, Esther M. et al. Early life adversity and adult biological risk profiles. **Psychosomatic medicine**, v. 77, n. 2, p. 176-185, 2015.

FRYE, C. A.; PETRALIA, S. M.; RHODES, M. E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 3, p. 587–596, nov. 2000.

FOUNTAIN, Emily D. et al. Effects of diets enriched in omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids on offspring sex-ratio and maternal behavior in mice. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 2, p. 211-217, 2008.

GALLER, Janina; RABINOWITZ, Danielle Galler. The intergenerational effects of early adversity. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 128, p. 177-198, 2014.

GINHOUX, Florent et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 841-845, 2010.

GRIMM, Simone et al. Early life stress modulates oxytocin effects on limbic system during acute psychosocial stress. **Social cognitive and affective neuroscience**, v. 9, n. 11, p. 1828-1835, 2014.

GONÇALVES, Carlos-Alberto; LEITE, Marina Concli; NARDIN, Patrícia. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clinical biochemistry**, v. 41, n. 10-11, p. 755-763, 2008.

GOSSELIN, R.-D. et al. Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression. **Neuroscience**, v. 159, n. 2, p. 915-925, 2009.

INNIS, Sheila M. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 4, p. 855-859, 2007.

IVENS, Sebastian et al. Persistent increase in ventral hippocampal long-term potentiation by juvenile stress: a role for astrocytic glutamine synthetase. **Glia**, v. 67, n. 12, p. 2279-2293, 2019.

IZQUIERDO, Ivan; FURINI, Cristiane RG; MYSKIW, Jociane C. Fear memory. **Physiological reviews**, v. 96, n. 2, p. 695-750, 2016.

JAYAKUMAR, Arumugam R.; NORENBERG, Michael D. Glutamine synthetase: role in neurological disorders. **The glutamate/GABA-glutamine cycle: Amino acid neurotransmitter homeostasis**, p. 327-350, 2016.

HANSEL, Gisele. Avaliação de parâmetros neuroquímicos em fatias de hipocampo de rato submetidas à privação de oxigênio e glicose, 2009.

HARNACK, Kerstin; ANDERSEN, Gaby; SOMOZA, Veronika. Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids. **Nutrition & metabolism**, v. 6, p. 1-11, 2009.

HELLAND, Ingrid B. et al. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. **Pediatrics**, v. 111, n. 1, p. e39-e44, 2003.

HERTZ, Leif. The glutamate–glutamine (GABA) cycle: importance of late postnatal development and potential reciprocal interactions between biosynthesis and degradation. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, p. 51460, 2013.

HOLLIS, Fiona et al. Mitochondrial function in the brain links anxiety with social subordination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 50, p. 15486-15491, 2015.

KADRI, Nadia et al. Prevalence of anxiety disorders: a population-based epidemiological study in metropolitan area of Casablanca, Morocco. **Annals of General Psychiatry**, v. 6, p. 1-6, 2007.

KEMPURAJ, D. et al. Neuroinflammation induces neurodegeneration. **Journal of neurology, neurosurgery and spine**, v. 1, n. 1, 2016.

KESSLER, Ronald C. et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of general psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 593-602, 2005.

KIOUKIA-FOUGIA N, et al., Z. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p. 823-30, 2002.

KOENIGS, Michael; GRAFMAN, Jordan. Posttraumatic stress disorder: the role of medial prefrontal cortex and amygdala. **The Neuroscientist**, v. 15, n. 5, p. 540-548, 2009.

LAMPREA, M. R. et al. Thigmotactic responses in an open-field. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 135-140, 2008.

LAMPRECHT, Raphael et al. Fear conditioning induces distinct patterns of gene expression in lateral amygdala. **Genes, Brain and Behavior**, v. 8, n. 8, p. 735-743, 2009.

LEDOUX, Joseph E. The amygdala: contributions to fear and stress. In: **Seminars in Neuroscience**. Academic Press, 1994.

LEDOUX, Joseph E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155-184, 2000.

LEDOUX, Joseph. The amygdala. **Current biology**, v. 17, n. 20, p. R868-R874, 2007.

LEDOUX, Joseph E.; PINE, Daniel S. Using neuroscience to help understand fear and anxiety: a two-system framework. **American journal of psychiatry**, v. 173, n. 11, p. 1083-1093, 2016.

LEUSSIS, Melanie P. et al. Depressive-like behavior in adolescents after maternal separation: sex differences, controllability, and GABA. **Developmental neuroscience**, v. 34, n. 2-3, p. 210-217, 2012.

LEITE, Marina Concli et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 93-99, 2008.

LIMA, D. P. et al. Quality of life and neuropsychological changes in mild head trauma. Late analysis and correlation with S100B protein and cranial CT scan performed at hospital admission. **Injury**, v. 39, n. 5, p. 604-611, 2008.

LIPPARD, Elizabeth TC; NEMEROFF, Charles B. The devastating clinical consequences of child abuse and neglect: increased disease vulnerability and poor treatment response in mood disorders. **American journal of psychiatry**, v. 177, n. 1, p. 20-36, 2020.

LIU, Lin-Lin et al. Sex differences in depressive-like behaviour may relate to imbalance of microglia activation in the hippocampus. **Brain, behavior, and immunity**, v. 81, p. 188-197, 2019.

LUHESHI, Nadia M. et al. Sphingosine regulates the NLRP3-inflammasome and IL-1 $\beta$  release from macrophages. **European journal of immunology**, v. 42, n. 3, p. 716-725, 2012.

LUZ, Gabrielle da et al. Suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 reduz marcadores inflamatórios e melhora a ação da insulina em fígado de camundongos. **Revista de Nutrição**, v. 25, p. 621-629, 2012.

MARANGONI, Ciro; HERNANDEZ, Mariely; FAEDDA, Gianni L. The role of environmental exposures as risk factors for bipolar disorder: a systematic review of longitudinal studies. **Journal of affective disorders**, v. 193, p. 165-174, 2016.

MARCONDES, F. K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology and Behavior**, v. 74, n. 4-5, p. 435-440, 12 nov. 2001.

MANSARA, Prakash et al. Improved antioxidant status by omega-3 fatty acid supplementation in breast cancer patients undergoing chemotherapy: a case series. **Journal of medical case reports**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2015.

MANZARI, Nicla et al. Prenatal maternal stress and risk of neurodevelopmental disorders in the offspring: a systematic review and meta-analysis. **Social psychiatry and psychiatric epidemiology**, v. 54, p. 1299-1309, 2019.

MARCONDES, Fernanda Klein et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & behavior**, v. 74, n. 4-5, p. 435-440, 2001.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.

MARSLAND, Anna L. et al. The effects of acute psychological stress on circulating and stimulated inflammatory markers: a systematic review and meta-analysis. **Brain, behavior, and immunity**, v. 64, p. 208-219, 2017.

McAllister WR, McAllister DE (1971) Behavioral measurement of conditioned fear in Aversive Conditioning and Learning, FR Brush (ed) Academic Press, New York, NY, p 105-179.

MCCARTHY, Margaret M. Estradiol and the developing brain. **Physiological reviews**, v. 88, n. 1, p. 91-134, 2008.

MEYER, Peter-Wolfgang et al. Heart rate variability in patients with post-traumatic stress disorder or borderline personality disorder: relationship to early life maltreatment. **Journal of Neural Transmission**, v. 123, p. 1107-1118, 2016.

MINET, R. et al. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. **Clinica chimica acta**, v. 268, n. 1-2, p. 121-132, 1997.

