

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOSÉ HENRIQUE CARARO DA SILVA

**ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS, COMPORTAMENTAIS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO
ESTRESSE PRÉ-NATAL**

CRICIÚMA

2021

JOSÉ HENRIQUE CARARO DA SILVA

**ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS, COMPORTAMENTAIS E DE
ESTRESSE OXIDATIVO NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO
ESTRESSE PRÉ-NATAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Samira da Silva Valvassori
Coorientador: Prof. Dr. João Luciano de Quevedo

CRICIÚMA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S586a Silva, José Henrique Cararo da.

Alterações epigenéticas, comportamentais e de estresse oxidativo na prole de ratas submetidas ao estresse pré-natal / José Henrique Cararo da Silva. - 2021.

105 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2021.

Orientação: Samira da Silva Valvassori.

Coorientação: João Luciano de Quevedo.

1. Epigenética. 2. Estresse oxidativo. 3. Transtorno bipolar. 4. Estresse pré-natal. I. Título.

CDD. 22. ed. 616.895



unesc

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato José Henrique Cararo da Silva, sob o título "ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS, COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE PRÉ-NATAL" do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela "APROVAÇÃO" da Tese.

Criciúma, SC, 12 de agosto de 2021.

Profa. Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Membro Relator – UNESC

Prof. Dr. EDUARDO PACHECO RICO
Membro Interno – UNESC

Profa. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO
Membro Externo – UNISUL

Prof. Dr. ROGER BITENCOURT VARELA
Membro Externo – The University of Queensland

Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori
Orientadora

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador Adjunto do PPGCS

Folha informativa

Esta dissertação foi elaborada seguindo as normas de Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

O presente trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (UNESC).

Agradecimentos

A Deus.

Aos meus queridos pais, Terezinha e José, bem como ao meu irmão, Ezequiel.

À professora orientadora Dr^a. Samira da Silva Valvassori.

Ao professor coorientador Dr. João Quevedo.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense e seu Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Psiquiatria Translacional: Fernanda, Gustavo, Samira, Jhoanne, Taise, Jorge, Jefté e Beatriz.

À Fundação de Amparo à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC).

A todos os demais que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração do presente trabalho.

Resumo

Os transtornos mentais, tais como o transtorno bipolar (TB), são condições crônicas e incapacitantes, com impacto mundial significativo. A etiologia do TB pode estar associada ao desenvolvimento prejudicado do sistema nervoso em um período precoce da vida. Similarmente, acredita-se que a fisiopatologia do TB esteja relacionada à interação entre fatores ambientais e genéticos. Além disso, o estresse oxidativo tem emergido como uma importante fonte de biomarcadores para o TB. Neste contexto, há um crescente interesse no papel da epigenética e do estresse oxidativo na fisiopatologia deste transtorno. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações comportamentais em ratas prenhes submetidas ao estresse pré-natal e em sua prole, bem como parâmetros epigenéticos e de estresse oxidativo no hipocampo da prole. Foram utilizadas ratas Wistar com 14 dias de gestação ($n = 16$). Os animais do grupo estresse pré-natal foram submetidos a um protocolo de estresse repetido e variado até o dia do nascimento dos filhotes. Entre o 1º e o 6º dia pós-natal, foram realizadas observações do comportamento materno das matrizes com suas respectivas proles. Após o desmame dos filhotes (21º dia pós-natal) foi realizada a avaliação dos comportamentos do tipo maníaco e depressivo das matrizes, bem como uma avaliação complementar do peso da glândula adrenal. Foram também avaliados, em sua prole adulta (60 dias pós-natais), os comportamentos do tipo maníaco, depressivo e ansioso, bem como parâmetros epigenéticos – atividade das enzimas DNA metiltransferases, histonas desacetilases e histonas acetiltransferases; e o nível de acetilação da histona H3 (resíduos de lisina 9 [H3K9] e 14 [H3K14]). Além disso, foram avaliados o peso da glândula adrenal e parâmetros de estresse oxidativo (nível de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico; oxidação do diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína; atividades da superóxido dismutase e catalase) no hipocampo da prole. Foi observado que as matrizes que foram submetidas ao estresse apresentaram menor frequência de comportamentos de cuidado materno em dias específicos (2º, 3º e 6º dias de observação); entretanto, quando foi considerada a média dos seis dias de avaliação, bem como o peso da glândula adrenal, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos estresse e controle. Também foi demonstrado um comportamento do tipo maníaco nas fêmeas da prole descendentes de matrizes submetidas ao estresse, o qual foi caracterizado por aumento no número de cruzamentos e levantamentos e diminuição do tempo de latência no teste de campo aberto. Além destas alterações, observou-se uma hipertrofia da glândula adrenal na prole de ratas estressadas, bem como aumento da atividade de DNMTs em hipocampo. Outra alteração epigenética observada foi o aumento da acetilação de H3K14 no hipocampo, detectado nas fêmeas da prole. Nos machos, também foi detectado um aumento na atividade da superóxido dismutase. Portanto, foi possível uma melhor caracterização das alterações comportamentais induzidas pelo estresse repetido e variado pré-natal em ratas prenhes, bem como um maior detalhamento dos efeitos comportamentais e neuroquímicos em sua prole. O presente estudo propõe que estas alterações poderiam fazer parte da neurobiologia do TB, e o paradigma de estresse pré-natal utilizado poderia ser empregado para mimetizar alguns aspectos deste transtorno.

Palavras-chave: Epigenética; estresse oxidativo; estresse pré-natal; hipocampo; transtorno bipolar.

Abstract

Mental disorders, such as bipolar disorder (BD), are chronic and disabling conditions with a significant worldwide impact. BD etiology may be associated with an impaired development of the nervous system early in the life. Similarly, BD pathophysiology may be related to the interaction between environmental and genetic factors. In addition, oxidative stress has emerged as an important source of biomarkers for BD. In this context, there is a growing interest on the role of epigenetics and oxidative stress in the pathophysiology of this disorder. The aim of this study is to evaluate behavioral changes in pregnant rats subjected to prenatal stress and in their offspring, as well as epigenetic and oxidative stress parameters in the offspring hippocampus. The experiments were carried out with Wistar rats at day 14 of gestation ($n = 16$). The animals in the prenatal stress group were submitted to a repeated and varied stress protocol until the day of the pup's birth. Between the first and the 6th post-natal day, the dams were submitted to assessments of nursing behavior to take care their pups. After the weaning of the pups (postnatal day 21), an assessment of the manic and depressive-like behaviors of the dams was carried out, as well as an additional assessment of the adrenal gland weight. Manic, depressive, and anxious-like behaviors were also evaluated in their adult offspring (60-day-old), as well as epigenetic parameters – activity of DNA methyltransferases, histone deacetylases, and histone acetyltransferases; acetylation level of histone H3 (lysine residues 9 [H3K9] and 14 [H3K14]). In addition, the weight of the adrenal gland and oxidative stress parameters (level of thiobarbituric acid reactive substances; 2',7'-dichlorofluorescein diacetate oxidation; superoxide dismutase and catalase activities) in the offspring hippocampus were evaluated. It was observed that dams subjected to stress exhibited a lower frequency of maternal care behaviors, especially in the 2nd, 3rd, and 6th days of assessments; however, when the mean of the six days of evaluation was considered, as well as the weight of the adrenal gland, no significant differences were detected between the stress and control groups. Manic-like behavior was also demonstrated in the female offspring from dams subjected to stress, which was characterized by an increase in the number of crossings and rearings and decrease in the time of latency (open field test). Additionally, there was hypertrophy of the adrenal gland in the offspring from rats subjected to stress, as well as increased activity of DNMTs in the hippocampus. Another epigenetic alteration observed was the increase in H3K14 acetylation in the female offspring hippocampus. In males, an increase in superoxide dismutase activity was also detected. Therefore, it was possible to better characterize the behavioral changes induced by repeated and varied prenatal stress in pregnant rats, as well as to get better insight on the behavioral and neurochemical effects in their offspring. The present study proposes that these alterations could be part of the BD neurobiology, and the prenatal stress paradigm used can mimic some aspects of this disorder.

Keywords: Epigenetics; oxidative stress; prenatal stress; hippocampus; bipolar disorder.

Lista de ilustrações

Figura 1: Representação esquemática que ilustra a definição de estresse oxidativo.....	16
Figura 2: Sequência de reações que ocorrem durante a redução do oxigênio molecular (O₂) em água (H₂O) na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.....	17
Figura 3: Representação esquemática ilustrando a preponderância do estresse oxidativo em diferentes condições de saúde.....	19
Figura 4: Esquema que ilustra genericamente os mecanismos epigenéticos que alteram a estrutura da cromatina.....	20
Figura 5: Representação esquemática sobre a função de importantes enzimas epigenéticas.....	23
Figura 6: Representação esquemática que ilustra as etapas experimentais realizadas com as ratas prenhes e sua prole.....	34
Figura 7: Variáveis (parâmetros) avaliadas durante as observações de comportamento materno.....	36
Figura 8: Representação esquemática que ilustra o aparato utilizado no teste do labirinto em cruz elevado.....	37
Figura 9: Representação esquemática que ilustra o aparato utilizado no teste comportamental de campo aberto.....	38
Figura 10: Parâmetros avaliados no teste do nado forçado.....	39
Figura 11: Principais etapas experimentais envolvidas na determinação da atividade das enzimas epigenéticas em placas de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA).....	42
Figura 12: Análise comportamental das ratas matrizes em relação a suas proles, utilizando-se o método descrito por Popoola e colaboradores (2015).....	48
Figura 13: Análise comportamental das ratas matrizes em relação a suas proles, utilizando-se o método descrito por Popoola e colaboradores (2015 – valores médios dos seis dias de avaliação).....	50
Figura 14: Análise comportamental das ratas matrizes realizada por meio do teste de campo aberto.....	52
Figura 15: Análise comportamental das ratas matrizes realizada por meio do teste do borrifo com solução de sacarose.....	53
Figura 16: Comparação de peso de glândula adrenal das ratas matrizes.....	54

Lista de ilustrações (continuação)

Figura 17: Análise comportamental dos machos da prole de ratos, utilizando-se os testes de campo aberto, borrifo com solução de sacarose, natação forçada e labirinto em cruz elevado.....	56
Figura 18: Análise comportamental das fêmeas da prole de ratos, utilizando-se os testes de campo aberto, borrifo com solução de sacarose, natação forçada e labirinto em cruz elevado.....	57
Figura 19: Peso da glândula adrenal da prole adulta.....	58
Figura 20: Parâmetros epigenéticos nos machos da prole adulta.....	59
Figura 21: Parâmetros epigenéticos nas fêmeas da prole adulta.....	60
Figura 22: Parâmetros de estresse oxidativo nos machos da prole adulta.....	61
Figura 23: Parâmetros de estresse oxidativo nas fêmeas da prole adulta.....	61

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

- 11 β -hsd2* – 11 β -Hidroxiesteroide desidrogenase [gene]
ABN – *Arched-back nursing* (posição de amamentação)
AVE – Acidente vascular encefálico
AVP – Arginina vasopressina [gene]
BDNF/Bdnf – Fator neurotrófico derivado do encéfalo [gene] (do inglês, *Brain derived neurotrophic factor*)
Brd1 – Gene 1 contendo bromodomínio (do inglês, *Bromodomain containing 1 gene*)
BRPF3-HBO1 – Proteína 3 contendo dedo de PHD e bromodomínio associado a HBO1 (do inglês, *bromodomain- and PHD finger-containing protein 3-histone acetyltransferase bound to ORC1*)
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
COXs – Ciclo-oxigenases
CP – Grupo controle pré-natal
CpG – Dinucleotídeo de citosina-fosfato-guanina (do inglês, *cytosine-phosphate-guanine*)
CRH – Hormônio de liberação da corticotrofina [gene] (do inglês, *Corticotropin-releasing hormone*)
CRHBP – Proteína ligante de CRH [gene] (do inglês, *Corticotropin-releasing factor-binding protein*)
CTEM – Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial
CTNNA2 – Catenina α -2 [gene]
DCF – 2',7'-Diclorofluoresceína (forma oxidada)
DCFH – 2',7'-Diclorofluoresceína (forma reduzida)
DCFH-DA – Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
DNMT – DNA metiltransferase (pl.: DNMTs)
DO – Densidade óptica
e – Elétron
ELISA – Ensaio imunossorvente ligado à enzima (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*)
EP – Grupo estresse pré-natal
ERO – Espécie reativa de oxigênio (pl.: EROs)
ESR1 – Receptor α de estrogênio [gene] (do inglês, *Estrogen receptor 1*)
Fe²⁺ – Cátion ferroso
FKBP5/Fkbp5 – Proteína 5 ligante de FK506 [gene] (do inglês, *FK506 binding protein 5*)
GAD67 – Glutamato descarboxilase 67 [gene]
gl – Grau de liberdade
GPx/GPX – Glutationa peroxidase
Grm1 – Receptor metabotrópico de glutamato do tipo 1 [gene] (do inglês, *Glutamate metabotropic receptor 1*)
Grm3 – Receptor metabotrópico de glutamato do tipo 3 [gene] (do inglês, *Glutamate metabotropic receptor 3*)
GSH – Glutationa reduzida
GSSG – Glutationa oxidada
H₂O – Água (monóxido de di-hidrogênio)
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
H3K14 – Resíduo de lisina 14 da histona H3
H3K9 – Resíduo de lisina 9 da histona H3

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos (continuação)

HAT – Histona acetiltransferase (pl.: HATs)
hda-1 – Histona desacetilase 1 de levedura
HDAC – Histona desacetilase (pl.: HDACs)
HK-2 – Células epiteliais tubulares renais humanas (do inglês, *human kidney 2*)
HPA – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (do inglês, *hypothalamic–pituitary–adrenal axis*)
MAOs – Monoamina-oxidases
MBD4 – Proteína 4 com domínio ligante de metil-CpG [gene] (do inglês, *Methyl-CpG binding domain protein 4*)
MCHRI – Receptor 24 acoplado à proteína G [gene] (do inglês, *Melanin concentrating hormone receptor 1*)
MeCP2 – Proteína 2 ligante de metil-CpG (do inglês, *methyl-CpG-binding protein 2*)
NAD⁺ – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (forma oxidada) (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*)
NADP⁺ – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (forma oxidada) (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
NADPH – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato (forma reduzida)
NO• – Óxido nítrico
NR3C1/Nr3c1 – Membro 1 do grupo C da subfamília 3 de receptores nucleares, também referido como receptor glicocorticoide [gene] (do inglês, *Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*)
O₂ – Oxigênio molecular (gás oxigênio)
O₂^{•-} – Ânion superóxido
OH• – Radical hidroxila
ONOO⁻ – Ânion peroxinitrito
pH – Potencial hidrogeniônico
PN – Pós-natal
PRX – Peroxirredoxina
RELN – Reelina [gene]
REST – Fator de transcrição silenciador de elemento 1 repressor (do inglês, *repressor element-1 (RE1) silencing transcription factor*)
Rpd3 – Dependência 3 de potássio reduzida de levedura (do inglês, *reduced potassium dependency 3*) (proteína com atividade de HDAC)
rpm – Rotações por minuto
Sir2 – Regulador 2 de informação silente (sirtuína) (do inglês, *silent information regulator 2*)
SIRT – Sirtuína
SLC6A4 - Transportador de 5-hidroxitriptamina [gene] (do inglês, *Solute carrier family 6 member 4*)
SOD/SOD – Superóxido dismutase
TB – Transtorno bipolar
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances*)
TRX – Tiorredoxina redutase
UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

Sumário

1	Introdução.....	14
1.1	Transtorno bipolar.....	14
1.2	Estresse oxidativo.....	15
1.3	Epigenética.....	19
1.3.1	DNMTs.....	20
1.3.2	HATs.....	21
1.3.3	HDACs.....	22
1.4	A importância da epigenética para o neurodesenvolvimento e o TB.....	24
1.5	Estresse repetido e variado no período pré-natal.....	27
1.6	Justificativa.....	28
2.1	Objetivo geral.....	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	Materiais e métodos.....	32
3.1	Animais experimentais.....	32
3.2	Estresse repetido e variado pré-natal.....	32
3.3	Experimentos de fase 1 – Avaliação de comportamentos do tipo locomotor, exploratório e depressivo das ratas após o desmame de seus respectivos filhotes.....	33
3.4	Experimentos de fase 2 – Avaliação comportamental da prole adulta de ratas submetidas ao estresse pré-natal.....	34
3.5	Testes comportamentais.....	35
3.5.1	Análise do comportamento materno.....	35
3.5.2	Teste do labirinto em cruz elevado.....	36
3.5.3	Teste de campo aberto.....	37
3.5.4	Teste do borrifo com solução de sacarose.....	38
3.5.5	Teste do nado forçado.....	38
3.6	Preparo das amostras de hipocampo da prole.....	39
3.7	Avaliações bioquímicas.....	40
3.7.1	Extração nuclear.....	40
3.7.2	Atividade de DNMTs, HATs e HDACs.....	40
3.7.3	Níveis de acetilação de H3K9 e H3K14.....	42
3.7.4	Avaliações de estresse oxidativo.....	43
3.7.5	Determinação da concentração de proteínas.....	45

3.8 Análise estatística	46
4 Resultados	47
5 Discussão	62
5.1 Conclusões.....	70
Referências.....	72
ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	96
ANEXO B – Adendos do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	98

1 Introdução

1.1 Transtorno bipolar

O transtorno bipolar (TB) é um transtorno mental caracterizado por flutuações cíclicas do humor, incluindo desde estados de alegria e tristeza até mudanças patológicas, tais como os episódios de mania ou hipomania, depressão e estados mistos (Ketter, 2010; Baek et al., 2011; Kim et al., 2017). Basicamente, o TB é classificado em dois tipos: 1) No tipo I, os pacientes apresentam os episódios de mania alternados com os de depressão; 2) No tipo II, entretanto, os pacientes apresentam episódios de hipomania ao invés de mania, alternados com episódios depressivos. A mania é um estado elevado do humor, no qual o paciente encontra-se expansivo ou irritável por um período de, pelo menos, uma semana ou se a hospitalização for necessária. O episódio hipomaníaco possui os mesmos critérios de alterações de humor do estado maníaco, porém, com duração mínima de quatro dias (Associação de Psiquiatria Americana, 2013; Jain e Mitra, 2021).

Apesar de o marco clínico no diagnóstico do TB ser a mania (ou a hipomania), é bem descrito que os pacientes passam a maior parte de suas vidas em episódios depressivos (Judd et al., 2003). O paciente em depressão apresenta o humor deprimido e/ou anedonia, o que é acompanhado por perda ou ganho significativo de peso, insônia ou hipersonia, retardo ou agitação psicomotora, fadiga ou perda da energia, sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva, dificuldade para concentrar-se e pensamentos de morte ou ideação suicida (Associação de Psiquiatria Americana, 2013). O TB é um dos transtornos mentais mais incapacitantes já descritos, com alto impacto na saúde e na vida do paciente, de sua família e da sociedade (Namjoshi e Buesching, 2001; Zendjidjian et al., 2012; Sylvia et al., 2015). Estima-se que a sua taxa de prevalência mundial seja de até 2,4% (Merikangas et al., 2011). Além disso, esta condição é a sexta maior causa de incapacitação e a terceira entre os transtornos psiquiátricos, após o transtorno depressivo maior e a esquizofrenia (Murray e Lopez, 1997; Colombo et al., 2012). Apesar de sua gravidade, o TB ainda é uma condição pouco compreendida e inúmeras pesquisas têm sido realizadas a fim de promover um melhor entendimento sobre a etiologia e fisiopatologia deste transtorno.

O tratamento do TB é realizado por meio de abordagens farmacológicas, tais como o uso de lítio, antipsicóticos atípicos, valproato e alguns antidepressivos, bem como por terapias psicossociais, tais como a terapia cognitiva-comportamental e a psicoeducação (Geddes e Miklowitz, 2013). Já o diagnóstico desta condição é realizado exclusivamente pela avaliação e

interpretação de sinais e sintomas e, apesar do grande avanço, não existe nenhum marcador biológico específico para o transtorno, indicando a necessidade de mais estudos sobre sua neurobiologia (Grande et al., 2015; Teixeira et al., 2016).

Embora a fisiopatologia do TB seja pouco conhecida, diversas teorias fisiopatológicas foram postuladas para esse transtorno. Uma teoria convincente é o desenvolvimento prejudicado do sistema nervoso em estágios precoces do desenvolvimento (Marangoni et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que o desenvolvimento anormal do sistema nervoso central pode desempenhar um papel importante na origem dos transtornos psiquiátricos (Lewis e Levitt, 2002; Rapoport et al., 2005; Kloiber et al., 2020). Neste contexto, acredita-se que a interação entre fatores ambientais e genéticos (na forma de alterações epigenéticas) esteja envolvida na fisiopatologia do TB (Fries et al., 2016).

1.2 Estresse oxidativo

O *estresse oxidativo*, um termo cada vez mais presente na pesquisa sobre o TB, pode ser definido como um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade das células de eliminar tais espécies por meio de defesas antioxidantes, de forma a propiciar o acúmulo de ERO (Pizzino et al., 2017; Liguori et al., 2018) (**Figura 1**). Ao menos três questões distintas emergem desta definição (Preiser, 2012):

- 1) Uma produção de formas reativas ou ativadas de oxigênio,
- 2) com toxicidade potencial;
- 3) A presença de sistemas de desintoxicação (ou *destoxificação*).

Neste contexto, apesar de as ERO serem necessárias em diversas funções celulares, estas espécies, quando produzidas em excesso e sem o controle dos sistemas de defesa antioxidante, podem induzir danos em quaisquer componentes de uma célula (Preiser, 2012).

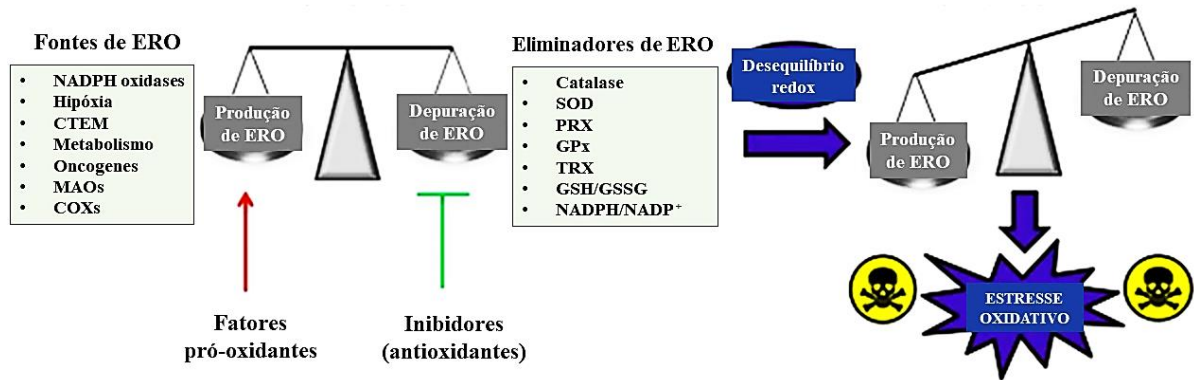


Figura 1: Representação esquemática que ilustra a definição de estresse oxidativo. Geralmente, cada célula mantém um equilíbrio entre os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os níveis de compostos que inibem a produção destas espécies, ou seja, os antioxidantes (enzimáticos ou não). Quando as fontes de ERO se sobrepõem aos mecanismos de defesa antioxidante, conforme observado em uma situação de desequilíbrio na homeostase redox, a produção de ERO excede a capacidade dos compostos antioxidantes de eliminar tais espécies reativas, o que resulta em estresse oxidativo, com dano potencial às macromoléculas e demais componentes celulares. Adaptada de Panieri e Santoro (2016). Abreviaturas: COXs: Ciclo-oxigenases (EC 1.14.99.1); CTEM: Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial; ERO: Espécie reativa de oxigênio; GPx: Glutaciona peroxidase (EC 1.11.1.9); GSH: Glutaciona reduzida; GSSG: Glutaciona oxidada; MAOs: Monoamina-oxidases (EC 1.4.3.4); NADPH: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato (reduzido); NADP⁺: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato (oxidado); PRX: Peroxirredoxina (EC 1.11.1.24); SOD: Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1); TRX: Tiorredoxina reductase (EC 1.8.1.9).

As mitocôndrias são a principal fonte de ERO, as quais são produzidas na medida em que os elétrons fluem pela cadeia respiratória e se combinam com o oxigênio molecular (O₂) (Kandola et al., 2015). De fato, o transporte de elétrons por meio das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial não é totalmente eficiente, de modo que a redução incompleta destas partículas ao se combinarem com o oxigênio resulta na formação do ânion superóxido (O₂^{•-}) na matriz mitocondrial. A taxa de formação depende do número de elétrons presentes na cadeia, sendo elevada em condições de hiperóxia, hiperglicemia, ou mesmo na hipóxia (quando a disponibilidade reduzida de oxigênio, o qual atua comoceptor de elétrons no complexo IV, desencadeia acúmulo de elétrons) (Burton e Jauniaux, 2011). Adicionalmente, o metabolismo do ferro e de grupos heme na célula pode fazer com que o ferro adquira a configuração de cátion ferroso (Fe²⁺), catalisando a geração de radicais hidroxila (OH•) por meio das reações de Haber-Weiss e Fenton. Desta forma, a homeostase redox deve ser regulada rigorosamente para garantir que o excesso de ferro seja quelado a fim de evitar a geração de OH• e de outras EROs (Breitenbach e Eckl, 2015). A **Figura 2** esquematiza a sequência de reações envolvidas na redução do oxigênio molecular em água que ocorre na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

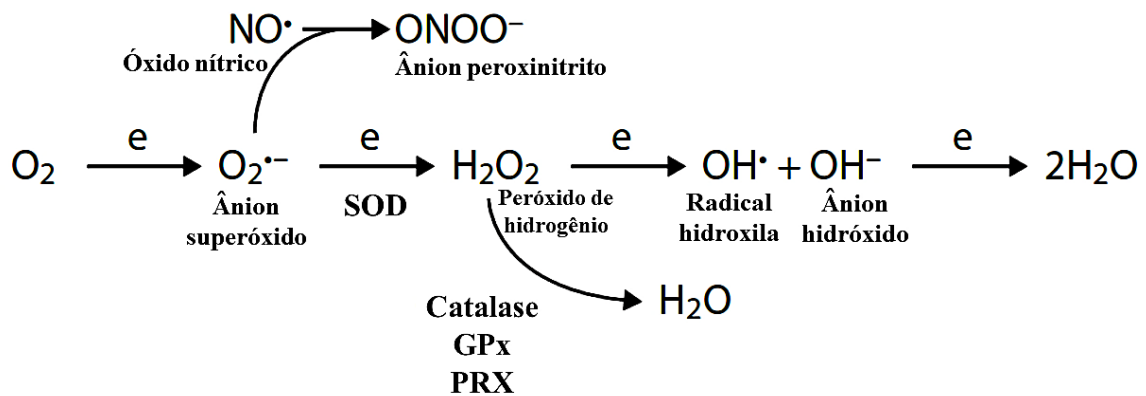


Figura 2: Sequência de reações que ocorrem durante a redução do oxigênio molecular (O₂) em água (H₂O) na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. O O₂ pode sofrer uma redução incompleta com o ganho de um elétron (e), gerando o ânion superóxido (O₂^{•-}), na matriz da mitocôndria. A partir daí, o O₂^{•-} pode tanto se combinar com o óxido nítrico (NO•), gerando o ânion peroxinitrito (ONOO⁻), ou ser convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em uma reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1). O H₂O₂, por sua vez, pode sofrer decomposição em radical hidroxila (OH•) e O₂^{•-} ou ser convertido em H₂O por ação da catalase (EC 1.11.1.21), glutatona peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) ou peroxirredoxina (PRX, EC 1.11.1.24). Adaptado de Noh e Ha (2011).

Durante a conversão do oxigênio em água que ocorre na cadeia respiratória, ao menos duas importantes enzimas antioxidantes participam deste processo: A catalase (EC 1.11.1.21) e a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1). A catalase catalisa a desprotonação (perda de prótons) do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), gerando água e oxigênio (Sepasi Tehrani e Moosavi-Movahedi, 2018). Com base em diferenças em sua sequência e estrutura, há três tipos diferentes de catalase: 1) A enzima monofuncional contendo o grupo heme, que está presente em todos os organismos aeróbicos; 2) A enzima catalase-peroxidase bifuncional, que também contém um grupo heme mas é estruturalmente relacionada às peroxidases de plantas; 3) E a catalase contendo manganês como grupo prostético, a qual não apresenta o grupo heme (Nandi et al., 2019). Já a SOD é a enzima que catalisa a produção de oxigênio e água a partir do ânion superóxido. Em humanos, esta proteína se apresenta em três isoformas: SOD1, localizada no citoplasma; SOD2, mitocondrial; e a SOD3, que é extracelular. As SODs são associadas a cofatores, tais como ferro, cobre, zinco, manganês e níquel, de modo que a SOD1 e SOD3 possuem cobre e zinco, enquanto que a SOD2 contém manganês em seu sítio ativo (Jiang et al., 2016). Conforme descrito na **Figura 2**, a catalase e a SOD são proteínas cruciais no processo de desintoxicação de ERO nas células.

