



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

Sávio Reder de Souza

**Efeitos do controle de temperatura e da vimpocetina sobre os déficits neurocomportamentais decorrentes do estresse por separação materna em camundongos suíços neonatos**

Rio de Janeiro

2015

Sávio Reder de Souza

**Efeitos do controle de temperatura e da vimpocentina sobre os déficits neurocomportamentais decorrentes do estresse por separação materna em camundongos suíços neonatos**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Sávio Reder de.  
Efeitos do controle de temperatura e da vimpocetina sobre os déficits neurocomportamentais decorrentes do estresse por separação materna em camundongos suíços neonatos / Sávio Reder de Souza. – 2015.  
89 f.

Orientador: Cláudio Carneiro Filgueiras.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Transtorno do Deficit de Atenção com Hiperatividade - Teses. 2. Estresse Fisiológico. 3. Relações Mãe-Filho. 4. Temperatura Ambiente. 5. Nootrópicos - Uso terapêutico. 6. Alcalóides de Vinca - Uso terapêutico. I. Filgueiras, Cláudio Carneiro. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.89-008.43

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Sávio Reder de Souza

**Efeitos do controle de temperatura e da vimpocetina sobre os déficits neurocomportamentais decorrentes do estresse por separação materna em camundongos suíços neonatos**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 06 de março de 2015.

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras (Orientador)  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mário Fritsch Toros Neves  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Bruna Romana de Souza  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Pablo Pandolfo  
Universidade Federal Fluminense

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Paula Campello Costa Lopes  
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2015

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Mauro Gomes de Souza (*in memoriam*) e Maria Suely Reder de Souza, por terem construído tudo o que eu sou.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Professor Doutor Cláudio Carneiro Filgueiras, meu orientador, por ter conduzido, gentil e eficazmente, a realização deste trabalho.

Agradeço, ainda, ao Professor Doutor Alex Christian Manhães que, por sua visão de futuro, ainda como Coordenador Geral do Programa de Fisiopatologia Clínica e Experimental (FISCLINEX), me estimulou a realizar o processo seletivo para o Doutorado.

Finalmente, agradeço aos demais docentes do FISCLINEX, especialmente da Neurofisiologia e da Fisiologia Endócrina, bem como a todos os colaboradores, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

Sonhos determinam o que você quer.  
Ação determina o que você conquista.

*Aldo Novak*

## RESUMO

SOUZA, Sávio Reder de. **Efeitos do controle de temperatura e da vimpocetina sobre os déficits neurocomportamentais decorrentes do estresse por separação materna em camundongos suíços neonatos**. 2015. 89 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O estresse durante o desenvolvimento está associado com diversas desordens neurocomportamentais, que podem persistir ao longo da vida. A hiperatividade é um dos transtornos comportamentais que, com maior frequência, observa-se em humanos submetidos ao estresse precoce. Esse transtorno pode ser a manifestação clínica predominante, ou mesclar-se com déficit de atenção, impulsividade e retardo da aprendizagem, constituindo o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), com número de casos diagnosticados em ascensão. Diversos protocolos experimentais utilizam a separação materna (SM) de roedores neonatos para mimetizar as consequências do estresse precoce em humanos. Esta predileção por roedores recém-nascidos se deve à sua equivalência aproximada com fetos humanos no terceiro trimestre da gestação em termos de neurodesenvolvimento, quando ocorre o maior crescimento do Sistema Nervoso Central fetal. Neste trabalho, camundongos suíços neonatos foram submetidos a sessões diárias de isolamento com separação materna, entre o 2º e o 10º dias de vida pós-natal (PN2 a PN10), variando-se a temperatura de isolamento dos filhotes, que permaneciam sem aquecimento (na temperatura do biotério, entre 22 e 25°C) ou eram mantidos aquecidos a 37°C durante essas sessões. Portanto, foram três grupos experimentais: isolamento aquecido com SM; isolamento não aquecido com SM; e controle. Os animais do grupo controle foram pesados em PN2 e PN10 e, prontamente, devolvidos às progenitoras. Todos os animais foram desmamados e sexados em PN21, não sendo perturbados até a realização dos testes neurocomportamentais, a partir de PN30, que incluíram os Testes de Campo Aberto e de Esquiva Inibitória. Num segundo estudo, foram realizadas dosagens séricas da corticosterona basal e dos hormônios tireoidianos nos três grupos experimentais, em PN6, PN10 e PN30. Finalmente, num terceiro estudo, camundongos do grupo controle e do grupo submetido ao isolamento não aquecido com SM foram tratados com vimpocetina (20g/kg), um neuroprotetor potencial, ou com veículo (Dimetilsulfóxido), a fim de avaliar os efeitos da vimpocetina na atividade locomotora. O 1º estudo demonstrou que a temperatura foi um fator crítico para a manifestação de hiperatividade locomotora no Teste do Campo Aberto, que ocorreu, somente, nos animais do grupo submetido ao isolamento não aquecido. Adicionalmente, não houve diferenças entre os grupos experimentais no Teste da Esquiva Inibitória, quanto à memória e à aprendizagem. O 2º estudo demonstrou que a temperatura do isolamento influenciou os níveis da corticosterona basal e dos hormônios tireoidianos em PN10 e em PN30. No 3º estudo, a vimpocetina reduziu a hiperatividade locomotora no grupo de animais submetidos ao isolamento não aquecido com SM. De todo o exposto, conclui-se que o isolamento com SM de camundongos suíços neonatos à temperatura de 22 a 25°C aumentou a atividade locomotora nesses animais, e que a vimpocetina foi capaz de atenuar esse comportamento, sem aumento da mortalidade. Finalmente, considerando-se o maior risco de desenvolvimento do TDAH em crianças e adolescentes com históricos de prematuridade, levanta-se a hipótese de que o estresse térmico pelo frio seja um dos fatores envolvidos na fisiopatogenia da hiperatividade nesses casos.

Palavras-chave: Estresse neonatal. Hiperatividade. Vimpocetina.



## ABSTRACT

SOUZA, Sávio Reder de. **Effects of the temperature control and vinpocetine on neurobehavioral deficits resulting from stress by maternal separation of neonate swiss mice**. 2015. 89 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The stress during development is associated with several neurobehavioral disorders that can persist into postnatal life. Hyperactivity is one of these disorders that is frequently observed in humans early exposed to the early stress. This disorder may be the predominant clinical manifestation, or merge itself with attention deficit, impulsivity and impaired learning, composing the Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), with the number of diagnosed cases on the rise. Several experimental protocols use maternal separation (MS) of newborn rodents to mimic the effects of early life stress in humans. This predilection for newborn rodents is due to its approximate equivalence with human fetuses at the 3rd trimester of pregnancy in terms of neurodevelopment, when there is the greatest growth of the fetal Central Nervous System (CNS). This work was carried out in three separate studies. In the first study, Swiss mice underwent daily sessions of isolation with maternal separation between the 2nd day of postnatal life (PN2) to PN10, varying the isolation temperature of the puppies, that were kept without heating (with the room temperature between 22 and 25° C) or heated at 37 °C during these sessions. Therefore, we had three groups: “warmed isolation with MS”; “unheated isolation with MS”; and control. Control group animals were weighed in PN2 and PN10 and promptly returned to its progenitors. All animals were weaned and sexed in PN21–and were tested from PN30 in the Open Field and Inhibitory Passive Avoidance. In a second study, serum basal corticosterone and thyroid hormones were measured in the three experimental groups at PN6, PN10 and PN30. Finally, in a third study, mice from the control group and the group “unheated isolation with MS” were treated with Vinpocetine (20g / kg), a drug with potential neuroprotective effects, or vehicle (dimethylsulfoxide), in order to evaluate the effects of Vinpocetine on locomotor activity. The 1st study showed that the temperature was critical for the manifestation of locomotor hyperactivity in the Open Field Test, since it took place only in the group submitted to the unheated isolation. There were no differences among groups in the Inhibitory Avoidance Test concerning to memory and learning. The 2nd study showed that the temperature during isolation influenced significantly the levels of basal corticosterone and thyroid hormones in PN10 and PN30. In the 3rd study, Vinpocetine reduced the locomotor hyperactivity in animals submitted to the unheated isolation. Our results suggest that the temperature during neonatal isolation is an important factor to manifestation of neuroendocrine disorders caused by early stress in mice, and that Vinpocetine was able to mitigate them, without increasing mortality. Finally, considering that many cases of hyperactivity in human children are related to prematurity, raises the hypothesis that thermal stress by cold is one of the factors involved in the pathogenesis of hyperactivity in these cases.

Keywords: Neonatal stress. Hyperactivity. Vinpocetine.

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 (A e B)-	Médias ( $\pm$ EPM) da massa corpórea em gramas dos animais dos grupos controle, isolamento aquecido e isolamento não aquecido durante o período de isolamento (de PN2 para PN10) [A] e durante o período de teste [B].....	48
Gráfico 2 (A e B)-	Médias ( $\pm$ EPM) da distância percorrida pelos animais dos grupos controle, isolamento aquecido e isolamento não aquecido ao longo dos 10 intervalos de tempo [A] e no tempo total do teste [B].....	49
Gráfico 3-	Médias ( $\pm$ EPM) da latência para descida da plataforma dos animais dos grupos controle, isolamento aquecido e isolamento não aquecido na primeira (S1), segunda (S2) e terceira (S3) sessões experimentais.....	50
Gráfico 4 (A e B)-	Médias ( $\pm$ erro padrão da média) dos valores obtidos para as diferenças entre as latências na primeira (L1) e na segunda (L2) [A] e entre as latências na primeira (L1) e na terceira (L3) sessões [B].....	51
Gráfico 5 (A e B)-	Dosagens de Corticosterona em PN6 e PN10. (A) Dosagens da corticosterona em PN6; (B) Dosagens da Corticosterona em PN10.....	52
Gráfico 6-	Dosagens da corticosterona em PN30.....	53
Gráfico 7 (A e B)-	Dosagens do T3. (A) Dosagens do T3 no período de isolamento; (B) Dosagens do T3 em PN30.....	54
Gráfico 8 (A e B)-	Dosagens do T4. (A) Dosagens do T4 no período de isolamento; (B) Dosagens do T4 em PN30.....	55
Gráfico 9 (A e B)-	Médias ( $\pm$ EPM) da massa corpórea em gramas dos animais dos grupos controle e isolamento não aquecido no início (PN2) e final (PN10) do período de isolamento [A] e durante o período de teste [B].....	57
Gráfico 10-	Médias ( $\pm$ EPM) da ambulação total no centro e na periferia do campo aberto.....	58

Gráfico 11-	Médias ( $\pm$ EPM) da ambulação total no teste de campo aberto dos animais submetidos ao isolamento não aquecido do segundo ao décimo dia pós-natal e tratados com 20mg/kg de Vimpocetina (Vp20) ou solução veículo (DMSO).....	59
Gráfico 12-	Médias ( $\pm$ EPM) da razão entre a ambulação no centro e periferia no teste de campo aberto dos animais submetidos ao isolamento não aquecido do segundo ao décimo dia pós-natal (isolado) e tratados com 20mg/kg de vimpocetina (Vp20) ou solução veículo (DMSO).....	60

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Esquema da molécula da vimpocetina.....	34
Fotografia 1.	Monitor de atividade do teste de campo aberto.....	38
Fotografia 2.	Recipiente para o teste da esquiva inibitória.....	39
Tabela 1.	Número de ninhadas por grupo experimental no estudo 2.....	41
Tabela 2.	Número de ninhadas por grupo experimental no estudo 3.....	44
Quadro 1.	Comparativo entre diferentes protocolos de separação materna quanto à idade e duração da separação, e ao grau de atividade locomotora.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
AA	Active avoidance
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de Variância
Ca <sup>++</sup>	Íon cálcio
CM	Circular maze
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CREB	cAMP Responsive Element Binding Protein
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DSM-IV-TR	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th Edition, Text Revision
EPM	Erro padrão médio
FLSD test	Fisher's Least Significant Difference Test
g	Grama
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HHA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
LTP	Long-Term Potentiation
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma
MWM	Morris water maze task
ng/dl	Nanograma por decilitro
NIH	National Institutes of Health
OR	Object recognition
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Protein kinase A
PKG	Protein kinase G
SM	Social memory

SNC	Sistema Nervoso Central
SRF	Serum Response Factor
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade
TM	T-maze
Vp20	Vimocetina na dose de 20 miligramas/quilograma
YM	Y-maze

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>ESTRESSE E SISTEMA NERVOSO CENTRAL</b> .....	19
1.1	<b>Impacto do estresse na função do sistema nervoso</b> .....	19
1.2	<b>Efeitos neurocomportamentais do estresse durante o desenvolvimento</b> .....	20
1.2.1	<u>Estresse pré-natal e aprendizado e memória</u> .....	22
1.2.2	<u>Estresse pré-natal e Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH)</u> .....	23
1.3	<b>Limitações dos estudos em humanos</b> .....	25
1.4	<b>Uso de roedores para o estudo dos déficits neurocomportamentais induzidos pelo estresse precoce</b> .....	26
1.4.1	<u>Teste de campo aberto como modelo para avaliar a hiperatividade em roedores submetidos ao estresse precoce</u> .....	27
1.4.2	<u>Modelos utilizados para avaliar os déficits de memória e aprendizado em roedores submetidos ao estresse precoce</u> .....	28
1.4.3	<u>Surto de crescimento cerebral</u> .....	29
1.4.4	<u>Técnicas para induzir em roedores o estresse durante o desenvolvimento</u> .....	31
1.5	<b>Mecanismos envolvidos com a manifestação e o tratamento dos efeitos deletérios do estresse</b> .....	32
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	36
3.1	<b>Avaliação do efeito do controle da temperatura do ambiente durante o isolamento com separação materna no período neonatal na manifestação da hiperatividade locomotora em camundongos adolescentes</b> .....	36
3.1.1	<u>Formação dos grupos experimentais</u> .....	36
3.1.2	<u>Teste de campo aberto</u> .....	37
3.1.3	<u>Teste da esQUIVA inibitória</u> .....	38
3.1.4	<u>Análise estatística</u> .....	40
3.2	<b>Avaliação do efeito do controle da temperatura do ambiente durante o isolamento materno nos níveis de corticosterona e hormônios tireoidianos de camundongos neonatos e adolescentes</b> .....	40

3.2.1	<u>Formação dos grupos experimentais</u> .....	40
3.2.2	<u>Dosagens hormonais</u> .....	41
3.2.2.1	Corticosterona.....	42
3.2.2.2	Hormônios tireoidianos.....	42
3.2.3	<u>Análise estatística</u> .....	42
3.3	<b>Avaliação do efeito da vimpocetina na hiperatividade locomotora induzida pela separação materna no período neonatal</b> .....	43
3.3.1	<u>Formação dos grupos experimentais</u> .....	43
3.3.2	<u>Preparação das soluções de vimpocetina</u> .....	44
3.3.3	<u>Teste de campo aberto</u> .....	45
3.3.4	<u>Análise estatística</u> .....	45
4	<b>RESULTADOS</b> .....	47
4.1	<b>Estudo 1: Avaliação do efeito do controle da temperatura do ambiente durante o isolamento com separação materna no período neonatal na manifestação da hiperatividade locomotora em camundongos adolescentes</b> ....	47
4.1.1	<u>Taxa de Mortalidade</u> .....	47
4.1.2	<u>Ganho de peso</u> .....	47
4.1.3	<u>Teste de Campo Aberto</u> .....	48
4.1.4	<u>Teste de Esquiva Inibitória</u> .....	49
4.2	<b>Estudo 2: Efeito do controle da temperatura do ambiente nas alterações hormonais induzidas pela separação materna no período neonatal</b> .....	51
4.2.1	<u>Corticosterona Plasmática</u> .....	51
4.2.2	<u>Hormônios Tireoidianos</u> .....	53
4.3	<b>Estudo 3: Efeito da vimpocetina na hiperatividade locomotora induzida pela separação materna no período neonatal</b> .....	55
4.3.1	<u>Taxa de Mortalidade</u> .....	56
4.3.2	<u>Ganho de peso</u> .....	56
4.3.3	<u>Teste de Campo Aberto</u> .....	57
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	61
5.1	<b>Resumo dos resultados</b> .....	61
5.2	<b>O isolamento neonatal não afetou o ganho de massa corpórea</b> .....	62
5.3	<b>O isolamento neonatal com separação materna resultou em hiperatividade locomotora somente no grupo de animais submetido ao isolamento sem</b>	



	<b>aquecimento.....</b>	<b>63</b>
5.4	<b>O isolamento neonatal sem aquecimento aumentou a atividade locomotora no centro do campo aberto.....</b>	<b>67</b>
5.5	<b>Não houve alteração na aprendizagem e na memória dos animais em decorrência do isolamento neonatal com separação materna.....</b>	<b>68</b>
5.6	<b>Houve redução das latências de descida na primeira sessão da esquiva inibitória no grupo submetido ao isolamento não aquecido.....</b>	<b>70</b>
5.7	<b>A corticosterona plasmática no final do período de isolamento estava mais elevada nos animais que foram submetidos ao isolamento não aquecido.....</b>	<b>70</b>
5.8	<b>Os animais que foram submetidos ao isolamento não aquecido apresentaram os níveis de T3 e T4 menores que aqueles observados nos animais dos demais grupos experimentais, respectivamente, no final do período de isolamento e no início da adolescência.....</b>	<b>72</b>
5.9	<b>Na adolescência, os animais submetidos ao isolamento aquecido não manifestaram hiperatividade, mas apresentaram níveis maiores de corticosterona basal na comparação com os demais grupos experimentais.....</b>	<b>73</b>
5.10	<b>A vimpocetina normalizou a atividade locomotora de camundongos suíços adolescentes, previamente submetidos ao isolamento neonatal não aquecido com separação materna.....</b>	<b>74</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>

## INTRODUÇÃO

O conceito de estresse tem sido matéria de debate desde que foi primeiramente utilizado na literatura científica por Hans Selye para definir uma reação inespecífica do corpo em resposta a um estímulo nocivo ou situação de risco (Selye, 1950). Esta resposta inespecífica, que ocorria quando ratos eram expostos a vários tipos de agentes nocivos (como frio, injúria cirúrgica, choque medular ou intoxicações sub-letais), envolvia o encolhimento de órgãos como o timo, baço, nódulos linfáticos, fígado e tecido adiposo, úlceras estomacais, edema, perda de tônus muscular, queda da temperatura corporal e congestão das glândulas adrenais. A partir da década de 50, o conceito de estresse foi refinado para distinguir entre o estressor e a resposta ao estresse. Em linhas gerais, o estressor passou a ser considerado um estímulo que ameaça a homeostase enquanto que, a resposta ao estresse, a reação do organismo destinada a recuperar a homeostase (Koolhaas *et al.*, 2011). No início da década de 90, foi introduzida a idéia de que o estresse deve ser considerado como um processo que inclui três componentes: um estímulo, o processamento perceptivo deste estímulo e a respectiva resposta comportamental e fisiológica (Levine, 2005). Mais recentemente um quarto componente vem sendo considerado, o *feedback* da resposta ao estresse, que implica na condução das informações a respeito das mudanças periféricas causadas pelo estresse ao cérebro e que, muitas vezes, é responsável pelo aumento da sensação de estresse (Ursin e Eriksen, 2004).

Os estímulos que desencadeiam o estresse podem ser variados, como por exemplo, fatores psicossociais, enfermidades psiquiátricas, traumas físicos como acidentes ou violência (Gaviria A., 2006). De modo geral, se um estímulo vai ou não desencadear o estresse depende da avaliação individual da situação e esta se baseia, em grande parte, na experiência prévia e nas consequências esperadas. Um mesmo estímulo pode ser positivo para alguns indivíduos e negativo para outros (Ursin e Eriksen, 2004).

As respostas fisiológicas ao estresse abrangem, principalmente, o sistema simpático-adrenomedular e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Em linhas gerais, estes dois sistemas desempenham um papel fundamental na mobilização de energia e redistribuição do oxigênio e nutrientes para ativação de órgãos e tecidos, uma função metabólica que vai além do estresse *per se*. Desta forma, de um ponto de vista fisiológico pode se dizer que tanto o eixo HHA como o sistema simpático-adrenomedular tem uma função crucial na preparação metabólica e cardiovascular do organismo para o desempenho do comportamento (Koolhaas

*et al.*, 2011). Durante a exposição ao agente estressor, o sistema nervoso autônomo simpático pode ser ativado de modo massivo e provocar alterações rápidas no estado fisiológico, que levam o organismo a um conjunto de respostas imediatas classicamente conhecidas como reação de “luta ou fuga”. Em situações de luta e fuga, a liberação de noradrenalina pelos terminais nervosos simpáticos ativam a glândula adrenal (supra-renal), o que induz a liberação de adrenalina na corrente sanguínea. Uma vez que a adrenalina é capaz de ativar os mesmos receptores ativados pela noradrenalina simpática, ativação da adrenal atua em sinergia com a estimulação simpática. O eixo HHA responde ao estímulo estressor através da ativação dos neurônios do hipotálamo que secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH, do inglês *Corticotropin-Releasing Hormone*). O CRH age na hipófise, induzindo a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *Adrenocorticotropic Hormone*), que atua no córtex da adrenal induzindo a produção dos glicocorticóides. Os glicocorticóides atuam na mobilização de energia armazenada no organismo e têm papel fundamental no término da resposta ao estresse através do *feedback* negativo no eixo HHA (Lent, 2010) (Zuardi, 2013).

Os glicocorticóides atuam, predominantemente, por meio da ligação a dois receptores intracelulares, que atuam como ligantes de fatores de transcrição ativados, sendo que um deles possui alta afinidade pelos glicocorticóides (receptores de glicocorticóides) e o outro, pelos mineralocorticóides (receptores de mineralocorticóides) (De Kloet *et al.*, 1998). Esses receptores são ativados pelo aumento dos níveis séricos de glicocorticóides em resposta ao estresse ou pelo pico circadiano de concentração, que é matinal em humanos, e vespertino/noturno em roedores. Os receptores de glicocorticóides se distribuem, amplamente, no cérebro, sendo encontrados nos córtices frontal e cingulado, hipocampo, núcleos basomedial e basolateral da amígdala, acumbente e tálamo, mas se encontrando, em maior número, nos neurônios hipotalâmicos produtores de CRH e na hipófise, onde eles atuam no *feedback* negativo do eixo. Os receptores de mineralocorticóides, por sua vez, estão em maior concentração no hipocampo, podendo participar da regulação da aprendizagem e da memória (De Kloet *et al.*, 1998).

Quando a resposta ao estresse ocorre de maneira aguda e dentro dos limites fisiológicos é considerada uma adaptação fisiológica, que instrumenta o organismo para reagir às adversidades do ambiente. Porém, a partir do momento em que a exposição ao agente estressor se torna frequente, ou extrapola a capacidade funcional da maquinaria que cuida da homeostasia, a reação orgânica ao estresse pode resultar no desenvolvimento de doenças (Le Moal, 2007). Dentre as doenças mais comumente associadas como o estresse estão a

aterosclerose, que pode causar acidentes vasculares encefálicos e infartos do miocárdio (Mcewen, 2007), a hipertensão arterial, diabetes, aumento dos depósitos de gordura, imunossupressão e maior suscetibilidade a infecções. Além disso, pode ocorrer formação de úlcera péptica e síndrome do cólon irritável em decorrência dos efeitos do estresse sobre o sistema gastrointestinal. Estudos recentes mostram que o estresse também pode interferir sobre os processos de crescimento, reprodução e sono (Zuardi, 2013).

