



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS DECORRENTES DA HIPÓXIA
ISQUÊMICA ENCEFÁLICA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR
NITRITO DE SÓDIO**

THIAGO DOS SANTOS BEZERRA

BRASÍLIA-DF
2017

THIAGO DOS SANTOS BEZERRA

**COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS DECORRENTES DA HIPÓXIA
ISQUÊMICA ENCEFÁLICA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR
NITRITO DE SÓDIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Orientadora: **Profa. Dra. Vania Maria Moraes Ferreira**

BRASÍLIA-DF

2017

BB574c BEZERRA, THIAGO DOS SANTOS
COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS DECORRENTES DA HIPÓXIA
ISQUÊMICA ENCEFÁLICA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR
NITRITO DE SÓDIO / THIAGO DOS SANTOS BEZERRA;
orientador VANIA MARIA MORAES FERREIRA. -- Brasília,
2017.
78 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências da
Saúde) -- Universidade de Brasília, 2017.

1. ANSIEDADE. 2. DEPRESSÃO. 3. HIPOCAMPO. 4.
HIPÓXIA ISQUÊMICA. 5. NITRITO DE SÓDIO. I. FERREIRA,
VANIA MARIA MORAES, orient. II. Título.

THIAGO DOS SANTOS BEZERRA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas em Saúde.

Aprovada em 04 de Abril de 2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vania Moraes Ferreira
(Presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Leonora Maciel de Souza Vianna
(Membro Titular Externo)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Letícia Martins Paiva
(Membro Titular Externo)
UniCEUB

Profa. Dra. Lilian Rosana Ferreira Faro
(Membro Suplente)
UVIGO

BRASÍLIA-DF

2017

Dedico esta Dissertação de Mestrado à minha família, especialmente aos meus pais que foram meus primeiros mestres, me ensinando os valores que trago comigo até hoje. Dedico também à minha esposa que sempre me apoiou neste projeto e me auxiliou das mais diversas formas e às minhas queridas filhas que são minha razão da busca contínua pela evolução pessoal.

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, por guiar meus passos e me dar coragem saúde e sabedoria;
- ✓ A minha querida esposa Mara, por toda paciência e pelo apoio que foi primordial para a elaboração deste trabalho.
- ✓ A minha Orientadora Profa. Dra Vânia Ferreira pela competência e pela oportunidade que me foi dada de aprimorar meus conhecimentos.
- ✓ A Dra. Leonora Vianna, pelo incansável apoio nas análises histológicas que tanto foi importante na fase final do trabalho. Agradeço também pela paciência e a tranquilidade de compartilhar conhecimentos.
- ✓ Ao Prof. Hugo Alves por toda ajuda e companheirismo neste projeto.
- ✓ Ao Laboratório de Patologia, em especial à Profa. Fabiana Pirani, que não limitou espaços físicos para que nossas pesquisas pudessem ser realizadas.
- ✓ Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, em especial ao corpo docente, que pelos novos conhecimentos acadêmicos e científicos adquiridos me permitiram galgar mais uma etapa de minha vida, que agora, por meio deste título de Mestre, consigo vencer obstáculos que me limitavam na vida profissional.

"A lógica mundana impele-nos para o sucesso, o domínio e o dinheiro. A lógica de Deus para a humildade, o serviço e o amor."

Papa Francisco

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Modelo esquemático das alterações provocadas pela isquemia | 18 |
| Figura 2 – Formação hipocampal na qual destacam-se o Corno de Amon com as sub-regiões CA1 a CA4 e o Giro Denteado..... | 28 |
| Figura 3 – Circuito trissináptico na região hipocampal e do córtex entorrinal de um rato..... | 31 |
| Figura 4 – Diagrama esquemático das conexões estabelecidas pelas regiões ventral e dorsal do hipocampo | 33 |
| Figura 5 – Campo aberto dividido em 9 quadrantes para avaliar atividade locomotora dos ratos | 38 |
| Figura 6 – Labirinto em Cruz Elevado utilizado para avaliar o comportamento de ansiedade/estresse dos ratos..... | 39 |
| Figura 7 - Aparato usado no teste de nado forçado para avaliação de comportamento sugestivo de depressão..... | 40 |
| Figura 8 – Fluxograma das principais etapas dos procedimentos experimentais | 41 |
| Figura 9 – Imagem histológica com a metodologia empregada para a seleção das áreas do cerebelo..... | 43 |
| Figura 10 – Imagens histológicas com a metodologia empregada para a seleção das áreas do hipocampo | 44 |
| Figura 11 – Imagens histológicas de um corte do cerebelo de ratas Wistar que sofreram hipóxia isquêmica induzida por nitrito de sódio (60 mg/Kg) | 45 |
| Figura 12 – Corte histológico do cerebelo de ratas Wistar com 4 meses de idade expostas à intoxicação por nitrito de sódio (60 mg/Kg)..... | 46 |

| | |
|--|----|
| Figura 13 – Box-Plot dos dados de contagem dos neurônios das áreas CA1, CA2, CA3 e CA4 do hipocampo no grupo controle nas quatro áreas segundo o tipo de neurônio..... | 51 |
| Figura 14 – Box-Plot dos dados de contagem dos neurônios das áreas CA1, CA2, CA3 e CA4 do hipocampo no grupo experimento nas quatro áreas segundo o tipo de neurônio..... | 51 |
| Figura 15 – Box-Plot dos dados do hipocampo, segundo grupo, área e tipo de neurônio..... | 54 |
| Figura 16 – Imagem histológica da área CA1 do hipocampo de um animal do grupo controle (A) e experimento (B)..... | 55 |
| Figura 17 – Imagem histológica da área CA2 do hipocampo de um animal do grupo controle (A) e experimento (B)..... | 55 |
| Figura 18 – Imagem histológica da área CA3 do hipocampo de um animal do grupo controle (A) e experimento (B)..... | 56 |
| Figura 19 – Imagem histológica da área CA4 do hipocampo de um animal do grupo controle (A) e experimento (B)..... | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Dados Comportamentais – Locomoção Espontânea, Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado pré hipóxia | 48 |
| Tabela 2 – Dados Comportamentais – Locomoção Espontânea, Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado pós hipóxia..... | 49 |
| Tabela 3 – Dados Bioquímicos de cortisol, glicose, colesterol e lactato dos grupos controle e experimental | 49 |
| Tabela 4 – Cerebelo: Neurônios sadios, lesionados e total, segundo o grupo (controle e experimental)..... | 50 |
| Tabela 5 – Número de neurônios lesionados e saudáveis nas diferentes áreas intragrupo - hipocampo..... | 52 |
| Tabela 6 – Número de neurônios lesionados e saudáveis nas diferentes áreas - hipocampo: áreas CA1, CA2, CA3 e CA4 | 53 |
| Tabela 7 – Número total de neurônios nas diferentes áreas - hipocampo: áreas CA1, CA2, CA3 e CA4..... | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------|--|
| ACTH..... | Homônio adrenocoticotrófico |
| ANOVA..... | Análise de Variância |
| ATP..... | Adenosina Trifosfato |
| BHE | Barreira Hemato-Encefálica |
| CA..... | Corno de Amon |
| CA1..... | Subregião 1 do Corno de Amon |
| CA2..... | Subregião 2 do Corno de Amon |
| CA3..... | Subregião 3 do Corno de Amon |
| CA4..... | Subregião 4 do Corno de Amon |
| CER 1..... | Cerebelo 1 |
| CER 2..... | Cerebelo 2 |
| CER 3..... | Cerebelo 3 |
| ERO..... | Espécies Reativas de Oxigênio – Radicais Livres |
| GC..... | Grupo Controle |
| GE..... | Grupo Experimental |
| HD..... | Hipocampo Dorsal |
| HE..... | Hematoxilina e Eosina |
| HPA..... | Hitotálamo-Pituitária (Hipófise) – Adrenal |
| HV..... | Hipocampo Ventral |
| LCE..... | Labirinto em Cruz Elevado |
| MetHb..... | MetaHemoglobulina |
| NaNO2..... | Nitrito de Sódio |
| SNC..... | Sistema Nervoso Central |
| UVA..... | Ultravioleta A |
| VP..... | Via Perfurante |

RESUMO

Introdução: A hipóxia isquêmica cerebral pode produzir severas lesões neurológicas, levando aos transtornos comportamentais que podem ter impacto negativo na recuperação do indivíduo e, por vezes, repercutindo negativamente na sua qualidade de vida. Esta pesquisa procurou analisar as alterações histológicas hipocampais e cerebelares provocadas pela hipóxia isquêmica encefálica induzida experimentalmente por nitrito de sódio e possíveis repercussões diretas sobre o comportamento. **Metodologia:** Foi realizado um estudo experimental por meio da administração de 60mg/Kg de Nitrito de Sódio em 10 ratas Wistar, com 3 meses de idade, durante 15 dias consecutivos. Dez ratas, que não sofreram hipóxia, serviram como controle. A fim de verificar repercussões comportamentais, avaliou-se os animais, pré e pós lesão no Campo aberto, Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado, testes que avaliam locomoção, ansiedade e depressão, respectivamente. Os marcadores dos níveis de estresse foram avaliados por meio da verificação dos níveis sanguíneos de cortisol, glicose, colesterol e lactato. As lesões hipocampais foram verificadas por meio de estudo histológico das áreas CA1 a CA4. Cortes do cerebelo também foram avaliados, uma vez que as células de Purkinje são altamente sensíveis a hipóxia isquêmica e serviriam como marcadores deste processo. **Resultados:** O número de neurônios com lesão foi significativamente maior nos animais expostos ao Nitrito de Sódio nas áreas CA2, CA3 e CA4 do hipocampo, refletindo, de forma negativa, nos parâmetros de avaliação nos testes de ansiedade e depressão. **Conclusão:** Foi possível verificar que o Nitrito de Sódio promoveu lesão encefálica por hipóxia isquêmica em ratos, sendo que os animais que sofreram intoxicação apresentaram diminuição do peso do encéfalo, lesões nas regiões CA2, CA3 e CA4 do hipocampo e comportamento ansiogênico e depressivo.

Palavras-chave: **Ansiedade, Cerebelo, Depressão, Hipocampo, Hipóxia isquêmica, Nitrito de sódio.**

ABSTRACT

Introduction: Brain ischaemic hypoxia can produce severe neurological damage that leads to behavioural disorders, which may negatively impact the individual's recovery and, sometimes, their quality of life. This research analysed the hippocampal and cerebellar histological alterations caused by brain ischaemic hypoxia experimentally induced by sodium nitrite (NaNO₂) and possible direct repercussions of this hypoxia on behaviour. **Methodology:** An experimental study was carried out by administering 60 mg/kg NaNO₂ to 10 Wistar rats at 3 months of age for 15 consecutive days. Ten control rats did not receive NaNO₂. To assess behavioural repercussions, the animals were evaluated in Open Field, Elevated Plus-Maze (EPM), and Forced Swim tests before and after injury to evaluate locomotion, anxiety like behavioural, and depression like behavioural, respectively. Markers of stress were evaluated by measuring the blood levels of cortisol and glucose. The presence of hippocampal lesions was verified by histologically studying the CA1 to CA4 areas. Sections of the cerebellum were also evaluated because Purkinje cells are highly sensitive to ischaemic hypoxia and may serve as markers for this process. **Results:** The number of neurons with lesions was significantly higher in animals exposed to NaNO₂ in the hippocampus areas CA2, CA3, and CA4, and this number is correlated with the parameters of the anxiety and depression tests. **Conclusion:** NaNO₂ promoted brain damage due to ischaemic hypoxia in rats. Intoxicated animals showed decreased brain weights; damage in hippocampus regions CA2, CA3, and CA4; and anxiogenic and depressive behaviour. In addition, the cerebellum was very vulnerable to hypoxia, presenting extensive lesion areas

Keywords: Anxiety, Cerebellum, Depression, Hippocampus, Ischaemic hypoxia, Sodium nitrite.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA | 17 |
| 1.2 MODELO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA | 19 |
| 1.2.1 Nitrito de sódio | 19 |
| 1.2.2 Efeitos da Intoxicação por Nitrito de Sódio | 20 |
| 1.3 ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DA HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA | 22 |
| 1.3.1 Aspectos Bioquímicos | 22 |
| 1.3.1.1 Estresse | 22 |
| 1.3.2 Aspectos Comportamentais (ansiedade e depressão) | 25 |
| 1.4 FORMAÇÃO HIPOCAMPAL | 27 |
| 1.4.1 Anatomia e histologia | 27 |
| 1.4.2 Principais conexões do hipocampo | 29 |
| 1.4.3 Aspectos fisiológicos gerais | 31 |
| 1.1.4 Lesões Hipocampais: etiologia e repercussões..... | 34 |
| | |
| 2 OBJETIVOS | 36 |
| 2.1 GERAIS | 36 |
| 2.2 ESPECÍFICOS..... | 36 |
| | |
| 3 METODOLOGIA | 37 |
| 3.1 AMOSTRA | 37 |
| 3.2 EXPOSIÇÃO AO NITRITO DE SÓDIO | 37 |
| 3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS..... | 37 |
| 3.4 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS E COGNITIVAS..... | 38 |
| 3.4.1 Atividade locomotora espontânea | 38 |
| 3.4.2 Labirinto Em Cruz Elevado (LCE) | 38 |
| 3.4.3 Teste Do Nado Forçado | 39 |
| 3.5 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS | 40 |
| 3.6 AVALIAÇÕES SANGUÍNEAS | 41 |
| 3.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA..... | 42 |
| 3.8 METODOLOGIA PARA A CONTAGEM DOS NEURÔNIOS | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 3.9 MORFOMETRIA HISTOLÓGICA | 45 |
| 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 46 |
| 4 RESULTADOS | 48 |
| 5 DISCUSSÃO | 57 |
| 6 CONCLUSÕES | 67 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |
| ANEXO | 79 |

1 INTRODUÇÃO

Isquemia encefálica representa a terceira causa de morte e a principal etiologia de incapacidades no mundo (BAKY et al., 2010; GABRYEL et al., 2014). Todos os anos, aproximadamente 10 milhões de pessoas sobrevivem às lesões neurológicas relacionadas à hipóxia isquêmica cerebral (DOYLE et al., 2015). É caracterizada pela diminuição do aporte sanguíneo rico em oxigênio e glicose para o encéfalo, sendo um fator predisponente para a ocorrência de infarto cerebral (RAGLIO et al., 2015).

As pessoas que sobrevivem aos primeiros estágios do infarto cerebral podem sofrer com sequelas decorrentes do comprometimento neurológico. Isto está associado com alta incidência de déficits das funções sensório-motores e também de habilidades cognitivas (LI et al., 2013; ZHOU et al., 2013). Mais relevante é o fato de que as pessoas que sobrevivem ao quadro de hipóxia cerebral têm o dobro de chance de desenvolver alterações cognitivo-comportamentais relacionadas à ansiedade e ao comportamento sugestivo de depressão, quando comparadas aos indivíduos que nunca sofreram tal condição (DOYLE et al., 2015).

O Nitrito de sódio (NaNO_2) é um sal inorgânico utilizado na fabricação de corantes e tratamento de produtos têxteis (GONCHAR; MANKOVSKAYA; KLYUCHKO 2006). Ao atingir a corrente sanguínea, ele é altamente reativo com a hemoglobina e induz a formação de metahemoglobina (MetHb), e pode reduzir a capacidade da hemoglobina em transportar o oxigênio. (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; GLUHCHEVAA et al., 2012; KOHN et al., 2002). Outro efeito é induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são altamente lesivas às células neuronais (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; DELLAVALLE et al., 2013; GLUHCHEVAA et al., 2012).

Como o Sistema Nervoso Central (SNC) é particularmente suscetível aos efeitos tanto da hipóxia quanto dos radicais livres, a intoxicação por NaNO_2 pode provocar extenso dano neuronal em várias áreas do cérebro (BAKY et al., 2010; KOHN et al., 2002). De acordo com as áreas lesionadas repercussões

comportamentais podem surgir, como ansiedade e depressão (YUDOFISKY, 2006).

O hipocampo é uma das estruturas cerebrais que compõe o sistema límbico, que age no controle de várias funções comportamentais e cognitivas. Por ser facilmente identificável, torna-se o elemento de escolha para muitos estudos envolvendo análises histológicas (EL FALOUGY; BENUSKA, 2006; SCORZA et al., 2005). Fisiologicamente, a formação hipocampal apresenta duas áreas distintas, o hipocampo dorsal, representado pela área do Corno de Amon 1 (CA1); e o hipocampo ventral, representada por CA3 e giro denteado. À região dorsal são atribuídas as funções de aprendizagem e memória, enquanto a parte ventral regula o estresse, emoção, afeto e intermedia reações de ansiedade e de depressão (ENGIN et al., 2016; FANSELOW; DONG, 2010; GRIGORYAN; SEGAL, 2016; LI et al., 2014; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015).

As estruturas da formação hipocampal podem ser afetadas por diversas formas diferentes de doenças e disfunções, bem como pelo processo fisiológico de envelhecimento (BOBINSKI, 1999; DEVI; SATPATI, 2017; MUELLER; WEINER, 2009; SMALL et al., 2011). Embora a etiologia das lesões do hipocampo possa ser bem diversa, o estresse crônico (ONO; KOIZUMI; ONOZUKA, 2015) e a hipóxia isquêmica encefálica (HUANG et al., 2015) parecem induzir mudanças em propriedades elétricas neuronais no hipocampo, de forma a prejudicar a memória e também influenciar comportamento ansiogênico (ONO; KOIZUMI; ONOZUKA, 2015). O cerebelo também é uma região muito sensível a diminuição da oferta de oxigênio, isto porque, em sua região cortical predomina substância cinzenta, especialmente representada pelas células de Purkinje (BARKHUIZEN et al., 2017).

Atualmente, muitas pesquisas vêm dando atenção diferenciada aos estudos voltados para detalhar com maior precisão os danos produzidos pela hipóxia, de forma independente do comportamento do sujeito investigado. Dessa maneira, muitos pesquisadores acabam deixando passar despercidos detalhes em informações cruciais para analisar o que, de fato, poderia estar refletindo de forma integrada comportamento x danos produzidos pela hipóxia.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo principal analisar as possíveis alterações comportamentais decorrentes das modificações histológicas hipocámpais e cerebelares, provocadas pela hipóxia isquêmica encefálica induzida experimentalmente por NaNO₂, em ratas.

1.1 HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA

Os eventos decorrentes da hipóxia isquêmica são representados pelo desencadeamento de uma cascata de reações bioquímicas que se mantém até o reestabelecimento do correto fluxo sanguíneo. Portanto, a sua severidade poderá ser determinada ou influenciada pelo tempo de duração da hipóxia. Mais detalhadamente, com a queda dos valores de oxigênio e glicose, o metabolismo aeróbico, necessário para a sobrevivência celular, desloca-se para a glicólise anaeróbica. No entanto, este último processo é ineficiente para gerar a energia para manter os gradientes iônicos e os processos metabólicos celulares neuronais em níveis aceitáveis (VANNUCCI, 1990).

O déficit no aporte sanguíneo gera como consequência a hipóxia, promovendo alterações de nutrição e oxigenação dos tecidos encefálicos (CHOI et al., 2008). Uma vez que o metabolismo aeróbico é fundamental para execução adequada das funções metabólicas neuronais, a diminuição acentuada ou ausência de oxigênio e glicose desencadeará uma série de eventos que poderão terminar por promover sofrimento e até morte neuronal (GABRYEL et al., 2014).