MORI, Trevor A.; BEILIN, Lawrence J. Omega-3 fatty acids and inflammation. **Current atherosclerosis reports**, v. 6, n. 6, p. 461-467, 2004.

MULDOON, Matthew F. et al. Serum phospholipid docosahexaenonic acid is associated with cognitive functioning during middle adulthood. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 4, p. 848-853, 2010.

MUSCATELL, Keely A. et al. Greater amygdala activity and dorsomedial prefrontal-amygdala coupling are associated with enhanced inflammatory responses to stress. **Brain, behavior, and immunity**, v. 43, p. 46-53, 2015.

NELSON, David L.; COX, Michael M. Leninger princípios de bioquímica. In: **Leninger princípios de bioquímica**. 2002. p. 975-975.

NELSON, Charles A.; GABARD-DURNAM, Laurel J. Early adversity and critical periods: neurodevelopmental consequences of violating the expectable environment. **Trends in neurosciences**, v. 43, n. 3, p. 133-143, 2020.

NEWMAN, Eric A. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. **Trends in neurosciences**, v. 26, n. 10, p. 536-542, 2003.

NUNES et al. Produção e consumo de óleos de soja no Brasil. Departamento de estudos socio-econômicos rurais (Deser), n. 159. Available from: <http://www.deser.org.br/documentos/doc/SP.2007>.

O'DONOVAN, Aoife et al. Clinical anxiety, cortisol and interleukin-6: Evidence for specificity in emotion–biology relationships. **Brain, behavior, and immunity**, v. 24, n. 7, p. 1074-1077, 2010.

PASCUAL, María et al. Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. **Neuropharmacology**, v. 89, p. 352-359, 2015.

PATEL, Ankur; SIEGEL, Allan; ZALCMAN, Steven S. Lack of aggression and anxiolytic-like behavior in TNF receptor (TNF-R1 and TNF-R2) deficient mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 24, n. 8, p. 1276-1280, 2010.

PATEL, D. et al. Repeated social stress leads to contrasting patterns of structural plasticity in the amygdala and hippocampus. **Behavioural brain research**, v. 347, p. 314-324, 2018.

PEET, Malcolm et al. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. **Biological psychiatry**, v. 43, n. 5, p. 315-319, 1998.

POGGI, Giulia; ALBIEZ, Jamie; PRYCE, Christopher R. Effects of chronic social stress on oligodendrocyte proliferation-maturation and myelin status in prefrontal cortex and amygdala in adult mice. **Neurobiology of Stress**, v. 18, p. 100451, 2022.

POWER, Ann E.; MCGAUGH, James L. Cholinergic activation of the basolateral amygdala regulates unlearned freezing behavior in rats. **Behavioural brain research**, v. 134, n. 1-2, p. 307-315, 2002.

PURVES, Dale et al. **Principles of cognitive neuroscience**. Sunderland: Sinauer Associates, 2013.

QUEVEDO, João; IZQUIERDO, Ivan. **Neurobiologia dos transtornos psiquiátricos**. Artmed Editora, 2019.

RADLEY, Jason J.; MORRISON, John H. Repeated stress and structural plasticity in the brain. **Ageing research reviews**, v. 4, n. 2, p. 271-287, 2005.

RASAEI, Niloufar et al. Investigation of the interaction between Genetic Risk Score (GRS) and fatty acid quality indices on mental health among overweight and obese women. **BMC Women's Health**, v. 23, n. 1, p. 413, 2023.

ROSSI, Silvia et al. Neuroinflammation drives anxiety and depression in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Neurology**, v. 89, n. 13, p. 1338-1347, 2017.

RAJKOWSKA, Grazyna; A STOCKMEIER, Craig. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. **Current drug targets**, v. 14, n. 11, p. 1225-1236, 2013.

ROQUE, Susana et al. The behavioral and immunological impact of maternal separation: a matter of timing. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, p. 192, 2014.

SALINAS, J. A. et al. Posttraining intraamygdala infusions of oxotremorine and propranolol modulate storage of memory for reductions in reward magnitude. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, n. 1, p. 51–59, 1997.

SALIM, Samina; CHUGH, Gaurav; ASGHAR, Mohammad. Inflammation in anxiety. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 88, p. 1-25, 2012

SAPOLSKY, Robert M.; ROMERO, L. Michael; MUNCK, Allan U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000.

SCHÄFFER, Michael et al. Regulation of nitric oxide synthesis in wounds by IFN- $\gamma$  depends on TNF- $\alpha$ . **Journal of Investigative Surgery**, v. 19, n. 6, p. 371-379, 2006.

SELYE, Hans. **The Stress of life**, rev. McGraw Hill, 1978.

SHALEV, Arieh Y. Posttraumatic stress disorder and stress-related disorders. **Psychiatric Clinics**, v. 32, n. 3, p. 687-704, 2009

SIMEN, Birgitte B. et al. TNF $\alpha$  signaling in depression and anxiety: behavioral consequences of individual receptor targeting. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 9, p. 775-785, 2006.

SILVEIRA, P. P. et al. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 111–118, 2010.

TERLING, Peter. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. **Handbook of life stress, cognition and health**, 1988.

SINCLAIR, A. J. Long-chain polyunsaturated fatty acids in the mammalian brain. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 34, n. 3, p. 287-291, 1975.

SUAREZ, I.; BODEGA, G.; FERNANDEZ, B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. **Neurochemistry international**, v. 41, n. 2-3, p. 123-142, 2002.

SZEWCZYK, Adam; WOJTCZAK, Lech. Mitochondria as a pharmacological target. **Pharmacological reviews**, v. 54, n. 1, p. 101-127, 2002.

TRAMONTINA, Francine et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 282-286, 2007.

TORRES-BERRÍO, Angélica et al. Unraveling the epigenetic landscape of depression: focus on early life stress. **Dialogues in clinical neuroscience**, 2022.

TOUFEXIS, D. Region-and sex-specific modulation of anxiety behaviours in the rat. **Journal of neuroendocrinology**, v. 19, n. 6, p. 461-473, 2007.

TROUBAT, Romain et al. Neuroinflammation and depression: A review. **European journal of neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 151-171, 2021.

TSE, Dorothy et al. Schemas and memory consolidation. **Science**, v. 316, n. 5821, p. 76-82, 2007.

USHIO, Soichiro et al. Os efeitos ansiolíticos do hochuekkito em camundongos tratados com lipopolissacarídeo envolvem a inibição da interleucina-6. **Fronteiras em Farmacologia**, v. 13, p. 890048, 2022.

VASILADIS, Helen-Maria et al. Sex differences in anxiety disorders in older adults. **Current Psychiatry Reports**, v. 22, p. 1-9, 2020.

VIZUETE, Adriana Fernanda K. et al. Arundic acid (ONO-2506) downregulates neuroinflammation and astrocyte dysfunction after status epilepticus in young rats induced by

Li-pilocarpine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 123, p. 110704, 2023.

WANG, Qixue et al. Brain mitochondrial dysfunction: A possible mechanism links early life anxiety to Alzheimer's Disease in later life. **Aging and Disease**, v. 13, n. 4, p. 1127, 2022.

WAHIS, Jérôme et al. Astrocytes mediate the effect of oxytocin in the central amygdala on neuronal activity and affective states in rodents. **Nature neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 529-541, 2021.

WEI, Yali et al. The effects of low-ratio n-6/n-3 PUFA on biomarkers of inflammation: A systematic review and meta-analysis. **Food & function**, v. 12, n. 1, p. 30-40, 2021.