Por sua vez, os efeitos do estresse, tanto agudo quanto crônico, sobre o desenvolvimento do SNC apenas começam a ser compreendidos e, do mesmo modo, as suas consequências clínicas.

## 1 ESTRESSE E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

### 1.1 Impacto do estresse na função do sistema nervoso

Em situações normais, os estímulos ambientais ou da vida cotidiana provocam reações emocionais fisiológicas que são mantidas em limites homeostáticos, e que retornam ao estado de equilíbrio pré-fixado uma vez que se tenha extinguido o estímulo elicitor. Entretanto, se o estímulo é duradouro ou repetitivo, essas reações são potencializadas por uma espécie de memória biológica, em que sua intensidade não retorna à situação homeostática anterior. (Le Moal, 2007). Eventos estressantes em nossas vidas deixam vestígios no cérebro e a maior parte deles são devidos às suas consequências emocionais, que se associam com alterações sustentadas das secreções de hormônios e de neurotransmissores. A liberação de cortisol em resposta ao estresse, determina altas concentrações desses hormônios em áreas do sistema nervoso central (Bangasser e Shors, 2010). Como o hipocampo e o córtex pré-frontal são ricos em receptores para glicocorticóides, em geral é bem aceita a idéia de que, durante a resposta ao estresse, o cortisol pode influenciar as funções mediadas por estas áreas (Joëls, 2007; Mcklveen *et al.*, 2013). A liberação excessiva de glicocorticóides frente ao estresse crônico inibe a transcrição de moléculas de adesão nucleares, o que prejudica a plasticidade sináptica, a formação da memória e a habilidade cognitiva (Hasan *et al.*, 2012). Um exemplo desse efeito é o que ocorre com pacientes que sofrem da Síndrome de Cushing, que liberam grandes quantidades de cortisol e apresentam dificuldades de memória e de desempenho em testes cognitivos, que são revertidos quando os níveis do hormônio são normalizados (Bangasser e Shors, 2010). Além disso, a neurogênese em adultos ocorre, comumente, no giro dentado do hipocampo de mamíferos, incluindo humanos, e essa característica parece ser importante para a função normal do hipocampo no aprendizado e na memória (Schoenfeld e Gould, 2012). Os glicocorticóides, entre outros neuroquímicos, têm sido implicados na redução da neurogênese em adultos induzida pelo estresse (Schoenfeld e Gould, 2012).

O córtex pré-frontal (CPF) é uma das regiões mais sensíveis aos efeitos deletérios do estresse (Arnsten, 2009). O estresse agudo incontrolável, ainda que leve, pode causar perda rápida e intensa das habilidades cognitivas pré-frontais e, se houver exposição prolongada, resultar em alterações arquiteturais nos dendritos pré-frontais. A redução no funcionamento

do CPF que ocorre durante o estresse é importante para a compreensão da inter-relação entre as saúdes física e mental do ser humano. A perda do autocontrole mental que ocorre durante a exposição ao estresse pode permitir uma série de comportamentos deletérios à saúde física, tais como o uso de drogas, tabagismo, consumo de álcool e aumento da ingestão alimentar (Li e Sinha, 2008). O estresse prolongado é uma das principais causas de depressão, e a exposição ao estresse agudo intenso pode resultar em Transtorno de Estresse Pós-Traumático (Arnsten, 2009). Adicionalmente, o estresse pode exacerbar os sintomas da esquizofrenia e do Transtorno Afetivo Bipolar, por exemplo, desencadeando um estado maníaco (Arnsten, 2009).

## 1.2 Efeitos neurocomportamentais do estresse durante o desenvolvimento

Durante o desenvolvimento o sistema nervoso é particularmente vulnerável ao estresse. O desenvolvimento do sistema nervoso é marcado por uma sequência complexa de eventos que inclui a formação das células nervosas (neurogênese), a migração das células nervosas para suas posições finais no tecido nervoso, o crescimento axonal e a formação das conexões sinápticas, a morte celular programada e o refinamento das conexões. Em cada região do sistema nervoso, o curso temporal destes eventos é controlado por uma complexa rede de sinalização que regula de modo preciso a expressão gênica dos diversos tipos celulares envolvidos. Desta forma, qualquer perturbação em uma das etapas do desenvolvimento neural pode comprometer de modo significativo o desenvolvimento subsequente e acarretar em prejuízos geralmente irreversíveis para a vida do indivíduo.

O estresse materno durante a gestação aumenta os níveis plasmáticos de cortisol e de CRH na mãe e, conseqüentemente, no feto (Weinstock, 2008). A placenta também produz CRH que, ao contrário da regulação negativa sofrida pela síntese do CRH no hipotálamo frente ao aumento da cortisolemia, sofre *feedback* positivo do cortisol presente na circulação materna. O CRH placentário, produzido por estímulo do cortisol materno, desencadeia eventos que estimulam a atividade do miométrio, predispondo à prematuridade (Sandman *et al.*, 2005). Adicionalmente, a exposição do feto a níveis elevados de cortisol materno durante a segunda metade da gestação foi associada com maior e mais duradoura liberação de cortisol frente ao estresse no neonato (Sandman *et al.*, 2005). Essa observação é condizente ainda com

a que relaciona a injeção de glicocorticóides sintéticos entre o final do segundo trimestre e o início do terceiro trimestre da gestação com uma resposta amplificada do cortisol ao estresse em neonatos nascidos a termo (Sandman *et al.*, 2005). Este aumento da atividade do eixo HHA pode comprometer as funções cognitivas, motoras e emocionais da criança após o nascimento (Sandman *et al.*, 2005).

Segundo diversos estudos, os hormônios de estresse maternos e da placenta exercem influência marcante sobre o comportamento e programação do desenvolvimento do sistema nervoso e do eixo HHA fetais (Sandman *et al.*, 2005). A programação é o processo através do qual um evento (p.ex. alteração do estado fisiológico, estimulação sensorial ou contato com agente neurotóxico) ocorrido durante um período crítico do desenvolvimento afeta o cérebro de modo duradouro ou permanente, alterando sua estrutura e/ou função, ou ainda aumentando o risco de desenvolvimento de doenças (Sandman *et al.*, 2005).

A maior parte da informação a cerca dos efeitos de longo prazo na prole decorrentes do estresse emocional sofrido por gestantes humanas foi obtida por meio de estudos retrospectivos. Esse estresse emocional pode resultar da ação do homem, como em guerras ou atos terroristas, mas também de causas naturais, como terremotos e tempestades, entre outros. Além disso, tensões interpessoais e adversidades, tanto no ambiente familiar quanto no trabalho, também podem produzi-lo. Esses estudos têm evidenciado a associação entre o estresse materno durante a gestação e a ocorrência de déficit intelectual leve e de falhas no desenvolvimento da linguagem na prole (Watson *et al.*, 1999; Brouwers *et al.*, 2001). Outros transtornos comportamentais relatados na prole dessas gestantes incluem déficit de atenção, esquizofrenia, ansiedade e depressão, bem descritos em trabalhos anteriores (Kofman, 2002; Weinstock, 2008).

Estudos prospectivos mais recentes examinaram os efeitos da ansiedade materna auto-relatada em diferentes períodos da gestação sobre o comportamento da prole dessas mulheres, independentemente da evidência direta de estresse psicológico. Tais crianças eram mais irritáveis, e apresentavam maior incidência de transtornos alimentares e de problemas do sono que aquelas nascidas de mães não-ansiosas (Huizink *et al.*, 2002; De Weerth *et al.*, 2003). Finalmente, os filhos das mães ansiosas foram mais propensos a apresentar problemas emocionais, além de déficits de atenção e hiperatividade, resultando em mais baixos desempenhos escolares (Weinstock, 2008).

Vale mencionar que o período de vulnerabilidade do sistema nervoso ao estresse vai além do período gestacional. Pesquisas recentes têm demonstrado maior incidência de

transtornos mentais entre indivíduos expostos ao estresse durante a infância, tais como depressão, esquizofrenia, transtorno bipolar e abuso de substâncias (Brietzke *et al.*, 2012). Uma série de eventos pode desencadear estresse durante a infância. Habitualmente, o estresse em crianças decorre de situações novas, com as quais a crianças não estão familiarizadas, além de situações imprevisíveis, de expectativas incertas, da antecipação de algo desagradável ou do medo do fracasso. Mais especificamente, a maioria das causas de ansiedade infantil nasce de eventos estressantes ou da tensão interpessoal no ambiente familiar ou na escola. (Washington, 2009). De modo geral, algumas crianças vão considerar os eventos como sendo mais ou menos estressantes do que outras, dependendo da atitude mental e de suas crenças (Washington, 2009). Desse modo, nem todas as crianças terão os mesmos níveis de estresse em circunstâncias similares.

### 1.2.1 Estresse pré-natal e aprendizado e memória

A memória consiste na capacidade de armazenamento de informações, que podem ser recuperadas e utilizadas posteriormente. O processo de formação da memória baseia-se em duas etapas principais, a aquisição de informação (aprendizagem) e a retenção da informação, que pode ser de curto ou de longo prazo.

Existem várias classificações dos tipos de memória, mas se pode dizer que os mais utilizados são aqueles que dividem a memória entre de curto ou longo prazo, e entre declarativa ou explícita (consciente) e não-declarativa ou implícita (inconsciente) (Xavier, 1993). A memória declarativa é utilizada para recordar significados, fatos e eventos conscientemente, enquanto a memória não-declarativa é importante para criação de hábitos e habilidades, de comportamentos condicionados e da aprendizagem não associativa, não estando acessível à consciência, e sendo evidenciável somente através do desempenho (Xavier, 1993). Xavier (Xavier, 1993) defende a inclusão da memória operacional, que seria capaz de acessar conteúdos dos sistemas de curto e longo prazo, mantendo-se por tempo variável, mas transitório, em função da utilidade da informação. Ela contém os objetivos de processamento e ação em curso, possuindo, portanto, uma função integradora.

Alguns estudos têm demonstrado que o aumento dos hormônios do estresse durante a gravidez pode resultar em déficits de memória e aprendizagem. Filhos de mães que passaram



por desastres naturais ou por outros estressores durante a gestação apresentaram habilidades cognitivas reduzidas entre os 5 e 7 anos de idade, entre os 8 e 9 anos de idade e na adolescência (Schwabe *et al.*, 2012). A associação entre estresse pré-natal e distúrbios da memória e da aprendizagem tem sido reportada desde muito cedo no desenvolvimento. Níveis elevados de CRH placentário durante o último trimestre da gestação, o que potencialmente reflete altos níveis de estresse, são associados com um prejuízo na habituação de fetos (Sandman *et al.*, 1999). Tais déficits podem estar relacionados às alterações na estrutura do hipocampo e com redução nas projeções especializadas dos dendritos de neurônios pós-sinápticos (Dal Bello *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012 ). Ademais, o estresse materno durante a gestação induz a liberação excessiva de corticosterona o que tem sido relacionado à redução do número de receptores de corticosteroides no hipocampo (Lemaire *et al.*, 2000).

### 1.2.2 Estresse pré-natal e Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH)

O TDAH é uma desordem psiquiátrica comum que afeta de maneira negativa as funções da vida social e acadêmica dos indivíduos (Curatolo *et al.*, 2010). Em linhas gerais, o TDAH é caracterizado como um padrão persistente (por pelo menos 6 meses) de desatenção, hiperatividade e impulsividade que causa prejuízos individuais e sociais em pelo menos dois contextos diferentes (casa e escola, por exemplo), de acordo com o DSM-IV-TR (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th Edition, Text Revision*) da Associação Psiquiátrica Americana.

Tal transtorno costuma manifestar-se desde o início da infância sendo mais evidente em crianças em idade escolar, com prevalência variando entre 8%-12%; esta prevalência tende a diminuir com o aumento da idade, mas os sintomas persistem, na idade adulta, em cerca de 50% dos pacientes diagnosticados (Grizenko *et al.*, 2008) (Gaviria A., 2006) (Skounti *et al.*, 2007). Em crianças, a hiperatividade é caracterizada por inquietação, incapacidade de permanecer sentado. A impulsividade envolve falar excessivamente, responder sem pensar, e a inabilidade de esperar a sua vez, com interrupções frequentes do outro. O déficit de atenção pode envolver incapacidade de concluir as tarefas, organizar e manter os esforços, bem como o esquecimento e a distração (Konopka, 2014). Adicionalmente, nem todos os pacientes considerados hiperativos e impulsivos possuem

déficit de atenção, e vice-versa, demonstrando a heterogeneidade dessa condição, e contribuindo para o confundimento dos critérios de diagnóstico do TDAH.

Várias pesquisas têm revelado que a etiologia do TDAH inclui múltiplos fatores, internos e externos, relacionando a suscetibilidade ao TDAH a diversos genes e à programação fetal por meio da interferência de fatores ambientais (Rohde e Halpern, 2004). Uma possível predisposição genética pode estar presente em 60 a 90% dos casos (Curatolo *et al.*, 2010). Dentre os fatores ambientais que podem desencadear o transtorno, encontram-se lesões cerebrais graves causadas por traumas, e a exposição gestacional a substâncias neurotóxicas como o etanol e o chumbo (Dopheide e Pliszka, 2009). Além disso, o tabagismo materno na gestação pode aumentar em 2,7 vezes o risco para TDAH (Curatolo *et al.*, 2010), sendo que isto pode ser devido ao efeito sobre receptores nicotínicos que modulam a atividade dopaminérgica.

Atualmente, procura-se estabelecer uma relação entre o TDAH e complicações na gestação e durante o parto; tais complicações incluem a toxemia, eclâmpsia, a pós-maturidade fetal, o tempo de duração do parto, estresse fetal, baixo peso ao nascer, hemorragia pré-parto e má saúde materna; crianças que nasceram sob estas condições e apresentam pré-disposição genética ao TDAH são consideradas como grupo de risco para tal doença (Rohde e Halpern, 2004). Em gestantes, estudos revelam que o estresse durante a gestação parece ser fator de risco independente para o Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) (Ronald *et al.*, 2010). Adicionalmente, tem sido mostrado que crianças com TDAH que tiveram as mães expostas a estresse moderado à grave apresentam maior intensidade dos sintomas quando comparadas a crianças com TDAH que não tiveram as mães expostas a estresse durante a gestação (Grizenko *et al.*, 2008). Entretanto, os mecanismos pelos quais o estresse pré-natal produz o TDAH ainda carecem de confirmação, justificando-se a realização de novas pesquisas. Alguns autores sugerem que o TDAH é uma das consequências mais consistentes do estresse pré-natal em humanos entre 4 e 15 anos de idade (Talge *et al.*, 2007). Van den Bergh e Marcoen (2004), citados por Talge (Talge *et al.*, 2007), acharam que a ansiedade materna durante a gestação era responsável por cerca de 22% das manifestações de TDAH em crianças dos 8 aos 9 anos de idade. Adicionalmente, a exposição a eventos estressantes dobrou o risco de TDAH num outro estudo realizado por Obel e colaboradores (2003), citado por Talge (Talge *et al.*, 2007).

### 1.3 Limitações dos estudos em humanos

Os resultados dos estudos descritos nas sessões anteriores apresentam, em sua maioria, associações entre o estresse pré-natal e uma grande variedade de sequelas em crianças. Entretanto, esses estudos não provam de modo inequívoco que a programação fetal esteja ocorrendo porque não conseguem descartar a influência de componentes genéticos, nem de um ambiente pós-natal adverso sobre o comportamento das crianças. Adicionalmente, se a mãe passa por estresse na gestação, ela pode continuar sendo estressada no período pós-parto, prejudicando a qualidade dos cuidados maternos com a criança. Finalmente, o estresse materno, sofrido antes ou depois do parto, pode interferir na sua interpretação do comportamento da criança, enviesando os estudos que se baseiam no relato materno para diagnosticar alterações do comportamento infantil. Permanecem, ainda, uma série de outras variáveis que poderiam influenciar a aparente associação entre estresse pré-natal e distúrbios na infância, tais como o tabagismo ou o consumo de álcool durante a gestação, que são capazes de afetar, diretamente, o desenvolvimento fetal (Burd *et al.*, 2003; Blood-Siegfried e Rende, 2010).

O momento em que o estresse ocorre, durante a gestação, também pode ser importante para o aparecimento de efeitos na prole (Talge *et al.*, 2007). Dos estudos que consideraram esta questão, por exemplo, um achou evidência de maior sensibilidade ao estresse durante o primeiro trimestre (Rodriguez e Bohlin, 2005), dois no meio da gestação (Obel *et al.*, 2003b ; Van Den Bergh e Marcoen, 2004) e um no final da gestação. Há várias razões possíveis para essas discrepâncias. Uma delas é que os limites temporais das experiências estressoras são, muitas vezes, difíceis de definir. Por exemplo, um desastre natural, embora seja um evento estressante agudo, produz alterações persistentes no ambiente ao redor, que também podem resultar em estresse. Adicionalmente, relatos maternos de depressão e ansiedade, bem como de aborrecimentos cotidianos, se caracterizam por sua cronicidade, tornando difícil definir o início e término da sua ocorrência. Ainda, os estudos variam quanto à idade gestacional em que é feita a avaliação da exposição aos estressores. É possível que os efeitos do estresse sejam, realmente, máximos no meio da gestação, e que isto tenha concorrido para os achados dos outros estudos. Finalmente, estudos de pequena escala não têm poder suficiente para definir, efetivamente, o período gestacional de maior sensibilidade aos efeitos do estresse,

sendo necessárias novas pesquisas para esclarecer essa questão definitivamente (Talge *et al.*, 2007).

Desta forma a existência de modelos animais para o estudo dos efeitos teratogênicos do estresse durante o desenvolvimento abre grandes possibilidades de investigar seus efeitos em condições controladas (sem a influência de possíveis “contaminantes”). Além disso, a utilização de modelos animais possibilita avaliar, especificamente, os mecanismos de ação ao nível celular e a eficácia de possíveis tratamentos para a melhoria das consequências da exposição ao estresse durante o desenvolvimento.

#### **1.4 Uso de roedores para o estudo dos déficits neurocomportamentais induzidos pelo estresse precoce**

Roedores são amplamente utilizados para o estudo das bases neurobiológicas de uma série de distúrbios neurocomportamentais. Em particular, ratos e camundongos são de fácil criação e manutenção em laboratório, o que possibilita que seja exercido um controle razoável das condições ambientais e das variáveis fisiológicas durante o período de estudo (Markham *et al.*, 2010).

Além disso, estes animais têm sua biologia muito bem conhecida e apresentam comportamentos bem estabelecidos, o que permite seu uso como ferramenta de estudo de condições neuropatológicas associadas ao estresse em humanos (Glover, 2011). (Talge *et al.*, 2007) (Peña, 2012). Adicionalmente, isto permite a avaliação de parâmetros específicos da manipulação, como o momento e duração do estresse pós-natal, a fim de determinar os fatores críticos que contribuem para os efeitos de longa duração do estresse. Estudos com animais têm variabilidade reduzida uma vez que muitos fatores podem ser uniformizados, como condições de habitação, tamanho das ninhadas, e fatores genéticos, pelo emprego de ratos de linhagens específicas (Kosten *et al.*, 2012). Cumpre mencionar ainda que, como os transtornos decorrentes do estresse precoce podem ter manifestação tardia, a utilização de animais de fácil reprodução e com ciclo de vida relativamente curto (em torno de 2 anos), como é o caso dos roedores, permite a produção de evidências *in vivo* com menor tempo de pesquisa.

O uso de roedores tem auxiliado na caracterização da fenomenologia, patologia e fatores de risco associados com o estresse. De modo análogo ao observado em humanos, quando expostos a fatores estressantes durante o desenvolvimento, os roedores apresentam uma série de distúrbios neurocomportamentais como a hiperatividade e déficits de memória e aprendizado (Van Meer e Raber, 2005; Weinstock, 2008). No que se refere ao estresse materno, o aparecimento de tais alterações pode variar em função do momento da ocorrência, da duração e da intensidade do estresse, além do sexo da prole, e está associado com alterações estruturais no hipocampo, córtex frontal, amígdala e núcleo acumbente (Weinstock, 2008).

#### 1.4.1 Teste de campo aberto como modelo para avaliar a hiperatividade em roedores submetidos ao estresse precoce

Apesar dos três principais sintomas do TDAH (impulsividade, desatenção e hiperatividade) serem modelados em roedores, a hiperatividade é o que está melhor caracterizado (Sagvolden *et al.*, 2005). A hiperatividade costuma ser avaliada no teste de campo aberto (*open field test*) pelo registro da atividade locomotora. Esta medida tem se mostrado uma ferramenta importante no estudo de vários aspectos do comportamento, genética e neurobiologia do TDAH (Sagvolden *et al.*, 2005; Lalonde e Strazielle, 2009). O teste de campo aberto é capaz de quantificar a atividade locomotora espontânea num intervalo de tempo pré-estabelecido (geralmente os testes duram entre 5 e 15 minutos) e, dessa forma, espera-se que os animais hiperativos percorram distâncias maiores. Nesse teste, animais normais ou controles tendem a caminhar mais nos primeiros minutos, reduzindo as distâncias percorridas, gradativamente, até o final do teste. Esse comportamento deambulatório pode ser de natureza exploratória nos primeiros minutos, reduzindo-se nos minutos seguintes pela ambientação (habituação) ao interior da caixa e pela memória de curto prazo.

#### 1.4.2 Modelos utilizados para avaliar os déficits de memória e aprendizado em roedores submetidos ao estresse precoce

Déficits de aprendizado e memória decorrentes do estresse durante o desenvolvimento têm sido demonstrados em vários modelos. Estes podem ser agrupados em três categorias de acordo com o tipo de tarefa envolvida (Kosten *et al.*, 2012). A primeira categoria é o condicionamento aversivo, que inclui condicionamento pelo contexto e medo (*context and cue fear conditioning*), esquiva inibitória (*inhibitory avoidance*), condicionamento de piscar os olhos (*eyeblink conditioning*), e susto potencializado pelo medo (*fear-potentiated startle*). Nesta categoria, as tarefas se baseiam no condicionamento Pavloviano. Tipicamente, um estímulo condicionado (luminoso ou sonoro), emocionalmente neutro, é apresentado com um choque leve nas patas (estímulo não condicionado). Após um ou mais pareamentos, os animais demonstram reações de medo (geralmente, “congelamento”) ao estímulo condicionado na ausência do choque nas patas, bem como ao contexto em que os pareamentos aconteceram. Uma das variantes mais utilizadas nesta categoria é a esquiva inibitória, em que uma resposta do animal (em geral, entrar em um compartimento escuro ou descer de uma plataforma) desencadeia a aplicação do estímulo aversivo (em geral, choque nas patas). O evitamento do compartimento escuro ou o aumento da latência de descida da plataforma, numa sessão subsequente, é o que se mede na esquiva inibitória. De modo geral, trabalhos de condicionamento sugerem que manipulações no início da vida, geralmente, prejudicam a aquisição e/ou o desempenho de tarefas aversivas (Kosten *et al.*, 2012).

