



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP

ESCOLA DE NUTRIÇÃO



Mariana Lima Farias

**A INFLUÊNCIA DA SEPARAÇÃO MATERNA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO
E RESPOSTAS DEFENSIVAS COMPORTAMENTAIS DE RATOS E RATAS
WISTAR**

Ouro Preto

2025

Mariana Lima Farias

**A INFLUÊNCIA DA SEPARAÇÃO MATERNA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO
E RESPOSTAS DEFENSIVAS COMPORTAMENTAIS DE RATOS E RATAS
WISTAR.**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado à
Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro
Preto como requisito para a formação superior em
Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha A. de Menezes

Coorientadoras: Prof^ª. Dr^ª. Sylvana I. S. R. de
Noronha e Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Cacilda dos Santos
Silva

Ouro Preto

2025

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

F224a Farias, Mariana Lima.

A influência da separação materna sobre o estresse oxidativo e respostas defensivas comportamentais de ratos e ratas e wistar. [manuscrito] / Mariana Lima Farias. - 2025.

62 f.: il.: color., gráf..

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.

Coorientadores: Profa. Dra. Fernanda Cacilda dos Santos Silva, Profa. Dra. Sylvana Isaura Saliba Rendeiro de Noronha.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Graduação em Nutrição .

1. Separação (Psicologia). 2. Comportamento. 3. Estresse oxidativo. 4. Metabólitos. I. Menezes, Rodrigo Cunha Alvim de. II. Noronha, Sylvana Isaura Saliba Rendeiro de. III. Silva, Fernanda Cacilda dos Santos. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 612.39

Bibliotecário(a) Responsável: Sonia Marcelino - CRB6/2247



FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Lima Farias

A influência da separação materna sobre o estresse oxidativo e respostas defensivas comportamentais de ratos e ratas wistar

Monografia apresentada ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Nutricionista

Aprovada em 18 de agosto de 2025

Membros da banca

Doutor - Rodrigo Cunha Alvim de Menezes- Orientador- Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora - Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de Noronha- Co-orientadora- Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora - Ana Beatriz Farias de Souza- Universidade Federal de Ouro Preto
Doutor - MARcel Severio da Silva- Universidade Federal de Ouro Preto

Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 04/09/2025



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 04/09/2025, às 09:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0973048** e o código CRC **63166F1E**.

Dedico este trabalho à minha família, pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

A realização deste Trabalho de Conclusão de Curso foi uma jornada marcada por desafios, aprendizados e conquistas. Nada disso seria possível sem o apoio e incentivo de pessoas muito especiais, às quais deixo aqui minha eterna gratidão.

Primeiramente, agradeço à minha família pelo amor, paciência e apoio em cada etapa deste percurso. Vocês foram o alicerce que me manteve firme até aqui. À minha mãe, que me ensinou que sou capaz de enfrentar qualquer batalha com persistência e amor. Ao meu pai, que me mostrou como os estudos abririam portas que ninguém seria capaz de fechar. À Lara, que me ensinou a contar nos dedos e, hoje, é com quem sei que posso contar. Ao Sam, que me mostrou que os porquês devem ser questionados e, sem querer, me trouxe até a ciência. Agradeço ao Igor por me dar força e coragem para seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos, que, de diferentes formas, tornaram essa caminhada mais leve — em especial, Mi e Dini, que me acompanham desde a infância; Sara, Laura e Duda, que estiveram ao meu lado em todos esses anos de faculdade; e as amigas de Januária, que até aqui estiveram comigo.

À Sylvana, por acreditar no meu potencial, pelos ensinamentos e pela paciência durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Seu auxílio foi essencial para que este projeto se concretizasse. À equipe LFC — Deoclécio, Rodrigo, Fernanda, Lucas, Amanda, Mari e Leticia —, obrigada por me permitirem viver a ciência ao lado de vocês.

Aos professores e colaboradores da Escola de Nutrição, por compartilharem conhecimento gratuito e de qualidade e por contribuírem para minha formação acadêmica e pessoal.

Por fim, à República Bico Doce e a todas as moradoras que fizeram parte desta trajetória. Cada gesto de apoio foi fundamental para a conclusão deste ciclo.

Muito obrigada!

RESUMO

A separação materna (SM) é um modelo pré-clínico amplamente utilizado para investigar os efeitos do estresse precoce sobre o desenvolvimento neurocomportamental e fisiológico. Este estudo avaliou os efeitos da SM durante os primeiros dias de vida sobre parâmetros biométricos, comportamento, estresse oxidativo em regiões encefálicas e metabólitos cecais em ratos e ratas Wistar na fase adulta. Os animais foram submetidos a um protocolo de SM de 3 horas diárias durante 13 dias e, posteriormente, avaliados por meio de testes comportamentais, análises bioquímicas e quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os resultados revelaram alterações sexo-específicas: em fêmeas, a SM reduziu o acúmulo de tecido adiposo, promoveu comportamento semelhante à ansiedade e impulsividade, além de desencadear um aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no encéfalo mesmo diante de uma resposta compensatória do sistema antioxidante (aumento da atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT)) em regiões encefálicas. Em machos, observou-se redução das enzimas SOD e CAT em regiões encefálicas, sem aumento nos marcadores de dano oxidativo, comportamento de evitação ao centro no campo aberto (CA) e aumento significativo da concentração do ácido láctico cecal. Os achados indicam que a SM afeta de forma sexo-específica machos e fêmeas, com maior vulnerabilidade das fêmeas a desfechos deletérios e possível adaptação metabólica em machos, sugerindo uma relação entre os efeitos do estresse neonatal por SM no eixo intestino-cérebro, nos mecanismos de dano e defesa oxidativa, e nas respostas comportamentais relacionadas à ansiedade na fase adulta.

Palavras-chave: separação materna; comportamento; estresse oxidativo; metabólitos cecais.

ABSTRACT

Maternal separation (MS) is a widely used preclinical model to investigate the effects of early-life stress on neurobehavioral and physiological development. This study evaluated the effects of MS during the first days of life on biometric parameters, behavior, oxidative stress in brain regions, and cecal metabolites in adult male and female Wistar rats. The animals were subjected to an MS protocol consisting of 3 hours per day for 13 days and were subsequently assessed through behavioral tests, biochemical analyses, and quantification of short-chain fatty acids (SCFAs). The results revealed sex-specific alterations: in females, MS reduced adipose tissue accumulation, promoted anxiety-like and impulsive behavior, and triggered an increase in TBARS levels in the brain, even in the presence of a compensatory antioxidant system response (increased SOD and CAT). In males, a reduction in SOD and CAT enzymes was observed in brain regions, without an increase in oxidative damage markers, along with center avoidance behavior in the open field (OF) test and a significant increase in cecal lactic acid concentration. The findings indicate that MS affects males and females in a sex-specific manner, with greater female vulnerability to deleterious outcomes and possible metabolic adaptation in males, suggesting a relationship between the effects of neonatal stress induced by MS on the gut–brain axis, oxidative damage and defense mechanisms, and anxiety-related behavioral responses in adulthood.

Keywords: maternal separation; behavior; oxidative stress; cecal metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do protocolo de Separação Materna (SM).....	16
Figura 2 - Linha do tempo experimental	17
Figura 3 - Efeitos da separação materna sobre os parâmetros de massa corporal de ratos Wistar.....	25
Figura 4 - Efeitos da separação materna sobre os parâmetros de massa corporal de ratas Wistar.....	26
Figura 5 - Efeitos da separação materna sobre o comportamento de ratos Wistar avaliados no LCE.....	28
Figura 6 - Efeitos da separação materna sobre o comportamento de ratas Wistar avaliados no LCE.....	30
Figura 7 - Efeitos da separação materna sobre o comportamento de ratos Wistar avaliados no CCE.	31
Figura 8 - Efeitos da separação materna sobre o comportamento de ratas Wistar avaliados no CCE.	32
Figura 9 - Efeito da Separação Materna sobre as respostas comportamentais de ratos Wistar avaliadas no CA.....	33
Figura 10 - Efeito da Separação Materna sobre as respostas comportamentais de ratas Wistar avaliadas no CA.....	34
Figura 11 - Efeito da Separação Materna sobre as respostas comportamentais de ratos Wistar avaliadas no Splash teste.	35
Figura 12 - Efeito da Separação Materna sobre as respostas comportamentais de ratas Wistar avaliadas no Splash teste.	36
Figura 13 - Efeito da Separação Materna sobre as enzimas de defesa antioxidante e marcadores de dano oxidativo sobre o hipocampo, hipotálamo e a glândula adrenal de ratos Wistar.....	38
Figura 14 - Efeito da Separação Materna sobre as enzimas de defesa antioxidante e marcadores de dano oxidativo sobre o hipocampo, hipotálamo e a glândula adrenal de ratas Wistar.....	39
Figura 15 - Efeitos da Separação Materna sobre a concentração de Ácidos Graxos de Cadeia Curta de ratos Wistar.	40
Figura 16 - Efeitos da Separação Materna sobre a concentração de Ácidos Graxos de Cadeia Curta de ratas Wistar.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AGCM	Ácidos Graxos de Cadeia Média
BHE	Barreira Hematoencefálica
CA	Campo Aberto
CAT	Catalase
CCE	Caixa Claro-Escuro
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
CRFR1	Receptor 1 do Fator Liberador de Corticotropina
EPM	Erro Padrão da Média
FC	Fêmeas Controle
FSM	Fêmeas Submetidas à Separação Materna
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GH	Hormônio do Crescimento
GPx	Glutathiona Peroxidase
GR	Receptores de Glicocorticoides
HHA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MC	Machos Controle
MSM	Machos Submetidos à Separação Materna
MR	Receptores Mineralocorticoides
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCO	Proteínas Carboniladas
SM	Separação Materna
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TTDA	Tarefa de Tomada de Decisão Arriscada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. METODOLOGIA	15
3.1 Modelo Animal	15
3.2 Procedimento	15
3.3 Protocolo de Separação Materna	16
3.4 Delineamento Experimental	17
3.5 Testes Comportamentais	17
3.5.1 Teste Labirinto em Cruz Elevado.....	17
3.5.2 Teste Caixa Claro/Escuro.....	18
3.5.3 Teste Campo Aberto.....	18
3.5.4 Splash Teste.....	18
3.6 Eutanásia	19
3.7 Avaliação do estado REDOX	19
3.7.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	20
3.7.2 Atividade da Catalase (CAT).....	21
3.7.3 Ácido Tiobarbitúrico (TBARs).....	21
3.7.4 Determinação de Proteína Carbonilada (PCO).....	22
3.8 Análise de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)	23
3.8.1 Protocolo de Extração dos AGCC e Método de Análise.....	23
3.9 Análises Estatísticas	23
4. RESULTADOS	24
4.1 A separação materna de 13 dias impactou significativamente na evolução do peso semanal em ratos machos e no acúmulo de tecidos adiposos em fêmeas.	24
4.2 A separação materna por 13 dias induz ansiedade e aumento do tempo de avaliação de risco de forma sexo-específica, mas não altera comportamentos relacionados à anedonia em animais adultos jovens.	27
4.2.1 Labirinto em Cruz Elevado.....	27
4.2.2 Caixa Claro-Escuro.....	30
4.2.3 Campo Aberto.....	32
4.2.4 Splash Teste.....	34
4.3 Efeitos da separação materna de 13 dias sobre o estado REDOX em ratos e ratas Wistar.	37

4.3.1 Machos submetidos a SM por 13 apresentaram redução de marcadores de defesa oxidativa, enquanto fêmeas apresentaram aumento da defesa oxidativa associada a dano lipídico em regiões encefálicas.....	37
4.4 A SM por 13 dias na primeira infância modifica de forma branda os metabólitos intestinais durante a fase adulta de ratos, mas não de ratas.....	40
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

A formação dos vínculos afetivos nos primeiros anos de vida é considerada um dos pilares do desenvolvimento de um indivíduo (Van der horst; Van der veer, 2008). Segundo Bowlby (1952), autor da clássica teoria do apego, as relações afetivas estabelecidas na infância com a figura cuidadora principal, geralmente a mãe, são fundamentais para o desenvolvimento emocional, a formação da personalidade e a capacidade de adaptação social. Essa perspectiva foi elaborada a partir de observações realizadas no período pós-Segunda Guerra Mundial, quando muitas crianças foram separadas de suas famílias. O autor argumenta que a ausência ou ruptura precoce do vínculo afetivo pode gerar prejuízos duradouros no comportamento, na cognição e na saúde mental, sobretudo quando ocorre durante os estágios iniciais do desenvolvimento infantil (Bowlby, 1952; Berth, 2021).

Dentro desse contexto, os estudos pioneiros de Seymour Levine (1957) buscaram compreender os mecanismos por trás dos efeitos do cuidado materno sobre o desenvolvimento fisiológico, metabólico e comportamental em roedores. Levine foi um dos primeiros a demonstrar que variações nas experiências precoces, como o manuseio neonatal, influenciam a resposta ao estresse ao longo da vida. Posteriormente, Meaney e colaboradores (1991) aprofundaram os estudos sobre o manuseio neonatal ao investigar como variações sutis no ambiente precoce influenciam o desenvolvimento de sistemas bioquímicos específicos no cérebro, particularmente aqueles envolvidos na regulação da resposta adrenocortical ao estresse. Os autores demonstraram como o cuidado na primeira infância torna essa resposta mais eficiente, evitando a exposição prolongada aos glicocorticoides catabólicos, o que preserva a integridade de estruturas cerebrais relacionadas à cognição e favorece uma maior resiliência a estressores ao longo da vida (Meaney et al., 1991).

A partir dessas evidências, diversos modelos experimentais de estresse neonatal foram desenvolvidos para investigar os efeitos das adversidades precoces sobre o neurodesenvolvimento. Dentre eles, destaca-se o protocolo de separação materna (SM). A separação repetida de ratos ou camundongos neonatos de suas mães, por períodos de 1 a 6 horas durante as duas primeiras semanas de vida, uma janela crítica do desenvolvimento, tem sido associada a desfechos como aumento de comportamentos ansiosos e depressivos, além de prejuízos cognitivos observados na idade adulta (Wang et al., 2020). Estudos pré-clínicos indicam que o modelo de separação materna, a depender do protocolo adotado, replica de forma consistente um evento traumático precoce, acarretando alterações duradouras nos sistemas fisiológicos e comportamentais (Lieb et al., 2019). Esse modelo busca simular experiências

adversas vividas por neonatos humanos, como ocorre com bebês prematuros, que precisam se adaptar precocemente à vida extrauterina e frequentemente enfrentam diversos estressores, incluindo a ausência do contato materno (Gomes, 2019).

Apesar da variedade de modelos experimentais aplicados e das múltiplas hipóteses propostas ao longo dos anos, os mecanismos específicos pelos quais a separação materna afeta o indivíduo, bem como os sistemas-alvo mais sensíveis a esse impacto, ainda permanecem inconclusivos (Wang et al., 2020). Além disso, as diferenças nas respostas entre machos e fêmeas tornam essa relação ainda mais complexa, evidenciando uma lacuna na literatura e reforçando a importância de investigar tais mecanismos, de maneira sexo-específica.

Diante desse cenário, a disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é considerada o principal mecanismo envolvido na mediação dos efeitos de longo prazo da separação materna, especialmente no que se refere à regulação da resposta ao estresse (Loi, M., et al., 2014; Ou-Yang, et al., 2022; Lupien et al., 2009; Lajud & Torner. 2015). Em condições normais, esse eixo regula a liberação de glicocorticoides, hormônios que ajudam a restaurar a homeostase do organismo após situações estressantes, por meio de um sistema de retroalimentação negativa mediado pelos receptores mineralocorticoides (MR) e glicocorticoides (GR). No entanto, experiências adversas na infância podem comprometer esse mecanismo, resultando em uma resposta exacerbada ou prolongada ao estresse (Jurena, 2014).

Paralelamente à hipótese neuroendócrina, a literatura tem apontado o estresse oxidativo como um possível mecanismo envolvido nos efeitos duradouros da separação materna. A exposição precoce a eventos estressantes pode desencadear um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os sistemas antioxidantes do organismo, comprometendo a integridade celular, especialmente em regiões cerebrais vulneráveis durante o neurodesenvolvimento, como o hipocampo e o hipotálamo (Réus, 2018). As enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) desempenham funções essenciais na neutralização de EROs, contribuindo para a manutenção do equilíbrio redox celular. Alterações na atividade dessas enzimas podem indicar uma condição de estresse oxidativo, caracterizada pelo acúmulo de EROs e consequente potencial lesivo às estruturas celulares (Maes et al., 2011). As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), amplamente utilizadas como marcador de peroxidação lipídica, e a quantificação de proteínas carboniladas (PCO), indicadora de oxidação proteica, são marcadores de danos oxidativos a componentes celulares fundamentais, podendo comprometer a homeostase e a integridade tecidual (Marković et al., 2017). O desequilíbrio de tais estruturas têm sido associado à disfunção mitocondrial, neuroinflamação e alterações comportamentais em modelos animais submetidos à separação

materna, sugerindo que o estresse oxidativo pode atuar como mediador dos efeitos deletérios do estresse neonatal (Malcon et al., 2020).

Mais recentemente, a disfunção do eixo intestino-cérebro também tem sido proposta como um mecanismo relevante na compreensão dos efeitos sistêmicos do estresse precoce. O eixo intestino-cérebro, composto por vias neurais, imunológicas e endócrinas, estabelece uma comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central e o trato gastrointestinal (Jones et al., 2006). Essa rede pode ser modulada por diferentes tipos de estressores, e há evidências de que experiências adversas precoces, como a separação materna, alteram a forma como esse eixo responde ao estresse na vida adulta (O'mahony et al., 2009). Dentre os mediadores envolvidos nessa comunicação, destacam-se os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Kasprowicz; Savi, 2022). Capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e atuar diretamente sobre as células cerebrais, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são substâncias produzidas por microrganismos e desempenham um papel fundamental na sinalização do eixo intestino-cérebro (Vieira, 2022; Erny et al., 2021). A microbiota intestinal degrada glicanos por meio de enzimas, liberando glicose que é fermentada em AGCC, como acetato, butirato, lactato, entre outros (Kasprowicz; Savi, 2022). Os AGCC modulam importantes funções fisiológicas, incluindo a motilidade intestinal, a absorção de nutrientes, a liberação de muco e a proliferação de células epiteliais intestinais (Egerton et al., 2020). Alterações nas concentrações desses compostos têm sido associadas ao surgimento de distúrbios do neurodesenvolvimento e de doenças neurodegenerativas, especialmente quando ocorrem em fases críticas do desenvolvimento. Evidências obtidas a partir de modelos animais demonstram a ampla influência desses ácidos sobre processos neurológicos e comportamentais (Silva; Bernardi; Frozza, 2020). Compostos como o acetato, butirato, propionato e lactato são frequentemente listados na literatura sobre seu papel benéfico no organismo (Egerton et al., 2020). E alterações nas concentrações desses compostos podem comprometer a integridade funcional do eixo intestino-cérebro, favorecendo um estado de disfunção neuroimune e neuroendócrina que contribui para o desenvolvimento de distúrbios neurológicos e comportamentais (Silva; Bernardi; Frozza, 2020).