WILL CC, AIRD F, REDEI EE. Selectively bred Wistar-Kyoto rats: an animal model of depression and hyper-responsiveness to antidepressants. *Mol Psychiatry*. 2003;8:925–32.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. World Health Organization, 2017.

YAN, Yiqing et al. Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1154-1163, 2013.

YIRMIYA, R. et al. Illness, cytokines, and depression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, n. 1, p. 478-487, 2000.

YARDAN, Turker et al. Usefulness of S100B protein in neurological disorders. **JPMA-Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 61, n. 3, p. 276, 2011.

ZATTI, Cleonice et al. Childhood trauma and suicide attempt: A meta-analysis of longitudinal studies from the last decade. **Psychiatry research**, v. 256, p. 353-358, 2017.

ZHANG, Wen-Hua et al. Amygdala circuit substrates for stress adaptation and adversity. **Biological psychiatry**, v. 89, n. 9, p. 847-856, 2021.

**Anexo 1 - Resultados dos testes estatísticos. Efeitos significativos são relatados no texto da Dissertação. Efeitos não significativos, com seus respectivos graus de liberdade e valores de F e P são mostrados na tabela abaixo.**

<b>Labirinto em Cruz Elevado</b>				
<b>Fator</b>	<b>Variável</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Sexo</b>	<b>Braços abertos</b>	<b>1,179</b>	<b>2,779</b>	<b>0,097</b>
	<b>SAP</b>	<b>1,179</b>	<b>1,373</b>	<b>0,243</b>
<b>Dieta</b>	<b>Braços aberto</b>	<b>1,179</b>	<b>0,007</b>	<b>0,691</b>
	<b>Rearings</b>	<b>11,179</b>	<b>0,158</b>	<b>0,751</b>
	<b>HD</b>	<b>1,179</b>	<b>0,101</b>	<b>0,441</b>
	<b>SAP</b>	<b>1,179</b>	<b>0,864</b>	<b>0, 354</b>
<b>SM</b>	<b>Braços abertos</b>	<b>1,179</b>	<b>0,596</b>	<b>0,441</b>
	<b>HD</b>	<b>1,179</b>	<b>0,964</b>	<b>0,354</b>
<b>Sexo x Dieta</b>	<b>Braços abertos</b>	<b>1,179</b>	<b>0,399</b>	<b>0,528</b>
	<b>Rearings</b>	<b>1,179</b>	<b>1,226</b>	<b>0,270</b>
	<b>HD</b>	<b>1,179</b>	<b>1,825</b>	<b>0,178</b>
	<b>SAP</b>	<b>1,179</b>	<b>0,054</b>	<b>0,816</b>
<b>Sexo x SM</b>	<b>Braços abertos</b>	<b>1,179</b>	<b>0,404</b>	<b>0,526</b>
	<b>Rearings</b>	<b>1,179</b>	<b>0,054</b>	<b>0,817</b>
	<b>HD</b>	<b>1,179</b>	<b>1,195</b>	<b>0,276</b>

	<b>SAP</b>	<b>1,179</b>	<b>2,157</b>	<b>0,144</b>
<b>Dieta x SM</b>	<b>Rearings</b>	<b>1,179</b>	<b>0,209</b>	<b>0,648</b>
	<b>HD</b>	<b>1,179</b>	<b>0,235</b>	<b>0,629</b>
	<b>SAP</b>	<b>1,179</b>	<b>0,612</b>	<b>0,435</b>
<b>Sexo x Dieta x SM</b>	<b>Braço Aberto</b>	<b>1,179</b>	<b>0,000</b>	<b>0,986</b>
	<b>Rearings</b>	<b>1,179</b>	<b>2,723</b>	<b>0,101</b>
	<b>HD</b>	<b>1,179</b>	<b>0,009</b>	<b>0,905</b>
	<b>SAP</b>	<b>1,179</b>	<b>0,018</b>	<b>0,892</b>

<b>Campo Aberto</b>				
<b>Fator</b>	<b>Variável</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Dieta</b>	<b>Rearings</b>	<b>1,182</b>	<b>0,001</b>	<b>0,976</b>
	<b>Tempo periferia</b>	<b>1,182</b>	<b>3,584</b>	<b>0,060</b>
	<b>Tempo centro</b>	<b>1,182</b>	<b>3,541</b>	<b>0,061</b>
	<b>Crossings</b>	<b>1,182</b>	<b>0,283</b>	<b>0,595</b>
<b>Sexo</b>	<b>Tempo periferia</b>	<b>1,182</b>	<b>3,030</b>	<b>0,083</b>
	<b>Tempo centro</b>	<b>1,182</b>	<b>2,991</b>	<b>0,085</b>
<b>SM</b>	<b>Rearings</b>	<b>1,182</b>	<b>0,947</b>	<b>0,332</b>
	<b>Tempo centro</b>	<b>1,182</b>	<b>2,071</b>	<b>0,152</b>

	<b>Tempo periferia</b>	<b>1,182</b>	<b>2,100</b>	<b>0,149</b>
	<b>Crossings</b>	<b>1,182</b>	<b>0,829</b>	<b>0,364</b>
<b>Dieta x Sexo</b>	<b>Rearings</b>	<b>1,182</b>	<b>0,52</b>	<b>0,820</b>
	<b>Tempo na Periferia</b>	<b>1,182</b>	<b>1,733</b>	<b>0,190</b>
	<b>Tempo Centro</b>	<b>1,182</b>	<b>1,704</b>	<b>0,193</b>
	<b>Crossings</b>	<b>1,182</b>	<b>1,701</b>	<b>0,194</b>
<b>Dieta x SM</b>	<b>Tempo na Periferia</b>	<b>1,182</b>	<b>0,002</b>	<b>0,965</b>
	<b>Tempo Centro</b>	<b>1,182</b>	<b>0,001</b>	<b>0,973</b>
	<b>Crossings</b>	<b>1,182</b>	<b>0,013</b>	<b>0,908</b>
<b>Sexo x SM</b>	<b>Rearings</b>	<b>1,182</b>	<b>0,393</b>	<b>0,531</b>
	<b>Crossings</b>	<b>1,182</b>	<b>0,611</b>	<b>0,435</b>
<b>Dieta x Sexo x SM</b>	<b>Rearings</b>	<b>1,182</b>	<b>2,321</b>	<b>0,129</b>
	<b>Tempo na Periferia</b>	<b>1,182</b>	<b>0,868</b>	<b>0,353</b>
	<b>Tempo Centro</b>	<b>1,182</b>	<b>0,848</b>	<b>0,358</b>
	<b>Crossings</b>	<b>1,182</b>	<b>3,480</b>	<b>0,064</b>

<b>Fator</b>	<b>Variável</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>SM</b>	<b>Tempo no escuro</b>	<b>1,176</b>	<b>0,824</b>	<b>0,365</b>
	<b>Tempo no claro</b>	<b>1,176</b>	<b>0,837</b>	<b>0,361</b>
	<b>Passagens</b>	<b>1,176</b>	<b>3,287</b>	<b>0,72</b>

<b>Dieta</b>	<b>Tempo no escuro</b>	<b>1,176</b>	<b>3,177</b>	<b>0,76</b>
	<b>Tempo no Claro</b>	<b>1,176</b>	<b>3,163</b>	<b>0,77</b>
<b>SM x Dieta</b>	<b>Tempo no escuro</b>	<b>1,176</b>	<b>0,09</b>	<b>0,923</b>
	<b>Tempo no claro</b>	<b>1,176</b>	<b>0,10</b>	<b>0,921</b>
<b>SM x Sexo</b>	<b>Tempo no escuro</b>	<b>1,176</b>	<b>2,101</b>	<b>0,149</b>
	<b>Tempo no claro</b>	<b>1,176</b>	<b>2,122</b>	<b>0,147</b>
<b>Dieta x Sexo</b>	<b>Tempo no escuro</b>	<b>1,176</b>	<b>0,283</b>	<b>0,595</b>
	<b>Tempo no Claro</b>	<b>1,176</b>	<b>0,280</b>	<b>0,597</b>
	<b>Passagens</b>	<b>1,176</b>	<b>0,887</b>	<b>0,348</b>

