



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thainá Ferraz Gonçalves da Silva

**Efeitos da hipóxia isquemia pré-natal no risco cardiovascular e  
no comportamento de ratos adultos**

Rio de Janeiro

2020

Thainá Ferraz Gonçalves da Silva

**Efeitos da hipóxia isquemia pré-natal no risco cardiovascular e no comportamento de ratos adultos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ângela de Castro Resende

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz

Rio de Janeiro

2020

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

S586 Silva, Thainá Ferraz Gonçalves da.  
Efeitos da hipóxia isquemia pré-natal no risco cardiovascular e no comportamento de ratos adultos / Thainá Ferraz Gonçalves da Silva. - 2020.  
74f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ângela de Castro Resende.  
Coorientadora: Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz.

Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Pressão arterial – Teses. 2. Hipóxia fetal. 3. Sistema cardiovascular – Doenças – Fatores de Risco. 4. Hipoxia-isquemia encefálica. I. Resende, Ângela de Castro. II. Ferraz, Marcos Rochedo. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.831-00.4

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

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

---

Assinatura

---

Data

Thainá Ferraz Gonçalves da Silva

**Efeitos da hipóxia isquemia pré-natal no risco cardiovascular e no comportamento de ratos adultos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 04 de março de 2020[51].

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ângela de Castro Resende (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Natália Galito Rocha Ayres  
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2020

## DEDICATÓRIA

A minha mãe, Miriam, e a toda a minha família que sempre estiveram ao meu lado encorajando o meu sonho de seguir a carreira académica.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me dar a vida e a oportunidade de fazer o que eu amo e de ter colocado tantas pessoas maravilhosas no meu caminho que me ajudaram a realizar o meu sonho.

A minha mãe, Miriam, por sempre acreditar no meu potencial e me dar todos os meios possíveis para estar onde eu estou hoje. Sempre me levantando a cada obstáculo e vibrando todas as minhas conquistas, andando de mãos dadas comigo em todas as etapas.

Agradeço a todas as pessoas da minha família: ao meu pai, Antônio, a minha avó, Darcy e ao meu avô, Douglas, minha madrinha, Claudia, minha tia, Alice, minha bisavó, Antônia, as minhas primas, a minha irmã, Maria Luisa, e ao meu padrasto, Mauro, que sempre estiveram presentes na minha vida e acompanharam de perto essa etapa da minha carreira.

Aos meus amigos Aline, Bárbara, Maitê, Marina, Andressa e Luiz Filipe que fizeram parte de todas as fases da minha vida e me ajudaram a realizar essa etapa sempre com um sorriso no rosto e com o melhor humor possível. Eu não teria conseguido sem vocês!

A minha orientadora, Ângela de Castro Resende, que me acolheu, guiou e acreditou no meu potencial, tornando possível a continuidade do meu sonho de me tornar Mestre.

Ao meu coorientador, Marcos Rochedo Ferraz, que sempre esteve ao meu lado disposto a me ajudar me guiando em mais uma etapa.

A todos os alunos e professores do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais que me guiaram durante esses dois anos e mostraram o verdadeiro significado de companheirismo e trabalho em equipe. Em especial gostaria de agradecer a Izabelle Barcellos, Grazielle Freitas de Bem e Ricardo de Andrade que tiveram um papel fundamental no desenvolvimento desse trabalho e na minha formação profissional.

Gostaria de agradecer também as alunas do Prof. Dr. Marcos Ferraz, do Laboratório de Psicobiologia, Comportamento e Neuroquímica, Fernanda, Mariana, Sabrina, Júlia e Keise que me ajudaram no desenvolvimento deste projeto de mestrado desde a iniciação científica.

A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.

*Paulo Freire*

## RESUMO

Silva, Thainá Ferraz Gonçalves da. **Efeitos da hipóxia isquemia pré-natal no risco cardiovascular e no comportamento de ratos adultos**. 2020. 74f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O estresse perinatal pode ser associado ao aumento da suscetibilidade a distúrbios afetivos. Existem evidências que mostram uma relação entre doenças mentais e cardiovasculares, sugerindo que a depressão pode ser um fator de risco para infarto agudo do miocárdio e mortalidade cardiovascular. No presente estudo, investigamos se há associação entre hipóxia pré-natal, isquemia, depressão e doença cardiovascular tardia. A hipóxia isquêmica foi induzida por pinçamento das artérias uterinas de ratas prenhes (Wistar) por 45 minutos, no 18º dia de gestação. As mesmas condições foram aplicadas às ratas grávidas para formar o grupo SHAM, apenas sem o clampeamento das artérias uterinas. Ainda, foi formado mais um grupo de animais controles que não passaram por nenhum tipo de manipulação. As análises de serotonina e seu conteúdo de metabólitos no mesencéfalo basal e no córtex pré-frontal foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência. As análises da espessura da túnica média e da deposição de colágeno nos tecidos de aortas foram representadas pela Hematoxilina e Eosina e Picrosirius red, respectivamente. O dano oxidativo foi avaliado pela carbonilação proteica e imunohistoquímica para o 8-isoprostano e a defesa antioxidante pela atividade enzimática antioxidante (SOD, GPx e catalase). A medida da pressão arterial sistêmica foi realizada pelo método não invasivo de pletismografia caudal, e o estudo da reatividade vascular à agentes vasodilatadores e vasoconstritores foi realizado no leito arterial mesentérico e em aorta torácica. Estudos metabólicos foram realizados através da análise das concentrações de glicose, triglicerídeos e colesterol total no plasma dos animais de cada grupo. Os dados foram analisados estatisticamente usando *one way* ANOVA e pós-teste de Tukey. Foi considerado significativo valores de  $p \leq 0,05$ . Os resultados mostraram alteração no comportamento tipo depressivo nos animais HI, assim como uma hipoatividade serotoninérgica no mesencéfalo basal. Em animais hipoxiados (P120), os resultados mostram uma disfunção endotelial associada ao remodelamento vascular e ao desequilíbrio redox. Além disso, nossos estudos evidenciaram alterações metabólicas nos animais HI em comparação aos grupos controle. Esses resultados são consistentes com a hipótese de maior vulnerabilidade do sistema serotoninérgico ao estresse perinatal e desenvolvimento de alterações funcionais e estruturais no sistema cardiovascular.

Palavras chaves: Hipóxia isquêmica. Pressão arterial sistêmica. Reatividade vascular.



## ABSTRACT

Silva, Thainá Ferraz Gonçalves da. **Effects of prenatal ischemia hypoxia on cardiovascular risk and behavior of adult rats**. 2020. 74f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Perinatal stress can be associated with increased susceptibility to affective disorders. There is evidence that shows a relationship between mental and cardiovascular diseases, suggesting that depression may be a risk factor for acute myocardial infarction and cardiovascular mortality. In the present study, we investigated whether there is an association between prenatal hypoxia, ischemia, depression and late cardiovascular disease. Ischemic hypoxia was induced by clamping the uterine arteries of pregnant rats (Wistar) for 45 minutes, on the 18th day of pregnancy. The same conditions were applied to pregnant rats to form the SHAM group, only without clamping the uterine arteries. In addition, another group of control animal was formed, and those animals did not undergo to any type of manipulation. The analyses of serotonin and its metabolite content in the basal midbrain and in the prefrontal cortex were performed using the high-performance liquid chromatography technique. The analysis of the thickness of the tunica media and the deposition of collagen in the aortal tissues were represented by Hematoxylin and Eosin and Picrosirius red, respectively. The oxidative damage was assessed by protein carbonylation and immunohistochemistry for 8-isoprostane and antioxidant defense by antioxidant enzyme activity (SOD, GPx and catalase). Systemic blood pressure was measured using the non-invasive method of caudal plethysmography, and the study of vascular reactivity to vasodilator and vasoconstrictor agents was performed in the mesenteric arterial bed and in the thoracic aorta. Metabolic studies were performed by analyzing the concentrations of glucose, triglycerides, and total cholesterol in the plasma of animals of each group. The data were analyzed statistically using one-way ANOVA and Tukey's post-test. Data was considered significant with  $p \leq 0.05$ . In hypoxic animals (P120), the results show an endothelial dysfunction associated with vascular remodeling and redox imbalance. In addition, our studies demonstrate metabolic changes in HI animals compared to control groups. These results are consistent with a hypothesis of greater vulnerability of the serotonergic system to perinatal stress and the development of functional and structural changes in the cardiovascular system

Keywords: Ischemic hypoxi. Systemic blood pressure. Vascular reactivity.

## LISTA DE FIGURAS[52]

Figura 1 –	Imagem representativa das camadas vasculares.....	22
Figura 2 –	Funções biológicas do óxido nítrico.....	23
Figura 3 –	Imagem ilustrativa da cirurgia de hipóxia isquemia pré-natal sem o clampeamento das artérias uterinas.....	32
Figura 4 –	Imagem ilustrativa da cirurgia de hipóxia isquemia pré-natal com o clampeamento das artérias uterinas.....	33
Figura 5 –	Imagem ilustrativa representando o <i>Forced swim test</i> .....	34
Figura 6 –	Aparelho no qual é realizada a reatividade vascular em leito arterial mesentérico isolado de ratos.....	38
Figura 7 –	Efeitos da HI pré-natal no tempo de imobilidade (A) e no número de <i>Head shakes</i> (B) .....	46
Figura 8 –	Efeitos da HI pré-natal na concentração de 5-HT (A) e de 5-HIAA (B) no mesencéfalo basal.....	47
Figura 9 –	Efeitos da HI pré-natal na concentração de 5-HT (A) e de 5-HIAA (B) no córtex pré-frontal.....	47
Figura 10 –	Efeitos da HI pré-natal na pressão arterial sistólica (A), diastólica (B) e média (C).....	49
Figura 11 –	Efeitos da HI pré-natal no relaxamento vascular do LAM induzida por doses crescentes de acetilcolina.....	49
Figura 12 –	Efeitos da HI pré-natal no relaxamento vascular (A) e na tensão (B) no anel de aorta induzido por doses crescentes de acetilcolina e noradrenalina.....	50
Figura 13 –	Efeitos da HI pré-natal na espessura da túnica média de aortas torácicas (A-D) .....	51
Figura 14 –	Efeitos da HI pré-natal na deposição de colágeno em aortas torácicas (A-D).....	52
Figura 15 –	Efeitos da HI pré-natal na carbonilação de proteínas em aortas torácicas.....	54
Figura 16 –	Efeitos da HI pré-natal na imunomarcação do 8-isoprostano em aortas torácicas (A-D) .....	54

Figura 17 – Efeitos da HI pré-natal na atividade enzimática da catalase (A), glutathiona peroxidase (B) e superóxido dismutase (C) em aortas torácicas.....	56
Figura 18 – Efeitos da HI pré-natal na concetração de glicose (A), triglicerídeos (B) e colesterol total (C) em amostra de plasma.....	57
Figura 19 – Efeito da HI pré-natal no peso corporal dos animais HI, SHAM e Controle em P0 (A) e P120 (B).....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA	Ácido 5 – hidroxí indolacético
5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
CAT	Catalase
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DCV	Doença cardiovascular
DAG	Diacilglicerol
DE	Disfunção endotelial
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDHF	Fator de hiperpolarização derivado do endotélio
e-NOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FAK	Kinase de adesão focal
GMP – c	Monofosfato cíclico de guanosina
GPx	Glutathione peroxidase
GTP	Guanosina trifosfato
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HE	Hematoxilina e eosina
HI	Hipóxia isquemia
HPA	Hipotálamo hipófise adrenal
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IFN - $\gamma$	Interferon gama
IL - 1 $\beta$	Interleucina um beta
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP3	Inositol trifosfato
LAM	Leito arterial mesentérico
LPS	Lipopolissacarídeo
MDD	<i>Major depressive disease</i>
MMP 2	Metaloproteinase de matriz tipo 2
MMPs	Metaloproteinases

NE	Norepinefrina
NMDA	N – Metil D – aspartato
n-NOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Tampão fosfato salino
Phe	Fenilefrina
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato
PKG	Proteína kinase G
SOD	Superóxido dismutase
TAB	Transtorno afetivo bipolar
TNF – $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama Multiplicação
%	Porcentagem
Min	Minuto
Mg	Miligramma
g	Gramma
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
mM	Milimolar
pH	Potencial hidrogênico
pMol	Picomol
$\mu$ L	Microlitros
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Água destilada
nm	Nanometro
mmHg	Miligramma de mercúrio
ml	Mililitro