Com base nas evidências de que a separação materna (SM) pode modular parâmetros biométricos, oxidativos, metabólicos, fisiológicos e comportamentais de forma sexo-específica, levanta-se a hipótese de que esse estressor precoce induza, na fase adulta, alterações distintas em machos e fêmeas, afetando: (1) a composição corporal; (2) a atividade das enzimas de defesa antioxidante e os marcadores de dano oxidativo em regiões encefálicas críticas para a organização comportamental; (3) as respostas defensivas associadas ao comportamento ansioso; e (4) a concentração de metabólitos cecais relacionados ao eixo intestino-cérebro. Espera-se que os resultados deste estudo contribuam para elucidar de que forma adversidades

vivenciadas na infância podem ter efeitos persistentes ao longo da vida, resultando em alterações na fase adulta, e, assim, ampliar a compreensão dos mecanismos envolvidos nas disfunções fisiológicas associadas ao protocolo de SM.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da separação materna, de maneira sexo-específica, sobre parâmetros biométricos, marcadores de estresse oxidativo, metabólitos cecais e respostas defensivas comportamentais.

2.2 Objetivos Específicos

Em machos e fêmeas Wistar previamente submetidos à separação materna:

- Avaliar alterações em parâmetros biométricos;
- Analisar os efeitos da separação materna sobre o comportamento ansioso;
- Investigar os impactos da separação materna sobre os sistemas de defesa antioxidante e os níveis de dano oxidativo no hipocampo, hipotálamo e nas glândulas adrenais;
- Quantificar os níveis de metabólitos cecais, especialmente os ácidos graxos de cadeia curta acetato, butirato, lactato e propionato.

3. METODOLOGIA

3.1 Modelo Animal

Ao todo foram utilizados 41 ratos Wistar (19 machos e 22 fêmeas). Os animais experimentais foram provenientes de 5 ratas prenhas com idade aproximada de 4 meses, selecionando-se de cada prole animais de ambos os sexos (ao menos 4 machos e 4 fêmeas). Desde o nascimento os ratos foram mantidos no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, em caixas-viveiro forradas com maravalha, enriquecidas com duas unidades de folhas de papel toalha esterilizadas, com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), sistema de renovação de ar, ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 06:00 da manhã) e livre acesso à água e alimentação (Dieta Nuvilab®). O peso dos animais experimentais foi mensurado, no mínimo, uma vez a cada sete dias, com o objetivo de comparar o ganho de peso semanal entre os grupos experimental e controle. Para as análises estatísticas, foram considerados os dados de peso obtidos da primeira até a décima segunda semana do experimento. O ganho de peso dos animais foi expresso em gramas. Os protocolos experimentais foram realizados em cumprimento à ética e às normas de experimentação em animais de laboratório estabelecidos pelo Comitê Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, mediante à aprovação pela Comissão de Ética no Uso da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP nº2065030823).

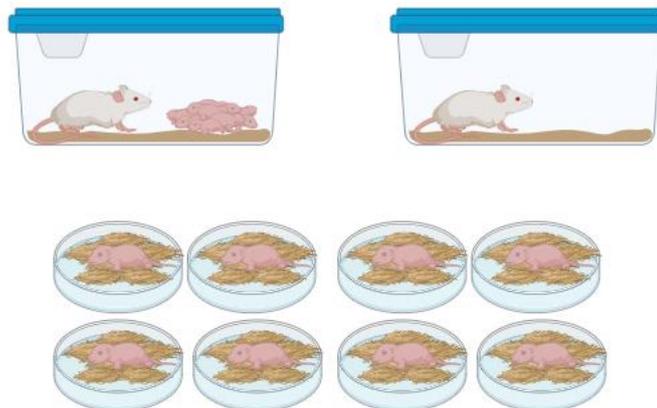
3.2 Procedimento

Cinco fêmeas prenhas foram monitoradas por aproximadamente 14 dias em caixas-viveiros separadas com a finalidade de conferir o nascimento da prole. Os 8 filhotes (4 machos e 4 fêmeas) foram mantidos com as mães até o dia do desmame PN-21 (dia vinte e um pós nascimento), quando as mães foram eutanasiadas. O dia do nascimento foi considerado PN-0 (dia pós nascimento zero). No dia PN-1 (dia um pós nascimento) foi feita a contagem de filhotes e a separação por sexo, por meio da avaliação da distância anogenital. Quando a ninhada era maior que 8 animais, os demais foram eutanasiados imediatamente. A divisão de grupos foi realizada após a eutanásia das mães, sendo 1) MSM: Machos submetidos à separação materna (n=7); 2) MC: Machos controle (n=10); 3) FSM: Fêmeas submetidas à separação materna (n=12) e 4) FC: Fêmeas controle (n=10).

3.3 Protocolo de Separação Materna

O protocolo de separação materna foi iniciado no PN-3 (dia três pós-nascimento) e encerrado no dia PN-16 (dia dezesseis pós nascimento). A separação consiste na remoção dos filhotes das caixas de suas mães e a posterior alocação individual de cada filhote em uma pequena caixa forrada com maravalha, permanecendo separados por três horas diárias. Os animais separados ficaram isolados em uma sala com temperatura adequada para sua sobrevivência ($30 \pm 1^\circ \text{C}$). Ao final das três horas, todos os filhotes separados foram reunidos com suas respectivas mães nas caixas-viveiro. Os animais que não foram separados (grupo controle) não foram submetidos a nenhum tipo de manipulação (Figura 1).

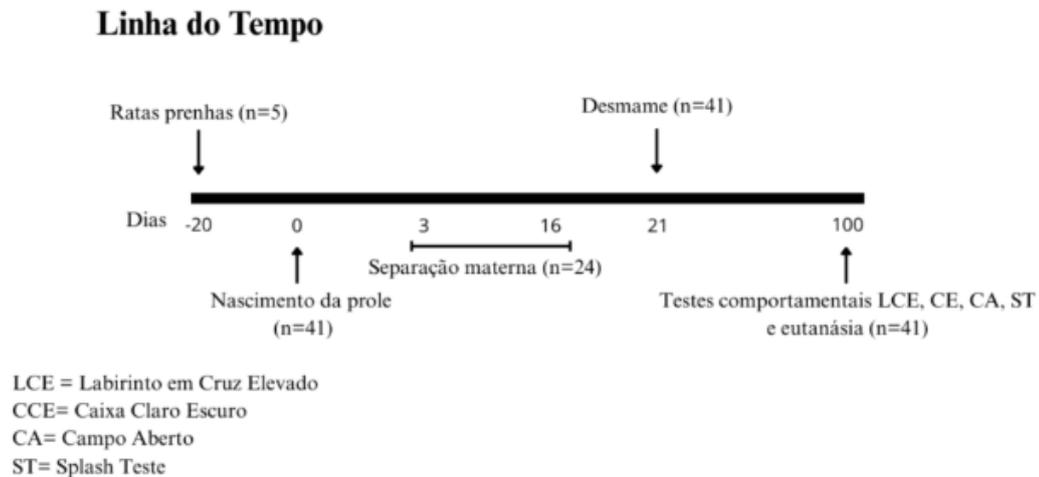
Figura 1- Representação do protocolo de Separação Materna (SM)



Fonte: Figura criada com BioRender.com

3.4 Delineamento Experimental

Figura 2- Linha do tempo experimental



Fonte: Figura criada com BioRender.com

3.5 Testes Comportamentais

Os animais foram mantidos agrupados durante o dia PN21 até o dia PN-100 (dia 21 pós nascimento até o dia 100 pós nascimento) quando foram separados para a realização dos testes comportamentais. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais de labirinto em cruz elevado (LCE), caixa claro/escuro (CCE), campo aberto (CA) e Splash teste. Todos os testes foram realizados no mesmo dia. A sala de experimento foi mantida livre de ruídos e com controle de luz. Os animais foram colocados na sala 30 minutos antes do início do experimento para habituação à iluminação de aproximadamente 60 lux. Os testes foram registrados por uma câmera instalada acima dos aparatos para execução das análises. Após finalizar os testes de cada animal os aparatos foram higienizados com álcool 20% (de Noronha et.al., 2017).

3.5.1 Teste Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um aparato composto por quatro braços, dois braços fechados com paredes de 40 cm de altura e dois braços abertos sem paredes, ambos os braços possuem a mesma proporção (50 cm de comprimento x 12 cm de largura) e 50cm elevados do chão. No centro do aparelho há um quadrante que liga os quatro braços. Os ratos

foram colocados no centro do aparato e direcionados para a entrada de um dos braços fechados, com a disponibilidade de exploração por 300 segundos. Considera-se que o animal está em um dos braços quando tem as quatro patas nesse mesmo braço do labirinto. Ao fim de cada teste, o labirinto foi limpo com uma solução de 20% de álcool. O teste é baseado no princípio de que os roedores possuem um comportamento natural de medo a alturas e espaços abertos, e preferência por locais escuros e fechados. (Handley et al., 1984).

3.5.2 Teste Caixa Claro/Escuro

A Caixa Claro/Escuro é um aparato com dois compartimentos, um claro e um escuro, ligados por uma abertura de 10 cm que permite que o animal possa transitar entre os dois compartimentos. O animal foi posicionado no centro do aparato, ficando livre para transitar durante 300 segundos claro e o teste se inicia a partir da primeira entrada no compartimento escuro. Neste teste foram avaliados o número de entradas e o tempo de permanência em cada compartimento além do tempo de reentrada e o tempo no centro do aparato (De Noronha et.al 2017). O tempo de reentrada corresponde ao tempo gasto pelo animal para reentrar no compartimento claro após a primeira entrada no compartimento escuro (Meseguer Henjarejos et al., 2020)

3.5.3 Teste Campo Aberto

O Teste de Campo Aberto foi realizado em um aparato de acrílico em formato quadrado (60 cm de largura x 60 cm de altura x 40 cm de profundidade). A base do aparato é dividida em 16 quadrantes. No início do teste o animal foi posicionado no centro do aparato, ficando livre para transitar durante 300 segundos. Neste teste foram avaliados o tempo de permanência no centro do aparato, o tempo de permanência na periferia do aparato, o número de quadrantes percorridos na periferia, o número de quadrantes percorridos no centro, o número de explorações verticais (*Rearing*) e o tempo de autolimpeza (*Grooming*). Mais tempo passado no centro do campo aberto é interpretado como um efeito tipo ansiolítico, enquanto menos tempo no centro da arena pode refletir um comportamento ansioso (Crawley et al., 1997).

3.5.4 Splash Teste

O Splash Teste é um protocolo utilizado para avaliar o comportamento de autolimpeza (*grooming*) em roedores, frequentemente associado à motivação e ao estado emocional do animal. No presente estudo, o teste consistiu na aplicação de uma solução de sacarose a 10% sobre a região dorsal dos ratos. Devido à sua viscosidade, a solução adere ao pelo, induzindo uma resposta comportamental de higiene. Imediatamente após a aplicação, a frequência de comportamentos de grooming foi registrada durante um período de 300 segundos. Esse comportamento inclui ações como lambe o corpo, esfregar o rosto com as patas anteriores e realizar movimentos semicirculares sobre a cabeça e atrás das orelhas (Liang et al., 2018). Reduções na frequência ou duração desses comportamentos têm sido interpretadas como indicativas de sintomas semelhantes à depressão, refletindo possíveis déficits motivacionais (Lorigooini et al., 2019).

3.6 Eutanásia

Após a realização do último teste comportamental (Splash Teste), os animais foram pesados e anestesiados com um coquetel composto por cetamina, xilazina e fentanil, em doses calculadas individualmente de acordo com o peso corporal. Em seguida, foram submetidos à eutanásia por decapitação, utilizando uma guilhotina apropriada. Foram coletadas as regiões encefálicas do hipocampo e hipotálamo, além das glândulas adrenais, que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Também foram coletados os tecidos adiposos das regiões inguinal, retroperitoneal, epididimal (em machos) e parametrial (em fêmeas) e as fezes cecais diretamente do ceco para posterior análise. Todos os materiais coletados foram posteriormente pesados e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.7 Avaliação das enzimas antioxidantes e marcadores de dano oxidativo

Amostras dos tecidos das glândulas adrenais, hipocampo e hipotálamo (aproximadamente 100 mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,2) contendo sal dissódico do ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), utilizando um homogeneizador politron (Homogeneizador T10 basic ULTRA-TURRAX®, IKA®) em microtubos de 2 mL. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a centrifugação, foram coletadas alíquotas do sobrenadante para posterior avaliação. Foram quantificadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como determinado o dano oxidativo por meio da peroxidação lipídica,

utilizando o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e da quantificação de proteínas carboniladas.

3.7.1 Proteínas Totais

O método colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951) foi utilizado para quantificar as proteínas presentes no sobrenadante do homogeneizado. A técnica consiste na formação de um complexo azul resultante da interação entre os aminoácidos aromáticos das proteínas e o reagente de Folin-Ciocalteu em meio alcalino com íons cúpricos. A intensidade dessa coloração é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra. Para a mensuração, alíquotas de 10 µL do extrato sobrenadante ou do padrão foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e diluídas a um volume final de 100 µL com água deionizada. O controle branco, representado por um microtubo contendo 100 µL de água deionizada foi utilizado para a calibração do equipamento espectrofotométrico. Na sequência, 1 mL do reagente C (solução alcalina de cobre) foi adicionado a todos os microtubos, os quais foram homogeneizados em vórtex e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse intervalo, 100 µL do reagente D (reagente de Folin-Ciocalteu) foi acrescentado a cada tubo. Em seguida, o homogenato foi incubado em ambiente escuro, por 30 minutos, para garantir a formação completa do complexo colorido. A absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro ajustado para 595 nm. A curva de calibração foi construída com base nos valores de absorbância dos padrões proteicos de concentração conhecida, utilizando análise de regressão linear. A equação da reta resultante foi empregada para determinar a concentração de proteínas no sobrenadante do homogenato, por interpolação dos resultados de absorbância das amostras.

3.7.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada no homogenato com base no procedimento descrito por Marklund e colaboradores (MARKLUND; MARKLUND, 1974). O método se baseia na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol, um composto fenólico que, ao ser oxidado, gera radicais superóxidos (O_2^-). Estes radicais, por sua vez, reduzem o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difenilterazolio (MTT) a sal de formazan. A SOD atua competindo com os radicais superóxido produzidos no processo de oxidação do pirogalol, resultando em menor formação de formazan. Assim, quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor será a formação de formazan, indicando uma

maior atividade da enzima. Para mensuração, amostras homogeneizadas de todos os tecidos foram pipetadas em placa de microtitulação de 96 poços e incubadas por 5 minutos a 37°C com uma solução de pirogalol e MTT. Após o período de incubação, a reação foi interrompida com a adição de Dimetilsulfóxido (DMSO), que solubiliza os cristais de formazan formados. A absorbância foi medida em espectrofotometria em leitora de microplacas à 570 nm. O valor de absorbância obtido foi utilizado para calcular a atividade de SOD, subtraindo-se a absorbância do controle branco da amostra e, em seguida, dividindo-se pelo valor correspondente à subtração da absorbância do padrão pelo branco. O resultado foi expresso em unidades de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

3.7.3 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade catalítica da enzima catalase foi avaliada pela cinética de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Com base no método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984), analisamos a capacidade da catalase de acelerar a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio molecular. O comportamento da reação foi acompanhado pela redução gradual da absorbância a 240 nm. A velocidade dessa redução reflete diretamente a atividade enzimática, possibilitando uma verificação da atividade da catalase. Para execução da técnica, todos os homogenatos teciduais anteriormente preparados em tampão fosfato foram utilizados como amostras para a reação enzimática. O tampão fosfato contendo o peróxido de hidrogênio (10mM) foi aliquotado junto com a amostra em cubeta de quartzo, nas seguintes proporções: 970 μ L de tampão e H_2O_2 com 30 μ L amostra. O tampão e a amostra foram homogeneizados a leitura foi realizada utilizando cubetas de quartzo e a absorbância foi monitorada a 240 nm durante 60 segundos, com registros a cada 30 segundos, iniciando a contagem no tempo 0. A atividade da catalase foi quantificada com base na diminuição da absorbância a 240 nm, de acordo com a Lei de Lambert-Beer. O valor da absorbância foi obtido pela diferença entre a absorbância final e a inicial, sendo essa variação (Δ) utilizada para calcular a atividade enzimática a partir do coeficiente de extinção molar do H_2O_2 . A unidade de atividade foi expressa como U de catalase por mg de proteínas totais, equivalente à hidrólise de 1 μ mol de H_2O_2 por minuto por mL.

3.7.4 Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio do método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Esse procedimento

baseia-se na reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e os lipídeos oxidados, formando um complexo vermelho cuja intensidade colorimétrica está diretamente relacionada à concentração de substâncias reativas ao TBA nas amostras. Para o ensaio, foi elaborada uma curva padrão utilizando 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP) em diferentes concentrações (0,05 a 0,0000976 $\mu\text{mol/mL}$). O TMP reage com o TBA, gerando um composto estável de coloração rosa. Os homogenatos teciduais previamente preparados foram tratados com reagentes específicos, que incluíram 125 μL de ácido tricloroacético (TCA 28% p/v em HCl 0,25 N), 125 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA 1% em ácido acético 1:1) e 62,5 μL de butilhidroxitolueno (BHT 5mM em etanol). Após a adição, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e submetidas a um tratamento térmico em banho-maria a 95°C por 15 minutos para a extração dos produtos de oxidação lipídica. Após este procedimento, foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos e centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C para remoção de precipitado. 200 μL do sobrenadante foi transferido para uma placa de ELISA de 96 poços onde a absorbância foi medida a 535 nm em leitora de microplaca. A concentração de TBARS foi calculada através da equação da reta obtida da análise de regressão linear a partir da curva padrão. Os resultados foram expressos em nmol de TBARS por mg de proteína.

3.7.5 Determinação de Proteína Carbonilada (PCO)

A determinação de proteínas carboniladas foi realizada pelo método de derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), adaptado de Reznick e Packer (1994). Essa técnica baseia-se na detecção espectrofotométrica dos derivados carbonílicos resultantes da reação entre o DNPH e os grupos carbonila das proteínas, que formam compostos denominados hidrazonas. A quantidade de proteína carbonilada foi mensurada a partir de 250 μL de homogenato dos tecidos, os quais foram transferidos para microtubos de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 250 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% para induzir a precipitação das proteínas, e as amostras foram agitadas em vórtex. Após a homogeneização, foram centrifugadas a 5000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado resultante foi resuspenso em 250 μL de DNPH a 10 mM, e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente e na ausência de luz por 1 hora, com agitação em vórtex a cada 15 minutos. Após o período de reação, 250 μL de TCA a 10% foram novamente adicionados às amostras, seguidos de uma nova centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 0,5 mL da solução de etanol/acetato de etila (1:1) foi adicionado ao precipitado, seguido de agitação em vórtex e centrifugação sob as mesmas condições. Essa

etapa de lavagem foi repetida duas vezes. Após a segunda lavagem, o sobrenadante foi descartado, e 0,5 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 6% foi adicionado ao precipitado. As amostras foram novamente agitadas em vórtex e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante final foi coletado, transferido para uma cubeta de quartzo, e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 370 nm. A concentração de proteína carbonilada foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar do DNPH através da equação de Lambert-Beer, e os resultados expressos em nmol/mg de proteínas totais.