SAN

<b>Parâmetro analisado: Freezing</b>	<b>DF</b>	<b>Z</b>	<b>p</b>
<b>Tempo x sexo</b>	<b>1,69</b>	<b>3,62</b>	<b>0,061</b>
<b>Tempo x SM</b>	<b>1,69</b>	<b>0,063</b>	<b>0,803</b>
<b>Tempo x Dieta</b>	<b>1,69</b>	<b>2,588</b>	<b>0,112</b>
<b>Tempo x Sexo x SM</b>	<b>1,69</b>	<b>0,379</b>	<b>0,054</b>
<b>Tempo x Sexo x Dieta</b>	<b>1,69</b>	<b>0,237</b>	<b>0,623</b>
<b>Dieta</b>	<b>1,69</b>	<b>0,124</b>	<b>0,726</b>
<b>Sexo</b>	<b>1,69</b>	<b>0,03</b>	<b>0,863</b>
<b>SM</b>	<b>1,69</b>	<b>0,068</b>	<b>0,796</b>
<b>Sexo x SM</b>	<b>1,69</b>	<b>1,382</b>	<b>0,244</b>
<b>Sexo x Dieta</b>	<b>1,69</b>	<b>1,957</b>	<b>0,166</b>

<b>Sexo x SM x Dieta</b>	<b>1,69</b>	<b>0,451</b>	<b>0,504</b>
<b>SM x Dieta</b>	<b>1,69</b>	<b>3,288</b>	<b>0,074</b>

<b>Fator</b>	<b>DF</b>	<b>Z</b>	<b>p</b>
<b>Dieta</b>	<b>1,161</b>	<b>1,56</b>	<b>0,306</b>
<b>Sexo</b>	<b>1,161</b>	<b>0,187</b>	<b>0,666</b>
<b>Dieta x Sexo</b>	<b>1,161</b>	<b>2,409</b>	<b>0,123</b>
<b>Dieta x Extinção</b>	<b>1,161</b>	<b>0,138</b>	<b>0,711</b>
<b>SM x Sexo</b>	<b>1,161</b>	<b>0,056</b>	<b>0,813</b>
<b>SM x Extinção</b>	<b>1,161</b>	<b>0,06</b>	<b>0,807</b>
<b>Sexo x Extinção</b>	<b>1,161</b>	<b>3,259</b>	<b>0,073</b>
<b>Dieta x SM x Sexo</b>	<b>1,161</b>	<b>0,184</b>	<b>0,668</b>
<b>Dieta x SM x Extinção</b>	<b>1,161</b>	<b>2,275</b>	<b>0,133</b>
<b>Dieta x Sexo x Extinção</b>	<b>1,161</b>	<b>3,225</b>	<b>0,74</b>
<b>SM x Sexo X extinção</b>	<b>1,161</b>	<b>0,012</b>	<b>0,912</b>

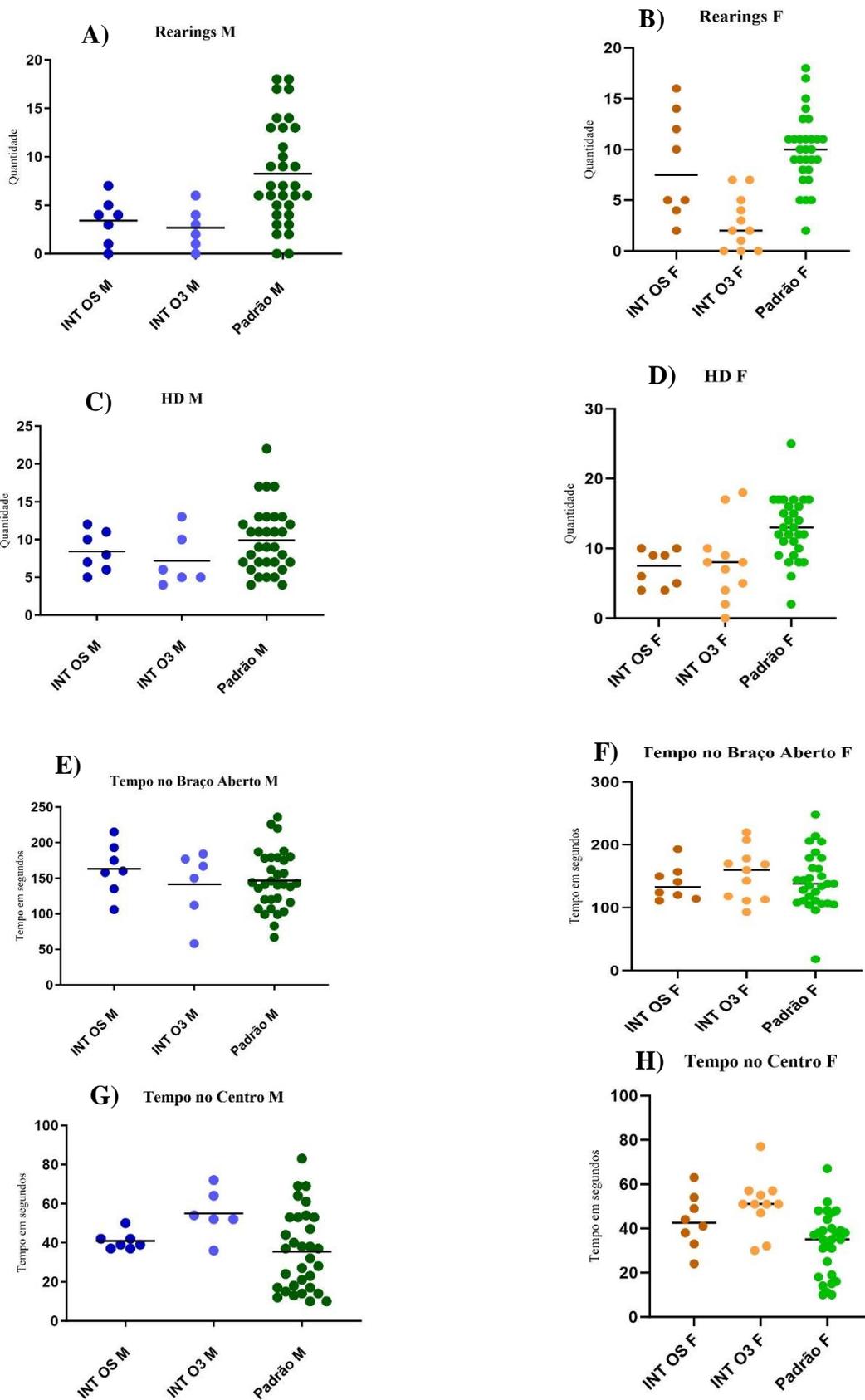
<b>Dieta x SM x Sexo x Extinção</b>	<b>1,161</b>	<b>2,566</b>	<b>0,111</b>
---	--------------	--------------	--------------