As ERO causam modificações químicas em proteínas (desnaturação e agregação), lipídios (peroxidação), bem como em carboidratos e ácidos nucleicos (alterações na estrutura do DNA) (Jakubczyk et al., 2020). Neste contexto, o estresse oxidativo causa danos a macromoléculas e está associado a diversas doenças/condições, tais como aterosclerose,

diabetes, câncer, doenças neurodegenerativas e envelhecimento (Gupta et al., 2014) (**Figura 3**). Além disso, estudos têm demonstrado uma forte correlação entre estresse oxidativo e a fisiopatologia de transtornos mentais (Michel et al., 2012; Salim, 2014; Smaga et al., 2015; Hassan et al., 2016; Fedoce et al., 2018). No caso do TB, por exemplo, foram detectadas alterações em diversos parâmetros de estresse oxidativo (Andreazza et al., 2008; Steckert et al., 2010; Andreazza et al., 2015; Tsai e Huang, 2015; Rowland et al., 2018), indicando que este processo pode ser uma importante fonte de marcadores biológicos para o transtorno.

Além da catalase e SOD, outros parâmetros sugestivos de estresse oxidativo incluem as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e os níveis de oxidação do diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). As TBARS são indicadores bioquímicos da homeostase redox, sendo biomarcadores de estado pró-oxidante, e sua determinação constitui um método para a triagem e monitoramento da peroxidação lipídica (dano oxidativo a lipídeos) (Mikić et al., 2011). Uma das TBARS mais avaliadas na pesquisa biomédica é o malondialdeído, um potencial marcador de peroxidação que, ao reagir com o ácido tiobarbitúrico, produz um conjugado capaz de refletir a luz vermelha (cuja intensidade da cor é proporcional à concentração do conjugado presente na amostra) (Ohkawa et al., 1978; Aguilar Diaz De Leon e Borges, 2020). A detecção *in situ* de níveis de ERO utilizando DCFH-DA tem sido também amplamente adotada por pesquisadores que estudam o estresse oxidativo (Labuschagne e Brenkman, 2013). Neste procedimento, o DCFH-DA cruza a membrana celular e é facilmente desacetilado por esterases intracelulares; esta reação converte o DCFH-DA em um intermediário não fluorescente, o qual é imediatamente oxidado ao composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) na presença de H₂O₂ e outras ERO. Desse modo, os níveis de DCF, diretamente proporcionais à intensidade de fluorescência a ser mensurada, são proporcionais ao nível aproximado de ERO presente em um determinado meio (Labuschagne e Brenkman, 2013; Yoon et al., 2018).

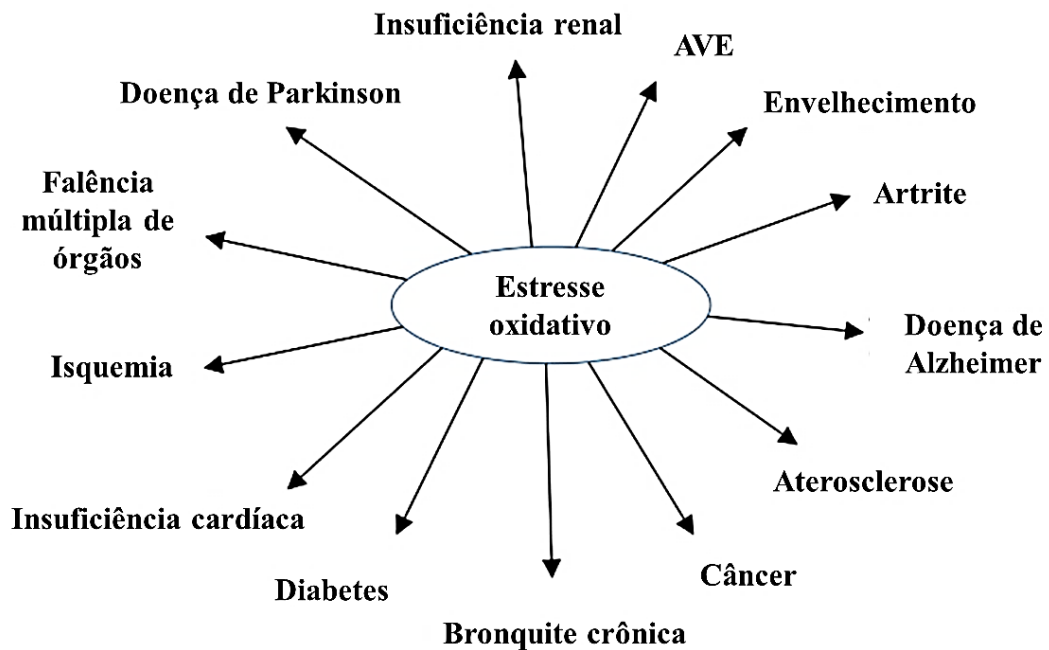


Figura 3: Representação esquemática ilustrando a preponderância do estresse oxidativo em diferentes condições de saúde. Adaptado de Ghezzi et al., 2017. Abreviatura: AVE: Acidente vascular encefálico.

1.3 Epigenética

Grande parte do DNA de eucariotos é compartimentalizada em estruturas chamadas nucleossomos, complexos supramoleculares formados quando uma sequência de DNA de aproximadamente 147 pares de base envolve um octâmero de histonas (Xu e Olson, 2010; Cutter e Hayes, 2015; Brown et al., 2018). Cada octâmero de histonas é uma estrutura globular formada por duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4 (Quina et al., 2006; de Jong e van Noort, 2019). A acessibilidade do DNA à transcrição gênica é regulada dinamicamente pela atividade de enzimas epigenéticas, incluindo as DNA metiltransferases (DNMTs, EC 2.1.1.37), histonas acetiltransferases (HATs, EC 2.3.1.48) e as histonas desacetilases (HDACs, EC 3.5.1.98) (Copeland et al., 2010). Estas enzimas constituem o *core* de mecanismos que dirigem o neurodesenvolvimento em mamíferos, conforme revisado recentemente por Salinas e colegas pesquisadores (2020).

Neste contexto, a *epigenética* é um termo que pode ser definido como todos os mecanismos que levam a alterações funcionais do genoma ao induzir modificações estáveis na expressão gênica, sem que a sequência de nucleotídeos de ácido desoxirribonucleico (DNA) que constitui o gene seja alterada (Nieratschker et al., 2013). O câncer, as doenças autoimunes, os transtornos mentais, as doenças neurodegenerativas e o abuso de substâncias são eventos com significativo envolvimento de alterações epigenéticas (Moosavi e Motevalizadeh

Ardekani, 2016). Entretanto, processos fisiológicos como o desenvolvimento embrionário e fetal e o envelhecimento também são regulados por mecanismos epigenéticos (**Figura 4**).

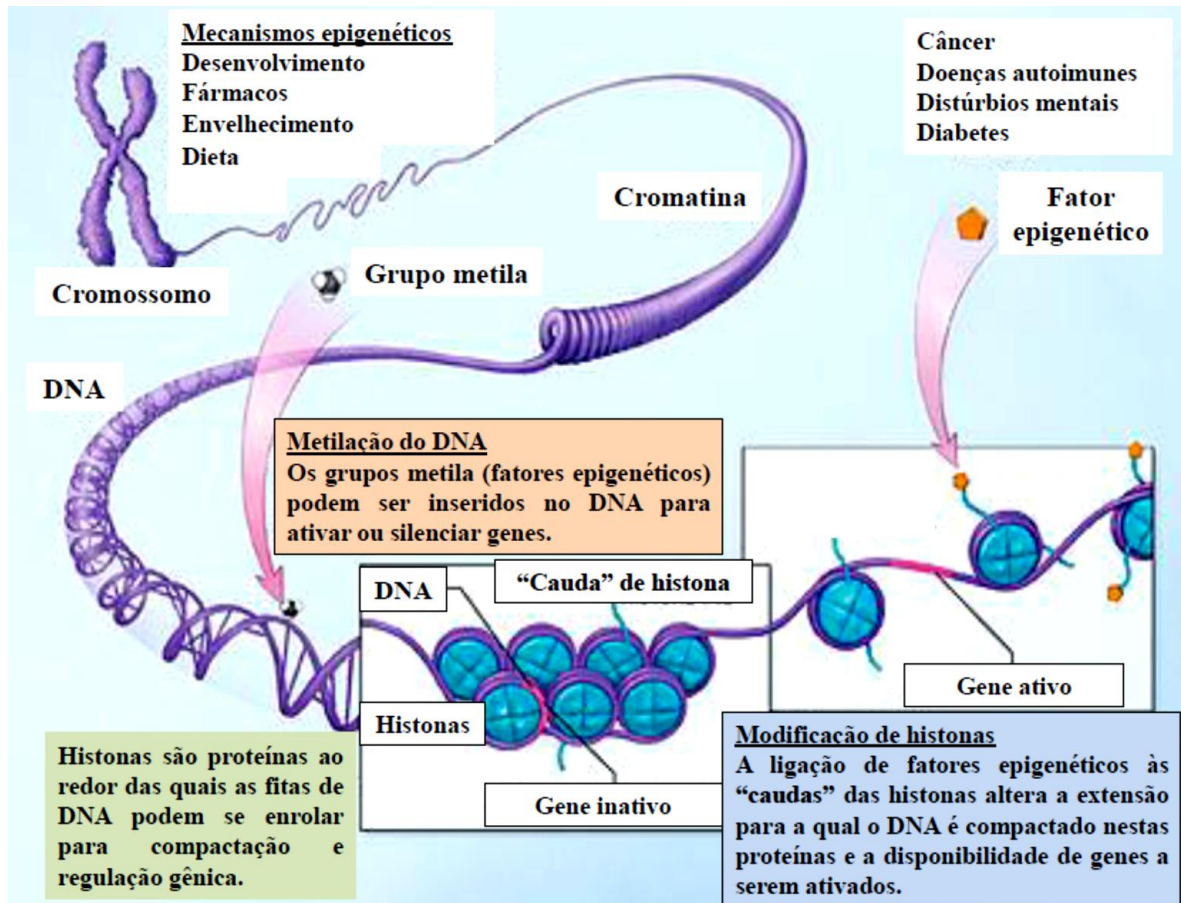


Figura 4: Esquema que ilustra genericamente os mecanismos epigenéticos que alteram a estrutura da cromatina. A metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) está associada ao desenvolvimento embrionário e fetal, uso de fármacos, envelhecimento e a certos componentes da dieta. Por outro lado, a modificação de histonas, que consiste na ligação covalente de fatores epigenéticos nas extremidades das cadeias N-terminais (“caudas”) destas proteínas, pode ser induzida por câncer, doenças autoimunes, distúrbios/transtornos mentais e diabetes. O resultado destes mecanismos contribui positiva ou negativamente para a exposição de seqüências de DNA que compõem determinados genes. Adaptada de *National Institutes of Health* (2011).

1.3.1 DNMTs

A metilação do DNA, que normalmente ocorre no carbono 5' de resíduos de citosina em dinucleotídeos de citosina-fosfato-guanina (CpG), é catalisada pelas DNMTs, grupo de enzimas com um domínio regulatório (N-terminal) e catalítico (C-terminal) que inclui a DNMT1, DNMT3A e a DNMT3B (Gujar et al., 2019). Estas enzimas utilizam como coenzima a *S*-adenosilmetionina, um composto sintetizado na via da metionina que serve como o principal doador de grupos metila em reações bioquímicas (Armstrong et al., 2014). Os mecanismos catalisados pelas DNMTs, além de poder reprimir a transcrição gênica, incluem a repressão

transcricional herdável de retrotransposons, a expressão monoalélica de genes que sofreram *imprinting*, a inativação do cromossomo X em células femininas, bem como a exposição seletiva de promotores de genes aos fatores de transcrição (Edwards et al., 2017). Por outro lado, a metilação de ilhas CpG intragênicas em sítios diferentes da região promotora é associada ao aumento da expressão gênica através da inibição da iniciação da transcrição em regiões não promotoras do gene (Neri et al., 2017).

Após a replicação, a metilação do DNA pode ser mantida pela DNMT1, a qual é uma metiltransferase de manutenção, com preferência por sítios CpG hemimetilados (Gowher e Jeltsch, 2018). Por outro lado, a DNMT3A e a DNMT3B não demonstram tal preferência, razão pela qual elas estão envolvidas na geração *de novo* de padrões de metilação do DNA durante o desenvolvimento de células germinativas e nos estágios embrionários iniciais (Li e Zhang, 2014; Gowher e Jeltsch, 2018). As DNMTs possuem uma importante função biológica na manutenção da integridade do genoma, colaborando para impedir a instabilidade dos cromossomos (Jin e Robertson, 2013). Além disso, a manutenção de padrões específicos de metilação do DNA através das divisões celulares torna a atividade destas enzimas um importante mecanismo para a preservação da memória epigenética (Chen e Zhang, 2020).

1.3.2 HATs

A acetilação de histonas é um mecanismo epigenético associado à ativação da transcrição gênica (Imran et al., 2019). Este mecanismo é catalisado pelas HATs, as quais transferem um grupamento acetila proveniente da acetil-coenzima A para grupos amino presentes em resíduos de lisina (K) nas extremidades das cadeias das histonas (Boycheva et al., 2014). A acetilação em resíduos de lisina 9 (H3K9) e 14 (H3K14) da histona H3, por exemplo, é um mecanismo epigenético catalisado por HATs que induz uma cromatina mais aberta, transcricionalmente ativa (Bergmann et al., 2012; Karmodiya et al., 2012; Fernández-Sánchez et al., 2013; Qiao et al., 2015).

As HATs podem ser classificadas em, pelo menos, cinco famílias diferentes, incluindo a HAT1 (histona acetiltransferase 1); Gcn5/PCAF (nomeada de acordo com seus membros fundadores Gcn5 (de levedura) e seu ortólogo humano, PCAF); MYST (nomeada de acordo com as letras iniciais dos nomes de seus membros fundadores MOZ, Ybf2/Sas3 (de levedura), Sas2 (de levedura) e Tip60 (humano)); p300/CBP (nomeada de acordo com os nomes de duas proteínas identificadas em humanos – hp300 e hCBP); e Rtt109 (denominada de acordo com sua identificação em levedura, atuando como um regulador da transposição do produto 109 do

gene *Ty1*) (Yuan e Marmorstein, 2013). É importante destacar que p300/CBP possuem um papel muito importante no desenvolvimento do sistema nervoso central, bem como na regulação da plasticidade de neurônios maduros (Lipinski et al., 2019).

Ao contrário das HDACs, as HATs não são consideradas alvos terapêuticos relevantes, uma vez que nenhuma aplicação clínica foi descrita para tais enzimas (Wapenaar e Dekker, 2016). Contudo, algumas isoformas de HAT, tais como a HAT 1, desempenham uma importante função no reparo do DNA dirigido por recombinação homóloga (Yang et al., 2013). Além disso, a acetilação de histonas catalisada por tais enzimas regula a renovação de células tronco hematopoiéticas, bem como sua proliferação e diferenciação nos progenitores hematopoiéticos, razão pela qual as translocações cromossômicas que envolvem HATs são frequentemente detectadas em enfermidades malignas hematológicas (Sun et al., 2015).

1.3.3 HDACs

A remoção de grupos acetila das histonas acetiladas constitui um mecanismo básico que leva a cromatina a um estado transcricionalmente inativo, devido à falta de acessibilidade das proteínas transcricionais à região promotora do gene (Parbin et al., 2014). A desacetilação de histonas é um mecanismo catalisado pelas HDACs, enzimas que removem grupos acetila ligados a resíduos de 1-N-acetil-L-lisina na extremidade das cadeias laterais das histonas, de modo a neutralizar o efeito das HATs e suprimir a expressão gênica (Lombardi et al., 2011; Chen et al., 2015).

Há quatro classes principais de HDACs em humanos, agrupadas de acordo com sua homologia com proteínas de leveduras, tipo de atividade enzimática, bem como localização celular (Hassel, 2019). Algumas isoenzimas (classes I, II e IV) são dependentes de íons de zinco, pois utilizam este metal como cofator, incluindo a HDAC1–HDAC11 (Barneda-Zahonero e Parra, 2012; Zhang e Zhong, 2014). As HDACs 1, 2, 3 e 8 estão agrupadas na classe I, apresentando similaridade de sequência com a dependência 3 de potássio reduzida de levedura (*Rpd3*). Já as HDACs de classe II, incluindo as HDACs 4, 5, 6, 7, 9 e 10, são distribuídas pelas subclasses IIA e IIB, apresentando homologia de sequência com a histona desacetilase 1 de levedura (*hda-1*). A HDAC 11 (classe IV) possui similaridade estrutural com as classes de desacetilase de levedura *Rpd3* e *hda-1*. Outra classe de enzimas (III) requer o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD^+) como coenzima (Barneda-Zahonero e Parra, 2012), tem similaridade de sequência com a desacetilase de levedura regulador 2 de informação silente (*Sir2*) e inclui as sete sirtuínas (*SIRT1–SIRT7*). As sirtuínas são conhecidas por modular

diversos processos biológicos, incluindo a sobrevivência, o envelhecimento, a resposta ao estresse e vários processos metabólicos (Singh et al., 2018).

As HDACs são enzimas criticamente envolvidas no desenvolvimento do câncer, na fibrose intersticial, em doenças autoimunes e inflamatórias, bem como em distúrbios metabólicos (Tang et al., 2013). Além disso, estas enzimas foram propostas como importantes alvos terapêuticos para transtornos depressivos, de modo que o uso de inibidores destas proteínas tem se provado eficaz no tratamento destas condições (Misztak et al., 2018). Entretanto, um corpo crescente de evidência tem sugerido um importante papel da atividade das HDACs de classe I, especialmente as HDACs 1 e 2, no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) assim como da transmissão sináptica, influenciando a aprendizagem e a memória (Mahgoub e Monteggia, 2014). No contexto do estresse oxidativo, tem sido demonstrado que a inibição de HDACs é capaz de contrabalançar os efeitos deste tipo de estresse em estudos mimetizando cenários patológicos (Shimazu et al., 2013; Nakamaru et al., 2015; Tokarz et al., 2016; Gao et al., 2018; Manea et al., 2020), o que destaca o protagonismo destas enzimas na fisiopatologia de diversas doenças.

A **Figura 5** esquematiza as principais alterações mediadas pelas três enzimas epigenéticas discutidas no presente estudo (DNMTs, HATs e HDACs).

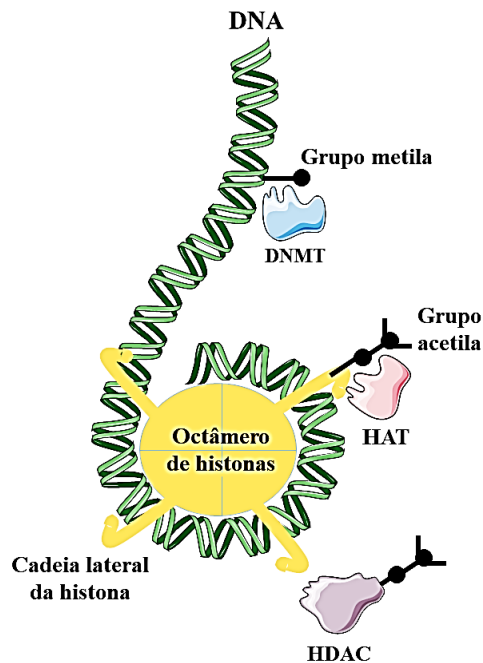


Figura 5: Representação esquemática sobre a função de importantes enzimas epigenéticas. O DNA é compartimentalizado nos cromossomos através de sua interação com as histonas. A transcrição gênica pode ser inibida por meio da metilação do DNA (catalisada pela DNA metiltransferase, DNMT, EC 2.1.1.37), bem como através da desacetilação de histonas (catalisada pela histona desacetilase, HDAC, EC 3.5.1.98). Por outro lado, a acetilação de histonas, um mecanismo catalisado pela histona acetiltransferase (HAT, EC 2.3.1.48), geralmente ativa a transcrição gênica. Figura elaborada pelo autor.

1.4 A importância da epigenética para o neurodesenvolvimento e o TB

A regulação de diversos aspectos do *epigenoma* (o conjunto de todos os mecanismos epigenéticos) é um fator crucial para o desenvolvimento cerebral normal *in utero* e permanece importante até o estágio cerebral adulto (Cristancho e Marsh, 2020). Vários fatores ambientais potencialmente “reeditam” o epigenoma. Entretanto, os mecanismos epigenéticos são reversíveis, o que é diferente do que ocorre no *genoma*, cujas alterações na estrutura são geralmente irreversíveis (Miyake et al., 2012).

A importância dos mecanismos epigenéticos durante o desenvolvimento pode ser compreendida por uma questão fundamental: Como mais de 200 tipos celulares diferentes podem ser produzidos a partir de células com praticamente o mesmo material genético? Apesar de toda célula apresentar o mesmo material genético, a fração deste material que é transcrita ativamente difere de acordo com cada tipo de célula. Assim, diversos tipos celulares emergem a partir da embriogênese (O'Donnell e Meaney, 2020). O processo de diferenciação celular resulta em especialização das funções celulares, o que é refletido no perfil transcricional, ou *transcriptoma*, de um tipo celular específico, correspondendo à porção do genoma ativamente expressa naquele tipo celular. As células do cérebro, por exemplo, estabelecem a capacidade de aprendizado e memória, bem como a comunicação e interações sociais, utilizando frações específicas do genoma ao fazê-lo (O'Donnell e Meaney, 2020).

Conforme supracitado, as alterações epigenéticas são mecanismos reversíveis. Neste contexto, durante muito tempo, acreditou-se que as alterações epigenéticas induzidas ambientalmente eram completamente eliminadas durante as duas ondas de reprogramação de marcas epigenéticas na gametogênese e após a fertilização (estágio a partir do qual são estabelecidos os padrões epigenômicos específicos para cada tipo de tecido). Contudo, hoje é aceito que as alterações epigenéticas induzidas pelo ambiente não são completamente eliminadas ao longo das divisões celulares, mas são parcialmente mantidas na gametogênese, em alguns loci no genoma, e transmitidas para a geração de células seguinte (Kubota et al., 2012 e 2015).

As alterações epigenéticas que são induzidas através do ambiente são capazes de exercer efeitos significativos no encéfalo em desenvolvimento, na plasticidade neural e em sistemas neuroendócrinos, cujas consequências são geralmente estáveis e podem perdurar no encéfalo até o estágio adulto (Kofink et al., 2013). De fato, o epigenoma é vulnerável a perturbações durante o desenvolvimento pré-natal, fase na qual as células-tronco sofrem diferenciação e marcas epigenéticas significativas estão sendo consolidadas, assim como

durante o desenvolvimento pós-natal precoce, estágio em que os circuitos neurais apresentam uma significativa plasticidade. Estas alterações epigenéticas podem interferir em vias implicadas em mecanismos patológicos de transtornos mentais, de modo que uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na interação entre genes e o ambiente circundante pode fornecer conhecimento valioso acerca da etiologia dos transtornos mentais (Kofink et al., 2013). As alterações epigenéticas induzidas por estresse ambiental podem modificar fenótipos, e o aumento no número de pacientes com TB e outros transtornos de neurodesenvolvimento pode ser causado por alterações epigenéticas induzidas por estresse ambiental ou social sofrido por mães e ou seus filhos (Kubota, 2016).

Os principais mecanismos epigenéticos passíveis de sofrerem desregulação no TB incluem a metilação do DNA, a metilação ou acetilação de histonas, bem como microRNAs e outros RNAs não codificantes (Legrand et al., 2021). No caso particular da metilação do DNA, esta pode atuar como um mediador entre a exposição a fatores de risco e o desenvolvimento de transtorno psiquiátrico na descendência adulta (Barker, 2018).

A metilação do DNA, as modificações pós-transcricionais de histonas e a regulação epigenética mediada por microRNAs desempenham importantes funções no neurodesenvolvimento e são capazes de regular um grande número de genes simultaneamente (Shorter e Miller, 2015). Mutações em genes de DNMTs e em proteínas ligantes de DNA metilado (tais como a proteína 2 ligante de metil-CpG, MeCP2) podem levar a transtornos de neurodesenvolvimento. Em relação à modificação de histonas, a HDAC1 e HDAC3 são mediadores cruciais da neurogênese embrionária, regulando a acetilação de H3K9 (Večeřa et al., 2018; Salinas et al., 2020). Neste contexto, o ácido valproico e outros inibidores de HDAC são comumente utilizados na terapia do TB, o que reforça o caráter neurodesenvolvimental deste transtorno (Abel e Zukin, 2008; Salinas et al., 2020).

De fato, a desregulação de histonas desempenha uma importante função na fisiopatologia do TB (Shorter e Miller, 2015). Além disso, foi demonstrado um padrão de metilação significativamente alterado em genes de vias envolvidas no neurodesenvolvimento e na fisiopatologia deste transtorno, incluindo os genes do receptor 24 acoplado à proteína G (*MCHRI*) e da catenina α -2 (*CTNNA2*) (Dempster et al., 2011). Foram também demonstradas alterações significativas no padrão de metilação em ilhas CpG adjacentes a promotores de genes envolvidos no neurodesenvolvimento e, ao mesmo tempo, no TB e na esquizofrenia (Li et al., 2015). Além disso, embora não tenham sido analisados no presente estudo, também foi sugerido que os microRNAs -34a, -137, -138, -145 e -181b podem ter sua expressão desregulada no TB,

o que poderia estar envolvido nas alterações de migração e diferenciação de neurônios que foram associadas ao transtorno (O'Shea e McInnis, 2015).

O fator de transcrição silenciador de elemento 1 repressor (REST), um fator silenciador da transcrição gênica amplamente expresso durante a embriogênese e com função crítica no desenvolvimento do fenótipo neuronal (Roopra et al., 2001; Ballas e Mandel, 2005; Ooi e Wood, 2007; Noh et al., 2012), é reconhecido por interagir com uma ampla gama de co-reguladores da transcrição, o que pode promover a ativação da expressão gênica e repressão ou silenciamento epigenético em longo prazo de genes específicos de neurônios. Neste contexto, é importante ressaltar que níveis reduzidos de RNA mensageiro deste fator de transcrição foram detectados em linfócitos de pacientes portadores de transtornos de humor durante episódios depressivos, o que foi acompanhado por alterações na transcrição do hormônio de liberação da corticotrofina (Otsuki et al., 2010).

Pessoas que sofreram maus-tratos/abusos durante a infância precoce, os quais podem ter um padrão de estresse repetido e variado, são mais suscetíveis a desenvolver transtornos mentais como depressão maior, transtornos de ansiedade, transtornos de abuso de substâncias, esquizofrenia e TB na fase adulta (Schmitt et al., 2014). Além disso, as experiências na infância precoce que são acompanhadas por estímulo estressor significativo são associadas a alterações na expressão gênica. Os genes suscetíveis à desregulação epigenética induzida por estresse incluem os genes de resposta ao estresse do eixo HPA, o que é geralmente acompanhado por hiperatividade e alterações em processos corticais e subcorticais de neuroplasticidade e neurodegeneração. Podem ocorrer também alterações na regulação epigenética do gene codificante de receptor glicocorticoide (*NR3C1*), gene da proteína 5 ligante de FK506 (*FKBP5*), gene de vasopressina arginina (*AVP*) e de receptor α de estrogênio (*ESR1*), gene do transportador de 5-hidroxitriptamina (*SLC6A4*), bem como no gene codificante do fator neurotrófico derivado do encéfalo (*BDNF*) (Talarowska, 2020).

Portanto, a análise de marcas epigenéticas específicas pode fornecer uma medida da qualidade do ambiente no início da vida e do risco para desenvolver transtornos mentais. Além do neurodesenvolvimento, as alterações epigenéticas parecem desempenhar um papel como mediadores na regulação do estresse e programação de sequelas decorrentes da exposição a estresses no início da vida (Murgatroyd e Spengler, 2012).