A segunda categoria é a aprendizagem inibitória, que inclui, principalmente, as tarefas de inibição latente. A aprendizagem inibitória se refere à redução de uma resposta condicionada a um estímulo condicionado se o animal foi exposto a esse estímulo antes do condicionamento ocorrer. Caracteristicamente, os animais recebem, inicialmente, estímulos luminosos ou sonoros repetidos na ausência do estímulo não condicionado. Então, esses estímulos são pareados com o estímulo não condicionado (ex: comida ou choque). De modo geral, os resultados desses testes sugerem que a aprendizagem inibitória é potencializada pelas manipulações no início da vida (Kosten *et al.*, 2012).

A Terceira Categoria, das tarefas de memória espacial/relacional, inclui o Teste do Labirinto Aquático de Morris (*Morris water maze task* - MWM), o labirinto circular (*circular maze* - CM), esquiva ativa (*active avoidance* - AA), labirinto em T (*T-maze* - TM), labirinto

em Y (*Y-maze* - YM), reconhecimento de objetos (*object recognition* - OR), e memória social (*social memory* - SM). A esquivas ativa está nesta categoria porque esse teste requer que o animal fuja da situação aversiva, a exemplo do Labirinto Aquático de Morris. Nesta categoria, as tarefas avaliam a memória de trabalho (*working memory*), a memória de referência (*reference memory*) ou ambas. A memória de trabalho é quando o animal age seguindo informação obtida durante uma sessão, como por exemplo, não retornar ao braço de um labirinto de onde a recompensa de comida tenha sido retirada. A memória de referência é quando o animal age seguindo informação obtida em sessão anterior, como por exemplo, nadar para o ponto onde uma plataforma oculta estava localizada numa sessão anterior. Outros testes, tais como SM, OR e YM, exploram a tendência do animal de explorar novos semelhantes, objetos, ou lugares, usando esse comportamento para avaliar a memória. Alguns testes podem usar comida ou restrição de água para fazer o animal a se deslocar por um labirinto. Outros testes expõem o animal a estressores, como o nado forçado no MWM, ou o estresse leve da colocação do animal num novo ambiente. No entanto, esses testes são similares pelo fato de avaliarem a memória espacial ou relacional (Kosten *et al.*, 2012).

Apesar do grande número de modelos para estudar os déficits de aprendizado e memória em roedores submetidos ao estresse durante o desenvolvimento, a maior parte dos estudos utiliza o labirinto aquático de Morris (Kosten *et al.*, 2012). Neste modelo, a capacidade de aprendizado e memória visuoespacial é avaliada em uma série de sessões experimentais em que os animais são colocados em um grande recipiente parcialmente repleto com água e devem usar as pistas visuoespaciais da sala de teste para encontrar uma plataforma circular submersa (geralmente a 1 cm da superfície). Um aspecto importante em relação a este modelo é que várias linhagens de camundongos não apresentam um bom desempenho neste teste (Voikar *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 2002) e, portanto, a grande maioria dos estudos é realizada em ratos.

#### 1.4.3 Surto de crescimento cerebral

Em mamíferos, o crescimento do cérebro acontece de modo lento e progressivo nos estágios iniciais da gestação e, subitamente, cresce de modo exponencial durante certo período de tempo; este período de crescimento súbito e acelerado é chamado de “surto de

crescimento cerebral” (do inglês, *brain growth spurt*) (Dobbind e Sands, 1979). Em ratos e camundongos, o surto de crescimento cerebral ocorre a partir do dia do nascimento e atinge seu pico no décimo dia de vida, aproximadamente. Em humanos, este período se inicia no terceiro trimestre de gestação e tem seu pico por volta do nascimento (Dobbind e Sands, 1979). Por conta deste fato, vários pesquisadores consideram que os dez primeiros dias de vida pós-natal em camundongos e ratos são o período equivalente ao terceiro trimestre da gestação humana no que diz respeito ao desenvolvimento neural (Dobbind e Sands, 1979; Bandeira *et al.*, 2009). Em acordo com esta idéia, estruturas como o neocórtex, hipocampo e cerebelo se desenvolvem de maneira marcante durante o último trimestre de gestação em humanos e durante a primeira semana de vida pós-natal em camundongos (Dobbind e Sands, 1979; Hannigan *et al.*, 2007; Bandeira *et al.*, 2009).

O período de surto de crescimento cerebral é considerado um período em que o sistema nervoso é particularmente vulnerável a ação de agentes externos (Dobbind e Sands, 1979; Anand e Scalzo, 2000 ). Durante este período, ocorrem os picos de uma série de processos fundamentais para a formação da circuitaria neural como a neurogênese, a migração de populações neuronais, a morte celular programada, o crescimento axonal e dendrítico e a sinaptogênese em diversas regiões cerebrais (Goodlett e Horn, 2001; Goodlett *et al.*, 2005).

Neste período do desenvolvimento, qualquer perturbação pode comprometer de modo marcante processos fundamentais de formação das futuras redes neurais, o que, possivelmente, resultará em prejuízos posteriores na vida do indivíduo. De fato, trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa sugerem que o período de surto de crescimento cerebral é um período crítico para a manifestação dos transtornos neurocomportamentais como a hiperatividade locomotora e os déficits de aprendizado e memória em roedores (Filgueiras *et al.*, 2009; Filgueiras *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2011). Este período crítico do desenvolvimento é relacionado, ainda, com a “programação fetal” ou “*imprinting*”, memória que programará diversas funções fisiológicas, que concorrerão para adaptar a criança ao ambiente em que viverá após o nascimento (Gaviria A., 2006; Glover, 2011; Seckl, 2004 ; Sandman *et al.*, 2005).



#### 1.4.4 Técnicas para induzir em roedores o estresse durante o desenvolvimento

Várias técnicas têm sido utilizadas para induzir o estresse em roedores durante o desenvolvimento. Durante a gestação, a injeção de solução salina, o nado forçado, a superpopulação e, mais frequentemente, isolamento ou aprisionamento com luz quente e brilhante são estressores usados comumente. A ligação entre esses estressores, é que eles são eventos, relativamente, imprevisíveis e incontroláveis, com começos súbitos que disparam uma resposta do eixo HHA nos animais (Charil *et al.*, 2010). Durante o período pós-natal, as principais técnicas envolvem a separação dos neonatos. Na maioria dos casos, o filhote é separado da mãe, mas também pode ser isolado do restante da ninhada. Alguns pesquisadores usam os termos “manipulação” ou “separação materna” independentemente dos filhotes serem isolados individualmente ou serem mantidos com o restante da sua ninhada (Kosten *et al.*, 2012). Outros autores consideram os termos “separação” e “isolamento” como processos distintos sendo que o primeiro se refere aos procedimentos em que os filhotes ficam amontoados com os irmãos e o segundo os procedimentos em que os filhotes ficam isolados (Kosten e Kehoe, 2005).

Os procedimentos utilizados para a separação materna ou isolamento neonatal variam muito entre os laboratórios, e as diferenças entre um ou vários parâmetros (ex: duração de cada sessão de separação, número de sessões de separação, dias da vida pós natal em que as sessões de separação acontecem, ambiente em que as separações são realizadas, etc), em diferentes combinações, resultam, provavelmente, nos resultados discrepantes ou inconsistentes reportados na literatura (Kosten e Kehoe, 2005; Kosten *et al.*, 2012). Além disso, na maioria dos procedimentos de separação materna, os filhotes são separados das mães, mas são mantidos juntos, amontoados muitas vezes no ambiente familiar da gaiola (Kosten e Kehoe, 2005; Kosten *et al.*, 2012). No procedimento de isolamento neonatal, cada filhote é isolado individualmente num recipiente que não contém traços do ambiente familiar (por exemplo: sem maravalha ou em um ambiente distinto do local onde são criados). Ao contrário do isolamento neonatal, durante a separação materna sem isolamento dos filhotes individualmente, os filhotes são expostos a uma gama de estímulos familiares, que podem ser táteis, olfativos, entre outros). Alguns autores sugerem que o grau de familiaridade do ambiente ou o contato com os irmãos podem influenciar de modo marcante a intensidade do estresse (Cirulli *et al.*, 1997; Kosten e Kehoe, 2005; Kosten *et al.*, 2012).

Vale ressaltar que durante os primeiros 10 dias pós-natais, o sistema nervoso de ratos e camundongos ainda está muito imaturo (p. ex. os olhos ainda não abriram e o córtex ainda não está com o padrão adulto de mielinização e citoarquitetura). Além disso, é bem possível que os circuitos hipocampais responsáveis pelos processos de aprendizado e memória em roedores não estejam maduros durante as primeiras duas semanas de vida (Manhães *et al.*, 2014 ). Desta forma, durante o período de surto de crescimento cerebral, fatores como a familiaridade com o ambiente (ou mesmo o grau de estimulação sensorial) podem ser menos determinantes para a intensidade da resposta ao estresse do que fatores que causem desconforto ou que afetem, diretamente, parâmetros fisiológicos como por exemplo a redução da temperatura corpórea durante os procedimentos de separação materna ou isolamento neonatal. Infelizmente, a maioria dos estudos em que os roedores são submetidos à separação materna ou ao isolamento neonatal não informa se os filhotes são aquecidos ou deixados à temperatura ambiente durante os procedimentos de estresse. Portanto, esta hipótese ainda que plausível, carece de suporte experimental capaz de validá-la.

O estresse no período pré-natal ou o estresse precoce por separação materna também podem produzir alterações nos sistemas dopaminérgicos mesolímbico e mesoestriatal (Boksa e El-Khodori, 2003).

### **1.5 Mecanismos envolvidos com a manifestação e o tratamento dos efeitos deletérios do estresse**

Em linhas gerais, é corrente a idéia de que os transtornos causados pelo estresse durante o desenvolvimento são mediados pelo aumento nos níveis dos glicocorticóides. Em acordo com essa idéia, as estruturas cerebrais mais afetadas pelo estresse precoce, como o córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala, são também ricas em receptores para glicocorticóides. Além disso, uma série de estudos demonstram, claramente, que a exposição precoce a elevados níveis de corticosterona resulta em diversas alterações morfofuncionais nestas áreas (Kofman, 2002; Charil *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014). Estudos em roedores têm possibilitado um grande avanço no entendimento das bases neurobiológicas das alterações neurocomportamentais decorrentes do estresse durante o desenvolvimento, como os déficits de aprendizagem e memória e o TDAH (Sagvolden *et al.*, 2005). Enquanto os déficits de

memória e aprendizado induzidos pelo estresse durante o desenvolvimento têm sido associados a uma redução da plasticidade neural, que é a capacidade do sistema nervoso modificar sua estrutura e função para se adaptar a novas condições (Sousa *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014), a hiperatividade locomotora tem sido associada a uma redução na transmissão catecolaminérgica (Sagvolden *et al.*, 2005).

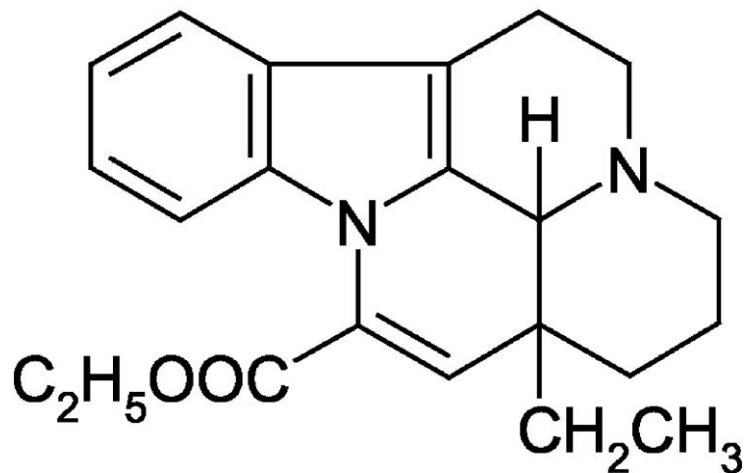
De particular importância para este estudo, um número crescente de trabalhos sugere prejuízos nas vias de sinalização mediadas pelos segundos mensageiros AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) e GMPc (monofosfato cíclico de guanosina) subjazem tanto os déficits de aprendizado e memória (Filgueiras *et al.*, 2010; Medina, 2011) como a hiperatividade locomotora (Russell, 2003; Pascoli *et al.*, 2005; Paine *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2011). De modo geral, nas vias de sinalização intracelular mediadas por estes nucleotídeos cíclicos, a ligação dos neurotransmissores com o complexo receptor/proteína G da membrana ativa a adenilato ciclase que converte AMP em AMPc e/ou a guanilato ciclase que converte o GMP em GMPc. O aumento dos níveis de AMPc e GMPc intracelulares ativam, respectivamente, a proteína cinase A (PKA) e a proteína cinase G (PKG) que fosforilam uma série de fatores de transcrição como o CREB (do inglês *cAMP Responsive Element Binding Protein*) e o SRF (do inglês *Serum Response Factor*). Estes fatores de transcrição promovem a expressão de genes que modulam a excitabilidade sináptica e a plasticidade neural (Goto e Grace, 2007; Medina, 2011; Bollen e Prickaerts, 2012). Desta forma, é possível que a grande gama de distúrbios neurocomportamentais causados pelo estresse durante o desenvolvimento tenha como um denominador comum uma diminuição das funções celulares mediadas pelo AMPc e pelo GMPc.

Em condições fisiológicas, os níveis de AMPc e GMPc são controlados pela atividade da enzima fosfodiesterase (PDE) que catalisa tanto a conversão do AMPc em AMP como do GMPc em GMP (Medina, 2011). De modo interessante, inibidores da fosfodiesterase têm sido utilizados com o intuito de aumentar os níveis de nucleotídeos cíclicos e, desta forma, promover a fosforilação do CREB e de outros fatores de transcrição como o SRF (Medina, 2011). Atualmente, são conhecidas 11 famílias de PDE. A PDE do tipo 1 (PDE1) é ativada por  $Ca^{++}$ /calmodulina e apresenta três isoformas, sendo que duas destas, a PDE1A e a PDE1B representam mais de 90% da atividade total da PDE1 no cérebro. A PDE1A é altamente expressa no hipocampo e no córtex cerebral e a PDE1B é expressa principalmente nas regiões dopaminérgicas, como o estriado e o núcleo acumbente (Medina, 2011). Inibidores da

fosfodiesterase do tipo 1, como a vimpocetina, tem sido utilizados para aumentar os níveis de AMPc e GMPc (Medina, 2011).

A vimpocetina é um etil-éster sintético do alcalóide apovincamina, que é isolado das folhas da *Vinca minor*, comumente conhecida como pervinca menor. O nome químico da vimpocetina é etil-apovincaminato (Figura 1). Desde a sua síntese, no final dos anos 60, tem sido proposta para o tratamento de diversos males, com destaque para as doenças cerebrovasculares, por seus efeitos no aumento do fluxo sanguíneo cerebral e neuroproteção (Patyar *et al.*, 2011b). Nos últimos anos, tem-se demonstrado que a administração aguda de vimpocetina é capaz de mitigar a hiperatividade (Nunes *et al.*, 2011) e amenizar os déficits de aprendizado e memória (Filgueiras *et al.*, 2010) de roedores expostos ao etanol durante o período de surto de crescimento cerebral. Contudo, se o tratamento com vimpocetina é capaz de reverter ou amenizar os déficits decorrentes do estresse durante o desenvolvimento, ainda é uma questão que permanece por ser verificada.

Figura 1 – Esquema da molécula da vimpocetina.



Fonte: (Zhou *et al.*, 2003)

## 2 OBJETIVOS

Considerando a necessidade de se compreender melhor os mecanismos envolvidos com a manifestação da hiperatividade locomotora causada pelo estresse precoce e os benefícios que podem advir do desenvolvimento de estratégias que mitiguem este transtorno, o presente estudo teve como objetivos principais:

- 1) Avaliação do efeito do controle da temperatura do ambiente durante o isolamento com separação materna no período neonatal na manifestação da hiperatividade locomotora em camundongos adolescentes;
- 2) Avaliar o efeito do controle da temperatura do ambiente durante o isolamento materno nos níveis de corticosterona e hormônios tireoidianos de camundongos neonatos e adolescentes;
- 3) Avaliar o efeito da vimpocetina na hiperatividade locomotora induzida pela separação materna no período neonatal.

### 3 METODOLOGIA

Neste estudo, foram utilizados camundongos Suíços criados e mantidos no biotério do Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Ciências Fisiológica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, em temperatura em torno de 22°C e submetidos a um ciclo de luminosidade artificial de 12 horas diárias (com início do período escuro às 14 horas), com acesso à água e ração *ad libitum*, em conformidade com as regras estabelecidas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Além disso, todos os experimentos estão de acordo com a declaração de Helsinque e com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório adotado e promulgado pelo National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos.

#### **3.1 Avaliação do efeito do controle da temperatura do ambiente durante o isolamento com separação materna no período neonatal na manifestação da hiperatividade locomotora em camundongos adolescentes.**

##### **3.1.1 Formação dos grupos experimentais**

No segundo dia de vida pós-natal (PN2), cada ninhada foi designada para um de três grupos experimentais: controle (36 fêmeas e 40 machos, provenientes de 08 ninhadas); isolamento aquecido com separação materna (38 fêmeas e 42 machos, provenientes de 08 ninhadas); e isolamento não aquecido com separação materna (42 fêmeas e 34 machos, provenientes de 08 ninhadas).

Para a realização do isolamento materno, os filhotes eram retirados das gaiolas, pesados e colocados, individualmente, em recipientes plásticos (pote coletor de urina com 80 ml, altura: 5,5cm e raio: 4,5 cm) por 3 horas diárias, no período de PN2 até PN10. Durante o período de isolamento, os filhotes não tinham acesso à água ou à comida e, para permitir a aeração, as tampas dos recipientes eram vazadas. Para manter os filhotes fora do alcance vocal ou olfativo das progenitoras, estas eram devolvidas ao biotério, com água e ração *ad*

*libitum*. Os potes contendo os animais do grupo submetido ao isolamento aquecido eram encaixados em placa de isopor e colocados no banho-maria, aquecido a 37° Celsius, de modo que os fundos dos potes se mantinham em contato direto com a água aquecida à temperatura citada. Os potes contendo os animais do grupo submetido ao isolamento não aquecido eram colocados, diretamente, sobre bancada de mármore, com a temperatura do recinto ajustada para 22° a 25°C. Ao término do isolamento, os animais dos dois grupos eram pesados novamente e, então, devolvidos às respectivas progenitoras no biotério.

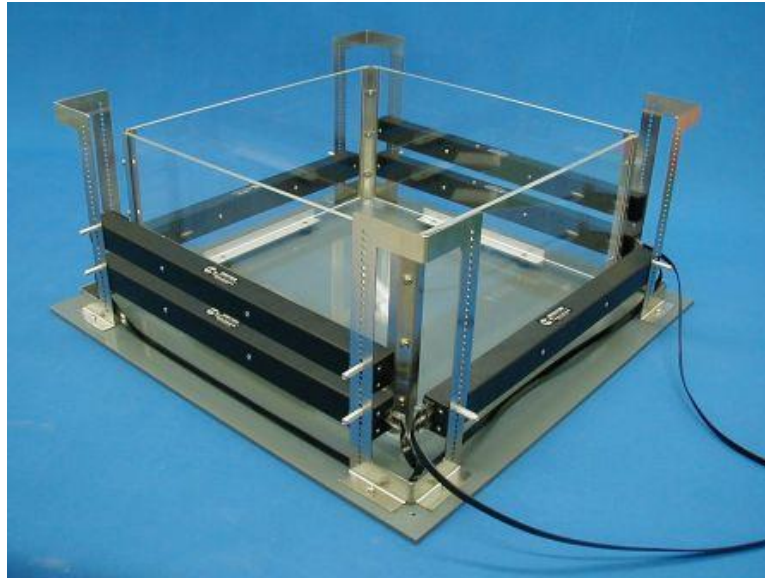
As ninhadas designadas para o grupo Controle só foram manipuladas em PN2 e em PN10, quando os filhotes eram pesados e devolvidos imediatamente para suas gaiolas.

Em PN21, todos os animais foram desmamados e separados por sexo (mínimo de 2 e máximo de 4 animais por gaiola). Entre PN28 e PN31, todos os animais foram submetidos ao Teste de Campo Aberto. A taxa de mortalidade decorrente dos diferentes tratamentos foi calculada, separadamente, para cada grupo experimental pela razão entre o número de animais mortos até o dia do teste comportamental e o total de animais pesados em PN2.

### 3.1.2 Teste de campo aberto

A atividade locomotora espontânea foi avaliada pela distância percorrida em um monitor de atividade (EP-149, Insight, SP), que consistiu em uma caixa de acrílico (46.5 × 46.5 × 35 cm) equipada com duas barras paralelas contendo 16 pares de emissores e sensores de infravermelho alinhados e posicionados a 1,5 cm do chão (Fotografia 1). A distância percorrida pelos animais foi calculada, automaticamente, por um computador conectado ao monitor de atividade a partir da contagem do número de interrupções dos feixes de infravermelho. A distância percorrida pelos animais foi registrada em intervalos de 1 minuto durante um período de 10 minutos.

Fotografia 1. Monitor de atividade do teste de campo aberto



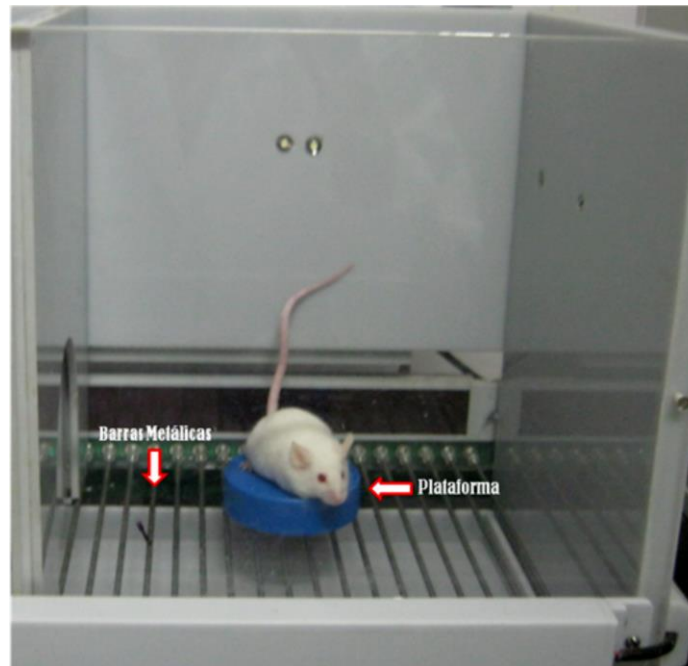
Todos os testes de campo aberto foram realizados entre 17:00 e 19:00 horas (período noturno), sob suave iluminação com luz vermelha, em uma sala com temperatura mantida entre 22°C e 25°C. Para a realização do teste, cada camundongo foi, individualmente, colocado no centro da arena. No final de cada sessão, o animal era retirado do monitor de atividade e, antes que o próximo animal fosse colocado na arena, o chão e as paredes eram limpos com toalha de papel descartável, embebida, levemente, com álcool.

### 3.1.3 Teste da esquiva inibitória

Este teste foi realizado em uma caixa (25cm x 25cm) com uma plataforma circular com diâmetro de 6,5cm e altura de 2cm, posicionada centralmente sobre uma grade metálica (espaçamento de 1 cm entre as barras de 2 mm de diâmetro) (Fotografia 2). Todos os animais foram submetidos a três sessões de três minutos de duração realizadas entre 8:00 e 12:00 horas (período claro).



Fotografia 2. Recipiente para o teste da esquiwa inibitória.