<b>Fator</b>	<b>Variável</b>	<b>DF</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Dieta</b>	<b>SAP</b>	<b>1,106</b>	<b>0,350</b>	<b>0,555</b>
	<b>HD</b>	<b>1,106</b>	<b>0,520</b>	<b>0,473</b>
<b>Sexo</b>	<b>SAP</b>	<b>1,106</b>	<b>0,884</b>	<b>0,349</b>
<b>SM</b>	<b>Braço aberto</b>	<b>1,106</b>	<b>2,252</b>	<b>0,136</b>
	<b>Rearings</b>	<b>1,106</b>	<b>0,248</b>	<b>0,619</b>
	<b>HD</b>	<b>1,106</b>	<b>1,009</b>	<b>0,317</b>
<b>Dieta x Sexo</b>	<b>Rearings</b>	<b>1,106</b>	<b>0,595</b>	<b>0,442</b>
	<b>SAP</b>	<b>1,106</b>	<b>0,012</b>	<b>0,912</b>
<b>Dieta x SM</b>	<b>Braço aberto</b>	<b>1,106</b>	<b>0,842</b>	<b>0,361</b>
	<b>Rearings</b>	<b>1,106</b>	<b>1,694</b>	<b>0,196</b>
	<b>SAP</b>	<b>1,106</b>	<b>0,839</b>	<b>0,362</b>
	<b>HD</b>	<b>1,106</b>	<b>0,711</b>	<b>0,401</b>
<b>Sexo x SM</b>	<b>Braço aberto</b>	<b>1,106</b>	<b>0,936</b>	<b>0,335</b>
	<b>Rearings</b>	<b>1,106</b>	<b>0,005</b>	<b>0,946</b>
	<b>SAP</b>	<b>1,106</b>	<b>0,058</b>	<b>0,810</b>

	<b>HD</b>	<b>1,106</b>	<b>1,010</b>	<b>0,317</b>
<b>Dieta x Sexo x SM</b>	<b>Braço aberto</b>	<b>1,106</b>	<b>2,034</b>	<b>0,157</b>
	<b>Rearings</b>	<b>1,106</b>	<b>0,000</b>	<b>0,994</b>
	<b>SAP</b>	<b>1,106</b>	<b>0,300</b>	<b>0,585</b>
	<b>HD</b>	<b>1,106</b>	<b>0,020</b>	<b>0,888</b>

## Anexo 2 - Comparação entre rações, um estudo piloto

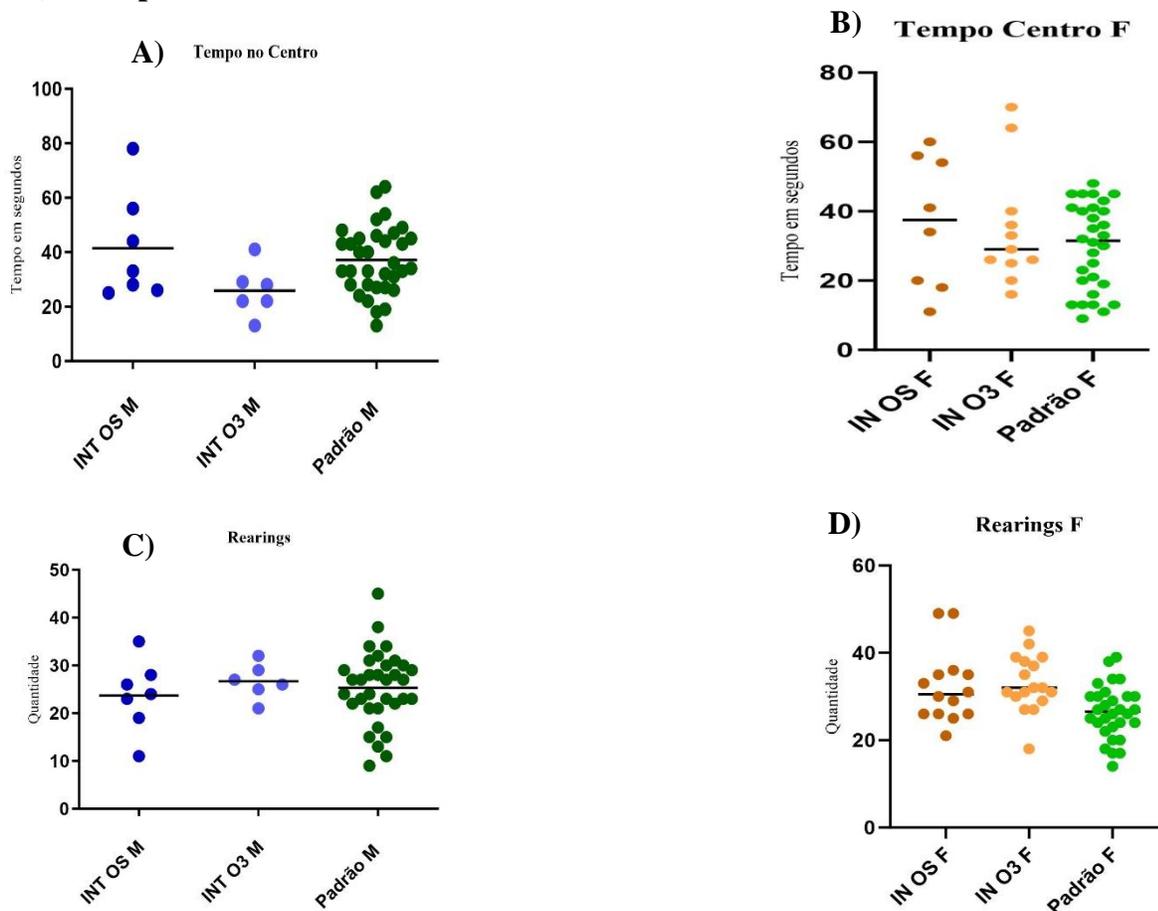
### 1) Labirinto em Cruz Elevado- LCE

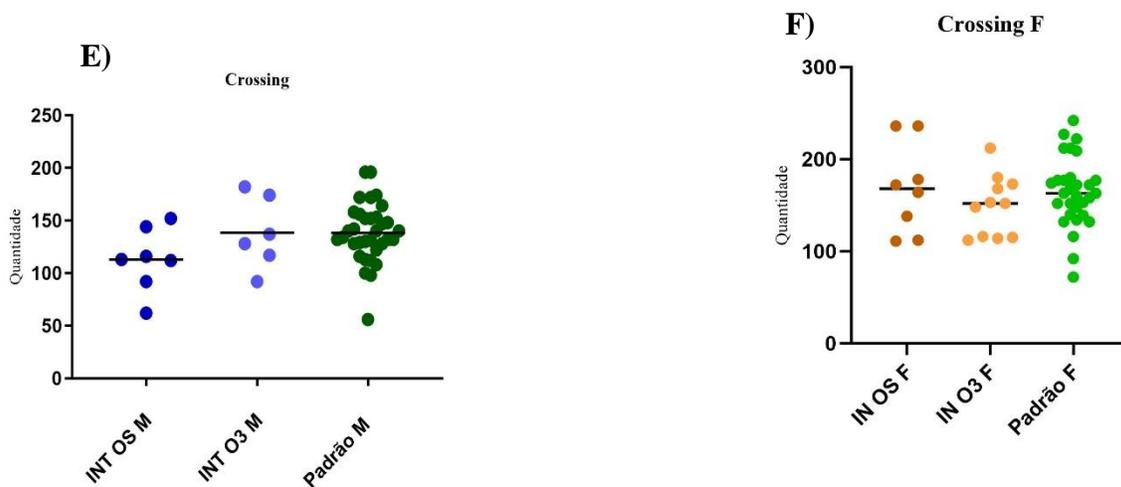


**Figura S1.** exposição da análise comportamental realizada no LCE.

Neste estudo piloto objetivamos mensurar se era possível identificar significativa diferença entre nos padrões comportamentais avaliados ao compararmos dietas enriquecidas em óleo de soja, óleo de linhaça e ração padrão, e de fato foi evidente as diferenças em vários critérios analisados, como por exemplo no gráfico **A)** e **B)** mostram que ratos alimentados com dieta Padrão realizam mais atividade exploratória tanto nos *Rearings* [ $F(2,87) = 15,675, p = 0,000$ ], como no HD, **D)** e **F)** [ $F(2,87) = 7,562, p = 0,001$ ].