3.8 Análise de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)

3.8.1 Protocolo de Extração dos AGCC e Método de Análise

Inicialmente, aproximadamente 100 mg de fezes de rato foram pesados e transferidos para microtubos de 2,0 mL. Em seguida, foram adicionados 300 µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,6 M. As amostras foram então homogeneizadas por agitação em vórtex por 4 minutos na velocidade máxima. Posteriormente, os microtubos foram submetidos à centrifugação a 10.000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C, para separação da fase sobrenadante. O sobrenadante (~300 µL) foi coletado com o auxílio de uma micropipeta e transferido para microtubos de 1,5 mL. Para remoção de partículas em suspensão, o sobrenadante foi filtrado utilizando uma seringa acoplada a um filtro de 0,22 µm, sendo o filtrado final direcionado para um novo microtubo de 1,5 mL. Posteriormente, um volume de 100 µL do material filtrado foi pipetado para inserts de vials. As determinações dos AGCC foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando os seguintes parâmetros operacionais: volume de injeção de 20 µL, fluxo de 0,6 mL/min, temperatura da coluna de 55°C (máxima de 58°C) e fase móvel composta por solução de H₂SO₄ 5 mM (preparada pela diluição de 699 µL de Ácido Sulfúrico 98% para HPLC, LiChropur). Foram injetadas alíquotas de 20 µL do material previamente filtrado. As análises foram conduzidas com fase móvel composta por solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mM, empregando um fluxo de 0,6 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 55°C durante o processo cromatográfico. A detecção foi realizada a 210 nm de comprimento de onda, sendo o tempo total de corrida de 70 minutos por amostra.

3.9 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no Software GraphPad Prism (versão 8.0.2.263). Os dados foram avaliados quanto à normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os outliers foram detectados por meio do teste de Grubbs, para apenas um dado, com valor estabelecido $\alpha=0,05$ e retirados antes das análises. As variáveis com distribuição normal foram expressas como média \pm erro padrão da média (EPM), enquanto os dados com distribuição não normal foram apresentados como mediana e intervalo interquartil (IIQ). As análises estatísticas foram realizadas de forma sexo-específica, ou seja, foram realizados *Unpaired T-test* (para dados paramétricos) e Mann-Whitney (para dados não paramétricos). Para avaliação do ganho de peso semanal foi utilizado Multiple teste-t como valores definidos em dois estágios lineares corrigidos por meio do FDR (False Discovery Rate) pelo método de Benjamini, Krieger and Yekutieli (e valor $Q = 1\%$), e os dados semanais com valores significativos expressos na forma de volcano plot. O nível de significância considerado para as análises foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Com o objetivo de caracterizar a resposta específica de cada sexo à separação materna, este estudo investigou os impactos do protocolo de separação materna da prole de ratos e ratas por 13 dias consecutivos durante o período pós-natal sobre parâmetros bioquímicos, comportamentais e fisiológicos. Os dados resultantes das análises de fêmeas e machos foram descritos separadamente.

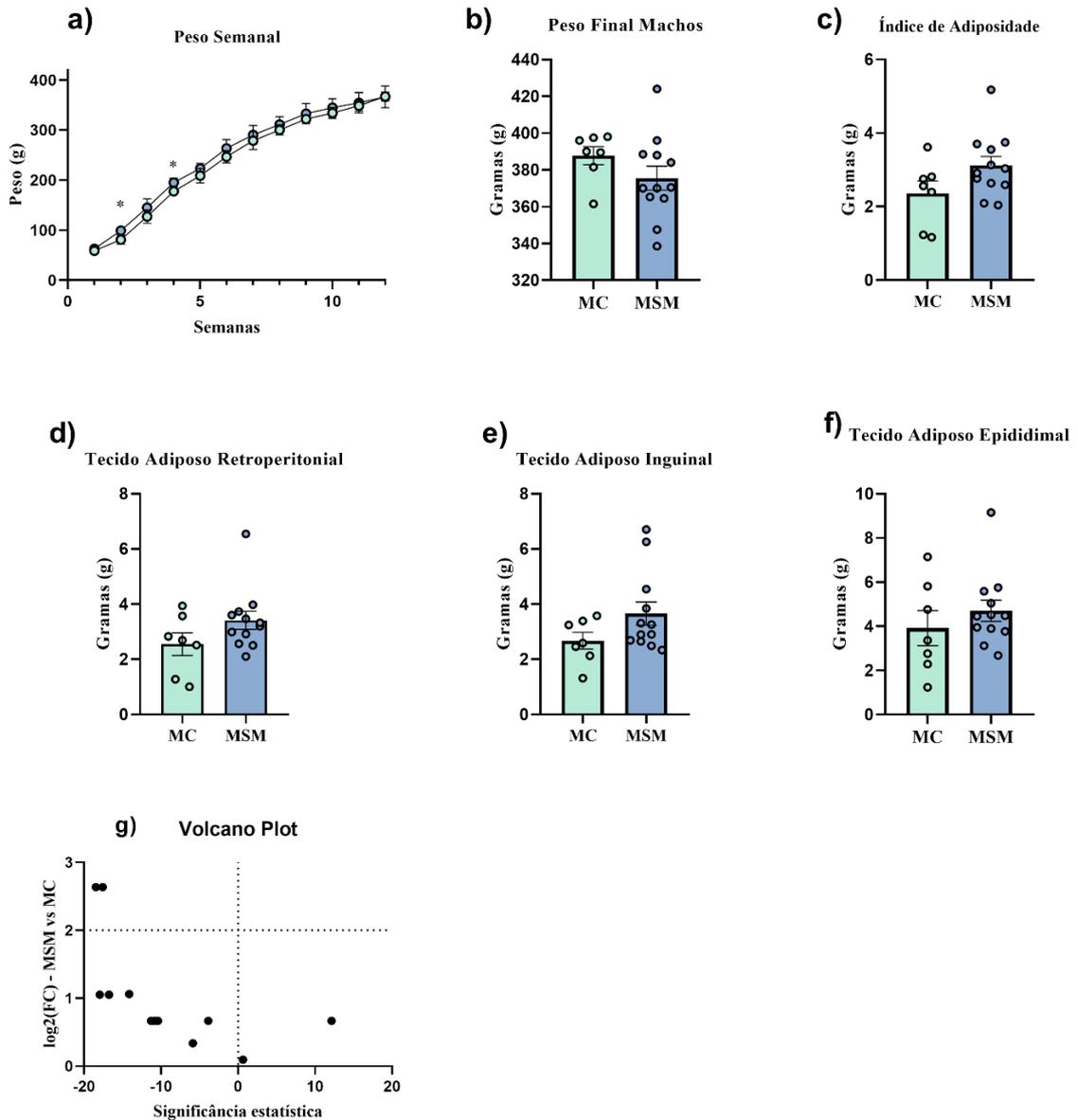
4.1 A separação materna de 13 dias impactou significativamente na evolução do peso semanal em ratos machos e no acúmulo de tecidos adiposos em fêmeas.

Machos submetidos ao protocolo de separação materna tiveram avaliados os seguintes parâmetros biométricos: peso final, ganho de peso semanal, tecidos adiposos epididimal, inguinal e retroperitoneal e o cálculo do índice de adiposidade.

Embora não tenha sido observada diferença no ganho de peso final entre os grupos, a separação materna por 13 dias resultou em diminuição significativa no ganho de peso semanal em momentos específicos, com interação observada na semana 2 pós-separação ($p < 0,0001$; Fig.3a) e na semana 4 pós-separação ($p=0,000333$; Fig.3a) em machos separados. Em relação ao acúmulo de gordura, não foram observadas alterações significativas no acúmulo dos tecidos

adiposos: retroperitoneal ($p=0,1209$; Fig.3d), inguinal ($p=0,1201$; Fig.3e), epididimal ($p=0,3755$; Fig.3f) ou no índice de adiposidade ($p=0,0849$; Fig.3c).

Figura 3 - Efeitos da separação materna sobre os parâmetros de massa corporal de ratos Wistar.

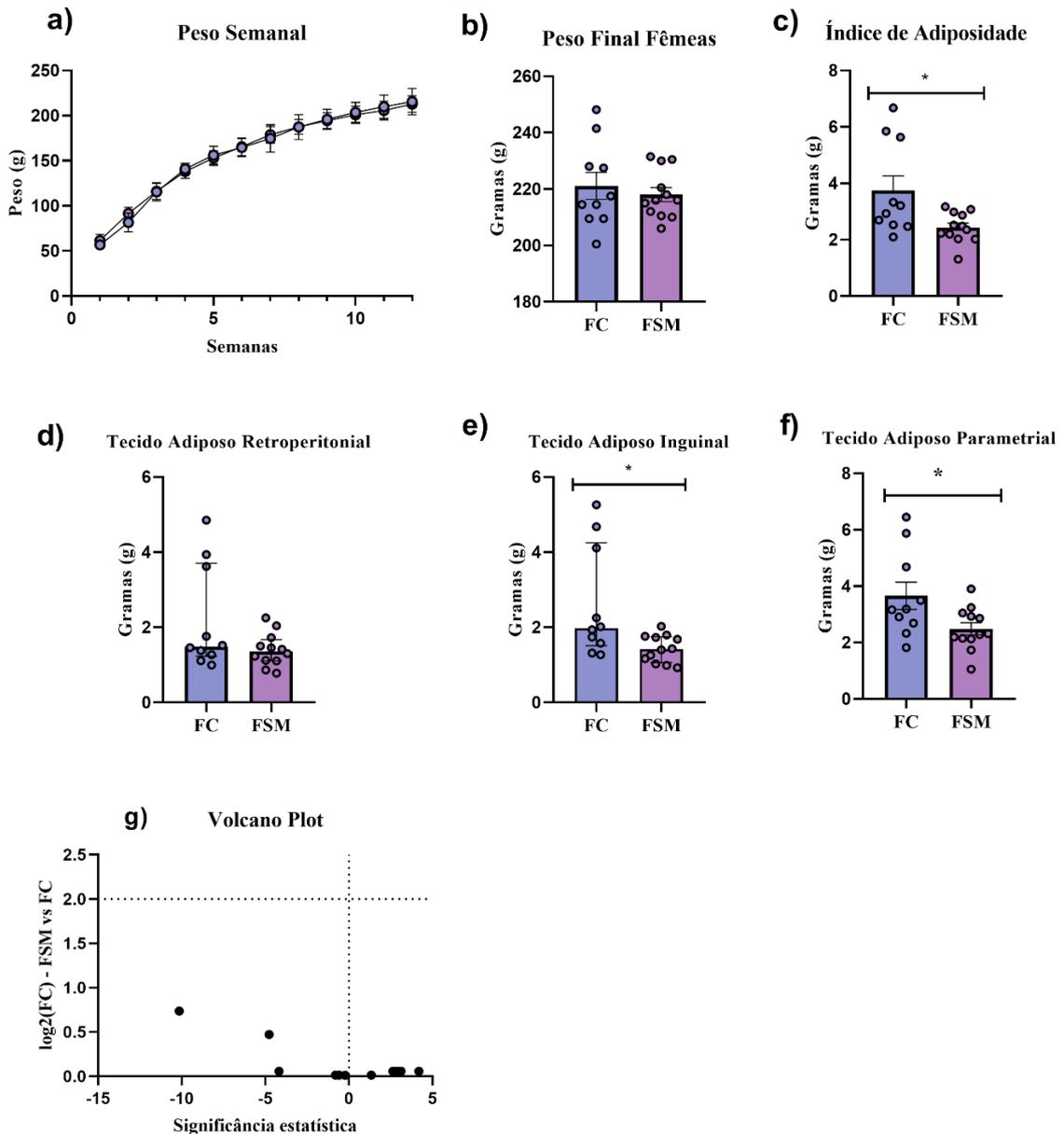


Legenda: a) Ganho de peso semanal. b) Peso final em gramas. c) Índice de adiposidade. d) Peso em gramas do tecido adiposo retroperitoneal e) Peso em gramas do tecido adiposo inguinal. f) Peso em gramas do tecido adiposo epididimal. g) Volcano plot com diferença significativa do ganho de peso semanal. MC: Machos Controle (n=7) MSM: Machos Separação Materna (n=10). *Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

Em fêmeas, a separação materna de 13 dias não foi capaz de demonstrar diferenças significativas no ganho de peso semanal, mas revelou uma redução no índice de adiposidade

($p=0,0176$; Fig.4c) e no peso dos tecidos adiposos inguinal ($p=0,0144$; Fig.4e) e parametrial ($p=0,0291$; Fig.4f) demonstrando sua influência na menor deposição de gordura em fêmeas submetidas ao protocolo de separação materna.

Figura 4 - Efeitos da separação materna sobre os parâmetros de massa corporal de ratas Wistar.



Legenda: a) Ganho de peso semanal. b) Peso final em gramas. c) índice de adiposidade d) Peso em gramas do tecido adiposo retroperitoneal. e) Peso em gramas do tecido adiposo inguinal. f) Peso em gramas do tecido adiposo parametrial. g) Volcano plot com diferença significativa do ganho de peso semanal. FC: Fêmeas Controle (n=10) FSM: Fêmeas Separação Materna (n=12). *Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

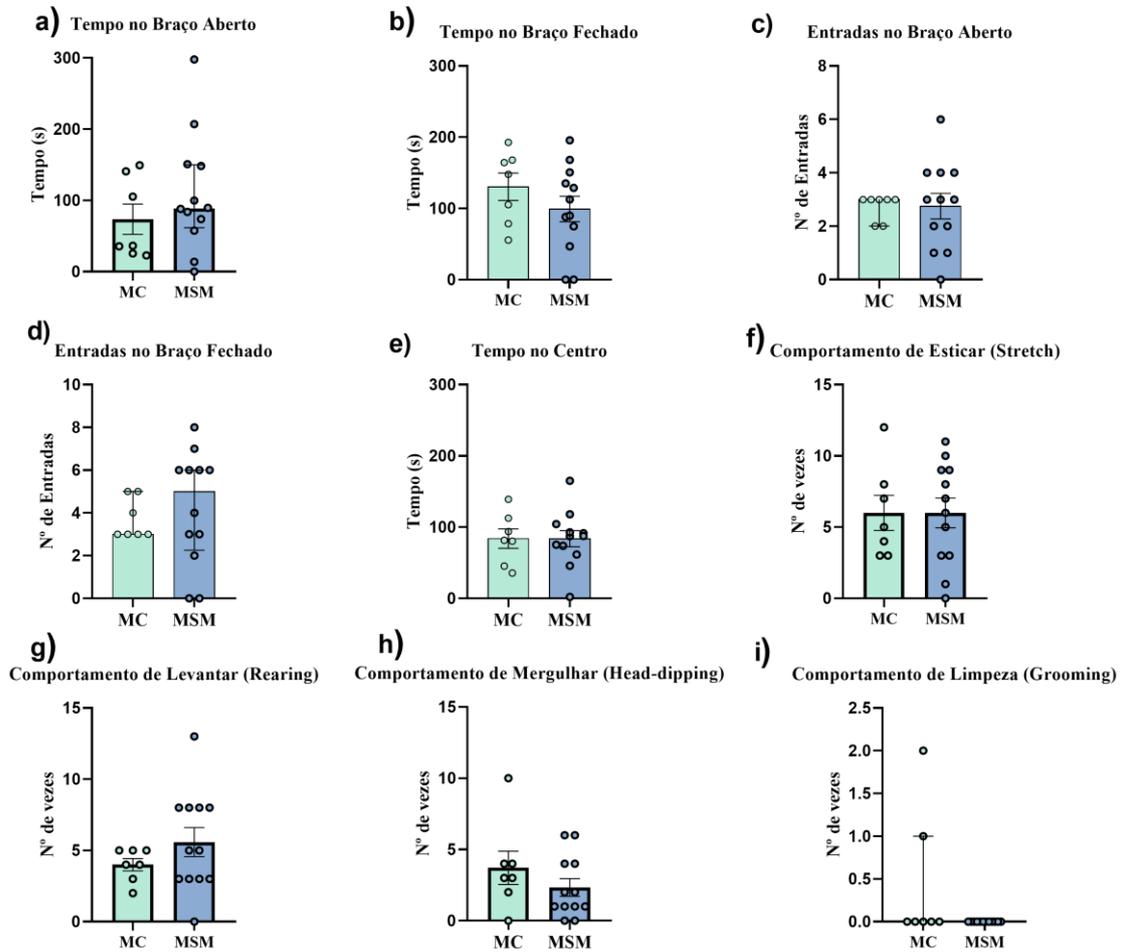
4.2 A separação materna por 13 dias induz ansiedade e aumento do tempo de avaliação de risco de forma sexo-específica, mas não altera comportamentos semelhantes à depressão em animais adultos jovens.

Com o intuito de analisar os efeitos da separação materna sobre as respostas comportamentais semelhantes à ansiedade e sobre comportamentos semelhantes à depressão em ratos e ratas Wistar, os animais foram submetidos aos testes Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Caixa Claro-Escuro (CCE), Campo Aberto (CA) e Splash Teste.

4.2.1 Labirinto em Cruz Elevado

Em relação às respostas semelhantes à ansiedade em machos no LCE, nosso protocolo não induziu alterações significativas em nenhum dos parâmetros analisados: Tempo no braço aberto ($p=0,3290$; Fig. 5a), tempo no centro ($p=0,9880$; Fig. 5e), tempo no braço fechado ($p=0,2775$; Fig. 5b), entradas no braço aberto ($p=0,8952$; Fig. 5c), entradas no braço fechado ($p=0,4875$; Fig. 5d), bem como nenhum dos comportamentos avaliados: Comportamento de esticar ($p>0,9999$; Fig. 5f), levantar ($p=0,2700$; Fig. 5g), mergulhar ($p=0,2655$; Fig. 5h), e tempo de autolimpeza ($p=0,1228$; Fig. 5i). Sendo assim, no teste LCE, a prole de machos não apresentou alterações nas respostas de ansiedade na fase adulta, apesar da separação materna durante a primeira infância.

Figura 5 - Efeitos da separação materna sobre o comportamento de ratos Wistar avaliados no LCE.