No dia seguinte ao teste de campo aberto, os animais foram submetidos a duas sessões experimentais. Na primeira sessão, os animais foram individualmente colocados sobre a plataforma e imediatamente após colocarem as quatro patas na grade metálica, recebiam um choque de 0,2 mA durante 2 segundos. Na segunda sessão, os animais foram recolocados na plataforma 3h após a primeira sessão. Vinte e quatro horas após a primeira sessão, todos os animais foram, novamente, colocados na plataforma. Na Segunda e Terceira sessões, os animais não receberam choques após descerem da plataforma. O tempo que os animais levaram para colocar as quatro patas na grade, denominado latência de descida, foi o parâmetro utilizado para avaliar o aprendizado e memória neste teste. Além disso, utilizamos dois índices de aprendizado que foram calculados com base nas diferenças entre o tempo de latência na primeira (L1) e na segunda (L2) ou terceira (L3) sessões: L2-L1 e L3-L1. Os animais que, na primeira sessão, tiveram latências de descida maiores que três minutos não foram utilizados nas análises.

### 3.1.4 Análise estatística

Os dados são apresentados como médias e erros padrão da média (EPM). Para todos os testes estatísticos o limite de significância foi de  $P < 0,05$  (bicaudal). Para minimizar a influência dos efeitos de ninhada, foi considerada a média dos valores dos machos e das fêmeas de uma mesma ninhada e não valores individuais (Wainwright, 1998).

Para avaliar as diferenças entre os grupos com relação às taxas de mortalidade foi utilizado o teste exato de Fisher (2x2). Análises de variância univariadas (uANOVA) foram utilizadas para avaliar os dados de peso em PN30 e os índices de aprendizado no teste de esQUIVA inibitória. Análises de variância de repetição (rANOVA) foram realizadas para avaliar os dados de peso durante o período de isolamento (de PN2 até PN10), de distância percorrida no teste de campo aberto e de latência para descida no teste de esQUIVA inibitória. Tanto para as uANOVAs quanto para as rANOVAs, o protocolo de isolamento (Controle, Isolamento aquecido, Isolamento não aquecido) e o sexo (macho e fêmea) foram usados como fatores de classificação (*Between-Subjects Factors*). A idade, os intervalos de tempo e a sessão experimental foram utilizados como fatores de repetição (*Within-Subjects Factors*). Para simplificar a apresentação dos resultados das rANOVAs, foram apresentados apenas os resultados dos testes univariados e, nos casos de rejeição da hipótese de esfericidade, os graus de liberdade foram corrigidos pelo método de Greenhouse-Geisser (Huynh e Feldt, 1976). Testes FLSD (*Fisher's Least Significant Difference Test*) foram utilizados para as análises *post hoc*.

## **3.2 Avaliação do efeito do controle da temperatura do ambiente durante o isolamento materno nos níveis de corticosterona e hormônios tireoidianos de camundongos neonatos e adolescentes**

### 3.2.1 Formação dos grupos experimentais

Neste estudo, os níveis plasmáticos de corticosterona basal e dos hormônios tireoidianos T3 e T4 foram dosados em PN6 e PN10 (período de isolamento materno) e em

PN30 (período de avaliação comportamental). Para tanto, novas ninhadas foram designadas, conforme descrito no item 3.1.1, para um de três grupos experimentais: controle; isolamento aquecido com separação materna; e isolamento não aquecido com separação materna.

Com base na quantidade de soro necessária para as análises hormonais, todos os animais de uma ninhada tiveram que ser sacrificados para a coleta do soro (pool da ninhada inteira) nas idades de PN6 e PN10, sem separação por sexos. Das ninhadas sacrificadas em PN30, foram obtidas duas amostras de cada, que eram: 1 - *pool* de soros dos machos; e 2 - *pool* de soro das fêmeas. Desta forma, o número de ninhadas em cada grupo experimental foi maior que o do estudo anterior, considerando as 3 idades de coleta de soro (Tabela 1).

Tabela 1. Número de ninhadas por grupo experimental no estudo 2

Grupo experimental	Idade		
	PN6	PN10	PN30
Controle	8	12	4 (*)
Isolamento Aquecido	7	7	2 (*)
Isolamento Não Aquecido	7	8	4 (*)

(\*) que resultaram no dobro de amostras, com *pool* de soros de machos e de fêmeas separadamente.

### 3.2.2 Dosagens hormonais

A dosagem da corticosterona e dos hormônios tireoidianos foi realizada em PN6, PN10 e PN30. Para tanto, os animais dos grupos Isolamento Aquecido e Isolamento Não Aquecido foram, imediatamente após o período de 3h de isolamento, pesados e sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado imediatamente, centrifugado (3500 rotações/minuto, por 20 minutos) e o soro armazenado em um freezer à temperatura de -80°C. Os animais do grupo controle foram pesados e sacrificados do mesmo modo e no mesmo horário dos demais grupos experimentais. Nas idades de PN6 e PN10 o soro foi obtido a partir do sangue de toda a ninhada (*pool* da ninhada). Na idade de PN30, os soros foram obtidos de machos e de fêmeas separadamente.

### 3.2.2.1 Corticosterona

A corticosteronemia foi avaliada através de radioimunoensaio utilizando um kit comercial (*ImmuChem<sup>TM</sup> 125I RIA kit, Double Antibody, MP Biomedicals LLC, EUA*) de acordo com os procedimentos estabelecidos pelo fabricante. Os valores foram expressos em ng/dL (nanogramas/decilitro). A sensibilidade do ensaio foi de 25 ng/ml.

### 3.2.2.2 Hormônios tireoidianos

As concentrações plasmáticas de T3 total e T4 livre foram dosadas por radioimunoensaio, utilizando kit comercial (*ImmuChem<sup>TM</sup> 125I RIA kit, MP Biomedicals LLC, EUA*) de acordo com os procedimentos estabelecidos pelo fabricante. Os valores foram expressos em ng/dL. A sensibilidade do ensaio foi de 6,7 ng/dL (T3) e 0,045 ng/dL (T4).

### 3.2.3 Análise estatística

Os dados serão apresentados como médias e erros padrões. Para todos os testes estatísticos o limite de significância foi de  $P < 0,05$  (bicaudal). Para minimizar a influência dos efeitos de ninhada, nós consideramos a média de cada ninhada para os dados obtidos em PN6 e PN10 ou a média dos valores dos machos e das fêmeas de uma mesma ninhada para os dados obtidos em PN30 (Wainwright, 1998).

Análises de variância univariadas (uANOVA) foram realizadas separadamente para avaliar os dados hormonais durante o período de isolamento (PN6 e PN10) e durante o período em que foram realizados os testes comportamentais (PN30). No primeiro caso, o tratamento neonatal (Controle, Isolamento aquecido, Isolamento não aquecido) e a idade (PN6 ou PN10) foram os fatores de classificação. No segundo caso, o tratamento neonatal (Controle, Isolamento aquecido, Isolamento não aquecido) e o sexo (machos e fêmeas) foram usados como fatores de classificação. Para simplificar a apresentação dos resultados das

rANOVAs, foram apresentados apenas os resultados dos testes univariados e, nos casos de rejeição da hipótese de esfericidade, os graus de liberdade foram corrigidos pelo método de Greenhouse-Geisser (Huynh e Feldt, 1976). ANOVAs de menor ordem foram realizadas separadamente para cada sexo ou para cada idade toda vez que interações envolvendo estes fatores com o tratamento neonatal foram detectadas nas uANOVAs (Snedecor e Cochran, 1967). Testes FLSD (*Fisher's Least Significant Difference Test*) foram utilizados para as análises *post hoc*.

### **3.3 Avaliação do efeito da vimpocetina na hiperatividade locomotora induzida pela separação materna no período neonatal**

#### **3.3.1 Formação dos grupos experimentais**

Neste estudo, cada ninhada foi designada para o grupo controle (53 fêmeas e 61 machos, provenientes de 13 ninhadas) ou para o grupo submetido ao isolamento não aquecido com separação materna (35 fêmeas e 42 machos, provenientes de 12 ninhadas). Os procedimentos utilizados do nascimento ao desmame para os animais de ambos os grupos foram idênticos aos descritos no item 3.1.1.

Entre PN28 e PN31, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto, contudo, neste estudo, os animais foram previamente injetados com vimpocetina ou solução veículo. Para tanto, os animais das ninhadas do grupo Controle e do grupo submetido ao isolamento não aquecido receberam uma injeção intraperitoneal de 20mg/kg de vimpocetina (Grupo Vp20) ou com volume equivalente de solução veículo (dimetilsulfóxido, Grupo DMSO). Desta forma, neste estudo os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, a saber: Controle+DMSO, Controle+Vp20, Isolamento Não Aquecido+DMSO, e Isolamento Não Aquecido +Vp20 (Tabela 2).

Tabela 2. Número de animais por grupo experimental no estudo 3

Grupos experimentais	DMSO	Vp20
Controle	18♂ e 16♀	21♂ e 18♀
Isolamento Não Aquecido	13♂, 14♀	14♂, 9♀

Observação: estão assinalados apenas os animais considerados na análise estatística.

A taxa de mortalidade decorrente dos diferentes tratamentos foi calculada separadamente para cada ninhada pela razão entre o número de animais mortos até o dia seguinte ao teste de campo aberto e o total de animais pesados em PN2.

### 3.3.2 Preparação das soluções de vimpocetina

Para a dose de 20 mg/Kg (miligramas/quilograma), foram diluídos 5mg (miligramas) de vimpocetina em 1ml (mililitro) de DMSO. A mistura foi para o vórtex por, no mínimo, 2 minutos e, em seguida, foi colocada no sonicador até que não houvesse nenhum precipitado visível. A concentração final dessa solução é de 5µg/µl (microgramas/microlitro) que, para atingir a dose de 20 mg/Kg, precisa ser injetada em volume (em microlitros) igual a 4 vezes o peso do animal.

A dose de Vimpocetina e o intervalo entre a administração da droga e o teste foram baseados em estudos prévios que mostraram que o tratamento com vimpocetina reverteu tanto os déficits de aprendizado e memória (Filgueiras et al., 2010) como a hiperatividade locomotora (Nunes et al. 2011) em roedores pré-púberes expostos ao etanol no período neonatal. A fim de minimizar o risco de lesionar os órgãos abdominais, utilizamos uma agulha de calibre 13mm x 0,45mm, que foi inserida, cuidadosamente, na parede abdominal.

### 3.3.3 Teste de campo aberto

Neste estudo não utilizamos o sistema automático de contagem da atividade locomotora descrito no item 3.1.2. Desta forma, a caixa de acrílico foi retirada do monitor de atividade e foi dividida em 16 quadrados (11,5 cm × 11,5 cm, cada um), sendo 12 periféricos e 4 centrais. O tempo de duração da sessão experimental foi de 10 minutos. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo posicionada a 1,5 metros acima da caixa e as contagens foram feitas a partir do material gravado. A ambulação foi medida pelo número de quadrados em que o animal colocava as quatro patas. Foram avaliadas, a ambulação nos 4 quadrados do centro (C), nos 12 quadrados da periferia (P) e a razão C/P e a ambulação total (C+P).

Todos os testes de campo aberto foram realizados entre 17:00 e 19:00 horas (período noturno), sob suave iluminação com luz vermelha, em uma sala com temperatura mantida entre 22°C e 25°C. Para a realização do teste, cada camundongo foi, individualmente, colocado no centro da arena. No final de cada sessão, o animal era retirado do monitor de atividade e, antes que o próximo animal fosse colocado na arena, o chão e as paredes eram limpos com toalha de papel descartável, embebida, levemente, com álcool.

### 3.3.4 Análise estatística

Conforme descrito nos estudos anteriores, os dados são apresentados como médias e erros padrões e o limite de significância foi de  $P < 0,05$  (bicaudal). Com o objetivo de minimizar a influência dos efeitos de ninhada, nós consideramos a média dos valores dos machos e das fêmeas de uma mesma ninhada e não valores individuais (Wainwright, 1998).

Para avaliar as diferenças entre os grupos com relação às taxas de mortalidade foi utilizado o teste exato de Fisher (2x2). Para avaliar os dados de peso em PN30 foram utilizadas uANOVAs. Para avaliar os dados de peso durante o período de isolamento (de PN2 até PN10) e de ambulação no teste de campo aberto foram utilizadas rANOVAs. Os fatores de classificação foram o isolamento neonatal (Controle, Isolamento aquecido ou Isolamento não aquecido), o tratamento com vimpocetina (DMSO ou Vp20) e o sexo (macho e fêmea). A

idade e os intervalos de tempo foram utilizados como fatores de repetição (*Within-Subjects Factors*). Nos casos em que foram identificadas interações entre o isolamento neonatal e o tratamento com vimpocetina com  $P < 0,10$ , foram realizadas ANOVAs de menor ordem adicionais subdividindo os grupos experimentais (Snedecor e Cochran, 1967). Para simplificar a apresentação dos resultados das rANOVAs, foram apresentados apenas os resultados dos testes univariados e, nos casos de rejeição da hipótese de esfericidade, os graus de liberdade foram corrigidos pelo método de Greenhouse-Geisser (Huynh e Feldt, 1976). Testes FLSD (*Fisher's Least Significant Difference Test*) foram utilizados para as análises post hoc.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Estudo 1: Avaliação do efeito do controle da temperatura do ambiente durante o isolamento com separação materna no período neonatal na manifestação da hiperatividade locomotora em camundongos adolescentes.

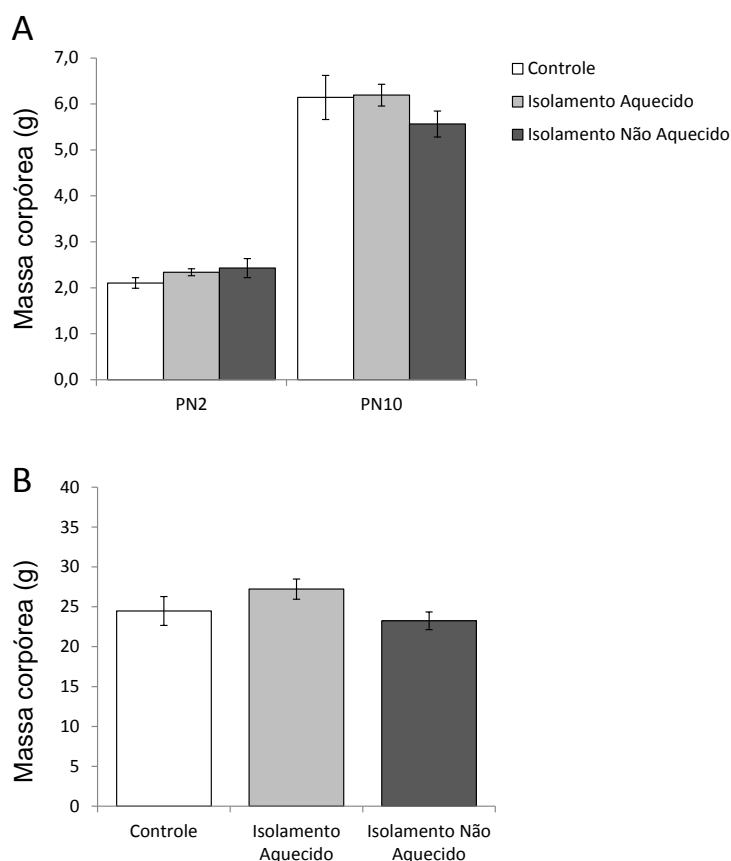
#### 4.1.1 Taxa de Mortalidade

A maioria dos animais sobreviveu até a idade dos testes comportamentais. A taxa de mortalidade foi de 9,5% (n = 8) no grupo controle, 8,0% (n = 7) no grupo de isolamento aquecido e 1,3% (n = 1) no grupo de isolamento não aquecido. A taxa de mortalidade do grupo de isolamento não aquecido foi significativamente menor que a do grupo controle [Teste exato de Fisher:  $P \leq 0,05$ ]. Não foram observadas diferenças nas demais comparações entre os grupos.

#### 4.1.2 Ganho de peso

A massa corpórea das ninhadas aumentou significativamente durante o período de isolamento materno (de PN2 a PN10) [rANOVA, idade:  $F(1/21) = 408,6$ ,  $P \leq 0,001$ ]. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais durante o período de isolamento e em PN30 (Gráfico 1 – A e B).

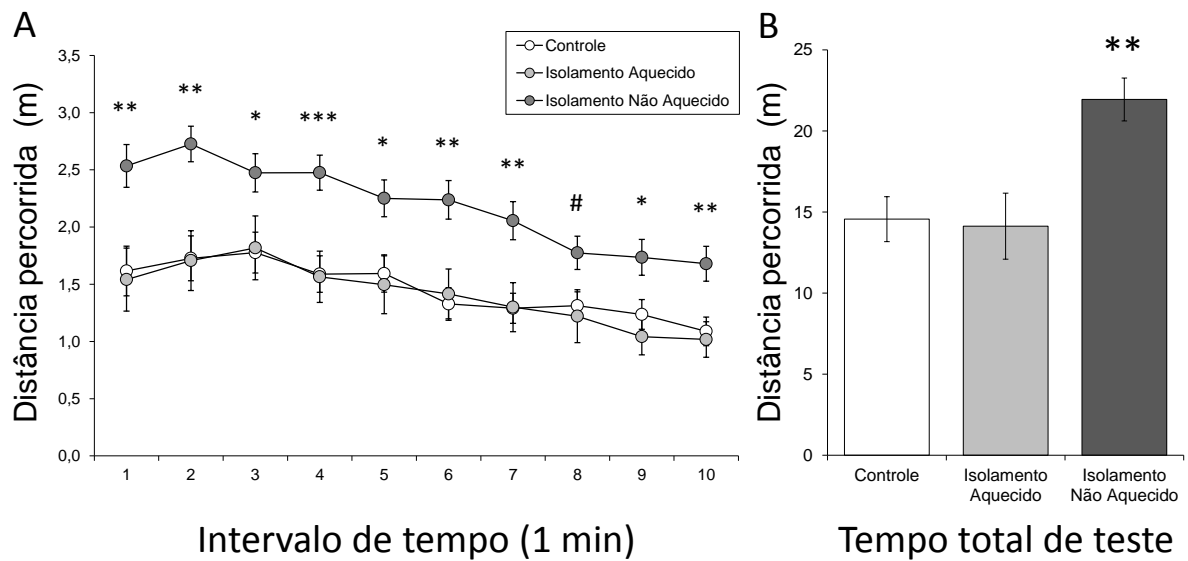
Gráfico 1 (A e B) - Médias ( $\pm$  EPM) da massa corpórea em gramas dos animais dos grupos controle, isolamento aquecido e isolamento não aquecido durante o período de isolamento (de PN2 para PN10) [A] e durante o período de teste [B]



#### 4.1.3 Teste de campo aberto

No teste de campo aberto, a distância percorrida reduziu, significativamente, ao longo dos 10 minutos do teste [rANOVA, intervalo de tempo:  $F(3,3/138,7) = 24,3$ ;  $P \leq 0,001$ ]. Não foram observadas diferenças entre os grupos com relação à redução de atividade ao longo dos intervalos de tempo. Contudo, a atividade do grupo submetido ao isolamento não aquecido foi maior que a dos demais grupos ao longo de todo o teste [rANOVA, protocolo de isolamento:  $F(2/42) = 7,0$ ;  $P \leq 0,01$ ] (Gráfico 2). Não foram observadas diferenças entre machos e fêmeas, nem interação do sexo com o protocolo de isolamento.

Gráfico 2 (A e B) - Médias ( $\pm$  EPM) da distância percorrida pelos animais dos grupos controle, isolamento aquecido e isolamento não aquecido ao longo dos 10 intervalos de tempo [A] e no tempo total do teste [B]

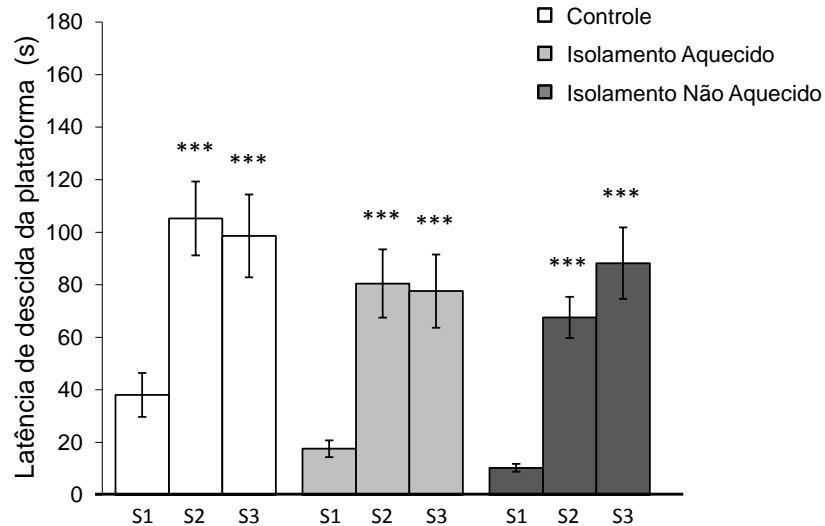


Observação: Notar que a atividade locomotora do grupo submetido ao Isolamento Não Aquecido foi significativamente maior que a dos demais grupos. Comparação Isolamento Não Aquecido vs. Demais grupos: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; Comparação Isolamento Não Aquecido vs. Isolamento Aquecido: #  $P \leq 0,05$ .

#### 4.1.4 Teste de esQUIVA inibitória

De modo geral, a latência para descida da plataforma aumentou com a repetição das sessões [rANOVA, sessão;  $F(2/60) = 45,3$ ;  $P \leq 0,001$ ]. Não foram observadas diferenças entre os grupos com relação ao aumento da latência de descida da plataforma ao longo das sessões (Gráfico 3). Não foram observadas diferenças entre machos e fêmeas, nem interação do sexo com o protocolo de isolamento.

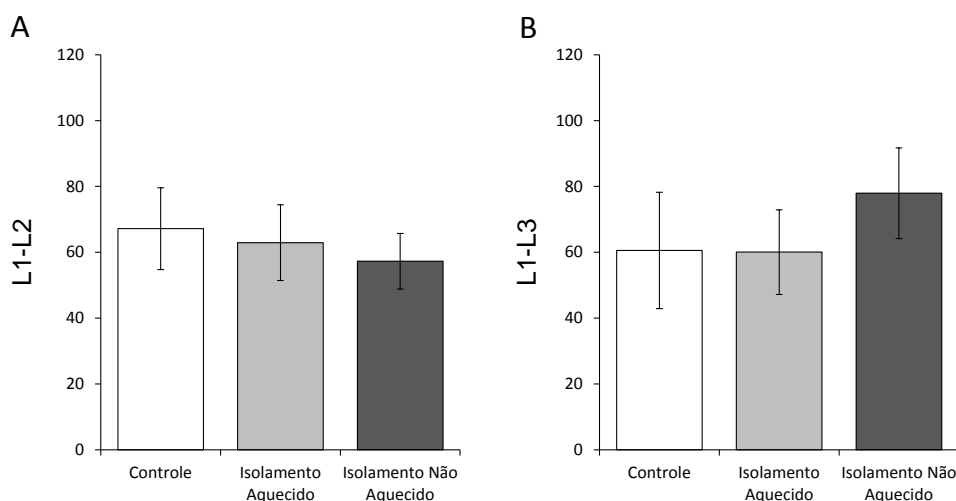
Gráfico 3 - Médias ( $\pm$  EPM) da latência para descida da plataforma dos animais dos grupos controle, isolamento aquecido e isolamento não aquecido na primeira (S1), segunda (S2) e terceira (S3) sessões experimentais.