## SUMÁRIO[53]

	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
1.1	<b>Geral .....</b>	<b>30</b>
1.2	<b>Específicos .....</b>	<b>30</b>
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
2.1	<b>Modelo experimental da HI pré-natal.....</b>	<b>31</b>
2.2	<b>Teste do nado forçado (forced swim test).....</b>	<b>33</b>
2.3	<b>Cromatografia líquida de alta eficiência.....</b>	<b>34</b>
2.4	<b>Pressão arterial sistêmica .....</b>	<b>36</b>
2.5	<b>Estudo da reatividade vascular em leito mesentérico.....</b>	<b>36</b>
2.6	<b>Estudo da reatividade vascular em anel de aorta.....</b>	<b>38</b>
2.7	<b>Morfologia da aorta .....</b>	<b>39</b>
2.8	<b>Ensaio pró-oxidantes.....</b>	<b>40</b>
2.8.1	<u>Carbonilação de proteínas.....</u>	<b>40</b>
2.8.2	<u>Imunohistoquímica .....</u>	<b>40</b>
2.9	<b>Ensaio antioxidantes.....</b>	<b>41</b>
2.9.1	<u>Superóxido dismutase.....</u>	<b>41</b>
2.9.2	<u>Glutathione peroxidase.....</u>	<b>42</b>
2.9.3	<u>Catalase.....</u>	<b>43</b>
2.10	<b>Dosagem de proteínas.....</b>	<b>43</b>
2.11	<b>Análises metabólicas.....</b>	<b>43</b>
2.11.1	<u>Dosagens séricas.....</u>	<b>43</b>
2.11.2	<u>Análise estatística.....</u>	<b>44</b>
3	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
3.1	<b>Teste do nado forçado.....</b>	<b>45</b>
3.2	<b>Medidas de 5-HT, 5-HIAA e o turnover de 5-HT no mesencéfalo basal e córtex pré-frontal.....</b>	<b>46</b>
3.3	<b>Pressão arterial sistêmica.....</b>	<b>48</b>
3.4	<b>Reatividade vascular em leito arterial mesentérico.....</b>	<b>49</b>
3.5	<b>Reatividade vascular em anel de aorta.....</b>	<b>50</b>

3.6	<b>Análises morfométricas.....</b>	<b>51</b>
3.7	<b>Ensaio pró-oxidante.....</b>	<b>53</b>
3.8	<b>Ensaio antioxidante.....</b>	<b>55</b>
3.9	<b>Dosagem sérica.....</b>	<b>57</b>
3.10	<b>Peso corporal.....</b>	<b>58</b>
4	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>



## INTRODUÇÃO

### Hipóxia isquemia pré-natal

A hipóxia isquemia (HI) ocorre devido a diferentes eventos que levam à diminuição da perfusão cerebral e, conseqüentemente, à menor distribuição de oxigênio e nutrientes para o cérebro. No período pré-natal, a HI pode ser uma das principais causas de morbidades no desenvolvimento neuronal e da mortalidade neonatal (Letourneur e col., 2012). Em humanos, o baixo peso ao nascimento e a prematuridade estão intimamente relacionados a eventos que levam à diminuição do aporte de oxigênio para o feto durante a gestação (Vannucci, 2000). Dos neonatos que sofreram hipóxia isquemia pré-natal e que apresentam encefalopatias, entre 20 e 50% morrem nos primeiros meses de vida (Organização Mundial de Saúde, 2015).

A HI pré-natal também pode ser entendida como uma condição fisiopatológica relacionada à programação fetal, no período embrionário (Robinson e col., 2005). Isso ocorre devido a menor disponibilidade de oxigênio para o trofoblasto, que dificulta seu desenvolvimento e diferenciação (Genbacev e col., 1997). Além disso, estudos mostram comprometimento funcional e estrutural do sistema cardiovascular em adultos (Tang e col., 2017). A hipóxia leva ao redirecionamento do fluxo sanguíneo da circulação periférica para órgãos nobres, como coração e o cérebro (Bell e col., 2020) e a diminuição do fluxo na circulação periférica pode levar ao comprometimento das artérias mesentéricas, importantes vasos de resistência, fundamental na regulação da pressão arterial sistêmica (Neuman e col., 2009).

A longo prazo, a HI pré-natal pode causar déficits no aprendizado e na concentração, hiperatividade, problemas relacionados à memória em crianças, além disso, epilepsia e paralisia cerebral e outras condições que cursam com a psicose, como a depressão (Stocker e col., 2005). A relação entre paralisia cerebral e hipóxia já está bem estabelecida e esse efeito está associado ao comprometimento das vias dopaminérgicas, principalmente na via nigroestriatal e, conseqüentemente, na região do estriado (Burke, 2004; Robinson e col., 2005). Além disso, evidências crescentes

têm atribuído à HI, um aumento na suscetibilidade à isquemia cardíaca, disfunção endotelial e síndrome metabólica na prole adulta (Pundik e col., 2006).

As causas da hipóxia em humanos nem sempre são identificadas, mas estão relacionadas ao uso de fármacos, como glicocorticoides, fumo, anemia, hipertensão, diabetes, infecções durante a gestação, pré-eclampsia, eclampsia, estresse e possíveis nascimentos múltiplos ou complicações no parto (Nesterenko e Aly, 2009). Nas duas últimas condições, o feto está sujeito à depleção de oxigênio durante as sístoles uterinas prolongadas (Zecchin e col., 2005; Lucas, 1991; Barker e Clark, 1997; Langley-Evans e col., 2003; Luo e col., 2006). As condições sistêmicas ou comportamentais geradas pela hipóxia isquêmica vão depender da duração e intensidade da interrupção do aporte de oxigênio, assim como, a fase gestacional em que o feto é submetido a esse insulto (Organização Mundial de Saúde, 2015).

Apesar dos mecanismos patológicos da HI não estarem claros, após o insulto perinatal há uma perda de oligodendrócitos, hipomielinização e astrogliose, e mudanças no desenvolvimento cortical em humanos (Bell e col., 2020).

Alguns estudos sugerem que o insulto em diferentes estágios gestacionais pode levar ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias e conseqüentemente interrompem o desenvolvimento neural. Dessa forma, o mecanismo por trás da patogênese da hipóxia pré-natal no desenvolvimento cerebral pode estar relacionado ao aumento da expressão de citocinas e de radicais livres (Folkerth e col., 2004; Haynes e col., 2003).

Existem diversos modelos experimentais para a indução da hipóxia isquemia pré-natal, como por exemplo, pela oclusão da artéria carótida do animal, desenvolvido por Levine em 1960 e reproduzido por Rice e colaboradores em 1981. Outra técnica para diminuir o aporte de oxigênio, corresponde à utilização da câmara hipobárica que reduz a concentração de oxigênio e aumenta a de gás carbônico durante um tempo estabelecido (Fan e col., 2009). A hipóxia hipobárica também pode ser utilizada para o estudo da hipóxia intermitente, onde o animal é submetido à câmara ligada a um equipamento que monitora as concentrações de oxigênio num determinado período, até o período dos experimentos previamente determinados (Fan e col, 2009). Entretanto, a HI pré-natal pelo clampeamento das artérias uterinas por 45 minutos, no décimo oitavo dia de gestação (E18) parece ser o modelo mais eficiente para mimetizar as alterações sistêmicas já descritas que ocorrem nos fetos

que sofrem um insulto pré-natal, e com menor taxa de mortalidade dos animais experimentais (Robinson e col., 2005)

### **Estresse pré-natal**

O estresse pode ser definido como um estado de desequilíbrio fisiológico e comportamental. Uma das características da resposta ao estresse é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) a partir da liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelos neurônios dos núcleos paraventriculares do hipotálamo que, por sua vez, na hipófise estimula a síntese e a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). No córtex adrenal, o ACTH é responsável pela produção e liberação dos hormônios glicocorticoides, o cortisol em humanos e corticosterona em roedores, iniciando a resposta ao estresse. A homeostase é preservada pelo *feedback* negativo que os glicocorticoides exercem na hipófise e no hipotálamo. Além disso, outras regiões do cérebro como o hipocampo e córtex pré-frontal regulam o eixo HPA (Fink 2000). Todavia, alterações no hipocampo podem alterar permanentemente a via HPA, impedindo a regulação por *feedback* negativo e promovendo aumento mantido nos níveis de glicocorticoides (Sapolsky e col., 1984; Uno e col., 1990). O estresse é fundamental para a adaptação, homeostase e sobrevivência do indivíduo e deve estar compreendido em um nível ótimo para promover esses ajustes fisiológicos e comportamentais (Davis, 1997).

A desregulação do eixo HPA e da sinalização do CRH já foram associados com o desenvolvimento de disfunções de humor (Dong e col., 2020). Dessa forma, o entendimento da regulação do *feedback* negativo é de fundamental importância para o estudo da resposta ao estresse (Arborelius e col. 1999; Nemeroff 1992; Reul e Holsboer 2002).

Os subtipos de receptores CRHR1 e CRHR2 apresentam grande importância na manutenção da homeostase e mobilização do metabolismo na resposta ao estresse. O CRHR1 é responsável pela responsividade do eixo HPA e assim, pelo aumento do estresse e dos sintomas de ansiedade. Por sua vez, o CRHR2 atua diminuindo a atividade do eixo HPA e promove efeitos semelhantes aos ansiolíticos (Timpl e col., 1998; Bale e col., 2000; Bale e col., 2002).

Estudos sugerem que a exposição de indivíduos ao estresse pré-natal em um período crítico do desenvolvimento, pode alterar o neurodesenvolvimento desses animais de modo a aumentar a predisposição aos distúrbios afetivos e ansiosos na vida adulta. Estudos com modelos animais também mostram que o estresse pré-natal e o estresse neonatal podem causar diversas alterações no humor que são observadas durante o tempo de vida desses animais (Morley-Fletcher e col., 2003; Kaiser e col., 2005). A HI representa um fator de risco para alteração das funções das vias encefálicas relacionadas à ansiedade e ao medo. Os animais que foram submetidos a esse evento pré-natal mostraram-se menos agressivos e com maior nível de estresse e ansiedade na idade adulta (Weitzdoerfer e col., 2004).

Em longo prazo, a hipóxia pré-natal pode causar déficits cognitivos em crianças, e outras condições que cursam com a depressão (Stocker e col., 2005). Além disso, tem sido atribuído à HI, um papel na programação de uma maior suscetibilidade a distúrbios cardiovasculares e síndrome metabólica na prole adulta (Pundik e col., 2006).

### **Distúrbios depressivos e cardiovasculares**

Os distúrbios de humor são divididos em duas categorias: distúrbio unipolar e transtorno afetivo bipolar (TAB). O distúrbio unipolar é associado aos transtornos depressivos, incluindo o distúrbio de depressão maior (MDD, do inglês *major depressive disease*) e a distímia. Já o distúrbio bipolar é subdividido em vários tipos, sendo os mais importantes clinicamente, os tipos um (TAB-1) e dois (TAB-2) (DSM 5). A MDD é um distúrbio que envolve transtornos emocionais, cognitivos, autonômicos e da função endócrina (Dremencov e col., 2002). A MDD também está relacionada a alterações de vias noradrenérgicas, serotoninérgicas e dopaminérgicas (Lemke, 2007), apresentando diversos sintomas relacionados à redução do afeto positivo e ao aumento do afeto negativo (Stahl, 2014, Cap. 6, pp. 253-255). A diminuição da motivação, sintoma comum para todos os tipos de depressão, pode ser manifestado através da anedonia, alteração do apetite, sono e função sexual (Martinez-Mota e col., 2005).

Animais nos quais foram induzidos um estado semelhante à depressão exibiram déficit de sono, de alimentação, perda da resposta aos estímulos de recompensa, déficit de esquiva passiva e alteração do comportamento sexual (Richardson, 1991).

Alguns estudos têm proposto uma relação entre depressão e doenças cardiovasculares (Pinto et al., 2008; Pinto et al., 2012). Nem todos os mecanismos biológicos necessários para compreender o elo entre depressão e doenças cardiovasculares foram bem estabelecidos, porém alguns mecanismos podem estar relacionados a essa conexão como: aumento da atividade simpática e uma diminuição da parassimpática (Kikuya e col., 2000), que predispõe a arritmias e aumenta o risco de infarto agudo do miocárdio (Niwa e col., 2007), disfunção endotelial, alteração na reatividade vascular (Pinto et al., 2008; Pinto et al., 2012), alteração na atividade plaquetária e hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, responsável por gerar uma resposta exagerada ao estresse (Maes e col., 1995; Fountoulakis e col., 2007).

Muitos estudos que visam o entendimento da relação entre depressão e doenças cardiovasculares (CVD) buscam compreender o papel do óxido nítrico (NO), cujas principais funções estão associadas à regulação da função vascular e da homeostase (Moncada e col., 2006; Bode-Böger e col., 2007; Ignarro, 2007). Estudos mostram que o desequilíbrio da via L- arginina – NO está associado à patogênese de diversas doenças cardiovasculares (Brunini e col., 2007). Ao contrário dos fatores de risco mais convencionais para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como hipertensão e diabetes mellitus, a depressão é um fator de risco independente. Contudo a diminuição da biodisponibilidade de NO poderia ser um link entre essas duas comorbidades, através da ativação plaquetária, disfunção endotelial e aumento da circulação de citocinas pró-inflamatórias (Pinto et al., 2008; Pinto et al., 2012). Dessa forma, pacientes que possuem doenças cardiovasculares e, além disso, foram diagnosticados com depressão, possuem uma chance de 2,5 à 4 vezes maior para ocorrência de algum evento cardiovascular (Rozanski e col., 1999).