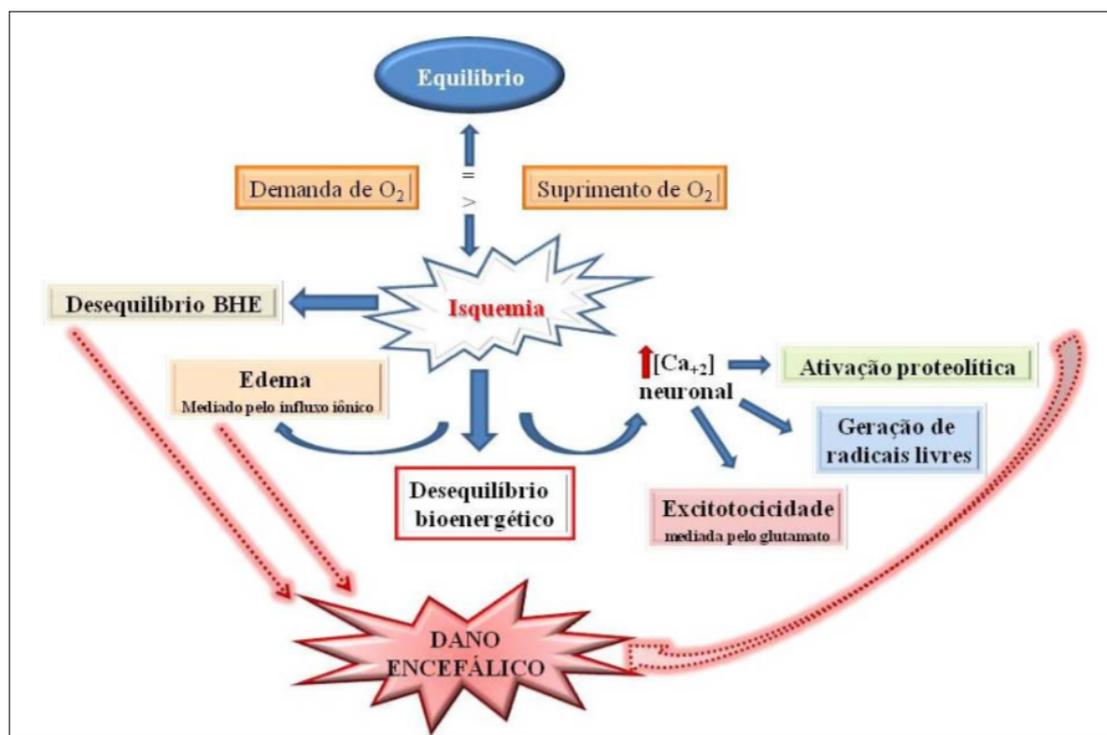


Figura 1 - Modelo esquemático das alterações provocadas pela isquemia que terminam por desencadear o dano encefálico (Fonte: MUZITANO; RODRIGUES, 2012).

A Figura 1, mostrada previamente, apresenta um modelo esquemático da patogênese da hipóxia encefálica, que pode estar associada com o tempo de duração da lesão e com uma cascata de eventos moleculares. O principal conjunto de alterações metabólicas provocadas pela hipóxia, descritas na literatura são: esgotamento rápido intracelular de adenosina trifosfato (ATP), mudança do metabolismo aeróbico para anaeróbico (glicólise anaeróbia), disfunção mitocondrial, formação de ERO, alteração do equilíbrio ácido-base, inibição de neurotransmissores excitatórios e ativação de enzimas estimuladas por cálcio (BAKY et al., 2010; MAITI; SINGH; ILAVAZHAGAN, 2008; VANNUCCI, 1990).

Uma característica importante que pode ser observada é que após a lesão isquêmica, a morte celular neuronal primária forma o núcleo isquêmico e, em seguida, pode ocorrer uma lesão neuronal secundária, chamada morte neuronal retardada, que atinge as regiões vizinhas ao núcleo (LEE et al., 2014).

Esta progressão da lesão encefálica que ocorre horas após o início do evento lesivo tem forte ligação com a formação de ERO, uma vez que estes

radicais livres terão a capacidade de dar continuidade ao processo de lesão neuronal (BAKY et al., 2010). Particularmente, a morte de neurônios é proeminente em áreas cerebrais consideradas sensíveis, tais como o hipocampo e corpo estriado (LEE et al., 2014).

A morte neuronal, propriamente dita, é causada pela interação de processos complexos, excitotoxicidade, despolarização, inflamação, autofagia e apoptose. A apoptose destaca-se como uma das principais vias que conduzem à morte das células na lesão de isquemia cerebral e quando atinge o hipocampo, por exemplo, é um dos principais agentes promotores de alterações de memória (BAKY et al., 2010; CERBAI et al., 2012; LEE et al., 2014).

Como consequência destes processos, muitos pacientes com lesão encefálica apresentam alterações comportamentais, tais como transtornos de humor, síndromes depressivas e perdas de memória, com taxa de prevalência variando entre 20 a 50% dos casos (RAGLIO et al., 2015). O transtorno comportamental pode ter impacto negativo na recuperação do indivíduo que sofreu lesão encefálica por hipóxia isquêmica, influenciando, sobretudo, em sua qualidade de vida e, por vezes, repercutindo negativamente na evolução clínica desses pacientes (CHOI et al., 2008).

Um dos modelos experimentais aplicado em animais, e que pode ser utilizado para simular os eventos e os efeitos da hipóxia cerebral em humano, é a administração de NaNO₂ em dose elevada. Este reduzirá a capacidade da hemoglobina em carregar o oxigênio e, desta forma, promoverá um quadro de hipóxia isquêmica global (BAKY et al., 2010).

1.2 MODELO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA

1.2.1 Nitrito de Sódio

Medicinalmente, o NaNO₂ pode ser utilizado como um vasodilatador, broncodilatador e como antídoto para o envenenamento por cianeto (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; GLUHCHEVAA et al., 2012). Apresenta tanto efeitos saudáveis quanto nocivos, uma vez que induz a formação de metahemoglobina

(MetHb) e pode provocar um tipo de hipóxia anêmica em humanos e também em animais experimentais, como os ratos (GLUHCHEVAA et al., 2012). Ele é amplamente aplicado como agrotóxico na agricultura contemporânea, e é utilizado na fabricação de compostos nitrosos e produtos químicos de borracha (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015). Outros usos comuns são em fertilizantes e pirotecnia (GLUHCHEVAA et al., 2012). Também é produzido a partir de nitrato, cuja a transformação se dá por bactérias existentes no trato gastrointestinal (KOHN et al., 2002).

A exposição humana ao nitrito tem aumentado acentuadamente nos últimos anos, por causa do uso extensivo de adubos nitrogenados na agricultura, devido eliminação inadequada dos resíduos domiciliares e industriais, assim como pela poluição (nitrogênio atmosférico) (GALLOWAY et al., 2003). Dessa forma, tal utilização indiscriminada representa importante papel na poluição ambiental (GONCHAR; MANKOVSKAYA; KLYUCHKO 2006).

O NaNO_2 é uma substância que tem contaminado os alimentos e a água potável. Alguns estudos demonstram que os índices de nitrato-nitrito têm aumentado de forma alarmante, muito além dos limites permitidos em algumas regiões dos Estados Unidos da América (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015).

1.2.2 Efeitos da Intoxicação por NaNO_2

O NaNO_2 quando atinge a corrente sanguínea é altamente reativo com a hemoglobina, afetando a hematopoiese, devido a hipoxemia. Assim, por apresentar esta afinidade tão grande com a hemoglobina, ele induz a formação de metahemoglobina, e pode provocar uma condição clínica conhecida como metahemoglobinemia, na qual há redução na capacidade da hemoglobina em transportar o oxigênio. A toxicidade do NaNO_2 , portanto, se torna uma das principais preocupações médicas voltadas para o paciente nessa condição (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; KOHN et al., 2002; GLUHCHEVAA et al., 2012).

A metahemoglobinemia gerada por doses elevadas de NaNO_2 é importante causador de liberação de ERO. Dessa forma o excesso de radicais livres no organismo é um dos mecanismos não específicos de danos celulares quem também pode ser causado por diversos poluentes químicos do meio ambiente e raios UVA (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; GLUHCHEVAA et al., 2012; GONCHAR; MANKOVSKAYA; KLYUCHKO, 2006).

De maneira mais detalhada, entende-se que os nitritos podem estimular a oxidação de íons ferrosos em oxi-hemoglobina para formar radicais MetHb e superóxido-ânions. Este subproduto será uma fonte de óxido nítrico, que reage rapidamente com superóxidos para formar peroxinitrito, que são altamente reativos. Os metabólitos de oxigênio reativo (ERO) podem iniciar uma grande variedade de reações oxidativas tóxicas (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; DELLAVALLE et al., 2013; GLUHCHEVAA et al., 2012).

Estes processos incluem a modificação oxidativa de proteínas, a inibição direta das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, a inativação da atividade dos transportadores de íons sódio e potássio na membrana, aumenta a peroxidação lipídica e distúrbios no sistema de defesa antioxidante (GONCHAR; MANKOVSKAYA; KLYUCHKO, 2006; OZEN et al., 2014).

E, ainda, o nitrito facilmente se transforma em compostos nitrificantes cancerígenos no ambiente ácido do intestino. Existe relação importante entre altos níveis de nitrito/nitrato e maior incidência de vários tipos de tumores em seres humanos (DELLAVALLE et al., 2013). Altas doses de NaNO_2 administradas em ratos, provocaram alterações degenerativas em vários tecidos (OZEN et al., 2014). Dessa forma, o nitrito foi assim classificado como citotóxico, mutagênico, teratogênico e embriotóxico (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; GONCHAR; MANKOVSKAYA; KLYUCHKO, 2006).

A hipóxia induzida por nitrito pode resultar em quadros de cianose. Além disso, pode até colocar o organismo em risco de morte ou até precipitar o aparecimento de outras doenças (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; GONCHAR; MANKOVSKAYA; KLYUCHKO, 2006; KOHN et al., 2002). As crianças são particularmente suscetíveis a este tipo intoxicação, causando as suas mortes, na

maioria dos casos assim como a exposição contínua a doses não-fatais de nitrito pode causar distúrbios fisiológicos do crescimento, desordens neurológicas, insuficiência respiratória e paralisia. As mulheres grávidas e pessoas anêmicas são também indivíduos propensos à toxicidade do nitrito (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015).

Entretanto, vale aqui o registro de que existe um efeito vasodilatador do NaNO_2 que pode ter benefício no tratamento da hipertensão pulmonar, vasoespasm cerebral pós-hemorrágico e pós infarto do miocárdio (GLUHCHEVAA et al., 2012) desde que administrado em doses terapêuticas.

Como o SNC é particularmente suscetível aos efeitos tanto da hipóxia, quanto dos radicais livres, a intoxicação por NaNO_2 pode ser especialmente danosa a este sistema, provocando o quadro de hipóxia isquêmica encefálica (BAKY et al., 2010; KOHN et al., 2002). É possível, que este quadro também cause alterações comportamentais e orgânicas relacionadas ao estresse que o organismo foi submetido, e que repercute com alterações de ansiedade e de depressão (YUDOFKY, 2006).

Portanto, o NaNO_2 pode ser aplicado experimentalmente para causar alterações na oxigenação sanguínea e, conseqüentemente, induzir estados de hipóxia anêmica, condição na qual haverá carência de oferta de oxigênio para vários órgãos e tecidos. Particularmente, o SNC poderá ser afetado por esta intoxicação, visto que, seu metabolismo aeróbico exige altos índices de suprimento vascular arterial (BAKY et al., 2010; KOHN et al., 2002).

1.3 ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DA HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA

1.3.1 Aspectos Bioquímicos:

1.3.1.1 Estresse

Organismos reagem ao estresse ativando respostas fisiológicas e comportamentais coordenadas, conhecidas como respostas ao estresse, que

protegem a homeostase do organismo e aumentam a sobrevivência da espécie em face aos estímulos ambientais (JOËLS; KRUGERS, 2007)

A lesão encefálica, assim como todas as repercussões decorrentes da intoxicação por NaNO₂, potencialmente pode agir como um mecanismo estressor para o organismo. Em reação a um estímulo estressor, o corpo deflagra sua resposta por meio da ativação do Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA). Em humanos, as principais moléculas responsáveis pela resposta ao estresse são a adrenalina e os glicocorticóides (ROTLLANT; TORT, 1997). O eixo HPA é composto por três estruturas principais: o núcleo paraventricular do hipotálamo, o lobo anterior da glândula pituitária, e a glândula supra-renal (KOOB, 2008).

Existem três fases principais da resposta ao estresse. A primeira fase envolve a produção de catecolaminas adrenalina e noradrenalina (GUEST et al., 2013). Essas moléculas são liberadas da medula adrenal, quase imediatamente na corrente sanguínea, via sistema nervoso autônomo e afetam diversas respostas no corpo. Por exemplo, a liberação de adrenalina e noradrenalina causa aumento na frequência de batimentos cardíacos e broncoilatação. Em adição, a secreção de insulina é inibida e a glicogenólise é estimulada nos músculos e fígado, levando a maior concentração de glicose na corrente sanguínea (DELAUNAY et al., 1997).

Secundariamente, após 20 minutos, o fator liberador de corticotrofina é liberado do núcleo paraventricular do hipotálamo no sistema portal e na eminência mediana do hipotálamo. Este, por sua vez, estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise anterior diretamente na corrente sanguínea. O ACTH atinge as glândulas adrenais, estimulando a liberação de glicocorticóides como o cortisol do córtex da adrenal. Também há a liberação de vasopressina pelos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular, que produz efeitos sinérgicos sobre a liberação de ACTH que são mediadas pela vasopressina (GUEST et al., 2013; KOOB, 2008; VAN RAALTE et al., 2009).

No terceiro estágio, os glicocorticóides produzem respostas que promovem aumento da gliconeogênese e lipólise, levando a maiores volumes de glicerol e ácidos graxos na corrente sanguínea (GUEST et al., 2013; VAN

RAALTE et al., 2009).

O eixo HPA é sintonizado via feedback negativo dos glicocorticóides circulantes que atuam em receptores de glicocorticóides, em duas áreas cerebrais principais: o núcleo paraventricular e o hipocampo. Os neurônios hipofisiotrópicos do núcleo paraventricular do hipotálamo são inervados por inúmeras projeções aferentes, incluindo a partir do tronco cerebral, outros núcleos do hipotálamo e estruturas límbicas do cérebro anterior (KOOB, 2008).

De forma mais ampla, pode-se entender que as respostas ao estresse dividem-se em três categorias: primária, secundária e terciária. As respostas primárias são as hormonais, as secundárias são mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos e as terciárias são o comprometimento no desempenho, mudanças no comportamento e aumento da suscetibilidade a doenças. O cortisol é considerado um bom indicador para avaliação de estresse primário. Os resultados dele podem ser facilmente comparados com outras espécies, uma vez que existe vasta literatura sobre este indicador (BRANDÃO; CARVALHO GOMES; CHAGAS, 2006). Um bom indicador para resposta secundária é a glicose do sangue ou plasma, com medidores de glicose de simples utilização e facilmente encontrados no mercado (BRANDÃO; CARVALHO GOMES; CHAGAS, 2006).

O cortisol ou hidrocortisona, é o principal corticóide produzido pelo córtex da supra-renal (10-20 mg diários), que está envolvido na resposta ao estresse, aumento da pressão arterial e da glicose do sangue (devido ao aumento de glucagon), além de suprimir o sistema imune. Após a síntese, o cortisol passa para a corrente sanguínea onde a maior parte (mais de 60%) encontra-se ligada a proteínas, incluindo a transcortina ou globulina ligante de cortisol e a albumina. O restante encontra-se livre no plasma, que é a forma ativa. A concentração sanguínea de cortisol não permanece constante durante todo o dia e sua meia vida é de 80-100 min, por isso a manutenção da concentração sérica depende da síntese constante. Adicionalmente, o cortisol também estimula a liberação de glucagon e, quando em concentração considerável, eleva os níveis plasmáticos de glicose, antagonizando as ações da insulina, por oposição de vias intracelulares (DELAUNAY et al., 1997).

Regiões específicas do cérebro parecem ser afetadas pelo estresse, tanto macroscópica quanto microscópicamente. Essas regiões incluem o hipocampo, a amígdala, o corpo caloso, o córtex cerebral, o cerebelo e o hipotálamo. Já que mudanças morfológicas nas regiões cerebrais acima relatadas têm sido ligadas a certos problemas psicológicos e comportamentais, é possível que o estresse afete o desenvolvimento neurológico dessas áreas. Isso, por sua vez, estaria relacionado a efeitos comportamentais, como aqueles vistos nas desordens psiquiátricas (GUEST et al., 2013).

O hipocampo é uma região importante envolvida com a regulação comportamental desempenhada pelo eixo HPA. Alterações no hipocampo acompanham a hiperatividade do eixo HPA em pessoas e em modelos animais que apresentam disfunções afetivas. O impacto da subregulação dos receptores para glicocorticoides no hipocampo é um fator crucial para a hiperatividade do eixo HPA (CHEN et al., 2015).

1.3.2 Aspectos Comportamentais (Ansiedade e Depressão)

A ansiedade pode ser definida como um estado de medo desenvolvido em antecipação a ameaças reais ou imaginárias, que promove a vigilância e facilita o comportamento evasivo. Propõe-se a distinção entre o traço e o estado de ansiedade, com o primeiro sendo uma característica emocional constante que pode se tornar patológico e o último sendo saudável, consequência momentânea de estímulos ansiogênicos. No entanto, o traço de ansiedade pode ser condicionado pela intensidade e frequência dos episódios de estados de ansiedade. Quando esses sentimentos são exagerados eles podem interromper o funcionamento da vida do indivíduo. Nessa situação, eles serão classificados como transtornos de ansiedade, o mais prevalente grupo de distúrbios na população americana (MEDEIROS et al., 2013; SADOCK; SADOCK, 2007).

Assim, os transtornos de ansiedade são caracterizados por presença de sentimento desproporcional de medo e de preocupação em resposta a estímulos ambientais ou internos (BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015; ENGIN et al., 2016), e representam uma das desordens mentais mais comuns na sociedade

contemporânea (AGETA et al., 2008).

A ansiedade, portanto, é um estado psicológico complexo, que pode até apresentar efeitos benéficos em algumas situações. Por exemplo, ela pode até ser considerada como resposta emocional normal e adequada ao estresse agudo, como, por exemplo, em situações em que haja ameaças a integridade física da pessoa. Porém, um modo de vida estressante pode levar a um comportamento ansiogênico patológico que acaba por perturbar as relações sociais e a saúde do indivíduo (ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015).

Quando elevada, a ansiedade passa a ser um estado fisiológico no qual ocorrerá reações exacerbadas e desproporcionalmente resposta a certas situações. Diferentes regiões do encéfalo, especialmente do sistema límbico, estão envolvidas na modulação da expressão do comportamento ansioso (BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015).

Dentre as regiões do sistema límbico que mantém estreita relação com o controle da ansiedade ou com o desenvolvimento de comportamento ansiogênico, destacam-se a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal (BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015). Mais detalhadamente, o giro denteado e a área CA3 do hipocampo, o complexo amigdalóide e a porção medial do córtex pré-frontal (ENGIN et al., 2016). Cada uma dessas regiões compõe a base de neurocircuito que modulam a ansiedade. Há vários mecanismos e neurotransmissores envolvidos na regulação da ansiedade. Porém, o sistema dopaminérgico parece ter um papel central no comportamento ansiogênico (ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015).

A depressão, por sua vez, é uma doença grave que, segundo a Organização Mundial de Saúde, é um dos maiores problemas de saúde do mundo. Trata-se da alteração grave do humor, que pode acompanhar ou aparecer em qualquer fase da vida (FERREIRA et al., 2016). Existe também uma dificuldade semântica de se conceituar a depressão, já que o termo é aplicado para designar um determinado sentimento ou sintoma; para especificar um complexo de sintomas; ou para designar uma entidade nosológica definida (BECK; ALFORD, 2011).

Existe forte relação, sobreposição e coincidência entre as características e mecanismos que ocorrem tanto na ansiedade quanto na depressão. De forma que, a depressão aparece como relato recorrente em indivíduos que sofrem de transtornos de ansiedade e o contrário também é observado (AGETA et al., 2008). Isso ocorre até mesmo porque as áreas corticais que são críticas para a fisiopatologia da depressão são praticamente as mesmas que controlam a ansiedade, destacando-se áreas do córtex pré-frontal, do sistema límbico e vias subcorticais. Inclusive, estruturalmente, a diminuição do volume hipocampal parece estar relacionada com episódios de depressão (BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015; BERNASCONI et al., 2015). Alterações semelhantes foram encontrados no giro cingulado anterior, amígdala e córtex pré-frontal (BERNASCONI et al., 2015).

Depressão e lesão encefálica são experiências partilhadas por muitos pacientes e, em geral, geradoras de dificuldades, especialmente para a qualidade de vida dos que as vivenciam, também para a efetivação da compreensão diagnóstica e, conseqüentemente, de propostas de tratamento e de reabilitação (YUDOFISKY, 2006).

1.4 FORMAÇÃO HIPOCAMPAL

1.4.1 Anatomia e Histologia

Os principais componentes do sistema límbico são o hipocampo, os giros parahipocampais, o giro denteado, o giro cingulado, o complexo amigdalóide, os núcleos anteriores do tálamo, o hipotálamo e o giro paraterminal. O hipocampo é uma das estruturas do sistema límbico que pode ser facilmente identificado, isto é, apresenta estrutura macroscópica e microscópica original e anatomicamente diferenciada, o que o torna elemento de escolha para os estudos e análises histológicas (EL FALOUGY; BENUSKA, 2006; SCORZA et al., 2005).