Observação: Notar que, para os três grupos, a latência da primeira sessão foi menor que a das demais. Comparação com a primeira sessão: \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

De modo interessante, a uANOVA realizada para as latências de descida obtidas na primeira sessão, indicaram que a latência do grupo submetido ao Isolamento Não Aquecido ( $10,3 \pm 1,4s$ ) foi significativamente menor que a do grupo Controle ( $38,1 \pm 8,3s$ ) [uANOVA<sub>menor ordem</sub>, protocolo de isolamento:  $F(2/35) = 7,8$ ;  $P \leq 0,01$ ]. As uANOVAs realizadas para as latências de descida obtidas na segunda e na terceira sessões não revelaram diferenças entre os grupos. Também não foram observadas diferenças entre os grupos para as análises realizadas para os dois índices de aprendizado utilizados (Gráfico 4 – A e B).

Gráfico 4 (A e B) - Médias ( $\pm$  erro padrão da média) dos valores obtidos para as diferenças entre as latências na primeira (L1) e na segunda (L2) [A] e entre as latências na primeira (L1) e na terceira (L3) sessões [B].



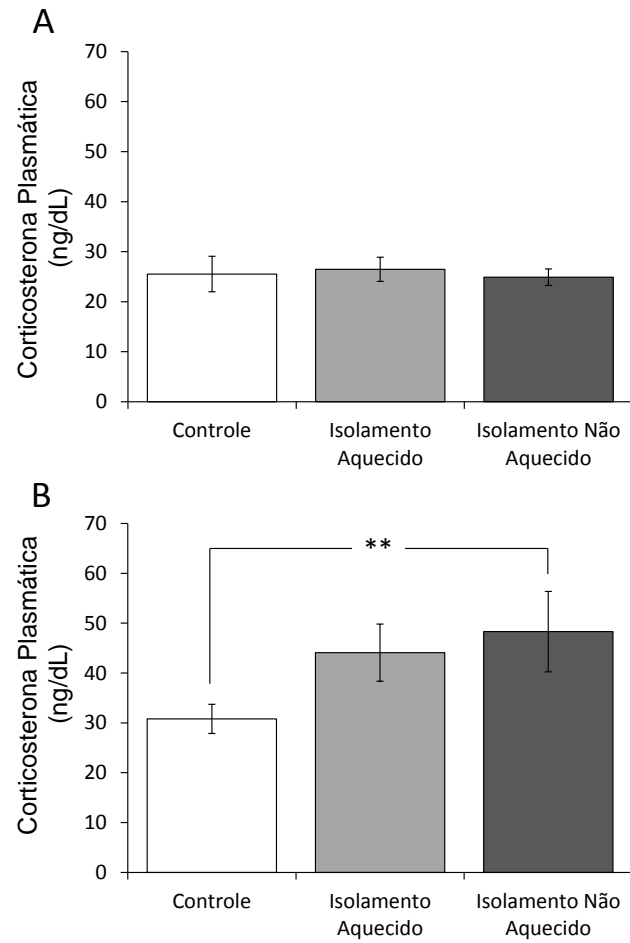
Observação: Notar que não foram observadas diferenças entre os animais dos grupos controle, isolamento aquecido e isolamento não aquecido em A e B.

## 4.2 Estudo 2: Avaliação do efeito do controle da temperatura do ambiente durante o isolamento materno nos níveis de corticosterona e hormônios tireoidianos de camundongos neonatos e adolescentes.

### 4.2.1 Corticosterona plasmática

Os níveis de corticosterona plasmática aumentaram significativamente durante o período de PN6 ( $25,1 \pm 2,9$  ng/dL) para PN10 ( $39,5 \pm 2,0$  ng/dL) [uANOVA, idade:  $F(1/55) = 24,5$ ;  $P \leq 0,001$ ]. Contudo, este aumento foi mais pronunciado no grupo de animais submetido ao isolamento não aquecido [uANOVA, idade $\times$ protocolo de isolamento:  $F(2/55) = 3,1$ ;  $P \leq 0,05$ ]. Enquanto não foram observadas diferenças entre os grupos em PN6, em PN10, os níveis de corticosterona plasmática do grupo de animais submetido ao isolamento não aquecido foram maiores que os dos demais grupos [uANOVA<sub>menor ordem</sub>, protocolo de isolamento:  $F(2/28) = 4,0$ ;  $P \leq 0,05$ ] (Gráfico 5 – A e B).

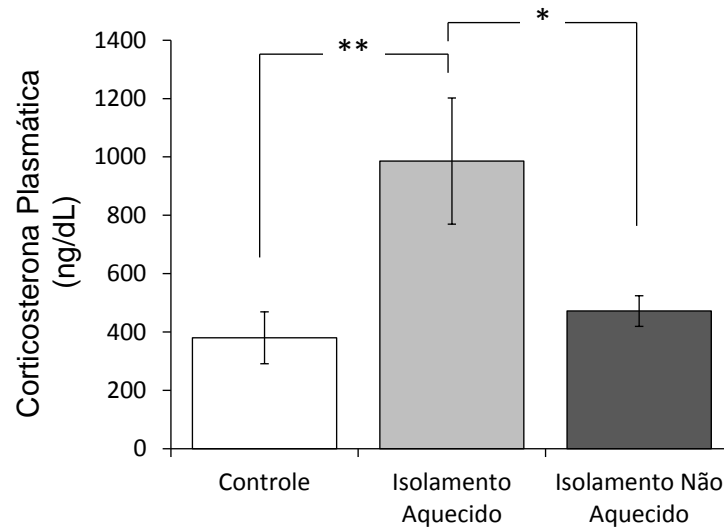
Gráfico 5 (A e B) - Dosagens de corticosterona em PN6 e PN10.



Legenda: (A) Dosagens da corticosterona em PN6; (B) Dosagens da Corticosterona em PN10.

Em PN30, os níveis de corticosterona plasmática diferiam entre os grupos experimentais [uANOVA, protocolo de isolamento:  $F(2/17) = 5,5$ ;  $P \leq 0,05$ ]. Contudo, de modo distinto ao observado em PN10, os animais do grupo submetido ao isolamento aquecido é que mostraram as maiores concentrações de corticosterona plasmática (Gráfico 6). Não foram observadas diferenças entre machos e fêmeas.

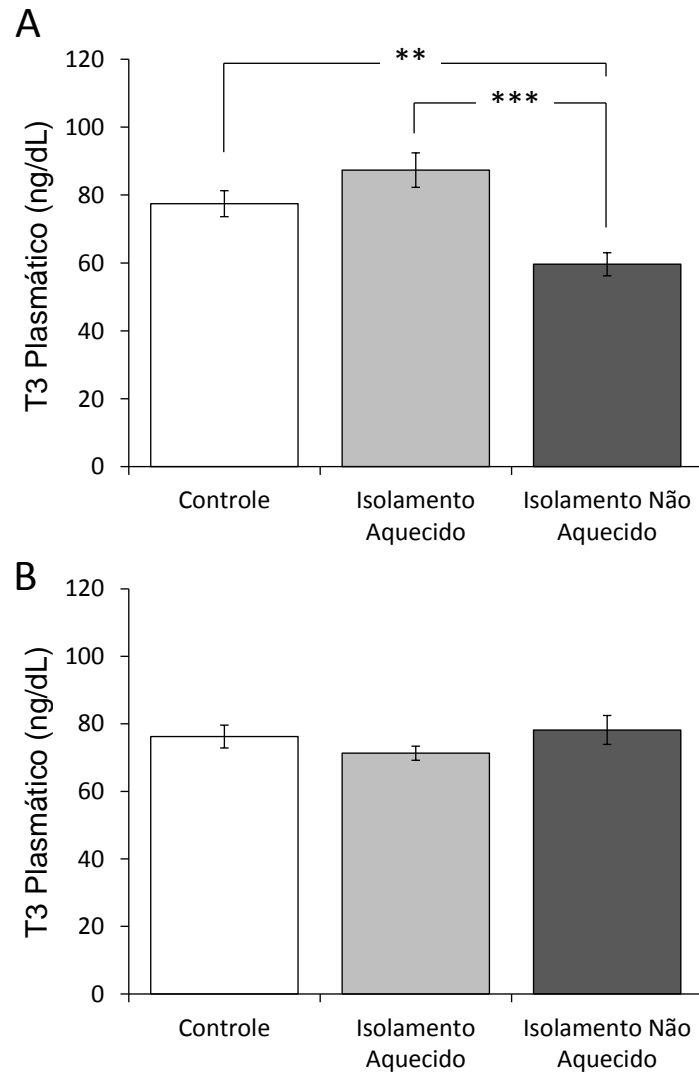
Gráfico 6 – Dosagens da corticosterona em PN30.



#### 4.2.2 Hormônios tireoidianos

Os níveis plasmáticos de T3 aumentaram significativamente durante o período de PN6 ( $72,0 \pm 3,1$  ng/dL) para PN10 ( $85,6 \pm 2,9$  ng/dL) [uANOVA, idade:  $F(1/48) = 10,0$ ;  $P \leq 0,01$ ]. De um modo geral, durante o período de isolamento, os animais do grupo submetido ao isolamento não aquecido apresentaram níveis plasmáticos de T3 significativamente menores que os dos demais grupos [uANOVA, protocolo de isolamento:  $F(2/48) = 11,7$ ;  $P \leq 0,001$ ] (Gráfico 7 – A). Em PN30, os níveis plasmáticos de T3 não diferiram entre os grupos (Gráfico 7 – B), nem entre machos e fêmeas.

Gráfico 7 (A e B) – Dosagens do T3

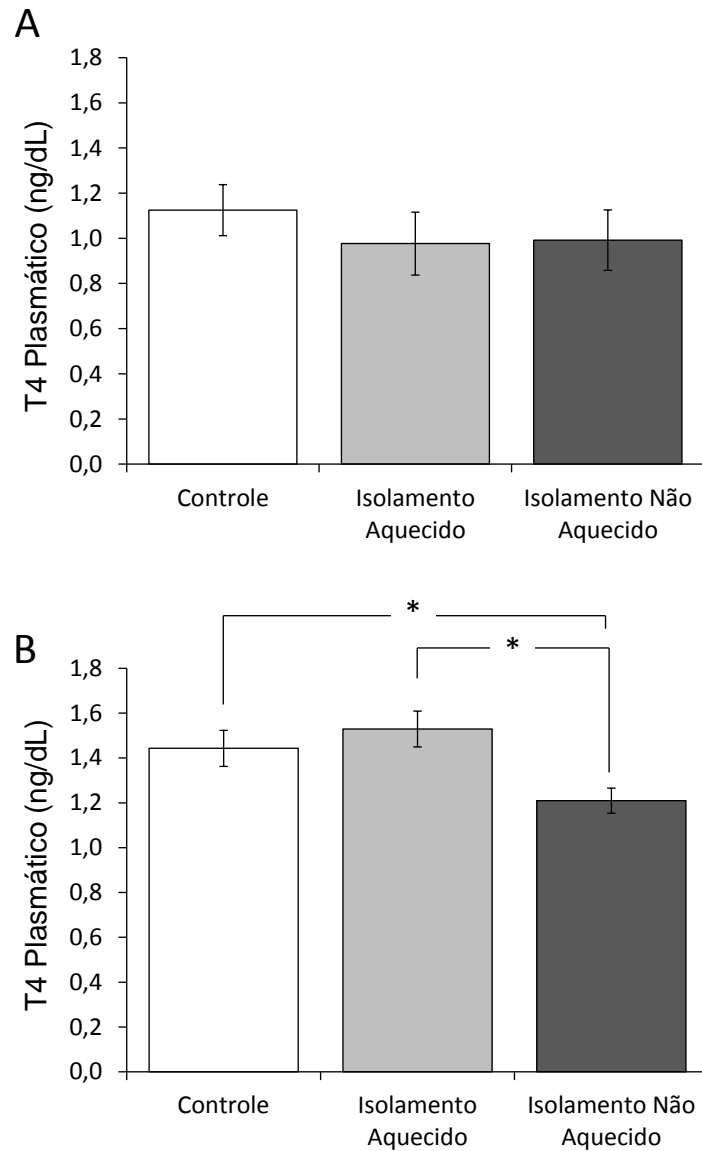


Legenda: Em (A), estão representadas as médias compiladas dos valores obtidos em PN6 e PN10 para cada um dos grupos experimentais; em (B) estão representadas as médias dos valores em PN30.

Os níveis plasmáticos de T4 aumentaram significativamente durante o período de PN6 ( $0,6 \pm 0,1$  ng/dL) para PN10 ( $1,4 \pm 0,1$  ng/dL) [uANOVA, idade:  $F(1/48) = 90,0$ ;  $P \leq 0,001$ ]. Durante o período de isolamento, não foram observadas diferenças nas concentrações plasmáticas de T4 entre os grupos controle, isolamento aquecido e isolamento não aquecido (Gráfico 8 – A). Contudo, em PN30, o grupo submetido ao isolamento não aquecido apresentou níveis plasmáticos de T4 menores que os dos demais grupos (Gráfico 8 – B). Não foram observadas diferenças entre machos e fêmeas em PN30.



Gráfico 8 (A e B) – Dosagens do T4



Legenda: Em (A), estão representadas as médias compiladas dos valores obtidos em PN6 e PN10 para cada um dos grupos experimentais; em (B) estão representadas as médias dos valores em PN30.

### 4.3 Estudo 3: Efeito da vimpocetina na hiperatividade locomotora induzida pela separação materna no período neonatal.

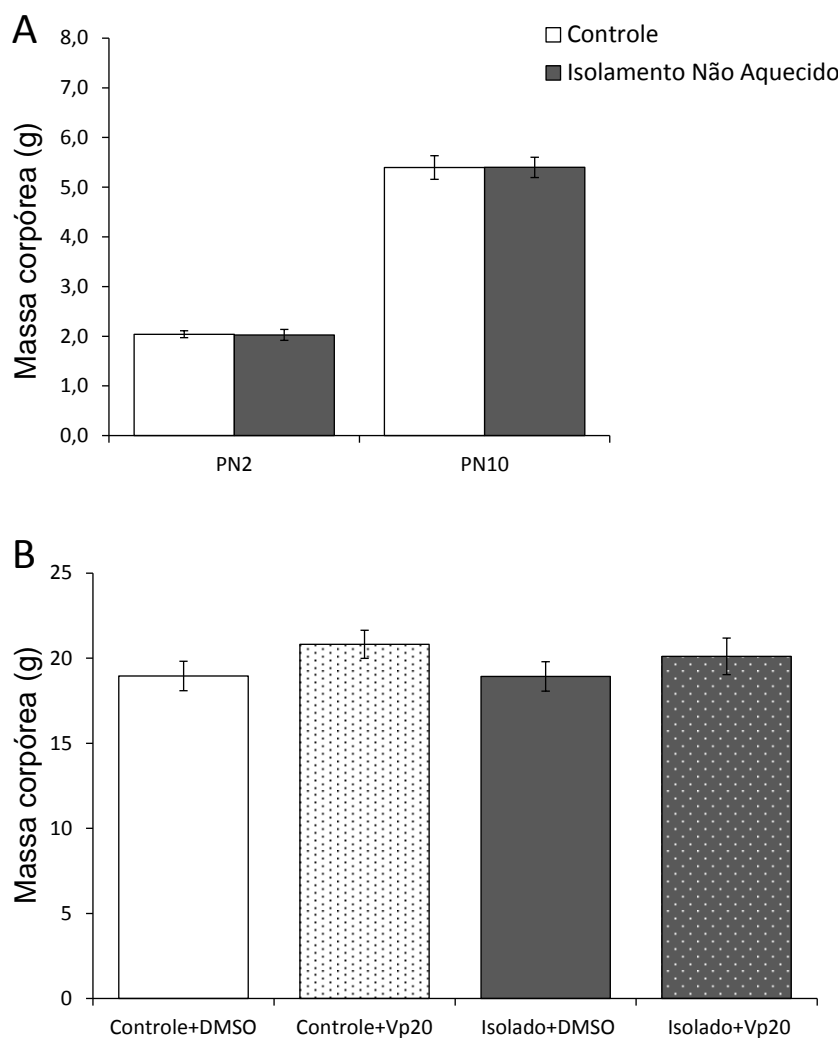
#### 4.3.1 Taxa de Mortalidade

Conforme observado no Estudo 1, a maioria dos animais sobreviveu até a idade dos testes comportamentais. A taxa de mortalidade foi de 7,8% ( $n = 10$ ) no grupo controle, e no grupo submetido ao isolamento não aquecido foi de 10,6% ( $n = 12$ ). Em contraste com o que foi observado no Estudo 1, a taxa de mortalidade do grupo submetido ao isolamento não aquecido não diferiu da do grupo controle. Não houve mortes após as injeções de vimpocetina ou de solução veículo.

#### 4.3.2 Ganho de peso

Durante o período de isolamento, a massa corpórea das ninhadas aumentou significativamente [rANOVA, idade:  $F(1/22) = 767,8$ ,  $P \leq 0,001$ ], porém não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais (Gráfico 9 – A). Em PN30, a massa corpórea não foi afetada pelo isolamento nem pelo tratamento com vimpocetina (Gráfico 9 – B).

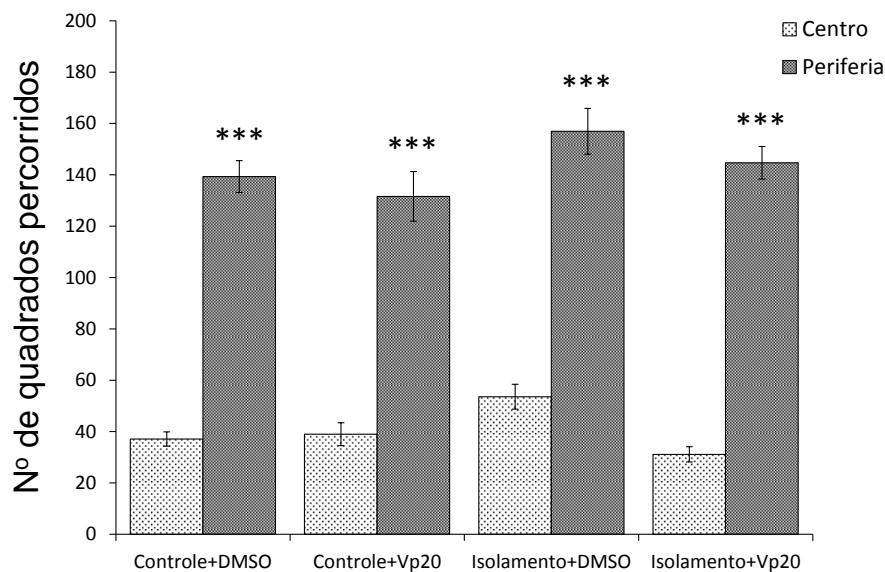
Gráfico 9 (A e B) - Médias ( $\pm$  EPM) da massa corpórea em gramas dos animais dos grupos controle e isolamento não aquecido no início (PN2) e final (PN10) do período de isolamento [A] e durante o período de teste [B].



#### 4.3.3 Teste de campo aberto

De modo geral, o número de quadrados percorridos na porção periférica do campo foi superior àquela no centro [ $F(1/107) = 347,3$ ;  $P < 0,001$ ] (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Médias ( $\pm$  EPM) da ambulação total no centro e na periferia do campo aberto

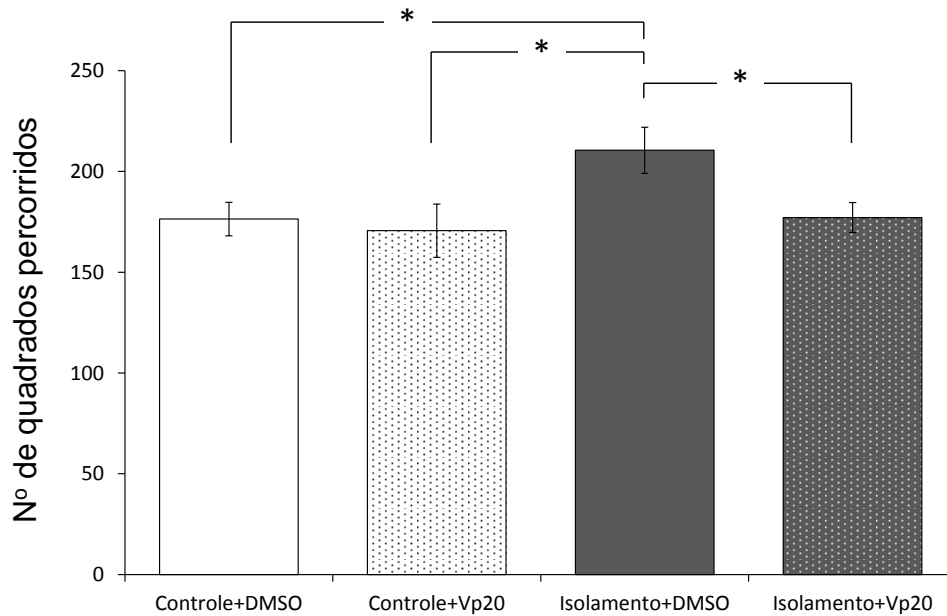


Um alto grau de correlação foi observado nas comparações realizadas entre as medidas de ambulação total e a ambulação na periferia ( $r = 0,97$ ,  $P < 0,001$ ) e entre as medidas de ambulação no total e a ambulação no centro ( $r = 0,81$ ,  $P < 0,001$ ). Desta forma, para evitar a redundância na apresentação dos resultados, optamos por apresentar apenas os resultados da análise da ambulação total (atividade no centro + atividade na periferia) e a razão entre a atividade no centro e na periferia.

De modo geral, a atividade reduziu, significativamente, ao longo dos 10 minutos do teste [rANOVA, intervalo de tempo:  $F(4,0/181,8) = 12,8$ ;  $P < 0,001$ ]. Não foram observadas diferenças entre os grupos com relação à redução de atividade ao longo dos intervalos de tempo. Em relação ao tempo total do teste, a atividade das fêmeas ( $198,6 \pm 7,7$ ) foi significativamente maior que a dos machos ( $172,8 \pm 7,1$ ) [rANOVA, Sexo:  $F(1/53) = 6,1$ ;  $P < 0,05$ ]. Apesar disso, não foram observadas interações do sexo com o isolamento neonatal e com o tratamento.

O isolamento neonatal promoveu um aumento da atividade locomotora que foi mitigado pelo tratamento com vimpocetina [rANOVA, Isolamento neonatal  $\times$  Tratamento:  $F(1/53) = 3,2$ ;  $P = 0,08$ ; ANOVA menor ordem:  $F(3/53) = 3,0$ ;  $P < 0,05$ ]. Particularmente, a atividade do grupo Isolado+DMSO foi 16% maior que a do grupo Controle+DMSO, 19% maior que a do grupo Controle+Vp20 e 16% maior que a do grupo Isolado+Vp20, que não diferiram entre si (Gráfico 11).