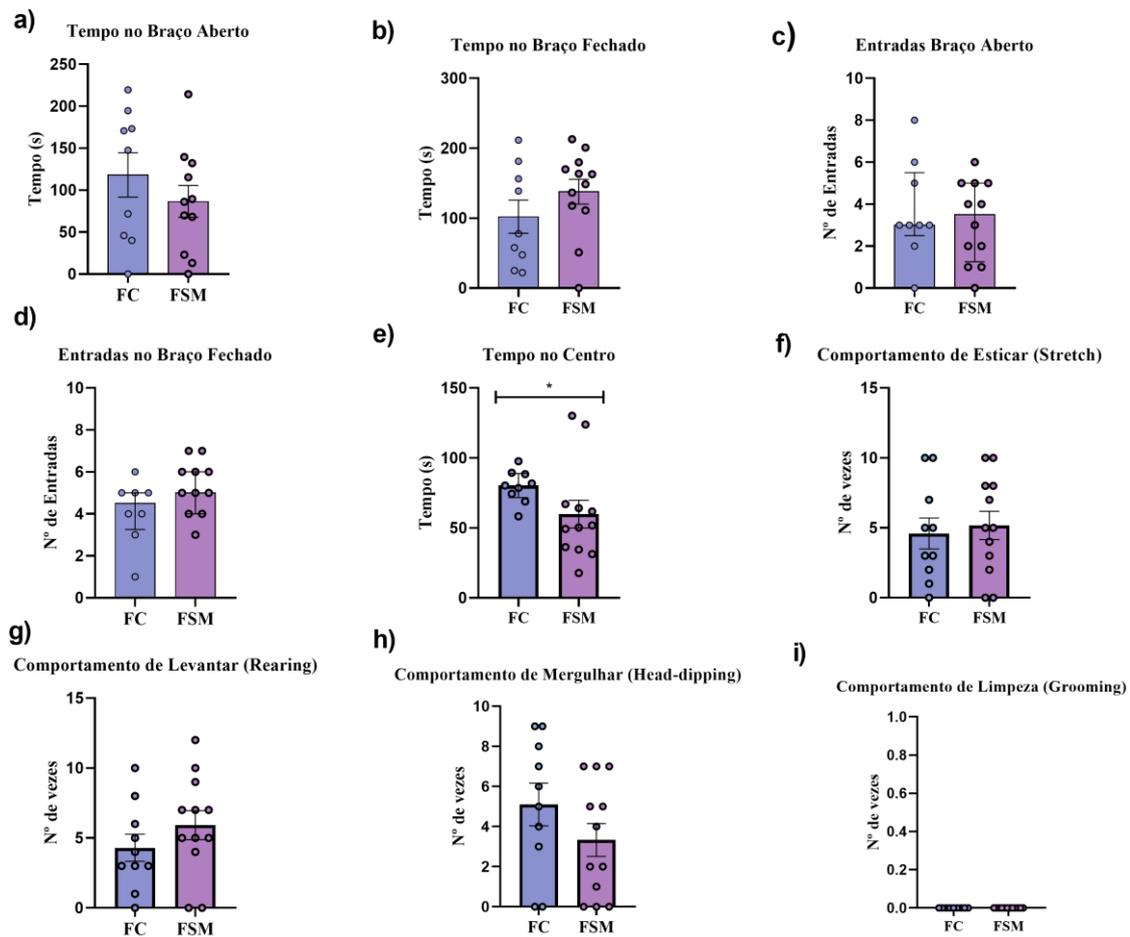


Legenda: a) Tempo no Braço Aberto. b) Tempo no Braço Fechado. c) Número de entradas no braço aberto. d) Número de entradas no Braço Fechado. e) Tempo no centro. f) Frequência do comportamento de se esticar (*Stretch*). g) Frequência do comportamento vertical (*Rearing*). h) Frequência do comportamento de mergulhar. i) Frequência do comportamento de limpeza (*Grooming*). MC: Machos Controle (n=7), MSM: Machos Separação Materna (n=10). *Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em mediana interquartil considerando o nível de significância $p < 0,05$.

Em relação as respostas do tipo ansiedade no LCE em fêmeas, nosso estudo encontrou alterações significativas no tempo de permanência no centro do aparato ($p=0,0184$; Fig. 6e) demonstrando a influência do protocolo no tempo de tomada de decisão em fêmeas. Entretanto, não houve diferenças significativas nos outros parâmetros analisados. Tempo no braço aberto ($p=0,3314$; Fig. 6a), tempo no braço fechado ($p=0,2303$; Fig. 6b), entradas no braço aberto ($p=0,7121$; Fig. 6c), entradas no braço fechado ($p=0,0944$; Fig. 6d), assim como nenhum dos comportamentos avaliados apresentou diferenças de frequência significativas: Comportamento

de esticar ($p=0,7099$; Fig. 6f), levantar ($p=0,2757$; Fig.6g), mergulhar ($p=0,1952$; Fig. 6h), e limpeza ($p>0,9999$; Fig. 6i). De maneira similar, fêmeas submetidas à SM apresentaram respostas comportamentais semelhantes às fêmeas do grupo controle, exceto pelo tempo de tomada de decisão inferior observado no grupo fêmeas separação materna.

Figura 6 - Efeitos da separação materna sobre o comportamento de ratas Wistar avaliados no LCE.



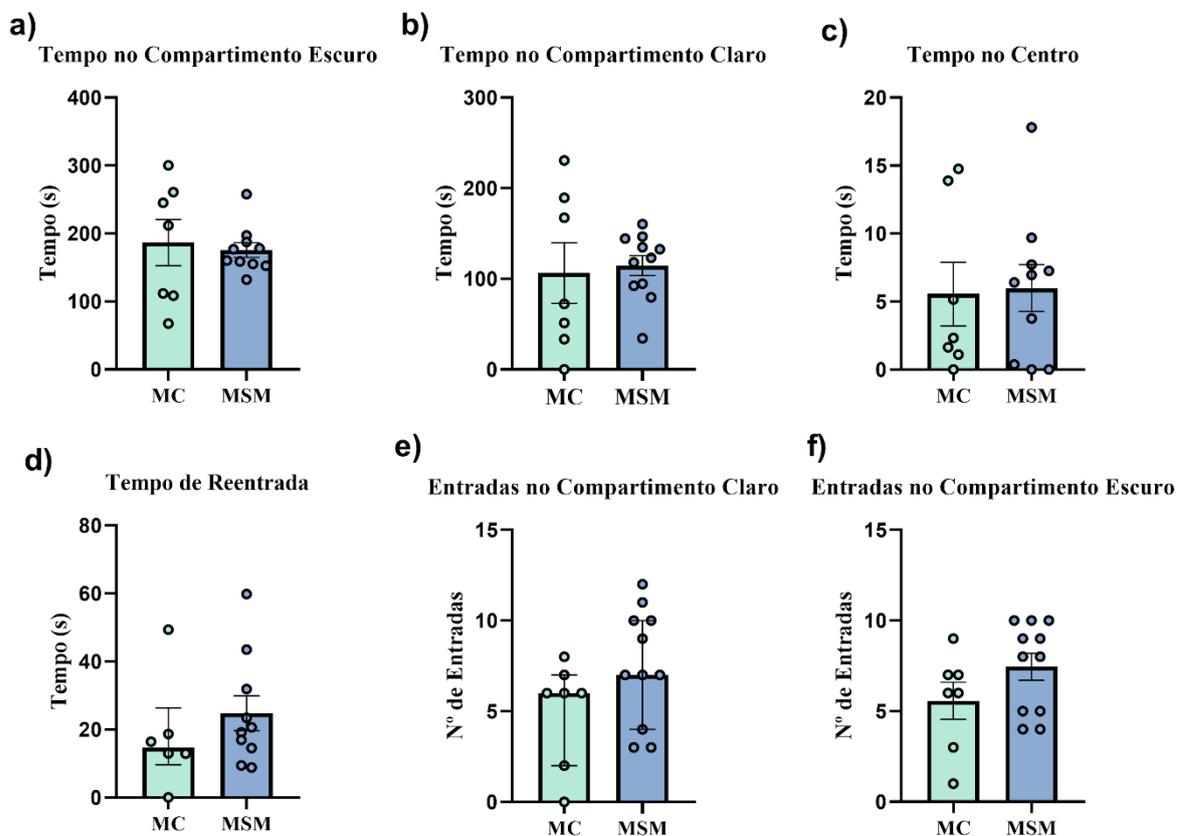
Legenda: a) Tempo no Braço Aberto. b) Tempo no Braço Fechado. c) Número de entradas no Braço Aberto. d) Número de entradas no Braço Fechado. e) Tempo no centro. f) frequência do comportamento de se esticar (*Stretch*). g) frequência do comportamento vertical (*Rearing*). h) frequência do comportamento de mergulhar. i) frequência do comportamento de limpeza (*Grooming*). FC: Fêmeas Controle (n=10), FSM: Fêmeas Separação Materna (n=12). *Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em média ± EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

4.2.2 Caixa Claro-Escuro

A análise da Caixa claro-escuro em machos não revelou diferenças significativas em relação ao tempo de permanência no compartimento escuro ($p=0,7287$; Fig.7a) e no compartimento claro ($p=0,7840$; Fig.7b), ou no número de entradas no compartimento claro ($p=0,0870$; Fig.7e), bem como no compartimento escuro ($p=0,1469$; Fig.7f). O teste também

não apontou diferença significativa no tempo de permanência no centro ($p=0,8790$; Fig.7c) ou no tempo de reentrada ($p=0,3132$; Fig.7d).

Figura 7 - Efeitos da separação materna sobre o comportamento de ratos Wistar avaliados no CCE.

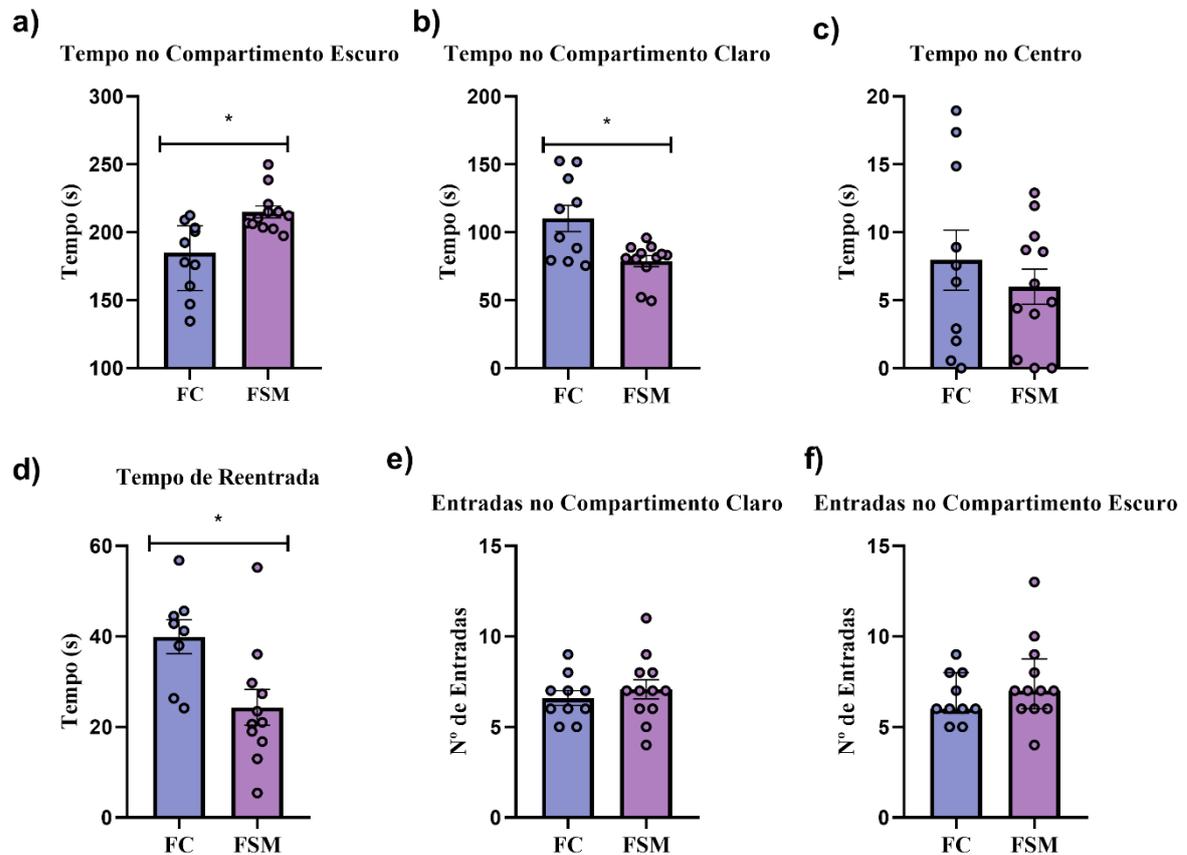


Legenda: a) Tempo de permanência no compartimento escuro. b) Tempo de permanência no compartimento claro. c) Tempo de permanência no centro. d) Tempo de reentrada, e) Número de entradas no compartimento claro. f) Número de entradas no compartimento escuro. MC: Machos Controle ($n=7$), MSM: Machos Separação Materna ($n=10$). *Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

A análise da Caixa claro-escuro em fêmeas revelou diferenças significativas em relação ao tempo de permanência no compartimento escuro ($p=0,0020$; Fig.8a), no tempo de reentrada ($p=0,0020$; Fig.8d), mas não apresentou alterações nos outros parâmetros: Entradas no compartimento claro ($p=0,0870$; Fig.8e), entradas no compartimento escuro ($p= 0,1469$; Fig.8f), tempo de permanência no compartimento claro ($p=0,0503$; Fig.8b) e tempo de permanência no centro ($p= 0,8790$; Fig.8c). O aumento no tempo no compartimento escuro, e menor tempo no compartimento claro é uma medida indicativa de maior ansiedade, reforçado

pelo tempo de reentrada menor no grupo SM, sugerindo que fêmeas apresentaram respostas comportamentais do tipo ansiedade na fase adulta após submissão ao protocolo de SM na primeira infância.

Figura 8 - Efeitos da separação materna sobre o comportamento de ratas Wistar avaliados no CCE.



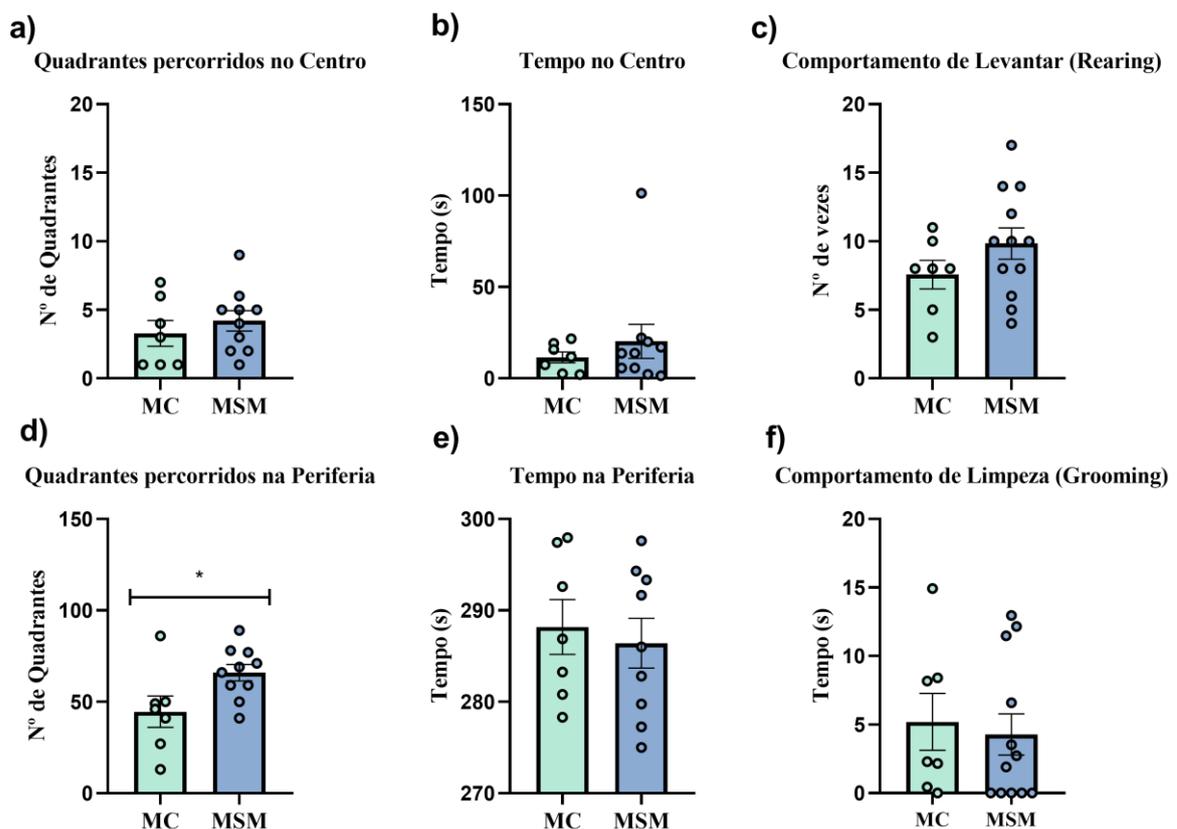
Legenda: a) Tempo de permanência no compartimento escuro. b) Tempo de permanência no compartimento claro. c) Tempo de permanência no centro. d) Tempo de reentrada. e) Número de entradas no compartimento claro. f) Número de entradas no compartimento escuro. FC: Fêmeas Controle (n=10), FSM: Fêmeas Separação Materna (n=12). * Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em média ± EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

4.2.3 Campo Aberto

Com base nos dados analisados pelo teste de Campo Aberto, foram observadas alterações significativas na quantidade de quadrantes percorridos pelos machos na periferia do aparato ($p=0,0300$; Fig.9d), mas não observamos outras alterações nos demais parâmetros

analisados: Quadrantes percorridos no centro ($p=0,4531$; Fig.9a), Tempo de permanência no centro ($p=0,4546$; Fig.9b), tempo de permanência na periferia ($p=0,6704$; Fig.9e), frequência do comportamento de limpeza ($p=0,7186$; Fig.9f), e frequência do comportamento de levantar ($p=0,1991$; Fig.9c). O maior número de quadrantes percorrido na periferia do aparato é sugestivo de maior exploração em uma porção mais protegida do aparato, podendo sugerir maior ansiedade.

Figura 9 - Efeito da Separação Materna sobre as respostas comportamentais de ratos Wistar avaliadas no CA.