A formação hipocampal foi assim denominada por se assemelhar a um cavalo marinho (hipocampo, em grego) quando observada no assoalho do corno

inferior dos ventrículos laterais do encéfalo humano. Está localizada ventralmente e na porção profunda do lobo temporal. Esta formação complexa é composta por seis estruturas: o hipocampo propriamente dito, o giro denteado, o complexo subicular (subiculum propriamente dito, pré-subiculum e parasubiculum) e o córtex entorrinal (AGSTER; BURWELL, 2013; EL FALOUGY; BENUSKA, 2006).

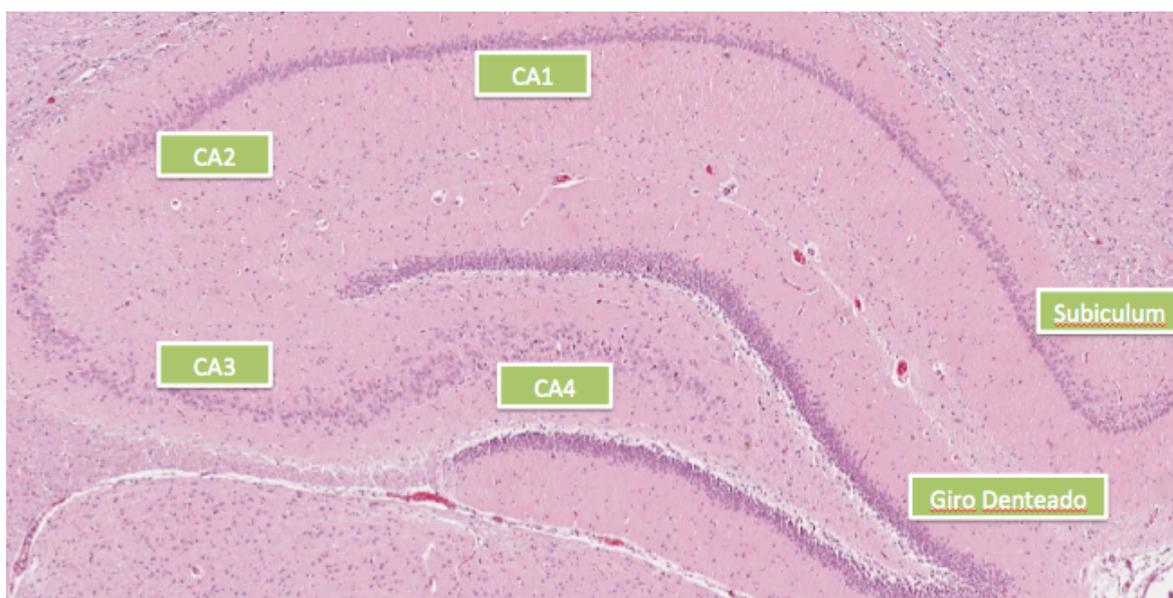


Figura 2 – Imagem histológica das principais áreas identificáveis da formação hipocampal de ratos Wistar. Destacam-se o Corno de Amon com suas regiões CA1 a CA4, o Subiculum e o Giro Denteado. Corno de Amon 1 a 4 (CA1; CA2; CA3; CA4) (Fonte: o autor).

Essa formação é composta por três camadas celulares (alocórtex) em forma de U, que se dobram uma sobre a outra, de forma que se destacam anatomicamente, o hipocampo propriamente dito e o giro denteado (Figura 2). O hipocampo propriamente dito, também é conhecido como Corno de Amon (CA) por sua forma lembrar o chifre de um carneiro presente na cabeça do Deus egípcio Amon (BOCCARA et al., 2015). É subdividido em 4 regiões, nomeadas de CA1 a CA4 (EL FALOUGY; BENUSKA, 2006; O'MARA et al., 2001). Já o giro dentado é dividido em três camadas: a camada molecular, a camada de células granulares e a camada polimórfica (BOCCARA et al., 2015; SCORZA et al., 2005).

A região CA1 é a continuação do natural do subiculum, sendo os corpos celulares de seus neurônios piramidais relativamente pequenos. Já CA2 é composta por neurônios grandes, ovóides e densamente agrupados. Enquanto

CA3 se estende ao longo da região curvada do Corno de Amon até penetrar na concavidade do giro denteado. Os corpos dos neurônios piramidais são semelhantes aos de CA2, mas a densidade é menor e, finalmente, CA4 está na concavidade do giro denteado. Os corpos neuronais são ovóides, grandes, pouco numerosos e espalhados entre as fibras musgosas e grandes fibras mielínicas características dessa região (BOCCARA et al., 2015; EL FALOUGY e BENUSKA, 2006; O`MARA et al., 2001)

O giro denteado, por sua vez, aparece como uma lâmina fina, com concavidade em direção dorsal (ou superior). A concavidade do giro denteado envolve o setor CA4 do hipocampo. O mesmo é separado dos setores CA1, CA2 e CA3 pelo sulco hipocampal, que desaparece durante o desenvolvimento, embora cavidades residuais possam persistir. Artérias e veias frequentemente seguem a rota original do sulco hipocampal, separando o Corno de Amon do giro denteado (AGSTER; BURWELL, 2013; DUVERNOY, 1988).

O fim do estrato radiado de CA1 é considerado o limite entre o hipocampo propriamente dito e o subículum. O subículum é subdividido em subregiões. 1 – pró-subículo, que é a continuidade de CA1; 2 – subículum propriamente dito, que pode parecer parcialmente encoberto pelo giro denteado; 3 – pré-subículum, caracterizado por pequenos neurônios piramidais superficiais agrupados; 4 – parasubículo, que contorna a margem do giro parahipocampal para a área entorrinal. Já a área do córtex entorrinal é mal delimitada. Aceita-se sua presença no uncus e região anterior do giro parahipocampal, porém a extensão da sua porção posterior é incerta (O`MARA et al., 2001).

1.4.2 Principais Conexões do Hipocampo

As conexões estabelecidas pelo hipocampo são extremamente complexas, ainda mal compreendidas e há numerosas discordâncias entre autores. Um dos conceitos mais difundidos é que os circuitos da formação hipocampal incluem a via trissináptica (SCORZA et al., 2005; WITTER et al., 2014). Pode-se entender a via trissináptica da seguinte forma, o giro dentado recebe a sua maior aferência do córtex entorrinal (via perfurante); e então, suas células granulares projetam

através das fibras musgosas para a região hilar e subcampo CA3. Das células piramidais de CA1 emergem colaterais axônicos que terminam em neurônios de CA3, que por sua vez, por meio de conexões de associação propiciam maior aferência para os neurônios piramidais de CA1 (SCORZA et al., 2005; WITTER et al., 2014).

De maneira mais detalhada, podemos explorar este intrincado circuito nervoso a partir do entendimento das principais vias e conexões aferentes e eferentes. As vias aferentes principais são formadas por conexões neuronais em cadeia, as quais incluem, sucessivamente, a área entorrinal, o giro denteado, os setores CA3 e CA1 do hipocampo e o subiculum (AMARAL; WITTER, 1989; BOBINSKI et al., 1999).

A zona entorrinal, é o principal ponto de recepção de informações de várias zonas corticais, particularmente de áreas de associação e de regiões subcorticais, dentre elas o tálamo e o núcleo amigdalóideo. E também o claustrum pode ser uma estrutura intermediária entre o neocórtex e a área entorrinal (AMARAL E WITTER, 1989; BOBINSKI et al., 1999). O córtex entorrinal manda dois tipos de fibras ao hipocampo, a via alvear e a via perfurante. A via alvear vem da parte medial da zona entorrinal e atinge a região do CA. Já a via perfurante é a principal aferência ao hipocampo, com fibras glutamérgicas excitatórias (BOCCARA et al., 2015).

A próxima conexão na via aferente provém do giro denteado. Os axônios dos neurônios granulosos, chamados fibras musgosas, são glutamérgicos. Atravessam a camada polimórfica e estimulam dendritos de neurônios localizados principalmente em CA3 e também CA4. Os axônios de CA3 e CA4, por sua vez, emitem colaterais (conhecidos como colaterais de Schaffer), que atingem os neurônios piramidais de CA1 (DUVERNOY, 1988).

A via principal de eferência do hipocampo tem origem neurônios de CA1, de CA3 e de CA4, elas convergem para a região dos alveus e depois na fímbria. Desta região as fibras dirigem-se pelo fórnix e atingem o núcleo talâmico anterior. Do tálamo, outras vias serão destinadas para o hipotálamo e para o córtex cerebral, particularmente para o giro do cíngulo (DUVERNOY,

1988). Portanto, a formação hipocampal é uma região cortical de organização tridimensional que realiza processamento de informações em seus eixos transversos e longitudinal (Figura 2) (AMARAL; WITTER, 1989).

Além das vias principais descritas também existem circuitos reguladores. Os internos têm como elemento básico interneurônios gabaérgicos inibidores, que formam terminações em cesto em torno dos neurônios piramidais do hipocampo e das células granulares do giro denteado. Estes neurônios em cesto são estimulados por colaterais dos próprios neurônios piramidais e, por sua vez, os inibem. Por fim, os externos, envolve estruturas extra hipocampais, particularmente os núcleos septais e o hipocampo contralateral (DUVERNOY, 1988).

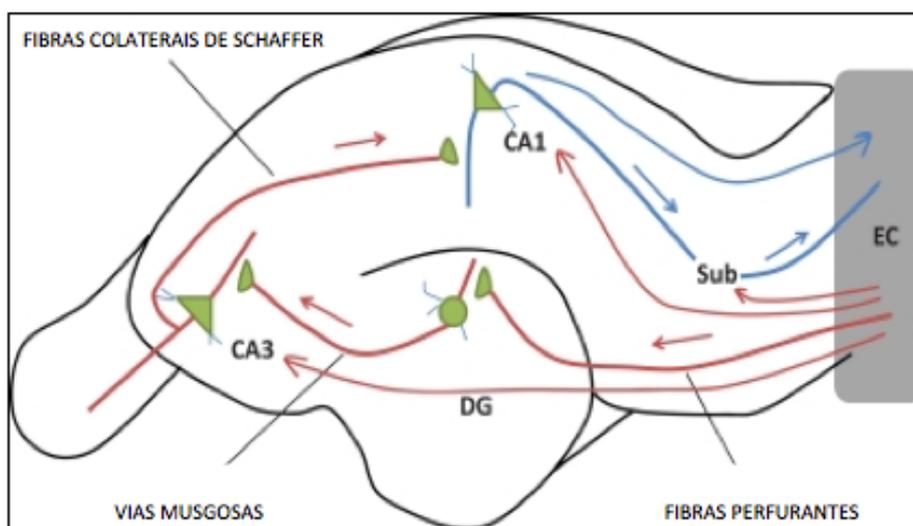


Figura 3 - A figura representa a via trissináptica na região hipocampal e do córtex entorrinal de um rato Wistar. Pode-se observar como estão dispostas as fibras musgosas e as colaterais de Schaffer. As fibras musgosas partem das células granulares do giro denteado e projetam seus axônios até a região CA3, onde se encontram com células piramidais. Na porção inferior do lado direito pode-se visualizar a via perfurante (VP), na porção superior pode-se ver as conexões estabelecidas com regiões do manto cortical (Fonte: ZHOU et al., 2013).

1.4.3 Aspectos Fisiológicos Gerais

As estruturas do sistema límbico, do córtex pré-frontal e as vias subcorticais são regiões mediadoras de vários aspectos do comportamento humano (BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015). A formação hipocampal é uma das regiões que compõe o sistema límbico, classicamente, as principais funções atribuídas a esta região foram relacionadas com a aprendizagem e a memória. Assim como há descrições do hipocampo influenciando em comportamentos relativos ao apetite e a saciedade. Contudo, ela também

participa do controle das emoções (DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2017; EL FALOUGY; BENUSKA, 2006).

Portanto, a região do hipocampal é importante nos processos de aprendizagem e memória, assim como para a afetividade e para a regulação do humor e de várias respostas comportamentais (SCHEIDT, 2015). O hipocampo, pode ser dividido, fisiologicamente, em região dorsal ou hipocampo dorsal (HD), representada por CA1; e região ventral ou hipocampo ventral (HV), representada por CA3 e giro denteado; é bem descrito na literatura que essas duas partes têm papéis funcionais distintos (ENGIN et al., 2016; GRIGORYAN; SEGAL, 2016).

À região dorsal são atribuídas as funções de aprendizagem e memória, enquanto a parte ventral regula o estresse, emoção e afeto e intermedia reações de ansiedade de depressão (ENGIN et al., 2016; FANSELOW; DONG, 2010; GRIGORYAN; SEGAL, 2016; LI et al., 2014; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015). O setor CA2, que é muito proeminente e distinto no hipocampo humano, tem papel obscuro, mas é provável que tenha funções importantes, tendo em vista sua alta celularidade e vascularização (DUVERNOY, 1988).

Os dois setores, HD e HV, estabelecem diferentes conexões, com outras estruturas do cérebro, assim como, cada qual apresenta diferentes receptores em sua constituição que realizam, por sua vez, diferentes funções. A Figura 4 apresenta as principais ligações funcionais que cada região estabelece. As diferentes conexões que o HV e o HD apresentam determinam sua distinção funcional. Fica claro que há conexões restritas ao HV, assim como ocorre com o HD. De forma que, tem sido sugerido que o HD desempenha um papel crucial nos processos de aprendizagem e memória espacial enquanto que o HV está envolvido na ansiedade, medo, comportamento defensivo, e respostas relacionadas ao estresse (GRIGORYAN; SEGAL, 2016).

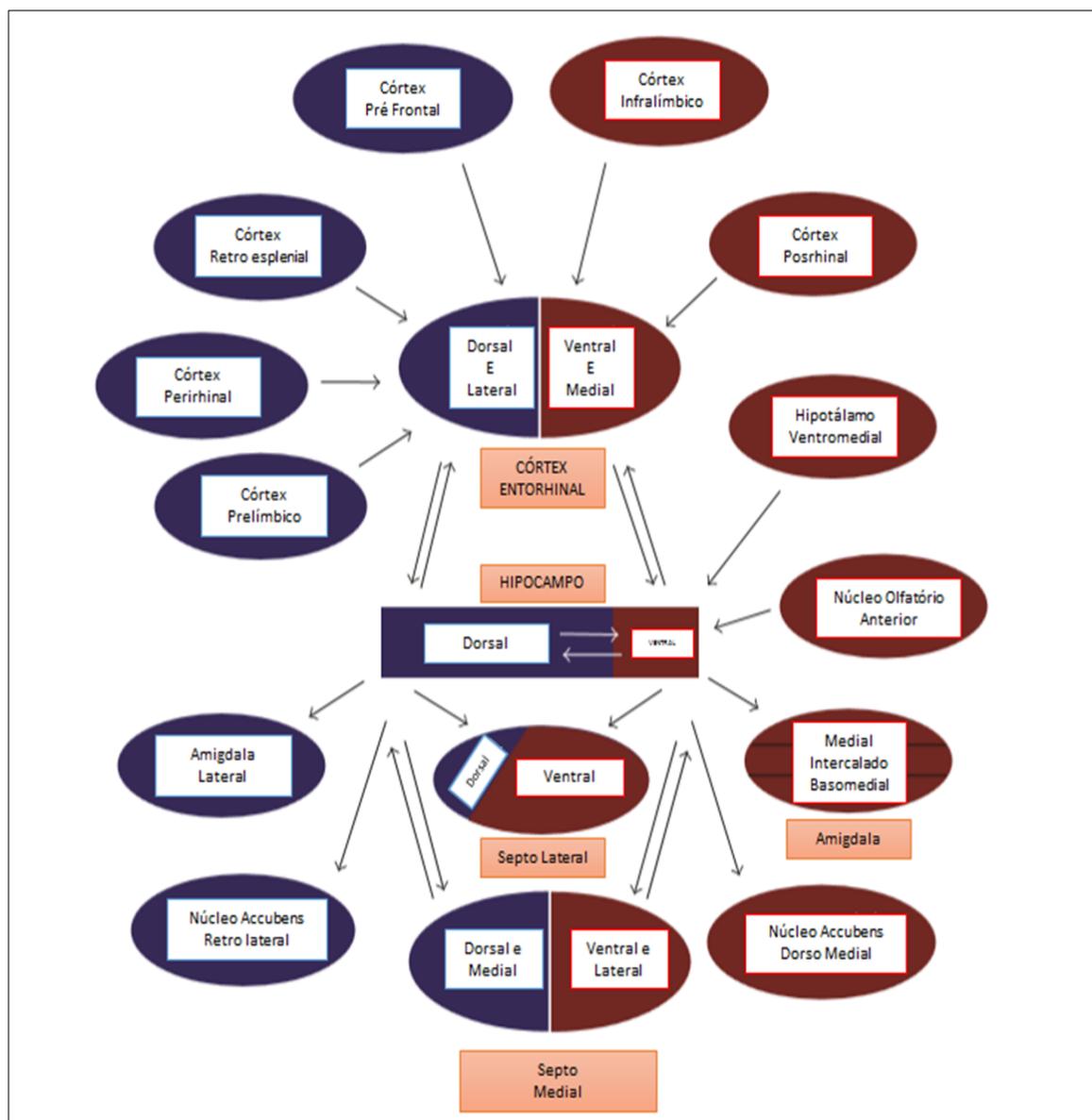


Figura 4 –Diagrama esquemático da maioria das conexões estabelecidas pelas regiões ventral e dorsal do hipocampo (Fonte: o autor, adaptada de Grigoryan; Segal, 2016).

Na amígdala, o HV se conecta à região medial, e o HD com a lateral. As projeções de áreas do giro cingulado, em especial as regiões infralímbicas, que estão envolvidas com regulação emocional, atingem principalmente o HV. Isso ocorre em ligação com a porção ventromedial do córtex entorrinal, enquanto o cingulado anterior e córtex retrosplenial envolvidas no processamento espacial, emite projeções principalmente para o HD, via segmentação dorsal e partes laterais do córtex entorrinal (GRIGORYAN; SEGAL, 2016).

As principais eferências do hipocampo serão direcionados ao septo medial e lateral. De forma que, o HD projeta à uma pequena porção dorsal do septo lateral e à porção medial do septo medial. Já o HV inerva a maior parte ventral do septo lateral e do medial (GRIGORYAN; SEGAL, 2016).

Desta forma, pode-se entender o hipocampo como uma região chave na mediação de respostas de estresse e ansiedade. Esta capacidade é possível devido a intrincadas conexões recíprocas estabelecidas com a amígdala e com o córtex pré-frontal (ONO; KOIZUMI; ONOZUKA, 2015). Mais profundamente, verifica-se que o hipocampo desempenha papel relevante na mediação da ansiedade e do medo, havendo, inclusive, áreas bem específicas e distintas responsáveis por respostas relacionadas a eles (ENGIN et al., 2016).

1.4.4 Lesões Hipocampais: Etiologia e Repercussões

As estruturas da formação hipocampal podem ser afetadas por diversas formas diferentes de doenças e disfunções, bem como pelo processo fisiológico de envelhecimento (BOBINSKI, 1999; DEVI; SATPATI, 2017; MUELLER; WEINER, 2009; SMALL et al., 2011). A atrofia hipocampal, por exemplo, tem sido relacionada a ocorrência de diversas doenças, sendo a mais expressiva a doença de Alzheimer. Mas também, pode aparecer, na esquizofrenia, na síndrome de estresse pós-traumático, na depressão e no transtorno bipolar, dentre outras (CZÉH et al., 2015).

Embora a etiologia das lesões do hipocampo possa ser bem diversa, o estresse crônico parece induzir mudanças em propriedades elétricas neuronais no hipocampo, de forma a prejudicar a memória e também influenciando em comportamento ansiogênico (ONO; KOIZUMI; ONOZUKA, 2015). Outra condição que pode afetar sobremaneira a função hipocampal é a hipóxia isquêmica encefálica (HUANG et al., 2015). As consequências da diminuição da oferta de oxigênio e glicose, decorrentes deste processo desencadeiam estresse metabólico celular, processo inflamatório local e pode levar até a morte celular (BARRETO et al., 2011).