A hiperatividade do eixo HPA leva ao aumento da liberação de cortisol, que por sua vez, também associado a aterosclerose e ao aumento da lesão de células endoteliais, leva a diminuição da vasodilatação. O cortisol promove *downregulation* da enzima óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS) e assim a biodisponibilidade do

NO em células endoteliais e no plasma, por consequência, reduz a vasodilatação e predispõe a ocorrência de inflamação, trombogênese e proliferação de células do músculo liso e colágeno. Dessa forma, o comprometimento da função endotelial leva ao aumento da pressão arterial e aterosclerose (Maes e col., 1995; Rosenblum, 1997). Entretanto, não existem evidências sobre possíveis alterações cardiovasculares em animais adultos, decorrentes dos modelos de HI pré-natal. Uma possível relação entre distúrbios depressivos e cardiovasculares decorrentes da HI pré-natal ainda não foi investigada.

### **Programação metabólica**

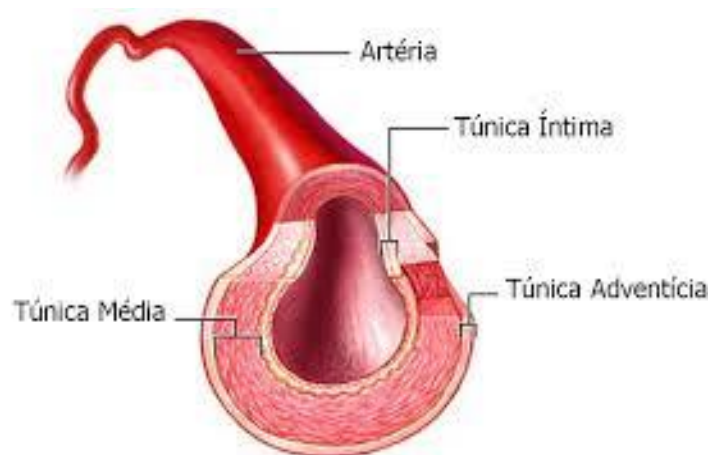
Evidências epidemiológicas mostram a relação entre condições intrauterinas adversas e distúrbios fisiológicos na idade adulta. Tais alterações pré-natais podem ser provenientes da má nutrição materna e exposição ao estresse (Roseboom e col., 1999). Consequências de uma condição intrauterina sub-ótima estão associadas à restrição do crescimento fetal, baixo peso ao nascer, aumento das taxas de doenças coronarianas e síndrome metabólica na idade adulta (Huang e col., 2012). Além do estresse materno e o tipo de nutrição materna, a hipóxia pré-natal é considerada uma das principais consequências de uma gestação sob condições desfavoráveis.

Estudos de Camm e colaboradores de 2011 mostraram alterações moleculares nas vias de sinalização da insulina hepática e muscular em ratos adultos como consequência da HI pré-natal. Esses dados sugerem que AKt poderia ser um alvo farmacológico para prevenção das alterações metabólicas. Estudos de Davidge e Dyck de 2008 mostraram que a HI pré-natal associada a uma dieta obesogênica pós-natal aumentou significativamente a deposição de gordura abdominal, aumento dos adipócitos, aumento da concentração da leptina no plasma, e de triglicérides no plasma, no fígado e no músculo esquelético. Essas mudanças na homeostase lipídica foram acompanhadas por alterações na resistência à insulina e tolerância a glicose *in vivo*, associada a menor ativação da AKt em resposta a insulina no fígado e no músculo esquelético.

## Endotélio e Função Vascular

As artérias de condutância, como a aorta são formadas por três camadas principais (figura 1). A túnica advéncia, camada mais externa, é composta basicamente de colágeno, elastina, mastócitos, fibroblatos e por uma camada de células adiposas, que secretam adipocinas responsáveis por agir nas próprias células da musculatura lisa (Kawashima e Sato, 2018). A túnica média é formada por células musculares lisas, capazes de fornecerem suporte para parede do vaso, além de sua função mecânica na reatividade vascular e no equilíbrio eletrolítico. Por sua vez, a túnica íntima compõe o endotélio vascular e é formada por uma monocamada de células endoteliais circundada por uma camada elástica (Minami e col., 2005). Essa camada é fundamental para a manutenção do tônus muscular devido a sua grande capacidade secretória de substâncias vasodilatadoras como o NO, prostaciclina, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e vasoconstritoras, como a angiotensina II, endotelina e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Xi Wang e Raouf A. Khalil, 2018).

Figura 1 - Imagem representativa das camadas vasculares



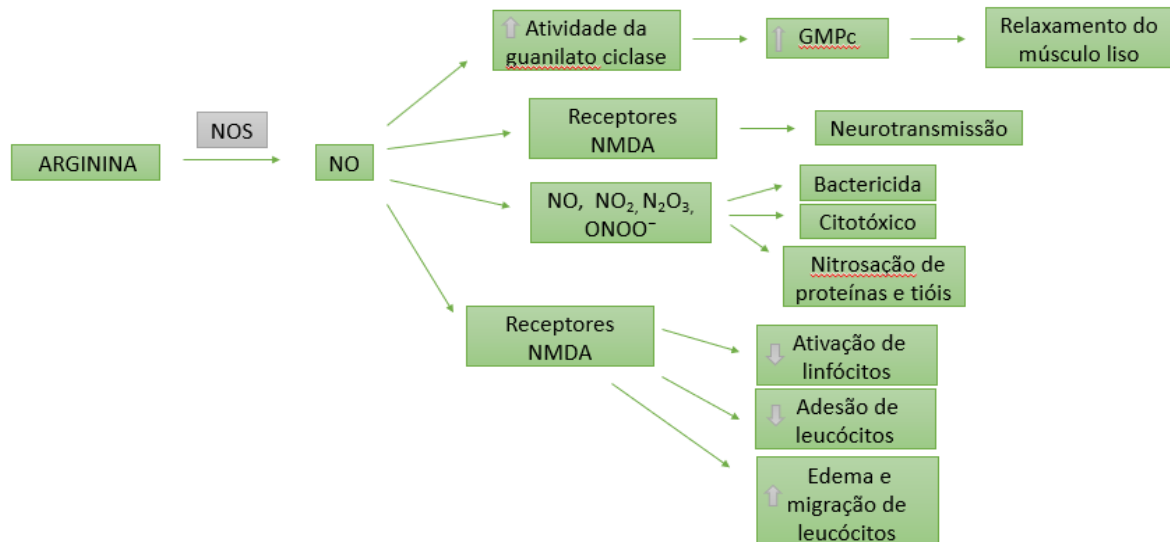
Fonte: Imagem obtida no google imagens em setembro de 2019.

A importância do endotélio para a homeostasia do sistema cardiovascular foi evidenciada, pelo estudo de Furchgott e Zawadski (1980), que utilizou anéis de aorta de coelho para demonstrar que a vasodilatação em resposta à acetilcolina exógena era dependente da integridade das células endoteliais. No entanto, após lesões químicas ou mecânicas à camada celular, tal resposta não era mais observada. Atualmente, o endotélio é considerado um órgão endócrino sensível a estímulos humorais, neurais e mecânicos, responsável pela síntese e liberação de substâncias que participam do processo de modulação do tônus vascular (Furchgott e Zawadski, 1980), coagulação e trombólise (Radomski et al., 1987), angiogênese (Shweiki et al., 1992), remodelamento vascular (Rudic et al., 1998) e inflamação (Pasceri et al., 2000).

O NO, principal fator de relaxamento derivado do endotélio, é um gás inorgânico que atua como uma das principais moléculas na sinalização vascular. O NO desempenha funções biológicas importantes como vasodilatador, neurotransmissor, regulador da citotoxicidade celular e resposta imune (Robbins et al., 1997) (Figura 2). Dentre as suas funções biológicas, o seu papel como vasodilatador é um dos mais estabelecidos. O NO também pode mediar o relaxamento da musculatura lisa vascular no cérebro e em outras artérias, independentemente do endotélio (Moncada e Higgs, 1993). No encéfalo, o NO atua como mediador da transmissão glutamatérgica no receptor *N* – Metil – D – aspartato, (NMDA) (Zhang e Snyder, 1995). Além disso, essa molécula também é capaz de modular as reações inflamatórias, tanto crônicas como agudas.



Figura 2 - Funções biológicas do óxido nítrico



Fonte: Adaptado de Richard A. Robbins e Matthew B. Grisham, 1997.

O NO é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir da oxidação do aminoácido L – arginina, gerando L – citrulina e NO. A L- arginina é um aminoácido polar básico semi-essencial, pois ele pode ser sintetizado pelo corpo em concentrações suficientes para as necessidades fisiológicas. Esse aminoácido é fundamental para manter o equilíbrio dos resíduos de nitrogênio produzidos pelo metabolismo, no ciclo da ureia. Tal processo ocorre no fígado e é mediado pela enzima arginase (Moncada e col., 2006; Brunini e col., 2005).

Existem diferentes isoformas dessa enzima que desempenham diferentes funções devido a suas estruturas distintas. Nas células endoteliais essa enzima é constitutivamente expressa e dependente de cálcio e identificada como e-NOS. Sua outra isoforma pode ser encontrada no sistema nervoso central, sendo conhecida como n-NOS, e com características químico-físicas semelhantes à óxido nítrico sintase endotelial. Ainda sua forma induzível (i-NOS) pode ser encontrada em diversos tecidos e órgãos, todavia ao contrário das outras isoformas, a i-NOS não é expressa na maioria dos tecidos e pode ser induzida por lipopolissacarídeos (LPS) e por citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e

interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) (Moncada e Higgs, 1993). O NO também pode participar da resposta imune como, mediador, contra agentes bacterianos e pela citotoxicidade em células tumorais. Ainda no trato respiratório aumenta os batimentos ciliares para proteção contra agentes externos (Barnes, 1995).

Alguns mecanismos de relaxamento vascular são dependentes do endotélio. A acetilcolina é um vasodilatador dependente de NO, de forma que atuando nos receptores M1 e/ou M3, presentes no endotélio vascular, ativa a via de sinalização intracelular que consiste em aumento da concentração de cálcio via proteína Gq e biossíntese de IP3 e DAG, que mobilizam as reservas de íons cálcio do retículo sarcoplasmático e extracelular (Evora e col., 1994; Moncada e Higgs, 2006). No endotélio, o cálcio se liga à calmodulina e ativa a e-NOS, enzima responsável pela conversão da L-arginina em L-citrulina, gerando NO. Por ser gás, extremamente difusível, o NO alcança o músculo liso vascular e ativa a enzima guanilato ciclase, que por sua vez, transforma guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMP cíclico) (Konior e col., 2014). Esse ativa a proteínocinase G (PKG), que pode ativar a fosfatase da cadeia leve da miosina, regulando negativamente a maquinaria contrátil ou fosforilar o canal de potássio, promovendo hiperpolarização da célula, pelo efluxo de íons potássio (Bolotina e col, 1994). Quando a célula se torna hiperpolarizada, ocorre o fechamento dos canais de cálcio sensíveis à voltagem, reduzindo os níveis de íons cálcio no citosol e produzindo a vasodilatação. Algumas moléculas como a nitroglicerina promovem o relaxamento independente do endotélio vascular, devido sua capacidade de doarem NO diretamente às células musculares lisas (Touyz e col., 2011).

Diversos estudos demonstraram que a remoção do endotélio aumenta a resposta vascular, indicando que estas células exercem um papel inibitório sobre a função contrátil do músculo liso vascular (Callera e cols., 2004; Vanhoutte e cols., 2009). Portanto, o endotélio vascular pode modular a contração do músculo liso vascular em resposta a estímulo nervoso, mecânico quando há um estiramento e a estímulos químicos, como por exemplo à noradrenalina, serotonina, angiotensina II e a vasopressina.

Entretanto, a atividade simpática é o principal modulador do tônus vascular e tem a noradrenalina como seu principal mediador. A noradrenalina produz potente vasoconstrição por ação nos receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos presentes no músculo liso vascular (Westfall e Westfall, 2012. P. 287). Esses receptores são do tipo

metabotrópicos e estão acoplados à cascata de sinalização intracelular da proteína Gq. Essa proteína transmembrana ativa a enzima fosfolipase C que, por sua vez, hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5 – bisfosfato (PIP2) em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 atua em receptores específicos no retículo sarcoplasmático, o que promove a liberação desse íon, através de canais de cálcio para o citosol. O DAG ativa a enzima proteinacina C (PKC) e esta fosforila canais de cálcio localizados na membrana plasmática, contribuindo para o rápido influxo de íons cálcio, que resulta na vasoconstricção vascular.