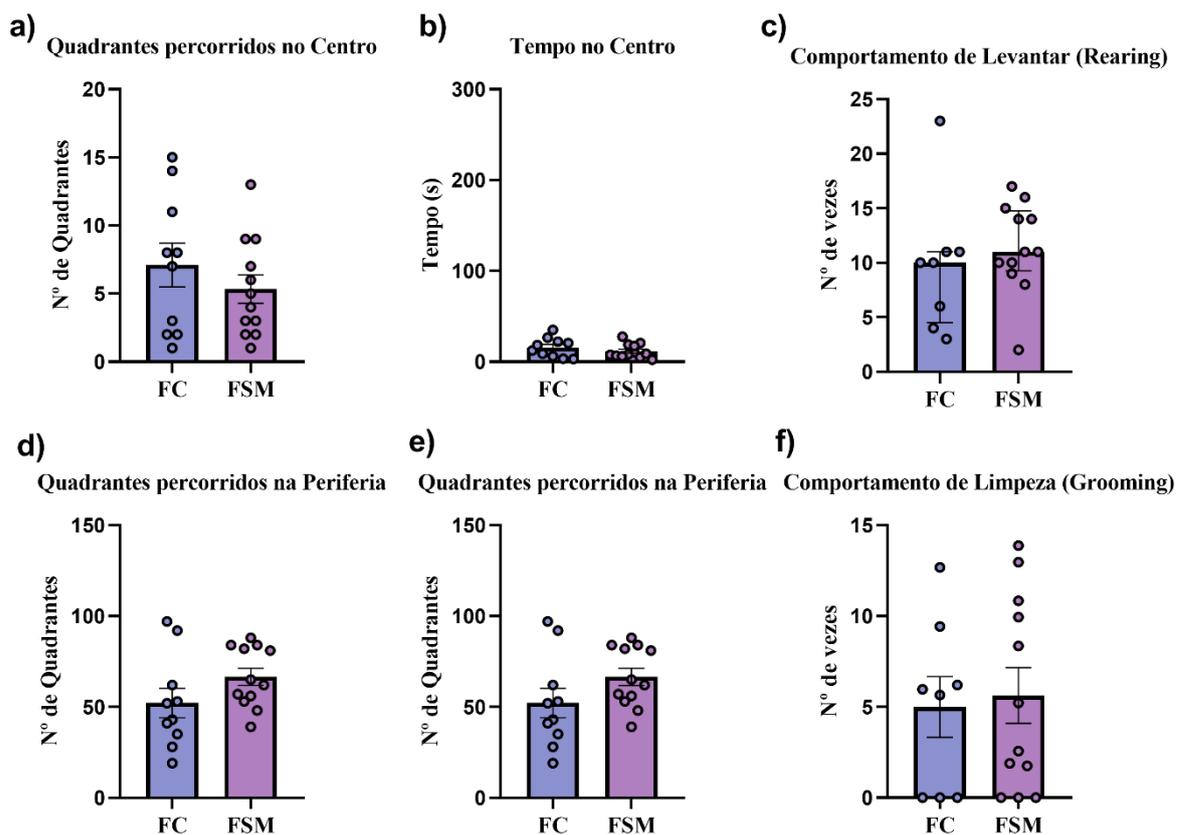


Legenda: a) Quadrantes percorridos no centro do aparato. b) Tempo de permanência no centro do aparato, c) frequência do comportamento vertical (*Rearing*) d) Quadrantes percorridos na periferia do aparato, e) Tempo de permanência na periferia do aparato, f) frequência do comportamento de limpeza (*grooming*). Legenda: MC: Machos Controle (n=7), MSM: Machos Separação Materna (n=10). * Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

Em relação as respostas defensivas comportamentais avaliadas pelo teste do campo aberto em fêmeas, o protocolo deste estudo não demonstrou alterações significativas em

nenhum dos parâmetros analisados: Quadrantes percorridos no centro ($p=0,3524$; Fig.10a), Tempo de permanência no centro ($p=0,3139$; Fig.10b), quadrantes percorridos na periferia do aparato ($p=0,1272$; Fig.10d), tempo de permanência na periferia ($p=0,3924$; Fig.9e), frequência do comportamento de limpeza ($p=0,7896$; Fig.10f), e frequência do comportamento de levantar ($p= 0,3307$; Fig.10c).

Figura 10 - Efeito da Separação Materna sobre as respostas comportamentais de ratas Wistar avaliadas no CA.

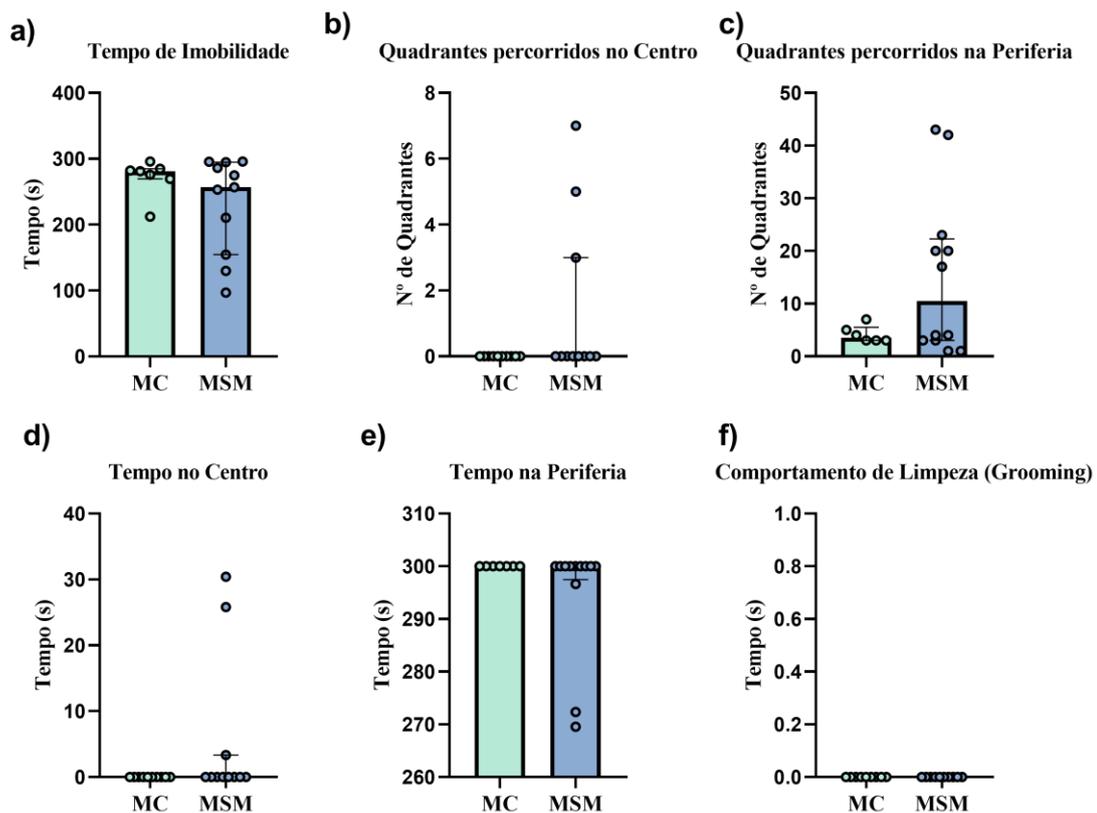


Legenda: a) Quadrantes percorridos no centro do aparato. b) Tempo de permanência no centro do aparato, c) frequência do comportamento vertical (*Rearing*) d) Quadrantes percorridos na periferia do aparato, e) Tempo de permanência na periferia do aparato, f) frequência do comportamento de limpeza (*Grooming*). FC: Fêmeas Controle (n=10), FSM: Fêmeas Separação Materna (n=12). * Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

4.2.4 Splash Teste

Em machos submetidos ao protocolo de separação materna de 13 dias, não foram observadas alterações significativas em nenhum dos parâmetros analisados: Tempo de imobilidade ($p=0,4252$; Fig.11a), Número de quadrantes percorridos no centro ($p= 0,2143$; Fig.11b), Número de quadrantes percorridos na periferia ($p=0,3627$; Fig.11c), tempo de permanência no centro ($p=0,2143$; Fig.11d), tempo de permanência na periferia ($p=0,2632$; Fig.11e) e frequência do comportamento de limpeza ($p>0,9999$; Fig.11f).

Figura 11 - Efeito da Separação Materna sobre as respostas comportamentais de ratos Wistar avaliadas no Splash teste.

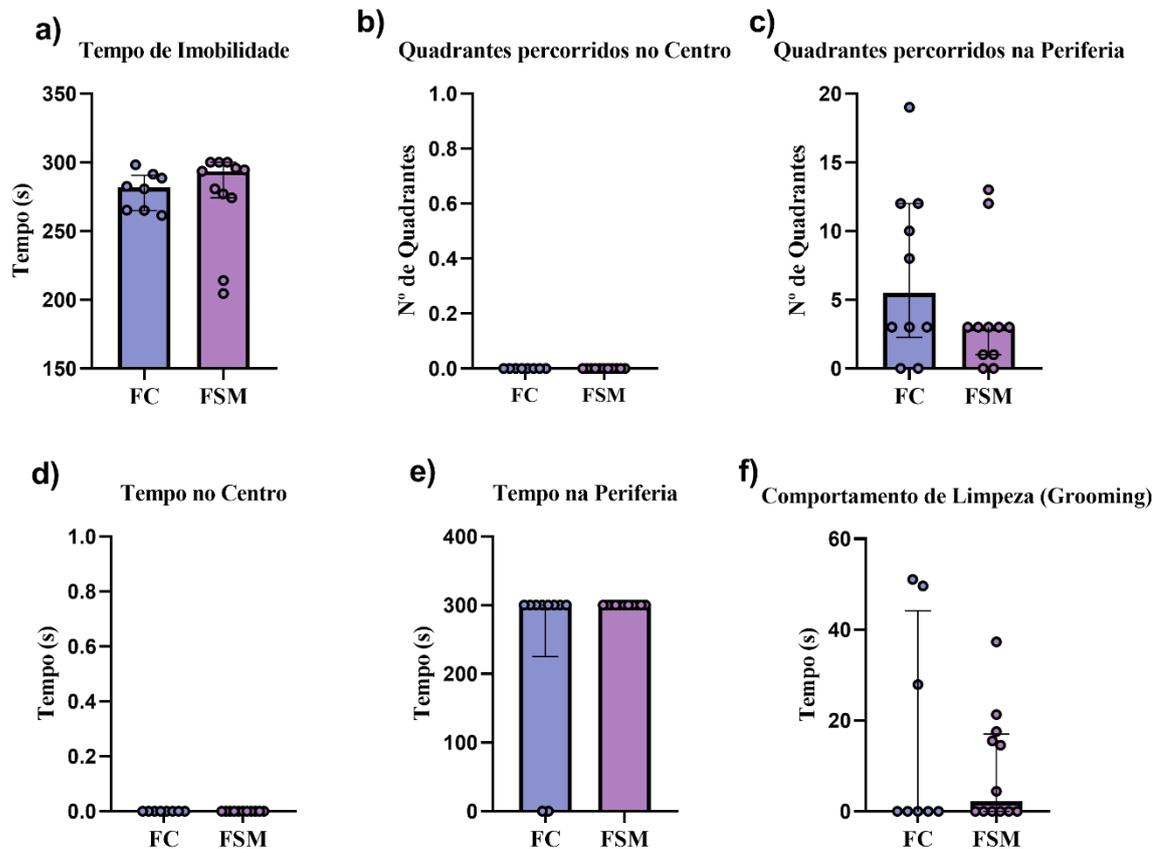


Legenda: a) Tempo de imobilidade. b) Quadrantes percorridos no centro do aparato. c) Quadrantes percorridos na periferia do aparato. d) Tempo de permanência no centro do aparato, e) Tempo de permanência na periferia do aparato, f) frequência do comportamento de limpeza (*Grooming*). MC: Machos Controle (n=7), MSM: Machos Separação Materna (n=10). * Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em mediana interquartil considerando o nível de significância $p < 0,05$.

Em relação aos resultados do Splash teste em fêmeas submetidas ao protocolo de separação materna de 13 dias, também não foram observadas alterações significativas em nenhum dos parâmetros analisados: Tempo de imobilidade ($p=0,4411$; Fig.12a), Número de quadrantes percorridos no centro ($p>0,9999$; Fig.12b), número de quadrantes percorridos na

periferia ($p=0,3021$; Fig.12c), tempo de permanência no centro ($p>0,9999$; Fig.12d), tempo de permanência na periferia ($p=0,2143$; Fig.12e) e frequência do comportamento de limpeza ($p=0,9067$; Fig.12f).

Figura 12- Efeito da Separação Materna sobre as respostas comportamentais de ratas Wistar avaliadas no Splash teste.



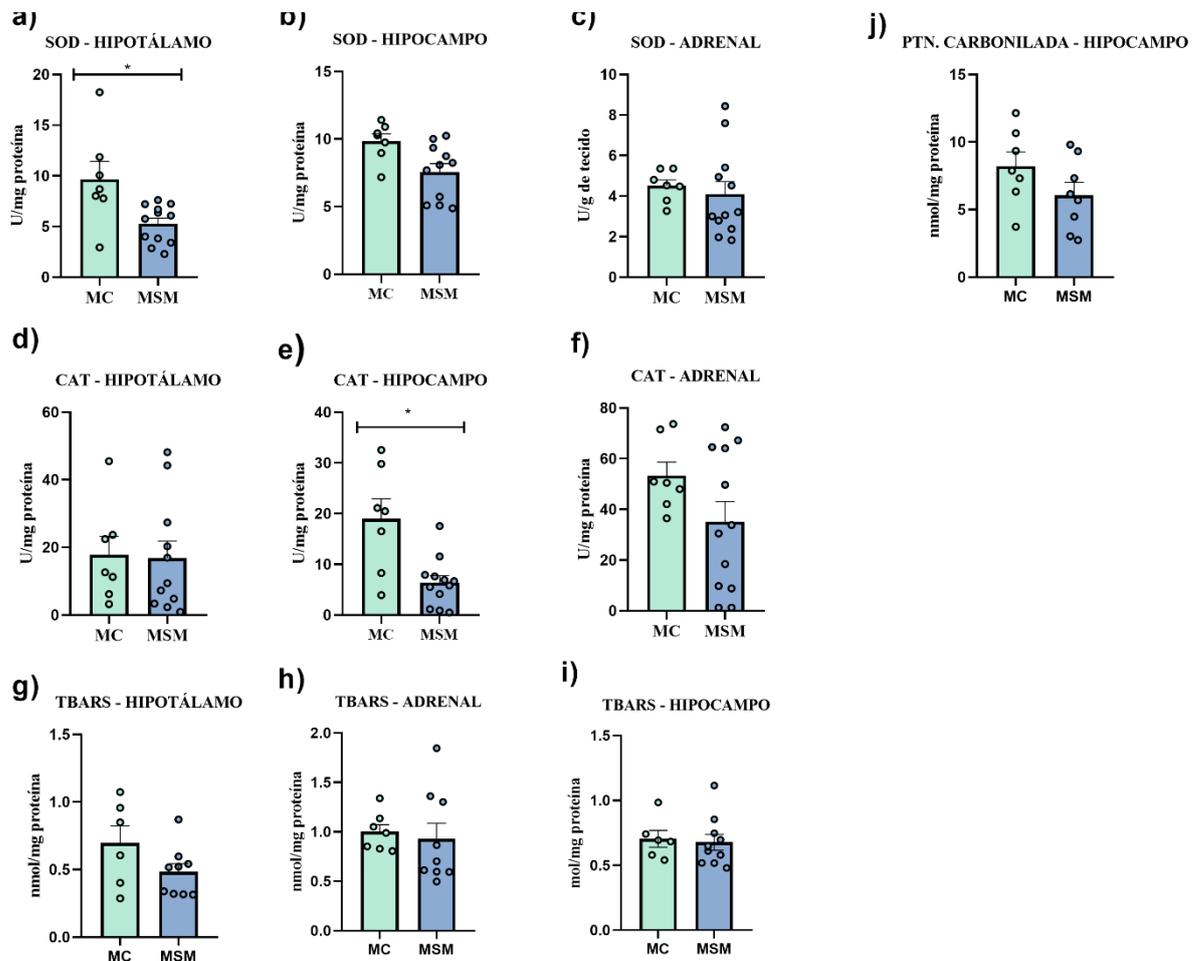
Legenda: a) Tempo de imobilidade. b) Quadrantes percorridos no centro do aparato. c) Quadrantes percorridos na periferia do aparato. d) Tempo de permanência no centro do aparato, e) Tempo de permanência na periferia do aparato, f) Frequência do comportamento de limpeza (*Grooming*). FC: Fêmeas Controle (n=10), FSM: Fêmeas Separação Materna (n=12). *Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em mediana interquartil considerando o nível de significância $p < 0,05$.

4.3 Efeitos da separação materna de 13 dias sobre o estado REDOX em ratos e ratas Wistar.

4.3.1 Machos submetidos a SM por 13 apresentaram redução de marcadores de defesa oxidativa, enquanto fêmeas apresentaram aumento da defesa oxidativa associada a dano lipídico em regiões encefálicas.

Em machos, nosso estudo encontrou diferenças significativas nos níveis de SOD no hipotálamo ($p=0,0097$; Fig. 13a) e no hipocampo ($p=0,0196$; Fig.13b). Também foram observadas alterações nos níveis de CAT no hipocampo ($p=0,0021$; Fig. 13e). Em relação aos marcadores de dano oxidativo, não foram encontradas alterações significativas nos marcadores analisados. Neste sentido, machos adultos que sofreram SM durante a primeira infância apresentam redução das enzimas antioxidantes em núcleos encefálicos limitantes da organização da resposta comportamental relacionada à ansiedade, sem necessariamente apresentarem aumento do dano lipídico ou proteico nessas mesmas regiões.

Figura 13 - Efeito da Separação Materna sobre as enzimas de defesa antioxidante e marcadores de dano oxidativo sobre o hipocampo, hipotálamo e a glândula adrenal de ratos Wistar.