O SNC é altamente sensível aos distúrbios de vascularização, como os que ocorrem na hipóxia, e algumas áreas encefálicas parecem ser ainda mais suscetíveis a este tipo de agressão. Este é o caso da formação hipocampal e das células de Purkinje do cerebelo, que são especialmente vulneráveis a lesão por hipóxia (HUANG et al., 2015). O hipocampo pode ser atingido por situações de hipóxia isquêmica encefálica, tanto agudas quanto crônicas (LEE et al., 2014; ZHANNING et al, 2016). E as consequências de tais lesões estarão relacionados com transtornos de memória e de comportamento (HUANG et al., 2015; ZHANNING et al, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar as alterações histológicas hipocampais e cerebelares e possíveis repercussões comportamentais provocadas pela hipóxia isquêmica encefálica induzida experimentalmente por NaNO₂.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da hipóxia encefálica promovida pelo NaNO₂ no comportamento de locomoção espontânea, ansiedade e depressão.
- Analisar variações biométricas relativas ao peso dos encéfalos dos animais com e sem hipóxia isquêmica encefálica.
- Investigar os possíveis efeitos bioquímicos estressores promovidos pela lesão encefálica por meio da análise dos níveis de cortisol, glicose, colesterol e lactato de ratos, após terem recebido o NaNO₂.
- Analisar os aspectos histológicos do hipocampo e do cerebelo nas condições experimentais previamente mencionadas.

3 METODOLOGIA

O estudo experimental foi realizado no Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília (UnB). Todos os procedimentos obedeceram aos critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, de acordo com o protocolo UnBDoc n° 67736/2014 (ANEXO).

3.1 AMOSTRA

Ratas Wistar (n=20), *Rattus norvegicus*, fêmeas, foram fornecidas pela Faculdade de Ciências da Saúde e Faculdade de Medicina. Os animais tinham 3 meses no início do experimento, pesando em média 200-250 gramas, e foram submetidas ao processo experimental por 1 mês. Os animais foram alojados em grupos de no máximo 5 ratos por gaiolas, mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração adequada para esses tipos de roedores, marca Purina® e água de torneira *ad libitum*. A amostra foi dividida em 2 grupos com 10 animais em cada. Sendo nomeados de Grupo Controle (GC), composto por animais que não receberam intervenção para indução de hipóxia e Grupo Experimental (GE), com animais que sofreram a hipóxia isquêmica encefálica induzida por NaNO₂.

3.2 EXPOSIÇÃO AO NANO₂

A indução da hipóxia foi realizada com a aplicação de NaNO₂, com o objetivo de reduzir a capacidade do oxigênio de ser carregado para o sangue, pela mudança normal da hemoglobina em metahemoglobina. Ele foi administrado por via intraperitoneal, na dose de 60 mg/Kg, administrada aos 3 meses de idade, durante 15 dias consecutivos (BAKY et al., 2010). Animais na mesma idade, que não receberam a injeção de NaNO₂, serviram de controles para as nossas investigações.

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Durante os experimentos foram realizados testes comportamentais e coletados dados biométricos, amostras bioquímicas e histológicas. Os testes comportamentais foram realizados em dois momentos, tanto para o GC quanto para o GE: o primeiro quando os animais tinham 3 meses de idade e repetidos

após um mês (segundo momento) quando os animais que pertenciam ao GE já haviam sofrido a hipóxia isquêmica encefálica. Ao final dos experimentos comportamentais, foram coletados os encéfalos e as amostras sanguíneas para avaliações bioquímicas e histológicas.

3.4 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Atividade Locomotora Espontânea

Para este teste, foi utilizada uma arena em madeira (60x60x35 cm), onde o chão encontrava-se dividido em 9 quadrantes de 20x20 cm. Cada animal era posicionado inicialmente no quadrante central da arena, sendo considerada atividade locomotora quando ele colocava as quatro patas em um novo quadrante. A atividade locomotora foi mensurada durante 5 min, de acordo com o número de quadrantes percorridos pelo animal (ENGIN, 2016).

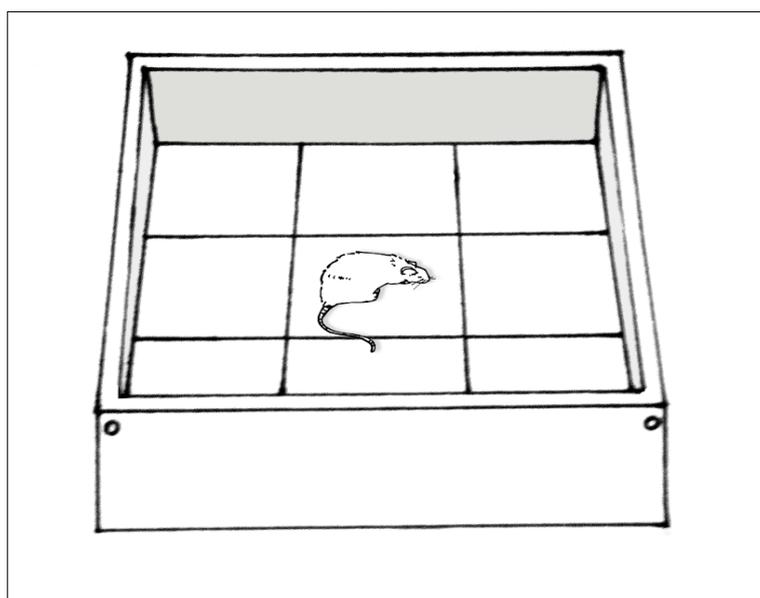


Figura 5 – Arena para teste do Campo aberto dividida em 9 quadrantes para avaliar a atividade locomotora dos ratos. O animal era posicionado no centro da arena para posteriormente explorá-la por 5 minutos.

3.4.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Este é um teste validado para se investigar ansiedade, no que concerne efeito ansiolítico ou ansiogênico (ENGIN, 2016). O LCE é um equipamento em madeira, na forma de cruz, elevado 50 cm do chão, com dois braços fechados (50x10x40 cm) e dois abertos (50x10 cm), opostos entre si (HANDLEY; MITHANI,

1984). Uma proteção de acrílico transparente de 1 cm de altura, circundava os braços abertos para impedir a queda dos animais do LCE. O animal foi colocado no centro do labirinto, individualmente, com a face voltada para um dos braços fechados sendo, em seguida, avaliado o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados durante cinco minutos. Cada entrada foi computada quando o animal deslocava com as quatro patas para a direção de um dos braços, o efeito ansiogênico era caracterizado por uma frequência ou tempo de permanência aumentada nos braços fechados, enquanto o efeito ansiolítico é caracterizado pela frequência ou tempo de permanência maior nos braços abertos (PELLOW et al., 1985; SCHEIDT, 2015). Após a avaliação de cada animal na arena e no LCE os aparatos eram limpos com álcool 10%, com o objetivo de minimizar o odor do rato previamente testado.

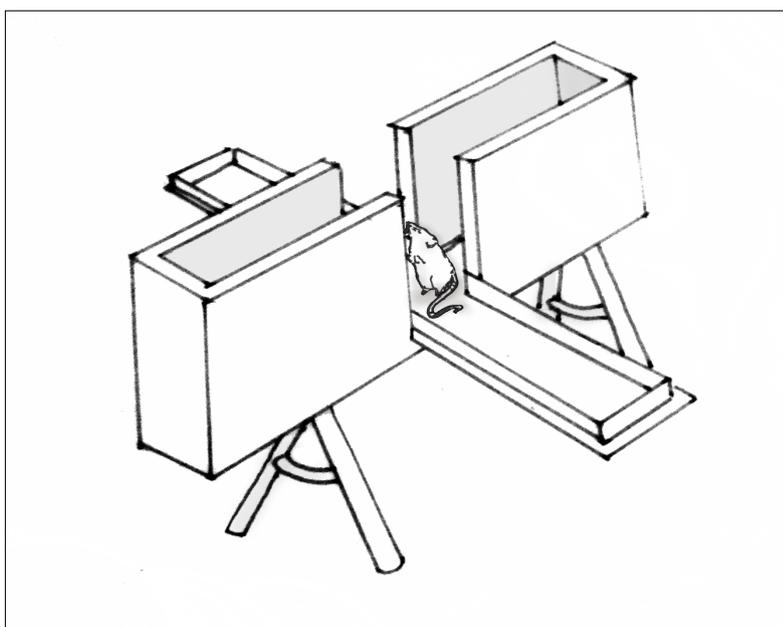


Figura 6– Teste do Labirinto em Cruz Elevado utilizado para avaliar o comportamento de ansiedade/estresse dos ratos. O primeiro passo era colocar o animal no centro do labirinto para poder escolher percorrer pelos braços abertos ou fechados durante um período de 5 minutos.

3.4.3 Teste do Nado Forçado

Este teste busca por evidências de comportamento sugestivo de depressão (DEEP et al., 2016). O aumento do tempo de imobilidade é um sinal típico de comportamento depressivo (CHEN et al., 2015; ONO; KOIZUMI; ONOZUKA, 2015). Os animais foram colocados em um cilindro Plexiglass, com 50 cm de

água à temperatura de aproximadamente $22 \pm 1^\circ\text{C}$, onde seus comportamentos foram observados durante cinco minutos (O'CONNOR et al., 2009). Eles podiam exibir dois tipos de comportamentos em um tempo de cinco minutos: fuga, normalmente verificada nos dois primeiros minutos, tempo necessário para habituação ao teste; imobilidade, nos três últimos minutos restantes, quando o animal permanecia flutuando, com somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água. Após este período os animais foram retirados da água, secos com uma toalha e devolvidos para suas gaiolas (ONO; KOIZUMI; ONOZUKA, 2015; PORSOLT et al., 1977).

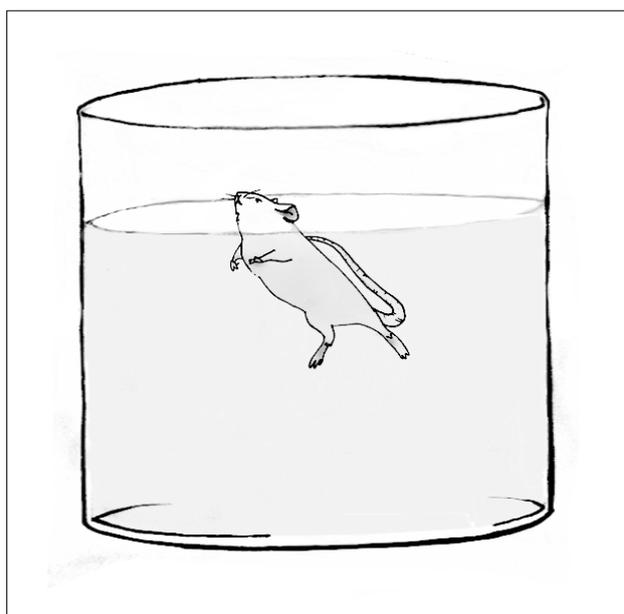


Figura 7 -Teste do Nado forçado, onde os animais permaneciam dentro do tanque por um tempo total de 5 min, onde os 2 primeiros minutos eram para habituação.

Todos os experimentos foram conduzidos entre 8:00 e 12:00 horas, com o objetivo de evitar as variações circadianas que poderiam interferir com os resultados experimentais. Os testes foram considerados cegos, pois foram realizados por avaliador previamente treinado, que desconhecia a que grupo pertencia o animal.

3.5 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Ao final das análises comportamentais, os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg) + xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal, e tiveram as

amostras sanguíneas coletadas por punção cardíaca e, em seguida, eles foram decapitados em guilhotina. Em seguida, foi realizada a craniotomia para a remoção do encéfalo. Com a ajuda de uma pinça, os ossos parietais foram afastados a partir da sutura sagital e o encéfalo foi então removido utilizando-se uma espátula curva. Este procedimento não ultrapassou 3 minutos para que o mesmo não sofresse hipóxia/isquemia indesejada.

As principais etapas do experimento são apresentadas na Figura 8, mostrando, de maneira esquemática, os procedimentos comportamentais, a coleta de amostras biológicas sanguíneas até a coleta do encéfalo dos animais.

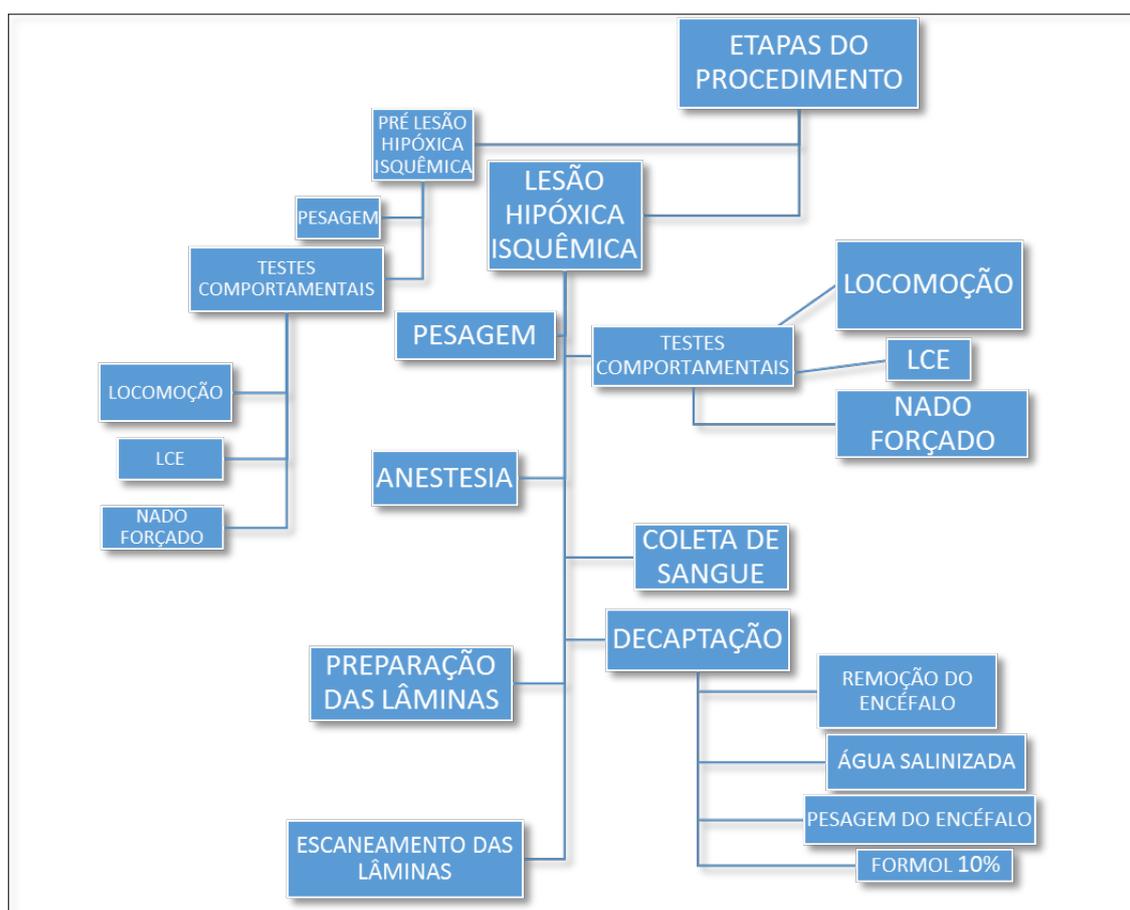


Figura 8 – Fluxograma que integra as principais etapas do experimento, desde o momento pré hipóxia até a preparação das lâminas histológicas. (Fonte: o autor)

3.6 AVALIAÇÕES SANGUÍNEAS

As amostras sanguíneas foram coletadas por punção cardíaca e o sangue alocado em tubos de exames específicos para o teste fim, previamente

identificados e encaminhados para laboratório especializado. Posteriormente, o conteúdo sanguíneo foi centrifugado, e especificamente o plasma sanguíneo foi processado e analisado com técnicas e kits específicos para as dosagens de cortisol, glicose, colesterol e lactato. Procurou-se realizar esta coleta logo no início da manhã, por volta de 8:00, a fim de evitar interferências do ciclo circadiano.

3.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Após a remoção dos encéfalos, os mesmos foram lavados em solução fisiológica a 0,9%, levemente enxutos e então pesados em balança de precisão MARTE AY220. Em seguida, eles foram imersos em solução de formalina 10% e após fixação por um período de 40h o material foi clivado, sendo realizados cortes coronais no encéfalo com retirada de fragmentos correspondentes a região do córtex cerebelar e do hipocampo. Os tecidos foram então processados, onde foi feita a desidratação e liofilização dos mesmos, sendo posteriormente embebidos e emblocados em parafina (URAN et al., 2012). Os blocos de parafina foram cortados com 2-5 μm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE). No córtex cerebelar foram avaliados o quantitativo de células de Purkinje sadias e lesionadas, por se tratarem de células altamente sensíveis às lesões por hipóxia induzida por drogas. Já no hipocampo analisou-se também, de maneira quantitativa, especificamente as regiões dos Cornos de Amon (CA1 – CA4). Para isso, procurou-se embasamentos em trabalhos prévios (CACERES et al., 2010; PAWLUSKI et al., 2010; URAN et al., 2012).

As lâminas foram escaneadas no aparelho Aperio Digital Pathology Slide Scanners: Leica Biosystems, pertencente ao Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina, da UnB. Posteriormente, elas foram analisadas por meio do Software ImageScope, no qual as imagens foram ampliadas e medidas.

3.8 METODOLOGIA PARA A CONTAGEM DOS NEURÔNIOS

As imagens do Cerebelo receberam o aumento inicial de 1,5 vezes para seleção de 3 regiões aleatórias de, aproximadamente, 1.000 μm , nas quais os neurônios seriam contados. Posteriormente, aplicou-se o aumento de 3,0 vezes

na imagem para a marcação das áreas. Para proceder a contagem, optou-se pelo aumento de 9,0 vezes (Figura 9).

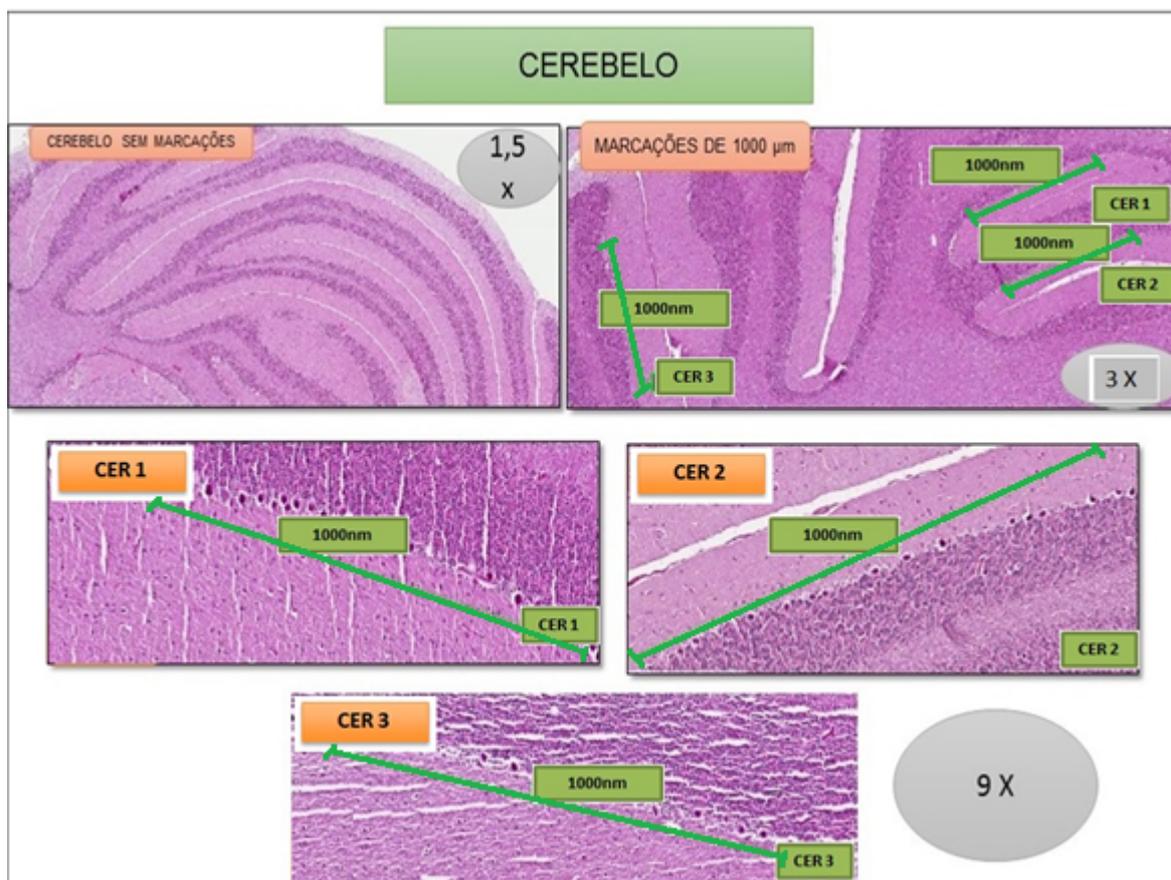


Figura 9 – Imagem histológica com a metodologia empregada para a seleção das áreas do cerebelo. O aumento de 1,5 x (vezes) aplicada para a marcação inicial para a área e o posterior aumento de 9,0 x (vezes) para a contagem dos neurônios. As áreas de cerebelo 1 (CER 1), cerebelo 2 (CER 2) e cerebelo 3 (CER 3) foram medidas em 1000 μm . (Fonte: o autor)

Para análise do hipocampo, procedeu-se inicialmente aumento de 3,6 vezes na imagem, para visualização e seleção das áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. Em cada área foi feita a marcação em aproximadamente 400 μm , nas quais os neurônios seriam contados (URAN et al., 2012). Para a contagem, optou-se pelo aumento de 16,6 vezes que possibilitava melhor visualização (Figura 10).