### **Disfunção Endotelial e remodelamento vascular**

Em condições fisiológicas, o endotélio é responsável pela manutenção do tônus vascular e da homeostase intravascular. Atua conservando o fluxo sanguíneo laminar, preservando a fluidez da membrana plasmática, criando mecanismos anticoagulantes, inibindo a proliferação e migração celulares e controlando a resposta inflamatória (Bahia e cols., 2006).

Em contrapartida, o dano ao endotélio é caracterizado por alterações fenotípicas, inflamação, alterações de permeabilidade, assim como, uma dilatação dependente de endotélio reduzida, que definem a disfunção endotelial (Huynh e col. 2019). A disfunção endotelial é o estágio inicial de doenças vasculares, e é um importante indicador prognóstico de doenças cardiovasculares e metabólicas (Suzuki e cols., 1995; Taddei e cols., 1996; Félétou e cols., 2010; Huynh e col. 2019). A disfunção endotelial contribui para o aumento da resistência, favorecendo a ocorrência de complicações cardiovasculares (Sotomayor e cols., 1999; Félétou e cols., 2010). A disfunção endotelial é um fenômeno que também está associado a diferentes fatores de risco cardiovasculares, como por exemplo, idade, alterações hormonais pós-menopausa, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes mellitus, tabagismo e hiper homocisteinemia (Santos e col., 2004; Ognibene e col., 2010). Entretanto, ainda não existem evidências da ocorrência de disfunção endotelial em modelos de HI pré-natal.

Na HI, a diminuição do fluxo na circulação periférica pode levar ao comprometimento das artérias mesentéricas, importantes vasos de resistência,

fundamental na regulação da pressão arterial sistêmica (Neuman e col., 2009). Entretanto, não existem estudos sobre o impacto da HI sobre a vasodilatação dependente de endotélio e contração, em vasos de resistência, que indiquem uma possível disfunção endotelial.

A disfunção endotelial pode estar associada a uma alteração fisiológica comum, o remodelamento vascular acelerado, que se traduz por um aumento na deposição de proteínas da matriz extracelular, tais como colágeno e elastina, onde há fundamental participação das metaloproteinases (MMPs) (Galis e cols., 2002; Faxon e cols., 2004; Touyz e Schiffrin, 2004; Cau e cols., 2011). Dentre os principais fatores que contribuem para a etiologia da disfunção endotelial, grande destaque tem sido dado ao estresse oxidativo (Dai e Dai, 2010; Touyz e Briones, 2011).

O aumento de espécies reativas de oxigênio nas células da musculatura lisa vascular pode ser responsável pela sinalização da proliferação celular e do remodelamento vascular adverso (Kyaw e col., 2004; Kleemann e col., 2011). Além disso, o estresse oxidativo leva à fosforilação da cinase de adesão focal (FAK), no endotélio e nas células do músculo liso, que por sua vez contribuem para migração celular (Ali e col., 2006; Moraes e col., 2015). Estudos mostram que o tratamento com antioxidantes pode diminuir a atividade da NADPH oxidase, a principal fonte de ROS nos vasos, resultando em melhora na disfunção endotelial e no remodelamento (Konior e col., 2014; Rodrigues e col., 2008; Escobales., 2005).

As ROS também estão relacionadas à regulação da expressão gênica e da atividade de metaloproteinases (MMPs). Essas, por sua vez, pertencem a um grupo de endopeptidases e são responsáveis pela degradação de proteínas intra e extracelulares levando a alterações da estrutura e na função vascular (Belo e col., 2015). O aumento da atividade das MMP-2 é visto em modelos de hipertensão com remodelamento hipertrófico e eutrófico. O remodelamento vascular hipertrófico é caracterizado pela hipertrofia e pela hiperplasia das células do músculo liso vascular na túnica média das aortas. Com isso ocorre um aumento da espessura da túnica média e da relação média lúmen (Belo e col., 2015; Lemarie e col., 2010). Por sua vez, no remodelamento eutrófico não há alterações no conteúdo da parede celular, porém há um rearranjo das células do músculo liso (Xi Wang e Raouf A. Khalil, 2018). Estudos em modelos de hipertensão mostram um aumento do estresse oxidativo e da atividade de metaloproteinases em amostras de plasma e de tecido

vascular (Bouvet e col., 2005; Martinez e col., 2006; 2008; Schulz, 2007; Castro e col., 2008; Rizzi e col., 2009).

O estresse oxidativo causado pela hipóxia gestacional parece aumentar a liberação de citocinas inflamatórias e fatores anti-angiogênicos que favorecem a resposta inflamatória materna e disfunção endotelial (Redman, 2005). Esse evento pode ocorrer em casos de pré-eclâmpsia (PE), conhecida pela sua associação entre hipertensão e proteinúria na segunda metade da gestação (Noris e col., 2005).

### **Estresse oxidativo**

O estresse oxidativo pode ser entendido como um desequilíbrio entre a formação e remoção de ROS, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes e está intimamente relacionado à disfunção endotelial (Sies e col., 1997; Wang e col., 2017). As ROS podem diminuir diretamente a produção do NO pela inibição da expressão da enzima e-NOS e causar o desacoplamento da mesma (Risbano e col., 2013; Xu e col., 2016).

As mitocôndrias são as maiores fontes de ROS, tais como, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que possuem um papel fundamental como segundos mensageiros na modulação de vias de sinalização intra e extracelulares e na homeostase (Burton e col., 2011). Se as mitocôndrias se encontram danificadas há um acúmulo desses radicais livres, o que leva ao dano de moléculas biológicas, levando a perda de função e morte celular (Pan e col., 2018).

No sistema cardiovascular, as ROS exercem um papel fisiológico essencial, mantendo a integridade cardíaca e vascular, e um papel fisiopatológico na disfunção cardiovascular associado com condições como hipertensão, diabetes e aterosclerose (Landmesser e Harrison, 2001; Zalba e cols., 2001, Touyz e Briones, 2011). As principais ROS nestes processos são:  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) e a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).

Na rede vascular, o  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$  e  $ONOO^-$  são produzidos em graus variados. Estes pró-oxidantes são regulados por antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), vitaminas

antioxidantes e outras moléculas pequenas (Stralin e cols., 1995; Halliwell, 1999; Channon e Guzik, 2002). Sob condições normais, a taxa de produção de ROS é equilibrada pela taxa de eliminação. Entretanto, um desequilíbrio entre a geração de ROS e proteção antioxidante resulta na alteração da biodisponibilidade de ROS, levando a um estado de estresse oxidativo (Landmesser e Harrison, 2001; Zalba e cols., 2001). O resultado patogênico do estresse oxidativo é o dano oxidativo, principal causa de dano vascular em doenças cardiovasculares (Schafer e Buettner, 2001). Os mecanismos de defesa antioxidantes mantêm a sobrevivência dos organismos contra o estresse oxidativo.

Já é estabelecido que o NO reage com o ânion superóxido formando um potente oxidante, o ONOO. Por outro lado, as enzimas antioxidantes SOD, GPx, e a CAT são o mecanismo de defesa celular contra as ROS, para evitar o dano oxidativo em proteínas, lipídios e ácidos nucléicos (Valença e col., 2009). O estresse oxidativo pode levar à disfunção endotelial pela ação direta nos vasos ou pela redução da biodisponibilidade do NO (Gilbert e col., 2008).

O estresse oxidativo, na forma severa de HI, é agravado pela depleção de reservas energéticas em tecidos, e com isso promover acidose, excitotoxicidade glutamatérgica, diminuição da produção de NO e do estresse oxidativo no sistema nervoso central (SNC). Esta condição pode levar ao atraso da formação neuronal e, por outro lado, acelerar os mecanismos de apoptose e inflamação (Peeters-Scholte e col., 2002; Vannucci e Hagberg, 2004). O aumento do estresse oxidativo durante a gestação pode ocorrer pelo aumento da atividade mitocondrial como um mecanismo compensatório pela redução do aporte de oxigênio durante a hipóxia e na reperfusão e reoxigenação, após o insulto isquêmico (Reddy e col., 2011; Weis e col., 2012).

# 1 OBJETIVOS

## 1.1 Objetivo Geral

Tendo em vista que estudos mostram que o estresse pré-natal está envolvido em condições fisiopatológicas que cursam com a psicose, como a depressão, e doenças cardiovasculares na idade adulta, o objetivo geral desse trabalho é avaliar as alterações comportamentais e cardiovasculares causadas pelo insulto isquêmico pré-natal.

## 1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o comportamento tipo depressivo através do teste do Nado forçado em P30;
- b) Analisar a concentração de serotonina e seu metabólito, ácido 5-hidroxi indolacético, no córtex pré-frontal e mesencéfalo basal em P45;
- c) Avaliar a pressão arterial sistêmica em P120 e a reatividade vascular em leito arterial mesentérico e aorta torácica;
- d) Avaliar as possíveis alterações histológicas da aorta;
- e) Analisar o possível dano oxidativo e a defesa antioxidante em amostras de aorta torácica;
- f) Estudar as alterações metabólicas através de dosagens séricas de glicose, triglicerídeos e colesterol total no plasma, assim como avaliar o peso corporal em P0 e P120.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Modelo experimental da HI pré-natal

Todas as experiências foram aprovadas pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do IBRAG da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Protocolo (CEUA 056/2018). Todos os experimentos foram realizados de acordo com a declaração de Helsinki e de acordo com o guia de cuidados e uso de animais de laboratórios como adotados ou promulgados. O trabalho foi conduzido a partir dos modelos experimentais de Robinson e colaboradores em 2005, uma adaptação do modelo de Cai e colaboradores de 1999 (de Cai e col., 1999; Robinson e col., 2005).

Nesse trabalho, fêmeas Wistar, com aproximadamente três meses de idade, foram submetidas ao processo de esfregaço vaginal para caracterização do seu ciclo estral e identificar o período em que estão receptivas aos machos, com a finalidade de melhorar o sucesso reprodutivo. Assim, as fêmeas que se encontravam na fase de estro foram colocadas junto aos machos por 12 horas para o acasalamento controlado.

As fêmeas grávidas foram divididas em três grupos: HI, controle cirúrgico SHAM e controle (não foram submetidas a cirurgia). No décimo oitavo dia de gestação, as fêmeas que deram origem às proles HI e SHAM foram anestesiadas com isoflurano inalatório (isoflurano 4% + 1 L/min de O<sub>2</sub> até a perda dos reflexos) e para manutenção da anestesia durante o processo cirúrgico (isoflurano 2,5% + 0,8 L/min de O<sub>2</sub>), e logo após foram tricotomizadas na região abdominal. Antes do começo da cirurgia todos os sinais vitais foram checados e subsequentemente, foi realizada uma laparotomia na linha média do abdome e os cornos uterinos foram expostos por 45 minutos. As fêmeas que deram origem aos animais SHAM tiveram seus cornos uterinos expostos por 45 minutos, todavia as artérias uterinas não foram clampeadas, mantendo um aporte de oxigênio para os fetos (Fig 3). Os animais HI se originaram de fêmeas que tiveram os cornos uterinos expostos e as artérias uterinas clampeadas por 45 minutos (Fig 4), mimetizando a HI pré-natal. As fêmeas que deram origem ao grupo controle não foram manipuladas e os fetos não sofreram nenhum tipo de estresse pré-natal.



Durante o procedimento cirúrgico, os cornos foram umidificados com solução salina e após os 45 minutos, os *clamps* foram removidos e os cornos uterinos foram recolocados novamente na cavidade abdominal, seguido pela sutura da camada muscular e epitelial. Para o processo pós-operatório foi injetado dipirona sódica (10 mg/100 g – por peso corporal), para o alívio da dor e xilocaína injetada nos pontos para manter a anestesia local. Os animais foram monitorados em um ambiente isolado até 3 dias depois do nascimento dos filhotes, entre o 21.<sup>o</sup> e o 23.<sup>o</sup> dia de gestação, e depois foram transferidos novamente para o biotério. Os animais, após o desmame, foram mantidos em caixas com 5 animais, em ambiente controlado, com temperatura de 23° C e receberam água e ração *ad libitum*.