1.5 Estresse repetido e variado no período pré-natal

A exposição materna ao estresse durante o segundo trimestre da gravidez pode alterar o desenvolvimento cerebral do feto (Buss et al., 2010; Wu et al., 2020). Eventos como luto materno, infecção viral, desnutrição ou a exposição a desastres naturais durante esta janela gestacional aumentam a probabilidade de a prole desenvolver transtornos psiquiátricos (Walker e Diforio, 1997; Koenig et al., 2002; Zhang et al., 2018). Está bem descrito que crianças de mães que sofreram de determinados estímulos estressores durante a gestação podem apresentar alterações no desenvolvimento motor precoce e vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos na idade adulta, incluindo depressão, ansiedade, autismo, esquizofrenia e transtornos de abuso de substâncias (Maccari et al., 2003; Weinstock, 2005; Beydoun e Saftlas, 2008; Kinney et al., 2008; Campbell et al., 2009; Lee et al., 2020).

No contexto pré-clínico, os efeitos do estresse pré-natal sobre as alterações fisiológicas, morfológicas e comportamentais da prole de roedores têm sido estudados desde a década de 1950. Já no início da década de 1970, Archer e Blackman demonstraram, por meio de um estudo de revisão, que a prole adulta proveniente de matrizes estressadas pode exibir, em teste de campo aberto, uma menor frequência de movimentos de limpeza, maiores latências (para executar o primeiro cruzamento) e maior quantidade de bolo fecal que a prole de matrizes controles, não estressadas. Além disso, estes autores demonstraram que animais descendentes de ratas estressadas em período pré-natal podem exibir um padrão de locomoção mais lento em comparação com controles (Archer e Blackman, 1971). Isto poderia sugerir, ressalvadas as limitações dos estudos experimentais realizados naquela época, que a prole de matrizes submetidas a estresse durante a gestação tem uma maior predisposição a comportamentos similares àqueles observados em algumas condições humanas, tais como depressão e outros transtornos mentais.

De forma semelhante ao que ocorre em humanos, o cérebro de roedores também é vulnerável ao estresse ambiental (Rayen et al., 2013; Notarangelo e Schwarcz, 2016). Nesse sentido, a exposição de ratas prenhes a eventos estressantes pode alterar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) da prole, o qual é reprogramado, de modo a potencializar as respostas comportamentais a drogas de abuso (Yang et al., 2006; Frye et al., 2011). Além disso, diversos estudos demonstraram que a exposição a estresse durante a gestação em ratos induz alterações fisiológicas e comportamentais importantes na prole adulta (Koehl et al., 1999; Weinstock et al., 2001; Bowman et al., 2004; Koenig et al., 2005; Rayen et al., 2013; Chen et al., 2020).

Adicionalmente, alguns estudos pré-clínicos também demonstram que a exposição repetida ao mesmo estresse em ratas prenhes não é capaz de reproduzir, na prole adulta, as alterações sensoriais e cognitivas que, em humanos, são elementos importantes no diagnóstico dos transtornos mentais (Lehmann et al., 2000; Bowman et al., 2004). Por outro lado, foi demonstrado que a exposição de ratas prenhes ao estresse repetido e variado induz déficits no comportamento e no desenvolvimento sensorial e cognitivo da prole adulta (Koenig et al., 2005; Wilson e Terry, 2013; Sickmann et al., 2015). Conforme citado na subseção anterior, as alterações no epigenoma que são secundárias a perturbações relacionadas ao estresse no início do neurodesenvolvimento podem ser um mecanismo chave que ajuda a explicar estes déficits cognitivos e comportamentais, tanto na prole adulta de roedores como em pacientes com transtornos mentais como o TB.

1.6 Justificativa

Considerando-se que o estresse pré-natal, especialmente o estresse repetido e variado pré-natal, pode levar a alterações no neurodesenvolvimento da prole (Koenig et al., 2005; Wilson e Terry, 2013; Sickmann et al., 2015) e que fatores ambientais podem influenciar a expressão gênica, estudos avaliando os efeitos do estresse induzido em ratas sobre as alterações epigenéticas e comportamentais na prole adulta são relevantes para a investigação destes sistemas no contexto do TB. De fato, há evidência demonstrando que o estresse pré-natal está associado às alterações comportamentais na prole adulta de roedores, tais como déficits de sociabilidade e comportamento do tipo ansioso (Chen et al., 2020), as quais são semelhantes às alterações observadas em alguns transtornos mentais. No TB, por exemplo, eventos estressantes no início da vida, tais como os conflitos familiares e problemas financeiros, foram observados em uma proporção significativamente maior em pacientes portadores de TB recidivantes, em comparação com pacientes que não passaram por tais experiências (Sam et al., 2019). Além disso, os eventos estressantes no início da vida podem ser considerados como um fator de risco para o início dos sintomas em pacientes com TB (Bergink et al., 2016). Visto que a fisiopatologia deste transtorno pode estar relacionada com a interação entre fatores ambientais e genéticos (Fries et al., 2016), as alterações epigenéticas constituem uma explicação interessante para a etiologia do TB e poderiam ser um elo mecanístico entre eventos estressantes no início da vida e o aparecimento desta condição. Adicionalmente, a análise de parâmetros de estresse oxidativo, os quais podem funcionar como marcadores biológicos em pacientes com TB (Steckert et al., 2010; Andrezza et al., 2015; Rowland et al., 2018), especialmente o

TBARS (Andreazza et al., 2008; Tsai e Huang, 2015), pode ser relevante em um cenário mimetizando o efeito do estresse pré-natal em tecido cerebral da prole adulta. Um melhor entendimento sobre a neurobiologia do TB pode colaborar para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para este transtorno.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações epigenéticas, comportamentais e parâmetros de estresse oxidativo na prole adulta de ratas submetidas ao estresse pré-natal, bem como o comportamento destas matrizes.

2.2 Objetivos específicos

- Aferir o comportamento das ratas em relação a sua prole, nos 6 primeiros dias de idade da ninhada;
- Aferir a atividade locomotora e exploratória das ratas, após o desmame de seus respectivos filhotes;
- Avaliar o comportamento do tipo depressivo das ratas, após o desmame de seus respectivos filhotes, por meio do teste do borrifo com solução de sacarose;
- Mensurar o peso da glândula adrenal das ratas, após o desmame de seus respectivos filhotes;
- Aferir o comportamento do tipo ansioso na prole adulta de ratas submetidas ao protocolo de estresse pré-natal, por meio do teste do labirinto em cruz elevado;
- Avaliar a atividade locomotora e exploratória na prole adulta de ratas submetidas ao protocolo de estresse pré-natal, por meio do teste de campo aberto;
- Avaliar o comportamento do tipo depressivo na prole adulta de ratas submetidas ao protocolo de estresse pré-natal, por meio do teste do borrifo com solução de sacarose e nado forçado;
- Avaliar o peso da glândula adrenal da prole adulta de ratas submetidas ao protocolo de estresse pré-natal;
- Mensurar a atividade de HDACs, HATs e DNMTs no hipocampo da prole adulta de ratas submetidas ao protocolo de estresse pré-natal;
- Avaliar os níveis de histona H3 acetilada (em H3K9 e H3K14) no hipocampo da prole adulta de ratas submetidas ao protocolo de estresse pré-natal;
- Determinar os níveis de malondialdeído no hipocampo da prole adulta de ratas submetidas ao protocolo de estresse pré-natal;

- Avaliar os níveis de DCF no hipocampo da prole adulta de ratas submetidas ao protocolo de estresse pré-natal;
- Mensurar a atividade das enzimas catalase e SOD no hipocampo da prole adulta de ratas submetidas ao protocolo de estresse pré-natal.

3 Materiais e métodos

3.1 Animais experimentais

Foram utilizadas 16 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) com 14 dias de gestação, procedentes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Visando à utilização do menor número possível de animais em experimentos, foi alcançada a quantidade de 16 animais. Previamente, estas fêmeas (60 dias de idade) foram mantidas em caixa moradia com machos da mesma espécie para acasalamento, durante aproximadamente 2 dias; somente no 14º dia gestacional é que foram utilizadas para experimentos (descontando-se os 2 dias para procriação). Foram utilizados, também, animais, com aproximadamente 60 dias, prole destas ratas (8-10 animais por matriz). Os ratos foram acondicionados em 5 por caixa, com ciclo claro-escuro de 12 horas (claro às 6:00 h) e livre acesso à água e ao alimento. O ambiente foi mantido à temperatura de 22 ± 1 °C. Uma parte do presente estudo foi realizada com os machos da prole, enquanto que a outra parte com as fêmeas desta mesma prole, a fim de se eliminar uma possível influência de feromônios ou odores nos testes comportamentais (ou seja, machos e fêmeas foram avaliados separadamente).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e uso de animais de laboratório (“Princípios de Cuidado com Animais de Laboratório”, *National Institutes of Health*, publicação nº 80-23, 1996; e “Diretriz 86/609/EEC, do Conselho Europeu”), além das diretrizes para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. É importante ressaltar também que o presente projeto obedeceu a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, aprovada pela Portaria do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal nº 465 de 23 de maio de 2013 (Brasil, 2013). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESC (protocolos nos. 014/2018 e 040/2019; **Anexos A e B**).

3.2 Estresse repetido e variado pré-natal

As ratas prenhes foram divididas em dois grupos: 1) estresse pré-natal (EP; $n = 7$) e 2) controle pré-natal (CP; $n = 9$). Os procedimentos de estresse pré-natal foram iniciados no 14º dia de gestação, estágio no qual se inicia o desenvolvimento neural (Clancy et al., 2001) e que corresponde ao segundo trimestre da gestação em humanos. As ratas prenhes foram submetidas

ao estresse repetido e variado até o nascimento dos filhotes, entre o 20° e 21° dia de gestação (Kinnunen et al., 2003). Os estressores utilizados no presente estudo foram: 1) contenção, em que o animal foi colocado em um cilindro de policloreto de vinila durante 1 hora (14° dia de gestação); 2) contenção e exposição a ambiente frio (4 °C), durante 6 horas; 3) 15 minutos de natação forçada; 4) estresse social de aglomeração *overnight*, em que cada rata prenhe foi acondicionada com outras 6 ratas prenhes em uma mesma caixa; 5) privação de comida da noite para o dia (12 horas; início às 18h00); 6) 24 horas de ciclo claro; 7) sem estresse (o que poderia se constituir em um estímulo ansiogênico, pois os animais estariam habituados a receber um tipo de estresse a cada dia); 8) isolamento social, em que cada rata foi isolada em uma caixa moradia. Esta ordem de estímulos estressores ao longo dos dias foi observada tendo-se em vista a necessidade de evitar a ocorrência de abortos. As ratas do grupo controle não foram submetidas a nenhum tipo de estressor e foram deixadas em suas caixas sem serem perturbadas.

Logo após o parto, as ratas dos grupos EP e CP e seus filhotes foram submetidos à análise de comportamento materno, durante 6 dias, a qual será detalhadamente explicada a seguir (**Item 3.5.3**). Após a avaliação do comportamento materno, as ratas e suas respectivas proles foram deixadas em suas caixas, sem serem perturbadas, até o 21° dia do período pós-natal. No 21° dia do período pós-natal, ocorreu o desmame, e os filhotes foram separados de suas mães e alocados em caixas. Estes animais foram utilizados nos procedimentos experimentais quando adultos (60 dias de idade).

3.3 Experimentos de fase 1 – Avaliação de comportamentos do tipo locomotor, exploratório e depressivo das ratas após o desmame de seus respectivos filhotes

Foram realizados testes comportamentais em cada uma das 16 ratas, após o desmame dos filhotes. Os comportamentos locomotor e exploratório foram determinados por meio do teste do campo aberto (Broadhurst, 1960), detalhado a seguir (**Item 3.5.3**). O comportamento do tipo depressivo das ratas foi avaliado por meio do “teste do borrifo com solução de sacarose” (**Item 3.5.4**). Esta metodologia foi utilizada para se aferir comportamento do tipo anedônico nos animais, caracterizado por uma incapacidade de sentir prazer e falta de autocuidado (em termos de movimentos de limpeza corporal) (Isingrini et al., 2010). O aparato utilizado neste procedimento foi o mesmo que o utilizado no teste do campo aberto.

Ao término desta etapa, as ratas foram submetidas à eutanásia com guilhotina, sem anestesia. Destes animais, foi extraída a glândula adrenal, cujo peso foi avaliado com uma balança analítica de precisão.

3.4 Experimentos de fase 2 – Avaliação comportamental da prole adulta de ratas submetidas ao estresse pré-natal

Neste protocolo, foram utilizados dois grupos experimentais: 1) ratos pertencentes à prole EP e 2) ratos pertencentes à prole CP. A estes animais, foram aplicados os seguintes testes comportamentais (os quais serão descritos a seguir, no **Item 3.5**): teste do campo aberto (Broadhurst, 1960); teste do nado forçado, desenvolvido por Porsolt e colaboradores (1977); teste do borrifo de sacarose (Isingrini et al., 2010); e o teste do labirinto em cruz elevado (para aferir o comportamento do tipo ansioso) (Pellow et al., 1985). Foi utilizado um $n = 8$ animais por grupo para cada teste comportamental. As principais etapas experimentais do presente estudo são apresentadas na figura abaixo (**Figura 6**).

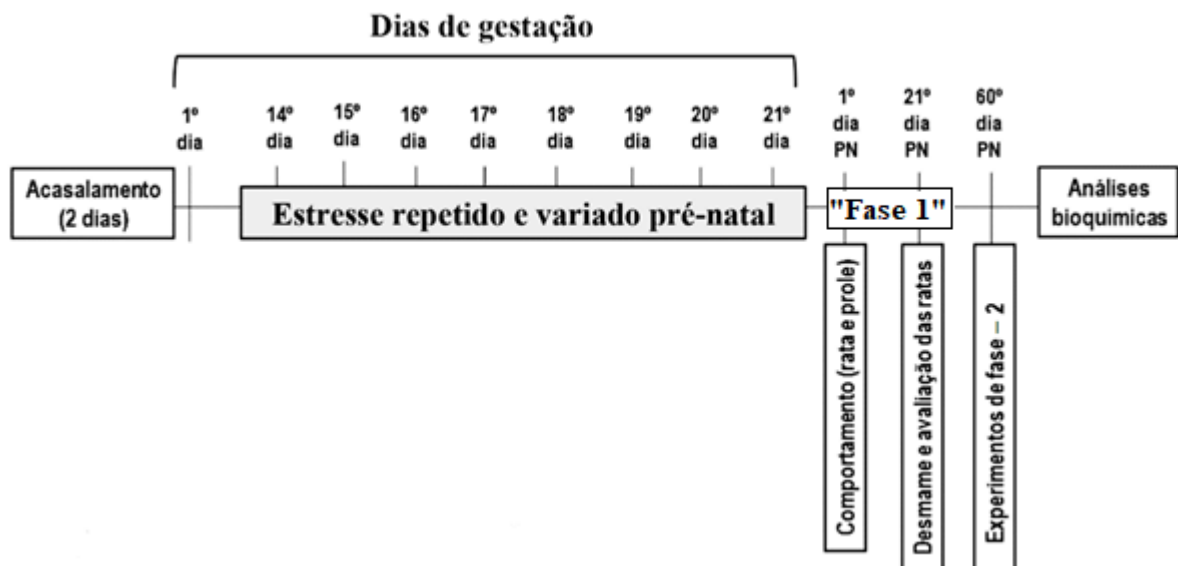


Figura 6: Representação esquemática que ilustra as etapas experimentais realizadas com as ratas prenhes e sua prole. As fêmeas (60 dias) foram postas para acasalar com machos durante aproximadamente 2 (dois) dias, a fim de assegurar que a maior quantidade possível de ratas tenha sido fertilizada. No 14º dia de gestação, descontados os dias para a procriação, as ratas foram submetidas a um protocolo de estresse repetido e variado pré-natal, o qual se iniciou com a contenção (por uma hora) e terminou com o estresse por isolamento social. No primeiro dia pós-natal (PN), foi avaliado o comportamento da rata em relação à sua prole (incluindo a amamentação) e, após o desmame (21º dia PN), a atividade locomotora e o comportamento do tipo depressivo das ratas matrizes foram avaliados, o que foi precedido por eutanásia por decapitação e dissecação da glândula adrenal ("Fase 1"). Os experimentos de fase 2 foram realizados exclusivamente com a prole adulta. Os animais da prole foram submetidos à eutanásia e amostras de hipocampo e glândula adrenal foram obtidas para a realização de análises subsequentes.

3.5 Testes comportamentais


No presente estudo, em cada grupo de análise comportamental desempenhada na prole, foi utilizado um $n = 8$ ratos (8 machos/8 fêmeas).

3.5.1 Análise do comportamento materno

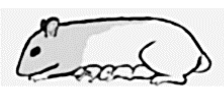
O procedimento que foi utilizado na presente pesquisa foi desenvolvido por Myers e colegas (1989), com ligeiras adaptações (Popoola et al., 2015). Baseia-se na observação do comportamento da rata matriz, em relação à prole. Brevemente, este protocolo consiste em três sessões de observação na “fase de claro” (6h00, 11h00 e 15h00) e duas sessões na “fase de escuro” (18h00 e 22h00). Cada sessão deve ter duração de 75 minutos, de modo que cada animal seja observado por períodos de 5 segundos, intercalados com intervalos de 3 minutos. Portanto, em cada sessão, cada matriz é observada 25 vezes (125 observações por dia). Estas análises ocorrem a partir do primeiro dia de nascimento dos filhotes, estendendo-se até o sexto dia pós-natal. As variáveis de comportamento materno são as seguintes (Popoola et al., 2015): 1) limpeza dos filhotes (*grooming*); 2) amamentação (*nursing*); 3) carregar um filhote para o ninho; 4) estar em contato com a prole (sem amamentação); 5) estar longe dos filhotes.

A postura de amamentação (*nursing*), por sua vez, inclui os seguintes subtipos: a) passiva (*passive nursing*; quando a rata está amamentando os filhotes deitada de perfil ou de costas); b) postura *blanket*, em que a mãe permanece sobre a ninhada, porém não levanta seu dorso ou estende suas pernas (está apenas sobre a ninhada); c) postura ABN (ABN, do inglês, *arched-back nursing*), a qual é, por sua vez, dividida em três posições: ABN1, em que a rata permanece “pairando” sobre a ninhada; ABN2, em que o dorso da rata permanece “arcado” e suas costas ou patas dianteiras estão semi-estendidas (posição denominada cifose); ABN3, em que o dorso da rata permanece arcado e todas as suas patas estão completamente flexionadas, de modo que a cifose é mais pronunciada (**Figura 7**). A postura ABN requer um maior dispêndio energético da rata que a postura passiva ou *blanket*, permitindo maior movimentação dos filhotes entre os mamilos da rata (Popoola et al., 2015). É importante ressaltar que, na presente pesquisa, a utilização desta análise levou em conta a possibilidade do estresse induzido na rata matriz poder influenciar no modo como esta lida com sua prole, constituindo um importante comportamento a ser aferido.


Identificação: Caixa _____	Data de nascimento: __/__/____		Número de filhotes:																							
Data da avaliação: __/__/____	Horário da avaliação: _____:		Responsável:																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1) LIMPEZA DOS FILHOTES																										
2) AMAMENTAÇÃO																										
2.1) PASSIVA																										
2.2) BLANKET																										
2.3) ABN1																										
2.4) ABN2																										
2.5) ABN3																										
3) CARREGAR UM FILHOTE PARA O NINHO																										
4) ESTAR EM CONTATO COM A PROLE (SEM AMAMENTAR)																										
5) ESTAR LONGE DOS FILHOTES																										




Passiva




Blanket



ABN1



ABN2



ABN3

Figura 7: Variáveis (parâmetros) avaliadas durante as observações de comportamento materno. A frequência de cada comportamento é avaliada utilizando-se uma tabela, a qual registra 25 observações, bem como outras informações relevantes (identificação, data de nascimento, etc.). Adaptada de Popoola et al., 2015. Abreviaturas: ABN: Do inglês, *arched-back nursing* – a posição de amamentação na qual a matriz permanece com o dorso curvado, sobre a ninhada.

3.5.2 Teste do labirinto em cruz elevado

Este procedimento é considerado válido para aferir comportamento do tipo ansioso em roedores, investigando aspectos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos (Pellow et al., 1985; Rodgers e Cole, 1994; Morato, 2006). Conforme o próprio nome sugere, o teste consiste em colocar o animal em um labirinto elevado do solo. Este aparato é formado por dois braços fechados (com paredes) e dois braços abertos (**Figura 8**), sendo analisada a frequência de entradas do animal em cada braço e o tempo gasto em cada tipo de braço. Outros comportamentos, incluindo deslocamentos, levantar-se e esticar-se, também são analisados. O animal explora os dois tipos de braço, mas geralmente entra mais e permanece mais tempo nos braços fechados. Considera-se a porcentagem da preferência (entradas e tempo gasto) pelos braços abertos ou pelos fechados como uma estimativa do comportamento do tipo ansioso: quanto mais evidente for este comportamento, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e o tempo gasto nos mesmos (Handley e Mithani, 1984; Pellow e File, 1986; Morato, 2006).

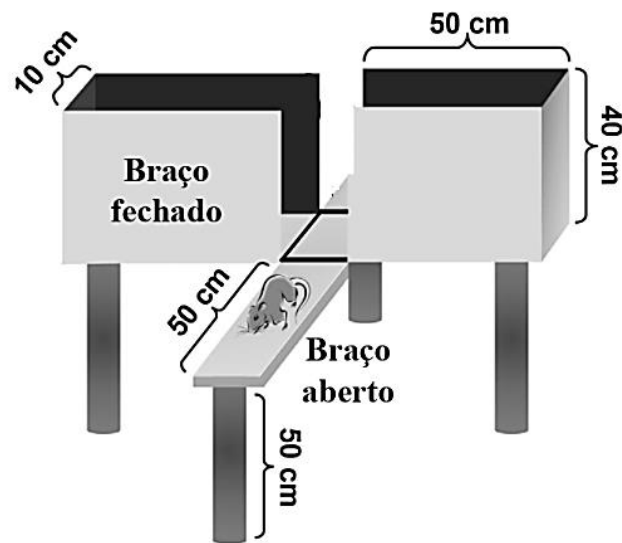


Figura 8: Representação esquemática que ilustra o aparato utilizado no teste do labirinto em cruz elevado. Adaptada de Sweis et al., 2016.

3.5.3 Teste de campo aberto

Esta metodologia foi descrita originalmente por Broadhurst (1960). Brevemente, o teste é executado em uma caixa medindo 40×60 cm, cercada por paredes de 50 cm de altura feitas de madeira compensada, com uma parede de vidro frontal e um assoalho dividido em nove quadrados iguais separados por linhas pretas (**Figura 9**). Cada animal é colocado cuidadosamente no quadrante traseiro esquerdo, a fim explorar a arena por 5 minutos, onde é contado o tempo de latência com que o animal deixa o quadrante, o número de cruzamentos entre as linhas pretas (*crossings*, para a avaliação da atividade locomotora), bem como o número de vezes em que o rato permanece apoiado nas patas traseiras (*rearings*, para a avaliação da atividade exploratória). Além disso, é avaliada a quantidade de vezes e o tempo em que o rato permanece no quadrante central do aparato, para a verificação do comportamento de risco. Finalmente, a contagem de bolo fecal possibilita estimar o comportamento do tipo ansioso dos animais.

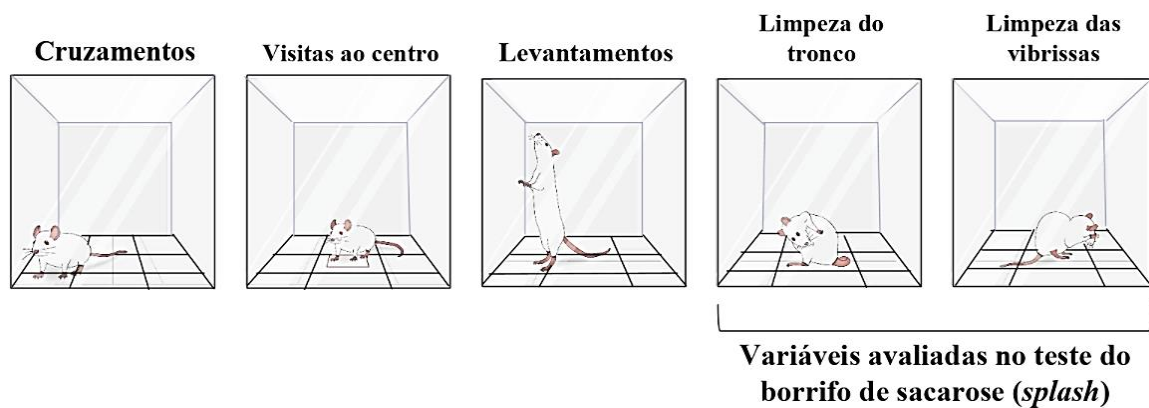


Figura 9: Representação esquemática que ilustra o aparato utilizado no teste comportamental de campo aberto. Alguns parâmetros analisados no teste do campo aberto e no teste do borrifo com solução de sacarose são apresentados. Adaptada de Valvassori et al., 2017.

3.5.4 Teste do borrifo com solução de sacarose

O teste do borrifo com solução de sacarose (também denominado *splash*) foi utilizado para estimar o comportamento do tipo anedônico nos animais. O teste consiste em uma borrifada de solução de sacarose 10% na parte dorsal do animal. O rato é então colocado em um aparato de campo aberto (vide teste do campo aberto, **Item 3.5.3**) e são observados os movimentos de *grooming*, durante cinco minutos (Isingrini et al., 2010). O *grooming* consiste em movimentos de autolimpeza realizados pelo animal, tais como lambidas nos pelos do tronco. Estes movimentos fornecem uma estimativa do comportamento de autocuidado dos animais (Isingrini et al., 2010). Na presente pesquisa, também foi analisado o tempo que cada animal consome na limpeza das vibrissas (*sniffing*), a fim de complementar os achados obtidos com o tempo de *grooming*.

3.5.5 Teste do nado forçado

Este teste consiste em dois dias de procedimento, nos quais cada rato é colocado em um cilindro com água a 23 °C, em quantidade suficiente para que o animal não consiga apoiar as patas no fundo e nem utilizar sua cauda para se apoiar no assoalho do aparato (**Figura 10**). No primeiro dia, os animais são forçados a nadar por 15 minutos (sessão de treino). Vinte e quatro horas após o treino, cada animal é novamente forçado a nadar durante 5 minutos (sessão de teste). Durante esta última sessão, é avaliado o tempo de imobilidade dos animais (imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar) (Porsolt et al., 1977). O tempo de imobilidade, o tempo de nado e o número de escaladas

fornece importante informação sobre o “comportamento de desesperança” do animal (quanto maior for o tempo de imobilidade e menor for o tempo de nado e o número de escaladas, maior é o nível deste comportamento no roedor). O “comportamento de desesperança” é considerado um comportamento do tipo depressivo.



Figura 10: Parâmetros avaliados no teste do nado forçado. Adaptada de Valvassori et al., 2017.

3.6 Preparo das amostras de hipocampo da prole

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação com guilhotina, sem anestesia. A caixa craniana foi aberta e os cérebros foram removidos. Dentre as diferentes regiões cerebrais, optou-se pela dissecação do hipocampo. O hipocampo é uma importante estrutura cerebral envolvida em mecanismos de memória (incluindo a memória declarativa) e é também um componente chave do sistema límbico – um conjunto de estruturas cerebrais envolvido no processamento de sensações e emoções (Torricco e Abdijadid, 2020). Portanto, a análise desta estrutura pode ser relevante em um cenário mimetizando os efeitos do estresse pré-natal sobre o neurodesenvolvimento.

Após terem sido dissecadas em uma superfície gelada, as amostras de hipocampo foram limpas, acondicionadas em microtubos, imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) para as análises bioquímicas subsequentes. Para estas avaliações (cuja metodologia é descrita a seguir), foi observado um tamanho n mínimo de 5 animais por grupo experimental.