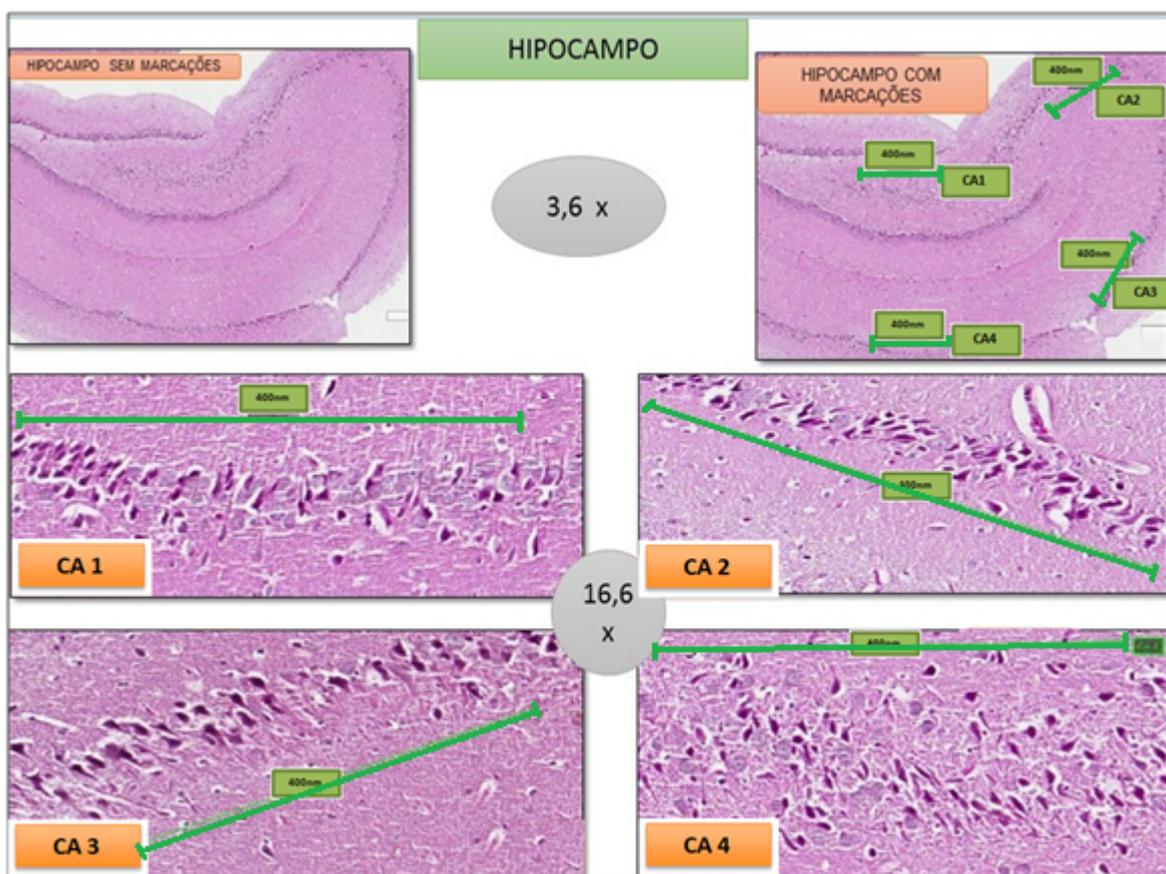


Figura 10 – Imagens histológicas com a metodologia empregada para a seleção das áreas do hipocampo. O aumento de 3,6 x (vezes) foi aplicado para a marcação inicial para a área e o posterior aumento de 16,6 x (vezes) para a contagem dos neurônios. As áreas de Corno de Amon 1 (CA1); Corno e Amon 2 (CA2); Corno de Amon 3 (CA3) e Corno de Amon 4 (CA4) foram medidas em aproximadamente 400 µm. (Fonte: o autor)

Depois de marcada, as imagens foram então selecionadas e transportadas para o programa Paint do Pacote Microsoft, versão Windows Vista 2008, para que pudessem ser marcados de cores diferentes os neurônios saudáveis e os neurônios que apresentavam sinais de lesão. Após este procedimento, as células pintadas com cores diferentes foram contadas por 2 examinadores que não conheciam o significado de cada cor. Adotou-se o mesmo procedimento descrito acima, na contagem das células de Purkinje do cerebêlo (Figura 11). A média da contagem dos dois examinadores compôs os dados que serão apresentados nos resultados.

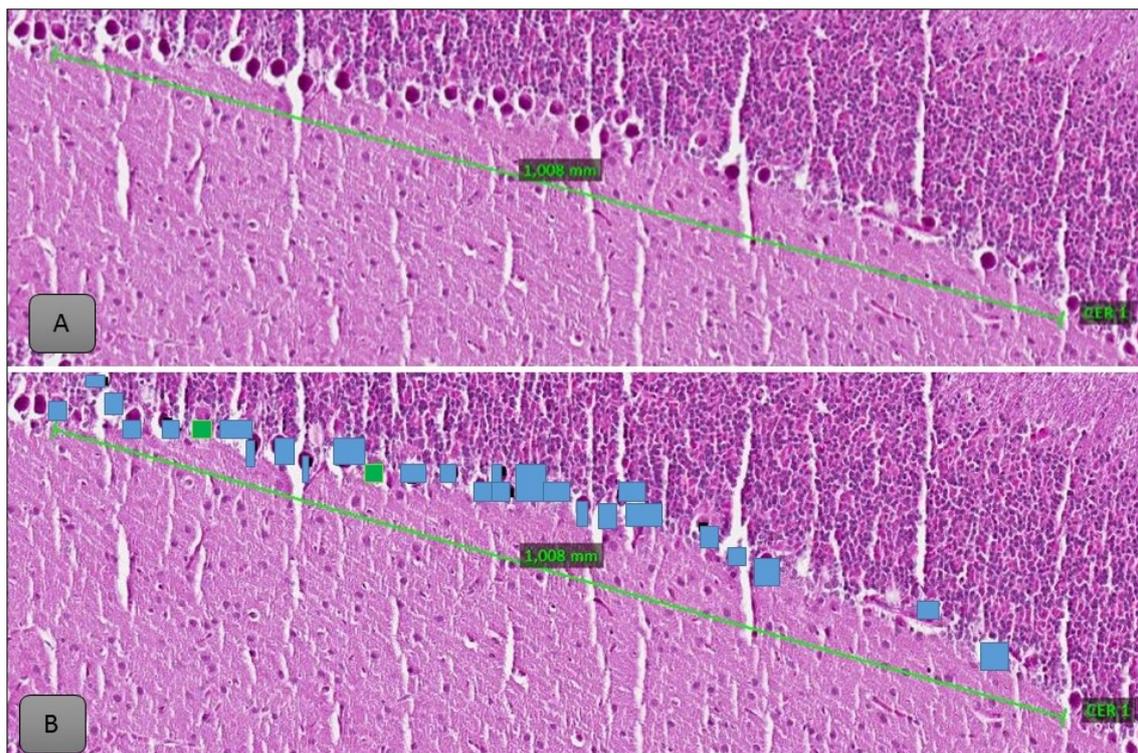


Figura 11 – Imagens histológicas de um corte do cerebelo de ratas Wistar que sofreram hipóxia isquêmica induzida por NaNO₂ (60 mg/Kg). A imagem A apresenta o corte com a marcação de 1008 μm. A figura B apresenta as marcações que foram feitas no programa Windows Paint, em cores distintas para neurônios considerados viáveis (em verde) e neurônios com lesão (em azul). (Fonte: o autor)

3.9 MORFOMETRIA HISTOLÓGICA

A Figura 12 apresenta imagem que ilustra os critérios adotados para determinar dano ou morte celular que são descritos abaixo (PAWLUSKI et al., 2010; CACERES et al., 2010; URAN et al., 2012):

1 - Tumefação celular: aumento do volume celular, com alteração da proporção citoplasma/núcleo (quando comparado às células adjacentes); e vacuolização citoplasmática que aumenta de volume, frequência e intensidade de acordo com o estágio da lesão.

2 – Células com Necrose: não apresentavam núcleo ou nas quais não se distinguia a morfologia celular normal.

3 – Células apoptóicas: se apresentavam com manchas escuras e envoltório escurecido.

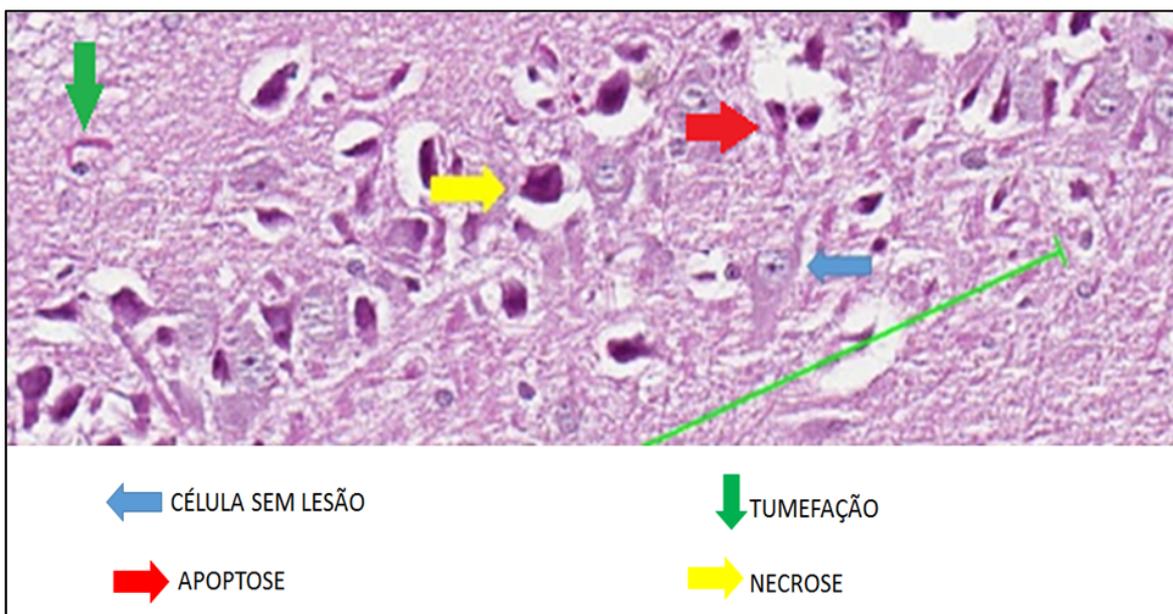


Figura 12- Corte histológico do cerebelo de ratos Wistar com 4 meses de idade expostos a intoxicação por NaNO₂ (60 mg/Kg). Pode ser verificada na seta azul uma célula sem lesão, na seta verde presença de tumefação, na seta vermelha a presença de apoptose e na seta amarela células com característica de necrose. (Fonte: o autor)

Para a análise dos resultados, identificou-se a quantidade de neurônios saudáveis e a quantidade de neurônios que apresentavam os sinais de lesão apresentados acima, não tendo sido diferenciado o tipo de lesão, apenas foram contados os neurônios lesionados.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O objetivo deste trabalho e a análise exploratória dos dados, bem como o uso de técnicas de inferência, foram estabelecidos a fim de comprovar possíveis diferenças estatísticas entre os grupos. Com o intuito de averiguar a normalidade dos dados, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado. Esse teste demonstrou que as variáveis apresentaram distribuição de probabilidade normal. Sendo assim, foi utilizada Análise de Variância (ANOVA), seguida do *post hoc* de ajuste para comparações múltiplas de Bonferroni, com nível de significância de $p \leq 0,05$. Para a construção desses testes o nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$) indicava diferença estatística significativa. Os dados foram digitados no programa Excel 2010 e analisados no SPSS (Statistical Package of Social Sciences) versão 19.0. Foram analisados dados biométricos, comportamentais e bioquímicos de acordo com o grupo (GC e GE). O teste adequado para verificar essas diferenças foi a ANOVA de uma via, no qual o

grupo representa o fator e as variáveis dependentes consistem nos dados mencionados. A ANOVA apresenta como hipótese nula a igualdade das médias entre os grupos.

Na análise referente ao cerebelo primeiramente foi observado diferença estatística entre os neurônios saudáveis e lesionados dentro do GC e GE. Os neurônios saudáveis e lesionados são dos mesmos animais e apresentaram distribuição de probabilidade normal, logo a técnica estatística apropriada foi o teste paramétrico T-Student para dados pareados (dependentes). Os dados do hipocampo foram examinados utilizando uma análise de variância nas 4 áreas intragrupo e intergrupo diferentes, o que facilitou a identificação do número de neurônios saudáveis e lesionados tanto no CG como no EG. O hipocampo foi analisado em 4 áreas intragrupo e intergrupo diferentes utilizando ANOVA de 1 via.

4 RESULTADOS

Dados biométricos relativos ao peso do encéfalo foram coletados e analisados tanto no GC quanto no GE. Foi evidenciado que houve diferença estatisticamente significativa (p -valor = 0,00*) entre os grupos, para o peso do encéfalo no período pós hipóxia, onde a média em gramas no GC foi de 2,15 e no GE 1,73 com o erro padrão da média de 0,04 e 0,03 respectivamente.

Por meio das análises dos dados comportamentais disponibilizados na Tabela 1 encontram-se os dados dos animais aos 3 meses de idade, pré-hipóxia do GE. É possível perceber diferença estatística entre os grupos apenas nas variáveis locomoção e frequência de entradas nos braços fechados.

Tabela 1 – Dados referentes aos testes no Campo aberto (Locomoção), no Labirinto em Cruz Elevado (Frequência aberto, Tempo Aberto e Frequência Fechado) e no Nado forçado (Imobilidade) dos grupos GC e GE. Os testes foram realizados com 20 ratos Wistar no momento pré-hipóxia do GE (animais com 3 meses).

| Variáveis de Comportamento | Grupo | Média | Erro-Padrão | P-Valor |
|----------------------------|-------|--------|-------------|---------|
| Locomoção Espontânea | GC | 30,5 | 3,72 | 0,01* |
| | GE | 46,25 | 1,48 | |
| Frequência aberto | GC | 27,9 | 4,57 | 0,56 |
| | GE | 26,82 | 2,21 | |
| Tempo Aberto | GC | 5,49 | 0,13 | 0,78 |
| | GE | 6,91 | 0,85 | |
| Frequência Fechado | GC | 6,83 | 0,82 | 0,00* |
| | GE | 4,42 | 1,35 | |
| Imobilidade | GC | 116,08 | 3,09 | 0,17 |
| | GE | 110,17 | 9,8 | |

GC= grupo controle, GE= grupo experimental.

Já na Tabela 2 tem-se os dados dos animais aos 4 meses de idade, após a hipóxia induzida pelo NaNO₂ no GE. É possível observar, na Tabela 3 que em relação às variáveis de comportamento, houve diferença estatística entre os grupos para as variáveis locomoção ($p=0,00$), tempo de permanência nos braços abertos do LCE ($p=0,03$), frequência de entradas nos braços fechados do LCE ($p=0,00$) e imobilidade ($p=0,00$).

Tabela 2 – Dados referentes aos testes no Campo aberto (Locomoção), no Labirinto em Cruz Elevado (Frequência aberto, Tempo aberto e Frequência fechado) e no Nado Forçado (Imobilidade) dos grupos GC e GE. Os testes foram realizados com 20 ratas Wistar no momento pós-hipóxia do GE (animais com 4 meses).

| Variáveis de Comportamento | Grupo | Média | Erro-Padrão | P-Valor |
|----------------------------|-------|--------|-------------|---------|
| Locomoção Espontânea | GC | 63,75 | 7,48 | 0,00* |
| | GE | 25,50 | 5,72 | |
| Frequência aberto | GC | 27,79 | 3,58 | 0,81 |
| | GE | 29,74 | 7,45 | |
| Tempo Aberto | GC | 16,09 | 4,28 | 0,03* |
| | GE | 4,82 | 1,03 | |
| Frequência Fechado | GC | 3,70 | 0,86 | 0,00* |
| | GE | 8,58 | 0,88 | |
| Imobilidade | GC | 60,92 | 12,65 | 0,00* |
| | GE | 121,50 | 10,21 | |

GC= grupo controle, GE= grupo experimental.

Os dados bioquímicos de cortisol, glicemia, colesterol e lactado relativos a amostra sanguínea coletada encontram-se na Tabela 3. Foi verificada diferença estatística ($p=0,00$) em relação aos valores de cortisol, glicose e colesterol. Já os valores de lactato não apresentaram diferença significativa.

Tabela 3 – Dados bioquímicos de Cortisol, Glicose, Colesterol e Lactato sanguíneo de 20 ratas Wistar no momento pós-hipóxia do GE, os animais encontravam-se com 4 meses de idade.

| Bioquímica | Grupo | Média | Erro - Padrão | P-Valor |
|------------|-------|-------|---------------|---------|
| Cortisol | GC | 2,80 | 0,33 | 0,00* |
| | GE | 5,88 | 0,56 | |
| Glicose | GC | 206,4 | 7,76 | 0,00* |
| | GE | 133,6 | 4,51 | |
| Colesterol | GC | 51,2 | 5,03 | 0,02* |
| | GE | 65,6 | 0,87 | |
| Lactato | GC | 5,88 | 0,84 | 0,13 |
| | GE | 4,38 | 0,34 | |

GC= grupo controle, GE= grupo experimental.

Quando se procedeu a análise dos neurônios do cerebelo dos animais, foi possível verificar que tanto no GC quanto no GE foram observadas diferenças estatísticas entre os neurônios lesionados e sadios, tendo o $p \leq 0,05$. O GC apresentou média de 23,47 ($\pm 5,63$) células de Purkinje sadias e 2,93 ($\pm 2,46$) neurônios

lesionados. Enquanto que o GE apresentou um contraste marcante, com apenas 2,75 ($\pm 2,36$) células de Purkinje sadias e 18,42 ($\pm 5,66$) neurônios lesionados. Também é possível observar que o número total de neurônios no GE é notadamente menor que o número de neurônios totais do GC. Os dados completos são apresentados na Tabela 4. De acordo com os dados apresentados existem diferenças estatísticas dos neurônios sadios, lesionados e total no GC em relação ao GE ($p \leq 0,05$).

Tabela 4 – Número de Neurônios (Células de Purkinje) do cerebelo de 20 ratas Wistar no momento pós-hipóxia do GE, os animais encontravam-se com 4 meses de idade.

| Número de Neurônios | Grupo | Média | Erro-Padrão | P-Valor |
|---------------------|-------|-------|-------------|---------|
| Sadio | GC | 23,47 | 1,48 | 0,00* |
| | GE | 2,75 | 1,15 | |
| Lesionado | GC | 2,93 | 0,63 | 0,00* |
| | GE | 18,42 | 1,15 | |
| Total | GC | 26,40 | 1,68 | 0,02* |
| | GE | 21,17 | 1,33 | |

GC= grupo controle, GE= grupo experimental.

Já em relação ao hipocampo, é possível observar nas Figuras 13 e 14 os dados relativos a contagem de neurônios nas quatro áreas do Corno de Amon. A figura 13 apresenta os resultados do GC que apresentou diferença expressiva entre o número de neurônios sadios e lesionados nas quatro áreas (CA1-CA4), sempre prevalecendo os neurônios saudáveis. Já na figura 14, aparece a análise da contagem de neurônios do GE, na qual é possível verificar diferença significativa, prevalecendo os neurônios lesionados nas áreas CA2, CA3 e CA4. Em contraste com a área CA1, na qual predominam neurônios saudáveis.