## 2) Campo Aberto

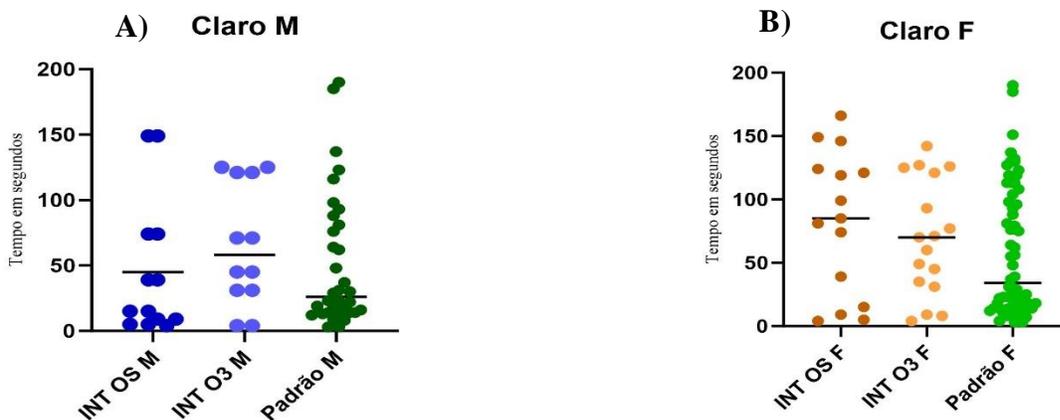


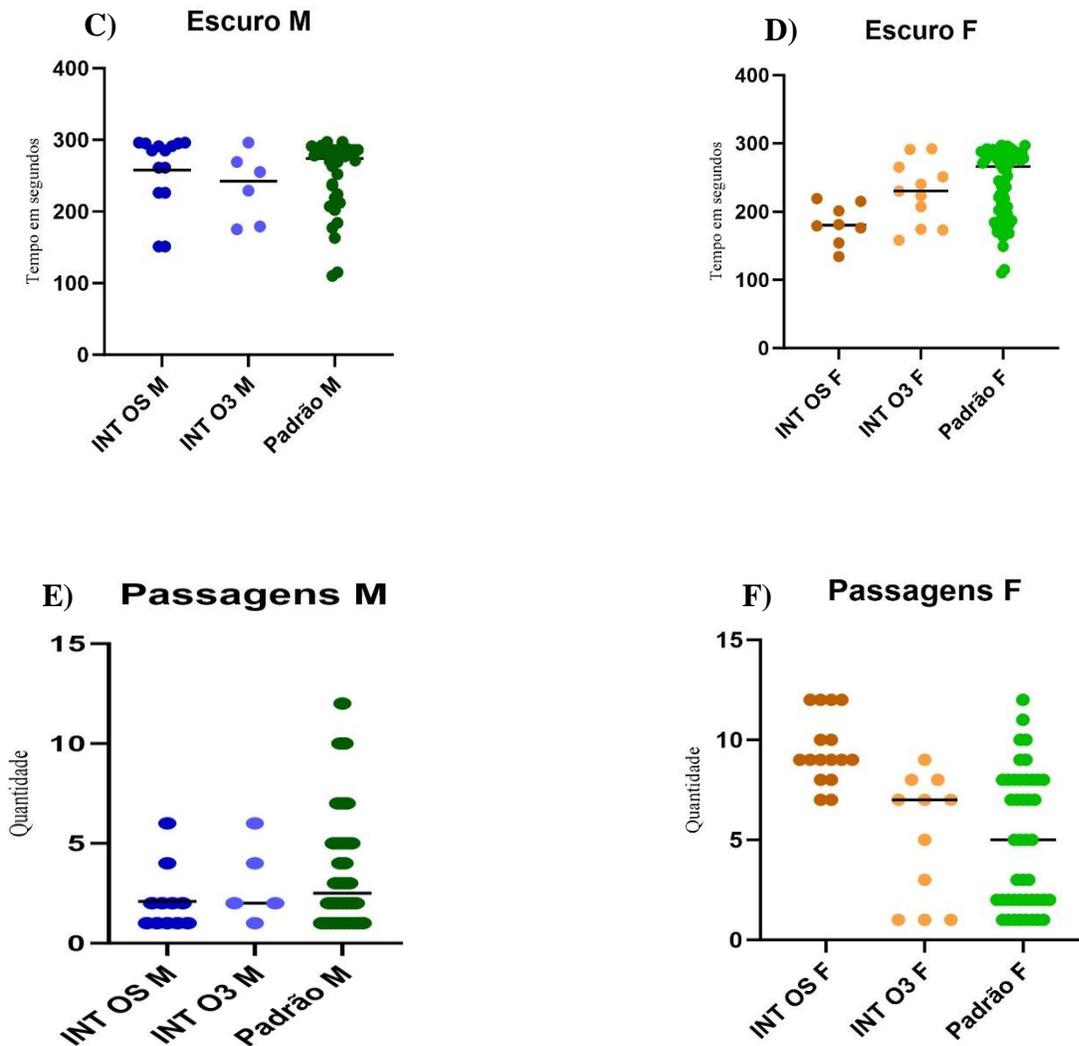


**Figura S2.** Medidas realizadas no campo aberto.

No campo aberto, novamente foi possível identificar uma importante atividade exploratória, porém um efeito para o sexo, **D**) fêmeas realizaram mais rearings ao serem comparadas com machos [F(1,90), 4,901, p=0,29] e nos crossings **F**) as fêmeas apresentaram atividade exploratória superior aos machos [F (1,90),12,247,p=0,001].