3.7 Avaliações bioquímicas

3.7.1 Extração nuclear

A extração nuclear, necessária para a avaliação dos parâmetros de epigenética, foi realizada utilizando-se um kit comercial específico (*EpiQuik™ Nuclear Extraction Kit II*, Epigentek Group Inc., Farmingdale, Nova Iorque, Estados Unidos; código OP-0022-100). Inicialmente, o hipocampo de cada animal da prole foi transferido para um tubo previamente resfriado. A este tubo, foram adicionados 5 mL do tampão de pré-extração (10X), previamente diluído em água (1:10) e suplementado com 5 µL de solução de ditioneitol por grama de tecido. Em seguida, os hipocampos foram homogeneizados e deixados em incubação em gelo por 15 minutos. Decorrido o prazo de incubação, as amostras foram submetidas à centrifugação a 12000 rotações por minuto (rpm) a 4 °C, durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados. Durante o tempo de incubação das amostras em gelo, foram preparadas algumas soluções: 1) Adicionou-se a solução de ditioneitol e coquetel inibidor de protease (1000x) ao tampão de extração, na proporção de 1:1000; 2) Adicionou-se a solução pré-limpadora à solução preparada na etapa anterior, em uma proporção de 1:10. Após a incubação e centrifugação das amostras, foram adicionados dois volumes do tampão de extração ao *pellet* (sedimento) nuclear (aproximadamente 10 µL de tampão de extração para cada 2 mg de tecido). Em seguida, os extratos foram novamente incubados em gelo por 15 minutos em agitação vigorosa (por 5 segundos) a cada período de 3 minutos. A suspensão obtida foi então centrifugada a 14.000 rpm a 4 °C, durante 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Ao sobrenadante, foi adicionada a solução limpadora de extração, na proporção de 1:100, e as amostras foram deixadas em incubação por 15 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o prazo de incubação, a suspensão foi centrifugada em 14.000 rpm a 4 °C, durante 1 minuto, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Uma alíquota de 10 µL do sobrenadante foi reservada e armazenada a -80 °C para posterior determinação da concentração de proteínas (**Item 3.7.5**). Os sobrenadantes contendo a fração nuclear foram armazenados a -80 °C para as análises epigenéticas subsequentes.

3.7.2 Atividade de DNMTs, HATs e HDACs

A atividade das enzimas DNMTs, HATs e HDACs foi determinada em extratos nucleares (fração nuclear) obtidos de amostras de hipocampo dos animais da prole. Foram

utilizados kits para ensaio de cada enzima, com placas de 96 poços, de acordo com as instruções do fabricante (EpiGenetek Group Inc.; DNMTs: *EpiQuik™ DNA Methyltransferase Activity/Inhibition Assay Kit*, código P-3001; HATs: *EpiQuik™ HAT Activity/Inhibition Assay Kit*, código P-4003; HDACs: *EpiQuik™ HDAC Activity/Inhibition Assay Kit (Colorimetric)*, código P-4002).

No kit para ensaio de atividade de DNMTs, um substrato de DNA com alta concentração de citosina reveste a superfície interna dos poços da placa. Estes poços foram tratados para apresentar uma alta capacidade de absorção de DNA. As DNMTs presentes nas amostras transferem um grupo metila derivado da *S*-adenosilmetionina para o substrato de DNA. O DNA metilado pode, então, ser reconhecido por um anticorpo anti-5'-metilcitosina. A quantidade de DNA metilado, a qual é proporcional à atividade de DNMTs, pode ser quantificada colorimetricamente.

No kit para ensaio de atividade de HATs, um substrato de histona reveste a superfície interna dos poços da placa. As HATs presentes nas amostras se ligam e acetilam o substrato de histona. O substrato acetilado pode, então, ser reconhecido por um anticorpo de alta afinidade dirigido contra histona acetilada. A quantidade de histona acetilada, a qual é diretamente proporcional à atividade de HATs, pode então ser quantificada colorimetricamente. Já no kit para ensaio de HDACs, a superfície interna dos poços é revestida com um substrato de histona acetilada. As HDACs presentes nas amostras se ligam e desacetilam o substrato de histona. O substrato remanescente, que não sofreu desacetilação, pode ser reconhecido por um anticorpo de alta afinidade dirigido contra histonas acetiladas. A quantidade de histonas acetiladas, que é inversamente proporcional à atividade de HDACs, pode então ser quantificada colorimetricamente.

As leituras colorimétricas foram realizadas em um leitor de placas de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), com comprimento de onda de 450 nanômetros (nm) tanto para a atividade de DNMTs quanto para a atividade de HATs e HDACs. Um esquema simplificado que ilustra as etapas de análise da atividade das enzimas é apresentado na **Figura 11**. Estas atividades foram expressas como uma unidade de densidade óptica por minuto por miligrama de proteína ($DO \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$).

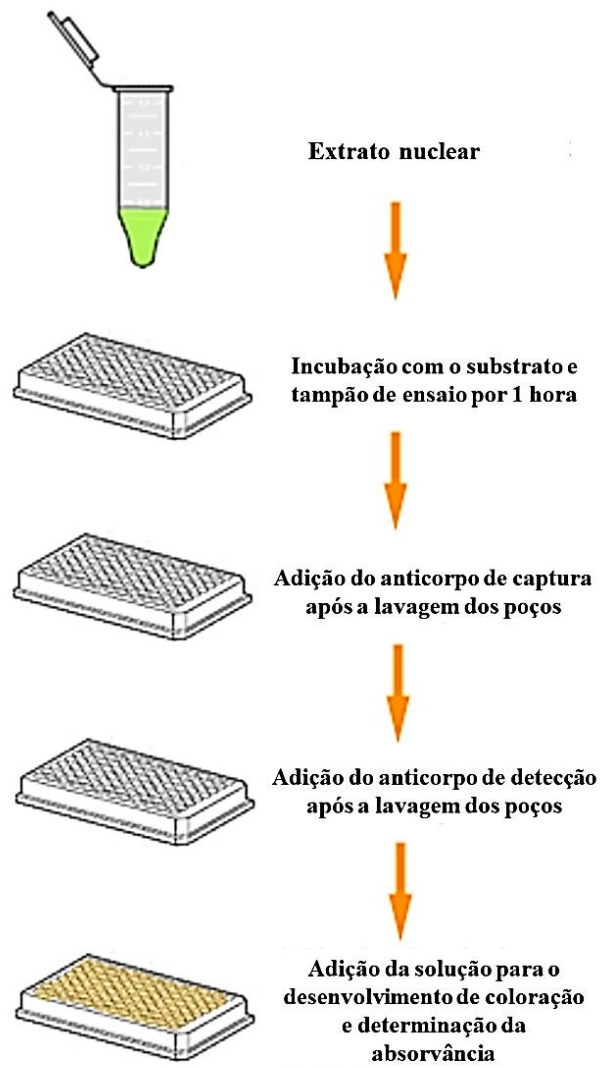


Figura 11: Principais etapas experimentais envolvidas na determinação da atividade das enzimas epigenéticas em placas de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA). (Adaptação de figura disponibilizada nas instruções do kit *EpiQuik™ DNA Methyltransferase Activity/Inhibition Assay Kit*, código P-3001; Epigentek Group Inc.).

3.7.3 Níveis de acetilação de H3K9 e H3K14

Outros importantes parâmetros epigenéticos avaliados no presente estudo foram os níveis de histona H3 acetilada em H3K9 e H3K14, os quais estão associados a um estado da cromatina transcricionalmente ativo, conforme supracitado (Bergmann et al., 2012; Karmodiya et al., 2012; Fernández-Sánchez et al., 2013; Qiao et al., 2015). Os níveis de acetilação de histona foram mensurados por meio de kits comerciais específicos, seguindo-se as instruções do fabricante (Epigentek Group Inc.; H3K9 acetilada: *EpiQuik™ Global Acetyl Histone H3-K9 Quantification Kit (Colorimetric)*, código P-4010; H3K14 acetilada: *EpiQuik™ Global Acetyl Histone H3-K14 Quantification Kit (Colorimetric)*, código P-4012).

Brevemente, o princípio do método subjacente a estes kits é descrito a seguir. A H3K9 ou H3K14 acetilada presente na amostra é capturada por um anticorpo anti-H3K9 ou anti-H3K14 ligado à superfície interna dos poços da microplaca. A histona acetilada capturada pelo anticorpo pode então ser detectada por meio de um anticorpo de detecção “marcado”. Posteriormente, é adicionado aos poços o reagente para o desenvolvimento de coloração, para posterior avaliação da absorvância. A razão de H3K9 ou H3K14 acetilada é proporcional à intensidade da absorvância medida. A quantidade absoluta de histona acetilada pode ser quantificada através da comparação com um controle padrão.

As avaliações colorimétricas foram realizadas em um leitor de placas de ELISA, com comprimento de onda de 450 nm tanto para a H3K9 quanto para a H3K14. A quantidade absoluta de cada histona foi expressa como nanogramas de histona por miligrama de proteína (ng/mg).

3.7.4 Avaliações de estresse oxidativo

3.7.4.1 Determinação dos níveis de TBARS

Na avaliação dos níveis de TBARS, optou-se por utilizar o método desenvolvido por Esterbauer e Cheeseman (1990). A técnica é baseada na detecção de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, geralmente subprodutos de peroxidação lipídica, gerando um conjugado de coloração vermelha ou rósea.

Inicialmente, foram preparadas as soluções aquosas a serem utilizadas na análise: O tampão de homogeneização, a solução A (1,1,3,3,-tetrametoxipropano e tampão de homogeneização), a solução B (solução A e tampão de homogeneização), a solução de ácido tricloroacético 10% e a solução de ácido tiobarbitúrico 0,67% em sulfato de sódio. As amostras foram homogeneizadas com tampão de fosfato de sódio (20 mM) e cloreto de potássio (140 mM), em pH 7,4. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 3500 rpm, durante 10 minutos, a 4 °C. Uma alíquota de 10 µL do sobrenadante foi reservada para subsequente análise da concentração de proteínas (**Item 3.7.5**). Em microtubos, foram pipetadas as soluções de modo a se obter uma curva padrão, em triplicata. Em cada tubo contendo amostra (100 µL), foram acrescentados 200 µL de ácido tricloroacético 10% e 300 µL de ácido tiobarbitúrico 0,67%. Os microtubos foram colocados em uma estante, a qual, por sua vez, foi encoberta com papel alumínio e levada ao banho maria fervente por duas horas. Decorrido este tempo, as amostras foram deixadas esfriar e então foram levadas à capela para a adição de 400 µL de

butano, o que foi precedido por agitação vigorosa. Posteriormente, os microtubos foram submetidos à centrifugação a 5000 rpm por 3 minutos. Ao final da técnica, a fase superior de cor rósea foi pipetada em placa preta para a realização da leitura da absorvância em fluorímetro (comprimentos de onda: 515 nm (excitação); 553 nm (emissão)). Os dados foram expressos como nanomol de malondialdeído por miligrama de proteína (nmol/mg proteína).

3.7.4.2 Avaliação da oxidação de DCFH

Para a avaliação dos níveis de DCFH oxidada (DCF), foi utilizado o método de LeBel e colaboradores (1992). O princípio do método se baseia na oxidação de DCFH na presença de espécies reativas de oxigênio, gerando um composto (DCF) cuja fluorescência é proporcional a sua concentração e pode ser lida fluorimetricamente.

Inicialmente, foram preparadas as soluções a serem utilizadas na técnica: O tampão de homogeneização, o DCFH-DA e a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF, forma oxidada da DCFH). A homogeneização foi realizada de acordo com o descrito no **Item 3.7.4.1**. Dez µL do sobrenadante foram reservados para subsequente análise da concentração de proteínas (**Item 3.7.5**). Em microplaca e em ambiente com pouca ou nenhuma luminosidade, foram pipetados 40 µL da amostra e 160 µL de DCFH-DA. Também foi pipetada uma curva padrão, em duplicata. Após as pipetagens, a placa foi incubada a 37 °C no escuro, durante 30 minutos. Finalmente, foi realizada a leitura da absorvância em fluorímetro (comprimentos de onda: 488 nm [excitação]; 525 nm [emissão]). Os dados foram expressos em termos de intensidade de fluorescência do composto DCF.

3.7.4.3 Avaliação da atividade da catalase

Para a avaliação da atividade da catalase, foi utilizado o método desenvolvido por Aebi (1984). O princípio do método se baseia no decaimento da absorvância conforme o consumo de H₂O₂ pela ação da enzima catalase (presente na amostra).

Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas conforme descrito no **Item 3.7.4.1**. Uma alíquota do sobrenadante (10 µL) foi reservada para a determinação da concentração de proteínas conforme o **Item 3.7.5**. Posteriormente, 50 µL da amostra e 5 µL de triton 10% (Triton X-100 + água milli-Q) foram pipetados em um microtubo e submetidos à agitação vigorosa, o que foi precedido pelo acondicionamento das amostras em gelo (para a liberação da catalase). Em seguida, foram pipetados 248 µL de tampão fosfato de potássio (10 mM), pH 7,0, no poço

da microplaca correspondente ao branco (controle da técnica). Na mesma microplaca, em duplicata, foram pipetados 8 μL de amostra e 240 μL do meio suplementado com H_2O_2 , servindo como substrato da enzima. Finalmente, foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 240 nm, durante 5 minutos, com leituras a cada 40 segundos. Os dados foram expressos como unidade de catalase por miligrama de proteína (U/mg proteína).

3.7.4.4 Avaliação da atividade da SOD

Para a determinação da atividade da SOD, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Bannister e Calabrese (1987). O princípio da técnica se fundamenta na inibição da auto-oxidação da adrenalina pela SOD, cuja absorvância é mensurada a 480 nm.

Previamente, as amostras foram homogeneizadas conforme descrito no Item **3.7.1**. Uma porção do sobrenadante (10 μL) foi reservada para a determinação da concentração de proteínas conforme o **Item 3.7.5**. Em seguida, foram elaboradas as soluções aquosas de glicina (tampão glicina), adrenalina e catalase. O tampão glicina foi colocado em banho maria a 32 °C antes que fossem iniciadas as pipetagens em microplaca (mesma que a utilizada em ELISA). Nesta microplaca, foram pipetados 190 μL de tampão glicina e 5 μL de catalase para o branco da amostra; 5 μL de amostra, 185 μL de tampão glicina e 5 μL de catalase para a amostra 1; 10 μL de amostra, 180 μL de tampão glicina e 5 μL de catalase para a amostra 2; 15 μL de amostra, 175 μL de tampão glicina e 5 μL de catalase para a amostra 3, e assim, sucessivamente. Decorridas estas pipetagens, foi realizada a leitura pontual em espectrofotômetro a 480 nm. Após a leitura, foram pipetados 5 μL de solução de adrenalina em todos os poços e, finalmente, foi realizada a leitura a 412 nm durante 20 minutos (a cada 40 segundos) a 32 °C. Os dados foram expressos como unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg proteína).

3.7.5 Determinação da concentração de proteínas

O conteúdo de proteínas foi mensurado conforme a técnica desenvolvida por Lowry e colegas (1951), com ligeiras modificações (Peterson, 1977).

3.8 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Os ensaios foram realizados em duplicata e a média foi utilizada na análise. Os dados foram comparados por meio do teste t de Tukey para amostras independentes (já que são apenas dois grupos, EP e CP). As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas por meio do programa *IBM SPSS Statistics* (IBM, Armonk, Nova Iorque, Estados Unidos). As figuras de gráficos dos resultados foram geradas utilizando-se a versão 5.0 do programa *GraphPad Prism* para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

4 Resultados

Na primeira etapa do presente estudo, foram realizadas avaliações do comportamento das matrizes em relação às suas respectivas proles, nos seis primeiros dias de vida destes animais. Em uma análise estratificada por dias, foi observada: 1) uma diminuição no número de posições de amamentação do tipo ABN2 no grupo EP, no primeiro dia de avaliação ($t = 2,147$, grau de liberdade [gl] = 14, $p = 0,0498$); 2) uma maior frequência de matrizes distantes de seus filhotes no grupo EP, no segundo dia de teste ($t = -2,221$, gl = 14, $p = 0,0433$); 3) um aumento no número de posições *blanket* no grupo EP, no terceiro dia de avaliação ($t = -2,4095$, gl = 14, $p = 0,03031$); e 4) uma menor frequência de amamentação do tipo passiva no grupo EP, no sexto dia de avaliação ($t = 2,464$, gl = 14, $p = 0,0273$), em comparação com o grupo CP (**Figura 12**).

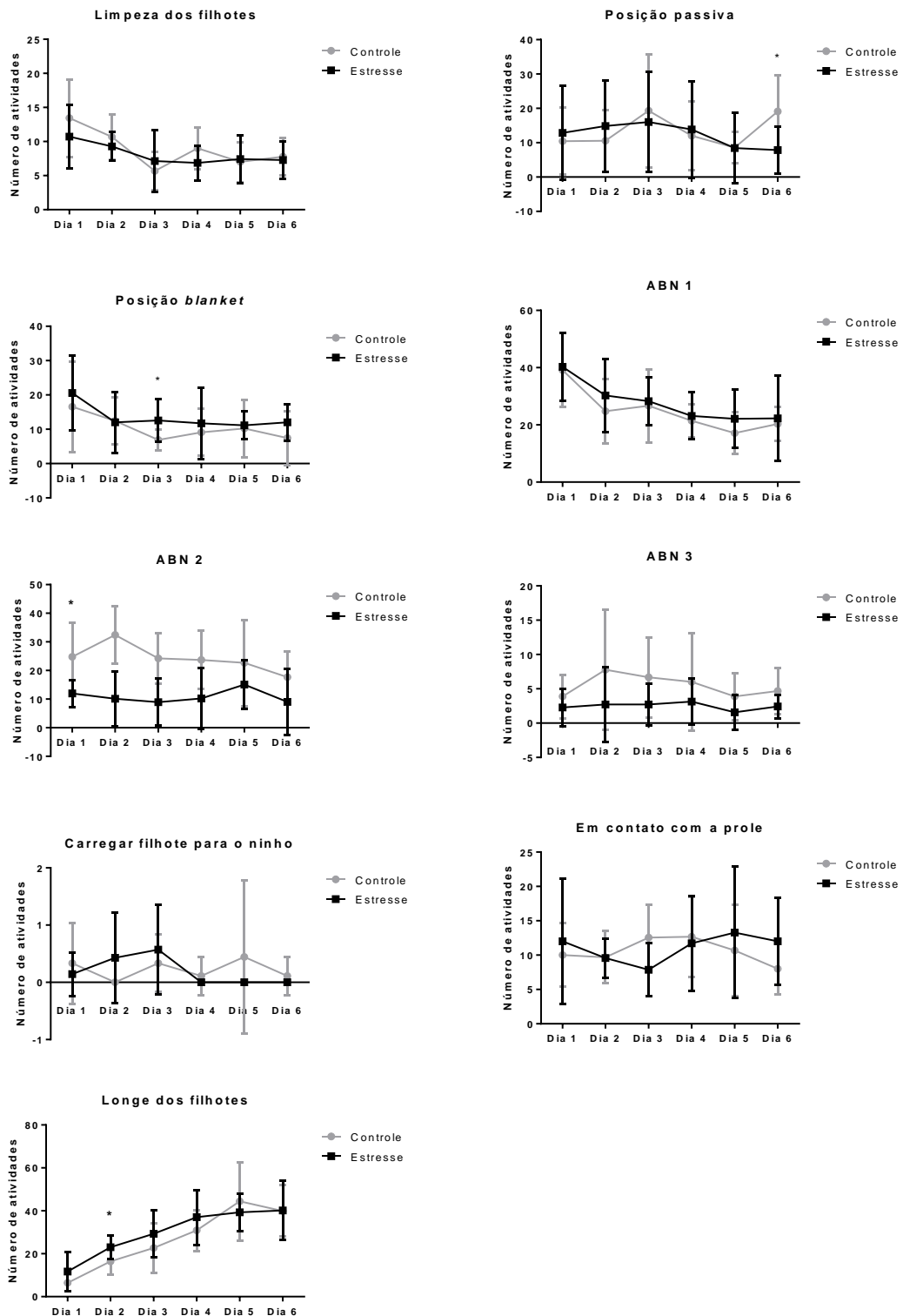


Figura 12: Análise comportamental das ratas matrizes em relação a suas proles, utilizando-se o método descrito por Popoola e colaboradores (2015). Este protocolo foi aplicado nos seis primeiros dias pós-natais da prole, onde foram analisadas as seguintes variáveis, em um período de 75 minutos por sessão (5 sessões diárias): Limpeza dos filhotes; Amamentação (posições passiva, *blanket*, *arched-back* [ABN]1, ABN2 e ABN3); Carregar um filhote para o ninho; Estar em contato com a prole; Estar longe dos filhotes. As linhas cinzas, com círculos, representam os dados de matrizes controles e suas proles (“Controle”; cada círculo é relativo a um dia de observação). As linhas pretas, com quadrados, representam os dados de matrizes submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal e suas proles (“Estresse”; cada quadrado é relativo a um dia de observação). * $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle. Teste t (Tukey).

Entretanto, quando se considerou a média dos seis dias de observação, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais, independente do parâmetro comportamental avaliado ($t_{(\text{limpeza})} = 0,836$, $gl = 14$, $p = 0,417$; $t_{(\text{posição passiva})} = 0,242$, $gl = 14$, $p = 0,812$; $t_{(\text{posição blanket})} = -1,178$, $gl = 14$, $p = 0,258$; $t_{(\text{ABN1})} = -0,821$, $gl = 14$, $p = 0,425$; $t_{(\text{ABN2})} = 1,269$, $gl = 14$, $p = 0,225$; $t_{(\text{ABN3})} = 1,869$, $gl = 14$, $p = 0,0826$; $t_{(\text{carregar filhote})} = 0,273$, $gl = 14$, $p = 0,789$; $t_{(\text{contato com a prole})} = -0,265$, $gl = 14$, $p = 0,795$; $t_{(\text{longe dos filhotes})} = -1,0988$, $gl = 14$, $p = 0,2904$) (**Figura 13**).

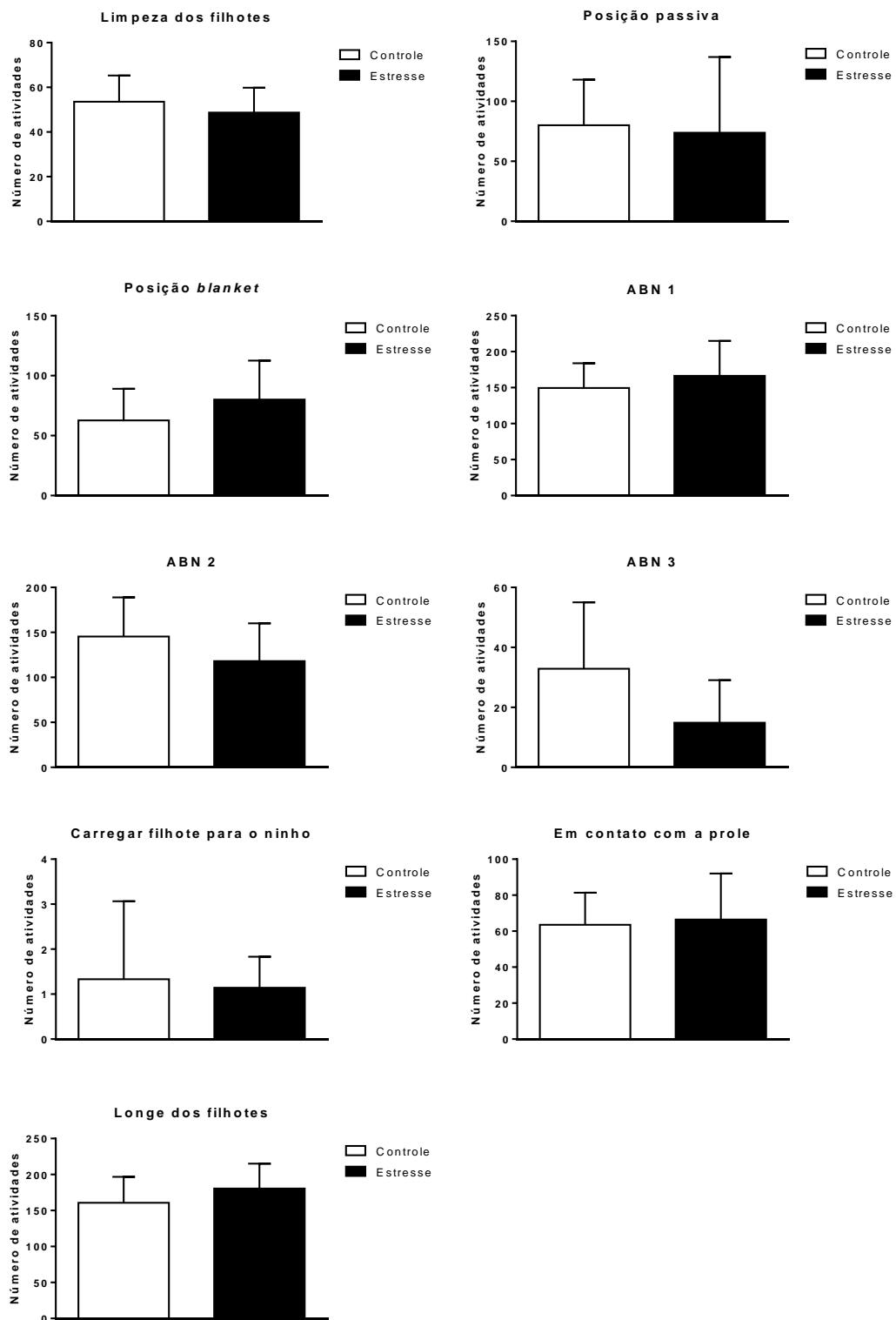


Figura 13: Análise comportamental das ratas matrizes em relação a suas proles, utilizando-se o método descrito por Popoola e colaboradores (2015 – valores médios dos seis dias de avaliação). Este protocolo foi aplicado nos seis primeiros dias pós-natais da prole, onde foram analisadas as seguintes variáveis, em um período de 75 minutos por sessão (5 sessões diárias): Limpeza dos filhotes; Amamentação (posições passiva, *blanket*, *arched-back* [ABN]1, ABN2 e ABN3); Carregar filhote para o ninho; Estar em contato com a prole; Estar longe dos filhotes. As barras brancas representam os dados de matrizes controles e suas proles (“Controle”; média calculada a partir de seis dias de observação). As barras pretas representam os dados de matrizes submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal e suas proles (“Estresse”; média calculada a partir de seis dias de observação). Teste *t* (Tukey).

Logo após o desmame (21º dia pós-natal) e consequente separação das matrizes de suas ninhadas, foi realizada a análise do comportamento das matrizes isoladamente. Inicialmente, foi aplicado o teste de campo aberto (para se analisar a locomoção, o comportamento de tomada de risco e os comportamentos estereotípicos) (**Figura 14**). Em seguida, foi aplicado o teste do borrifo com solução de sacarose 10% (para a investigação de comportamento do tipo depressivo) (**Figura 15**). Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi detectada após estas análises, independente do parâmetro comportamental analisado (Campo aberto: $t_{(\text{cruzamentos})} = -1,329$, $gl = 14$, $p = 0,2049$; $t_{(\text{levantamentos})} = 1,394$, $gl = 14$, $p = 0,185$; $t_{(\text{limpeza do tronco})} = -0,139$, $gl = 13$, $p = 0,892$; $t_{(\text{limpeza das vibrissas})} = 0,4097$, $gl = 14$, $p = 0,688$; $t_{(\text{visitas ao centro})} = -0,971$, $gl = 14$, $p = 0,348$; $t_{(\text{bolo fecal})} = -0,917$, $gl = 14$, $p = 0,374$; $t_{(\text{latência})} = 0,364$, $gl = 13$, $p = 0,722$) (Borrifo com solução de sacarose: $t_{(\text{limpeza do tronco})} = -0,683$, $gl = 14$, $p = 0,5056$; $t_{(\text{limpeza das vibrissas})} = 0,875$, $gl = 14$, $p = 0,396$).