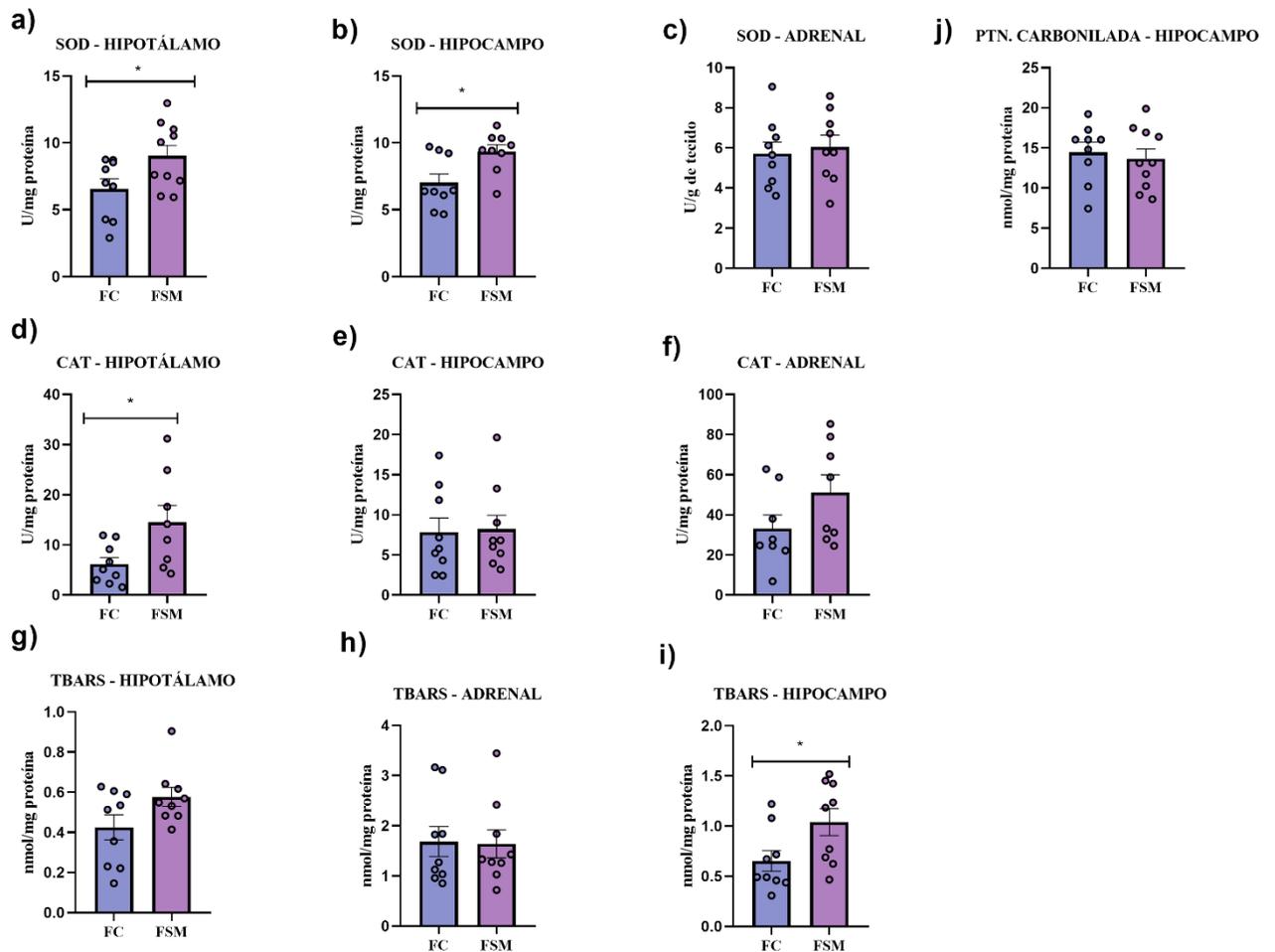
Legenda: a) Atividade da SOD no hipotálamo b) Atividade da SOD no hipocampo. c) Atividade da SOD na glândula adrenal d) Atividade da Catalase no hipotálamo e) Atividade da Catalase no hipocampo. f) Atividade da Catalase na glândula adrenal. g) Nível de TBARS no hipotálamo h) Nível de TBARS na glândula adrenal. i) Nível de TBARS no hipocampo. j) Nível de proteína carbonilada no hipocampo MC: Machos Controle (n=7), MSM: Machos Separação Materna (n=10). *Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em média ± EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

Em fêmeas, nosso estudo encontrou diferenças significativas também nos níveis de SOD no hipotálamo ($p=0,0097$; Fig. 14a) e no hipocampo ($p=0,0091$; Fig. 14b) e alterações nos níveis de CAT no hipotálamo ($p=0,0021$; Fig. 14d). Em relação aos marcadores de dano oxidativo, foram encontradas alterações significativas no hipocampo de fêmeas submetidas ao protocolo de separação materna.

De forma contrária ao observado em machos, as enzimas antioxidantes se apresentam aumentadas no hipotálamo e hipocampo de fêmeas, com aumento do dano lipídico hipocampal,

sugerindo que o aumento das enzimas antioxidantes está atuando diretamente no combate de um possível aumento do dano oxidativo lipídico.

Figura 14- Efeito da Separação Materna sobre as enzimas de defesa antioxidante e marcadores de dano oxidativo sobre o hipocampo, hipotálamo e a glândula adrenal de ratas Wistar.

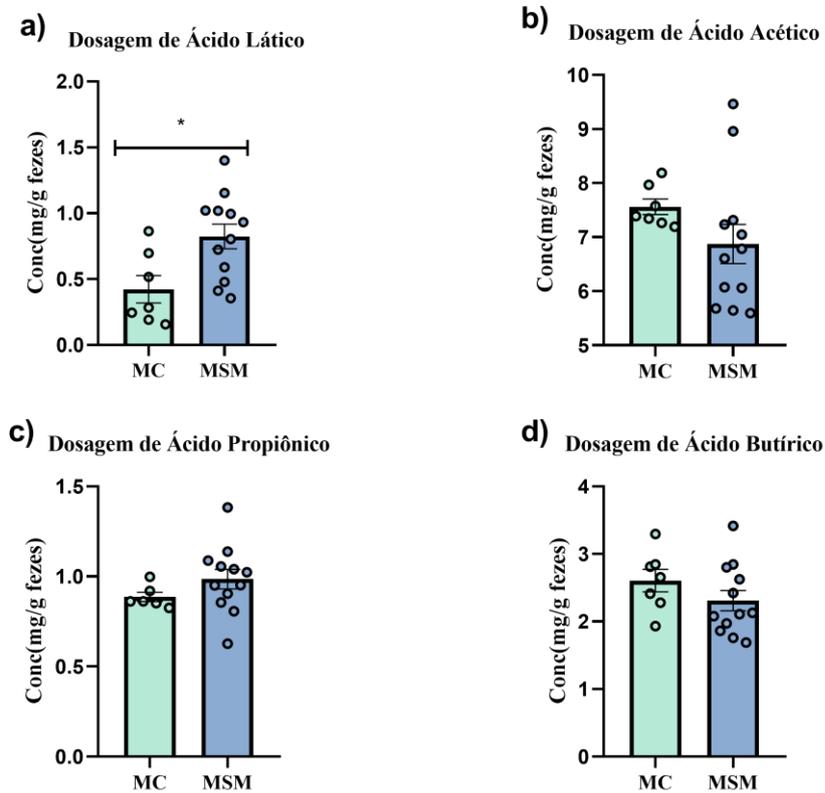


Legenda: a) Atividade da SOD no hipotálamo b) Atividade da SOD no hipocampo. c) Atividade da SOD na glândula adrenal d) Atividade da Catalase no hipotálamo e) Atividade da Catalase no hipocampo. f) Atividade da Catalase na glândula adrenal. g) Nível de TBARS no hipotálamo h) Nível de TBARS na glândula adrenal. i) Nível de TBARS no hipocampo. j) Nível de proteína carbonilada no hipocampo. FC: Fêmeas Controle (n=10), FSM: Fêmeas Separação Materna (n=12). *Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em média ± EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

4.4 A SM por 13 dias na primeira infância modifica de forma branda os metabólitos intestinais durante a fase adulta de ratos, mas não de ratas.

Em machos, a dosagem de ácidos graxos de cadeia curta revelou um aumento significativo na concentração de ácido láctico dos machos separados em relação aos machos controle ($p=0,0133$; Fig.15a), diferente dos demais ácidos que não apresentaram diferenças significativas: Ácido acético ($p=0,1799$; Fig.15b), ácido propiônico ($p=0,2328$; Fig.15c) e ácido butírico ($p=0,2268$; Fig.15d).

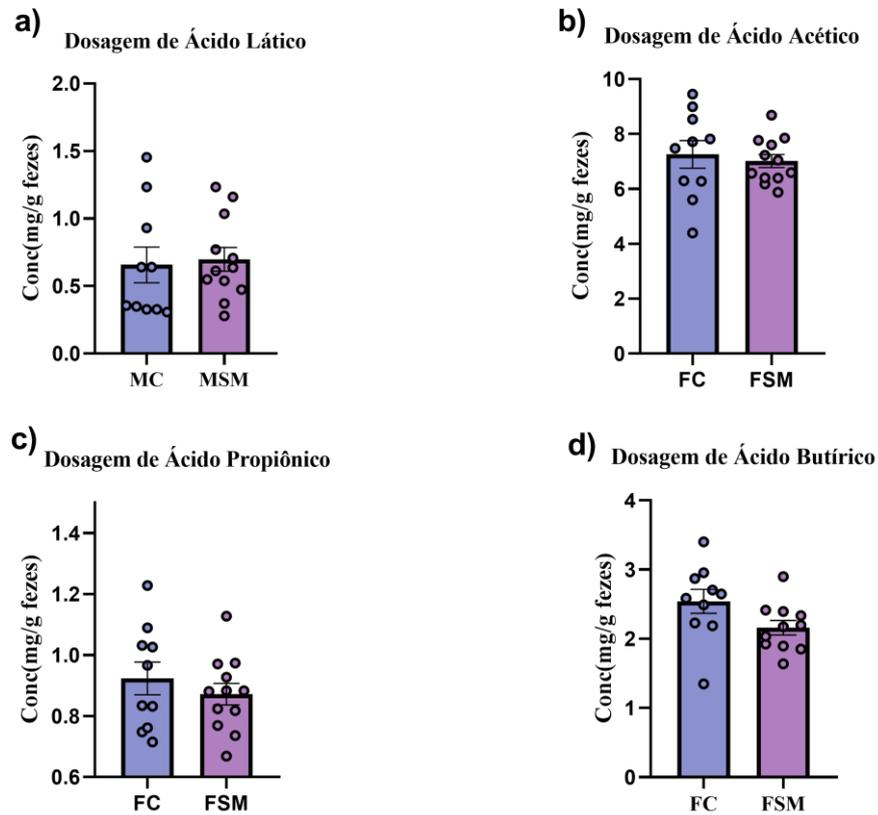
Figura 15 - Efeitos da Separação Materna sobre a concentração de Ácidos Graxos de Cadeia Curta de ratos Wistar.



Legenda: a) Dosagem de ácido láctico b) Dosagem de ácido acético, c) Dosagem de ácido propiônico, d) Dosagem de ácido butírico. MC: Machos Controle (n=7), MSM: Machos Separação Materna (n=10). * Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

Em fêmeas, não foram observadas alterações significativas em nenhum dos ácidos analisados: Ácido láctico ($p=0,5824$; Fig. 16a), ácido acético ($p=0,6520$; Fig. 16b), ácido propiônico ($p=0,4196$; Fig. 16c) e ácido butírico ($p=0,0691$; Fig. 16d).

Figura 16 - Efeitos da Separação Materna sobre a concentração de Ácidos Graxos de Cadeia Curta de ratas Wistar.



Legenda: a) Dosagem de ácido láctico b) Dosagem de ácido acético. c) Dosagem de ácido propiônico d) Dosagem de ácido butírico. FC: Fêmeas Controle (n=10), FSM: Fêmeas Separação Materna (n=12). * Diferença estatística entre os grupos controle e separação. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Foram investigados os efeitos da separação materna durante 13 dias sobre a regulação comportamental e parâmetros biométricos de ratos e ratas Wistar, com a finalidade de demonstrar alterações provenientes da privação materna na primeira infância. Neste estudo, usamos o protocolo de Separação Materna (SM) de 3h diárias e os pontos mais relevantes encontrados demonstraram que a SM: (I) promoveu redução significativa no ganho de peso corporal em semanas específicas em machos separados; (II) resultou na diminuição dos depósitos de tecidos adiposos abdominais e no índice de adiposidade em fêmeas separadas; (III) promoveu o fenótipo de ansiedade e diminuiu a avaliação do tempo de exposição ao risco em fêmeas; (IV) desencadeou alterações em marcadores de defesa antioxidante (SOD e CAT) em ambos os sexos (reduzidos em machos e aumentados em fêmeas) no hipocampo e hipotálamo, além do aumento de dano oxidativo (TBARS) no hipocampo das fêmeas; e (V) induziu aumento na concentração de ácido lático nas fezes cecais de machos separados. Em síntese, os resultados obtidos ampliam a compreensão, sob uma perspectiva diferenciada por sexo, dos mecanismos pelos quais a separação materna na fase inicial da vida modula respostas fisiológicas e comportamentais, possibilitando a análise de seus efeitos na idade adulta. As evidências apontam que a SM promove modificações neurobiológicas, ajustes no sistema antioxidante, dano oxidativo, alterações nos perfis de metabólitos intestinais e mudanças comportamentais que se expressam de forma sexo-dependente.

Parâmetros biométricos

Em machos, a separação materna resultou em menor ganho de peso nas semanas 2 e 4 pós-nascimento. No entanto, esse efeito não se manteve consistente até a fase adulta, já que não foram observadas diferenças significativas no peso corporal final entre os machos controle e separação, sugerindo uma recomposição corporal pós estresse infantil. Não observamos também alteração no depósito de tecidos adiposos de machos separados na fase adulta. Ainda não há consenso na literatura quanto aos efeitos da separação materna sobre o peso corporal de ratos. Iwasaki et al., 2000 relataram uma redução no ganho de peso semanal em machos submetidos a esse tipo de estressor neonatal, em comparação aos animais do grupo controle (Iwasaki et al., 2000). Por outro lado, há evidências de que a separação materna pode provocar efeitos diferentes, como aumento da ingestão alimentar, maior acúmulo de gordura abdominal, elevação dos níveis de triglicérides e aumento no ganho de peso corporal em ratos machos (Bernardi et al., 2013; Jahng, 2011). Em contraste, um estudo que utilizou um protocolo de separação de 4 horas diárias não identificou alterações significativas no peso de machos ou

fêmeas submetidos a separação (Zeng et al., 2021). Essas divergências sugerem que os efeitos da separação materna sobre parâmetros biométricos podem ser modulados por fatores como sexo, linhagem, duração e características do protocolo adotado, além das condições ambientais envolvidas.

Embora o presente estudo não tenha investigado diretamente os mecanismos responsáveis por essas alterações biométricas, a literatura oferece hipóteses que podem contribuir para a compreensão dos achados. Estudos sugerem que a separação materna promove alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), levando à sua hiperativação em fases críticas do neurodesenvolvimento (Loi et al., 2014; Ou-Yang, et al., 2022; Lupien et al., 2009). Essa ativação crônica resulta em níveis elevados de corticosterona, hormônio com efeitos catabólicos e anorexígenos, o que contribui para a redução do comportamento alimentar e do acúmulo de massa corporal (Lajud & Torner, 2015). Além disso, outros mecanismos descritos na literatura podem estar envolvidos. A separação materna pode comprometer a integridade da barreira intestinal, prejudicando a absorção de nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento (Söderholm et al., 2002). Também se observa, em modelos de protocolo semelhantes, uma menor ingestão alimentar em ratos adolescentes, possivelmente associada a alterações nos níveis de leptina no período neonatal e sua influência na expressão do neuropeptídeo Y (NPY), no núcleo arqueado do hipotálamo, um dos principais reguladores do comportamento alimentar (Wertheimer et al., 2016). Outra hipótese considera a possível supressão do hormônio do crescimento (GH) em decorrência das separações prolongadas e alterações nas interações mãe-filhote juntamente com a diminuição da oferta de leite materno, que também podem impactar o crescimento. (McIntosh; Anisman; Merali, 1999).

Importante destacar que tal déficit no ganho de peso, de forma intensa, pode ter conseqüências significativas no desenvolvimento fisiológico e comportamental, uma vez que evidências mostram que a desnutrição no início da vida pode alterar permanentemente a estrutura, fisiologia e metabolismo corporal e levar a distúrbios crônicos mais tarde na vida, além de resultar em menor resistência física e maior vulnerabilidade a estressores futuros (Engelbregt et al., 2004). Além disso, o déficit de peso pode refletir alterações na disponibilidade de nutrientes essenciais durante uma janela crítica de plasticidade neural, o que pode afetar a programação do comportamento, incluindo respostas ao estresse e regulação emocional (Andersen, 2003).

Nas fêmeas, não foi observada redução no ganho de peso semanal, uma vez que tanto o ganho ponderal quanto o peso corporal final permaneceram semelhantes entre os grupos ao longo de todo o período analisado. Esses dados sugerem uma possível resposta sexo-específica ao estresse neonatal em relação ao peso corporal. No entanto, apesar da ausência de diferenças

significativas no peso, a separação materna resultou em menor depósito de tecido adiposo e redução no índice de adiposidade, indicando uma modulação do metabolismo lipídico que ocorre de forma independente da massa corporal total. Essa resposta pode estar relacionada a uma maior sensibilidade das fêmeas à ativação prolongada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), o que pode provocar alterações persistentes no perfil lipogênico e na regulação hormonal do tecido adiposo, mesmo na ausência de alterações de peso (Loi et al., 2014). Em contrapartida, alguns estudos relataram aumento na deposição de gordura em fêmeas submetidas à separação materna, especialmente quando expostas a uma dieta hiperlipídica (Murphy et al., 2012). Outros estudos não encontraram alterações nos depósitos adiposos em fêmeas, mas identificaram esse efeito em machos submetidos ao mesmo estressor, reforçando a hipótese de uma resposta diferencial entre os sexos (Moyer-Mileur et al., 2011). A redução dos depósitos de gordura observada neste estudo pode refletir uma alteração relevante no equilíbrio energético e hormonal das fêmeas, considerando que o tecido adiposo desempenha papel fundamental como órgão endócrino na regulação do metabolismo sistêmico (Kershaw; Flier, 2004).

Estresse Oxidativo

Neste estudo, foram identificadas alterações no sistema enzimático antioxidante de ratos e ratas submetidos à privação materna. Em machos, observou-se redução significativa da atividade da superóxido dismutase (SOD) no hipotálamo e da catalase (CAT) no hipocampo, indicando um comprometimento da defesa antioxidante em regiões-chave para a regulação do estresse e do comportamento emocional.

A menor atividade de SOD no hipotálamo sugere uma capacidade reduzida de neutralização de radicais superóxido, favorecendo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) e um possível aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo em um núcleo central para a modulação do eixo HHA. Resultados semelhantes foram relatados por Malcon et al. (2020), que também identificaram redução da atividade de SOD no hipotálamo de machos submetidos à separação materna, sem alterações equivalentes em fêmeas, sugerindo uma vulnerabilidade sexualmente dimórfica ao estresse neonatal e indicando que machos podem ser mais suscetíveis a desequilíbrios redox em estruturas cerebrais críticas para a resposta ao estresse.

A diminuição da atividade de catalase no hipocampo de machos separados observada em nosso estudo pode contribuir para o potencial acúmulo de peróxido de hidrogênio, o que pode aumentar a vulnerabilidade ao dano oxidativo em uma região sensível ao estresse e essencial para a consolidação da memória e regulação emocional (Malcon et al., 2020). Essa

disfunção antioxidante foi previamente relatada por estudos que demonstraram reduções da atividade de CAT ao longo do desenvolvimento em ratos expostos à separação materna, mesmo na ausência de alterações sistêmicas detectáveis no plasma (Réus et al., 2018).