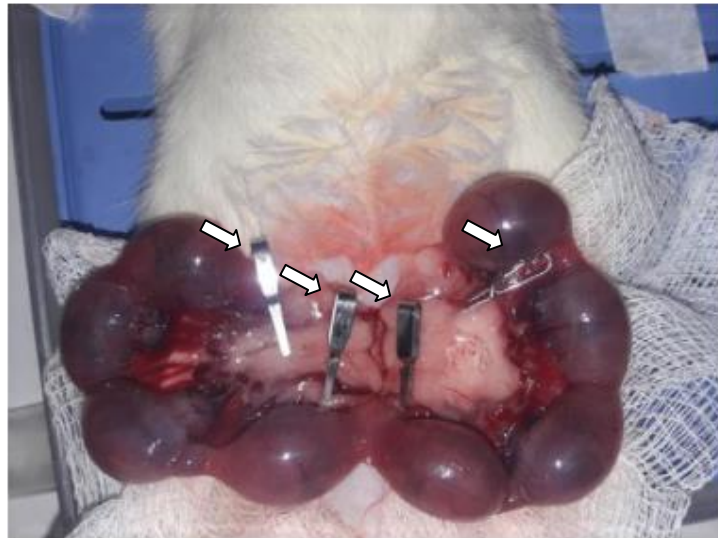
Os experimentos foram realizados com a prole de machos Wistar primeiramente em P30 para análise comportamental, a fim de evitar possíveis mecanismos de adaptação, pelos animais, tornando mais fidedignas as análises referentes ao insulto isquêmico. Após todos os animais serem submetidos a análise comportamental em um período de 15 dias, em P45, os animais foram eutanaziados e tiveram seus encéfalos dissecados para análises neuroquímicas. As análises das alterações cardiovasculares foram conduzidas em P120 com os animais jovens adultos para evitar qualquer alteração cardiovascular relacionada a idade.

Figura 3 - Imagem ilustrativa da cirurgia de hipóxia-isquemia pré-natal sem o clampeamento das artérias uterinas



Fonte: A autora, 2018.

Figura 4 - Imagem ilustrativa da cirurgia de hipóxia isquemia com o clampeamento das artérias uterinas



Legenda: Setas brancas indicam os grampos de aneurisma clampeando as artérias principais de suprimento fetal.

Nota: Modelo de hipóxia-isquêmica por clampeamento proposto por Robinson e colaboradores em 2005.

Fonte: A autora, 2018.

## 2.2 Teste do nado forçado (*Forced swim test*)

Porsolt e colaboradores em 1977 descreveram o teste do nado forçado com o objetivo de testar fármacos antidepressivos, além de outras terapias farmacológicas com a mesma finalidade, como privação de sono REM e eletroconvulso terapia (Porsolt e col., 1977; Porsolt e col., 1978, Kitada e col., 1981). Esse modelo experimental animal pode predizer se uma droga ou procedimento produz ação antidepressiva, através da análise do tempo de imobilidade do animal no teste. Fármacos antidepressivos reduzem esse tempo no teste do nado forçado (Porsolt e col., 1977; Porsolt e col., 1978, Kitada e col., 1981).

O experimento foi realizado segundo o protocolo original de Porsolt, sendo conduzido em dois dias. No primeiro dia, os animais machos dos grupos Controles, SHAM e HI, com um mês de idade (P30), foram submetidos a uma ambientação. Os mesmos foram forçados a nadar por 15 minutos em um cilindro vertical de vidro com 40 cm de altura por 18 cm de diâmetro contendo  $\frac{3}{4}$  de volume de água com temperatura aproximada de 25 graus Celsius.

No dia seguinte, esses animais foram forçados a nadar por 5 minutos nas mesmas condições do dia anterior e estes foram filmados por uma câmera sony DCR-SX20 para posterior análise e estatística. Os parâmetros analisados foram o tempo de imobilidade e o número de *head shakes* (comportamento estereotipado de sacudir a cabeça).

Figura 5 - Imagem ilustrativa representando o *Forced swim test*



Fonte: Imagem obtida no google imagens em 20 de agosto de 2017.

### 2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*, HPLC) é uma técnica similar a cromatografia líquida, porém com o emprego de pequenas colunas e uma fase móvel submetida a altas pressões. O objetivo é promover a separação e análise quantitativa de inúmeros componentes de uma amostra com alta resolução, a partir da fase móvel e a fase estacionária. A separação acontece pela diferença da afinidade dos componentes pela fase móvel e estacionária. A primeira foi constituída pelos solventes acetonitrila e tampão acetato, 25mM (pH 4,5) + ácido etilenodiamino tetra-acético, 0,5 mM (EDTA) em colunas de sílica sob altas pressões. Por sua vez, a fase estacionária possibilita a chegada dos componentes da amostra no detector em tempos diferentes, uma vez, que o tempo

de retenção na coluna é diferente para cada substância. Estudos prévios para análise do padrão de cada componente permitem quantificar analitos diferentes na amostra. Dessa forma, a partir do tempo (em minutos) de retenção a análise quantitativa é feita pela área do pico e a massa de cada analito em (pmol).

Neste estudo foi analisado indolaminas, 5-HT e 5-HIAA, em diferentes áreas do cérebro. Ratos Wistar machos em P45, foram anestesiados com isoflurano inalatório (isoflurano 4% + 1L/min de O<sub>2</sub>), e logo após foi realizada uma dissecação do encéfalo para obtenção de amostras do córtex pré-frontal e parte basal do mesencéfalo basal. A análise cromatográfica foi realizada preferencialmente com o hemisfério esquerdo e as amostras foram pesadas e mantidas a -20°C até o seu processamento. Para a análise das amostras foi utilizado o cromatógrafo *Waters Alliance e2695*. 10 µL da alíquota da amostra foram colocados em um *insert* (200 µL), no interior de um *vial* de vidro (2 mL) para HPLC, com 50 µL de reativo de benzilamina (benzilamina + metanol + tampão CAPS [ácido N-ciclohexil-2-hidroxil-3-aminopropanosulfônico] + ferricianeto de potássio + H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) e 50 µL de reativo de ácido clorídrico e glicina (ácido clorídrico + glicina + H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). Logo após foi realizada a homogeneização no vórtex e as amostras foram mantidas por no mínimo 3 minutos de incubação para haver a reação de derivatização, promovendo a reação de fluorescência das indolaminas ao receberem uma radiação à 345nm (excitação), promovendo a emissão da radiação à 480nm. O sinal gerado é transformado por um sistema de transdução e detectado pelo detector *Waters 2475 FLR*. Adaptado de Yoshitake e col., (2004 e 2006).

Essa metodologia juntamente com os testes comportamentais é fundamental para avaliar o dano causado pela hipóxia pré-natal, a essas estruturas e vias neuroquímicas responsáveis por alterações comportamentais relacionadas a ansiedade e ao comportamento do tipo depressivo.

#### 2.4 Pressão arterial sistêmica

A pressão arterial sistêmica (mmHg) foi aferida através da pletismografia caudal (Letica LE 5000), um método não invasivo realizado com os animais

conscientes e imobilizados (da Costa e col., 2012). A pressão arterial dos ratos adultos com quatro meses de idade (P120) foi aferida durante uma semana. Os seis primeiros dias foram considerados como período de treinamento, com o objetivo de reduzir o estresse gerado pelo método *per se*. No último dia de medição, os resultados foram considerados como os valores para análise. Imediatamente antes à aferição, cada rato foi mantido sob lâmpada incandescente de 127 volts e 60 watts, durante 20 minutos, para promover a dilatação da veia caudal desses animais e facilitar a medição.

As pressões sistólica, diastólica e média foram os parâmetros comparados entre os grupos Controle, SHAM e HI e esses dados foram obtidos pelo programa *Coda Non-invasive Blood Pressure System*.

## **2.5 Estudo da reatividade vascular em leito arterial mesentérico**

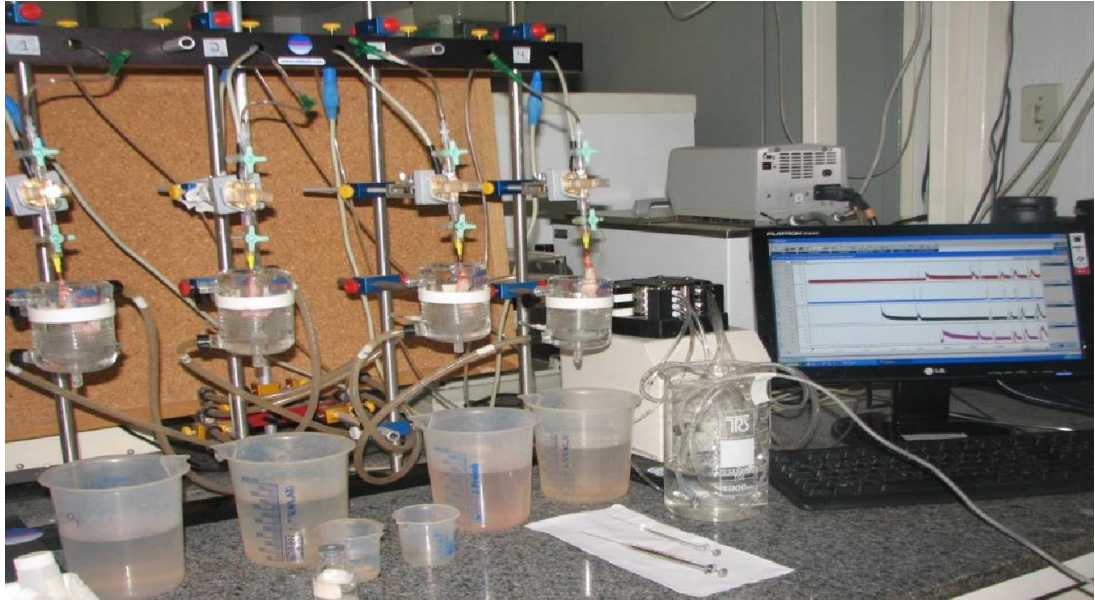
Os animais de cada grupo com quatro meses de vida foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de 1 ml de tiopental. As medidas de reatividade vascular dos grupos Controle, SHAM e HI foram obtidas através do método de isolamento do leito arterial mesentérico (LAM), em ratos Wistar machos (P120). Esse método foi descrito por McGregor em 1965, onde primeiramente é realizado uma laparotomia e em seguida, o LAM foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto em gaze umedecida com solução de Krebs conforme descrito previamente nos trabalhos publicados pelo nosso grupo (Costa et al., 2012). Brevemente, os ramos pancreáticos, duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE 50, *Clay Adams Brand CA – Becton Dickinson*) preenchido com solução de Krebs. A artéria mesentérica é fechada na sua extremidade distal, para obrigar a solução a passar pelas suas ramificações. Em seguida, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs (Amaral e col., 2017).

Após o isolamento do leito arterial mesentérico, a preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10 mL) e constantemente perfundida com solução de Krebs, por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior, que foi conectada a uma bomba peristáltica (Model MINIPULS 3, Gilson®, LB, França). Desse modo, a solução de Krebs, mantida à 37 °C e aerada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub>), foi infundida à velocidade constante de 4 mL /min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador através do programa LabChart Reader 7 (SP, Brasil), por meio de um transdutor de pressão (PowerLab 4/30, SA, Austrália).

Os experimentos foram precedidos de um período de 30 minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal foi mantida próxima de 20 a 40 mm Hg (Da Costa e col., 2012). Em seguida, testamos a viabilidade dos vasos mesentéricos por meio de injeção “in bolus” de 120 µmol de Cloreto de Potássio (KCl). Posteriormente, a norepinefrina (NE; 30 uM) foi adicionada à solução de perfusão para que a pressão de perfusão fosse elevada e mantida em torno de 80-100 mm Hg. Logo após a obtenção de resposta pressora constante pela NE, testamos a viabilidade do endotélio vascular, com a injeção de acetilcolina em doses crescentes (ACh; 0,01-1000 pmol), que produz um efeito vasodilatador dependente da liberação de NO pelas células endoteliais.

Essa metodologia visa avaliar a presença da disfunção endotelial (DE) pelo desequilíbrio entre os fatores vasoconstrictores e vasodilatadores dependentes do NO no LAM.

Figura 6 - Aparelho no qual é realizada a reatividade vascular em leito arterial mesentérico isolado de ratos



Fonte: Ricardo Soares, 2019

## 2.6 Estudo da reatividade vascular em anel de aorta

Para a análise da reatividade vascular às substâncias vasoativas em anel de aorta, um vaso de condutância, os anéis de aorta dos animais dos grupos Controle, SHAM e HI em P120, foram isolados e preparados de acordo com Furchgott e Zawadzki (1980) e adaptado por Zanichelli e colaboradores (2004, 2007). Foi realizada uma laparotomia na linha média do abdome, e a porção torácica da aorta foi removida e dividida em dois anéis de aproximadamente 4 mm de comprimento cada. Cada anel foi posicionado entre 2 ganchos de aço inoxidável em forma de triângulo, conectados a um transdutor de força isométrica (PanlabS.I. TRI202P). Estes ganchos foram colocados individualmente em uma cuba contendo 40 mL de solução fisiológica de Krebs modificada (g/L), NaCl 1 M, KCl 0,5 M, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,5 M, MgSO<sub>4</sub> 0,1 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, NaHCO<sub>3</sub> 1,86 g, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 1,42 g (Resende et al. 1997) e constantemente borbulhada com O<sub>2</sub> (95%) e CO<sub>2</sub> (5%), a 37°C.