### 3) Claro/Escuro

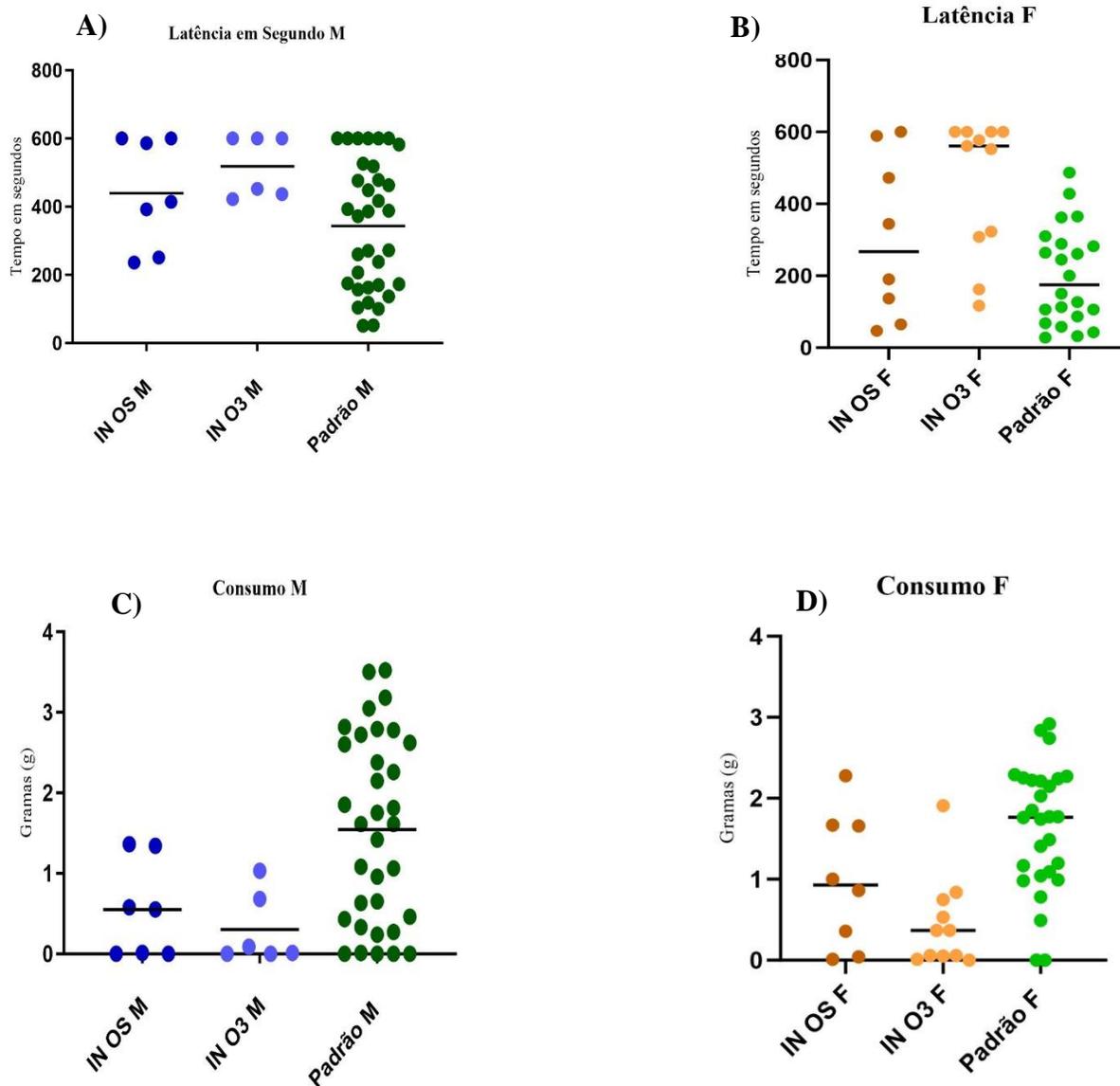




**Figura 1C. Gráficos para o comportamento Claro-Escuro**

Neste comportamento foi possível perceber algum interessante, embora os animais que receberam dieta padrão apresentaram um comportamento exploratório mais notável, neste comportamento eles passaram mais tempo no escuro **D) e E)** [ $F(1,90)=16,149$ ,  $p= 0,000$ ] e consequentemente menos tempo no ambiente claro **A) e B)** [ $F(1,90)=16,067$ ,  $p= 0,000$ ].

#### 4) Supressão da Alimentação pela Novidade - SAN

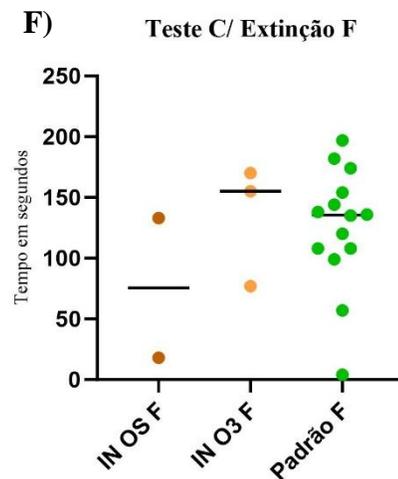
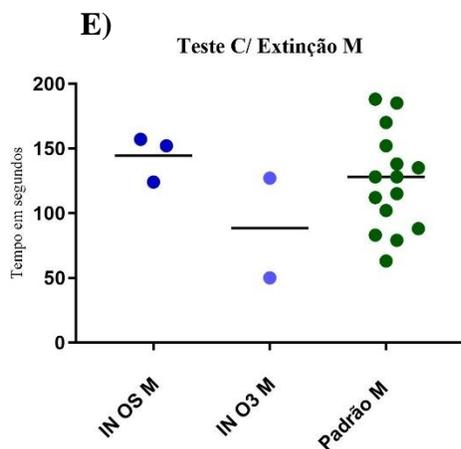
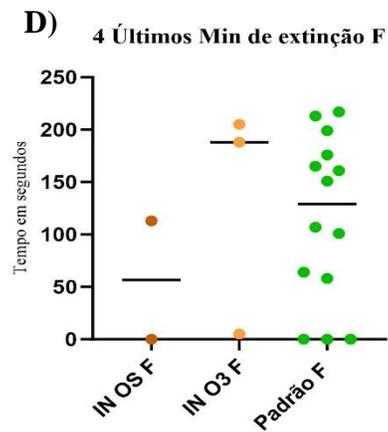
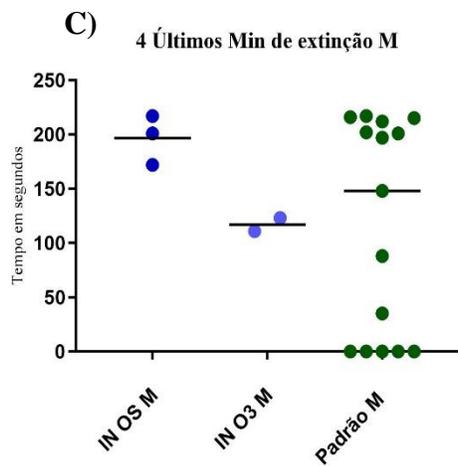
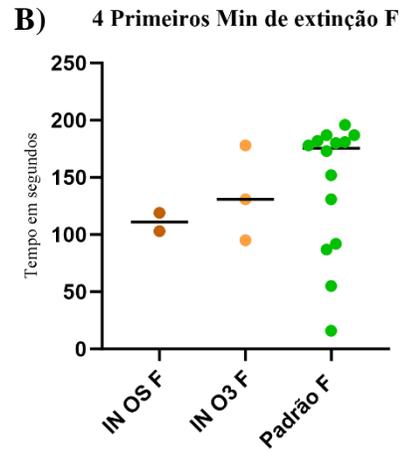
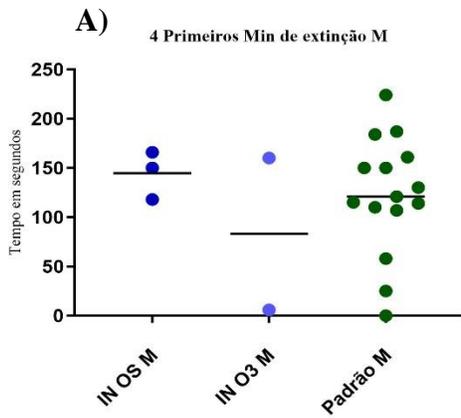