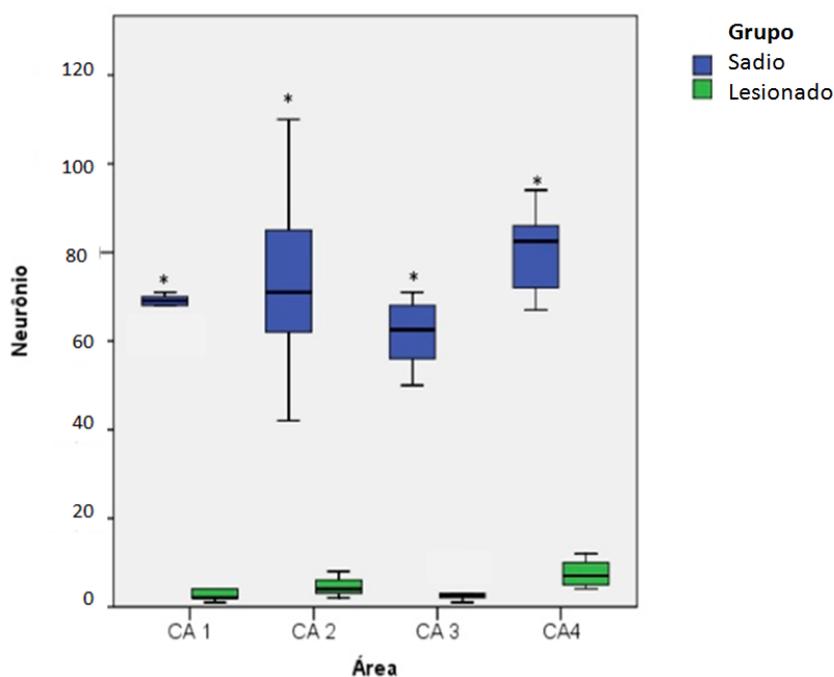


Figura 13 – Box-Plot da contagem do número de neurônios das quatro regiões do Hipocampo (CA1-CA4) de 10 ratos Wistar do GC, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em azul é apresentada a média de neurônios sadios nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. Em verde encontram-se as médias de neurônios com lesão nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. O * indica a diferença estatisticamente significante entre o número de neurônios sadios e lesionados ($p \leq 0,05$) (Fonte: o autor).

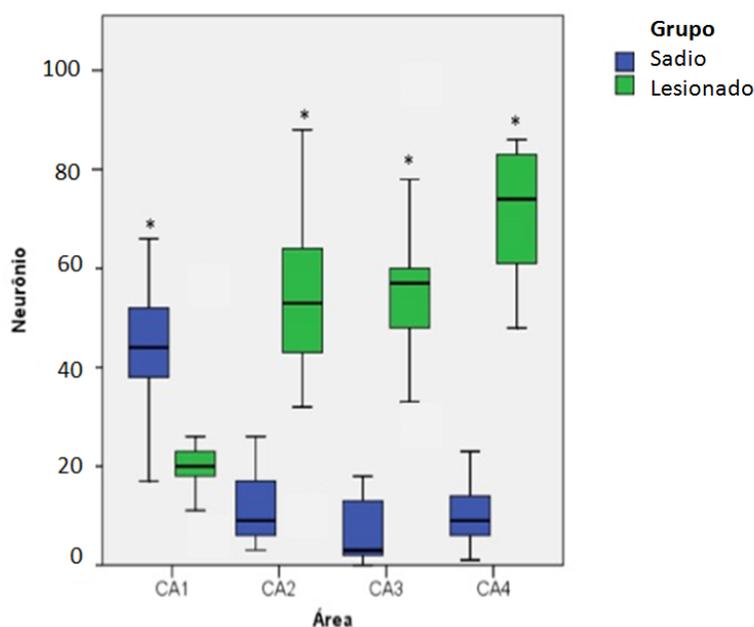


Figura 14 – Box-Plot da contagem do número de neurônios das quatro regiões do Hipocampo (CA1-CA4) de 10 ratos Wistar do GE, os animais encontravam-se com 4 meses de idade e sofreram intoxicação por NaNO_2 aos 3 meses, durante 15 dias. Em azul é apresentada a média de neurônios sadios nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. Em verde encontram-se as médias de neurônios com lesão nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. O * indica a diferença estatisticamente significante entre o número de neurônios sadios e lesionados. ($p \leq 0,05$) (Fonte: o autor).

Os dados completos da média da contagem de neurônios, assim como do erro padrão e do p-valor, para as quatro áreas do hipocampo, tanto no GC quanto no GE estão apresentados na Tabela 6. De modo que, conforme existem diferenças estatisticamente significativas intragrupo para as quatro áreas do hipocampo, entre o número de neurônios saudios em relação ao de lesionados ($p \leq 0,05$).

Tabela 5 – Apresenta o Número de Neurônios das quatro áreas do Hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4) de 20 ratas Wistar no momento pós – hipóxia do GE, os animais encontravam-se com 4 meses de idade.

| Grupo | Neurônio | Média | Erro Padrão | P-Valor |
|-------|---------------|-------|-------------|---------|
| GC | Sadio CA1 | 67,83 | 1,64 | 0,00* |
| | Lesionado CA1 | 2,50 | 3,85 | |
| | Sadio CA2 | 73,50 | 0,50 | 0,00* |
| | Lesionado CA2 | 4,50 | 3,26 | |
| | Sadio CA3 | 61,67 | 9,36 | 0,00* |
| | Lesionado CA3 | 3,00 | 2,15 | |
| | Sadio CA4 | 80,67 | 0,92 | 0,00* |
| | Lesionado CA4 | 7,50 | 5,55 | |
| GE | Sadio CA1 | 44,00 | 3,27 | 0,00* |
| | Lesionado CA1 | 21,31 | 1,89 | |
| | Sadio CA2 | 12,31 | 0,85 | 0,00* |
| | Lesionado CA2 | 53,62 | 4,97 | |
| | Sadio CA3 | 7,00 | 3,98 | 0,00* |
| | Lesionado CA3 | 55,92 | 2,11 | |
| | Sadio CA4 | 10,69 | 1,25 | 0,00* |
| | Lesionado CA4 | 70,92 | 3,77 | |

GC= grupo controle, GE= grupo experimental.

Já a Tabela 6, apresenta a comparação dos dados do hipocampo intergrupo. De acordo com os dados apresentados existe diferença significativa intergrupo nas quatro áreas do hipocampo entre o número de neurônios saudios e o número de lesionados ($p \leq 0,05$). No entanto, na Tabela 7 pode-se verificar que não houve diferença significativa entre os grupos, quando se procedeu a análise do número total de neurônios, ou seja, a soma dos saudáveis e lesionados.

Tabela 6 – Número de neurônios das quatro áreas do hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4) de 20 ratas Wistar no momento pós – hipóxia do GE, quando os animais se encontravam com 4 meses de idade.

| Área | Neurônio | Grupo | Média | Erro-Padrão | P-Valor |
|------|-----------|-------|-------|-------------|---------|
| CA 1 | Sadio | GC | 67,83 | 1,64 | 0,00* |
| | | GE | 44,00 | 3,85 | |
| | Lesionado | GC | 2,50 | 0,50 | 0,00* |
| | | GE | 21,31 | 3,26 | |
| CA 2 | Sadio | GC | 73,50 | 9,32 | 0,00* |
| | | GE | 12,31 | 2,15 | |
| | Lesionado | GC | 4,50 | 0,92 | 0,00* |
| | | GE | 53,62 | 5,55 | |
| CA 3 | Sadio | GC | 61,67 | 3,27 | 0,00* |
| | | GE | 7,00 | 1,89 | |
| | Lesionado | GC | 3,00 | 0,85 | 0,00* |
| | | GE | 55,92 | 4,97 | |
| CA 4 | Sadio | GC | 80,67 | 3,98 | 0,00* |
| | | GE | 10,69 | 2,11 | |
| | Lesionado | GC | 7,50 | 1,25 | 0,00* |
| | | GE | 70,92 | 3,77 | |

GC= grupo controle, GE= grupo experimental.

Tabela 7 – Número de neurônios totais (somatório de sadios e lesionados) em cada uma das quatro áreas do hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4) de 20 ratas Wistar no momento pós – hipóxia do GE, quando os animais se encontravam com 4 meses de idade.

| Área | Grupo | Média | Erro-Padrão | P-Valor |
|------|-------|-------|-------------|---------|
| CA1 | GC | 70,33 | 1,94 | 0,31 |
| | GE | 65,31 | 3,10 | |
| CA2 | GC | 78,00 | 8,55 | 0,19 |
| | GE | 65,92 | 4,55 | |
| CA3 | GC | 64,67 | 2,78 | 0,83 |
| | GE | 62,92 | 5,27 | |
| CA4 | GC | 88,17 | 2,89 | 0,25 |
| | GE | 81,62 | 3,43 | |

GC= grupo controle, GE= grupo experimental.

A Figura 15 traz o Box-Plot das áreas CA1 a CA4 do hipocampo, mostrando a diferença que foi encontrada entre a média do número de neurônios sadios e lesionados, nos GC e GE. A característica comum é a ocorrência superior de neurônios sadios no GC, em todas as áreas e, por outro lado, o predomínio de neurônios com lesão no GE, com excessão da área CA1, que apresenta mais neurônios sadios do que lesionados.

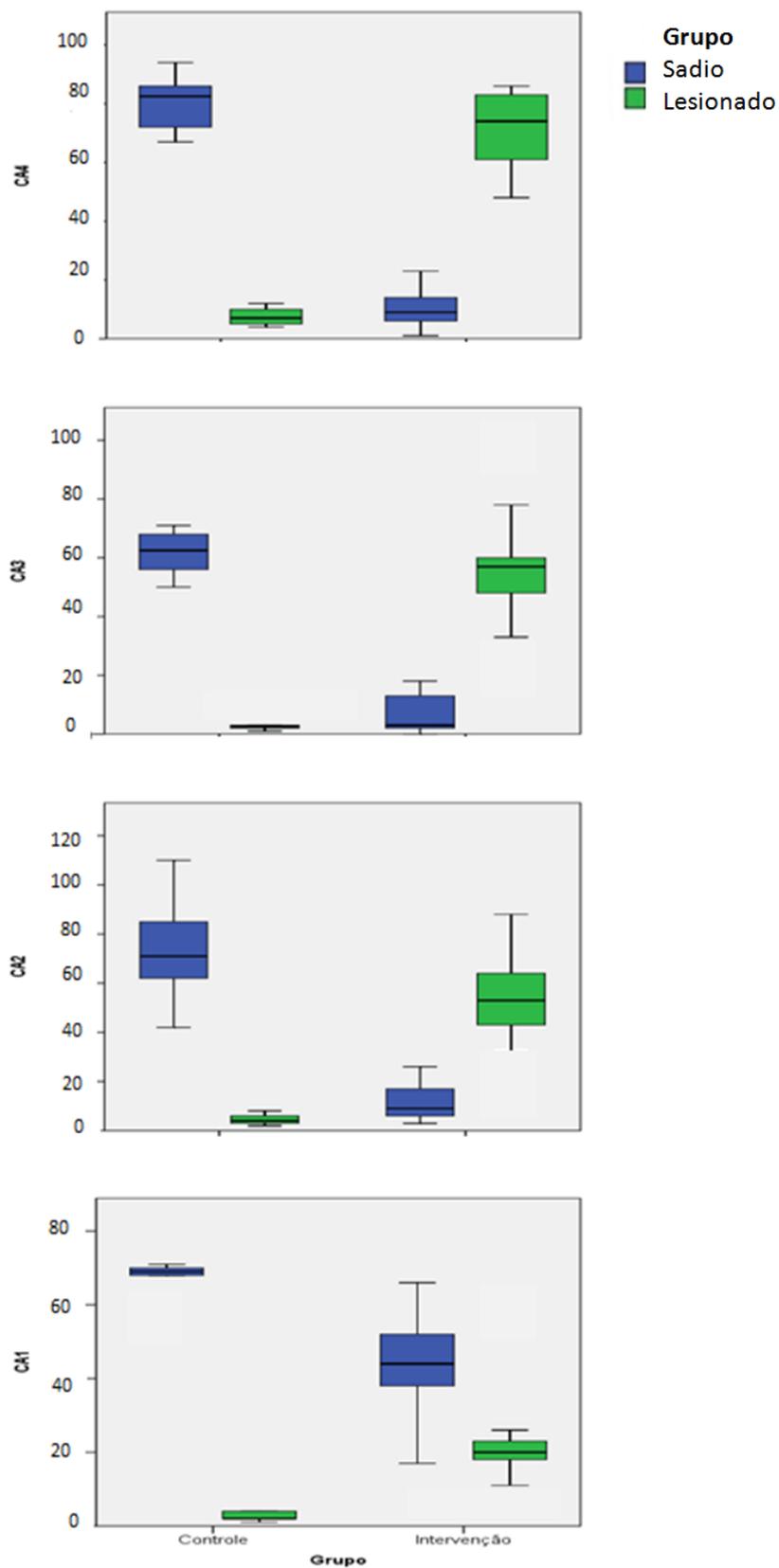


Figura 15 – Box-Plot da contagem do número de neurônios das quatro regiões do Hipocampo (CA1-CA4), em separado, por área, de 20 ratos Wistar, 10 no GC e 10 no GE, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em azul é apresentada a média de neurônios sadios nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. Em verde encontram-se as médias de neurônios com lesão nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4 (Fonte: o autor).

As Figuras 16, 17, 18 e 19, por sua vez, apresentam as imagens histológicas comparativas entre as características das áreas CA1, CA2, CA3 e CA4, respectivamente, do hipocampo de um animal do GC (A) e de um animal do GE (B). Sendo possível verificar as áreas de preservação e de lesão que apareceram em cada grupo.

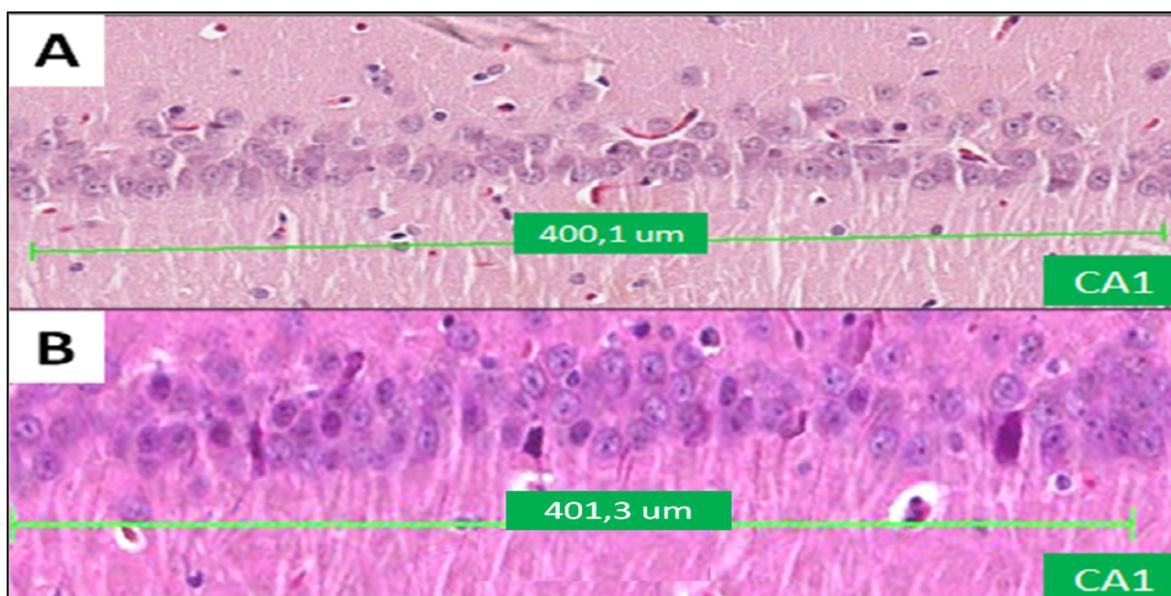


Figura 16 – Imagens histológicas da área CA1 do hipocampo. No campo A encontra-se a área CA1 de um animal do GC e na B do GE. O aumento de 16,6 x. A medida realizada em aproximadamente 400 μm . Observa-se que as lâminas do GC e GE apresentam mais células saudáveis que células lesionadas, porém é possível detectar algumas células com núcleo hiper cromático retraído com citoplasma eosinofílico evoluindo para morte celular em ambos os grupos (Fonte: o autor).

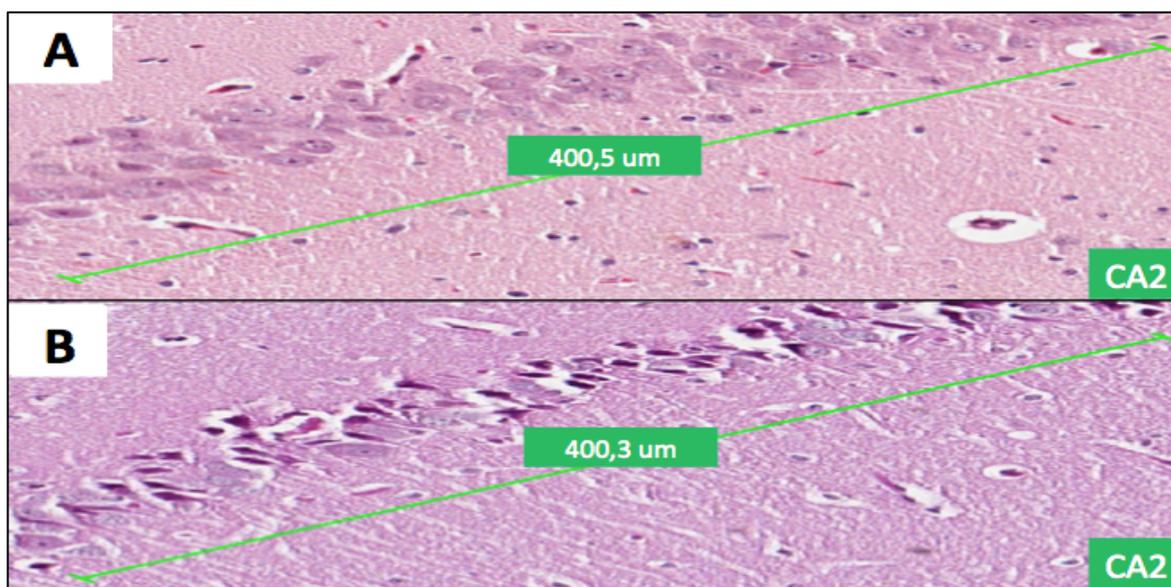


Figura 17 – Apresenta as imagens histológicas da área CA2 do hipocampo. No campo A encontra-se a área CA2 de um animal do GC e na B do GE. O aumento de 16,6 x. A medida realizada em aproximadamente 400 μm . Ao analisarmos a lâmina A vemos um corte com predominância de células com morfologia normal, porém na lâmina B, observamos um comprometimento neuronal bem mais extenso, praticamente não se vê células de aspecto normal (Fonte: o autor).

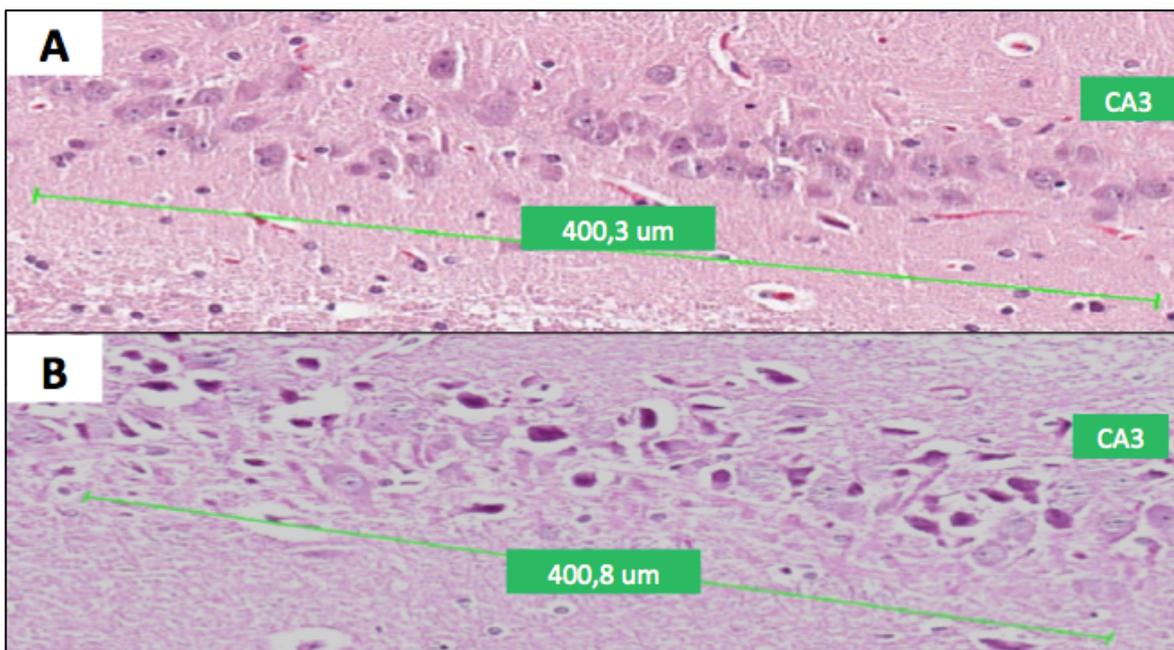


Figura 18 – Imagens histológicas da área CA3 do hipocampo. No campo A encontra-se a área CA3 de um animal do GC e na B do GE. O aumento de 16,6 x. A medida realizada em aproximadamente 400 μm . Embora possamos observar que no GC alguns neurônios possuem aspecto alterado, no GE as alterações são bem mais importantes, onde podem ser vistos restos celulares necróticos (Fonte: o autor).