Os anéis de aorta na cuba foram submetidos a uma tensão basal de 2g, e permaneceram por um período de 60 minutos para estabilização, durante os quais a

solução Krebs foi substituída a cada 20 minutos. Foi utilizado um transdutor isométrico de tensão (PanlabS.I. TR1202P) para registrar as tensões geradas, conectado a um sistema amplificador (ADInstruments, Quad bridge amp ML224). Em seguida, foram obtidas curvas concentração-efeito cumulativas à norepinefrina ( $10^{-10}$  mol/L–  $10^{-4}$  mol/L) e acetilcolina (ACh,  $10^{-10}$  mol/L–  $10^{-4}$  mol/L); esta última com o anel pré-contraído com fenilfrina (Phe) na concentração de  $3 \times 10^{-7}$  mol/L. Os gráficos de tensão foram registrados através do programa de computador (PowerLab4/30).

## 2.7 Morfologia da aorta

Os animais de cada grupo com quatro meses de vida foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de 1 ml de tiopental. A aorta torácica foi isolada e fixada em paraformaldeído 4%, pH 7.4 e incluída em blocos de paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). Cortes de  $7\mu$  foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise morfométrica, e com PicrossiriusRed para detecção da deposição de colágeno. Cinco imagens digitais de aorta não consecutivas por animal foram capturadas (formato JPEG, colorida 36-bit, 1280-1024 pixels, objetiva 10x) com uma câmera LC Evolution e um microscópio de luz Olympus BX51 e analisadas pelo programa Image Pro-Plus versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). A túnica média foi definida como a região delimitada entre as lâminas elásticas interna e externa e a razão média lúmen foi calculada a partir da medida do diâmetro interno e externo. Quatro medidas por imagem foram obtidas a 0, 90, 180 e 270 graus para determinar a espessura da túnica média.

A análise das imagens para a quantificação da marcação de colágeno foi realizada com o programa Image-Pro Plus, seguida de análise estatística.



## 2.8 Ensaio pró-oxidantes

### 2.8.1 Carbonilação de proteínas

Este método é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas e baseia-se no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de aminoácidos de proteínas (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonil é determinado espectrofotometricamente em 380 nm usando um coeficiente 22.0000 molar<sup>-1</sup> em nmol/mg de proteínas, como descrito por Levine *et al.* (1990).

Foram utilizados 200µL de homogenato de aorta dos grupos controle, SHAM e HI em duplicata. Foram feitas lavagens com solução de TCA 10% e etanol-acetato de etila. Em cada lavagem, as amostras foram centrifugadas por 2 min a 2000 rpm e descartado o sobrenadante. Uma parte das amostras foi incubada com 2,4-dinitrophenylhydrazine e outra parte incubada com HCl 2 M por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Todas as amostras foram incubadas com guanidina e centrifugadas por 3 min a 5000 rpm a temperatura ambiente. Foi realizada a leitura do sobrenadante na absorbância de 370 nm.

### 2.8.2 Imuno-histoquímica

Foram utilizados cortes histológicos (5 µm) de aorta previamente emblocadas em parafina e alocados em lâminas histológicas, seguidos de marcação com o anticorpo específico de interesse e coloração por hematoxilina. Para bloqueio de ligações inespecíficas dos anticorpos, os cortes histológicos foram incubados com *normalhorseserum* 2,5% por 20 minutos do kit Vectastain® Universal Quick HRP R.T.U, com posterior incubação com o anticorpo primário específico para proteína de interesse (overnight, a 4°C): 8- Isoprostano (1:100). No dia seguinte, os cortes foram

incubados com o anticorpo secundário durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguidos de lavagem com tampão fosfato salino (PBS) (1,38g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,96g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7,2g NaCl em pH 7.2), e incubação com estreptavidina durante 30 minutos, ambos pertencendo também ao do kit Vectastain® Universal Quick HRP R.T.U (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Após esse tempo os cortes foram incubados com o cromógeno diaminobenzidina (DAB), lavados em água destilada e corados com hematoxilina para evidenciação dos núcleos. As fotos dos cortes foram tiradas aleatoriamente. Todas as imagens foram escolhidas ao acaso (formato JPEG, cor 36-bit, 1360x1024 pixels) com a câmera Olympus DP71. A análise das imagens para a quantificação da marcação foi realizada com o programa Image-Pro Plus.

## 2.9 Ensaios antioxidantes

As atividades das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT foram realizadas em amostras de homogenato de aorta preparados com tampão fosfato (NaCl 5,84 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,8 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 26,8 g, KCl 7,45 g, EDTA 2,28 g) em pH:7,2.

### 2.9.1 Superóxido dismutase

O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que deve ser retirado do meio o mais rápido possível. Uma unidade de enzima é definida pela quantidade transformada em 1 µmol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi estimada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480 nm). A adrenalina é oxidada pelo O<sub>2</sub><sup>-</sup> para formar um produto róseo, adrenocromo. Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Bannister e cols. (1987) e adaptada para o tecido vascular.

Foram utilizados 10 20 e 30 µl de homogenato de aorta dos três grupos. Em cada cubeta foram adicionados 20µl de catalase (0,0024 g/mL de água destilada –

C9322, SIGMA) + 970  $\mu$ l de tampão glicina (0,75 g em 200 mL de água destilada – 32°C) + 40  $\mu$ l de norepinefrina (95 mg em 5mL de água destilada + 15  $\mu$ l/mL de HCl fumegante).

Para o cálculo foi utilizado o alfa da reta de cada amostra em todas as concentrações utilizadas em planilha do excel. Os resultados foram ponderados em mg de proteína.

### 2.9.2 Glutathione peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para  $H_2O$  e álcool, usando a GSH como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 340 nm.

Foram utilizados 200  $\mu$ L de amostra de homogenato de aorta dos três grupos. As mesmas foram incubadas com 1450 $\mu$ L de tampão fosfato, glutathione reduzida (2 mM), GR (0.11 mg/mL) e azida sódica (0,065 mg/mL) durante dez minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas as leituras em um intervalo de cento e oitenta segundos. Posteriormente,  $H_2O_2$  (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por duzentos e quarenta segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340 nm; Ultrospec 2100 Pro Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé e Gunzler (1984) e adaptada para o tecido de aorta.

### 2.9.3 Catalase

A catalase é uma heme proteína que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio, formando oxigênio molecular e água. Essa enzima antioxidante se

localiza principalmente no peroxissoma, entretanto outras organelas como as mitocôndrias podem conter alguma atividade da CAT. A catálise do peróxido de hidrogênio é importante, pois na presença de  $Fe^{2+}$ , leva a formação de radical hidroxil, conhecida como reação de Fenton, altamente reativo e danoso as biomoléculas. A atividade da enzima foi avaliada através do consumo de peróxido de hidrogênio pela reação e medida espectrofotometricamente a 240 nm (Ultrospec 2100 Pro Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

Foram utilizados 20  $\mu$ L de amostra de homogenato de aorta, em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato e peróxido de hidrogênio (0.16%). A concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi avaliada durante sessenta segundos por espectrofotometria (Aebi, 1984).

## 2.10 Dosagem de Proteínas (Bradford)

As proteínas totais das amostras estudadas foram quantificadas através do método de Bradford em placa de ELISA (Jamef®), utilizando a albumina bovina (SIGMA®) (Bradford, 1976).

## 2.11 Análises metabólicas

### 2.11.1 Dosagens séricas

As dosagens séricas foram analisadas em amostras de plasma dos animais dos grupos controle, SHAM e HI com quatro meses de idade (P120). Foram realizadas dosagens de glicose, triglicerídeos e colesterol total a partir dos kits da bioclin (Quibasa química básica Ltda). Foram utilizados 10  $\mu$ L de amostra de plasma com 1 ml do reagente 1, 10  $\mu$ L do padrão e por fim 1 ml do reagente 1 para o branco. Todas as amostras foram incubadas por 10 minutos na placa aquecedora a 37°C. As absorbâncias foram determinadas por espectrofotometria (Hidex), em um

comprimento de onda de 500 nm. Os cálculos da concentração em mg/dL foram realizados a partir da absorbância da amostra multiplicada por 100 sobre a absorbância do padrão (Trinder, 1969).

### 2.11.2 Análise estatística

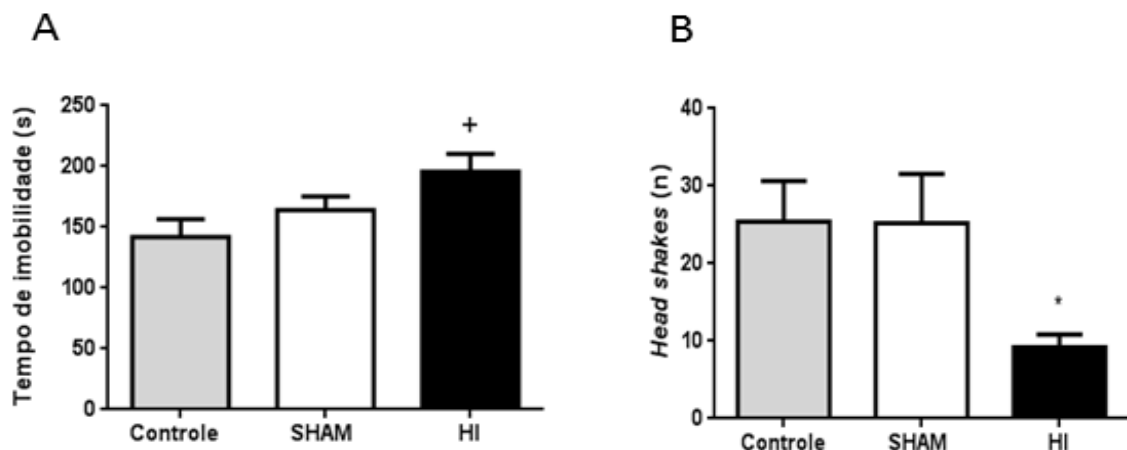
A análise estatística foi realizada por meio do programa *Graph-Pad Prism 6.0* (GraphPad Softwares Inc., San Diego, CA). Para todos os experimentos, dados dos três grupos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, para análise de normalidade. Os resultados foram, então, analisados através do teste One Way ANOVA e subsequentemente pelo teste post hoc de tukey. Para todos os testes estatísticos, foi considerado significativo, o valor de  $P \leq 0.05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Teste do nado forçado

A Figura 7 apresenta os efeitos da HI no tempo de imobilidade (A) e o número de *head shakes* (B). Esses parâmetros permitem avaliar o comportamento tipo depressivo e uma hipoatividade serotoninérgica em ratos com um mês de vida (Kokras e col., 2016). Podemos observar que houve um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) no tempo de imobilidade nos animais HI em relação ao grupo controle, sugerindo que os animais que sofreram o estresse pré-natal apresentam comportamento tipo-depressivo. Além disso, os resultados também mostraram uma redução ( $p \leq 0,05$ ) no número de *head shakes* nos animais HI em relação ao grupo SHAM, o que sugere uma hipoatividade serotoninérgica.

Figura 7 - Efeitos da HI pré-natal no tempo de imobilidade (A) e no número de *head shakes* (B).



Legenda: Efeitos da HI pré-natal no tempo de imobilidade (A) e no número de *head shakes* (B) entre os animais dos grupos controle, SHAM e HI em P30.

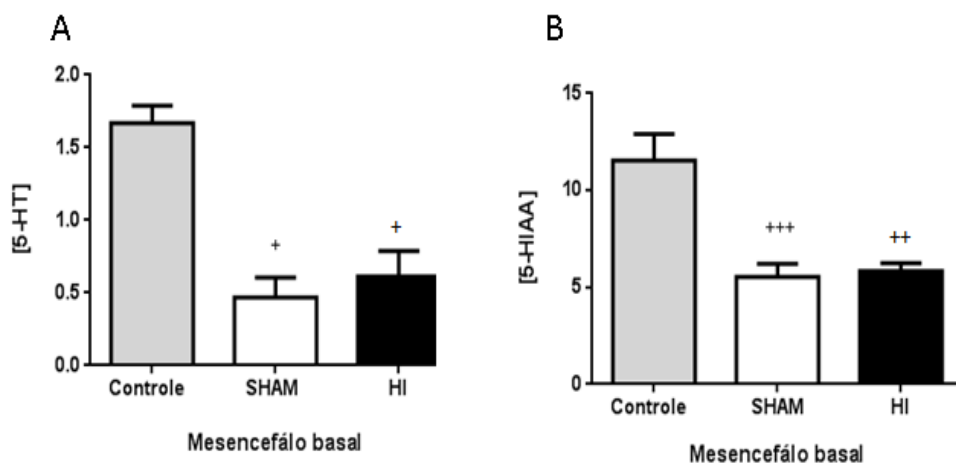
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 14 - 23$  ratos Wistar machos por grupo. \* significativamente diferente do grupo SHAM. + Significativamente diferente do grupo Controle considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

### 3.2 Medidas de 5-HT e 5-HIAA no mesencéfalo basal e córtex pré-frontal

As figuras 8 e 9 apresentam os efeitos da HI pré-natal na concentração de serotonina (5-HT) e do seu metabólito ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) no mesencéfalo basal (Fig 8) e no córtex pré-frontal (Fig 9) de ratos em P45. Houve uma redução ( $p \leq 0,05$ ) na concentração de serotonina e do seu metabólito no mesencéfalo basal nos grupos HI e SHAM em relação ao grupo controle, o que correlaciona com os dados do número de *head shakes*, sugerindo uma hipoatividade serotoninérgica nos animais HI. No córtex pré-frontal, não observamos diferença na concentração de serotonina e seu metabólito entre os grupos.