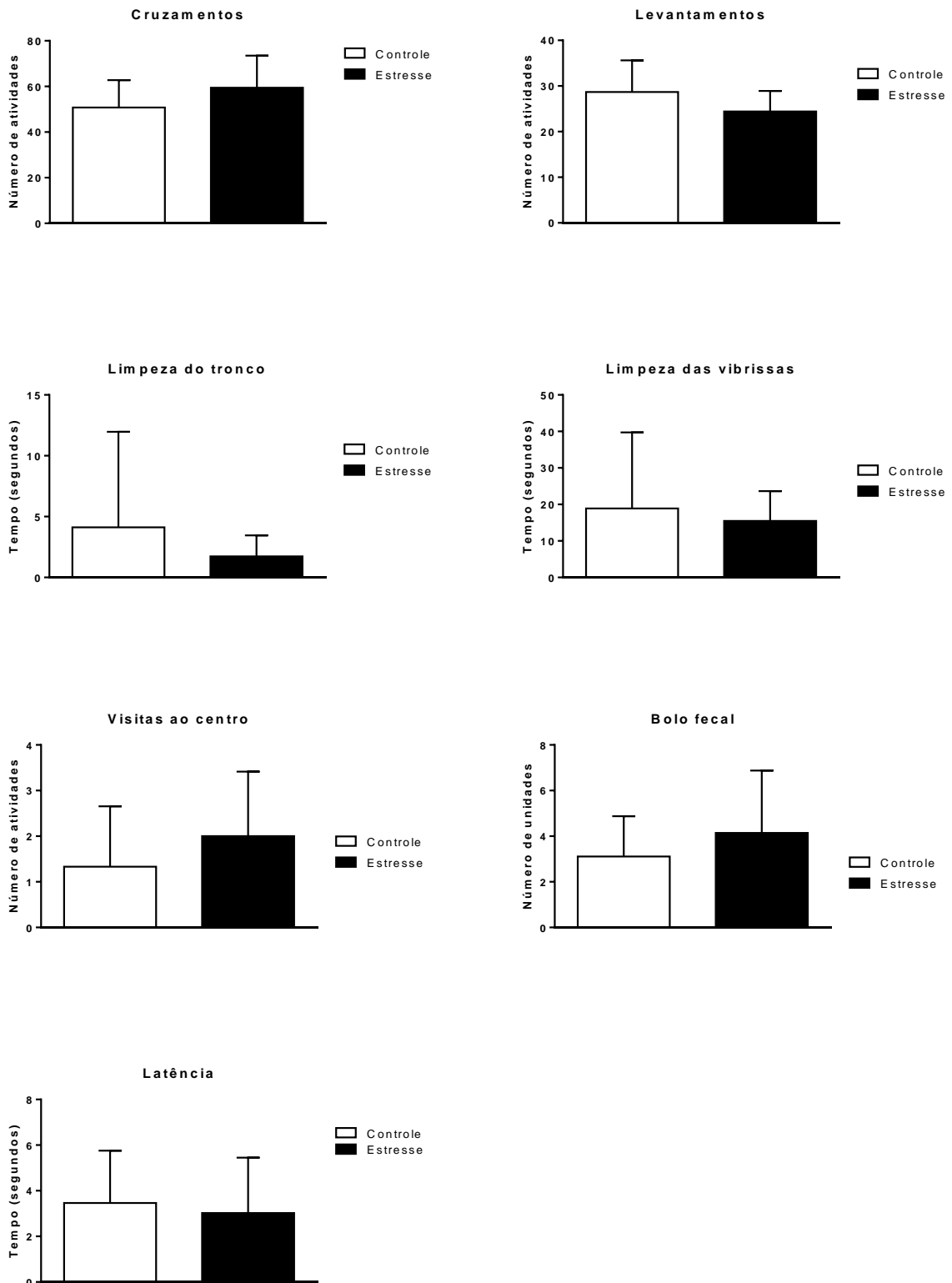


Figura 14: Análise comportamental das ratas matrizes realizada por meio do teste de campo aberto. As análises foram realizadas após o 21º dia pós-natal das proles (desmame). As barras brancas representam os dados de matrizes controles (“Controle”). As barras pretas representam os dados de matrizes submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal (“Estresse”). Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais foi detectada. Teste *t* (Tukey).

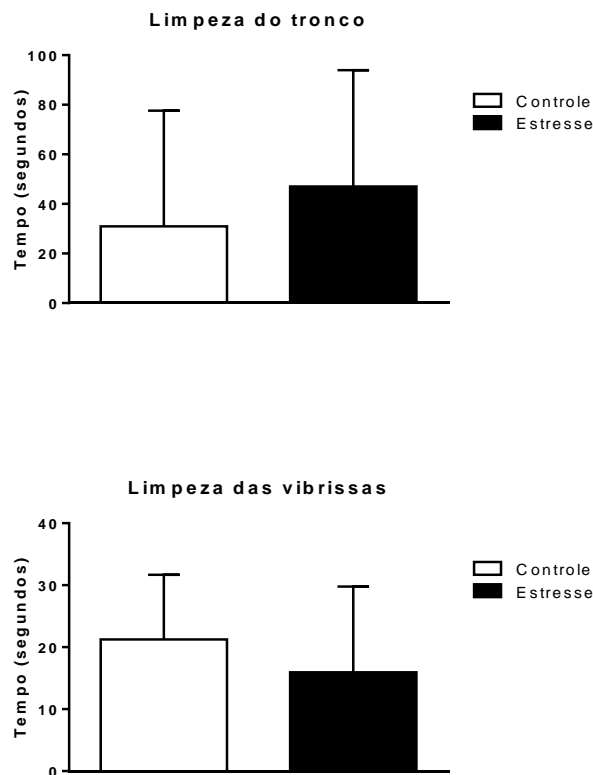


Figura 15: Análise comportamental das ratas matrizes realizada por meio do teste do borrifo com solução de sacarose. As análises foram realizadas após o 21º dia pós-natal das proles (desmame). As barras brancas representam os dados de matrizes controles (“Controle”). As barras pretas representam os dados de matrizes submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal (“Estresse”). Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais foi detectada. Teste *t* (Tukey).

Após a última análise comportamental, os animais foram submetidos à eutanásia, para a dissecação e determinação do peso das glândulas adrenais, o que é um marcador sugestivo de ativação do eixo HPA, caso esteja aumentado. Novamente, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (**Figura 16**) ($t = -0,251$, $gl = 14$, $p = 0,8053$). Estes dados são sugestivos de que o estresse induzido não alterou o comportamento ou o eixo HPA das matrizes *per se*, embora ele possa ter sido um fator significativo na relação dos animais com suas respectivas proles.

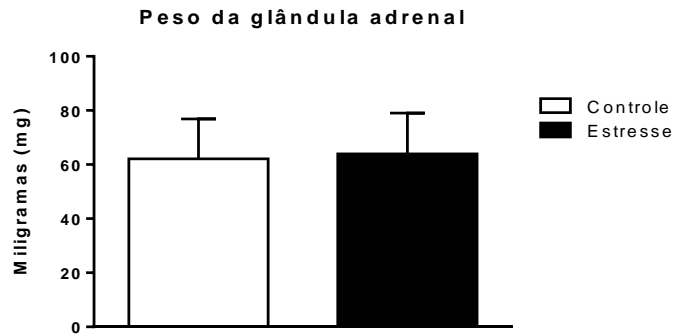


Figura 16: Comparação de peso de glândula adrenal das ratas matrizes. As análises foram realizadas após o 21º dia pós-natal das proles (desmame). As barras brancas representam os dados de matrizes controles (“Controle”). As barras pretas representam os dados de matrizes submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal (“Estresse”). Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais foi detectada (Teste *t* de Tukey).

A próxima etapa do presente estudo foi a avaliação da prole adulta (60 dias). Nesta avaliação, foram aplicados os seguintes testes comportamentais: labirinto em cruz elevado; campo aberto; borrifo com solução de sacarose; e nado forçado. Considerando-se os diferentes parâmetros comportamentais destes testes, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais nos machos da prole (**Figura 17**) (Campo aberto: $t_{(\text{cruzamentos})} = -0,432$, $gl = 21$, $p = 0,670003$; $t_{(\text{levantamentos})} = -1,02784$, $gl = 23$, $p = 0,315$; $t_{(\text{bolo fecal})} = -1,174$, $gl = 21$, $p = 0,253$; $t_{(\text{latência})} = -1,14060$, $gl = 20$, $p = 0,267$; $t_{(\text{limpeza do tronco})} = 0,459$, $gl = 21$, $p = 0,651$; $t_{(\text{limpeza das vibrissas})} = 0,6022$, $gl = 22$, $p = 0,553$; $t_{(\text{visitas ao centro})} = -0,44994$, $gl = 21$, $p = 0,657$) (Borrifo com solução de sacarose: $t_{(\text{limpeza do tronco})} = -1,165$, $gl = 21$, $p = 0,257$; $t_{(\text{limpeza das vibrissas})} = -1,646$, $gl = 21$, $p = 0,115$) (Labirinto: $t_{(\text{total entradas})} = 0,07505$, $gl = 21$, $p = 0,941$; $t_{(\text{entradas braço aberto})} = 0,0292$, $gl = 21$, $p = 0,977$; $t_{(\text{entradas braço fechado})} = 0,0961$, $gl = 21$, $p = 0,924$; $t_{(\text{tempo braço aberto})} = 1,384$, $gl = 21$, $p = 0,181$; $t_{(\text{tempo braço fechado})} = -1,645$, $gl = 21$, $p = 0,115$). Por outro lado, foi detectado que nas fêmeas descendentes de matrizes submetidas ao estresse, houve um aumento no número de cruzamentos e levantamentos, em comparação com os animais descendentes de matrizes que não sofreram o estresse repetido e variado durante a gestação (**Figura 18**) ($t_{(\text{cruzamentos})} = -3,192$, $gl = 25$, $p = 0,00379$; $t_{(\text{levantamentos})} = -3,639$, $gl = 25$, $p = 0,00124$). Além disso, houve uma diminuição significativa no tempo de latência para a saída do primeiro quadrante no teste de campo aberto, nas fêmeas descendentes de matrizes submetidas ao protocolo de estresse repetido e variado ($t = 2,982$, $gl = 25$, $p = 0,00629$). Em relação aos demais parâmetros avaliados nas fêmeas, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Campo aberto: $t_{(\text{bolo fecal})} = 1,944$, $gl = 25$, $p = 0,0632$; $t_{(\text{limpeza do tronco})} = -1,64129$, $gl = 19$, $p = 0,117$; $t_{(\text{limpeza das vibrissas})} = 0,691$, $gl = 25$, $p = 0,495$; $t_{(\text{visitas ao centro})} = -0,611$, $gl = 24$, $p = 0,547$) (Borrifo com solução de sacarose: $t_{(\text{limpeza do$

tronco) = $-0,891$, $gl = 25$, $p = 0,382$; $t_{\text{(limpeza das vibrissas)}} = -1,269$, $gl = 25$, $p = 0,216$) (Labirinto: $t_{\text{(total entradas)}} = -0,1074$, $gl = 25$, $p = 0,915$; $t_{\text{(entradas braço aberto)}} = 0,345$, $gl = 25$, $p = 0,733$; $t_{\text{(entradas braço fechado)}} = -0,5805$, $gl = 25$, $p = 0,567$; $t_{\text{(tempo braço aberto)}} = 0,353$, $gl = 25$, $p = 0,727$; $t_{\text{(tempo braço fechado)}} = -0,544$, $gl = 25$, $p = 0,591$). Estes achados sugerem que a exposição de matrizes ao estresse repetido e variado durante a gestação torna as fêmeas da prole suscetíveis à comportamentos do tipo hiperativo (aumento no número de cruzamentos e outros comportamentos), o que, por sua vez, indica uma maior vulnerabilidade a eventos estressores.

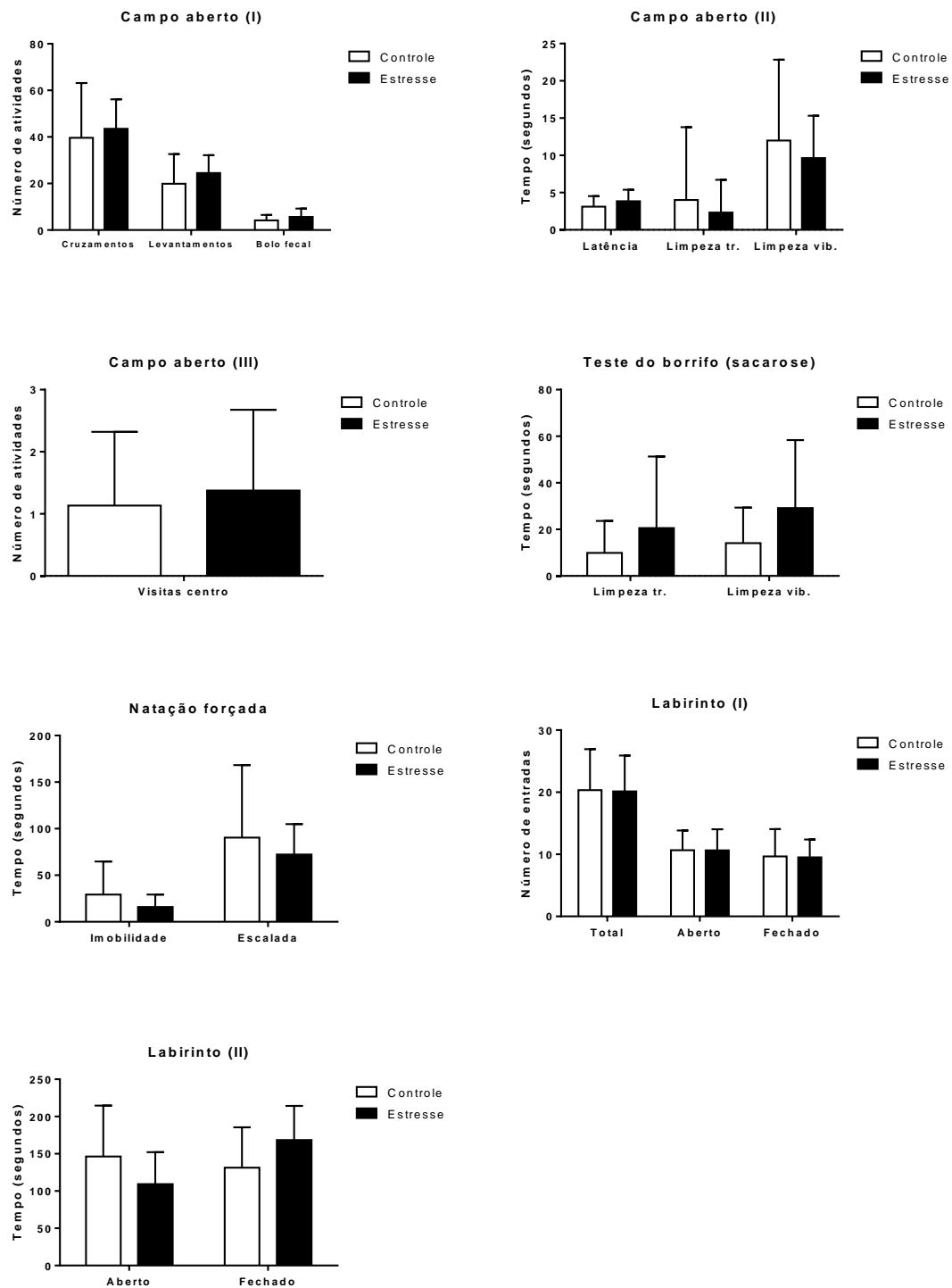


Figura 17: Análise comportamental dos machos da prole de ratos, utilizando-se os testes de campo aberto, borrifo com solução de sacarose, natação forçada e labirinto em cruz elevado. As barras brancas representam os dados de animais provenientes de matrizes não estressadas (“Controle”). As barras pretas representam os dados de animais provenientes de matrizes submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal (“Estresse/Estressado”). Teste *t* (Tukey). Abreviaturas: “Limpeza tr.”: Limpeza do tronco (autolimpeza); “Limpeza vib.”: Limpeza das vibrissas. (A ordem dos gráficos não reflete a ordem em que foram realizadas as análises comportamentais).

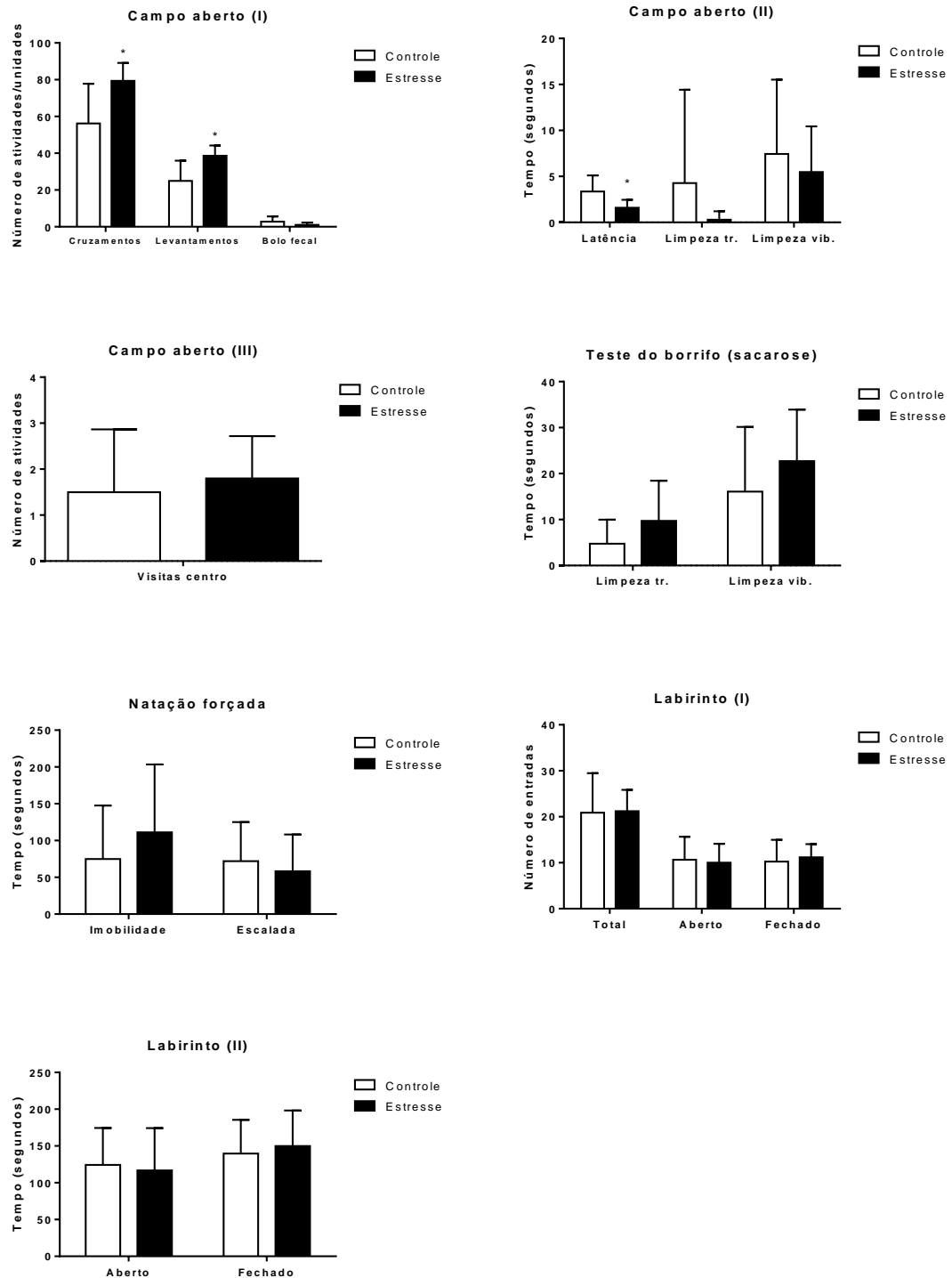


Figura 18: Análise comportamental das fêmeas da prole de ratos, utilizando-se os testes de campo aberto, borrifo com solução de sacarose, natação forçada e labirinto em cruz elevado. As barras brancas representam os dados de animais provenientes de matrizes não estressadas (“Controle”). As barras pretas representam os dados de animais provenientes de matrizes submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal (“Estresse/Estressado”). * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle. Teste t (Tukey). Abreviaturas: “Limpeza tr.”: Limpeza do tronco (autolimpeza); “Limpeza vib.”: Limpeza das vibrissas. (A ordem dos gráficos não reflete a ordem em que foram realizadas as análises comportamentais).

Decorridas todas as análises comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia, com posterior dissecação do hipocampo e da glândula adrenal. Por meio da pesagem, foi constatado que houve uma hipertrofia desta glândula, tanto em machos quanto em fêmeas do grupo descendente de matrizes estressadas, em comparação com o grupo controle (**Figura 19**) ($t_{\text{(machos)}} = -4,948$, $gl = 24$, $p = 0,0000475$; $t_{\text{(fêmeas)}} = -3,271$, $gl = 26$, $p = 0,003022$). Tal achado é sugestivo de ativação do eixo HPA nos animais.

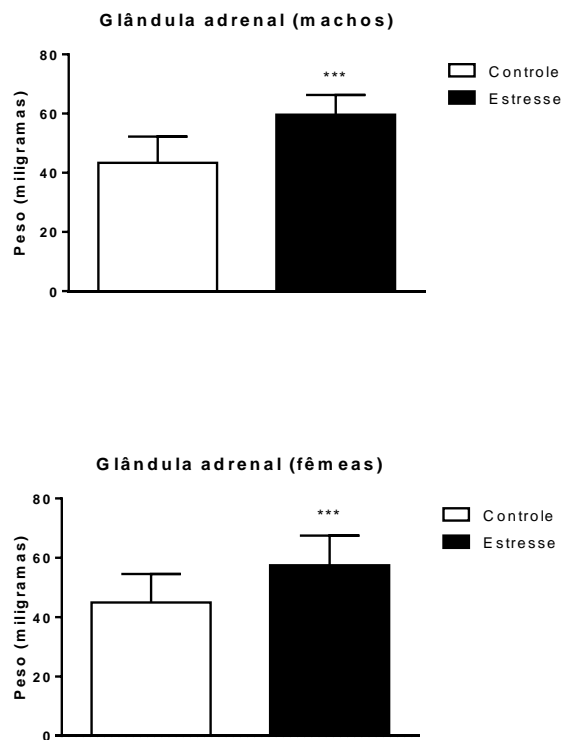


Figura 19: Peso da glândula adrenal da prole adulta. As barras brancas representam os dados de animais provenientes de matrizes não estressadas (“Controle”). As barras pretas representam os dados de animais provenientes de matrizes submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal (“Estresse/Estressado”). *** $p < 0,001$, em comparação com o grupo controle. Teste t (Tukey).

As próximas etapas do presente estudo se concentraram na análise de parâmetros bioquímicos em hipocampo. Inicialmente, foram analisados os parâmetros de epigenética nos machos da prole, nos quais foi detectado um aumento na atividade de DNMT nos animais descendentes de matrizes submetidas a estresse, em comparação com o grupo controle ($t = -5,2109$, $gl = 7$, $p = 0,00124$). Em relação aos demais parâmetros (atividade de HDAC e HAT, bem como níveis de H3K9 e H3K14 acetilada), não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (**Figura 20**) ($t_{\text{(HDAC)}} = -0,3404$, $gl = 8$, $p = 0,742$; $t_{\text{(HAT)}} = -0,254$, $gl = 8$, $p = 0,8061$; $t_{\text{(H3K9)}} = 0,659$, $gl = 8$, $p = 0,528$; $t_{\text{(H3K14)}} = 0,487$, $gl = 8$, $p = 0,639$). A análise das fêmeas também demonstrou um aumento na atividade de DNMT nos

animais descendentes de matrizes estressadas ($t = -3,994$, $gl = 8$, $p = 0,00398$), o que foi acompanhado por um aumento nos níveis de H3K14 acetilada ($t = -2,6048$, $gl = 8$, $p = 0,0314$), em comparação com o grupo controle. Com respeito aos demais parâmetros epigenéticos analisados, não foi detectada diferença significativa entre os grupos experimentais nas fêmeas (**Figura 21**) ($t_{(HDAC)} = -0,724$, $gl = 8$, $p = 0,489$; $t_{(HAT)} = -0,0113$, $gl = 8$, $p = 0,991$; $t_{(H3K9)} = -0,834$, $gl = 8$, $p = 0,428$).

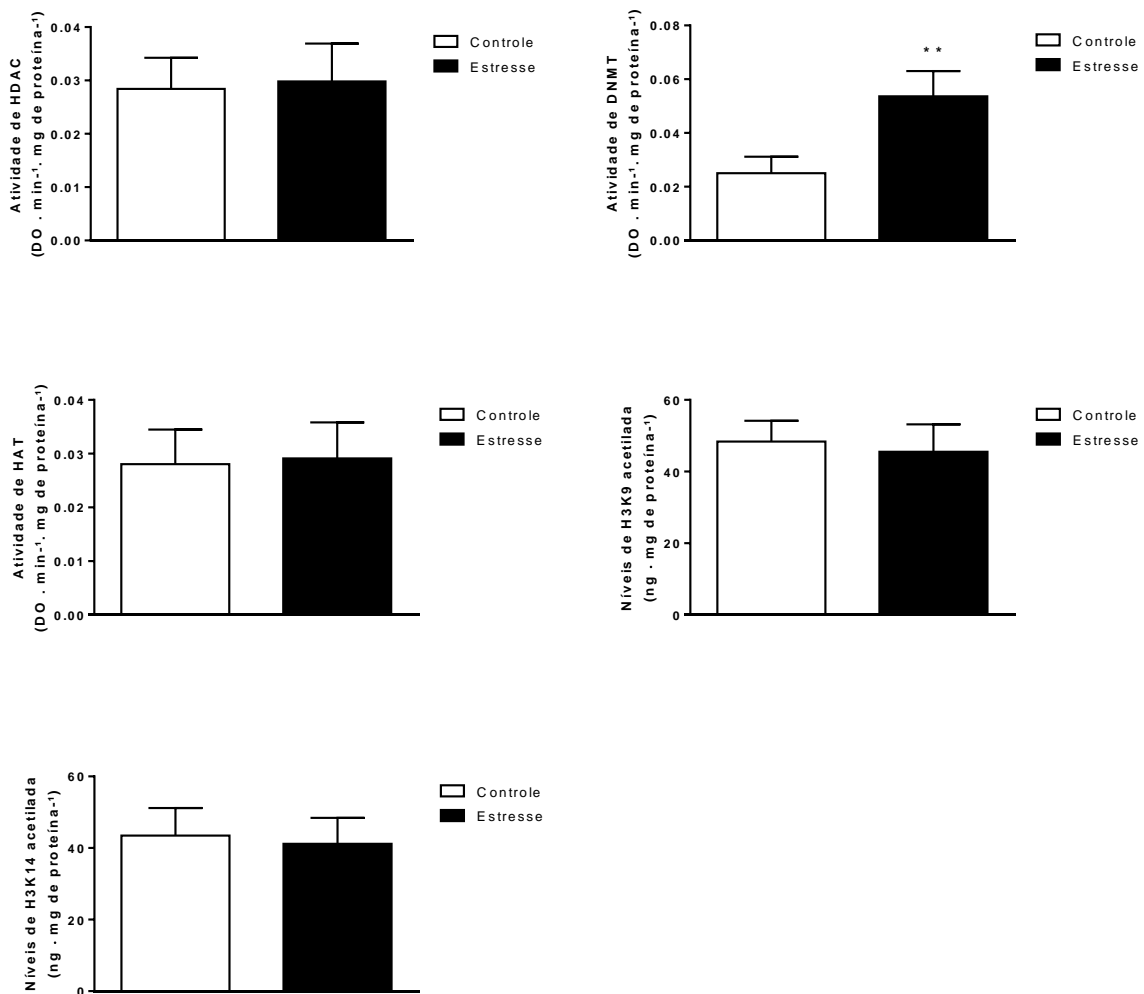


Figura 20: Parâmetros epigenéticos nos machos da prole adulta. As barras brancas representam os dados de animais provenientes de matrizes não estressadas (“Controle”). As barras pretas representam os dados de animais provenientes de matrizes submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal (“Estresse/Estressado”). A atividade das enzimas foi expressa como unidades de densidade óptica por minuto por miligrama de proteína ($DO \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$), ao passo que os níveis de histona H3 acetilada foram expressos como nanogramas por miligrama de proteína ($\text{ng} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$). ** $p < 0,01$, em comparação com o grupo controle. Teste t (Tukey). Siglas: HDAC: Histona desacetilase; DNMT: DNA metiltransferase; HAT: Histona acetiltransferase; H3K9: Resíduo de lisina 9 da histona H3; H3K14: Resíduo de lisina 14 da histona H3.