As enzimas antioxidantes SOD e CAT desempenham papel central na neutralização de EROs, sendo que o desequilíbrio dessas enzimas pode refletir um aumento do estresse oxidativo celular (Maes et al., 2011). Esses achados reforçam a hipótese de que a privação materna exerce efeitos regionais específicos no cérebro, particularmente em áreas associadas à resposta ao estresse. Complementarmente, embora alguns estudos não tenham detectado alterações clássicas em marcadores oxidativos como peróxido de hidrogênio, glutatona, proteína carbonilada e peroxidação lipídica, foi demonstrado que a separação materna prolongada modula a expressão de proteínas envolvidas em vias de morte celular, como apoptose e autofagia, nas regiões do córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo, alterações que podem persistir até a idade adulta e influenciar a reatividade ao estressor (Drastichova et al., 2021). Apesar do modelo de SM aplicado neste estudo demonstrar uma redução da atividade de SOD e CAT, não foram observadas alterações nos marcadores de dano oxidativo, sugerindo que potenciais efeitos nocivos foram controlados pelas defesas antioxidantes em machos separados.

Nas fêmeas submetidas à SM, observou-se um aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD no hipocampo e no hipotálamo, bem como da CAT no hipocampo, sugerindo uma ativação compensatória do sistema antioxidante frente ao estressor precoce. Tal resposta enzimática parece refletir uma tentativa do organismo de neutralizar o acúmulo de EROs induzido pela adversidade neonatal. No entanto, apesar dessa resposta adaptativa, foi detectado um aumento significativo nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo, marcador clássico de peroxidação lipídica, indicando que a elevação da atividade antioxidante não foi suficiente para impedir o dano oxidativo celular (Marković et al., 2017).

Esses resultados apontam para a coexistência de mecanismos de defesa antioxidante e de dano oxidativo, evidenciando um desequilíbrio redox nas fêmeas expostas à SM. O cérebro, por sua elevada taxa de consumo de oxigênio e alto conteúdo lipídico, é especialmente vulnerável ao estresse oxidativo. Esse intenso metabolismo favorece a geração excessiva de radicais livres, contribuindo não apenas para o aumento do dano lipídico, mas também para disfunções na neurotransmissão, particularmente nos sistemas serotoninérgico e glutamatérgico, fundamentais para a regulação emocional e cognitiva (Réus et al., 2018).

Assim como em nosso estudo, Uysal et al. (2005) relataram uma elevação na atividade da SOD acompanhada de aumento nos níveis de TBARS em regiões encefálicas, indicando intensificação da peroxidação lipídica. Embora não tenhamos investigado a via da glutatona,

autores sugerem que o aumento isolado da SOD, sem correspondente elevação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx), compromete a conversão adequada do peróxido de hidrogênio em água. Esse acúmulo de peróxido, subproduto da ação da SOD, favorece a formação de radicais hidroxila altamente reativos, o que pode exacerbar o dano oxidativo. Em contrapartida, Azuma, Minami e Nishi (2020) demonstraram que, em camundongos fêmeas, a separação materna neonatal por 3 horas afeta especificamente a via da GPx, sem alterações na atividade da SOD no hipocampo. Outros estudos encontraram aumento da atividade da SOD e da peroxidação lipídica em áreas cerebrais de machos separados, mas não em fêmeas, sugerindo, no caso das fêmeas, um possível efeito modulador dos estrogênios sobre os sistemas antioxidantes (Marković, 2017; Miura, Muraoka & Ogiso, 1996). Tomadas em conjunto, essas evidências sugerem que a SM compromete os sistemas antioxidantes cerebrais de maneira diferenciada entre sexos e regiões encefálicas.

Respostas defensivas comportamentais

Os efeitos da privação materna sobre comportamentos do tipo ansioso permanecem controversos na literatura, variando de acordo com o protocolo de separação empregado, o sexo dos animais e a idade em que são avaliados (Lehmann & Feldon, 2000; Wang et al., 2020). Cabe ressaltar que o termo *Separação Materna* pode assumir diferentes significados nos estudos experimentais: enquanto algumas abordagens se restringem à separação entre a mãe e sua ninhada, outras incluem também o isolamento entre os próprios filhotes, com o objetivo de romper simultaneamente o vínculo materno e de irmãos de ninhada (Hulshof et al., 2011), como realizado neste estudo. Outro ponto relevante é que diferentes testes comportamentais utilizados em modelos animais podem revelar distintas dimensões da ansiedade, o que contribui para a variabilidade dos achados observados (Belzung & Le Pape, 1994).

Em nosso estudo, observamos um efeito distinto da separação materna sobre o comportamento emocional de ratas e ratos. Em machos submetidos à separação não identificamos indicadores típicos de ansiedade no teste de Labirinto em Cruz Elevado ou na Caixa Claro Escuro, no entanto, durante o teste do Campo Aberto, os machos submetidos à separação apresentaram maior atividade locomotora restrita à periferia do aparato. Estudos que aplicaram o protocolo de separação materna por 180 minutos diários durante 21 dias observaram comportamentos semelhantes à ansiedade tanto no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) quanto no Campo Aberto (CA), e sugerem que o estresse precoce desencadeia uma ativação exacerbada da amígdala basolateral (BLA) e pode exercer efeitos moduladores sobre o hipocampo, contribuindo para alterações comportamentais associadas à ansiedade (Cevik et

al., 2023). Outro estudo que aplicou o protocolo por 12 dias encontrou resultados semelhantes à ansiedade em ratos jovens separados e, posteriormente, em ratos idosos que também sofreram separação, no teste de LCE (Vital de Figueiredo, 2009). Segundo a autora, a exposição precoce ao estressor da separação materna desencadeia alterações neuroendócrinas duradouras, especialmente no eixo HHA, que modulam negativamente os circuitos envolvidos na regulação da ansiedade ao longo da vida. Vital de Figueiredo, 2009 ressalta que essa vulnerabilidade se acentua com o envelhecimento, fase em que há elevação fisiológica dos níveis de corticosterona e diminuição da plasticidade neural, o que potencializa os efeitos adversos da privação materna. Entretanto, alguns estudos têm relatado dificuldade em reproduzir os efeitos do estresse precoce ao analisar parâmetros clássicos de ansiedade em machos no LCE, como o tempo gasto nos braços abertos e fechados e o número de entradas em cada braço (Kesting-Ferreira et al., 2021).

Em nosso estudo, machos submetidos à separação percorreram mais quadrantes na periferia do aparato. Roedores em condições normais tendem a evitar luz intensa e espaços abertos, o que torna o ambiente do Campo Aberto um estímulo ansiogênico que permite avaliar tanto a atividade locomotora relacionada à ansiedade quanto os comportamentos exploratórios (Belzung, 1999). A interpretação da movimentação baseia-se principalmente no medo e na motivação para explorar, sendo assim, o teste do campo aberto pode ser utilizado como uma medida indireta de ansiedade (Vital de Figueiredo, 2009). Assim, a permanência predominante na zona periférica é interpretada como um comportamento semelhante à ansiedade, refletindo uma tentativa de autopreservação diante de um ambiente percebido como ameaçador (Kim et al., 2013). Estudos semelhantes mostraram que ratos submetidos à separação materna por 180 minutos diários permaneceram menos tempo no centro do aparato e entraram menos vezes nessa área. (Egerton et al, 2020). Camundongos Balb/c submetidos a um protocolo semelhante de separação mostraram alterações significativas tanto no CA quanto na CCE, mas não no LCE. Kesting-Ferreira et al., 2021 sugerem que a exposição ao estresse precoce afeta regiões como o córtex pré-frontal medial, comprometendo o controle sobre a amígdala e favorecendo a redução na expressão de receptores mineralocorticoides, com consequente aumento nos níveis de corticosterona, indicando maior reatividade do eixo HHA (Kesting-Ferreira et al., 2021). Em contrapartida de nossos achados, outros estudos que aplicaram o mesmo protocolo de separação não encontraram alterações significativas no CA ou no LCE, o que reforça a ideia de que fatores como intensidade e duração do estressor influenciam diretamente nos desfechos comportamentais (Aguiar, 2015; Aisa, 2017).

Embora a SM seja um dos modelos mais utilizados para investigar os efeitos do estresse neonatal sobre o desenvolvimento comportamental de roedores, a literatura ainda apresenta

limitações significativas quanto à compreensão específica de seus impactos em fêmeas. Muitos estudos focam predominantemente em animais machos e, quando as fêmeas são incluídas, frequentemente os resultados não são reportados separadamente por sexo ou não são analisados com o mesmo nível de profundidade. Essa ausência de dados dificulta a formulação de conclusões robustas sobre possíveis diferenças sexuais na resposta comportamental ao estresse neonatal.

Em nosso estudo as fêmeas separadas, diferente dos machos separados, tiveram diferenças significativas no LCE em comparação ao grupo controle ao passar menos tempo na área central do aparato, além disso, no teste da Caixa Claro-Escuro, as fêmeas separadas permaneceram por mais tempo no compartimento escuro em comparação às fêmeas controle, além de exibirem um menor tempo de reentrada.

Apesar de não encontrarmos diferenças significativas nos parâmetros relacionados à ansiedade em específico no LCE, o tempo de permanência no centro tem sido considerado um medidor comportamental relevante, frequentemente associado à impulsividade, hesitação, avaliação de risco e tomada de decisão (Redolat et al., 2014). Nesse sentido, evidências recentes indicam que animais expostos ao estresse neonatal por SM apresentam maior propensão a comportamentos impulsivos e decisões precipitadas. No paradigma da Tarefa de Tomada de Decisão Arriscada (TTDA), desenvolvido para avaliar o comportamento frente ao risco em situações de ameaça inata, ratos submetidos à SM demonstraram menor latência para tomar decisões, menor número de posturas de avaliação e maior índice de risco em comparação aos controles. Os autores sugerem que o estresse neonatal compromete mecanismos cognitivos relacionados à avaliação de risco e regulações inibitórias, favorecendo decisões impulsivas e menos deliberadas (Chowdhury et al., 2023). Em fêmeas expostas precocemente a um ambiente pós-natal adverso, observou-se redução da avaliação de risco em tarefas envolvendo ameaça e recompensa. Essas alterações comportamentais foram associadas à regulação epigenética da expressão do Receptor 1 do Fator Liberador de Corticotropina (CRFR1) no córtex pré-frontal medial, indicando que estressores iniciais podem provocar mudanças persistentes nos circuitos cerebrais que regulam a tomada de decisão (Viola et al., 2019). Outros estudos encontraram um resultado oposto, em animais submetidos à SM houve um aumento do tempo de permanência no centro. Esse resultado foi interpretado pelos autores como uma dificuldade de tomada de decisão ou um conflito entre a exploração e a evitação do estímulo aversivo (o braço aberto) (Barbosa Neto et al., 2012). Nosso estudo corrobora com este último achado, sugerindo que fêmeas apresentaram dificuldade ou conflito entre exploração e evitação no LCE.

As fêmeas separadas demonstraram comportamentos semelhantes à ansiedade no teste CCE ao permanecer mais tempo na caixa escura e evitar a caixa clara, além de apresentarem

um maior tempo de reentrada na caixa clara. Esse teste explora o conflito natural entre a aversão dos animais à luz intensa e seu impulso exploratório. Nesse contexto, um aumento no tempo gasto no compartimento escuro é interpretado como um sinal de maior ansiedade, refletindo a preferência por ambientes mais seguros e protegidos (Bourin & Hascoët, 2003). O tempo de reentrada, também referido como latência para reentrar no compartimento claro após a primeira entrada no compartimento escuro, tem sido utilizado como um parâmetro comportamental adicional nos estudos de ansiedade (Meseguer Henjarejos et al., 2020). Esse tempo reflete a hesitação do animal em abandonar uma área considerada segura e retornar a um ambiente aversivo, como a zona iluminada. Valores mais altos dessa latência são frequentemente interpretados como indicativos de um estado emocional ansioso (Anderson et al., 2023). Outros estudos que analisaram a privação materna obtiveram resultados semelhantes, evidenciando, em fêmeas separadas, maior tempo de permanência na área escura. Os autores sugerem que a separação materna desencadeia uma hiperativação do sistema CRH, formado pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH) e seus receptores, no hipotálamo e em regiões límbicas, e está associada a comportamentos semelhantes à ansiedade, indicando seu papel central nos processos de neuroplasticidade (Faturi et al., 2010). A expressão de CRH já foi relacionada na literatura em estudos que mostraram que camundongos que produzem CRH em excesso aumentaram o comportamento semelhante à ansiedade no teste claro-escuro, conforme indicado pelo tempo reduzido no compartimento iluminado (Van Gaalen et al., 2002). Apesar de plausíveis, os mecanismos neurobiológicos descritos na literatura não foram analisados diretamente no presente estudo, sendo necessárias investigações adicionais para confirmar essa hipótese.

Esses resultados, obtidos em modelo animal, sugerem que a exposição à privação materna na primeira infância pode afetar de maneira diferenciada fêmeas e machos, evidenciando uma vulnerabilidade a consequências emocionais negativas decorrentes de experiências precoces de separação ou negligência materna neonatal, com impactos importantes na fase adulta. Outro aspecto comportamental investigado neste trabalho envolve a aplicação de sacarose 10% na região interescapular dos animais, conhecido como Splash Teste. Com o objetivo de analisar o comportamento de limpeza (*grooming*), o tempo de imobilidade e o número de quadrantes percorridos no centro e na periferia do aparato após aplicação de solução com 10% de sacarose, obteve-se a quantificação dos parâmetros citados, dos quais frequentemente estão associados à motivação, apatia e comportamento semelhante à depressão (Shiota et al., 2016). Nossos resultados mostraram que machos e fêmeas submetidos à SM não apresentaram diferenças significativas em qualquer dos indicadores analisados. Da mesma forma, no trabalho de Favoretto et al., 2023 a separação materna não afetou o comportamento

de autocuidado em camundongos separados. Entretanto, outros estudos que aplicaram o mesmo teste em camundongos encontraram uma diminuição significativa no tempo de autolimpeza no grupo submetido à separação em comparação ao grupo controle, o que pode indicar um efeito deletério do estresse causado pela separação e sugerem que o protocolo é capaz de induzir sintomas depressivos (Al-shudifat et al., 2024; Lorigooini et al., 2019; Amini-Khoei et al., 2017). Lorigooini et al., 2019 relacionam que tais alterações comportamentais indicam dificuldades de autocuidado e problemas motivacionais em roedores e sugerem que esse comportamento pode estar relacionado ao estresse oxidativo e diminuição da defesa antioxidante em áreas cerebrais (Lorigooini et al., 2019). Portanto, percebe-se uma heterogeneidade em relação aos resultados do Splash teste na literatura.

Metabólicos cecais (Ácidos Graxos de Cadeia Curta)

Neste trabalho foram quantificados os seguintes AGCC: ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico e ácido lático. Dentre eles, o acetato destaca-se por ser amplamente utilizado por diversos tecidos como principal via de obtenção de energia a partir de carboidratos não digeridos e não absorvidos no intestino delgado (Roy et al., 2006). Além de sua função energética, o acetato também atua como substrato na síntese de colesterol e de ácidos graxos de cadeia longa, bem como co-substrato na síntese de glutamina e glutamato (Den Besten et al., 2013). Evidências recentes apontam ainda seu papel essencial no desenvolvimento e funcionamento adequado da microglia, visto que contribui para a manutenção do metabolismo celular, modula a capacidade de fagocitose e influencia a resposta microglial durante processos neurodegenerativos (Erny et al., 2021). O ácido butírico e seus derivados apresentam efeitos benéficos amplamente documentados sobre a morfologia e a função intestinal, promovendo o aumento das vilosidades intestinais, o fortalecimento da barreira da mucosa e a estimulação da resposta imune celular local, o que contribui para a redução significativa do risco de infecções (Gerunova et al., 2024). Além dessas ações tróficas e imunomoduladoras, o butirato, um AGCC com propriedades eletrofisiológicas, também influencia a sinalização neural no intestino, ao aumentar inicialmente a excitabilidade e, em seguida, induzir uma hiperpolarização duradoura em neurônios mioentéricos que se projetam para a mucosa (Hamodeh et al., 2004). O ácido propiônico exerce diversas funções metabólicas importantes, incluindo a regulação da produção de adipocinas no tecido adiposo, a sinalização de vias relacionadas ao metabolismo energético, a promoção da oxidação de ácidos graxos no fígado, a redução da concentração hepática de lipídeos e a atuação como substrato da gliconeogênese hepática (Lorefice; Zoledziewska, 2024). Além desses efeitos sistêmicos, o propionato também pode exercer ações locais

benéficas, como a redução dos níveis de colesterol e o estímulo à proliferação e diferenciação dos colonócitos, células fundamentais para a integridade da mucosa intestinal (Roy et al., 2006).

O lactato tem sido considerado um elo metabólico entre diferentes sistemas fisiológicos. No intestino, ele é utilizado por bactérias na produção de propionato. No fígado, atua como substrato para a geração de energia mitocondrial, especialmente em presença de ácidos graxos de cadeia média (AGCM). No cérebro, é liberado por astrócitos e utilizado por neurônios como fonte energética (Schönfeld; wojtczak, 2016). Considerando a ampla gama de efeitos atribuídos aos AGCC, sua quantificação se mostra fundamental para elucidar possíveis alterações metabólicas associadas às condições estudadas.

Estudos anteriores indicam que os AGCC também exercem um papel central na mediação entre o estresse precoce, como a separação materna, e o surgimento de sintomas da Síndrome do Intestino Irritável (SII) (O'Mahony et al., 2009). Tanto a diminuição quanto o excesso desses metabólitos podem comprometer a função intestinal: concentrações reduzidas de AGCC estão relacionadas à menor produção de serotonina (5-HT) e disfunções intestinais, enquanto níveis elevados promovem a liberação excessiva de 5-HT, e lesão da mucosa (Tao et al., 2022; Roy et al., 2006). Apesar de variações nos efeitos dependendo da espécie, linhagem e protocolo, o modelo de SM tem sido considerado um bom protocolo para investigar as bases moleculares de disfunção do eixo cérebro-intestino (O'mahony et al., 2010).

Em nosso estudo encontramos um aumento significativo da dosagem de ácido láctico nos metabólitos cecais de machos submetidos à SM. Embora o ácido láctico tenha sido amplamente estudado por suas funções metabólicas e neuromodulatórias, não foram encontrados, até o momento, estudos que o associem diretamente ao modelo de separação materna.

Em meio aquoso com pH próximo ao fisiológico, o ácido láctico, por ser um composto hidrofílico e fracamente ácido, encontra-se predominantemente em sua forma ionizada, conhecida como lactato, resultado da liberação de prótons (H^+) (Apostolova; Pearce, 2022). Uma revisão recente sobre o papel do lactato destaca que ele exerce efeitos neuroprotetores no cérebro, especialmente em fases iniciais de doenças neurológicas, uma vez que fornece energia aos neurônios, atua como sinalizador celular, reduz a neuroinflamação ao modular a atividade da microglia e estimula a neurogênese (Liu; Zhou, 2024). Em um estudo com camundongos, a administração periférica de l-lactato produziu efeitos semelhantes aos de antidepressivos, revertendo comportamentos associados à depressão, como anedonia e imobilidade (Carrard et al., 2016). Em um modelo de depressão induzida por corticosterona, foi demonstrado que o lactato exerce efeito antidepressivo ao restaurar a neurogênese no hipocampo adulto (Carrard et al., 2021). Em camundongos expostos a estresse agudo, observou-se um aumento nos níveis

de lactato, sugerindo que a elevação do lactato cerebral está associada à resposta ao estresse e pode estar envolvido na regulação do humor (Wang et al., 2023).