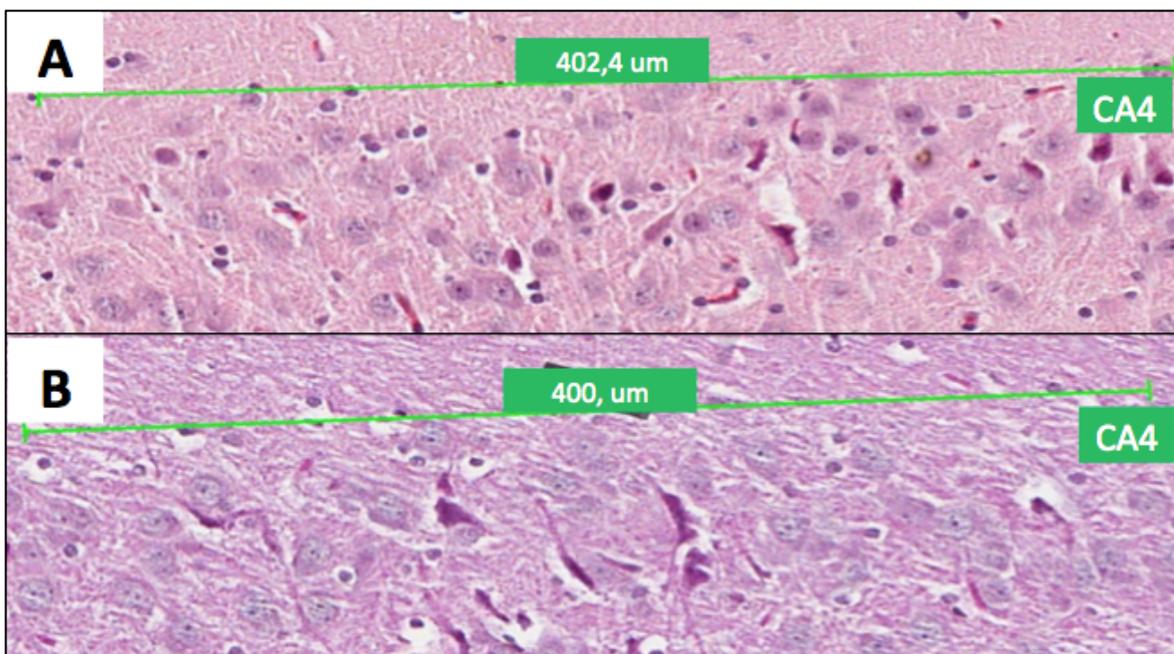


Figura 19 – Imagens histológicas da área CA4 do hipocampo. No campo A encontra-se a área CA4 de um animal do GC e na B do GE. O aumento de 16,6 x. A medida realizada em aproximadamente 400 μm . Apesar de existir alteração também no GC, observa-se uma rarefação celular no GE. (Fonte: o autor)

5 DISCUSSÃO

Após a análise dos dados do experimento, foi possível verificar que houve diferença nos dados biométricos, nas variáveis relativas aos comportamentos sugestivos de ansiedade e de depressão e também nas imagens histológicas do cerebelo e do hipocampo entre os grupos GC e GE.

Após a hipóxia isquêmica ocorrem reações em duas fases. Na primeira fase, a morte celular acontece imediatamente após o estímulo lesivo. Em casos de estímulos severos ocorrerá a morte imediata de neurônios e de células da glia. Considerando nossos resultados, acredita-se que alta dose de NaNO₂ utilizada, possivelmente gerou estímulo lesivo importante. Nesta fase, a morte neuronal ocorre por necrose, associado ao processo irreversível de degeneração neuronal. Portanto, necrose neuronal é a principal forma de neurodegeneração após hipóxia isquêmica severa. Já a segunda fase de morte celular ocorre após horas ou dias depois do evento causador da hipóxia. Esta morte celular a longo prazo é conhecida como apoptose ou morte celular programada. Acredita-se também, que como o Nitrito foi aplicado em um protocolo crônico, de 15 dias consecutivos, que os danos dessa fase também tenham ocorrido (KHAN, 2015).

Várias pesquisas prévias já propuseram estudar os efeitos da hipóxia no encéfalo de maneira experimental isto porque este tipo de estudo permite explorarmos áreas e técnicas que não seriam possíveis em humanos, e ainda permitem estabelecer inferências e relações com possíveis alterações semelhantes que ocorram em pessoas (LI et al., 2013; ZHOU et al., 2013; HUANG et al., 2015; KHAN, 2015).

Huang et al. (2015) realizaram um experimento provocando a hipóxia isquêmica em câmara de CO₂, e propuseram verificar a ação protetora da melatonina. Os autores concluíram que a hipóxia induziu o aumento de espécies reativas de oxigênio no tecido encefálico, especialmente no hipocampo, e que a melatonina foi efetiva em diminuir tais danos. Uma das prováveis causas da degeneração neuronal observada pode ter origem na produção de espécies reativas de oxigênio, promovidas pela intoxicação por NaNO₂.

Quando realizada a análise do peso dos encéfalos dos animais, foi possível verificar que o GE apresentou peso do encéfalo significativamente menor que o GC. Isto, provavelmente, pode ter sido atribuído à degeneração e morte neuronal que foi verificada após a intoxicação por NaNO₂. Quando ocorre o processo de morte e degeneração neuronal é comum que o número de neurônios seja reduzido e que, conseqüentemente, aquele encéfalo passe por transformações morfométricas (MEHRABI et al., 2016).

Após hipóxia isquêmica provocada por clampeamento da artéria carótida direita, Xu et al. (2016) detectaram que o cérebro dos animais apresentaram diminuição de proporção e de peso, assim como a densidade neuronal na região do tálamo e do hemisfério cerebral direito. Estes resultados corroboram, em parte, com o atual estudo, tendo em vista a natureza diferente da hipóxia induzida e também as regiões estudadas. Broshek, de Marco e Freeman (2015), por sua vez, encontraram relação positiva entre volume hipocampal e alterações comportamentais relacionadas a ansiedade. Este autor sugeriu que qualquer alteração no volume, estrutura ou função do hipocampo age como um gatilho para o desenvolvimento de comportamentos ansiogênicos. Tais achados vão de encontro com a pesquisa atual que também verificou a lesão das estruturas do hipocampo e a ocorrência de alterações comportamentais, tais como características de possíveis comportamentos sugestivos de depressão e ansiogênicos nos animais que sofreram intoxicação por NaNO₂.

Assim como o estudo atual, outros estudos, utilizaram diferentes protocolos de intoxicação por NaNO₂ a fim de provocar as reações com a hemoglobina e por fim promover a hipóxia isquêmica encefálica, além de representar uma forma mais simplificada e acessível de protocolo experimental (NAIK et al., 2006; GONCHAR et al., 2006). A metahemoglobinemia produzida pela injeção de NaNO₂ é um potente agente da formação de radicais livres. As ações metabólicas de ERO's estão relacionadas com uma grande gama de reações oxidativas tóxicas. (GONCHAR et al., 2006). O protocolo com injeção intraperitoneal de 60 mg/kg de NaNO₂ por 15 dias, foi possível induzir hipóxia e detectar danos no hipocampo dos animais estudados. Mostrando que o mesmo foi eficaz na indução da hipóxia, além de se tratar de um método confiável, de baixo custo e de fácil acesso.

Gonchar et al (2006) utilizaram um modelo de intoxicação aguda, com dose única de 60mg/Kg de NaNO₂ para induzir a hipóxia isquêmica encefálica em ratos Wistar. Diferente da proposta do presente estudo, que buscou estudar a aplicação crônica, naquela pesquisa, os autores analisaram o encéfalo, o fígado e o coração dos animais 50 minutos após a aplicação de dose única de NaNO₂. Foi verificada que a intoxicação aguda por NaNO₂ levou ao aumento de 34% de metahemoglobina circulante na corrente sanguínea e também houve o aumento significativo da peroxidação de lipídios no fígado (56%), no coração (42%) e no encéfalo (86%).

Naik et al (2006), por sua vez, objetivaram avaliar o poder da Ginkgo Biloba como antioxidante após hipóxia isquêmica encefálica induzida por NaNO₂, quando aplicada uma dose de 75 mg/kg, por 7 e por 14 dias consecutivos. Os autores verificaram que houve danos celulares nos tecidos encefálicos, especialmente atribuídos à formação de radicais livres e seus efeitos destruidores nas membranas plasmáticas. Esses resultados, até certo ponto, corroboram com os achados atuais.

Portanto, é provável que a extensa lesão verificada no hipocampo dos animais que sofreram a intoxicação por NaNO₂ deve-se ao fato deste composto orgânico combinar-se com a hemoglobina sanguínea e formar a MetHb, que tem uma afinidade com a hemoglobina de aproximadamente 20 vezes maior que o oxigênio, de forma que, posteriormente, o oxigênio não poderá realizar as trocas gasosas naturais com o CO₂ nos tecidos. Este processo leva a formação de ERO que reagem com moléculas de gordura das membranas plasmáticas das células, causando dano oxidativo. Desta forma, a liberação de radicais livres desregula o equilíbrio biológico podendo acarretar em morte celular (NAIK e al., 2006).

Com o protocolo experimental realizado foi possível promover lesão encefálica por hipóxia isquêmica induzida pela intoxicação com NaNO₂, assim como foram verificadas reações orgânicas e comportamentais. Os animais apresentaram diminuição do peso encefálico, manifestaram comportamento ansiogênico com sinais sugestivos de depressão e histologicamente verificaram-se lesões nas regiões CA2, CA3 e CA4 do hipocampo.

Em humanos, a ansiedade representa o estado emocional perturbador que pode ser deflagrado por diferentes estímulos, tais como a possibilidade de ocorrer ameaças obscuras ou algo não identificado que, muitas vezes, só existem no imaginário do indivíduo que os apresenta. Como resultado, é comum que ocorra comportamentos defensivos, tais como estado de alerta e avaliações de riscos constantes (ENGIN et al., 2016). Os transtornos psicológicos são consequências frequentes da lesão encefálica (BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015).

Já o estresse é um dos principais fatores que favorece a ansiedade. A experiência de estresse surge quando o indivíduo percebe as demandas do ambiente, sendo regulada pelos processos descendentes do SNC, bem como por processos subcorticais dentro do sistema límbico (THOMA et al., 2013). O estresse crônico também pode promover alterações neuroimunológicas que acabam por causar disfunções de aprendizagem e memória, ansiedade e depressão (DEEP et al., 2016).

Um interessante e potencialmente útil aspecto da resposta ao estresse e que aparece muito frequentemente durante o estresse agudo é a ativação significativa do giro denteado do hipocampo. Em resposta ao estímulo estressor, as células tronco neurais no giro denteado são transformadas em neurônios e células da glia, os quais eventualmente levam a novas conexões sinápticas. Supõe-se que esse seja, ao menos em parte, o mecanismo de como as memórias são feitas, e esse processo capacita indivíduos a lembrarem do objeto ou evento causador do estresse (GUEST et al., 2013).

Em estudos experimentais com roedores o comportamento ansiogênico ou ansiolítico pode ser investigado por meio de sua avaliação no LEC. A análise do efeito ansiolítico ou ansiogênico tem como princípio o estudo da proporção entre as entradas nos braços abertos e nos braços fechados do aparelho, assim como no tempo de permanência do animal nos braços abertos (CACERES, 2010; SCHEIDT, 2015; MOGHADAS, 2016). Segundo os resultados apresentados, foi verificado que os animais com lesão encefálica apresentaram comportamento ansiogênico, uma vez que houve redução no tempo de permanência nos braços abertos, quando comparados ao GC. Durante a avaliação no teste, o nível de

estresse no GE pareceu ser evidente uma vez que a frequência nos braços fechados se mostrou elevada quando comparada ao GC.

No que se refere ao teste do campo aberto, este foi utilizado para que os animais tivessem uma experiência locomotora prévia do LCE e que permitisse a maior exploração nesse aparato. Muito embora não fosse o objetivo analisar comportamento ansiolítico ou ansiogênico com este teste, foi possível notar que a locomoção espontânea foi maior nos animais que sofreram hipóxia, permitindo inferir que provavelmente áreas ou eventos ligados ao estresse poderiam estar sendo ativados, tal hipótese pode ser parcialmente confirmada pelos testes bioquímicos nos quais foi possível observar aumento dos níveis de cortisol nos animais pertencentes ao GE.

A depressão é um quadro frequente em humanos. A estimativa é de que uma em quatro mulheres e um em cada seis homens já experimentou sintomas dessa doença durante a sua vida, sendo que até 65% dos indivíduos têm episódios recorrentes dela (SLAVICH; IRWIM, 2014). É estimado que após lesão encefálica, em torno de 12-44% dos indivíduos experimentem algum sintoma de depressão, especialmente durante os 3 primeiros meses após a instalação do quadro (BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015).

O nado forçado é um teste comportamental validado amplamente como um modelo experimental com alto potencial de avaliar efeitos sugestivos de depressão e efeitos de farmacoterapias com potencial antidepressivo (PITYCHOUTIS et al., 2014). Foi verificado que os animais que sofreram a intoxicação por NaNO₂ apresentaram aumento do tempo de imobilidade, sugerindo estado de possível comportamento depressivo. De acordo com a literatura, a análise etiológica descritiva realizada em um estudo, mostrou o nado como um dos primeiros comportamentos apresentados pelos ratos na sessão de testes do nado forçado. A frequência e a duração da imobilidade aumentaram ao longo da sessão de teste. A postura de imobilidade na sessão do teste é interpretada como uma falha no comportamento dirigido à fuga (estado comportamental de desespero) ou o desenvolvimento de comportamento passivo que libera o animal das formas ativas de lidar com o estímulo estressante (OLIVEIRA; DE LIMA; CAROBREZ, 2005).

A análise Markoviana revelou que as transições de desespero durante o nado são os comportamentos frequentemente observados. É um resultado esperado, uma vez que na água, nadar é um comportamento adequado apresentado pelo animal, a fim de evitar o afogamento. Como consequência, a ocorrência frequente do nado prevê fortemente a imobilidade e balançadas de cabeça. A forte interligação entre a ocorrência de episódios de nado e imobilidade pode refletir, concomitantemente, o aumento das contagens destas variáveis ao longo do teste (OLIVEIRA; DE LIMA; CAROBREZ, 2005).

As transições para a imobilidade, mesmo menos frequentes do que as que provêm ou levam ao nado, ligou a postura passiva a todos os elementos da cadeia comportamental. Este padrão também pode ser esperado no teste do nado forçado, uma vez que o animal tende a assumir uma postura de imobilidade (desespero comportamental) depois de uma sessão de tensão e estresse (JAIN; KANNAMWAR; VERMA, 2017). Em um estudo sobre a intoxicação com Bisfenol-A, substância presente em utensílios plásticos, verificou-se que houve sinais de comportamento ansiogênico e também aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado (CHEN et al., 2015). Tal achado corrobora com os que foram encontrados na atual pesquisa, permitindo que seja feita uma relação interessante entre a intoxicação, a qual os seres humanos estão expostos no seu dia a dia, e a ocorrência de transtornos de comportamento, como a ansiedade e sintomas semelhantes a depressão, de forma que, a exposição de animais a agentes nocivos pode ser uma causa ambiental para o desenvolvimento de padrões desses comportamentos mencionados (CHEN et al., 2015).

O Eixo HPA desempenha um papel crítico na regulação de comportamentos afetivos e emocionais, tanto que, disfunções no referido eixo são consideradas como a base neurobiológica de desordens afetivas, tais como, ansiedade, depressão maior, depressão psicóticas e transtornos bipolares (CHEN et al., 2015). Aumento nos níveis de corticoesteróides podem indicar a hiperatividade do eixo HPA. Essa alteração é comumente identificada em indivíduos com depressão maior e também naqueles com transtornos de ansiedade (CHEN et al., 2015). Resultados que corroboram com os achados do

presente estudo que encontrou um aumento estatisticamente significativo dos níveis de cortisol do GE quando comparado ao GC.

Concordando também com os achados da presente pesquisa, diversos estudos têm conseguido estabelecer a relação entre estresse e alterações comportamentais (GRIGORYAN; SEGAL, 2016). Animais submetidos ao estresse demonstraram que as respostas para vários estímulos estressores estão relacionadas com a liberação de cortisol e outros indicadores metabólicos, tais como a glicose e o lactato (ROTLLANT; TORT, 1997). Estes autores ainda relatam que o cortisol é liberado em quantidades semelhantes após estresse agudo e crônico, independentemente de exposição prévia ao estresse crônico. Isto pode sugerir que há um limite para os níveis máximos de cortisol, que pode ser atingido, independentemente da condição pré-existente. Já os níveis de glicose aumentam logo após o estresse agudo, porém decaem significativamente entre uma e duas horas após o evento estressor. De forma que, no presente estudo, os animais submetidos a estresse crônico não apresentaram aumento do nível de glicose plasmática (ROTLLANT; TORT, 1997).

Além da lesão no hipocampo ventral, pretendeu-se estabelecer na presente pesquisa, relação entre o estresse que o animal estaria passando e a ocorrência de comportamento ansiogênico. Com isso verificou-se um aumento do nível de cortisol nos animais que sofreram hipóxia, e esta elevação foi creditada ao estresse bioquímico empregado nos animais. Durante eventos estressores, substâncias químicas, tais como adrenalina e glicocorticoides (incluindo cortisol) são liberadas na corrente sanguínea, levando a uma cadeia de reações orgânicas (GUEST et al., 2013). Os glicocorticoides são secretados do córtex da glândula supra-adrenal e encontram-se sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Tais hormônios desempenham papel essencial na regulação do metabolismo da glicose, de lipídeos e de proteína (VAN RAALTE; OUWEN; DIAMANT, 2009). De forma que, pode-se esperar que os animais que sofreram hipóxia isquêmica encontravam-se sob efeito de estresse crônico e possivelmente apresentassem alterações metabólicas, como foram verificadas.

No presente estudo, particularmente o hipocampo ventral apresentou maior vulnerabilidade à intoxicação por NaNO₂, notadamente demonstrada pelo número

de neurônios lesionados na área CA3 do hipocampo. Em termos de comparação, o hipocampo dorsal, representado por CA1, mostrou-se mais resistente à lesão, onde ambos os grupos apresentaram número maior de neurônios saudáveis que lesionados em CA1. O hipocampo ventral está mais relacionado com o controle da ansiedade e da depressão (FANSELOW; DONG, 2010; LI et al., 2014; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015; ENGIN et al., 2016; GRIGORYAN; SEGAL, 2016). Este fato possibilita a compreensão de que lesões nesta região possam alterar tais comportamentos. Grigoryan e Segal (2016) relacionaram comportamento ansiogênico às alterações no hipocampo ventral, corroborando com os achados da presente pesquisa e com os achados das pesquisas realizadas por Morris et al. (1982) e McHugh et al. (2004).

O hipocampo, além de desempenhar papel regulador importante no humor, também tem participação importante nos sintomas depressivos (WANG et al., 2015). No atual estudo, os animais com lesão hipocámpal também apresentaram comportamento sugestivo de depressão. Esses resultados também corroboram com os achados da pesquisa de Papadopoulou et al. (2015) quando relacionaram a ocorrência de estresse agudo e crônico com o desenvolvimento de comportamento depressivo e estabelecem uma correlação positiva entre estes eventos, verificando também a presença de lesões hipocámpais importantes.

Já lesões exclusivas do giro prejudicam a memória espacial e promove efeito ansiolítico. Esta área também compõe o hipocampo ventral (GRIGORYAN; SEGAL, 2016). Ele não foi explorado no trabalho atual, não podendo estabelecer relação direta com a pesquisa acima referida. No entanto, é interessante poder compreender que diferenças sutis de lesões, em uma área tão pequena, como o hipocampo podem provocar diferentes respostas em relação ao comportamento ansiolítico e ansiogênico, em ratos. Em humanos, também há relatos na literatura da correlação da lesão do hipocampo ventral com a ocorrência de esquizofrenia (LIPSKA; WEINBERGER, 2000).