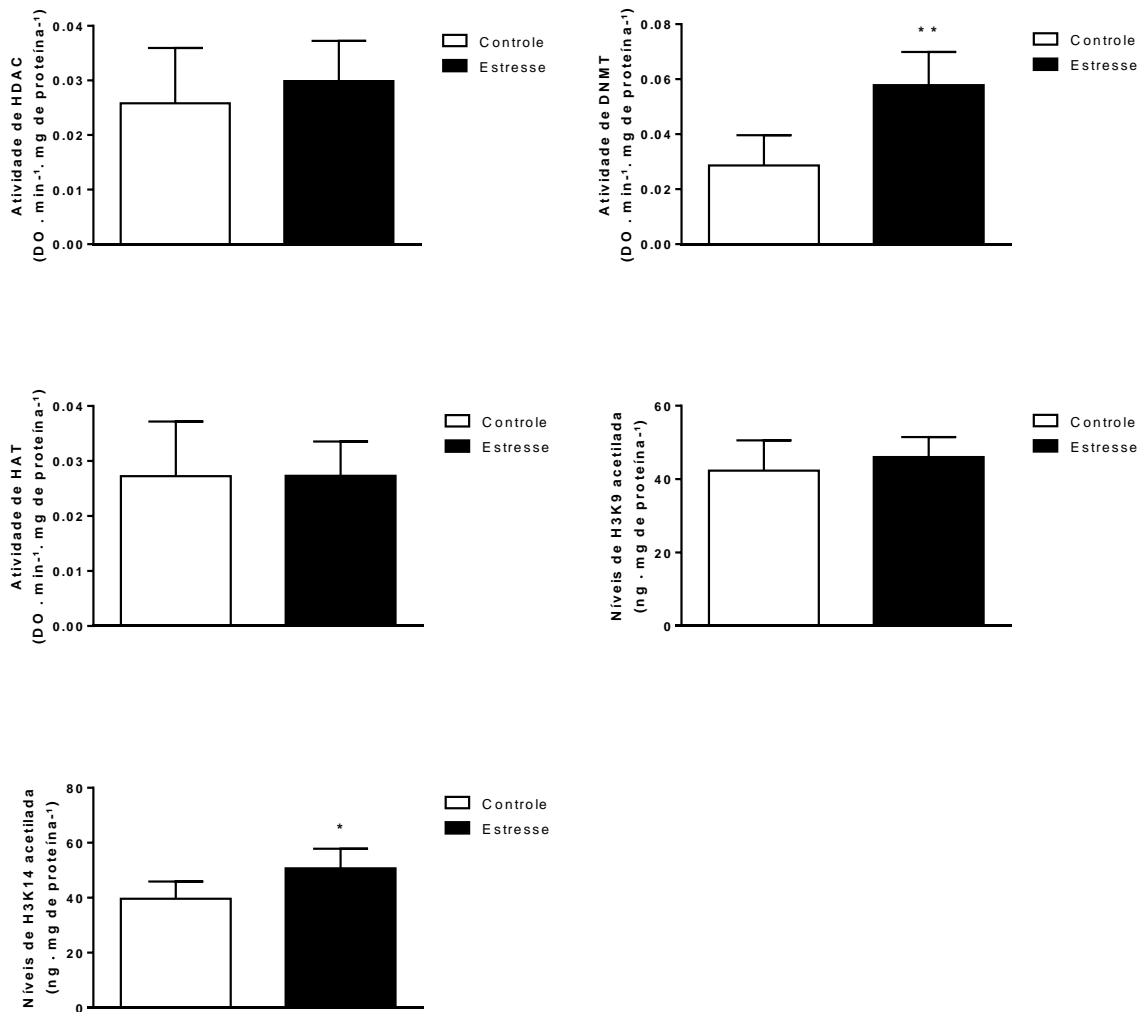


Figura 21: Parâmetros epigenéticos nas fêmeas da prole adulta. As barras brancas representam os dados de animais provenientes de matrizes não estressadas (“Controle”). As barras pretas representam os dados de animais provenientes de matrizes submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal (“Estresse/Estressado”). A atividade das enzimas foi expressa como unidades de densidade óptica por minuto por miligrama de proteína ($\text{DO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$), ao passo que os níveis de histona H3 acetilada foram expressos como nanogramas por miligrama de proteína ($\text{ng} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$). * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle. ** $p < 0,01$, em comparação com o grupo controle. Teste t (Tukey). Siglas: HDAC: Histona desacetilase; DNMT: DNA metiltransferase; HAT: Histona acetiltransferase; H3K9: Resíduo de lisina 9 da histona H3; H3K14: Resíduo de lisina 14 da histona H3.

Finalmente, as amostras de hipocampo foram submetidas a avaliações de parâmetros sugestivos de estresse oxidativo. Nos machos, foi demonstrado um aumento da atividade da SOD nos animais descendentes de ratas submetidas a estresse pré-natal, em comparação com o grupo controle ($t = -2,6013$, $gl = 18$, $p = 0,01805$). Entretanto, a análise dos demais parâmetros nestes animais (atividade da catalase, níveis de TBARS e de DCF) não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (**Figura 22**) ($t_{\text{catalase}} = -0,0658$, $gl = 18$, $p = 0,948$; $t_{\text{TBARS}} = -1,341$, $gl = 18$, $p = 0,196$; $t_{\text{DCF}} = -1,0255$, $gl = 16$, $p = 0,3203$). Em relação às fêmeas, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, independente do parâmetro bioquímico analisado (**Figura 23**) ($t_{\text{catalase}} = -0,164$, $gl = 18$, $p =$

0,872; $t_{(SOD)} = 1,145$, $gl = 18$, $p = 0,267$; $t_{(TBARS)} = 1,0512$, $gl = 17$, $p = 0,3079$; $t_{(DCF)} = -1,2069$, $gl = 18$, $p = 0,243$).

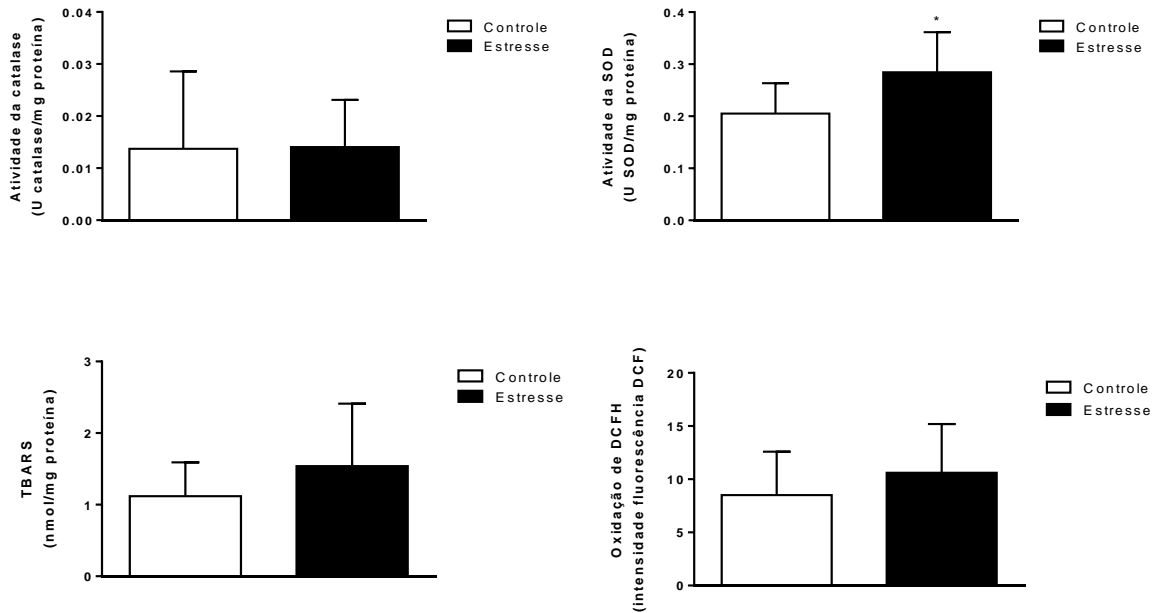


Figura 22: Parâmetros de estresse oxidativo nos machos da prole adulta. As barras brancas representam os dados de animais provenientes de matrizes não estressadas (“Controle”). As barras pretas representam os dados de animais provenientes de matrizes submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal (“Estresse/Estressado”). * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle. Teste t (Tukey). Siglas: DCF: 2’,7’-Diclorofluoresceína (forma oxidada); DCFH: 2’,7’-Diclorofluoresceína (forma reduzida); SOD: Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1); TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

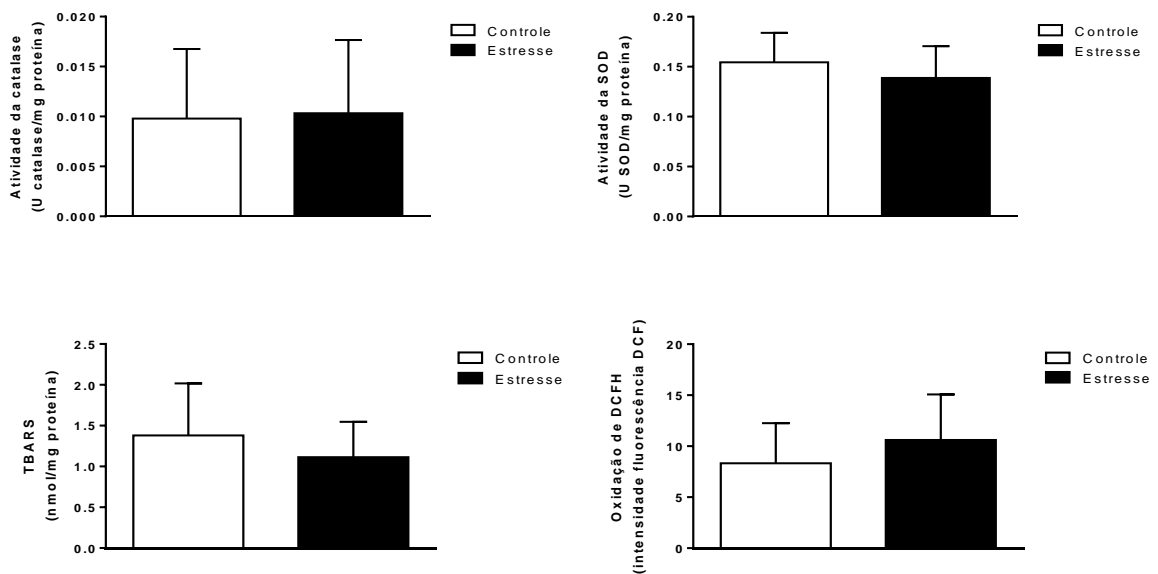


Figura 23: Parâmetros de estresse oxidativo nas fêmeas da prole adulta. As barras brancas representam os dados de animais provenientes de matrizes não estressadas (“Controle”). As barras pretas representam os dados de animais provenientes de matrizes submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal (“Estresse/Estressado”). Teste t (Tukey). Siglas: DCF: 2’,7’-Diclorofluoresceína (forma oxidada); DCFH: 2’,7’-Diclorofluoresceína (forma reduzida); SOD: Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1); TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

5 Discussão

O termo *estresse pré-natal* pode ser definido como um estresse (físico ou psicossocial) em que a gestante é exposta a uma situação que desencadeia sentimento de estresse ou mesmo respostas neuroendócrinas/fisiológicas ao estresse em seu organismo; o estresse está relacionado com a impressão de que certo evento ou desafio está acima da capacidade do indivíduo de enfrentá-lo, sendo algo que é influenciado pela percepção daquela condição pelo indivíduo (Huizink e de Rooij, 2018). A exposição a diferentes tipos de estresse durante a gestação é associada a diversas alterações comportamentais na descendência, incluindo desde a vulnerabilidade a eventos estressantes na adolescência até transtornos mentais como déficit de atenção e hiperatividade, psicose e depressão (Huizink, 2012; Maxwell et al., 2018). Adicionalmente, foi demonstrado que eventos estressantes como luto materno, desemprego, problemas financeiros e conjugais predisõem a uma maior incidência de transtornos mentais na descendência (Robinson et al., 2011).

Tendo-se em vista a necessidade de estudos adicionais no contexto da etiologia e fisiopatologia do TB, as primeiras análises a serem realizadas no presente estudo foram sobre o comportamento das matrizes com suas respectivas proles. Um nível adequado de cuidados maternos pode ser um fator pós-natal significativo, uma vez que o comportamento do tipo ansioso na prole adulta de ratas estressadas pode ser prevenido se a prole for alocada com matrizes que não passaram por estresse repetido durante a gestação (Weinstock, 2015). Neste cenário, foi demonstrada uma menor frequência na posição ABN2 entre as matrizes que foram submetidas a estresse em comparação com o grupo controle, no primeiro dia de avaliação. No segundo e terceiro dias, foram demonstradas uma maior frequência de matrizes distantes de seus filhotes e uma maior frequência da postura *blanket*, respectivamente, nas matrizes que foram submetidas ao estresse. Além disso, no sexto dia de avaliação, foi demonstrada uma menor frequência de amamentação do tipo passiva nas ratas que foram expostas ao estresse em comparação com o grupo controle. Contudo, quando se considerou os valores obtidos a partir da média dos seis dias de observação, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Neste contexto, é importante ressaltar que uma diminuição na frequência de amamentação, especialmente nas posições *arched-back*, pode ser observada em matrizes que sofreram estresse repetido pré-natal e este padrão comportamental predispõe a descendência a uma maior vulnerabilidade ao estresse (Meaney, 2001), embora existam exceções a esta tendência (Schmidt et al., 2018). A partir das análises de cuidados maternos realizadas, pode ser concluído que, embora o estresse tenha induzido alterações pontuais no

comportamento das matrizes ao longo dos dias, seu efeito não foi significativo a ponto de influenciar no comportamento em geral, calculado a partir da média dos seis dias de observação.

Após o desmame dos filhotes (21º dia pós-natal), a avaliação comportamental das matrizes por meio dos testes de campo aberto e borrifo com solução de sacarose não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Uma avaliação complementar nestes mesmos animais, comparando-se o peso de sua glândula adrenal, também não demonstrou diferença entre os grupos. Estes achados demonstram que, embora potencialmente traumático, o protocolo de estresse repetido e variado não foi capaz de induzir alterações comportamentais perceptíveis e duradouras nas matrizes no presente estudo, haja vista que a avaliação nesta etapa ocorreu apenas 21 dias após os animais terem sido expostos aos estressores, a fim de evitar que os mesmos fossem afastados de seus filhotes antes do período adequado para o desmame (20–21 dias pós-natais). Em um estudo conduzido por Baker e colegas pesquisadores (2008), foi observado que o estresse materno induziu comportamentos do tipo ansioso nas matrizes, o que também refletiu em menores índices de cuidado materno da prole. Tal discrepância com o presente estudo pode ser justificada pelo fato de aqueles autores terem exposto as ratas à contenção diariamente, durante 10 dias, enquanto que na presente pesquisa a contenção foi induzida apenas nos dois primeiros dias do protocolo de estresse repetido e variado, durante 1–6 horas por dia. É importante ressaltar também que a determinação do peso da glândula adrenal sugere que o protocolo de estresse repetido e variado não foi capaz de suscitar uma resposta fisiológica persistente das matrizes ao estresse por elas experimentado.

Por outro lado, na avaliação comportamental da prole, foi demonstrado um aumento na locomoção e diminuição do tempo de latência para sair do primeiro quadrante no teste de campo aberto em fêmeas descendentes de ratas estressadas, indicando um comportamento do tipo maníaco, em comparação com o grupo controle. Já em machos da mesma prole, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Neste contexto, é bem descrito que o estresse materno em período pré-natal pode predispor a descendência a maior suscetibilidade à ansiedade e irritabilidade, tanto em humanos quanto em roedores (Herrenkohl, 1986). Ao menos em parte, estes achados corroboram a evidência demonstrando comportamentos do tipo maníaco, entre outras alterações comportamentais, na prole de roedores submetidos a estresse durante a gestação, de uma forma similar ao que ocorre na condição humana (Weinstock, 2016). Assim como foi observado em transtornos mentais como o TB, o estresse pré-natal pode induzir hiperatividade e déficits no comportamento social na descendência de roedores, comportamentos que podem ser corrigidos pela administração de valproato, um fármaco estabilizador do humor (Matrisciano et al., 2013). Entretanto, visto que

as alterações comportamentais observadas no presente estudo foram detectadas apenas em fêmeas da prole de ratas que sofreram estresse repetido, não se pode descartar a possibilidade de que as fêmeas sejam mais vulneráveis que os machos em apresentar os comportamentos descritos (Schulz et al., 2011), ou ao menos que haja um padrão de alterações específico conforme o sexo.

Em um contexto hormonal, o estresse materno pode alterar a fisiologia do sistema reprodutor em ratos, de modo que as fêmeas da descendência podem apresentar problemas de fertilidade (Herrenkohl, 1986), enquanto que os machos são suscetíveis a um comportamento mais semelhante ao das fêmeas (Dahlöf et al., 1977), o que sugere um efeito da desregulação na secreção de corticosterona de ratas prenhes estressadas sobre vias de hormônios sexuais da prole, ao eventualmente cruzar a placenta. Além disso, foi demonstrado que os comportamentos do tipo ansioso e depressivo que podem ser observados na prole de matrizes estressadas sejam uma consequência da reprogramação do eixo HPA na prole, em resposta a uma desregulação na secreção de corticosterona na rata matriz durante a gestação (Weinstock, 2008). Neste contexto, no presente estudo, foi observada uma hipertrofia da glândula adrenal na prole descendente de matrizes submetidas ao estresse, tanto em machos quanto em fêmeas, em comparação com o grupo controle. Esta alteração pode explicar, ao menos em parte, o comportamento maníaco detectado nas fêmeas da prole, ao mesmo tempo que pode ter conferido uma maior vulnerabilidade ao estresse nos machos da prole. Diferenças significativas entre os perfis hormonais de ambos os sexos, juntamente com a influência do ciclo estral das fêmeas, também podem ter colaborado para a diferença de comportamentos observada.

Outro fator que poderia estar envolvido em todas as alterações comportamentais supracitadas é a epigenética. Isto poderia ser indicado pelo fato de o comportamento de cuidado materno não ter diferido significativamente entre matrizes estressadas e não estressadas na maioria dos parâmetros analisados, contribuindo para minimizar o efeito de uma possível “negligência” materna sobre a prole, apesar de que alterações epigenéticas possam ter sido induzidas na prole *in utero*, influenciando o seu comportamento na fase adulta. As alterações epigenéticas constituem um mecanismo que ajuda a explicar por que muitas das alterações comportamentais observadas podem se perpetuar por gerações, sendo ainda detectáveis na 2ª ou 3ª geração (Grundwald e Brunton, 2015). No contexto do estresse pré-natal, a alteração na metilação do promotor de genes de resposta ao estresse, incluindo o gene codificante para o receptor de glicocorticoide (membro 1 do grupo C da subfamília 3 de receptores nucleares – *Nr3c1*), pode estar envolvida em uma maior sensibilidade ao estresse durante a vida adulta (Phillips e Roth, 2019).

Neste cenário, no presente estudo, foi demonstrado que a atividade de DNMTs estava aumentada no grupo de animais de matrizes submetidas ao estresse pré-natal, em ambos os sexos, em comparação com o grupo controle. Este achado indica um aumento da atividade catalisada por estas enzimas, ou seja, aumento global na metilação de DNA. De fato, um estudo realizado por Benoit e colegas pesquisadores (2015) demonstrou que o estresse pré-natal com um padrão repetido e variado induz aumento dos níveis de DNMT1 no hipocampo da descendência (camundongos), o que poderia estar relacionado ao aumento da atividade desta enzima nesta estrutura cerebral. Outro estudo que demonstrou que o estresse pré-natal induz aumento da expressão de DNMTs em hipocampo de roedores foi conduzido recentemente por Grégoire e colaboradores (2020). Possíveis alvos da metilação catalisada por DNMTs incluem os genes 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase (*11 β -hsd2*) e proteína 5 ligante de FK506 (*Fkbp5*), genes da via glicocorticoide cujas regiões promotoras podem ser metiladas em resposta ao estresse pré-natal (Cao-Lei et al., 2017). Outra região que poderia ser alvo de metilação induzida por estresse é o éxon IV do gene do fator neurotrófico derivado do encéfalo (*Bdnf*), conforme demonstrado no estudo de Boersma e colaboradores (2014). Também foi demonstrado que o estresse pré-natal pode induzir metilação do gene do hormônio de liberação da corticotrofina (*CRH*) e da proteína ligante de CRH (*CRHBP*) em placenta e sangue materno humanos (Kertes et al., 2016), o que poderia estar associado a uma atividade aumentada de DNMTs. Desse modo, a atividade aumentada destas enzimas pode colaborar para um melhor entendimento das alterações comportamentais reportadas no presente estudo. Uma possível causa para este aumento é a ligação do receptor de glicocorticoides à região promotora do gene de DNMTs, especialmente *Dnmt3a*, resultando em aumento da expressão e atividade de DNMTs, conforme observado na resposta da prole de camundongos ao estresse por privação materna (Urb et al., 2019).

No contexto do TB, foi demonstrado que em estruturas cerebrais como o hipocampo, obtidas a partir de pacientes portadores do transtorno (*post mortem*), há um aumento da expressão de DNMT do tipo 1 associado à diminuição da expressão dos genes glutamato descarboxilase 67 (*GAD67*), reelina (*RELN*), e éxon IX do BDNF (*BDNF-IX*), evidenciando uma disfunção de sistemas neurotransmissores no SNC (Grayson e Guidotti, 2013; Dong et al., 2015a). Similarmente, em modelos de mania induzidos em camundongos a partir de estresse pré-natal por contenção, foi demonstrado que o hipocampo da descendência adulta apresenta um aumento na expressão de genes de DNMTs associado à hipermetilação de regiões promotoras dos genes *Bdnf*, *Gad67*, e receptores metabotrópicos de glutamato do tipo 1 (*Grm1*) e 3 (*Grm3*) (Matrisciano et al., 2012 e 2013; Dong et al., 2015b, 2016 e 2019). Uma vez que a

hiperatividade comportamental, a disfunção de sistemas de neurotransmissores e a alteração na expressão de DNMTs nestes animais puderam ser revertidas com a administração de um estabilizador de humor (ácido valproico), a alteração destas enzimas provavelmente desempenha um papel importante no comportamento do tipo maníaco observado nas fêmeas de roedores, colaborando para um melhor entendimento sobre a neurobiologia do TB.

Outro importante mecanismo epigenético envolvido no TB é a acetilação de histonas (Legrand et al., 2021). No presente estudo, foram analisadas as atividades das HATs e das HDACs, bem como os níveis de H3K9 e H3K14 acetiladas. Apesar de as HDACs desempenharem um importante papel na fisiopatologia do TB e outros transtornos de humor (Machado-Vieira et al., 2011), o presente estudo não foi capaz de demonstrar diferenças significativas neste parâmetro entre os grupos EP e CP. Outro parâmetro em que não foi observada diferença entre os grupos é a atividade das HATs, cujo papel na fisiopatologia do TB é pouco conhecido. Entretanto, foi detectado um aumento na acetilação de H3K14 nas fêmeas descendentes de ratas submetidas a estresse. Paradoxalmente, este achado se contrapõe ao aumento na atividade de DNMTs detectado no hipocampo destes animais, uma vez que teria uma função de repressão da expressão gênica. Conforme supracitado, a acetilação de H3K9 e H3K14 desempenha uma importante função na reestruturação da cromatina para um estado mais aberto, ativo transcricionalmente (Bergmann et al., 2012; Karmodiya et al., 2012; Fernández-Sánchez et al., 2013; Qiao et al., 2015). É importante ressaltar que paradigmas de estresse repetido ou crônico regulam a acetilação de histonas no hipocampo, uma região cerebral envolvida na regulação de respostas a estímulos estressores (Bagot, 2014). Neste contexto, supõe-se que a acetilação de histonas nesta região tenha um papel adaptativo ao estresse e constitua parte do mecanismo de ação de fármacos antidepressivos (Sun et al., 2013). Deste modo, é possível que o aumento de H3K14 acetilada no hipocampo seja um mecanismo estável de adaptação das fêmeas da prole ao ambiente intrauterino, uma vez que o estresse induzido nas ratas matrizes pode ter afetado o feto com a passagem de hormônios liberados durante o estresse (incluindo a corticosterona) da circulação materna para a placenta. Até o momento, este é o primeiro estudo demonstrando um aumento da acetilação de H3K14 no hipocampo da descendência de roedores em um paradigma de estresse pré-natal repetido e variado. O mecanismo preciso que poderia levar a este aumento é uma questão a ser abordada em estudos futuros, mas poderia envolver a participação do complexo da proteína 3 contendo dedo de PHD e bromodomínio associado a HBO1 (BRPF3-HBO1, do inglês *bromodomain- and PHD finger-containing protein 3-HBO1*), um complexo que catalisa a hiperacetilação de H3K14 que antecede a formação de pontos de origem de replicação do DNA (fase S) (Feng et

al., 2016). Outra possibilidade é o aumento da expressão do gene 1 contendo bromodomínio (*Brd1*) em hipocampo, cuja proteína BRD1 é um possível regulador da transcrição durante o neurodesenvolvimento e é responsável pela acetilação de H3K14 (Christensen et al., 2012).

Somando-se às alterações epigenéticas, outro fator envolvido na neurobiologia do TB é o estresse oxidativo (Kunz et al., 2008; de Sousa et al., 2014). Neste contexto, na presente pesquisa, também foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo. Apesar de o aumento dos níveis de TBARS ser um achado frequentemente replicado em estudos sobre o TB (Andreazza et al., 2008; Tsai e Huang, 2015), o presente estudo não observou diferenças estatisticamente significativas neste parâmetro entre os grupos experimentais, independentemente do sexo dos animais. Outros parâmetros nos quais não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos foram a atividade da catalase e os níveis de DCF. Entretanto, foi demonstrado que a atividade da superóxido dismutase estava significativamente aumentada no hipocampo de machos da prole descendentes de ratas submetidas aos estressores. Este resultado é diferente do que foi demonstrado em outros estudos, nos quais se analisou tecido cerebral/neurônios de ratos descendentes de ratas estressadas e foi detectado que a atividade da enzima estava diminuída, em comparação com ratos de matrizes que não foram submetidas a estresse (Flerov et al., 2009; Sahu et al., 2012). É importante ressaltar, porém, que estes estudos utilizaram metodologias diferentes do presente estudo, uma vez que neles o estresse pré-natal foi apenas por meio de contenção, aplicada ao longo de vários dias, enquanto que no presente estudo foi adotado um protocolo de estresse repetido e variado pré-natal. Além disso, diferente destes estudos, as análises bioquímicas não se concentraram em analisar células ou o tecido cerebral inteiro, mas focaram na análise de uma importante estrutura envolvida em mecanismos de resposta ao estresse (hipocampo).

Em estudos com pacientes portadores de TB, bem como em modelos animais de mania, foi demonstrado que há aumento na atividade da superóxido dismutase em diferentes espécimes biológicos (Frey et al., 2006; Savas et al., 2006; Andreazza et al., 2007; Frey et al., 2007; Kunz et al., 2008; Valvassori et al., 2018). Em pacientes, este aumento pode ser um mecanismo compensatório e consequência do acúmulo de ânion superóxido, conforme demonstrado em partículas submitocondriais isoladas de linfócitos no estudo de Valvassori e colaboradores (2018). Considerando-se que o modelo de estresse repetido e variado pré-natal utilizado no presente estudo pode simular alguns aspectos detectáveis no transtorno na prole adulta, não se poderia descartar que o aumento da atividade da enzima observado em ratos seja secundário a um desequilíbrio nos mecanismos de defesa antioxidante, levando a um aumento persistente na atividade da enzima. Além disso, este incremento pode ter desempenhado um

papel na modulação do comportamento dos machos da prole, prevenindo que estes apresentassem o comportamento do tipo maníaco observado nas fêmeas que poderia estar relacionado a alterações sugestivas de estresse oxidativo.

É importante ressaltar que o estresse oxidativo e a epigenética são processos que se influenciam mutuamente. Por exemplo, em células epiteliais tubulares renais humanas (HK-2), foi demonstrado que o estresse oxidativo induz uma desregulação na expressão de genes de metilação de DNA (*DNMT1*, *DNMT3a* e *MBD4*) e de acetilação de histonas (*HDAC1* e *HAT1*), de modo a favorecer um estado de hipermetilação do DNA em geral (Mahalingaiah et al., 2017). Além disso, o estresse oxidativo induz alterações globais na acetilação de histona H3 nas células HK-2, incluindo acetilações nos resíduos de lisina (K)9, K14, K18 e K27 desta proteína, o que pode ser um mecanismo adaptativo das células HK-2 que precede a sua conversão em um fenótipo maligno induzido por estresse oxidativo (Mahalingaiah et al., 2017). Outro estudo demonstrou que a metilação do DNA pode estar envolvida na diminuição da expressão dos genes de defesa antioxidante superóxido dismutase (*SOD*) e glutatona peroxidase (*GPX*), o que está associado ao estresse oxidativo e à inflamação que podem ser detectados em condições de síndrome metabólica (Yara et al., 2015). Também foi demonstrado que o estresse oxidativo, especialmente em curto prazo, provoca aumento nos níveis de histona metilada e diminuição nos níveis de histona acetilada (incluindo a acetilação em H3K9), assim como uma maior atividade de HDAC de classe I/II em células cultivadas (Niu et al., 2015). Além disso, foi sugerido que altos níveis de estresse oxidativo podem inibir a transcrição gênica globalmente, por meio da inibição da acetilação das histonas H3 e H4 (Berthiaume et al., 2006). De fato, a expressão do gene da SOD1 (*SOD1*) é controlada pela acetilação de histonas H3 e H4 que estão adjacentes a seu promotor gênico; uma redução no nível de acetilação destas histonas é associada à diminuição da expressão do gene *SOD1* (Rong et al., 2016).