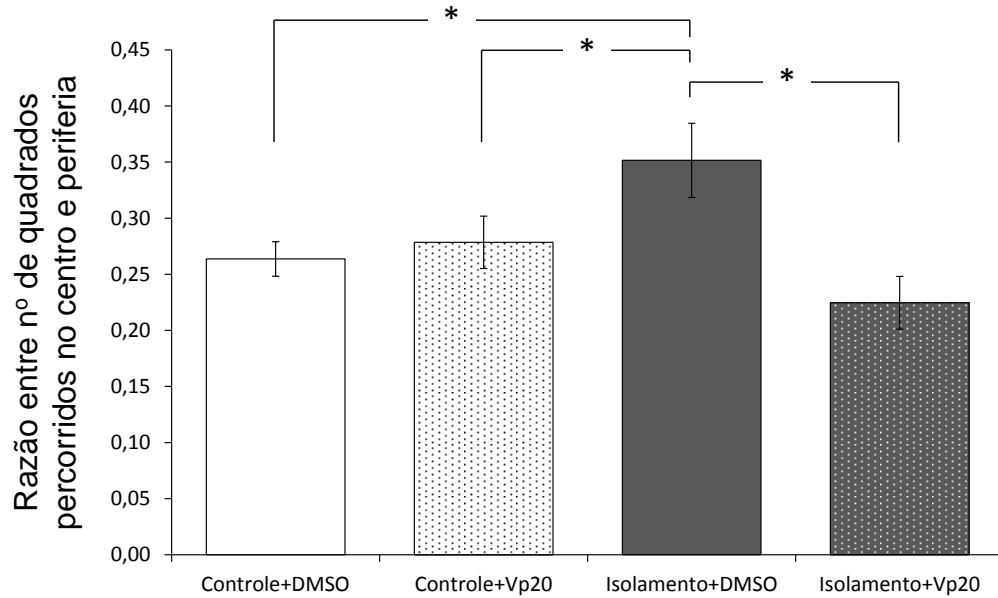
Gráfico 11 - Médias ( $\pm$  EPM) da ambulação total no teste de campo aberto dos animais submetidos ao isolamento não aquecido do segundo ao décimo dia pós-natal e tratados com 20mg/kg de vimpocetina (Vp20) ou solução veículo (DMSO)



Observação: Notar que a atividade do grupo Isolado+DMSO foi significativamente maior que a dos demais. FLSD: \*  $P < 0,05$ .

Em relação à razão entre a atividade no centro e na periferia do campo aberto, houve um aumento significativo ao longo dos 10 minutos do teste [rANOVA, intervalo de tempo:  $F(5,7/126,7) = 6,3$ ;  $P < 0,001$ ]. De modo interessante, o isolamento neonatal promoveu um aumento na razão entre centro e periferia que foi mitigado pelo tratamento com vimpocetina [rANOVA, Isolamento neonatal  $\times$  Tratamento:  $F(1/22) = 4,8$ ;  $P < 0,05$ ; ANOVA menor ordem:  $F(3/49) = 3,0$ ;  $P < 0,05$ ]. Particularmente, a atividade do grupo Isolado+DMSO foi 25% maior que a do grupo Controle+DMSO, 21% maior que a do grupo Controle+Vp20 e 36% maior que a do grupo Isolado+Vp20, que não diferiram entre si (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Médias ( $\pm$  EPM) da razão entre a ambulação no centro e periferia no teste de campo aberto dos animais submetidos ao isolamento não aquecido do segundo ao décimo dia pós-natal e tratados com 20mg/kg de vimopcetina (Vp20) ou solução veículo (DMSO).



Observação: Notar que os valores do grupo Isolado+DMSO foram significativamente maiores que a dos demais. FLSD: \*  $P < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Resumo dos resultados

Neste trabalho realizamos três estudos. Nos dois primeiros, avaliamos o efeito do controle da temperatura do ambiente durante o isolamento com separação materna no período neonatal sobre a atividade locomotora e sobre o aprendizado e memória em camundongos adolescentes (primeiro estudo) e nos níveis de corticosterona e hormônios tireoidianos de camundongos neonatos e adolescentes (segundo estudo). No terceiro estudo, avaliamos se o tratamento com vimocetina era capaz de reverter a hiperatividade locomotora induzida pelo isolamento não aquecido com separação materna no período neonatal. Os estudos foram realizados em épocas diferentes e, portanto, em cada um foi utilizada uma amostra independente de animais.

Os principais resultados foram:

- 1) O isolamento neonatal não afetou o ganho de massa corpórea;
- 2) O isolamento neonatal com separação materna resultou em hiperatividade locomotora somente no grupo de animais submetido ao isolamento sem aquecimento;
- 3) O isolamento neonatal sem aquecimento aumentou a atividade locomotora no centro do campo aberto;
- 4) Não houve alteração na aprendizagem e na memória dos animais em decorrência do isolamento neonatal com separação materna;
- 5) Houve redução das latências de descida na primeira sessão da esQUIVA inibitória no grupo submetido ao isolamento não aquecido;
- 6) A corticosterona plasmática no final do período de isolamento estava mais elevada nos animais que foram submetidos ao isolamento não aquecido;
- 7) Os animais que foram submetidos ao isolamento não aquecido apresentaram os níveis de T3 e T4 menores que aqueles observados nos animais dos demais grupos experimentais, respectivamente, no final do período de isolamento e no início da adolescência;

8) Na adolescência, os animais submetidos ao isolamento aquecido não manifestaram hiperatividade, mas apresentaram níveis maiores de corticosterona basal na comparação com os demais grupos experimentais;

9) A vimpocetina normalizou a atividade locomotora de camundongos suíços adolescentes, previamente submetidos ao isolamento neonatal não aquecido com separação materna.

Além disso, tivemos alguns resultados que não trouxeram conhecimento novo, mas corroboraram o que consta da literatura, destacando que:

1) No Teste de Campo Aberto, os animais de todos os grupos experimentais andaram, significativamente, mais nos minutos iniciais, reduzindo a atividade locomotora, gradativamente, nos minutos seguintes; esse comportamento pode se associar ao mecanismo de habituação (Klejbor *et al.*, 2013);

2) No Teste de Campo Aberto, os animais de todos os grupos experimentais andaram mais nos quadrados periféricos do que nos quadrados centrais; esse comportamento tem sido associado à uma tendência natural dos camundongos de evitarem áreas abertas (Prut e Belzung, 2003; Klejbor *et al.*, 2013);

3) No Teste da Esquiva Inibitória, os animais de todos os grupos experimentais apresentaram aumento significativo das latências de descida nas sessões subsequentes à primeira, em que receberam estímulo elétrico; esse comportamento tem sido associado à geração de memória, mas também ao mecanismo de condicionamento (Kosten *et al.*, 2012).

## **5.2 O isolamento neonatal não afetou o ganho de massa corpórea**

A medida da massa corpórea é considerada um bom indicador do estado geral de saúde dos animais (Henck, 2002). A avaliação periódica da massa pode dar uma idéia do grau de recuperação após um insulto ou tratamento invasivo (Henck, 2002). Além disso, o conhecimento sobre o massa corpórea no momento do teste comportamental é importante para a interpretação dos dados uma vez que alterações do peso corporal podem confundir os resultados comportamentais (Henck, 2002). Por conta disso, nós optamos por analisar a massa corpórea durante a exposição e durante o período dos testes.



Em humanos, o estresse gestacional tem sido associado com malformações fetais e com a diminuição do peso ao nascer (Grizenko *et al.*, 2008). Contudo, no nosso estudo, a separação materna precoce, realizada diariamente por 3 horas, não afetou o ganho de massa corporal dos animais durante o período de isolamento (de PN2 a PN10) e no início da adolescência (PN30). Resultados semelhantes foram observados em ratos submetidos ao isolamento neonatal por 1 hora diária de PN2 a PN9 em uma câmara com temperatura mantida nos 30°C (Kosten e Kehoe, 2010) e em camundongos C57Bl6/J submetidos a um protocolo de separação materna combinada com estresse materno imprevisível por 3 horas diárias de PN1 a PN14 (Franklin *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado em camundongos C57BL/6J que foram submetidos à 3h de isolamento diário de PN2 a PN17 foi sugerido que um aumento nos cuidados maternos após os períodos de isolamento poderia reduzir os efeitos decorrentes do estresse neonatal. Desta forma, é possível especular que a redução no ganho de peso decorrente de três horas diárias de jejum seja mascarada por um aumento da amamentação após a devolução dos filhotes à progenitora. Contudo, nossos dados não corroboram esta hipótese uma vez que, nos grupos submetidos ao isolamento, tanto aquecido quanto não aquecido, não foram observadas alterações significativas no peso dos animais entre as pesagens obtidas imediatamente antes e após cada sessão de isolamento. Este resultado indica que, pelo menos para camundongos Suíços, 3 horas de isolamento diário durante os dez primeiros dias de vida pós-natal não são suficientes para afetar a massa corpórea dos animais. Além disso, como a massa corpórea dos filhotes submetidos ao isolamento não aumentou, anormalmente, durante o período de isolamento, é pouco provável que a mãe superalimente os filhotes após sua devolução às gaiolas.

### **5.3 O isolamento neonatal com separação materna resultou em hiperatividade locomotora somente no grupo de animais submetido ao isolamento sem aquecimento**

O Teste de Campo Aberto é um instrumento útil para registrar algumas alterações comportamentais em roedores, principalmente, a hiper ou hipoatividade locomotoras (George *et al.*, 2010) (Nunes *et al.*, 2011) (Sawano *et al.*, 2013) (Daniels *et al.*, 2009). Além disso, o teste de campo aberto tem sido utilizado para avaliar a capacidade de habituação (Klejbor *et*

*al.*, 2013) e a ansiedade (Fabricius *et al.*, 2008) (Daniels *et al.*, 2009; George *et al.*, 2010). A Habituação, um fenômeno que envolve mecanismos de aprendizagem tanto associativos quanto não associativos, é geralmente caracterizada por uma redução no grau de atividade apresentada por um indivíduo à medida em que se torna familiarizado com uma situação ou ambiente (Leussis e Bolivar, 2006). Experimentalmente, a redução na atividade é observada à medida que o teste progride (habituação intra-sessões) e/ou em consequência de testes repetidos (habituação inter-sessões) (Leussis e Bolivar, 2006). Para avaliar a ansiedade, a maioria dos autores se vale do fato de que os roedores espontaneamente preferem ficar próximos à parede evitando a parte central da arena (Prut e Belzung, 2003) . De modo geral, um aumento de tempo gasto na parte central, aumento da razão entre a ambulação no centro e periferia ou a diminuição da latência para entrar na parte central são, normalmente utilizados como indicadores de ansiedade (Prut e Belzung, 2003)

No Estudo 1, pôde-se observar um efeito marcante da temperatura de conservação das ninhadas durante a separação materna sobre a atividade locomotora dos animais, resultando que os animais submetidos ao isolamento não aquecido apresentaram hiperatividade significativa durante quase todo o Teste de Campo Aberto. Uma vez que não houve diferença no comportamento locomotor entre os animais do grupo controle e do grupo isolado aquecido, sugere-se que, no modelo de estresse precoce por isolamento com separação materna, a temperatura de conservação dos filhotes durante o isolamento é um fator crítico para a geração de hiperatividade locomotora. Além disso, nossos dados suportam a hipótese de que, durante o período de surto de crescimento cerebral, fatores como a familiaridade com o ambiente ou o grau de estimulação sensorial podem ser menos determinantes para a intensidade da resposta ao estresse do que fatores que causem desconforto ou afetem diretamente parâmetros fisiológicos, como por exemplo, a redução da temperatura corpórea durante os procedimentos de separação materna ou isolamento neonatal. Em acordo com esta idéia, a hipóxia neonatal promove hiperatividade locomotora em ratos testados entre PN20 e PN45 (Iuvone *et al.*, 1996; Dell'anna, 1999)

De modo interessante, a influência da ausência do controle da temperatura ambiente durante o isolamento neonatal na manifestação da hiperatividade locomotora pode servir de base ao entendimento de uma situação clínica: os casos de Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) associados à prematuridade. Um grande estudo retrospectivo Sueco, que foi realizado sobre uma base com dados de mais de 1 milhão de crianças nascidas entre 1987 e 2000, demonstrou correlação inversa entre o aumento da idade gestacional ao

nascer e o risco posterior do aparecimento do TDAH, ou seja, quanto maior a idade gestacional ao nascer, menor o risco de TDAH (Lindstrom *et al.*, 2011). A exemplo dos bebês humanos, especialmente prematuros, a capacidade de gerar calor (termogênese) dos camundongos durante as duas primeiras semanas de vida é limitada e os animais que são mantidos longe do ninho, na temperatura ambiente (em torno de 22°C), apresentam uma redução significativa da temperatura corpórea (Akana, 2008). A temperatura da pele de bebês humanos prematuros, quando expostos ao ambiente, cairá cerca 0,5 a 1°C a cada minuto (Manani *et al.*, 2013). Em 1997, a Organização Mundial da Saúde categorizou a hipotermia em neonatos em faixas de gravidade: 36 a 36,5°C – estresse pelo frio; 32 a 36°C – hipotermia moderada, representando perigo e a necessidade de aquecimento imediato do bebê; abaixo de 32°C – hipotermia grave, com risco de vida, e medidas de urgência requeridas (Manani *et al.*, 2013). Em recém-nascidos, especialmente pré-termos, a instabilidade da temperatura corpórea contribui, diretamente, para a mortalidade: para cada 1°C abaixo de 36°C na temperatura de admissão, ocorre aumento de 28% na taxa de mortalidade (Manani *et al.*, 2013). Adicionalmente, a hipotermia ocorre em 31% a 78% dos bebês com peso ao nascimento menor que 1.500g, especialmente naqueles nascidos com menos de 28 semanas de idade gestacional.

Os efeitos neurocomportamentais tardios da prematuridade sobre o SNC podem se relacionar, adicionalmente, com uma maior susceptibilidade do SNC desses bebês à excitotoxicidade. Em fetos humanos no 3º trimestre da gestação, os neuroesteroides, em especial a allopregnanolona, podem atuar na proteção do SNC contra a excitotoxicidade uma vez que eles aumentam a inibição GABAérgica (Hirst *et al.*, 2009). Essa proteção é especialmente importante em situações de isquemia e hipóxia do SNC fetal. A placenta tem um papel importante na manutenção de níveis adequados de esteroides no cérebro do feto, atuando como fonte de precursores para a síntese de esteroides neuroativos pelo SNC do feto (Hirst *et al.*, 2009). A progesterona produzida na placenta é metabolizada no SNC do feto, resultando em agonistas dos receptores GABA<sub>A</sub>, como a allopregnanolona, que aumentam a inibição GABAérgica, e são importantes no controle da excitabilidade do cérebro fetal (Hirst *et al.*, 2009). A prematuridade priva o cérebro fetal desses precursores placentários, o que pode, ao menos teoricamente, concorrer para os transtornos neurocomportamentais dela decorrentes.

Do exposto, entende-se que submeter camundongos neonatos a um ambiente com temperatura inferior à sua temperatura interna poderia mimetizar, aproximadamente, o que

ocorre com bebês humanos que nasceram, prematuramente, durante o 3º trimestre gestacional. Assim, em face da influência da temperatura no nosso trabalho, levantamos a hipótese de que a fisiopatogenia dos casos de TDAH associados à prematuridade pode depender, ao menos em parte, da hipotermia decorrente da imaturidade na termorregulação desses bebês.

Vale mencionar, contudo, que outros fatores além da temperatura em que os animais são mantidos durante o isolamento podem afetar o desenvolvimento e assim contribuir para a manifestação da hiperatividade locomotora. Por exemplo, o estresse por separação materna pode resultar em fenótipos opostos no Teste de Campo Aberto, com hiperatividade ou hipoatividade locomotora, dependendo da linhagem de roedor utilizada (Spivey *et al.*, 2008). Não se pode descartar ainda a possibilidade de que diferenças no protocolo de separação materna com relação à idade e duração da separação ou à idade em que foram realizados os testes podem contribuir para as discrepâncias (Quadro 1). Diferenças nas condições de teste como a luminosidade, dimensões da caixa de atividade e duração do teste podem afetar a atividade locomotora no teste de campo aberto (Sagvolden *et al.*, 2009).

Quadro 1 – Comparativo entre diferentes protocolos de separação materna quanto à idade e duração da separação, e ao grau de atividade locomotora.

Protocolo de separação *	Idade do teste	Grau de atividade	Referência
3horas/dia de PN1 até PN14	PN15	Hiperatividade	(Arnold e Sivi, 2002)
6horas/dia de PN2 até PN6 e de PN9 até PN13	PN28	Hiperatividade apenas do 7º ao 9º min de um teste de 10 min.	(Colorado <i>et al.</i> , 2006)
6horas/dia de PN2 até PN14	PN40	Sem diferença	(Rhees <i>et al.</i> , 2001)
6horas/dia de PN4 até PN20	PN13-60	Sem diferença	(Stanton <i>et al.</i> , 1992)
3horas/dia de PN3 até PN14	PN77	Sem diferença	(Shalev e Kafkafi, 2002)

\* Em todos os casos os filhotes foram mantidos em contato com os irmãos e com a temperatura do recipiente aquecido entre 30 e 35° C. Fonte: vide referências citadas no próprio quadro.

Finalmente, vale mencionar que a influência da temperatura de isolamento no comportamento locomotor foi reproduzida no Estudo 3, o que mostra que é consistente a

associação entre isolamento não aquecido e hiperatividade nesse modelo de estresse precoce por isolamento com separação materna.

#### **5.4 O isolamento neonatal sem aquecimento aumentou a atividade locomotora no centro do campo aberto**

No estudo 1, não foi possível analisar a atividade dos animais no centro do Monitor de Atividade. Contudo no estudo 3, observou-se um aumento significativo da atividade no centro do Campo Aberto entre os animais submetidos ao isolamento neonatal com separação materna.

Roedores tendem a evitar, naturalmente, áreas abertas, o que representa um comportamento instintivo de preservação contra predadores em potencial. Por esse motivo, no Teste de Campo Aberto, a atividade motora desses animais tende a ser maior na periferia do que no centro. A atividade dos animais no centro do Teste de Campo Aberto tem sido utilizada como um indicador de ansiedade (Heldt *et al.*, 2012), ou seja, quanto maior a atividade no centro, menor a ansiedade dos animais.

De modo interessante, a atividade locomotora no Teste de Campo Aberto pode sofrer influência da luminosidade, conforme já sinalizado anteriormente (Sagvolden *et al.*, 2009). George (George *et al.*, 2010), utilizando camundongos C57BL/6, demonstrou que esses animais, quando submetidos à separação materna no período neonatal com desmame precoce, apresentavam maior atividade no centro do Teste de Campo Aberto que os animais controles; esse comportamento era o inverso do que era esperado pelos autores e poderia, inicialmente, ser interpretado como um nível reduzido de ansiedade nos animais submetidos à separação materna. Entretanto, a luminosidade no Teste de Campo Aberto era uniforme e suave nesse experimento. Os autores repetiram o teste, aumentando a intensidade da iluminação no centro do Teste de Campo Aberto e, como resultado, os animais submetidos à separação materna com desmame precoce passaram a evitar o centro do Campo Aberto muito mais que os controles. Com base neste resultado, os autores sugeriram que, em situação de iluminação suave, o Teste de Campo Aberto possa falhar em demonstrar o comportamento associado à ansiedade, mas pode ter sensibilidade aumentada para registrar o comportamento exploratório (George *et al.*, 2010).

Daniels (Daniels *et al.*, 2009), ao submeter ratos Sprague Dawley à separação materna por 3 horas diárias de PN2 a PN14 observou, no Teste de Campo Aberto, que a distância percorrida total e o tempo gasto no centro foram significativamente maiores no grupo de animais submetido à separação materna do que no grupo controle em PN19. Por outro lado, a frequência de aproximações de um novo objeto colocado na zona central em uma segunda sessão do Teste de Campo Aberto realizada em PN20 foi menor entre os ratos do grupo submetido à separação materna do que entre os controles. De posse dessa segunda observação, os autores sugeriram que o maior tempo de centro observado na 1ª sessão do Teste de Campo Aberto dos animais submetidos à separação materna, ao invés de representar um estado emocional relaxado ou um aumento do comportamento exploratório, significava um estado de hiperexcitação, que levava os animais a buscar, ansiosamente, uma rota de fuga ou um abrigo.

Considerando que utilizamos iluminação vermelha e suave (fora do espectro de percepção da luz dos camundongos) no Teste de Campo Aberto, essa observação poderia ser melhor interpretada como hiperexcitabilidade, com aumento da busca de rotas de fuga, do que como ansiedade reduzida ou comportamento exploratório aumentado nesses animais, conforme discutido acima. Como o instinto natural de evitar espaços abertos não foi refreado, esse comportamento poderia ser análogo à maior impulsividade de crianças com TDAH, que têm capacidade reduzida de inibir seus impulsos, e possuem grande sensibilidade aos estímulos do momento presente, respondendo ou agindo imediatamente, antes de pensar nas eventuais consequências.

### **5.5 Não houve alteração na aprendizagem e na memória dos animais em decorrência do isolamento neonatal com separação materna**

A memória consiste na capacidade de armazenamento de informações que podem ser recuperadas e utilizadas posteriormente (Lent, 2010). O processo de formação da memória baseia-se em duas etapas principais, a aquisição de informação (aprendizagem) e a retenção da informação, que pode ser de curto ou de longo prazo (Lent, 2010). Neste estudo optamos por utilizar a esQUIVA passiva que além de ser um teste simples e rápido, permite avaliar vários aspectos do processo de aprendizado e memória em curto e longo prazo.

A liberação de cortisol (em humanos) e da corticosterona (em roedores) em resposta ao estresse, determina altas concentrações desses hormônios em áreas do SNC sabidamente envolvidas com o aprendizado e a memória, como o hipocampo, o córtex pré-frontal e a amígdala, sugerindo que esses hormônios de estresse podem influenciar o desenvolvimento e a fisiologia dessas estruturas (Bangasser e Shors, 2010). Como a amígdala e o hipocampo desempenham um papel fundamental na modulação do aprendizado e memória no teste de esQUIVA inibitória (Cahill e Mcgaugh, 1998) esperávamos que os animais submetidos ao estresse apresentassem um desempenho pior que os animais do grupo controle. Contudo, no primeiro estudo, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais no que se refere ao aumento da latência de descida após a primeira sessão, indicando que todos os animais aprenderam, se recordaram ou foram condicionados pelo evento aversivo da 1ª sessão, ou seja, o estímulo elétrico. Neste sentido, nossos resultados contrastam com os achados em humanos (Weinstock, 2008) e em roedores (Kosten *et al.*, 2012) submetidos ao estresse durante o desenvolvimento.

Em roedores, três estudos avaliam os efeitos do estresse precoce no teste da esQUIVA inibitória (Kosten *et al.*, 2012). Nestes estudos, o estresse foi gerado por 15 minutos de isolamento (Kosten, Lee, *et al.*, 2007) ou por suaves choques nas patas (Ader, 1973) de PN1 a PN21 ou após 1 hora de isolamento de PN2 até PN9 (Kosten, Karanian, *et al.*, 2007). Nos três estudos foram observados prejuízos de aprendizado em machos e fêmeas. Contudo, nestes estudos foram utilizados apenas ratos da linhagem Sprague-Dawley e os testes foram realizados na idade adulta. Desta forma, não é possível descartar a possibilidade de que a discrepância entre o nosso achado e o dos demais estudos em roedores se devam às espécies utilizadas e/ou a idade em que foram realizados os testes. De modo interessante, alguns autores tem sugerido que o estresse precoce produz alterações morfológicas persistentes no hipocampo e em outras estruturas cerebrais, que podem não se tornar evidentes (cl clinicamente) até a vida adulta (Andersen e Teicher, 2004). Particularmente, o isolamento por 4 horas de PN2 a PN20 não afeta a densidade sináptica (medida pela imunomarcção da sinaptofisina) no hipocampo em PN20 e PN40, mas reduz significativamente em PN60 (Andersen e Teicher, 2004).