No presente estudo, foi possível comprovar que houve hipóxia isquêmica encefálica produzida pela intoxicação crônica por NaNO₂. Assim como, se pode perceber que ocorreram alterações na formação hipocámpal dos animais do grupo GE e que houve alterações comportamentais provavelmente relacionadas

com a lesão. Estes achados corroboram com o estudo de Deep et al. (2016) que afirmam que a hipóxia pode exercer influência importante no estado de humor e precipitar manifestações de ansiedade e de comportamento sugestivo de depressão (DEEP et al., 2016).

Outro fator que deve ser levado em consideração está relacionado com a possível neurogênese que ocorre no hipocampo, mesmo em animais adultos. A neurogênese na fase adulta é a produção de novos neurônios em áreas de cérebro adulto. As regiões onde mais se observa este processo são a zona subventricular e zona subgranular do hipocampo. Esta formação de novos neurônios desempenha vários papéis fisiológicos incluindo renovação de neurônios danificados, formação de memória e modulação da resposta ao estresse (AGETA et al., 2008). Há também a possibilidade de que este bloqueio da neurogênese cause impacto na regulação do eixo, assim como, distúrbios nos mecanismos de neurogênese de ratos adultos têm sido vistos como promovedores de efeitos ansiogênicos (AGETA et al., 2008). Neste contexto, podemos inferir que a intoxicação por NaNO_2 pode promover impacto semelhante. De forma que o nitrito pode agir de duas formas, provocando lesão e também bloqueando a neurogênese e interferindo negativamente na recuperação.

Conhecer os processos microscópicos envolvidos nas doenças orgânicas é um importante passo para aprimorar o entendimento da fisiopatologia envolvida nas lesões cerebrais e suas possíveis consequências e repercussões nas diferentes esferas do ser humano. Ao compreender melhor a ocorrência e o predomínio de danos internos celulares, em diferentes regiões encefálicas, pode-se visualizar com maior clareza as possíveis alterações que determinarão o desenvolvimento de quadros psicossociais e de comportamentos ansiogênicos e depressivos. Estes, muitas vezes, como verificado no atual estudo, associados a diferentes casos de hipóxia isquêmica neuronal. Desta forma, tendo um conhecimento mais global e abrangente do processo patológico, o profissional de saúde terá condições otimizadas de análise dos casos clínicos e também, melhor entendimento de seus pacientes como seres completos e complexos. Como consequência, tal profissional pode atuar de maneira mais específica e

significativa em busca do melhor tratamento e da maior recuperação funcional e psíquica de seus pacientes.

6.CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, foi possível verificar que o protocolo experimental utilizado promoveu lesão encefálica por hipóxia isquêmica e gerou reações orgânicas e comportamentais, uma vez que os animais submetidos à intoxicação por NaNO₂, apresentaram:

- Comportamento sugestivo de ansiedade (ansiogênico) e depressivo.
- Redução dos pesos dos encéfalos quando comparado ao GC.
- As variáveis bioquímicas apresentaram respostas significativas relacionadas ao cortisol, glicose e colesterol.
- Histologicamente verificaram-se lesões nas regiões CA2, CA3 e CA4 do hipocampo e nas células de Purkinje do cerebelo.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Ageta, H., Murayama, A., Migishima, R., Kida, S., Tsuchida, K., Yokoyama, M., & Inokuchi, K. (2008). Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. *PloS one*, 3(4), e1869.

Agster, K. L., & Burwell, R. D. (2013). Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Behavioural brain research*, 254, 50-64.

Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571-591.

Ansari, F. A., Ali, S. N., & Mahmood, R. (2015). Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 29(7), 1878-1886.

Baky, N. A. A., Zaidi, Z. F., Fatani, A. J., Sayed-Ahmed, M. M., & Yaqub, H. (2010). Nitric oxide pros and cons: The role of l-arginine, a nitric oxide precursor, and idebenone, a coenzyme-Q analogue in ameliorating cerebral hypoxia in rat. *Brain research bulletin*, 83(1), 49-56.

Barkhuizen, M., Van de Berg, W. D. J., De Vente, J., Blanco, C. E., Gavilanes, A. W. D., & Steinbusch, H. W. M. (2017). Nitric Oxide Production in the Striatum and Cerebellum of a Rat Model of Preterm Global Perinatal Asphyxia. *Neurotoxicity Research*, 1-10.

Barreto, G., E White, R., Ouyang, Y., Xu, L., & G Giffard, R. (2011). Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 11(2), 164-173.

Beck, A. T., & Alford, B. A. (2016). *Depressão: causas e tratamento*. Artmed Editora.

Bernasconi, R., Smieskova, R., Schmidt, A., Harrisberger, F., Raschle, N. M., Lenz, C., & Lang, U. E. (2015). Hippocampal volume correlates with attenuated negative psychotic symptoms irrespective of antidepressant medication. *NeuroImage: Clinical*, 8, 230-237.

Bobinski, M., De Leon, M. J., Wegiel, J., Desanti, S., Convit, A., Saint Louis, L. A., & Wisniewski, H. M. (1999). The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging-determined hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 95(3), 721-725.

Boccaro, C. N., Kjonigsen, L. J., Hammer, I. M., Bjaalie, J. G., Leergaard, T. B., & Witter, M. P. (2015). A three-plane architectonic atlas of the rat hippocampal region. *Hippocampus*, 25(7), 838-857

Brandão, F. R., de Carvalho Gomes, L., & Chagas, E. C. (2006). Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*, 36(3), 349.

Broshek, D. K., De Marco, A. P., & Freeman, J. R. (2015). A review of post-concussion syndrome and psychological factors associated with concussion. *Brain injury*, 29(2), 228-237.

Caceres, L. G., Bertolino, L. A., Saraceno, G. E., Zubilete, M. A. Z., Uran, S. L., Capani, F., & Guelman, L. R. (2010). Hippocampal-related memory deficits and histological damage induced by neonatal ionizing radiation exposure. Role of oxidative status. *Brain research*, 1312, 67-78.

Cerbai, F., Lana, D., Nosi, D., Petkova-Kirova, P., Zecchi, S., Brothers, H. M., & Giovannini, M. G. (2012). The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain

ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. *PLoS one*, 7(9), e45250.

Chen, F., Zhou, L., Bai, Y., Zhou, R., & Chen, L. (2015). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity accounts for anxiety-and depression-like behaviors in rats perinatally exposed to bisphenol A. *Journal of biomedical research*, 29(3), 250.

Choi, A. N., Lee, M. S., & Lim, H. J. (2008). Effects of group music intervention on depression, anxiety, and relationships in psychiatric patients: a pilot study. *The Journal of alternative and complementary medicine*, 14(5), 567-570.

Czéh, B., Varga, Z. K. K., Henningsen, K., Kovács, G. L., Miseta, A., & Wiborg, O. (2015). Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences. *Hippocampus*, 25(3), 393-405.

de Medeiros, G. F., Pereira, E., Granzotto, N., & Ramos, A. (2013). Low-Anxiety Rat Phenotypes Can Be Further Reduced through Genetic Intervention. *PLoS one*, 8(12), e83666.

Deep, S. N., Baitharu, I., Sharma, A., Gurjar, A. K. S., Prasad, D., & Singh, S. B. (2016). Neuroprotective Role of LN G-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) against Chronic Hypobaric Hypoxia with Crowding Stress (CHC) Induced Depression-Like Behaviour. *PLoS one*, 11(4), e0153371.

Delaunay, F., Khan, A., Cintra, A., Davani, B., Ling, Z. C., Andersson, A., & Okret, S. (1997). Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *Journal of Clinical Investigation*, 100(8), 2094.

Dellavalle, C. T., Daniel, C. R., Aschebrook-Kilfoy, B., Hollenbeck, A. R., Cross, A. J., Sinha, R., & Ward, M. H. (2013). Dietary intake of nitrate and nitrite and risk of renal cell carcinoma in the NIH-AARP Diet and Health Study. *British journal of cancer*, 108(1), 205-212.

De Quervain, D., Schwabe, L., & Roozendaal, B. (2017). Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(1), 7-19

Devi, S. A., & Satpati, A. (2017). Oxidative Stress and the Brain: An Insight into Cognitive Aging. In *Topics in Biomedical Gerontology*. Springer Singapore.(pp. 123-140).

Doyle, K. P., Quach, L. N., Solé, M., Axtell, R. C., Nguyen, T. V. V., Soler-Llavina, G. J., & Schneider, J. A. (2015). B-lymphocyte-mediated delayed cognitive impairment following stroke. *Journal of Neuroscience*, 35(5), 2133-2145.

Duvernoy, H. M. (1988). Anatomy of the Hippocampus. In *The Human Hippocampus* (pp. 25-43). JF Bergmann-Verlag.

El Falougy, H., & Benuska, J. (2006). History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. *Bratislavske lekarske listy*, 107(4), 103.

Engin, E., Smith, K. S., Gao, Y., Nagy, D., Foster, R. A., Tsvetkov, E., & Hajos, M. (2016). Modulation of anxiety and fear via distinct intrahippocampal circuits. *Elife*, 5, e14120.

Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron*, 65(1), 7-19.

Ferreira, R. A., Rosa, W. D. A. G., Silva, V. L. Q., & de Almeida, D. A. (2016). Depressão: Ponto de vista e conhecimento de enfermeiros do Programa Saúde da Família de São Sebastião do Paraíso. *Revista de Iniciação Científica da Libertas*, 5(2).

Gabryel, B., Kasprowska, D., Kost, A., Łabuzek, K., & Urbanek, T. (2014). Astrocytes in ischemic stroke-a potential target for neuroprotective strategies. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 69, 384-397.

Galloway, J. N., Aber, J. D., Erisman, J. W., Seitzinger, S. P., Howarth, R. W., Cowling, E. B., & Cosby, B. J. (2003). The nitrogen cascade. *Bioscience*, 53(4), 341-356.

Gluhchevaa, Y., Ivanovb, I., Petrovaa, E., Pavlova, E., & Vladova, I. (2012). Sodium nitrite-induced hematological and hemorheological changes in rats. *Series on Biomechanic*, 27, 53-58.

Gonchar, O., Mankovskaya, I., & Klyuchko, E. (2006). Role of complex nucleosides in the reversal of oxidative stress and metabolic disorders induced by acute nitrite poisoning. *Indian journal of pharmacology*, 38(6), 414.

Grigoryan, G., & Segal, M. (2016). Lasting differential effects on plasticity induced by prenatal stress in dorsal and ventral hippocampus. *Neural plasticity*, 2016.

Guest, F. L., Martins-de-Souza, D., Rahmoune, H., Bahn, S., & Guest, P. C. (2013). Os efeitos do estresse na função do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal em indivíduos com esquizofrenia. *Rev. psiquiatr. clín.(São Paulo)*, 20-27.

Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 327(1), 1-5.

Huang, C. C., Lai, C. J., Tsai, M. H., Wu, Y. C., Chen, K. T., Jou, M. J., & Wei, I. H. (2015). Effects of melatonin on the nitric oxide system and protein nitration in the hypobaric hypoxic rat hippocampus. *BMC neuroscience*, 16(1), 61.

Jain, N. S., Kannamwar, U., & Verma, L. (2017). Ethanol induced antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test: modulation by serotonergic system. *Psychopharmacology*, 234(3), 447-459.

Joëls, M., Karst, H., Krugers, H. J., & Lucassen, P. J. (2007). Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Frontiers in neuroendocrinology*, 28(2), 72-96.

Khan, A. A., Ramli, N. B., & Ismail, Z. M. (2015). Efectos de la Progesterona en Lesiones por Hipoxia Isquémica en la Región Cornu Ammonis (CA) del Hipocampo en Ratas Neonatas. *International Journal of Morphology*, 33(3), 962-970.

Kohn, M. C., Melnick, R. L., Ye, F., & Portier, C. J. (2002). Pharmacokinetics of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. *Drug metabolism and disposition*, 30(6), 676-683.

Koob, G. F. (2008). A role for brain stress systems in addiction. *Neuron*, 59(1), 11-34.

Lee, J. Y., Lee, H. E., Kang, S. R., Choi, H. Y., Ryu, J. H., & Yune, T. Y. (2014). Fluoxetine inhibits transient global ischemia-induced hippocampal neuronal death and memory impairment by preventing blood–brain barrier disruption. *Neuropharmacology*, 79, 161-171.

Li, W., Huang, R., Shetty, R. A., Thangthaeng, N., Liu, R., Chen, Z., & Forster, M. J. (2013). Transient focal cerebral ischemia induces long-term cognitive function deficit in an experimental ischemic stroke model. *Neurobiology of disease*, 59, 18-25.

Li, X., Huo, X., Zhang, C., Ma, X., Han, F., & Wang, G. (2014). Role of continuous high thoracic epidural anesthesia in hippocampal apoptosis after global cerebral ischemia in rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(4), 1227-1240.

Lino-de-Oliveira, C., De Lima, T. C., & de Pádua Carobrez, A. (2005). Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. *Behavioural brain research*, 158(2), 243-250.

Lipska, B. K., & Weinberger, D. R. (2000). To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*, *23*(3), 223-239.

Maiti, P., Singh, S. B., & Ilavazhagan, G. (2010). Nitric oxide system is involved in hypobaric hypoxia-induced oxidative stress in rat brain. *Acta histochemica*, *112*(3), 222-232.

McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Rawlins, J. N. P., & Bannerman, D. M. (2004). Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behavioral neuroscience*, *118*(1), 63.

Mehrabi, N. F., Waldvogel, H. J., Tippett, L. J., Hogg, V. M., Synek, B. J., & Faull, R. L. (2016). Symptom heterogeneity in Huntington's disease correlates with neuronal degeneration in the cerebral cortex. *Neurobiology of disease*, *96*, 67-74.

Moghadas, M., Edalatmanesh, M. A., & Robati, R. (2016). Histopathological Analysis from Gallic Acid Administration on Hippocampal Cell Density, Depression, and Anxiety Related Behaviors in A Trimethyltin Intoxication Model. *Cell Journal (Yakhteh)*, *17*(4), 659.

Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, *297*(5868), 681-683.

Mueller, S. G., & Weiner, M. W. (2009). Selective effect of age, Apo e4, and Alzheimer's disease on hippocampal subfields. *Hippocampus*, *19*(6), 558-564.

Naik, S. R., Pilgaonkar, V. W., & Panda, V. S. (2006). Evaluation of antioxidant activity of Ginkgo biloba phytosomes in rat brain. *Phytotherapy Research*, *20*(11), 1013-1016.

O'connor, J. C., Lawson, M. A., Andre, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., & Dantzer, R. (2009). Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is

mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase activation in mice. *Molecular psychiatry*, 14(5), 511-522.

O'Mara, S. M., Commins, S., Anderson, M., & Gigg, J. (2001). The subiculum: a review of form, physiology and function. *Progress in neurobiology*, 64(2), 129-155.

Ono, Y., Koizumi, S., & Onozuka, M. (2015). Chewing prevents stress-induced hippocampal LTD formation and anxiety-related behaviors: a possible role of the dopaminergic system. *BioMed research international*, 2015.

Özen, H., Kamber, U., Karaman, M., Gül, S., Atakişi, E., Özcan, K., & Atakişi, O. (2014). Histopathologic, biochemical and genotoxic investigations on chronic sodium nitrite toxicity in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 66(8), 367-375.

Papadopoulou, A., Siamatras, T., Delgado-Morales, R., Amin, N. D., Shukla, V., Zheng, Y. L., & Kino, T. (2015). Acute and chronic stress differentially regulate cyclin-dependent kinase 5 in mouse brain: implications to glucocorticoid actions and major depression. *Translational psychiatry*, 5(6), e578.

Pawluski, J. L., Barakauskas, V. E., & Galea, L. (2010). Pregnancy decreases oestrogen receptor α expression and pyknosis, but not cell proliferation or survival, in the hippocampus. *Journal of neuroendocrinology*, 22(4), 248-257.

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 14(3), 149-167.

Pitychoutis, P. M., Sanoudou, D., Papandreou, M., Nasias, D., Kouskou, M., Tomlinson, C. R., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2014). Forced swim test induces divergent global transcriptomic alterations in the hippocampus of high versus low novelty-seeker rats. *Human genomics*, 8(1), 4.

Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 229(2), 327-336.

Raglio, A., Attardo, L., Gontero, G., Rollino, S., Groppo, E., & Granieri, E. (2015). Effects of music and music therapy on mood in neurological patients. *World journal of psychiatry*, 5(1), 68.

Rotllant, J., & Tort, L. (1997). Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *Journal of Fish Biology*, 51(1), 21-28.

Sadock, B. E. S. Sadock (2007). ciência do comportamento e psiquiatria clínica. *Tradução Cláudia Dornelles [et. al.]*.–9. Ed. Porto Alegre: Artmed.

Scheidt, L., Fries, G. R., Stertz, L., Cabral, J. C. C., Kapczinski, F., & Almeida, R. M. M. D. (2015). Ethanol during adolescence decreased the BDNF levels in the hippocampus in adult male Wistar rats, but did not alter aggressive and anxiety-like behaviors. *Trends in psychiatry and psychotherapy*, 37(3), 143-151.

Scorza, F. A., Arida, R. M., Cysneiros, R. M., Scorza, C. A., Albuquerque, M. D., & CAVALHEIRO, A. (2005). Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. *Arq Neuropsiquiatr*, 63(2-A), 283-288.

Slavich, G. M., & Irwin, M. R. (2014). From stress to inflammation and major depressive disorder: A social signal transduction theory of depression. *Psychological bulletin*, 140(3), 774.

Small, S. A., Schobel, S. A., Buxton, R. B., Witter, M. P., & Barnes, C. A. (2011). A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(10), 585-601.

Thoma, M. V., La Marca, R., Brönnimann, R., Finkel, L., Ehlert, U., & Nater, U. M. (2013). The effect of music on the human stress response. *PloS one*, 8(8), e70156.

Uran, S. L., Aon-Bertolino, M. L., Caceres, L. G., Capani, F., & Guelman, L. R. (2012). Rat hippocampal alterations could underlie behavioral abnormalities induced by exposure to moderate noise levels. *Brain research*, 1471, 1-12.

Van Raalte, D. H., Ouwens, D. M., & Diamant, M. (2009). Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options?. *European journal of clinical investigation*, 39(2), 81-93.

Vannucci, R. C. (1990). Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatric Research*, 27(4), 317-326.

Wang, X. Q., Zhong, X. L., Li, Z. B., Wang, H. T., Zhang, J., Li, F., & Li, Z. Y. (2015). Differential roles of hippocampal glutamatergic receptors in neuropathic anxiety-like behavior after partial sciatic nerve ligation in rats. *BMC neuroscience*, 16(1), 14.

Witter, M. P., Canto, C. B., Couey, J. J., Koganezawa, N., & O'Reilly, K. C. (2014). Architecture of spatial circuits in the hippocampal region. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369(1635), 20120515.

Xu, B., Xiao, A. J., Chen, W., Turlova, E., Liu, R., Barszczyk, A., & Sun, H. S. (2016). Neuroprotective effects of a PSD-95 inhibitor in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Molecular neurobiology*, 53(9), 5962-5970.

Yudofsky, S. C. (Ed.). (2006). *Neuropsiquiatria e neurociências na prática médica*. Artmed.

Zarrindast, M. R., & Khakpai, F. (2015). The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Archives of Iranian Medicine (AIM)*, 18(9).

Zhang, X., Huang, X., Fang, C., Li, Q., Cui, J., Sun, J., & Li, L. (2016). miR-124 Regulates the Expression of BACE1 in the Hippocampus Under Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Molecular neurobiology*, 1-9.

Zhou, J., Zhuang, J., Li, J., Ooi, E., Bloom, J., Poon, C., & Barone, F. C. (2013). Long-term post-stroke changes include myelin loss, specific deficits in sensory and motor behaviors and complex cognitive impairment detected using active place avoidance. *PloS one*, 8(3), e57503.

ANEXO

Comprovantes CEUA



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 08 de novembro de 2013.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"INFLUÊNCIA DA MUSICOTERAPIA NO SISTEMA NERVOSO EM DESENVOLVIMENTO: UMA AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL"**, UnBDOC n.º 80243/2013, sob responsabilidade da Professora Vânia Moraes Ferreira foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Fernando Pacheco Rodrigues
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 10 de julho de 2014.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"APLICABILIDADE DA MUSICOTERAPIA NAS COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS DECORRENTES DA HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA"**, UnBDoC n.º 67736/2014, sob responsabilidade da Professora Vânia Ferreira foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.