Outro raciocínio que colabora para um melhor entendimento sobre a associação entre a epigenética e o estresse oxidativo é relacionado à biossíntese do antioxidante glutatona (GSH). A produção deste peptídeo é modulada por diversos mecanismos dentro das células durante o estresse oxidativo e o neurodesenvolvimento (Scarpato et al., 2020). Além disso, a biossíntese deste composto é ligada bioquimicamente a coenzimas que interferem nos processos epigenéticos, especialmente a S-adenosilmetionina (Li et al., 2020). Portanto, uma alteração na produção de GSH pode exercer influência nos padrões de epigenoma dos tecidos em desenvolvimento ao impactar na metilação do DNA e das histonas (Scarpato et al., 2020).

Além das alterações epigenéticas e potencialmente de estresse oxidativo, outros mecanismos biológicos que poderiam estar envolvidos no comportamento da prole no presente

estudo, não mutuamente exclusivos, incluem as alterações no eixo HPA (além do peso da glândula adrenal) e em receptores de 5-hidroxitriptamina (Akatsu et al., 2015), comprometimento de neurônios serotoninérgicos (Miyagawa et al., 2011), alterações estruturais em regiões chave do sistema límbico e na distribuição cerebral de noradrenalina, dopamina, serotonina e acetilcolina (Kofman, 2002), modificações na microbiota materna que poderiam ser transmitidas para a descendência *in utero* e se perpetuar até a sua vida adulta (Gur et al., 2017 e 2019), bem como a diminuição da permeabilidade da placenta a diferentes substâncias, incluindo citocinas pró-inflamatórias, impactando diretamente no feto (Glover, 2015). Esta última possibilidade pode ajudar a explicar uma possível associação entre o aumento da atividade de DNMTs e o estresse oxidativo que foram detectados no presente estudo.

A presente pesquisa utiliza um modelo capaz de reproduzir algumas características que têm sido atribuídas ao TB, tais como a hiperatividade, as alterações na atividade de DNMTs e na acetilação de histonas, bem como o aumento na atividade da superóxido dismutase. Desse modo, o modelo reforça o caráter neurodesenvolvimental do transtorno, constituindo-se em um modelo ambiental que poderia ser utilizado para o estudo de alguns aspectos da neurobiologia do TB, bem como para a triagem de fármacos. Estudos adicionais seriam interessantes para se confirmar se as alterações comportamentais observadas na prole são, de fato, específicas conforme o sexo, ou se o comportamento maníaco é também reprodutível em roedores machos.

5.1 Conclusões

O estresse repetido e variado pré-natal induziu alterações pontuais no comportamento das ratas matrizes em relação às suas proles, as quais são sugestivas de um comportamento “negligente” materno. Contudo, quando se analisou a média dos seis dias de avaliação comportamental, não foram detectadas diferenças significativas entre as matrizes expostas e não expostas aos estressores, demonstrando que as alterações observadas se limitaram a poucos dias de observação. Além disso, não foram observadas alterações no peso da glândula adrenal nos animais submetidos ao estresse.

Por outro lado, foi observado que o estresse pré-natal foi associado a um comportamento do tipo maníaco em fêmeas da prole adulta. É possível que as fêmeas sejam mais vulneráveis que os machos a apresentar os comportamentos descritos, e o ciclo estral pode ter contribuído para consolidar estas alterações comportamentais. Em animais de ambos os sexos, o estresse pré-natal foi significativamente associado à hipertrofia da glândula adrenal.

No presente estudo, foi também demonstrado que o estresse pré-natal foi associado a alterações epigenéticas no hipocampo da prole, incluindo o aumento da atividade de DNMTs em machos e fêmeas e aumento da acetilação de H3K14 em fêmeas. Apesar de haver poucos estudos relacionados a estes achados no contexto do TB, é importante ressaltar que aumento na expressão de DNMTs e alterações no padrão de acetilação de histonas foram associados ao transtorno. Neste sentido, os achados da presente pesquisa podem colaborar para um entendimento sobre o que ocorre com estes parâmetros no TB.

Adicionalmente, foi demonstrado que o estresse pré-natal esteve associado a um aumento na atividade da SOD nos machos da prole, uma alteração que pode ter sido compensatória sobre eventual acúmulo de superóxido nestes animais.

Portanto, foi possível uma melhor caracterização dos efeitos comportamentais em ratas que foram submetidas ao estresse repetido e variado pré-natal, assim como um maior detalhamento dos efeitos comportamentais e neuroquímicos em sua prole, de forma a mimetizar alguns aspectos da neurobiologia do TB.

As limitações do presente estudo, dentre outras, incluem o tamanho de amostra relativamente pequeno de ratas matrizes (16 animais) e o fato de ter sido analisada apenas uma estrutura cerebral (o hipocampo). Outra limitação da presente pesquisa é que não foram analisados possíveis genes alvo da atividade de DNMTs, ou da acetilação de H3K14, de modo que estudos avaliando genes alvo podem fornecer um quadro mais completo sobre o efeito das alterações epigenéticas detectadas. Além disso, a administração de fármaco(s) estabilizador(es)

de humor pode ser relevante para um maior entendimento das alterações no contexto do TB e para fins de validação do modelo utilizado.

Referências

- Abel T, Zukin RS. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8(1): 57-64.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 121-126.
- Aguilar Diaz De Leon J, Borges CR. Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *J Vis Exp*. 2020; (159).
- Akatsu S, Ishikawa C, Takemura K, Ohtani A, Shiga T. Effects of prenatal stress and neonatal handling on anxiety, spatial learning and serotonergic system of male offspring mice. *Neurosci Res*. 2015; 101: 15-23.
- Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, Cunha AB, Ceresér KM, Santin A, Gottfried C, Salvador M, Kapczinski F, Gonçalves CA. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res*. 2007; 41(6): 523-529.
- Andreazza AC, Gildengers A, Rajji TK, Zuzarte PM, Mulsant BH, Young LT. Oxidative stress in older patients with bipolar disorder. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2015; 23(3): 314-319.
- Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, Yatham LN. Oxidative stress markers in bipolar disorder: A meta-analysis. *J Affect Disord*. 2008; 111(2-3): 135-144.
- Archer JE, Blackman DE. Prenatal psychological stress and offspring behavior in rats and mice. *Dev Psychobiol*. 1971; 4(3): 193-248.
- Armstrong VL, Rakoczy S, Rojanathammanee L, Brown-Borg HM. Expression of DNA methyltransferases is influenced by growth hormone in the long-living Ames dwarf mouse in vivo and in vitro. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014; 69(8): 923-933.
- Associação de Psiquiatria Americana. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais, 5ª edição (DSM-5). Porto Alegre: Artmed, 2013. 992 p.

Baek JH, Park DY, Choi J, Kim JS, Choi JS, Ha K, Kwon JS, Lee D, Hong KS. Differences between bipolar I and bipolar II disorders in clinical features, comorbidity, and family history. *J Affect Disord.* 2011; 131(1-3): 59-67.

Bagot RC, Labonté B, Peña CJ, Nestler EJ. Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression. *Dialogues Clin Neurosci.* 2014; 16(3): 281-95.

Baker S, Chebli M, Rees S, Lemarec N, Godbout R, Bielajew C. Effects of gestational stress: 1. Evaluation of maternal and juvenile offspring behavior. *Brain Res.* 2008; 1213: 98-110.

Ballas N, Mandel G. The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Curr Opin Neurobiol.* 2005; 15(5): 500-506.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987; 32: 279-312.

Barker ED. Epigenetics, early adversity and child and adolescent mental health. *Psychopathology.* 2018; 51(2): 71-75.

Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol.* 2012; 6(6): 579-589.

Benoit JD, Rakic P, Frick KM. Prenatal stress induces spatial memory deficits and epigenetic changes in the hippocampus indicative of heterochromatin formation and reduced gene expression. *Behav Brain Res.* 2015; 281: 1-8.

Bergink V, Larsen JT, Hillegers MH, Dahl SK, Stevens H, Mortensen PB, Petersen L, Munk-Olsen T. Childhood adverse life events and parental psychopathology as risk factors for bipolar disorder. *Transl Psychiatry.* 2016; 6(10): e929.

Bergmann JH, Jakubsche JN, Martins NM, Kagansky A, Nakano M, Kimura H, Kelly DA, Turner BM, Masumoto H, Larionov V, Earnshaw WC. Epigenetic engineering: histone H3K9

acetylation is compatible with kinetochore structure and function. *J Cell Sci.* 2012 Jan; 125(Pt 2): 411-421.

Berthiaume M, Boufaied N, Moisan A, Gaudreau L. High levels of oxidative stress globally inhibit gene transcription and histone acetylation. *DNA Cell Biol.* 2006; 25(2): 124-134.

Beydoun H, Saftlas AF. Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: A review of recent evidence. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2008; 22(5): 438-466.

Boersma GJ, Lee RS, Cordner ZA, Ewald ER, Purcell RH, Moghadam AA, Tamashiro KL. Prenatal stress decreases *Bdnf* expression and increases methylation of *Bdnf* exon IV in rats. *Epigenetics.* 2014; 9(3): 437-447.

Bowman RE, MacLusky NJ, Sarmiento Y, Frankfurt M, Gordon M, Luine VN. Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology.* 2004; 145(8): 3778-3787.

Boycheva I, Vassileva V, Iantcheva A. Histone acetyltransferases in plant development and plasticity. *Curr Genomics.* 2014; 15(1): 28-37.

Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria nº 465, de 23 de maio de 2013. Aprova a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização e Animais para fins Científicos e Didáticos (Anexo). Disponível em: <https://ceua.ib.usp.br/images/Legislacao/371-Anexo_Portaria_465_DBCA.pdf>. Acesso em 01 abr. 2021.

Breitenbach M, Eckl P. Introduction to oxidative stress in biomedical and biological research. *Biomolecules.* 2015; 5(2): 1169-1177.

Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics. In: Eisenk HJ. *Experiments in Personality.* London: Routledge and Kegan Paul, 1960. p. 31-71.

Brown AJ, Mao P, Smerdon MJ, Wyrick JJ, Roberts SA. Nucleosome positions establish an extended mutation signature in melanoma. *PLoS Genet.* 2018; 14(11): e1007823.

Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011; 25(3): 287-299.

Buss C, Davis EP, Muftuler LT, Head K, Sandman CA. High pregnancy anxiety during mid-gestation is associated with decreased gray matter density in 6-9-year-old children. *Psychoneuroendocrinology.* 2010; 35(1): 141-53.

Campbell JC, Szumlinski KK, Kippin TE. Contribution of early environmental stress to alcoholism vulnerability. *Alcohol.* 2009; 43(7): 547-554.

Cao-Lei L, de Rooij SR, King S, Matthews SG, Metz GAS, Roseboom TJ, Szyf M. Prenatal stress and epigenetics. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020; 117: 198-210.

Chen HJ, Antonson AM, Rajasekera TA, Patterson JM, Bailey MT, Gur TL. Prenatal stress causes intrauterine inflammation and serotonergic dysfunction, and long-term behavioral deficits through microbe- and CCL2-dependent mechanisms. *Transl Psychiatry.* 2020; 10(1): 191.

Chen HP, Zhao YT, Zhao TC. Histone deacetylases and mechanisms of regulation of gene expression. *Crit Rev Oncog.* 2015; 20(1-2): 35-47.

Chen Z, Zhang Y. Role of Mammalian DNA Methyltransferases in Development. *Annu Rev Biochem.* 2020; 89: 135-158.

Christensen JH, Elfving B, Müller HK, Fryland T, Nyegaard M, Corydon TJ, Nielsen AL, Mors O, Wegener G, Børghlum AD. The Schizophrenia and Bipolar Disorder associated BRD1 gene is regulated upon chronic restraint stress. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012; 22(9): 651-656.

Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience.* 2001; 105(1): 7-17.

Colombo C, Fossati A, Colom F. Bipolar disorder. *Depress Res Treat.* 2012; 2012: 525837.

Copeland RA, Olhava EJ, Scott MP. Targeting epigenetic enzymes for drug discovery. *Curr Opin Chem Biol.* 2010; 14(4): 505-510.

Cristancho AG, Marsh ED. Epigenetics modifiers: potential hub for understanding and treating neurodevelopmental disorders from hypoxic injury. *J Neurodev Disord.* 2020; 12(1): 37.

Cutter AR, Hayes JJ. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett.* 2015; 589(20 Pt A): 2914-2922.

Dahlöf LG, Hård E, Larsson K. Influence of maternal stress on offspring sexual behaviour. *Anim Behav.* 1977; 25(4): 958-968.

de Jong BE, van Noort J. Overcoming chromatin barriers. *Elife.* 2019; 8: e50761.

de Sousa RT, Zarate CA Jr, Zanetti MV, Costa AC, Talib LL, Gattaz WF, Machado-Vieira R. Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium. *J Psychiatr Res.* 2014; 50: 36-41.

Dempster EL, Pidsley R, Schalkwyk LC, Owens S, Georgiades A, Kane F, Kalidindi S, Picchioni M, Kravariti E, Toulopoulou T, Murray RM, Mill J. Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet.* 2011; 20(24): 4786-4796.

Dong E, Dzitoyeva SG, Matrisciano F, Tueting P, Grayson DR, Guidotti A. Brain-derived neurotrophic factor epigenetic modifications associated with schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. *Biol Psychiatry.* 2015(b); 77(6): 589-596.

Dong E, Locci V, Gatta E, Grayson DR, Guidotti A. 2 N-Phthalyl-L-Tryptophan (RG108), like Clozapine (CLO), Induces Chromatin Remodeling in Brains of Prenatally Stressed Mice. *Mol Pharmacol.* 2019; 95(1): 62-69.

Dong E, Ruzicka WB, Grayson DR, Guidotti A. DNA-methyltransferase1 (DNMT1) binding to CpG rich GABAergic and BDNF promoters is increased in the brain of schizophrenia and bipolar disorder patients. *Schizophr Res.* 2015(a); 167(1-3): 35-41.

Dong E, Tueting P, Matrisciano F, Grayson DR, Guidotti A. Behavioral and molecular neuroepigenetic alterations in prenatally stressed mice: relevance for the study of chromatin remodeling properties of antipsychotic drugs. *Transl Psychiatry*. 2016; 6(1): e711.

Edwards JR, Yarychkivska O, Boulard M, Bestor TH. DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin*. 2017; 10: 23.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 407-421.

Fedoce ADG, Ferreira F, Bota RG, Bonet-Costa V, Sun PY, Davies KJA. The role of oxidative stress in anxiety disorder: cause or consequence? *Free Radic Res*. 2018; 52(7): 737-750.

Feng Y, Vlassis A, Roques C, Lalonde ME, González-Aguilera C, Lambert JP, Lee SB, Zhao X, Alabert C, Johansen JV, Paquet E, Yang XJ, Gingras AC, Côté J, Groth A. BRPF3-HBO1 regulates replication origin activation and histone H3K14 acetylation. *EMBO J*. 2016; 35(2): 176-192.

Fernández-Sánchez A, Baragaño Raneros A, Carvajal Palao R, Sanz AB, Ortiz A, Ortega F, Suárez-Álvarez B, López-Larrea C. DNA demethylation and histone H3K9 acetylation determine the active transcription of the NKG2D gene in human CD8+ T and NK cells. *Epigenetics*. 2013; 8(1): 66-78.

Flerov MA, Gerasimova IA, V'yushina AV, Pritvorova AV. Effects of prenatal stress on free-radical lipid and protein oxidation and superoxide dismutase activity in cerebral cortex neurons and neuroglia in the rat brain. *Neurosci Behav Physiol*. 2009; 39(4): 371-375.

Frey BN, Andreatza AC, Kunz M, Gomes FA, Quevedo J, Salvador M, Gonçalves CA, Kapczinski F. Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007; 31(1): 283-285.

Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J. Changes in antioxidant defense enzymes after d-amphetamine exposure: implications as an animal model of mania. *Neurochem Res.* 2006; 31(5): 699-703.

Fries GR, Li Q, McAlpin B, Rein T, Walss-Bass C, Soares JC, Quevedo J. The role of DNA methylation in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016; 68: 474-488.

Frye CA, Paris JJ, Osborne DM, Campbell JC, Kippin TE. Prenatal Stress Alters Progesterone to Mediate Susceptibility to Sex-Typical, Stress-Sensitive Disorders, such as Drug Abuse: A Review. *Front Psychiatry.* 2011; 2: 52.

Gao J, Wang Y, Li W, Zhang J, Che Y, Cui X, Sun B, Zhao G. Loss of histone deacetylase 2 inhibits oxidative stress induced by high glucose via the HO-1/SIRT1 pathway in endothelial progenitor cells. *Gene.* 2018; 678: 1-7.

Geddes JR, Miklowitz DJ. Treatment of bipolar disorder. *Lancet.* 2013; 381(9878): 1672-1682.

Ghezzi P, Jaquet V, Marcucci F, Schmidt HHHW. The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects. *Br J Pharmacol.* 2017; 174(12): 1784-1796.

Glover V. Prenatal stress and its effects on the fetus and the child: Possible underlying biological mechanisms. *Adv Neurobiol.* 2015; 10: 269-283.

Gowher H, Jeltsch A. Mammalian DNA methyltransferases: New discoveries and open questions. *Biochem Soc Trans.* 2018; 46(5): 1191-1202. Errata em: *Biochem Soc Trans.* 2019; 47(3): 959.

Grande I, Berk M, Birmaher B, Vieta E. Bipolar disorder. *Lancet.* 2016; 387(10027): 1561-1572.

Grayson DR, Guidotti A. The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38(1): 138-66.

Grégoire S, Jang SH, Szyf M, Stone LS. Prenatal maternal stress is associated with increased sensitivity to neuropathic pain and sex-specific changes in supraspinal mRNA expression of epigenetic- and stress-related genes in adulthood. *Behav Brain Res.* 2020; 380: 112396.

Grundwald NJ, Brunton PJ. Prenatal stress programs neuroendocrine stress responses and affective behaviors in second generation rats in a sex-dependent manner. *Psychoneuroendocrinology.* 2015; 62: 204-216.

Gujar H, Weisenberger DJ, Liang G. The Roles of Human DNA Methyltransferases and their isoforms in shaping the epigenome. *Genes (Basel).* 2019; 10(2): 172.

Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(11): 4405-4409.

Gur TL, Palkar AV, Rajasekera T, Allen J, Niraula A, Godbout J, Bailey MT. Prenatal stress disrupts social behavior, cortical neurobiology and commensal microbes in adult male offspring. *Behav Brain Res.* 2019; 359: 886-894.

Gur TL, Shay L, Palkar AV, Fisher S, Varaljay VA, Dowd S, Bailey MT. Prenatal stress affects placental cytokines and neurotrophins, commensal microbes, and anxiety-like behavior in adult female offspring. *Brain Behav Immun.* 2017; 64: 50-58.

Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1984; 327(1): 1-5.

Hassan W, Noreen H, Castro-Gomes V, Mohammadzai I, da Rocha JB, Landeira-Fernandez J. Association of oxidative stress with psychiatric disorders. *Curr Pharm Des.* 2016; 22(20): 2960-2974.

Hassell KN. Histone Deacetylases and their inhibitors in cancer epigenetics. *Diseases.* 2019; 7(4): 57.

Herrenkohl LR. Prenatal stress disrupts reproductive behavior and physiology in offspring. *Ann N Y Acad Sci.* 1986; 474: 120-128.

Huizink AC. Prenatal substance use, prenatal stress and offspring behavioural outcomes: Considerations for future studies. *Nord J Psychiatry.* 2012; 66(2): 115-122.

Huizink AC, de Rooij SR. Prenatal stress and models explaining risk for psychopathology revisited: Generic vulnerability and divergent pathways. *Dev Psychopathol.* 2018; 30(3): 1041-1062.

Imran M, Shafiq S, Farooq MA, Naeem MK, Widemann E, Bakhsh A, Jensen KB, Wang RR. Comparative genome-wide analysis and expression profiling of histone acetyltransferase (HAT) gene family in response to hormonal applications, metal and abiotic stresses in cotton. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(21): 5311.

Isingrini E, Camus V, Le Guisquet AM, Pingaud M, Devers S, Belzung C. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: A model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS One.* 2010; 5(4): e10404.

Jain A, Mitra P. Bipolar Affective Disorder. [Atualizado em 19 out. 2020]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558998/>>. Acessado em: 14 mar. 2021.

Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski.* 2020; 48(284): 124-127.

Jiang T, Sun Q, Chen S. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2016; 147: 1-19.

Jin B, Robertson KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 754: 3-29.

Judd LL, Schettler PJ, Akiskal HS, Maser J, Coryell W, Solomon D, Endicott J, Keller M. Long-term symptomatic status of bipolar I vs. bipolar II disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2003; 6(2): 127-137.

Kandola K, Bowman A, Birch-Machin MA. Oxidative stress--a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. *Int J Cosmet Sci.* 2015; 37 Suppl 2: 1-8.

Karmodiya K, Krebs AR, Oulad-Abdelghani M, Kimura H, Tora L. H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC Genomics.* 2012; 13: 424.

Kertes DA, Kamin HS, Hughes DA, Rodney NC, Bhatt S, Mulligan CJ. Prenatal Maternal Stress Predicts Methylation of Genes Regulating the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical System in Mothers and Newborns in the Democratic Republic of Congo. *Child Dev.* 2016; 87(1): 61-72.

Ketter TA. Diagnostic features, prevalence, and impact of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry.* 2010; 71(6): e14.

Kim Y, Santos R, Gage FH, Marchetto MC. Molecular Mechanisms of Bipolar Disorder: Progress Made and Future Challenges. *Front Cell Neurosci.* 2017; 11: 30.

Kinney DK, Munir KM, Crowley DJ, Miller AM. Prenatal stress and risk for autism. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008; 32(8): 1519-1532.

Kinnunen AK, Koenig JI, Bilbe G. Repeated variable prenatal stress alters pre- and postsynaptic gene expression in the rat frontal pole. *J Neurochem.* 2003; 86(3): 736-748.

Kloiber S, Rosenblat JD, Husain MI, Ortiz A, Berk M, Quevedo J, Vieta E, Maes M, Birmaher B, Soares JC, Carvalho AF. Neurodevelopmental pathways in bipolar disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020; 112:213-226.

Koehl M, Darnaudéry M, Dulluc J, Van Reeth O, Le Moal M, Maccari S. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J Neurobiol.* 1999; 40(3): 302-315.

Koenig JI, Elmer GI, Shepard PD, Lee PR, Mayo C, Joy B, Hercher E, Brady DL. Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: Potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res.* 2005; 156(2): 251-261.

Koenig JI, Kirkpatrick B, Lee P. Glucocorticoid hormones and early brain development in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2002; 27(2): 309-318.

Kofink D, Boks MP, Timmers HT, Kas MJ. Epigenetic dynamics in psychiatric disorders: environmental programming of neurodevelopmental processes. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013; 37(5): 831-845.

Kofman O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002; 26(4): 457-470.

Kubota T. Epigenetic alterations induced by environmental stress associated with metabolic and neurodevelopmental disorders. *Environ Epigenet.* 2016; 2(3): dvw017.

Kubota T, Miyake K, Hariya N, Mochizuki K. Understanding the epigenetics of neurodevelopmental disorders and DOHaD. *J Dev Orig Health Dis.* 2015; 6(2): 96-104.

Kubota T, Takae H, Miyake K. Epigenetic mechanisms and therapeutic perspectives for neurodevelopmental disorders. *Pharmaceuticals (Basel).* 2012; 5(4): 369-383.

Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, Belmonte-de-Abreu PS, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32(7): 1677-1681.

Labuschagne CF, Brenkman AB. Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging. *Ageing Res Rev.* 2013; 12(4): 918-930.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5(2): 227-231.

Lee YH, Cherkerzian S, Seidman LJ, Papandonatos GD, Savitz DA, Tsuang MT, Goldstein JM, Buka SL. Maternal Bacterial Infection During Pregnancy and Offspring Risk of Psychotic Disorders: Variation by Severity of Infection and Offspring Sex. *Am J Psychiatry.* 2020; 177(1): 66-75. Errata em: *Am J Psychiatry.* 2021; 178(2): 206.

Legrand A, Iftimovici A, Khayachi A, Chaumette B. Epigenetics in bipolar disorder: a critical review of the literature. *Psychiatr Genet.* 2021; 31(1): 1-12.

Lehmann J, Stöhr T, Feldon J. Long-term effects of prenatal stress experiences and postnatal maternal separation on emotionality and attentional processes. *Behav Brain Res.* 2000; 107(1-2): 133-144.

Lewis DA, Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci.* 2002; 25: 409-432.

Li E, Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6(5): a019133.

Li Y, Camarillo C, Xu J, Arana TB, Xiao Y, Zhao Z, Chen H, Ramirez M, Zavala J, Escamilla MA, Armas R, Mendoza R, Ontiveros A, Nicolini H, Magaña AA, Rubin LP, Li X, Xu C. Genome-wide methylome analyses reveal novel epigenetic regulation patterns in schizophrenia and bipolar disorder. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 201587.

Li Z, Wang F, Liang B, Su Y, Sun S, Xia S, Shao J, Zhang Z, Hong M, Zhang F, Zheng S. Methionine metabolism in chronic liver diseases: an update on molecular mechanism and therapeutic implication. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5(1): 280.

Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018; 13: 757-772.

Lipinski M, Del Blanco B, Barco A. CBP/p300 in brain development and plasticity: disentangling the KAT's cradle. *Curr Opin Neurobiol*. 2019; 59: 1-8.

Lombardi PM, Cole KE, Dowling DP, Christianson DW. Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr Opin Struct Biol*. 2011; 21(6): 735-743.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265-275.

Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O. Prenatal stress and long-term consequences: Implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003; 27(1-2): 119-127.

Machado-Vieira R, Ibrahim L, Zarate CA Jr. Histone deacetylases and mood disorders: epigenetic programming in gene-environment interactions. *CNS Neurosci Ther*. 2011; 17(6): 699-704.

Mahalingaiah PK, Ponnusamy L, Singh KP. Oxidative stress-induced epigenetic changes associated with malignant transformation of human kidney epithelial cells. *Oncotarget*. 2017; 8(7): 11127-11143.

Mahgoub M, Monteggia LM. A role for histone deacetylases in the cellular and behavioral mechanisms underlying learning and memory. *Learn Mem*. 2014; 21(10): 564-568.

Manea SA, Vlad ML, Fenyo IM, Lazar AG, Raicu M, Muresian H, Simionescu M, Manea A. Pharmacological inhibition of histone deacetylase reduces NADPH oxidase expression, oxidative stress and the progression of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic

apolipoprotein E-deficient mice; potential implications for human atherosclerosis. *Redox Biol.* 2020; 28: 101338.

Marangoni C, Hernandez M, Faedda GL. The role of environmental exposures as risk factors for bipolar disorder: A systematic review of longitudinal studies. *J Affect Disord.* 2016; 193: 165-174.

Matrisciano F, Tueting P, Dalal I, Kadriu B, Grayson DR, Davis JM, Nicoletti F, Guidotti A. Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. *Neuropharmacology.* 2013; 68:184-194.

Matrisciano F, Tueting P, Maccari S, Nicoletti F, Guidotti A. Pharmacological activation of group-II metabotropic glutamate receptors corrects a schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. *Neuropsychopharmacology.* 2012; 37(4):929-938.

Maxwell SD, Fineberg AM, Drabick DA, Murphy SK, Ellman LM. Maternal prenatal stress and other developmental risk factors for adolescent depression: Spotlight on sex differences. *J Abnorm Child Psychol.* 2018; 46(2): 381-397.

Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24: 1161-1192.

Merikangas KR, Jin R, He JP, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, Viana MC, Andrade LH, Hu C, Karam EG, Ladea M, Medina-Mora ME, Ono Y, Posada-Villa J, Sagar R, Wells JE, Zarkov Z. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry.* 2011; 68(3): 241-251.

Michel TM, Pülschen D, Thome J. The role of oxidative stress in depressive disorders. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(36): 5890-5899.

Mikić AN, Brkić S, Marić D, Sekulić B, Cetković A, Mitić G. Thiobarbituric acid reactive substances as marker of oxidative stress in pregnancies with pre-eclampsia. *Med Pregl.* 2011; 64(7-8): 377-380.