### **5.6 Houve redução das latências de descida na primeira sessão da esQUIVA inibitória no grupo submetido ao isolamento não aquecido**

Ainda que os parâmetros utilizados para avaliar o aprendizado e memória não tenham sido afetados pelo isolamento neonatal, foram encontradas diferenças entre os grupos na primeira sessão (antes do choque). Especificamente, as latências de descida na primeira sessão do grupo submetido ao isolamento não aquecido foram menores que a dos demais grupos experimentais. Essa redução pode ser resultante tanto da hiperatividade locomotora, da hiperexcitabilidade com aumento da reação de fuga, quanto do aumento do instinto exploratório, menos provavelmente, nos animais do grupo submetido ao isolamento não aquecido. Essa redução poderia, ainda, ser uma manifestação de maior impulsividade? Não há amparo na literatura nesse sentido, mas caberia a discussão.

### **5.7 A corticosterona plasmática no final do período de isolamento estava mais elevada nos animais que foram submetidos ao isolamento não aquecido**

Cortisol, catecolaminas e hormônios tireoidianos parecem desempenhar papéis importantes para a maturação fetal no final da gestação, além de contribuírem para as adaptações fisiológicas do feto no momento do parto e após o nascimento (Hillman *et al.*, 2012). Alterações perinatais nos níveis desses hormônios induzidas por fatores externos, como o estresse ou a prematuridade, podem impactar na transição neonatal normal. Em acordo com esta idéia, o hipocampo é uma região do cérebro que parece ser, particularmente, sensível aos efeitos do estresse (Andersen e Teicher, 2004). A exposição precoce ao estresse ou aos corticosteroides pode causar remodelagem no hipocampo, com redução da ramificação dendrítica e da neurogênese (Andersen e Teicher, 2004). Altas concentrações de glicocorticóides podem exercer toxicidade direta sobre as células piramidais do hipocampo (Andersen e Teicher, 2004).

Em humanos, a exposição fetal a níveis elevados de cortisol materno durante a segunda metade da gestação foi associada com maior e mais duradoura liberação de cortisol frente ao estresse no neonato (Sandman *et al.*, 2011). Essa observação é condizente ainda com



a que relaciona a injeção de glicocorticóides sintéticos entre o final do segundo semestre e o início do terceiro trimestre da gestação com uma resposta amplificada do cortisol ao estresse em neonatos humanos nascidos a termo (Sandman *et al.*, 2011). Esta hiperreatividade do eixo HHA pode comprometer as funções cognitivas, motoras e emocionais da criança após o nascimento, sendo plausível que os neonatos mais reativos ao estresse se tornem mais inibidos ou ansiosos na infância e na adolescência (Sandman *et al.*, 2011).

Adicionalmente, alterações mais persistentes nos níveis desses hormônios podem influenciar muito além do período perinatal. Segundo Hasan (Hasan *et al.*, 2012), a liberação excessiva de glicocorticóides frente ao estresse psicológico crônico inibe a transcrição de moléculas de adesão nucleares, o que prejudica a plasticidade sináptica, além de reduzir a neurogênese e a sinaptogênese. Todos esses efeitos concorreriam para a produção de déficits de aprendizado, de memória e da habilidade cognitiva no processo de envelhecimento (Hasan *et al.*, 2012).

De modo importante, no estudo 2, observamos um aumento dos níveis de corticosterona plasmática apenas em PN10 e no grupo em que foi submetido ao isolamento não aquecido. Este resultado pode estar associado com o fato de que, em roedores neonatos, existe um período de responsividade reduzida do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) ao estresse, caracterizado por níveis basais reduzidos de corticosterona no soro e pela incapacidade de estressores leves induzirem elevação nos níveis séricos de corticosterona (Fabricius *et al.*, 2008). Em ratos, esse período de responsividade reduzida da corticosterona ao estresse vai do 4º ao 14º dias de vida, e em camundongos, do 1º ao 12º dias de vida (Fabricius *et al.*, 2008). Desta forma, a prematuridade do aumento dos níveis de corticosterona em resposta ao estresse observado no grupo que foi submetido ao isolamento não aquecido pode estar associada ao fato de que o nível de estresse pode ser maior em uma condição que gera hipotermia nos animais.

**5.8 Os animais que foram submetidos ao isolamento não aquecido apresentaram os níveis de T3 e T4 menores que aqueles observados nos animais dos demais grupos experimentais, respectivamente, no final do período de isolamento e no início da adolescência**

Ainda que a corticosterona tenha papel provável na produção de hiperatividade na adolescência dos animais submetidos ao isolamento neonatal não aquecido com separação materna, alterações nos níveis séricos de outros hormônios podem estar envolvidas na fisiopatogenia desse comportamento. Os hormônios da tireóide também são liberados em situação de trauma, estresse e frio, e podem ter participação nos efeitos do estresse sobre o SNC. Sawano (Sawano *et al.*, 2013), utilizando camundongos da sublinhagem SAMP8 (SAM – *senescence-accelerated mouse*) observou redução da concentração de 3,5,3'-triiodotironina (T3) no hipocampo que se correlacionou com hiperatividade locomotora (do 1º ao 8º meses de vida) e ansiedade reduzida (do 3º ao 5º meses de vida) no teste do campo aberto. Depke (Depke *et al.*, 2008), utilizando camundongos BALBc que foram submetidos a sessões repetidas de estresse, observou que esses animais desenvolveram uma síndrome hipermetabólica, com perda de massa magra, hiperglicemia, dislipidemia e acidose, associada a hipercortisolismo, hiperleptinemia, resistência insulínica e hipotireoidismo.

Segundo Chen (Chen *et al.*, 2012), o hipotireoidismo materno durante a gestação inibe a neurogênese no telencéfalo embrionário de camundongos, resultando em disfunção da aprendizagem e da memória na prole. Em humanos, a deficiência perinatal de hormônios tireoidianos leva ao cretinismo, uma síndrome caracterizada por déficits neurológicos e retardo mental (Chen *et al.*, 2012). Sawano (Sawano *et al.*, 2013), por sua vez, aponta a associação entre a deficiência de hormônios tireoidianos durante o desenvolvimento com o aparecimento posterior do TDAH. Segundo o autor, 40-70% das crianças com Resistência Generalizada aos Hormônios Tireoidianos, uma síndrome rara determinada geneticamente, desenvolvem TDAH. Adicionalmente, outros estudos têm mostrado o maior risco do desenvolvimento de TDAH em bebês prematuros, sendo que a maioria dos prematuros experimenta hipotireoidismo neonatal transitório por incapacidade da tireoide do recém-nascido pré-termo de suprir suas necessidades sem o aporte dos hormônios maternos, que ainda seria importante no final da gestação (Sawano *et al.*, 2013).

No nosso trabalho, os níveis séricos de T3 estavam significativamente reduzidos no período de separação materna somente no grupo submetido ao isolamento não aquecido. Adicionalmente, os níveis séricos de T4 estavam reduzidos nesse mesmo grupo em PN30. Esse fato sugere que a temperatura ambiente baixa pode comprometer a função tireoidiana em camundongos suíços neonatos e essa alteração pode ainda existir no início adolescência. Os níveis persistentemente reduzidos dos hormônios tireoidianos, por sua vez, podem comprometer a termogênese, resultando em hipotermia, estresse, e na maior liberação de corticosterona. No item 5.3, levantamos a hipótese de que a fisiopatogenia dos casos de TDAH associados à prematuridade pode depender, ao menos em parte, da hipotermia decorrente da imaturidade na termorregulação dos bebês. Agora, acrescentamos que a temperatura ambiente baixa pode interferir com a função tireoidiana no pré-termo, dificultando a termogênese, e contribuindo para uma cascata de reações que incluem estresse pelo frio e hipercortisolismo.

#### **5.9 Na adolescência, os animais submetidos ao isolamento aquecido não manifestaram hiperatividade, mas apresentaram níveis maiores de corticosterona basal na comparação com os demais grupos experimentais**

O aumento dos níveis de corticosterona basal observado, em PN30, no grupo de animais submetido ao isolamento aquecido está em acordo com outros estudos. Ratos Sprague Dawley submetidos à separação materna (sem isolamento dos filhotes, que permaneciam juntos) por 3 horas diárias de PN2 até PN14 apresentaram, em PN21, a corticosterona basal aumentada (Daniels *et al.*, 2009).

Desta forma, ainda que não tenhamos encontrado alterações no grupo de animais submetidos ao isolamento com a temperatura ambiente controlada durante o período de estresse, os níveis elevados de corticosterona basal em PN30, sugerem que houve uma programação do eixo HHA neste grupo. Essa observação reforça a importância das interferências ocorridas durante o período crítico do neurodesenvolvimento para a geração de alterações fisiológicas tardias associadas com o estresse.

### **5.10 A vimpocetina normalizou a atividade locomotora de camundongos suíços adolescentes, previamente submetidos ao isolamento neonatal não aquecido com separação materna**

No estudo 3, a vimpocetina foi capaz de mitigar a hiperatividade locomotora, bem como o aumento da atividade na zona central do Teste de Campo Aberto nos animais submetidos ao isolamento sem aquecimento. Estes resultados estão em acordo com estudos prévios realizados por nosso grupo que demonstraram que a vimpocetina também foi capaz de abolir a hiperatividade locomotora em camundongos expostos ao etanol (Nunes *et al.*, 2011) e ao chumbo (Filgueiras *et al.*, 2014) durante o desenvolvimento.

Desde a sua síntese, no final dos anos 60, a vimpocetina tem sido proposta para o tratamento de diversos males, com destaque para as doenças cerebrovasculares, por seus efeitos no aumento do fluxo sanguíneo cerebral e neuroproteção (Patyar *et al.*, 2011a). Contudo, os mecanismos através dos quais a vimpocetina exerce seus efeitos protetores e restaurativos ainda não são completamente conhecidos. Tem-se considerado que um sistema catecolaminérgico hipofuncional desempenhe um papel maior para a manifestação do fenótipo de hiperatividade em roedores e em humanos com TDAH. (Sagvolden *et al.*, 2005; Arnsten e Pliszka, 2011). Esta idéia é apoiada pelo fato de que agentes que aumentam a atividade catecolaminérgica, como metilfenidato e anfetaminas, são largamente usados no tratamento farmacológico do TDAH (Gerlach *et al.*, 2013) e são capazes de reduzir a hiperatividade em modelos de roedores para o TDAH (Kostrzewa *et al.*, 2008). Tanto o metilfenidato quanto as anfetaminas são inibidores da recaptção de dopamina e norepinefrina, mas as anfetaminas também estimulam a liberação de dopamina e norepinefrina e inibem a monoaminoxidase (Heal *et al.*, 2009). Interessantemente, o potencial protetor da vimpocetina contra o dano neuronal induzido por isquemia tem sido associado com a habilidade desse inibidor da fosfodiesterase de alterar os níveis extracelulares de dopamina; contudo, os resultados não são consistentes. (Yamashita *et al.*, 1997; Trejo, F *et al.*, 2001; Herrera-Mundo e Sitges, 2013). Em culturas de neurônios mesenfálicos de ratos, a administração de vimpocetina diminuiu o nível intracelular de dopamina e aumentou os níveis extracelulares de dopamina e do seu metabólito, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) (Yamashita *et al.*, 1997). Ao contrário, em terminações nervosas isoladas do corpo estriado, a

presença da vimpocetina diminuiu o conteúdo de dopamina, aumentou DOPAC, mas não alterou a liberação basal de dopamina (Trejo, F. *et al.*, 2001; Herrera-Mundo e Sitges, 2013).

Alguns autores têm sugerido que o mecanismo de ação principal da vimpocetina envolve a inibição da fosfodiesterase 1 (PDE 1), que faz a conversão do AMPc e do GMPc em AMP e GMP, respectivamente. Essa ação inibitória aumenta o conteúdo intracelular de AMPc e GMPc, substratos da PED 1, que atuam como segundos mensageiros numa cadeia de reações que resulta na fosforilação e ativação dos fatores de transcrição CREB (do inglês *cAMP Responsive Element Binding Protein*) e SRF (do inglês *Serum Response Factor*). Estes fatores de transcrição aumentam a expressão de genes relacionados à plasticidade, que promovem as alterações funcionais e morfológicas necessárias para que a neuroplasticidade ocorra (Medina, 2011).

Em acordo com esta idéia, a vimpocetina parece facilitar a potenciação de longo termo (*Long-Term Potentiation* – LTP), favorece a dinâmica estrutural das espinhas dendríticas, melhora a recuperação da memória, e melhora o desempenho de humanos em testes cognitivos (Medina, 2011). Também conseguiu reduzir os déficits de aprendizagem e memória decorrentes da exposição precoce ao álcool (Figueiras *et al.*, 2010), bem como da estreptozocina, que mimetiza déficits cognitivos da Doença de Alzheimer, ambos em roedores (Medina, 2011). O uso da vimpocetina em modelos animais sugere que a droga é capaz de restaurar a neuroplasticidade, com efeitos potenciais na melhora da aprendizagem e da memória. Entretanto, os achados dos estudos clínicos que utilizaram a vimpocetina para doenças cerebrovasculares e demência foram controversos até aqui, sendo necessários novos estudos (Medina, 2011).

A capacidade que a vimpocetina tem de aumentar os níveis de AMPc e GMPc pode estar associada aos seus efeitos sobre a hiperatividade. De fato, estudos em roedores têm sugerido que déficits nas cascatas de sinalização dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc contribuem para a hiperatividade locomotora em animais que estão em um estado de hipofunção catecolaminérgica (Russell, 2003; Pascoli *et al.*, 2005; Paine *et al.*, 2009). Tanto a redução do Fator de Resposta do Soro (do inglês *Serum Response Factor* – SRF) em neurônios dopaminoceptivos (Parkitna *et al.*, 2010) quanto a inibição da Proteína Quinase A (PKA) causam hiperatividade locomotora (Paine *et al.*, 2009) em roedores. Em camundongos “*knock out*” para a Guanilil Ciclase C, a hiperatividade locomotora e o deficit de atenção são revertidos pela terapêutica para TDAH e pela ativação aguda da Proteína Quinase G (PKG) (Gong *et al.*, 2011). Adicionalmente, uma redução na neurotransmissão mediada pela

dopamina pode resultar em síntese reduzida de AMPc e GMPc (Lorenc-Koci and Czarnecka, 2013).

É importante notar que os efeitos restaurativos da vimpocetina em roedores têm sido demonstrados somente por curtos períodos após o tratamento (Medina *et al.*, 2006; Krahe *et al.*, 2009; Filgueiras *et al.*, 2010). Desse modo, necessita-se de investigação adicional para saber se é persistente a melhora produzida pela vimpocetina na hiperatividade locomotora induzida pelo estresse durante o desenvolvimento. Uma outra questão que deve ser considerada é que a vimpocetina já é utilizada em alguns países (como Cavinton©) para tratar doenças cérebro-vasculares, sem mostrar efeitos colaterais significativos em doses que variam de 15 a 45mg por dia (Kidd, 1999). Os efeitos sobre a atividade locomotora, associados à baixa toxicidade presumida, sugere a possibilidade da utilização terapêutica desse fármaco nos casos de TDAH relacionados ao estresse precoce, sendo, entretanto, necessários novos estudos para melhor avaliar seus riscos e benefícios.

## CONCLUSÃO

Os resultados apresentados, bem como a discussão dos mesmos, em face das informações disponíveis na literatura, permitem concluir que:

1) A temperatura do ambiente durante o isolamento com separação materna no período neonatal é um fator crítico para a manifestação da hiperatividade locomotora em camundongos suíços adolescentes.

2) A temperatura do ambiente durante o isolamento com separação materna no período neonatal influenciou nos níveis de corticosterona basal e de hormônios tireoidianos de camundongos suíços, no período neonatal e no início da adolescência.

3) A administração de vimpocetina foi capaz de mitigar a hiperatividade locomotora, induzida pelo isolamento neonatal com separação materna, na adolescência de camundongos suíços.

Adicionalmente, ainda que seja difícil modelar, precisa e plenamente, quadros psiquiátricos humanos em animais experimentais, sugere-se que o isolamento neonatal não aquecido com separação materna de camundongos suíços pode ser útil para estudar alguns aspectos do TDAH relacionado ao estresse precoce, especialmente, a hiperatividade e a impulsividade, com baixo custo, sendo, entretanto, necessários novos estudos nesse sentido.

Desta forma, nossos dados sugerem uma participação do estresse térmico (por hipotermia) na fisiopatogenia dos casos de TDAH associados à prematuridade. Além disso, a vimpocetina pode contribuir para o tratamento desse transtorno.

## REFERÊNCIAS

- ADER, R. Effects of early experiences on shock- and illness-induced passive avoidance behaviors. *Developmental Psychobiology*, v. 6, p. 547–555, 1973.
- AKANA, S. Feeding and stress interact through the serotonin 2C receptor in developing mice. *Physio. Behav.* 94: 569-579 p. 2008.
- ANAND, K.; SCALZO, F. Can Adverse Neonatal Experiences Alter Brain Development and Subsequent Behavior? *Biol. Neonate*, 69-82 p. 2000
- ANDERSEN, S. L.; TEICHER, M. H. Delayed effects of early stress on hippocampal development. *Neuropsychopharmacology*, v. 29, n. 11, p. 1988-93, Nov 2004. ISSN 0893-133X (Print) 0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15316569> <http://www.nature.com/npp/journal/v29/n11/pdf/1300528a.pdf> >. Acesso em: 11 set. 2012.
- ARNOLD, J.; SIVIY, S. Effects of neonatal handling and maternal separation on rough-and-tumble play in the rat. *Dev. Psychobiol.*, v. 41, n. 3, p. 205-15, 2002.
- ARNSTEN, A. F. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 10, n. 6, p. 410-22, Jun 2009. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19455173> >. Acesso em: 18 ago. 2011.
- ARNSTEN, A. F.; PLISZKA, S. R. Catecholamine influences on prefrontal cortical function: relevance to treatment of attention deficit/hyperactivity disorder and related disorders. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 99, n. 2, p. 211-6, Aug 2011. ISSN 1873-5177 (Electronic) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295057> >. Acesso em: 08 jun. 2013.
- BANDEIRA, F.; LENT, R.; HERCULANO-HOUZEL, S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 106: 14108-14113 p. 2009.
- BANGASSER, D. A.; SHORS, T. J. Critical brain circuits at the intersection between stress and learning. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 34, n. 8, p. 1223-33, Jul 2010. ISSN 1873-7528 (Electronic) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153364> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763410000266> >. Acesso em: 23 mai. 2012.
- BLOOD-SIEGFRIED, J.; RENDE, E. K. The long-term effects of prenatal nicotine exposure on neurologic development. *J. Midwifery Womens Health*, v. 55, n. 2, p. 143-52, Mar-Apr 2010. ISSN 1542-2011 (Electronic) 1526-9523 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20189133> >. Acesso em: 10 abr. 2014.



BOKSA, P.; EL-KHODOR, B. F. Birth insult interacts with stress at adulthood to alter dopaminergic function in animal models: possible implications for schizophrenia and other disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 27, n. 1-2, p. 91-101, 2003. ISSN 01497634. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763403000125> >. Acesso em: 20 set. 2014.

BOLLEN, E.; PRICKAERTS, J. Phosphodiesterases in neurodegenerative disorders. *IUBMB Life*, v. 64, n. 12, p. 965-70, Dec 2012. ISSN 1521-6551 (Electronic)

1521-6543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23129425> >. Acesso em: 01 jan. 2014.

BRIETZKE, E. et al. Impact of Childhood Stress on Psychopathology. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 34, n. 4, p. 480-488, 2012. ISSN 15164446. Disponível em: < [http://ac.els-cdn.com/S1516444612000426/1-s2.0-S1516444612000426-main.pdf?\\_tid=c4edcb14-43f8-11e4-9cac-00000aacb361&acdnat=1411569826\\_7f93f8e89b65beab6e00cc20bfb1caef](http://ac.els-cdn.com/S1516444612000426/1-s2.0-S1516444612000426-main.pdf?_tid=c4edcb14-43f8-11e4-9cac-00000aacb361&acdnat=1411569826_7f93f8e89b65beab6e00cc20bfb1caef) >.

Acesso em: 23 jan. 2015.

BROUWERS, E.; VAN BAAR, A.; POP, V. Maternal anxiety during pregnancy and subsequent infant development. *Infant. Behav.*, v. 24, p. 95-106, 2001

BURD, L. et al. Fetal alcohol syndrome: neuropsychiatric phenomics. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 25, p. 697-705, 2003.

CAHILL, L.; MCGAUGH, J. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in Neurosciences*, v. 21, p. 294-299, 1998.

CHARIL, A. et al. Prenatal stress and brain development. *Brain Research Reviews*, v. 65 p. 56-79, 2010.

CHEN, C. et al. Thyroid hormone promotes neuronal differentiation of embryonic neural stem cells by inhibiting STAT3 signaling through TRalpha1. *Stem Cells Dev.*, v. 21, n. 14, p. 2667-81, Sep 20 2012. ISSN 1557-8534 (Electronic)

1547-3287 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22468949> >. Acesso em: 22 ago. 2014.

CIRULLI, F.; ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. Sexual segregation in infant mice: behavioural and neuroendocrine responses to d-amphetamine administration. *Psychopharmacology*, v. 134, p. 140-152, 1997.

COLORADO, R. et al. Effects of maternal separation, early handling, and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rats. *Behav. Processes*. 71: 51-58 p. 2006.

CURATOLO, P.; D'AGATI, E.; MOAVERO, R. The neurobiological basis of ADHD. *Ital. J. Pediatr.*, v. 36, n. 1, p. 79, 2010. ISSN 1824-7288 (Electronic)

1720-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21176172> <http://www.ijponline.net/content/pdf/1824-7288-36-79.pdf> >. Acesso em: 02 jun. 2012.

DAL BELLO, A.; RIUL, T.; OLIVEIRA, L. Desnutrição e estresse na gestação: medidas comportamentais das mães e dos filhotes durante a lactação. *Temas em Psicologia da SBP*. 13: 34-44 p. 2005.

DANIELS, W. M. et al. Maternal separation alters nerve growth factor and corticosterone levels but not the DNA methylation status of the exon 1(7) glucocorticoid receptor promoter region. *Metab. Brain Dis.*, v. 24, n. 4, p. 615-27, Dec 2009. ISSN 1573-7365 (Electronic) 0885-7490 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19816761> <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11011-009-9163-4> >. Acesso em: 04 set. 2014.

DE KLOET, E. et al. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. *Endocr. Rev.*, v. 19, p. 269–301, 1998.

DE WEERTH, C.; VAN HEES, Y.; BUITELAAR, J. Prenatal maternal cortisol levels and infant behavior during the first 5 months. *Early Hum. Dev.*, v. 74, p. 139–151, 2003.

DELL'ANNA, M. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behav. Brain Res.*, v. 45, p. 125–34, 1999.

DEPKE, M. et al. Hypermetabolic syndrome as a consequence of repeated psychological stress in mice. *Endocrinology*, v. 149, n. 6, p. 2714-23, Jun 2008. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325986> >. Acesso em: 28 jan. 2012.