Diante desses achados, é possível levantar a hipótese de que a SM também seria capaz de desencadear alterações no eixo intestino-cérebro, em específico modificando a concentração de metabólitos liberados do sistema digestivo (subproduto metabólico da microbiota intestinal) para a circulação sistêmica, de maneira sustentada ao longo da fase adulta. Em nosso estudo foi possível observar alguns efeitos simultâneos em ratos machos submetidos a SM. Houve aumento da concentração de ácido, em paralelo, observamos o uso de reserva de enzimas antioxidantes (SOD e CAT), sem danos lipídicos ou proteicos em núcleos encefálicos, e um indicador de ansiedade associado à exploração periférica no CA, mas sem efeitos no LCE e CCE. O aumento do ácido láctico cecal em machos potencialmente poderia ser uma resposta compensatória ao estresse precoce atuando como um modulador neuroquímico, com efeitos na neurogênese e regulação do humor, porém mais estudos são necessários para melhor compreensão dessa relação. Em contrapartida, as fêmeas submetidas à SM não apresentaram aumento de nenhum metabólito intestinal com efeito protetivo neural, e em paralelo apresentaram danos oxidativos (TBARS) e aumento das defesas antioxidativas em núcleos encefálicos, além de apresentarem resposta comportamental de ansiedade, o que sugere um efeito sexo-específico do protocolo de SM.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. A principal delas refere-se ao tamanho amostral relativamente restrito, o que pode limitar a generalização dos achados. Embora a análise de metabólitos cecais tenha revelado alterações relevantes, não foi realizada a caracterização do microbioma intestinal, o que poderia fornecer informações mais abrangentes sobre a interação eixo intestino-cérebro. Além disso, não foram dosados hormônios, o que limita a compreensão da resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA).

Mesmo com essas limitações, o estudo apresenta achados relevantes para a compreensão do modelo de separação materna, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre os efeitos do estresse precoce.

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os achados demonstram que a SM desencadeia alterações neurobiológicas, de compensação do estresse oxidativo e comportamentais que se expressam de maneira sexo-específica, destacando a importância desta análise em modelos pré-clínicos de adversidade precoce. Tais evidências reforçam a relevância do eixo intestino-cérebro, do

sistema antioxidante, da composição corporal, e das respostas defensivas comportamentais, como alvos potenciais para a compreensão e intervenção em desfechos associados ao impacto do estresse no início da vida e suas compensações na fase adulta.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Ana Cristina Borges. Efeitos do período de separação materna e do cuidado materno no momento da reunião do filhote isolado, sobre a ansiedade, depressão e ataques de pânico na vida adulta. 2015. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015.
- AISA, B. et al. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, v. 32, n. 3, p. 256–266, abr. 2007.
- AL-SHUDIFAT, A.-E. et al. Antidepressant potential of β -caryophyllene in maternal separation-induced depression-like in mice: A focus on oxidative stress and nitrite levels. *Phytomedicine Plus*, v. 4, n. 4, p. 100624, 20 ago. 2024.
- AMINI-KHOEI, H. et al. Oxytocin mitigated the depressive-like behaviors of maternal separation stress through modulating mitochondrial function and neuroinflammation. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 76, p. 169–178, jun. 2017.
- ANDERSON, L. G. et al. Memory deficits and hippocampal cytokine expression in a rat model of ADHD. *Brain Behavior & Immunity - Health*, v. 35, p. 100700, 18 nov. 2023.
- ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 27, n. 1–2, p. 3–18, jan. 2003.
- APOSTOLOVA, P.; PEARCE, E. L. Lactic acid and lactate: revisiting the physiological roles in the tumor microenvironment. *Trends in Immunology*, v. 43, n. 12, p. 969–977, dez. 2022.
- AZUMA, C.; MINAMI, T.; NISHI, M. Effects of early life adverse experience on contents of essential trace elements related to the antioxidative system in the adult mouse hippocampus. *Psychology*, v. 11, n. 2, p. 314–325, 2020.
- BARBOSA NETO, J. B. et al. Stress during development alters anxiety-like behavior and hippocampal neurotransmission in male and female rats. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 1, p. 518–526, jan. 2012.

BELZUNG, C.; LE PAPE, G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiology & Behavior*, v. 56, n. 3, p. 623–628, set. 1994.

BELZUNG, C. Measuring rodent exploratory behavior. In: CRUSIO, W. E.; GERLAI, R. T. (ed.). *Handbook of molecular genetic techniques for brain and behavior research*. Amsterdam: Elsevier, 1999. p. 738–749.

BERG, D. et al. Desequilíbrio redox. *Pesquisa de Células e Tecidos*, v. 318, n. 1, p. 201–213, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0976-5>.

BERTH, F. Discovering Bowlby: Infant homes and attachment theory in west Germany after the second world war. **Paedagogica Historica**, v. 59, n. 4, p. 1–17, 20 jul. 2021.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, n. 1–3, p. 55–65, 2003. DOI: 10.1016/S0014-2999(03)01274-3.

BOWLBY, J. *Maternal care and mental health: a report prepared on behalf of the World Health Organization as a contribution to the United Nations programme for the welfare of homeless children*. Geneva: World Health Organization, 1952. (Monograph Series, n. 2).

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRANKA MARKOVIĆ et al. Long-term effects of maternal deprivation on redox regulation in rat brain: involvement of NADPH oxidase. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, n. 1, 1 jan. 2017.

CARRARD, A. et al. Peripheral administration of lactate produces antidepressant-like effects. *Molecular Psychiatry*, v. 23, n. 2, p. 392–399, 18 out. 2016.

CARRARD, A. et al. Role of adult hippocampal neurogenesis in the antidepressant actions of lactate. *Molecular Psychiatry*, 14 maio 2021.

CEVIK, O. S. et al. Maternal separation increased memory function and anxiety without effects of environmental enrichment in male rats. *Behavioural Brain Research*, v. 441, p. 114280, mar. 2023.

CHOWDHURY, A. et al. Risk-based decision-making task: a novel paradigm for assessing risky behavior in early-life stress-exposed rats. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 392, 2023. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2023.109864.

- CRAWLEY, J. N.; PAYLOR, R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Hormones and Behavior*, v. 3, p. 197–211, 1997.
- DEN BESTEN, G. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, v. 54, n. 9, p. 2325–2340, 2 jul. 2013.
- DRASTICHOVA, Z.; RUDAJEV, V.; PALLAG, G. et al. Proteome profile of different rat brain regions reveals prolonged maternal separation modulates proteins involved in cell death-related processes. *Biological Research*, v. 54, n. 4, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40659-021-00327-5>.
- EGERTON, S. et al. Investigating the potential of fish oil as a nutraceutical in an animal model of early life stress. *Nutritional Neuroscience*, v. 25, n. 2, p. 356–378, 31 jul. 2020.
- ENGELBREGT, M. J. T. et al. Body composition and bone measurements in intra-uterine growth retarded and early postnatally undernourished male and female rats at the age of 6 months: comparison with puberty. *Bone*, v. 34, n. 1, p. 180–186, jan. 2004.
- ERNY, D. et al. Microbiota-derived acetate enables the metabolic fitness of the brain innate immune system during health and disease. *Cell Metabolism*, v. 33, n. 11, p. 2260–2276.e7, nov. 2021.
- FATURI, C. B. et al. Disruptions of the mother–infant relationship and stress-related behaviours: Altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 34, n. 6, p. 821–834, 1 maio 2010.
- FAVORETTO, C. A. et al. Impacts of maternal separation stress on ethanol-related responses, anxiety- and depressive-like behaviors in adolescent mice. *Neuroscience Letters*, v. 809, p. 137295, 12 maio 2023.
- GERUNOVA, L. K. et al. Butyric acid and prospects for creation of new medicines based on its derivatives: a literature review. *Journal of Veterinary Science*, v. 25, n. 2, p. e23, 4 mar. 2024.
- GOMES, N. S. Avaliação de alterações comportamentais e oxidativas no cérebro e intestino de ratos submetidos a separação materna: influência do sexo e do tratamento com escitalopram e doxíciclina. Fortaleza, CE: [s. n.], 2019. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/52699/1/2019_dis_nsgomes.pdf. Acesso em: 07 ago. 2025.
- HAMODEH, S. A. et al. Mechanism of butyrate-induced hyperpolarization of cultured rat myenteric neurones. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 16, n. 5, p. 597–604, 22 jul. 2004.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 1, p. 15, 1984.

HULSHOF, H. J. et al. Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, v. 216, n. 2, p. 552–560, 20 jan. 2011.

HUOT, R. L. et al. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Research*, v. 950, n. 1–2, p. 52–63, set. 2002.

ISINGRINI, E. et al. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high-fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS ONE*, v. 5, n. 4, p. e10404, 28 abr. 2010.

IWASAKI, S. et al. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. *Physiology & Behavior*, v. 70, n. 5, p. 551–556, set. 2000.

KASPROWICZ, J. N.; SAVI, D. C. O papel da microbiota intestinal nos transtornos depressivos: uma revisão sobre o tema e estudos clínicos. *Vitalle – Revista de Ciências da Saúde*, v. 34, n. 3, p. 8–19, 22 dez. 2022.

KESTERING-FERREIRA, E. et al. Long-term effects of maternal separation on anxiety-like behavior and neuroendocrine parameters in adult Balb/c mice. *Chronic Stress*, v. 5, p. 247054702110671, jan. 2021.

KIM, J. Y.; PARK, J. H.; CHOI, S. Y. Behavioral analysis of anxiety and depression in animal models using open field and elevated plus maze tests. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, v. 17, n. 5, p. 401–406, 2013. DOI: 10.4196/kjpp.2013.17.5.401.

LAJUD, N.; TORNER, L. Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: sexual dimorphism, long-term consequences and possible mediators. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 8, 13 fev. 2015.

LEHMANN, J.; FELDON, J. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Reviews in the Neurosciences*, v. 11, n. 4, jan. 2000.

LEVINE, S. Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science*, v. 126, n. 3270, p. 405, 1957.

LIEB, M. W. et al. Effects of maternal separation on serotonergic systems in the dorsal and median raphe nuclei of adult male Tph2-deficient mice. *Behavioural Brain Research*, v. 373, p. 112086, 2019.

- LIANG, X. et al. Antidepressant-like effect of asiaticoside in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 89, n. 3, p. 444–449, 5 fev. 2008.
- LIU, S.; ZHOU, S. Lactate: a new target for brain disorders. *Neuroscience*, v. 552, p. 100–111, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2024.06.023>. Acesso em: 4 ago. 2025.
- LOI, M. et al. Age- and sex-dependent effects of early life stress on hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, v. 5, 2014.
- LOREFICE, L.; ZOLEDZIEWSKA, M. Propionic acid impact on multiple sclerosis: evidence and challenges. *Nutrients*, v. 16, n. 22, p. 3887, 14 nov. 2024.
- LORIGOOINI, Z. et al. Implication of NMDA-NO pathway in the antidepressant-like effect of ellagic acid in male mice. *Neuropeptides*, v. 76, p. 101928, ago. 2019.
- LUPIEN, S. J. et al. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 10, n. 6, p. 434–445, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrn2639>.
- MAES, M. et al. Depression's multiple comorbidities explained by (neuro)inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. *Neuro Endocrinology Letters*, v. 32, n. 1, p. 7–24, 2011.
- MALCON, L. M. C. et al. Maternal separation induces long-term oxidative stress alterations and increases anxiety-like behavior of male Balb/cJ mice. *Experimental Brain Research*, v. 238, n. 9, p. 2097–2107, 12 jul. 2020.
- MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology*, v. 35, n. 5, p. 717–728, jun. 2010.
- MCINTOSH, J.; ANISMAN, H.; MERALI, Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Developmental Brain Research*, v. 113, n. 1–2, p. 97–106, mar. 1999.
- MEANEY, M. J. et al. The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology*, v. 16, n. 1–3, p. 85–103, jan. 1991.
- MEANEY, M. J.; AHO, K. H.; D'AMATO, F. R. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 66, p. 60–72, 1996.
- MESEGUER HENAREJOS, A. B. et al. Sex and time-of-day impact on anxiety and passive avoidance memory strategies in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 14, 25 maio 2020.

MIURA, T.; MURAOKA, S.; OGISO, T. Inhibition of lipid peroxidation by estradiol and 2-hydroxyestradiol. *Steroids*, v. 61, n. 6, p. 379–383, jun. 1996.

MOYER-MILEUR, L. J. et al. Mechanical-tactile stimulation (MTS) during neonatal stress prevents hyperinsulinemia despite stress-induced adiposity in weanling rat pups. *Early Human Development*, v. 87, n. 3, p. 159–163, 6 jan. 2011.

MURPHY, M. O. et al. Postnatal treatment with metyrapone attenuates the effects of diet-induced obesity in female rats exposed to early-life stress. *AJP Endocrinology and Metabolism*, v. 312, n. 2, p. E98–E108, 14 dez. 2016.

NEDER, K.; AMORIM, K. de S. Conceito de privação materna na teoria de John Bowlby: impactos na educação infantil. *SciELO Preprints*, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.4864>. Disponível em: <https://preprints.scielo.org/index.php/scielo/preprint/view/4864>. Acesso em: 20 mar. 2025.

NORONHA, S. R. et al. High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. *Behavioural Brain Research*, v. 316, p. 38–46, jan. 2017.

O'MAHONY, S. M. et al. Maternal separation as a model of brain–gut axis dysfunction. *Psychopharmacology*, v. 214, n. 1, p. 71–88, 1 out. 2010.

O'MAHONY, S. M. et al. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biological Psychiatry*, v. 65, n. 3, p. 263–267, fev. 2009.

O'MAHONY, S. M. et al. Maternal separation as a model of brain–gut axis dysfunction. *Psychopharmacology*, v. 214, n. 1, p. 71–88, 1 out. 2010.

O'NEILL, M.; SOROCHAN, J. Anxiety. In: MICHALOS, A. C. (ed.). *Encyclopedia of Quality of Life and Well-Being Research*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 195–197.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Relatório mundial de saúde mental: transformar a saúde mental para todos*. Genebra: OMS, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240049338>. Acesso em: 20 mar. 2025.

OU-YANG, B. et al. A meta-analytic study of the effects of early maternal separation on cognitive flexibility in rodent offspring. *Developmental Cognitive Neuroscience*, v. 56, p. 101126, ago. 2022.

REDOLAT, R.; VERDÚ, M.; MOLINA, V.; MORALES, J. A. Análisis de comportamiento en el laberinto en cruz elevado: revisión y perspectivas. *Revista Colombiana de Psicología*, v. 23, n. 2, p.

219–235, 2014. Disponível em: <https://www.redalyc.org/journal/647/64750042014/html/>. ISSN: 0121-5469.

RÉUS, G. Z. et al. ω -3 and folic acid act against depressive-like behavior and oxidative damage in the brain of rats subjected to early- or late-life stress. *Nutrition*, v. 53, p. 120–133, set. 2018.

ROY, C. C. et al. Short-chain fatty acids: ready for prime time? *Nutrition in Clinical Practice*, v. 21, n. 4, p. 351–366, ago. 2006.

SALIM, S. Oxidative stress and psychological disorders. *Current Neuropharmacology*, v. 12, n. 2, p. 140–147, mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.2174/1570159X11666131120230309>.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *Journal of Lipid Research*, v. 57, n. 6, p. 943–954, 2016. DOI: 10.1194/jlr.R067629.

SHIOTA, N. et al. Water spray-induced grooming is negatively correlated with depressive behavior in the forced swimming test in rats. *The Journal of Physiological Sciences*, v. 66, n. 3, p. 265–273, 1 maio 2016.

SHALEV, U.; KAFKAFI, N. Repeated maternal separation does not alter sucrose-reinforced and open-field behaviors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 73, n. 1, p. 115–122, ago. 2002.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 25, n. 12, p. 1058–1071, dez. 1986.

SILVA, Y. P.; BERNARDI, A.; FROZZA, R. L. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Frontiers in Endocrinology*, v. 11, 31 jan. 2020.

SÖDERHOLM, J. D. et al. Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 283, n. 6, p. G1257–G1263, 1 dez. 2002.

TAO, E. et al. Potential roles of enterochromaffin cells in early life stress-induced irritable bowel syndrome. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 16, 15 mar. 2022.

UYSAL, N. et al. Age-dependent effects of maternal deprivation on oxidative stress in infant rat brain. *Neuroscience Letters*, v. 384, n. 1–2, p. 98–101, ago. 2005.

VAN DER HORST, F. C. P.; VAN DER VEER, R. Loneliness in infancy: Harry Harlow, John Bowlby and issues of separation. *Integrative Psychological and Behavioral Science*, v. 42, n. 4, p. 325–335, 13 ago. 20

VAN GAALEN, M. M. et al. Effects of transgenic overproduction of CRH on anxiety-like behaviour. *European Journal of Neuroscience*, v. 15, n. 12, p. 2007–2015, jun. 2002.

VIEIRA, L. G. *Efeito do tratamento com inulina sobre a memória, microbiota intestinal e proteoma hipocampal em um modelo de obesidade induzida pela dieta hiperlipídica*. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.repositorio.ufop.br/items/c7f6058a-d491-4dc6-afda-4a3a06735f8f>. Acesso em: 28 jul. 2025.

VIOLA, H. et al. Postnatal impoverished housing impairs adolescent risk-assessment and increases risk-taking: a sex-specific effect associated with histone epigenetic regulation of Crfr1 in the medial prefrontal cortex. *Psychoneuroendocrinology*, v. 103, p. 135–145, 2019. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2018.08.032.

VITAL DE FIGUEIREDO, Joana. *Efeito da separação maternal na memória dependente do hipocampo de rato*. [S. l.: s. n.], [s. d.]. Disponível em: https://repositorio.ulisboa.pt/bitstream/10451/2386/1/ulsd058273_tm_Joana_Figueiredo.pdf. Acesso em: 28 jul. 2025.

WANG, D. et al. Systematic review and meta-analysis: effects of maternal separation on anxiety-like behavior in rodents. *Translational Psychiatry*, v. 10, n. 1, 1 jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0856-0>.

WANG, J. et al. HSPA12A controls cerebral lactate homeostasis to maintain hippocampal neurogenesis and mood stabilization. *Translational Psychiatry*, v. 13, n. 1, p. 280, 14 ago. 2023.

WERTHEIMER, G. S. et al. Maternal deprivation alters growth, food intake, and neuropeptide Y in the hypothalamus of adolescent male and female rats. *Developmental Psychobiology*, v. 58, n. 8, p. 1066–1075, 16 jun. 2016.

ZENG, H. et al. Attachment insecurity in rats subjected to maternal separation and early weaning: sex differences. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 15, p. 637678, 2021. DOI: 10.3389/fnbeh.2021.637678.