**Figura S3. Exposição gráfica do comportamento de Supressão da alimentação pela novidade.**

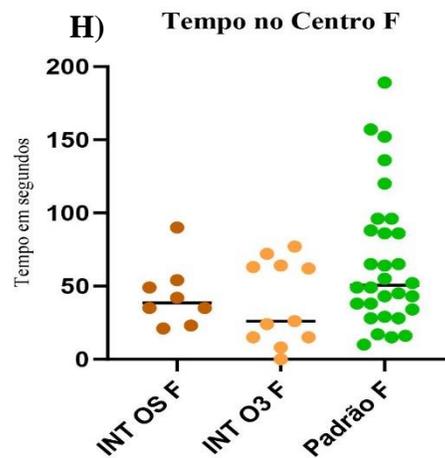
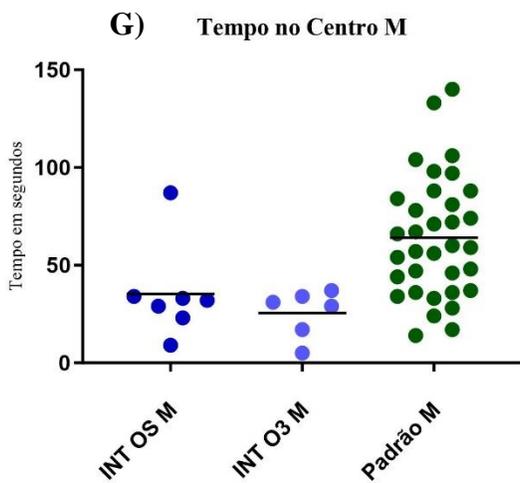
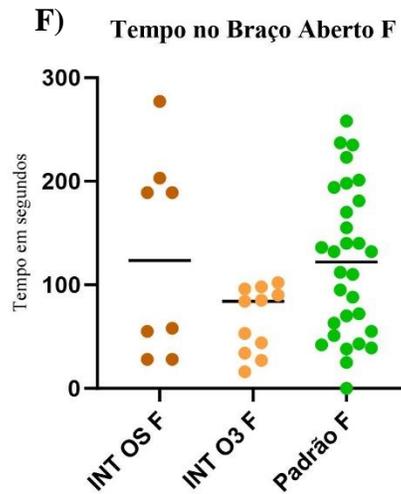
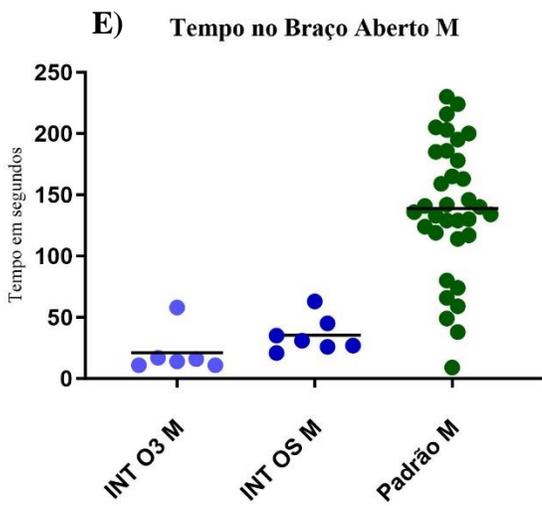
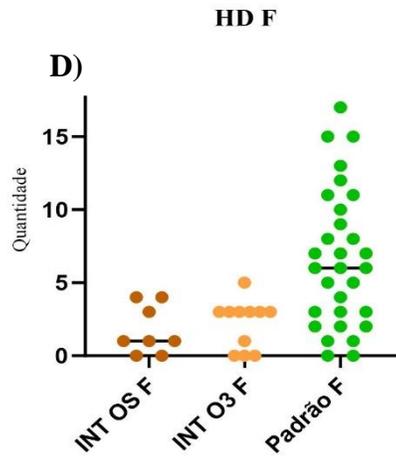
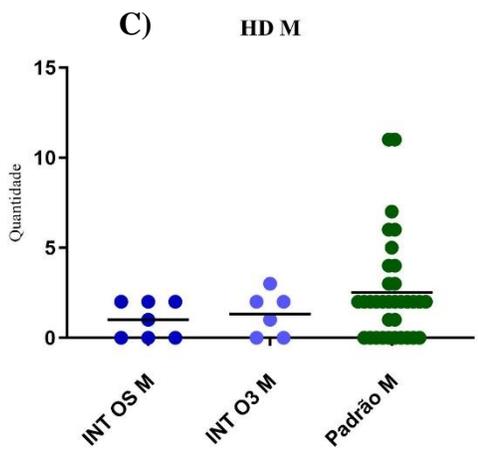
Neste teste comportamental, notadamente os animais com alimentação padrão tiveram um consumo alimentar ao serem comparados com os animais das outras dietas, e isso pode ser observar em ambos os sexos,  $[F(1,90)= 5,897, p= 0,17]$ , ainda foi possível observar que fêmeas

com dieta padrão possuíam menor latência para iniciar o consumo, resultando em um efeito para o sexo [F(1,90)=5,897,p=0,17].

### 5) Testes de memória







**Figura S5: Exposição gráfica do Labirinto em Cruz Elevado pós choque.**

Por fim ao executar realizar o experimento do Labirinto em Cruz Elevado pós o choque, novamente foi possível identificar medidas importantes medidas, tais como efeitos da dieta no tempo nos abertos [F (2,90), 14,305,p=0,000], porém neste teste animais que receberam a dieta O3 realização mais rearings [F (2,90), 14,305,p=0,000]. E nos braços abertos houve um interação entre dieta x sexo [ F(2,90), 5,799, p=0,004] demonstrando que machos com dieta padrão permaneceram um tempo significativamente maior ao serem comparados as fêmeas.

Anexo 3 – Carta de Aprovação do projeto de pesquisa pela CEUA/UFRGS



**U F R G S**

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 41511

Título: ESTRESSE PRECOCE POR SEPARACAO MATERNA E PROGRAMACAO DO  
COMPORTAMENTO ANSIOSO NA FASE ADULTA: EFEITOS DE DIETA RICA EM OMEGA- 3

Vigência: 01/11/2021 à 31/10/2023

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CARLA DALMAZ - coordenador desde 01/11/2021  
Regina Andressa Caetano de Souza - desde 01/11/2021  
Joelma Alves Lúcio - desde 01/11/2021  
Thiago Ângelo Smaniotto - desde 01/11/2021

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 07/03/2022 - Reunião por videoconferência via MCONF, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 26 fêmeas prenhes (ratas Wistar de cerca de 3 meses), e os filhotes dessas ninhadas: 94 machos e 94 fêmeas provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS, órgão auxiliar do CEUA e do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.***

Porto Alegre, Terça-Feira, 26 de Abril de 2022

MAITE DE MORAES VIEIRA  
Coordenador da comissão de ética

Anexo 4 – Carta de Aprovação do projeto de pesquisa para ampliar o N pela  
CEUA/UFRGS



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 41511

Título: ESTRESSE PRECOCE POR SEPARACAO MATERNA E PROGRAMACAO DO  
COMPORTAMENTO ANSIOSO NA FASE ADULTA: EFEITOS DE DIETA RICA EM OMEGA- 3

Vigência: 01/11/2021 à 31/10/2023

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CARLA DALMAZ - coordenador desde 01/11/2021  
Regina Andressa Caetano de Souza - desde 01/11/2021  
Joelma Alves Lúcio - desde 01/11/2021  
Thiago Ângelo Smaniotto - desde 01/11/2021

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 26/06/2023 - Reunião por videoconferência via MCONF, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 6 fêmeas prenhas (ratas Wistar de cerca de 3 meses), e os filhotes dessas ninhadas: 30 machos e 30 fêmeas provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.***

Porto Alegre, Quarta-Feira, 28 de Junho de 2023



Documento assinado digitalmente

MAITE DE MORAES VIEIRA  
Data: 29/06/2023 10:16:41-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

MAITE DE MORAES VIEIRA  
Coordenador da comissão de ética