Figura 8 - Efeitos da HI pré-natal na concentração de 5-HT (A), de 5-HIAA (B) no mesencéfalo basal

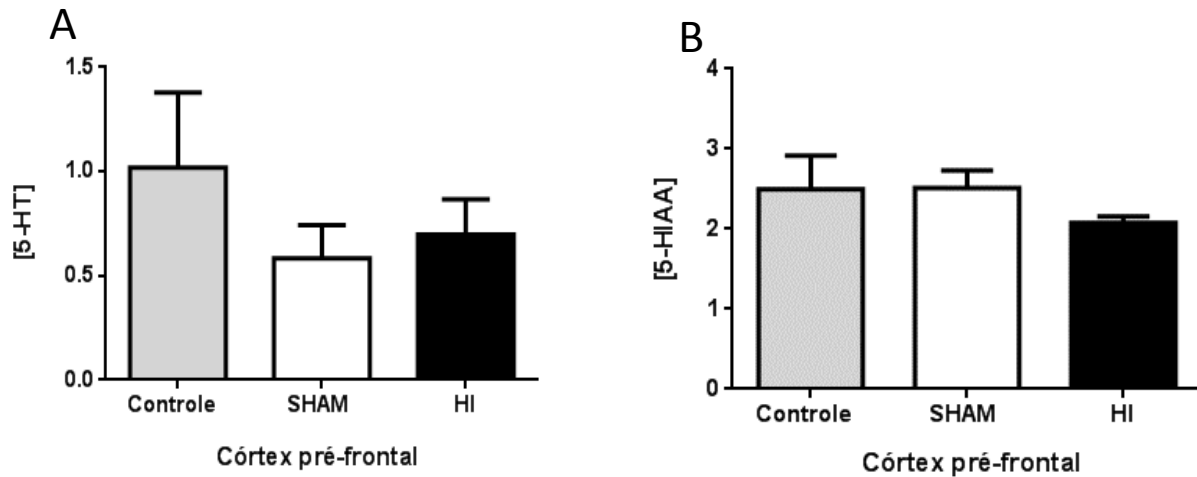


Legenda: Efeitos da HI pré-natal na concentração de 5-HT (A) de 5-HIAA(B) e no turnover de serotonina (C) no mesencéfalo basal nos animais dos grupos controle, SHAM e HI em P45.

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 3 - 6$  ratos Wistar machos por grupo. + Significativamente diferente do grupo Controle considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 9 - Efeitos da HI pré-natal na concentração de 5-HT (A), de 5-HIAA (B) no córtex pré-frontal



Legenda: Efeitos da HI pré-natal na concentração de 5-HT (A) de 5-HIAA(B) no córtex pré-frontal nos animais dos grupos controle, SHAM e HI em P45.

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 3 - 6$  ratos Wistar machos por grupo. Considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

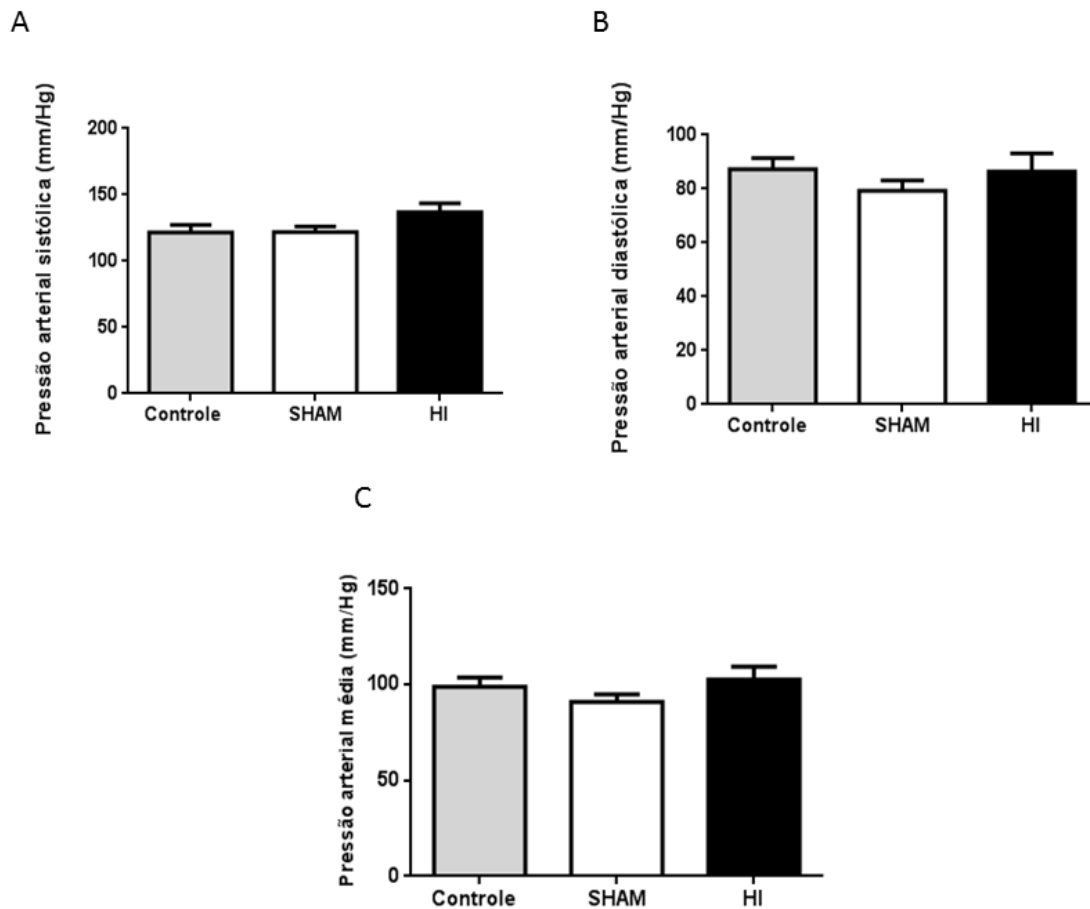
Fonte: A autora, 2018.

### 3.3 Pressão arterial sistêmica

A Figura 10 apresenta os resultados das medidas da pressão arterial sistêmica em ratos do grupo controle, SHAM e HI com quatro meses de idade (P120). Não foram observadas diferenças significativas na pressão arterial sistólica (A), diastólica (B) e média (C) entre os diferentes grupos.



Figura 10 - Efeitos da HI pré-natal na pressão arterial sistólica (A), diastólica (B) e média (C)



Legenda: Efeitos da HI pré-natal na pressão arterial sistólica (A) diastólica (B) e média (C) nos animais dos grupos controle, SHAM e HI em P120.

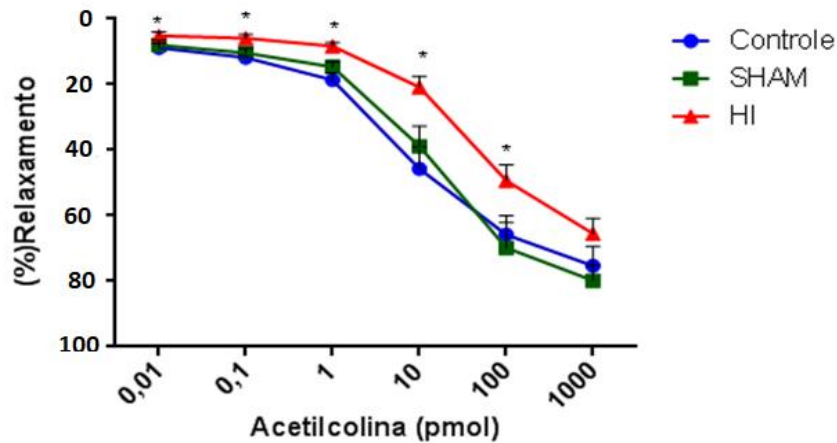
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 14 - 23$  ratos Wistar machos por grupo. Considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

### 3.4 Reatividade vascular em leito arterial mesentérico

A Figura 11 apresenta o resultado da análise da reatividade vascular no leito arterial mesentérico de ratos com quatro meses de idade que sofreram HI pré-natal. Pode-se observar que a acetilcolina (0,01 a 1 pM) produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) no grupo HI comparado ao grupo SHAM.

Figura 11 - Efeito da HI pré-natal no relaxamento vascular do LAM induzida por doses crescentes de acetilcolina



Legenda: Efeito da hipóxia isquemia pré-natal no relaxamento vascular do LAM induzido por doses crescentes de acetilcolina nos grupos controle, SHAM e HI em P120.

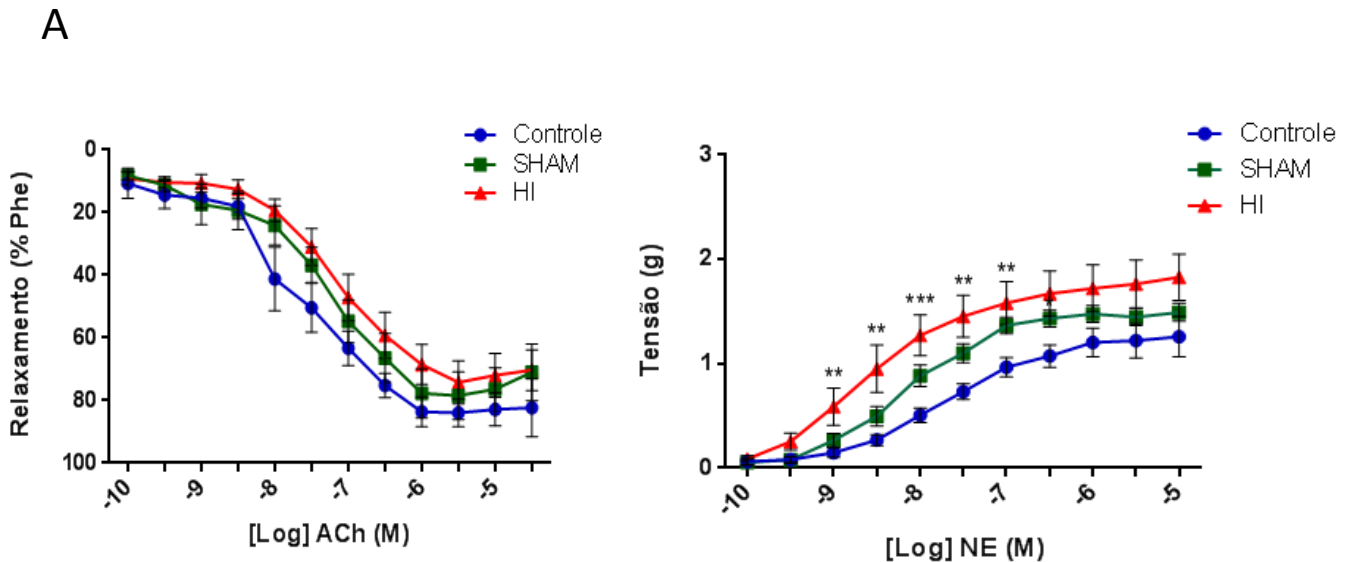
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 5 - 7$  ratos Wistar machos por grupo. \* significativamente diferente do grupo SHAM considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2018.

### 3.5 Reatividade vascular em anel de aorta

A Figura 12 apresenta os resultados da análise da reatividade vascular em anel de aorta de ratos com quatro meses de idade que sofreram HI pré-natal (HI). A acetilcolina produziu uma resposta vasodilatadora dependente da concentração que não foi diferente entre os três grupos experimentais. Por outro lado, a noradrenalina produziu uma resposta constritora que foi significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) nos animais HI em relação ao controle.

Figura 12 - Efeito da HI pré-natal no relaxamento vascular (A) e na tensão (B) no anel de aorta induzida por doses crescentes de acetilcolina e norepinefrina, respectivamente



Legenda: Efeito da hipóxia isquemia pré-natal na tensão no anel de aorta induzida por doses crescentes de norepinefrina (A) e no relaxamento vascular induzida por doses crescentes de acetilcolina (B) nos grupos controle, SHAM e HI em P120.