- Misztak P, Pańczyszyn-Trzewik P, Sowa-Kućma M. Histone deacetylases (HDACs) as therapeutic target for depressive disorders. *Pharmacol Rep.* 2018; 70(2): 398-408.
- Miyagawa K, Tsuji M, Fujimori K, Saito Y, Takeda H. Prenatal stress induces anxiety-like behavior together with the disruption of central serotonin neurons in mice. *Neurosci Res.* 2011; 70(1): 111-117.
- Miyake K, Hirasawa T, Koide T, Kubota T. Epigenetics in autism and other neurodevelopmental diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 724: 91-98.
- Moosavi A, Motevalizadeh Ardekani A. Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iran Biomed J.* 2016; 20(5): 246-258.
- Morato S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. *Psicol. USP.* 2006; 17(4): 159-174.
- Murgatroyd C, Spengler D. Genetic variation in the epigenetic machinery and mental health. *Curr Psychiatry Rep.* 2012; 14(2): 138-149.
- Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 1997; 349: 1436-1442.
- Myers MM, Brunelli SA, Squire JM, Shindeldecker RD, Hofer MA. Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures. *Dev Psychobiol.* 1989; 22(1): 29-53.
- Nakamaru Y, Takagi D, Homma A, Hatakeyama S, Fukuda S. Oxidative stress regulates IL-4 gene expression in mast cells through the reduction of histone deacetylase. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015; 152(1): 48-52.
- Namjoshi MA, Buesching DP. A review of the health-related quality of life literature in bipolar disorder. *Qual Life Res.* 2001; 10(2):105-115.
- Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019: 9613090.

National Institutes of Health (US). National Center for Biotechnology Information (NCBI). United States National Library of Medicine. Epigenomics Scientific Background. Epigenomics Help [Internet]. Bethesda: NCBI; 2011.

Neri F, Rapelli S, Krepelova A, Incarnato D, Parlato C, Basile G, Maldotti M, Anselmi F, Oliviero S. Intragenic DNA methylation prevents spurious transcription initiation. *Nature*. 2017; 543(7643): 72-77.

Nieratschker V, Batra A, Fallgatter AJ. Genetics and epigenetics of alcohol dependence. *J Mol Psychiatry*. 2013; 1(1): 11.

Niu Y, DesMarais TL, Tong Z, Yao Y, Costa M. Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation. *Free Radic Biol Med*. 2015; 82: 22-28.

Noh H, Ha H. Reactive oxygen species and oxidative stress. *Contrib Nephrol*. 2011; 170: 102-112.

Noh KM, Hwang JY, Follenzi A, Athanasiadou R, Miyawaki T, Grealley JM, Bennett MV, Zukin RS. Repressor element-1 silencing transcription factor (REST)-dependent epigenetic remodeling is critical to ischemia-induced neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(16): E962-E971.

Notarangelo FM, Schwarcz R. Restraint Stress during Pregnancy Rapidly Raises Kynurenic Acid Levels in Mouse Placenta and Fetal Brain. *Dev Neurosci*. 2016; 38(6): 458-468.

O'Donnell KJ, Meaney MJ. Epigenetics, Development, and Psychopathology. *Annu Rev Clin Psychol*. 2020; 16: 327-350.

O'Shea KS, McInnis MG. Neurodevelopmental origins of bipolar disorder: iPSC models. *Mol Cell Neurosci*. 2016; 73: 63-83.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *J Lipid Res*. 1978; 19(8): 1053-1057.

Ooi L, Wood IC. Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nat Rev Genet.* 2007; 8(7): 544-554.

Otsuki K, Uchida S, Wakabayashi Y, Matsubara T, Hobara T, Funato H, Watanabe Y. Aberrant REST-mediated transcriptional regulation in major depressive disorder. *J Psychiatr Res.* 2010; 44(6): 378-384.

Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: A dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016; 7(6): e2253.

Parbin S, Kar S, Shilpi A, Sengupta D, Deb M, Rath SK, Patra SK. Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. *J Histochem Cytochem.* 2014; 62(1): 11-33.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 1985; 14(3): 149-167.

Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1986; 24(3): 525-529.

Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 1977; 83(2): 346-356.

Phillips NLH, Roth TL. Animal models and their contribution to our understanding of the relationship between environments, epigenetic modifications, and behavior. *Genes (Basel).* 2019; 10(1): 1-15.

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 8416763.

Popoola DO, Borrow AP, Sanders JE, Nizhnikov ME, Cameron NM. Can low-level ethanol exposure during pregnancy influence maternal care? An investigation using two strains of rat across two generations. *Physiol Behav.* 2015; 148: 111-121.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: A primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1977; 229(2): 327-336.

Preiser JC. Oxidative stress. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012; 36(2): 147-154.

Qiao Y, Wang R, Yang X, Tang K, Jing N. Dual roles of histone H3 lysine 9 acetylation in human embryonic stem cell pluripotency and neural differentiation. *J Biol Chem.* 2015; 290(4): 2508-2520. Errata em: *J Biol Chem.* 2015; 290(16): 9949.

Quina AS, Buschbeck M, Di Croce L. Chromatin structure and epigenetics. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72(11): 1563-1569.

Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR. The neurodevelopmental model of schizophrenia: Update 2005. *Mol Psychiatry.* 2005; 10(5): 434-449.

Rayen I, Steinbusch HW, Charlier TD, Pawluski JL. Developmental fluoxetine exposure and prenatal stress alter sexual differentiation of the brain and reproductive behavior in male rat offspring. *Psychoneuroendocrinology.* 2013; 38(9): 1618-1629.

Robinson M, Mattes E, Oddy WH, Pennell CE, van Eekelen A, McLean NJ, Jacoby P, Li J, De Klerk NH, Zubrick SR, Stanley FJ, Newnham JP. Prenatal stress and risk of behavioral morbidity from age 2 to 14 years: The influence of the number, type, and timing of stressful life events. *Dev Psychopathol.* 2011; 23(2): 507-520.

Rodgers RJ, Cole JC. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In Cooper SJ, Hendrie CA (Eds.). *Ethology and psychopharmacology.* New York: John Wiley and Sons, 1994. p. 9-43.

Rong X, Qiu X, Jiang Y, Li D, Xu J, Zhang Y, Lu Y. Effects of histone acetylation on superoxide dismutase 1 gene expression in the pathogenesis of senile cataract. *Sci Rep.* 2016; 6: 34704.

Roopra A, Huang Y, Dingledine R. Neurological disease: listening to gene silencers. *Mol Interv.* 2001; 1(4): 219-228.

Rowland T, Perry BI, Upthegrove R, Barnes N, Chatterjee J, Gallacher D, Marwaha S. Neurotrophins, cytokines, oxidative stress mediators and mood state in bipolar disorder: systematic review and meta-analyses. *Br J Psychiatry.* 2018; 213(3): 514-525.

Sahu S, Madhyastha S, Rao G. Effect of prenatal stress on expression of glutathione system in neonatal rat brain. *Turk Neurosurg.* 2012; 22(5): 576-582.

Salim S. Oxidative stress and psychological disorders. *Curr Neuropharmacol.* 2014; 12(2): 140-147.

Salinas RD, Connolly DR, Song H. Invited Review: Epigenetics in neurodevelopment. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2020; 46(1): 6-27.

Sam SP, Nisha A, Varghese PJ. Stressful life events and relapse in bipolar affective disorder: A cross-sectional study from a tertiary care center of Southern India. *Indian J Psychol Med.* 2019; 41(1): 61-67.

Savas HA, Gergerlioglu HS, Armutcu F, Herken H, Yilmaz HR, Kocoglu E, Selek S, Tutkun H, Zoroglu SS, Akyol O. Elevated serum nitric oxide and superoxide dismutase in euthymic bipolar patients: impact of past episodes. *World J Biol Psychiatry.* 2006; 7(1): 51-55.

Scarpato R, Testi S, Colosimo V, Garcia Crespo C, Micheli C, Azzarà A, Tozzi MG, Ghirri P. Role of oxidative stress, genome damage and DNA methylation as determinants of pathological conditions in the newborn: an overview from conception to early neonatal stage. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2020; 783: 108295.

Schmidt M, Braun K, Brandwein C, Rossetti AC, Guara Ciurana S, Riva MA, Deuschle M, Bock J, Gass P, Gröger N. Maternal stress during pregnancy induces depressive-like behavior only in female offspring and correlates to their hippocampal Avp and Oxt receptor expression. *Behav Brain Res.* 2018; 353: 1-10.

Schmitt A, Malchow B, Hasan A, Falkai P. The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Front Neurosci.* 2014; 8: 19.

Schulz KM, Pearson JN, Neeley EW, Berger R, Leonard S, Adams CE, Stevens KE. Maternal stress during pregnancy causes sex-specific alterations in offspring memory performance, social interactions, indices of anxiety, and body mass. *Physiol Behav.* 2011; 104(2): 340-347.

Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA. Catalase and its mysteries. *Prog Biophys Mol Biol.* 2018; 140: 5-12.

Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, He W, Shirakawa K, Le Moan N, Grueter CA, Lim H, Saunders LR, Stevens RD, Newgard CB, Farese RV Jr, de Cabo R, Ulrich S, Akassoglou K, Verdin E. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science.* 2013; 339(6116): 211-214.

Shorter KR, Miller BH. Epigenetic mechanisms in schizophrenia. *Prog Biophys Mol Biol.* 2015; 118(1-2): 1-7.

Sickmann HM, Arentzen TS, Dyrby TB, Plath N, Kristensen MP. Prenatal stress produces sex-specific changes in depression-like behavior in rats: implications for increased vulnerability in females. *J Dev Orig Health Dis.* 2015; 6(5): 462-474.

Singh AK, Bishayee A, Pandey AK. Targeting histone deacetylases with natural and synthetic agents: An emerging anticancer strategy. *Nutrients.* 2018; 10(6): 731.

Smaga I, Niedzielska E, Gawlik M, Moniczewski A, Krzek J, Przegaliński E, Pera J, Filip M. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol Rep.* 2015; 67(3): 569-580.

Steckert AV, Valvassori SS, Moretti M, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Role of oxidative stress in the pathophysiology of bipolar disorder. *Neurochem Res.* 2010; 35(9): 1295-1301.

Sun H, Kennedy PJ, Nestler EJ. Epigenetics of the depressed brain: role of histone acetylation and methylation. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38(1): 124-137.

Sun XJ, Man N, Tan Y, Nimer SD, Wang L. The role of histone acetyltransferases in normal and malignant hematopoiesis. *Front Oncol.* 2015; 5: 108.

Sweis BM, Bachour SP, Brekke JA, Gewirtz JC, Sadeghi-Bazargani H, Hevesi M, Divani AA. A modified beam-walking apparatus for assessment of anxiety in a rodent model of blast traumatic brain injury. *Behav Brain Res.* 2016; 296: 149-156.

Sylvia LG, Shelton RC, Kemp DE, Bernstein EE, Friedman ES, Brody BD, McElroy SL, Singh V, Tohen M, Bowden CL, Ketter TA, Deckersbach T, Thase ME, Reilly-Harrington NA, Nierenberg AA, Rabideau DJ, Kinrys G, Kocsis JH, Bobo WV, Kamali M, McInnis MG, Calabrese JR. Medical burden in bipolar disorder: findings from the Clinical and Health Outcomes Initiative in Comparative Effectiveness for Bipolar Disorder study (Bipolar CHOICE). *Bipolar Disord.* 2015; 17(2): 212-223.

Talarowska M. Epigenetic Mechanisms in the Neurodevelopmental Theory of Depression. *Depress Res Treat.* 2020; 2020: 6357873.

Tang J, Yan H, Zhuang S. Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases. *Clin Sci (Lond).* 2013; 124(11): 651-662.

Teixeira AL, Salem H, Frey BN, Barbosa IG, Machado-Vieira R. Update on bipolar disorder biomarker candidates. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016; 16(11): 1209-1220.

Tokarz P, Kaarniranta K, Blasiak J. Inhibition of DNA methyltransferase or histone deacetylase protects retinal pigment epithelial cells from DNA damage induced by oxidative stress by the stimulation of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol.* 2016; 776: 167-175.

Torrico TJ, Abdijadid S. Neuroanatomy, Limbic System. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (Flórida, Estados Unidos): StatPearls Publishing, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538491/>. Acesso em 25 abr. 2021.

Tsai MC, Huang TL. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) is a state biomarker of oxidative stress in bipolar patients in a manic phase. *J Affect Disord.* 2015; 173: 22-26.

Urb M, Anier K, Matsalu T, Aonurm-Helm A, Tasa G, Koppel I, Zharkovsky A, Timmusk T, Kalda A. Glucocorticoid Receptor Stimulation Resulting from Early Life Stress Affects Expression of DNA Methyltransferases in Rat Prefrontal Cortex. *J Mol Neurosci.* 2019; 68(1): 99-110.

Valvassori SS, Bavaresco DV, Feier G, Cechinel-Recco K, Steckert AV, Varela RB, Borges C, Carvalho-Silva M, Gomes LM, Streck EL, Quevedo J. Increased oxidative stress in the mitochondria isolated from lymphocytes of bipolar disorder patients during depressive episodes. *Psychiatry Res.* 2018; 264: 192-201.

Valvassori SS, Varela RB, Quevedo J. Animal models of mood disorders: Focus on bipolar disorder and depression. In: Conn PM, *Animal models for the study of human disease.* Academic Press: London, 2017. p. 991-1002.

Večeřa J, Bártová E, Krejčí J, Legartová S, Komůrková D, Rudá-Kučerová J, Štark T, Dražanová E, Kašpárek T, Šulcová A, Dekker FJ, Szymanski W, Seiser C, Weitzer G, Mechoulam R, Micale V, Kozubek S. HDAC1 and HDAC3 underlie dynamic H3K9 acetylation during embryonic neurogenesis and in schizophrenia-like animals. *J Cell Physiol.* 2018; 233(1): 530-548.

Walker EF, Diforio D. Schizophrenia: A neural diathesis-stress model. *Psychol Rev.* 1997; 104(4): 667-685.

Wapenaar H, Dekker FJ. Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clin Epigenetics.* 2016; 8: 59.

Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol.* 2001; 65(5): 427-451.

Weinstock M. Changes induced by prenatal stress in behavior and brain morphology: Can they be prevented or reversed? *Adv Neurobiol.* 2015; 10: 3-25.

Weinstock M. Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. *Neurobiol Stress*. 2016; 6: 3-13.

Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008; 32(6): 1073-1086.

Weinstock M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun*. 2005; 19(4): 296-308.

Wilson CA, Terry AV Jr. Variable maternal stress in rats alters locomotor activity, social behavior, and recognition memory in the adult offspring. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013; 104: 47-61.

Wu Y, Lu YC, Jacobs M, Pradhan S, Kapse K, Zhao L, Niforatos-Andescavage N, Vezina G, du Plessis AJ, Limperopoulos C. Association of Prenatal Maternal Psychological Distress With Fetal Brain Growth, Metabolism, and Cortical Maturation. *JAMA Netw Open*. 2020; 3(1): e1919940.

Xu F, Olson WK. DNA architecture, deformability, and nucleosome positioning. *J Biomol Struct Dyn*. 2010; 27(6): 725-739.

Yang J, Li W, Liu X, Li Z, Li H, Yang G, Xu L, Li L. Enriched environment treatment counteracts enhanced addictive and depressive-like behavior induced by prenatal chronic stress. *Brain Res*. 2006; 1125(1): 132-137.

Yang X, Li L, Liang J, Shi L, Yang J, Yi X, Zhang D, Han X, Yu N, Shang Y. Histone acetyltransferase 1 promotes homologous recombination in DNA repair by facilitating histone turnover. *J Biol Chem*. 2013; 288(25): 18271-18282.

Yara S, Lavoie JC, Levy E. Oxidative stress and DNA methylation regulation in the metabolic syndrome. *Epigenomics*. 2015; 7(2): 283-300.

Yoon DS, Lee MH, Cha DS. Measurement of intracellular ROS in *Caenorhabditis elegans* using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate. *Bio Protoc*. 2018; 8(6): e2774.

Yuan H, Marmorstein R. Histone acetyltransferases: Rising ancient counterparts to protein kinases. *Biopolymers*. 2013; 99(2): 98-111.

Zendjidjian X, Richieri R, Adida M, Limousin S, Gaubert N, Parola N, Lançon C, Boyer L. Quality of life among caregivers of individuals with affective disorders. *J Affect Disord*. 2012; 136(3): 660-665.

Zhang J, Zhong Q. Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71(20): 3885-3901.

Zhang W, Rajendran K, Ham J, Finik J, Buthmann J, Davey K, Pehme PM, Dana K, Pritchett A, Laws H, Nomura Y. Prenatal exposure to disaster-related traumatic stress and developmental trajectories of temperament in early childhood: Superstorm Sandy pregnancy study. *J Affect Disord*. 2018; 234: 335-345.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



CEUA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **27/03/2018**.

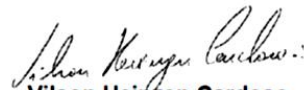
Título do projeto	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS E COMPORTAMENTAIS NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE PRÉ-NATAL: IMPLICAÇÕES PARA A FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR
Project title	ASSESSMENT OF EPIGENETIC AND BEHAVIORAL ALTERATIONS IN THE OFFSPRING OF FEMALE RATS SUBMITTED TO PRENATAL STRESS: IMPLICATIONS FOR THE BIPOLAR DISORDER PATHOPHYSIOLOGY
Número do protocolo Protocol number	014/2018-1 – Versão 02
Pesquisador principal Principal Investigator	Samira da Silva Valvassori
Pesquisadores Researchers	Abel Freitas Garcia, Daniela Vicente Bavaresco, Fernanda Frederico Gava, Gustavo Colombo Dal Pont, Helena Cristina Zuehl Dal-Toé, José Henrique Cararo da Silva, Roger Bittencourt Varela, Samira Menegas Pereira, Tamires Rosa Pacheco.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	19/04/2018 a 19/04/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Wistar
Nº de animais	540 masculino e 108 feminino = 648
Idade/Peso	60 dias / 250-300g
Gênero	Masculino e Feminino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma, 27 de março de 2018.



Vilson Heinzen Cardoso
Coordenador Adjunto da CEUA

ANEXO B – Adendos do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



CEUA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **31/07/2018**.

Título do projeto	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS E COMPORTAMENTAIS NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE PRÉ-NATAL: IMPLICAÇÕES PARA A FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR
Project title	ASSESSMENT OF EPIGENETIC AND BEHAVIORAL ALTERATIONS IN THE OFFSPRING OF FEMALE RATS SUBMITTED TO PRENATAL STRESS: IMPLICATIONS FOR THE BIPOLAR DISORDER PATHOPHYSIOLOGY
Número do protocolo Protocol number	014/2018-1 – Versão 03
Pesquisador principal Principal Investigator	SAMIRA DA SILVA VALVASSORI
Pesquisadores Researchers	Abel Freitas Garcia, Daniela Vicente Bavaresco, Fernanda Frederico Gava, Gustavo Colombo Dal Pont, Helena Cristina Zuehl Dal-Toé, José, Henrique Cararo da Silva, Roger Bittencourt Varela, Samira Menegas Pereira, Tamires Rosa Pacheco.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/08/2018 a 20/08/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico <i>Wistar</i>
No de animais	540 masculino e 648 feminino = 1188
Idade/Peso	60 dias / 250 a 300 g
Gênero	Masculino e Feminino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma, 31 de julho de 2018.



Vilson Heinzen Cardoso
Coordenador Adjunto do CEUA

CARTA-RESPOSTA – Parecer Aprovado

Página 1 de 1



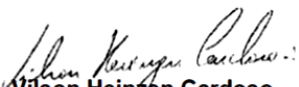
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **20/11/2018**.

Título do projeto	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS E COMPORTAMENTAIS NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE PRÉ-NATAL: IMPLICAÇÕES PARA A FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR.
Project title	ASSESSMENT OF EPIGENETIC AND BEHAVIORAL ALTERATIONS IN THE OFFSPRING OF FEMALE RATS SUBMITTED TO PRENATAL STRESS: IMPLICATIONS FOR THE BIPOLAR DISORDER PATHOPHYSIOLOGY
Número do protocolo Protocol number	014/2018-1– adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	Samira da Silva Valvassori
Pesquisadores Researchers	Abel Freitas Garcia, Daniela Vicente Bavaresco, Fernanda Frederico Gava, Gustavo Colombo Dal Pont, Helena Cristina Zuehl Dal-Toé, José Henrique Cararo da Silva, Roger Bittencourt Varela, Samira Menegas Pereira, Tamires Rosa Pacheco.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/12/2018 a 03/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
No de animais	540 Masculinos e 648 Femininos = 1188
Idade/Peso	60 dias / 250-300 g
Gênero	Masculino e Feminino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.
May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.


Wilson Heinzen Cardoso
Coordenador Adjunto da CEUA

Criciúma, 20 de novembro de 2018.



CEUA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

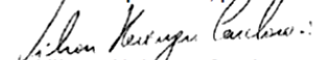
Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **07/05/2019**.

Título do projeto	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS E COMPORTAMENTAIS NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE PRÉ-NATAL: IMPLICAÇÕES PARA A FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR
Project title	ASSESSMENT OF EPIGENETIC AND BEHAVIORAL ALTERATIONS IN THE OFFSPRING OF FEMALE RATS SUBMITTED TO PRENATAL STRESS: IMPLICATIONS FOR THE BIPOLAR DISORDER PATHOPHYSIOLOGY
Número do protocolo Protocol number	014/2018-1 adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	Samira da Silva Valvassori
Pesquisadores Researchers	Roger Bitencourt Varela, Gustavo Colombo Dal Pont, Samira Menegas Pereira, José Henrique Cararo da Silva, Fernanda Frederico Gava, Luiz Felipe Andrade Quadros, Helena Cristina Zuehl Dal Toé, Beatriz Galatto Nesi, Tamires Rosa Pacheco, Jorge Machado de Aguiar Geraldo, Taise de Souza Possamai Della, Jefte Peper do Nascimento, Cauane Teixeira Presse, Amanda Hilsendeger Pereira de Oliveira, Natália Giasson Baticini, Leticia Hobold Kammer, Thiani Daminelli de Souza.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/05/2019 a 27/05/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/ Wistar
Idade/Peso	60 dias/250-300 g
Gênero	Feminino e masculino
Número de animais	Masculino 540 e Feminino 648 = 1188
Origem	Biotério Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.


Vilson Heinzen Cardoso
Coordenador Adjunto do CEUA

Criciúma, 07 de maio de 2019.



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **30/07/2019**.

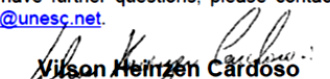
Título do projeto	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS E COMPORTAMENTAIS NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE PRÉ-NATAL: IMPLICAÇÕES PARA A FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR
Project title	ASSESSMENT OF EPIGENETIC AND BEHAVIORAL ALTERATIONS IN THE OFFSPRING OF FEMALE RATS SUBMITTED TO PRENATAL STRESS: IMPLICATIONS FOR THE BIPOLAR DISORDER PATHOPHYSIOLOGY
Número do protocolo Protocol number	014/2018-1
Pesquisador principal Principal Investigator	Samira da Silva Valvassori
Pesquisadores Researchers	Roger Bitencourt Varela, Gustavo Colombo Dal Pont, Samira Menegas Pereira, José Henrique Cararo da Silva, Fernanda Frederico Gava, Luiz Felipe Andrade Quadros, Helena Cristina Zuehl Dal Toé, Beatriz Galatto Nesi, Jorge Machado de Aguiar Geraldo, Taise de Souza Possamai Della, Jefte Peper do Nascimento, Amanda Hilsendeger Pereira de Oliveira, Leticia Hobold Kammer, Thiani Daminelli de Souza.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/08/2019 a 25/08/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	60 dias / 250-300 g
Número de animais / Gênero	540 / feminino e 662 / masculino = 1202
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	Neonatos / 5g
Número de animais / Gênero	70 / feminino e 70 / masculino = 140
Total	1342
Origem	Biotério 2 UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.


Wilson Heinzen Cardoso
Coordenador Adjunto do CEUA

Criciúma, 30 de julho de 2019



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **13/08/2019**.

Título do projeto	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS E COMPORTAMENTAIS NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE PRÉ-NATAL: IMPLICAÇÕES PARA A FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR
Project title	ASSESSMENT OF EPIGENETIC AND BEHAVIORAL ALTERATIONS IN THE OFFSPRING OF FEMALE RATS SUBMITTED TO PRENATAL STRESS: IMPLICATIONS FOR THE BIPOLAR DISORDER PATHOPHYSIOLOGY
Número do protocolo Protocol number	014/2018-1 e 40/2019/1 adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	Samira da Silva Valvassori
Pesquisadores Researchers	Roger Bitencourt Varela, Gustavo Colombo Dal Pont, Samira Menegas Pereira, José Henrique Cararo da Silva, Fernanda Frederico Gava, Luiz Felipe Andrade Quadros, Helena Cristina Zuehl Dal Toé, Beatriz Galatto Nesi, Jorge Machado de Aguiar Geraldo, Taise de Souza Possamai Della, Jefte Peper do Nascimento, Amanda Hilsendeger Pereira de Oliveira, Letícia Hobold Kammer, Thiani Daminelli de Souza.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/09/2019 a 02/09/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Idade/Peso	60 dias /250-300g
Número de animais / Gênero	664 / feminino e 540 / masculino = 1204
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Idade/Peso	Neonatos / 5 g
Número de animais / Gênero	80 / feminino e 80 / masculino = 160
TOTAL	1364
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma, 13 de Agosto de 2019.

Wilson Heinzen Cardoso
Coordenador Adjunto do CEUA

CARTA-RESPOSTA – Parecer Aprovado

Página 1 de 1



CERTIFICADO

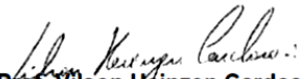
Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **24/09/2019**.

Título do projeto	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS E COMPORTAMENTAIS NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE PRÉ-NATAL: IMPLICAÇÕES PARA A FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR
Project title	ASSESSMENT OF EPIGENETIC AND BEHAVIORAL ALTERATIONS IN THE OFFSPRING OF FEMALE RATS SUBMITTED TO PRENATAL STRESS: IMPLICATIONS FOR THE BIPOLAR DISORDER PATHOPHYSIOLOGY
Número do protocolo Protocol number	014/2018-1 e 40/2019/1 adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	SAMIRA DA SILVA VALVASSORI
Pesquisadores Researchers	Roger Bitencourt Varela, Gustavo Colombo Dal Pont, Samira Menegas Pereira, José Henrique Cararo da Silva, Fernanda Frederico Gava, Luiz Felipe Andrade Quadros, Helena Cristina Zuehl Dal Toé, Beatriz Galatto Nesi, Jorge Machado de Aguiar Geraldo, Taise de Souza Possamai Della, Jefte Peper do Nascimento, Amanda Hilsendeger Pereira de Oliveira, Leticia Hobold Kammer, Thiani Daminelli de Souza, Maria Eduarda Magagnin Pessetti, Alice Ferreira Inácio, Jhoanne Merlyn Luiz .

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/09/2019 a 02/09/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Idade/Peso	60 dias / 250 a 300g
Número de animais / Gênero	664 / feminino e 540 / masculino = 1204
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Idade/Peso	neonatos / 5g
Número de animais / Gênero	80 / feminino e 80 / masculino = 160
total	1364
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.


Prof. Vilson Heinzen Cardoso
 Coordenador Adjunto da CEUA

Criciúma, 24 de setembro de 2019.



CERTIFICADO

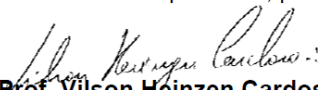
Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **08/10/2019**.

Título do projeto	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS E COMPORTAMENTAIS NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO ESTRESSE PRÉ-NATAL: IMPLICAÇÕES PARA A FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO BIPOLAR
Project title	ASSESSMENT OF EPIGENETIC AND BEHAVIORAL ALTERATIONS IN THE OFFSPRING OF FEMALE RATS SUBMITTED TO PRENATAL STRESS: IMPLICATIONS FOR THE BIPOLAR DISORDER PATHOPHYSIOLOGY
Número do protocolo Protocol number	14/2018-1 adendo 5
Pesquisador principal Principal Investigator	SAMIRA DA SILVA VALVASSORI
Pesquisadores Researchers	Roger Bitencourt Varela, Gustavo Colombo Dal Pont, Samira Menegas Pereira, José Henrique Cararo da Silva, Fernanda Frederico Gava, Luiz Felipe Andrade Quadros, Helena Cristina Zuehl Dal Toé, Beatriz Galatto Nesi, Jorge Machado de Aguiar Geraldo, Taise de Souza Possamai Della, Jefé Peper do Nascimento, Amanda Hilsendeger Pereira de Oliveira, Leticia Hobold Kammer, Thiani Daminelli de Souza, Maria Eduarda Magagnin Pessetti, Alice Ferreira Inácio, Jhoanne Merlyn Luiz, Bruna Souza Vargas.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/09/2019 a 02/09/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Idade/Peso	60 dias / 250 a 300g
Número de animais / Gênero	664 / feminino e 540 / masculino = 1204
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Idade/Peso	neonatos / 5g
Número de animais / Gênero	80 / feminino e 80 / masculino = 160
total	1364
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.


Prof. Wilson Heinzen Cardoso
Coordenador Adjunto da CEUA

Criciúma, 08 de outubro de 2019.