DOBBIND, J.; SANDS, J. Comparative aspects of the brains growth spurt. *Early Hum. Dev.* 3: 79-83 p. 1979.

DOPHEIDE, J.; PLISZKA, S. Attention-Deficit-Hyperactivity Disorder: An Update. Pharmacotherapy. *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 29: 656-679. p. 2009.

FABRICIUS, K.; WORTWEIN, G.; PAKKENBERG, B. The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus. *Brain Struct. Funct.*, v. 212, n. 5, p. 403-16, Feb 2008. ISSN 1863-2653 (Print) 1863-2653 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18200448> [http://download.springer.com/static/pdf/42/art%253A10.1007%252Fs00429-007-0169-6.pdf?auth66=1411742648\\_a403923b2bd1e69751a70b8c57afae64&ext=.pdf](http://download.springer.com/static/pdf/42/art%253A10.1007%252Fs00429-007-0169-6.pdf?auth66=1411742648_a403923b2bd1e69751a70b8c57afae64&ext=.pdf) >. Acesso em: 26 out. 2014.

FILGUEIRAS, C. et al. Acute administration of vinctocetine, a phosphodiesterase type 1 inhibitor, mitigates locomotor hyperactivity in female mice exposed to lead during development. *Toxicology Letters*, v. 229S p. S40–S252, 2014.

FILGUEIRAS, C. et al. Early ethanol exposure in mice increases laterality of rotational side preference in the free-swimming test. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, v. 93, p. 148-154, 2009.

FILGUEIRAS, C. C.; KRAHE, T. E.; MEDINA, A. E. Phosphodiesterase type 1 inhibition improves learning in rats exposed to alcohol during the third trimester equivalent of human gestation. *Neurosci. Lett.*, v. 473, n. 3, p. 202-7, Apr 12 2010. ISSN 1872-7972 (Electronic)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20219634> >. Acesso em: 30 set. 2011.

FRANKLIN, T. B. et al. Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biol. Psychiatry*, v. 68, n. 5, p. 408-15, Sep 1 2010. ISSN 1873-2402 (Electronic) 0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673872> [http://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006-3223\(10\)00576-7/pdf](http://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006-3223(10)00576-7/pdf) >. Acesso em: 01 nov. 2012.

GAVIRIA A., S. L. Estrés prenatal, neurodesarrollo y psicopatología. *Revista Colombiana de Psiquiatria*. XXXV: 210-224 p. 2006.

GEORGE, E. D. et al. Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. *BMC Neurosci.*, v. 11, p. 123, 2010. ISSN 1471-2202 (Electronic) 1471-2202 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20920223> <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2202-11-123.pdf> >. Acesso em: 15 set. 2013.

GERLACH, M.; GRUNBLATT, E.; LANGE, K. Is the treatment with psychostimulants in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder harmful for the dopaminergic system? *Atten. Defic. Hyperact. Disord.*, v. 5, n. 2, p. 71-81, 2013.

GLOVER, V. Annual research review: prenatal stress and the origins of psychopathology: an evolutionary perspective. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 52: 356-367 p. 2011.

GONG, R. et al. Role for the membrane receptor guanylyl cyclase-C in attention deficiency and hyperactive behavior. *Science*, v. 333, p. 1642-1646, 2011.

GOODLETT, C.; HORN, K. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res. Health.*, v. 25, n. 3, p. 175-184, 2001.

GOODLETT, C.; HORN, K.; ZHOU, F. Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, v. 230, p. 394-406, 2005.

GOTO, Y.; GRACE, A. The dopamine system and the pathophysiology of schizophrenia: a basic science perspective. *Int. Rev. Neurobiol.*, v. 78, p. 41-68, 2007.

GRIZENKO, N. et al. Relation of maternal stress during pregnancy to symptom severity and response to treatment in children with ADHD. *J. Psychiatry Neurosci.*: 10-16 p. 2008.

HANNIGAN, J.; SHONAGH, K.; BERMAN, R. Postnatal environmental or experiential amelioration of neurobehavioral effects of perinatal alcohol exposure in rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 31: 202-211. p. 2007.

HASAN, K. M. et al. Psychological stress and aging: role of glucocorticoids (GCs). *Age (Dordr)*, v. 34, n. 6, p. 1421-33, Dec 2012. ISSN 1574-4647 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971999> <http://link.springer.com/article/10.1007%2F11357-011-9319-0> >. Acesso em: 27 jul. 2014.

HEAL, D.; CHEETHAM, S.; SMITH, S. The neuropharmacology of ADHD drugs in vivo: insights on efficacy and safety. *Neuropharmacology*, v. 57, n. 7-8, p. 608-18, 2009.

HELDT, S. A.; MOU, L.; RESSLER, K. J. In vivo knockdown of GAD67 in the amygdala disrupts fear extinction and the anxiolytic-like effect of diazepam in mice. *Transl Psychiatry*, v. 2, p. e181, 2012. ISSN 2158-3188 (Electronic) 2158-3188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23149445> >. Acesso em: 15 dez. 2014.

HENCK, J. Developmental neurotoxicology: testing and interpretation. *New Jersey*: Humana Press, 2002.

HERRERA-MUNDO, N.; SITGES, M. Vinpocetine and alpha-tocopherol prevent the increase in DA and oxidative stress induced by 3-NPA in striatum isolated nerve endings. *J. Neurochem.*, v. 124, n. 2, p. 233-40, Jan 2013. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23121080> <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/jnc.12082/asset/jnc12082.pdf?v=1&t=i0pp0657&s=9221771fabe6d2bebfab014196eab2527f2d9de0> >. Acesso em: 06 jan. 2015.

HILLMAN, N. H.; KALLAPUR, S. G.; JOBE, A. H. Physiology of transition from intrauterine to extrauterine life. *Clin. Perinatol.*, v. 39, n. 4, p. 769-83, Dec 2012. ISSN 1557-9840 (Electronic) 0095-5108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23164177> >. Acesso em: 07 mar. 2014.

HIRST, J. J. et al. Stress in pregnancy: a role for neuroactive steroids in protecting the fetal and neonatal brain. *Dev. Neurosci.*, v. 31, n. 5, p. 363-77, 2009. ISSN 1421-9859 (Electronic) 0378-5866 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684402> <http://www.karger.com/Article/Pdf/232555> >. Acesso em: 12 set. 2011.

HOLMES, A. et al. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes Brain Behav.*, v. 1, p. 55-69, 2002.

HUIZINK, A. et al. Psychological measures of prenatal stress as predictors of infant temperament. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiat.*, v. 41, p. 1078-1085, 2002

HUYNH, H.; FELDT, L. Estimation of BOX correction for degrees of freedom from sample data in randomized block and split-plot designs. *J. Edu. Statistics*, v. 1, p. 69-82, 1976.

IUVONE, L.; GELOSO, M.; DELL'ANNA, E. Changes in open field behavior, spatial memory, and hippocampal parvalbumin immunoreactivity following enrichment in rats exposed to neonatal anoxia. *Exp. Neurol.*, v. 139, p. 25-33., 1996.

JOËLS, M. Role of corticosteroid hormones in the dentate gyrus. *Prog. Brain. Res.*, v. 163, p. 355-370, 2007.

KIDD, P. A review of nutrients and botanicals in the integrative management of cognitive dysfunction. *Altern. Med. Rev.*, v. 4, p. 144-161, 1999.

KLEJBOR, I.; LUDKIEWICZ, B.; TURLEJSKI, K. Effect of light-dark changes on the locomotor activity in open field in adult rats and opossums. *Folia Morphologica*, v. 72, n. 4, p. 300-305, 2013. ISSN 1644-3284 0015-5659.

KOFMAN, O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 26, p. 457-470, 2002.

KONOPKA, L. M. Understanding attention deficit disorder: a neuroscience prospective. *Croat. Med. J.*, Apr, v. 55, n. 2, p. 174-176, 2014.

KOOLHAAS, J. M. et al. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 35, n. 5, p. 1291-301, Apr 2011. ISSN 1873-7528 (Electronic) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21316391> >. Acesso em: 16 out. 2012.

KOSTEN, T. et al. Memory impairments and hippocampal modifications in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Neurobiol. Learn. Mem.*, v. 88, n. 2, p. 167-76, 2007.

KOSTEN, T.; KEHOE, P. Neonatal Isolation is a Relevant Model for Studying the Contributions of Early Life Stress to Vulnerability to Drug Abuse: Response to Marmendal et al. *Dev. Psychobiol.*, v. 47, n. 2, p. 108-10, 2005.

KOSTEN, T.; LEE, H.; KIM, J. Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. *Brain Res.*, v. 1154, p. 144-53, 2007.

KOSTEN, T. A.; KEHOE, P. Immediate and enduring effects of neonatal isolation on maternal behavior in rats. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 28, n. 1, p. 53-61, Feb 2010. ISSN 1873-474X (Electronic) 0736-5748 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782745> >. Acesso em: 11 nov. 2012.

KOSTEN, T. A.; KIM, J. J.; LEE, H. J. Early life manipulations alter learning and memory in rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 36, n. 9, p. 1985-2006, Oct 2012. ISSN 1873-7528 (Electronic) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819985> >. Acesso em: 03 jun. 2013.

KOSTRZEWA, R. et al. Pharmacological models of ADHD. *J. Neural. Transm.*, v. 115, n. 2, p. 287-98, 2008.

KRAHE, T. E.; WANG, W.; MEDINA, A. E. Phosphodiesterase inhibition increases CREB phosphorylation and restores orientation selectivity in a model of fetal alcohol spectrum disorders. *PLoS One*, v. 4, n. 8, p. e6643, 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680548> >. Acesso em: 08 fev. 2012.

LALONDE, R.; STRAZIELLE, C. The relation between open-field and emergence tests in a hyperactive mouse model. *Neuropharmacology*, v. 57, n. 7-8, p. 722-4, 2009.

- LE MOAL, M. Historical approach and evolution of the stress concept: a personal account. *Psychoneuroendocrinology*, v. 32 Suppl 1, p. S3-9, Aug 2007. ISSN 0306-4530 (Print) 0306-4530 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17659843> >. Acesso em: 05 ago. 2012.
- LEMAIRE, V. et al. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *PNAS*. 97 11032–11037 p. 2000.
- LENT, R. Cem bilhões de neurônios? *Conceitos Fundamentais de Neurociência*. São Paulo: Atheneu, 2010.
- LEUSSIS, M.; BOLIVAR, V. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, v. 30, p. 1045-1064, 2006.
- LEVINE, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*, v. 30, n. 10, p. 939-46, Nov 2005. ISSN 0306-4530 (Print) 0306-4530 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15958281> >. Acesso em: 31 jul. 2012.
- LI, C.; SINHA, R. Inhibitory control and emotional stress regulation: neuroimaging evidence for frontal-limbic dysfunction in psycho-stimulant addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 32, p. 581–597, 2008.
- LI, M. et al. Environmental Enrichment during Gestation Improves Behavior Consequences and Synaptic Plasticity in Hippocampus of Prenatal-Stressed Offspring Rats. *Acta Histochem. Cytochem.*, 157-166 p. 2012
- LINDSTROM, K.; LINDBLAD, F.; HJERN, A. Preterm birth and attention-deficit/hyperactivity disorder in schoolchildren. *Pediatrics*, v. 127, n. 5, p. 858-65, May 2011. ISSN 1098-4275 (Electronic) 0031-4005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21502231> <http://pediatrics.aappublications.org/content/127/5/858.full.pdf> >. Acesso em: 12 set. 2012.
- MANANI, M. et al. Elimination of admission hypothermia in preterm very low-birth-weight infants by standardization of delivery room management. *Perm. J.*, v. 17, n. 3, p. 8-13, Summer 2013. ISSN 1552-5775 (Electronic) 1552-5767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24355884> >. Acesso em: 09 jul. 2014.
- MANHÃES, A. et al. Ontogenetic analysis of behavior in the tail suspension test: temporal differences in the emergence of within- and between-session habituation in Swiss mice. *Dev. Psychobiol.*, v. 56, n. 4, p. 850-6, 2014
- MARKHAM, J. et al. Characterization of the cognitive impairments induced by prenatal exposure to stress in the rat. *Front. Behav. Neurosci.*, v. 4, p.1-15, 2010.
- MCEWEN, B. S. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiol. Rev.*, v. 87, p. 873-904, 2007.

MCKLVEEN, J. M. et al. Role of prefrontal cortex glucocorticoid receptors in stress and emotion. *Biol. Psychiatry*, v. 74, n. 9, p. 672-9, Nov 1 2013. ISSN 1873-2402 (Electronic) 0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23683655> >. Acesso em: 28 jan. 2014.

MEDINA, A. E. Therapeutic utility of phosphodiesterase type I inhibitors in neurological conditions. *Front. Neurosci.*, v. 5, p. 21, 2011. ISSN 1662-453X (Electronic) 1662-453X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21373359> <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fnins.2011.00021/pdf> >. Acesso em: 06 abr. 2012.

MEDINA, A. E.; KRAHE, T. E.; RAMOA, A. S. Restoration of neuronal plasticity by a phosphodiesterase type 1 inhibitor in a model of fetal alcohol exposure. *J. Neurosci.*, v. 26, n. 3, p. 1057-60, Jan 18 2006. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16421325> <http://www.jneurosci.org/content/26/3/1057.full.pdf> >. Acesso em: 16 nov. 2012.

NUNES, F. et al. Acute administration of vinpocetine, a phosphodiesterase type 1 inhibitor, ameliorates hyperactivity in a mice model of fetal alcohol spectrum disorder. *Drug Alcohol Depend.*, v. 119, n. 1-2, p. 81-7, Dec 1 2011. ISSN 1879-0046 (Electronic) 0376-8716 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21689896> [http://ac.els-cdn.com/S037687161100250X/1-s2.0-S037687161100250X-main.pdf?\\_tid=b5d8f6b2-48df-11e4-8d0a-00000aacb362&acdnat=1412108819\\_e5c0527c2ba4c827a8f2f9f014867b4d](http://ac.els-cdn.com/S037687161100250X/1-s2.0-S037687161100250X-main.pdf?_tid=b5d8f6b2-48df-11e4-8d0a-00000aacb362&acdnat=1412108819_e5c0527c2ba4c827a8f2f9f014867b4d) >. Acesso em: 12 mai. 2012.

OBEL, C. et al. Does gestational anxiety result in children's attention disorders? *Ugeskr Laeger*, v. 165, p. 479, 2003b

PAINE, T. A.; NEVE, R. L.; CARLEZON, W. A., JR. Attention deficits and hyperactivity following inhibition of cAMP-dependent protein kinase within the medial prefrontal cortex of rats. *Neuropsychopharmacology*, v. 34, n. 9, p. 2143-55, Aug 2009. ISSN 1740-634X (Electronic) 0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19387423> >. Acesso em: 15 jun. 2012.

PARKITNA, J. R. et al. Loss of the serum response factor in the dopamine system leads to hyperactivity. *FASEB J.*, v. 24, n. 7, p. 2427-35, Jul 2010. ISSN 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223941> >. Acesso em: 10 jun. 2013.

PASCOLI, V. et al. cAMP and extracellular signal-regulated kinase signaling in response to d-amphetamine and methylphenidate in the prefrontal cortex in vivo: role of beta 1-adrenoceptors. *Mol. Pharmacol.*, v. 68, n. 2, p. 421-9, Aug 2005. ISSN 0026-895X (Print) 0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890841> >. Acesso em: 04 abr. 2013.

PATYAR, S. et al. Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases. *Pharmacological Reports*. 63: 618-628 p. 2011a.

\_\_\_\_\_. Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases. *Pharmacological Reports*, v. 63, p. 618-628, 2011b. ISSN 1734-1140.

PEÑA, C. Epigenetic Effects of Prenatal Stress on 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 in the Placenta and Fetal Brain. *PLoS ONE*. 7: e39791 p. 2012.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 463, p. 3-33, 2003.

RHEES, R.; LEPHART, E.; ELIASON, D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behavioural Brain Research*, v. 123, p. 1-10, 2001.

RODRIGUEZ, A.; BOHLIN, G. Are maternal smoking and stress during pregnancy related to ADHD symptoms in children? *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, v. 46, p. 246–254, 2005.

ROHDE, L.; HALPERN, R. Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: Atualização/Recent advances on attention deficit/hyperactivity disorder. *Jornal de Pediatria*. 80: S61-S70 p. 2004.

RONALD, A.; PENNELL, C. E.; WHITEHOUSE, A. J. Prenatal Maternal Stress Associated with ADHD and Autistic Traits in early Childhood. *Front. Psychol.*, v. 1, p. 223, 2010. ISSN 1664-1078 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21833278> <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpsyg.2010.00223/pdf> >. Acesso em: 20 fev. 2012.

RUSSELL, V. Dopamine hypofunction possibly results from a defect in glutamate-stimulated release of dopamine in the nucleus accumbens shell of a rat model for attention deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 27, n. 7, p. 671-682, 2003.

SAGVOLDEN, T. et al. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the appropriate reference strain. *Neuropharmacology*, v. 57, n. 7-8, p. 619-26, Dec 2009. ISSN 1873-7064 (Electronic) 0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19698722> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002839080900272X> >. Acesso em: 14 ago. 2012.

SAGVOLDEN, T. et al. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry*, v. 57, n. 11, p. 1239-47, 2005.

SANDMAN, C. et al. Prenatal Programming of Human Neurological Function. *Biochem. J.*: 593-610 p. 2005.

SANDMAN, C. et al. Maternal corticotropin-releasing hormone and habituation in the human fetus. *Developmental Psychobiology*, v. 34, p. 163-173, 1999



SANDMAN, C. A. et al. Prenatal programming of human neurological function. *Int. J. Pept.*, v. 2011, p. 837596, 2011. ISSN 1687-9775 (Electronic) 1687-9767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21760821> >.

SAWANO, E. et al. Alterations in local thyroid hormone signaling in the hippocampus of the SAMP8 mouse at younger ages: association with delayed myelination and behavioral abnormalities. *J. Neurosci. Res.*, v. 91, n. 3, p. 382-92, Mar 2013. ISSN 1097-4547 (Electronic) 0360-4012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23224839> [http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/jnr.23161/asset/23161\\_ftp.pdf?v=1&t=i0gs2v4n&s=f77942fad390a83ba76a0f716b90e9eeddc358b](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/jnr.23161/asset/23161_ftp.pdf?v=1&t=i0gs2v4n&s=f77942fad390a83ba76a0f716b90e9eeddc358b) >. Acesso em: 16 jan. 2015.

SCHOENFELD, T. J.; GOULD, E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp. Neurol.*, v. 233, n. 1, p. 12-21, Jan 2012. ISSN 1090-2430 (Electronic) 0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281629> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488611000227> >. Acesso em: 01 dez. 2014.

SCHWABE, L. et al. Stress effects on memory: An update and integration. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 36, p. 1740–1749, 2012.

SECKL, J. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur. J. Endocrinol.*: 49-62 p. 2004

SELYE, H. Stress and the General Adaptation Syndrome. *Br. Med. J.*, v. 1, n. 4667, p. 1383–1392, 1950.

SHALEV, U.; KAFKAFI, N. Repeated maternal separation does not alter sucrose-reinforced and open-field behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 73, p. 115-122, 2002.

SKOUNTI, M.; PHILALITHIS, A.; GALANAKIS, E. Variations in prevalence of attention deficit hyperactivity disorder worldwide. *European journal of pediatrics*. 166: 117-123. p. 2007.

SNEDECOR, G.; COCHRAN, W. *Statistical methods*. 6 ed. Iowa: 1967.

SOUSA, V. et al. Maternal separation impairs long term-potential in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats. *Neurobiol. Aging*, v. 35, n. 7, p. 1680-1685, 2014.

SPIVEY, J. et al. Mother-infant separation leads to hypoactive behavior in adolescent Holtzman rats. *Behav. Processes*, v. 79, n. 1, p. 59-65, Sep 2008. ISSN 0376-6357 (Print) 0376-6357 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18585869> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376635708001599> >. Acesso em: 09 fev. 2012.

STANTON, M.; CROFTON, K.; LAU, C. Behavioral development following daily episodes of mother-infant separation in the rat. *Fundam. Appl. Toxicol.*, v. 19, p. 474–477, 1992.

TALGE, N. M.; NEAL, C.; GLOVER, V. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J. Child Psychol. Psychiatry*, v. 48, n. 3-4, p. 245-61, Mar-Apr 2007. ISSN 0021-9630 (Print)

0021-9630 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17355398>  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-7610.2006.01714.x/abstract> >. Acesso em: 12 mai. 2012.

TREJO, F.; NEKRASSOV, V.; SITGES, M. Characterization of vinpocetine effects on DA and DOPAC release in striatal isolated nerve endings. *Brain Res.*, v. 909, n. 1-2, p. 59-67, 2001.

TREJO, F.; NEKRASSOV, V.; SITGES, M. Characterization of vinpocetine effects on DA and DOPAC release in striatal isolated nerve endings. *Brain Res.*, v. 909, n. 1-2, p. 59-67, Aug 3 2001. ISSN 0006-8993 (Print)  
0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11478921> >. Acesso em: 06 abr. 2013.

URSIN, H.; ERIKSEN, H. R. The cognitive activation theory of stress. *Psychoneuroendocrinology*, v. 29, n. 5, p. 567-592, 2004. ISSN 03064530.

VAN DEN BERGH, B.; MARCOEN, A. High antenatal maternal anxiety is related to ADHD symptoms, externalizing problems, and anxiety in 8 and 9 year olds. *Child Development*, v. 13, p. 1085-1097, 2004.

VAN MEER, P.; RABER, J. Mouse behavioural analysis in systems biology. *Biochem. J.* : 593-610 p. 2005.

VOIKAR, V. et al. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol. Behav.*, v. 72, p. 271-281, 2001.

WAINWRIGHT, P. Issues of design and analysis relating to the use of multiparous species in developmental nutritional studies. *J. Nutr.*, v. 128, n. 3, p. 661-663, 1998.

WASHINGTON, T. Psychological stress and anxiety in middle to late childhood and early adolescence: manifestations and management. *J. Pediatr. Nurs.* , v. 24, n. 4, p. 302-313, 2009.

WATSON, J. et al. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Dev. Psychopathol.* , v. 11, p. 457-466, 1999.

WEINSTOCK, M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32: 1073-1086 p. 2008.

XAVIER, G. F. A Modularidade da Memória e o Sistema Nervoso. *Psicologia USP*, v. 4, n. 1/2, p. 61-115, 1993.

YAMASHITA, N. et al. Rolipram, a selective inhibitor of phosphodiesterase type 4, pronouncedly enhanced the forskolin-induced promotion of dopamine biosynthesis in primary cultured rat mesencephalic neurons. *Jpn. J. Pharmacol.*, v. 75, n. 1, p. 91-5, 1997.

YANG, X. et al. Stress during a Critical Postnatal Period Induces Region-Specific Structural Abnormalities and Dysfunction of the Prefrontal Cortex via CRF1. *Neuropsychopharmacology*, 2014.

ZHOU, X. et al. Vinpocetine is a potent blocker of rat NaV1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 306, n. 2, p. 498-504, Aug 2003. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730276> <http://jpet.aspetjournals.org/content/306/2/498.full.pdf> >. Acesso em: 06 jun. 2012.

ZUARDI, A. Fisiologia do Estresse e sua influência na saúde. *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo*. 2013.