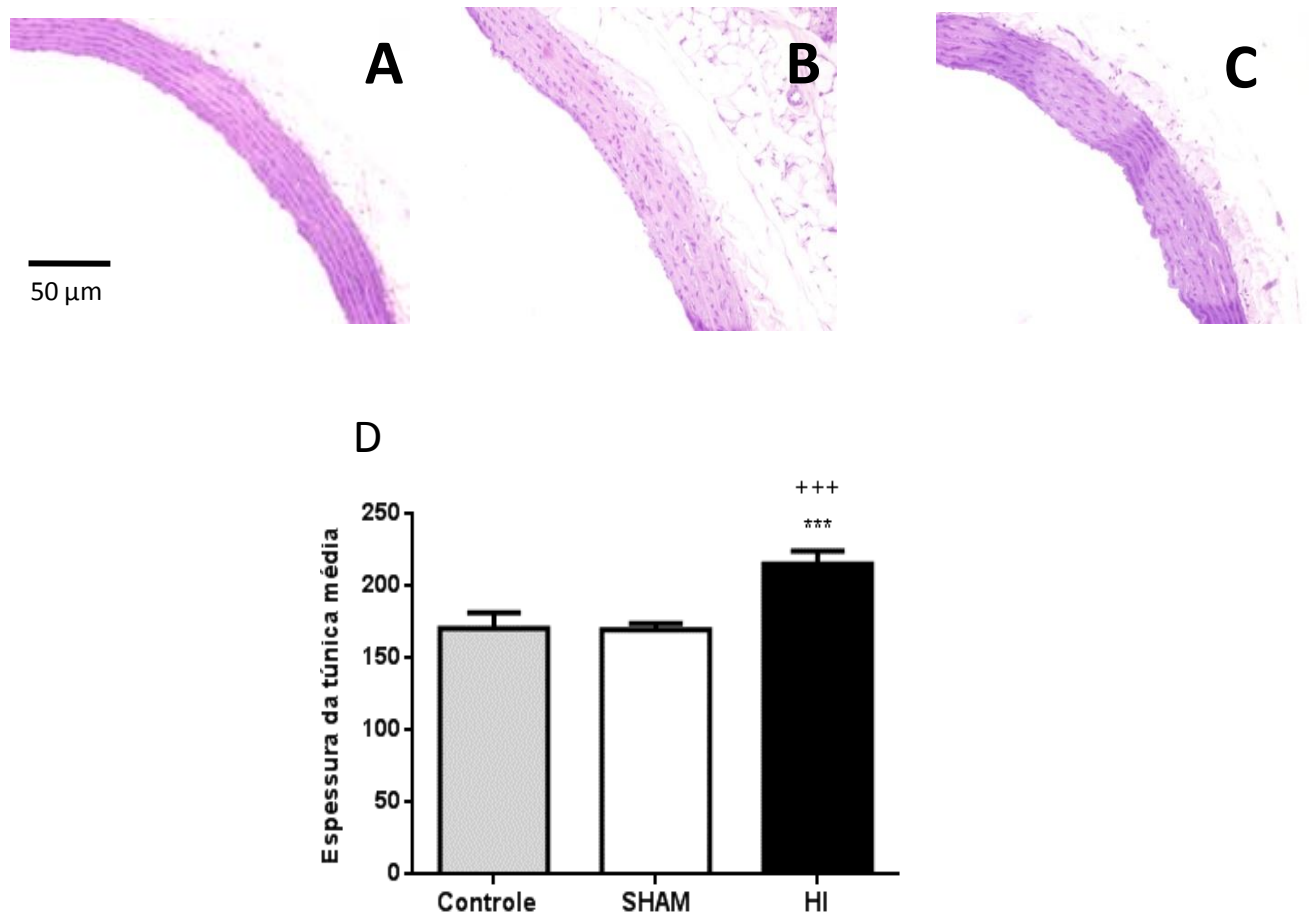
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 5 - 7$  ratos Wistar machos por grupo. \* significativamente diferente do grupo Controle considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2019.

### 3.6 Análises morfométricas

As Figuras 13 e 14 apresentaram os resultados das análises morfométricas em aortas torácicas de ratos com quatro meses de idade que sofreram HI pré-natal (HI). Houve um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) na espessura da túnica média (Fig.13 A-D) e na deposição de colágeno (Fig.14 A-D) nas aortas dos animais HI em relação aos animais dos grupos SHAM e Controle.

Figura 13 - Efeito da HI pré-natal na espessura da túnica média de aortas torácicas (A-D)

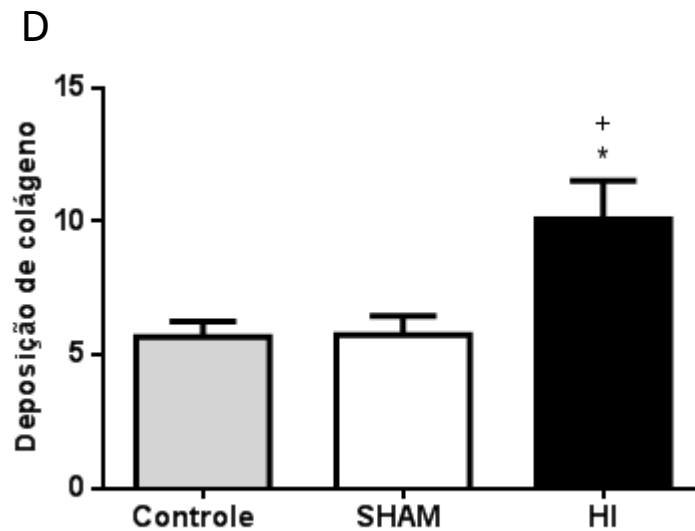
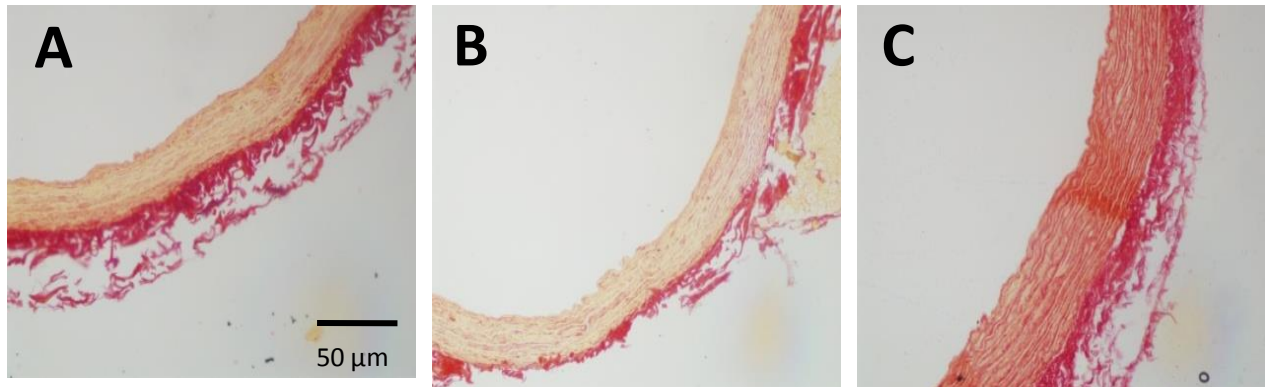


Legenda: Fotomicrografia da aorta torácica corada com hematoxilina e eosina dos grupos Controle (A), grupo SHAM (B), grupo HI (C). Aumento 20 X, barra de calibração = 50μm. Efeito da hipóxia isquemia pré-natal na espessura da túnica média de aortas (D) em animais dos grupos Controle, SHAM e HI respectivamente, em P120.

Nota: Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média, n = 5 ratos Wistar machos por grupo. \* significativamente diferente do grupo SHAM; + Significativamente diferente do grupo Controle considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 14 - Efeitos da HI pré-natal na deposição de colágeno em aortas torácicas (A-D).



Legenda: Fotomicrografia da aorta torácica corada com Picrosirius red dos grupos Controle (A), grupo SHAM (B), grupo HI (C). Aumento 20 X, barra de calibração = 50µm. Efeito da hipóxia isquemia pré-natal na deposição de colágeno em aortas (D) em animais dos grupos Controle, SHAM e HI respectivamente, em P120.

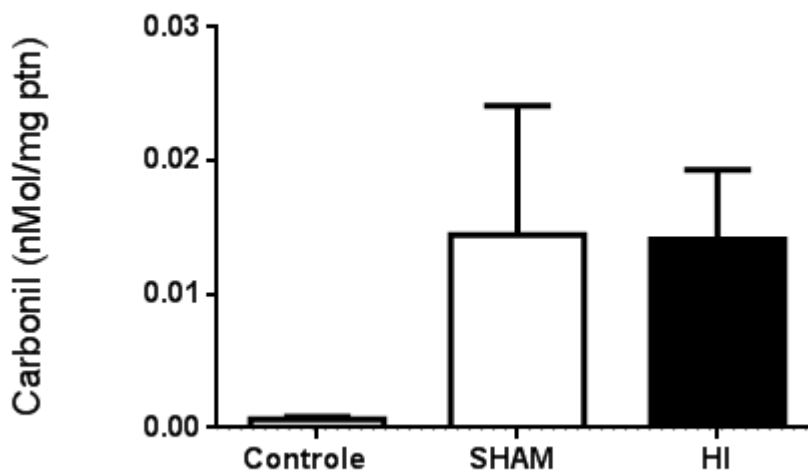
Nota: Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média, n = 5 ratos Wistar machos por grupo. \* significativamente diferente do grupo SHAM; + Significativamente diferente do grupo Controle considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2019.

### 3.7 Ensaios pró-oxidativos

A Figura 15 apresenta os resultados das análises da carbonilação de proteínas em amostras de aortas torácicas de ratos com quatro meses de idade que sofreram HI pré-natal (HI). Podemos observar que apesar de uma tendência de aumento da carbonilação de proteína nas aortas dos animais HI em relação aos animais do grupo Controle, não houve diferença significativa entre os três grupos (Fig.15). Por outro lado, houve um aumento ( $p \leq 0,05$ ) da imunomarcagem para o marcador de dano oxidativo, o 8-isoprostano nas aortas dos animais HI em relação aos animais dos grupos SHAM e controle (Fig.16 A-D).

Figura 15 - Efeitos da HI pré-natal na carbonilação de proteínas em amostras de aorta torácica

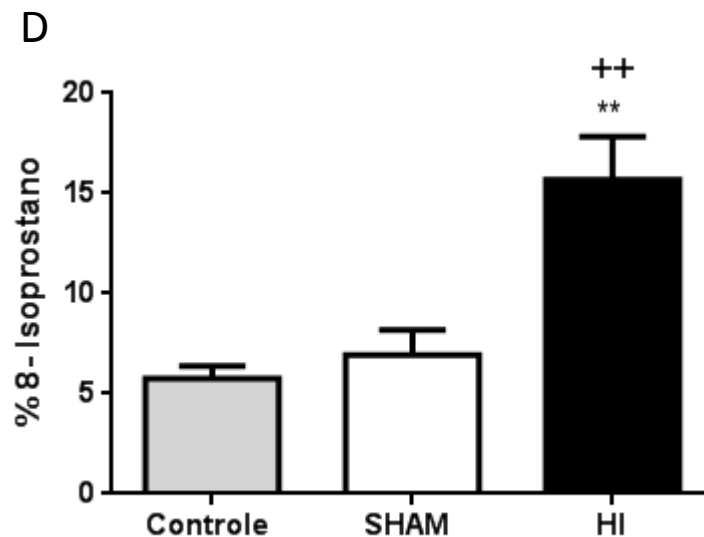
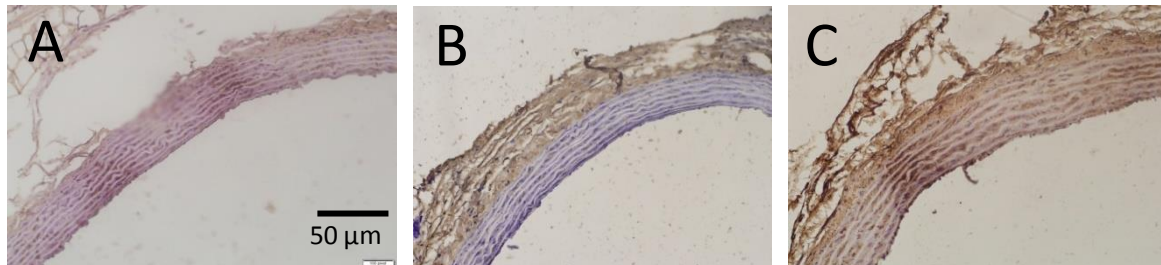


Legenda: Efeito da hipóxia isquemia pré-natal na carbonilação de proteínas em aortas torácicas de animais dos grupos Controle, SHAM e HI, em P120.

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 6 - 15$  ratos Wistar machos por grupo. Considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 16 - Efeitos da HI pré-natal na imunomarcação do 8-isoprostano em amostras de aorta torácica (A-D)



Legenda: Fotomicrografia da aorta torácica dos grupos Controle (A), grupo SHAM (B), grupo HI (C) para imunomarcação do 8-isoprostano. Aumento 20 X, barra de calibração = 50µm. Efeito da hipóxia isquemia pré-natal no dano oxidativo (D) dos grupos em aortas torácicas de animais dos grupos Controle, SHAM e HI, em P120.

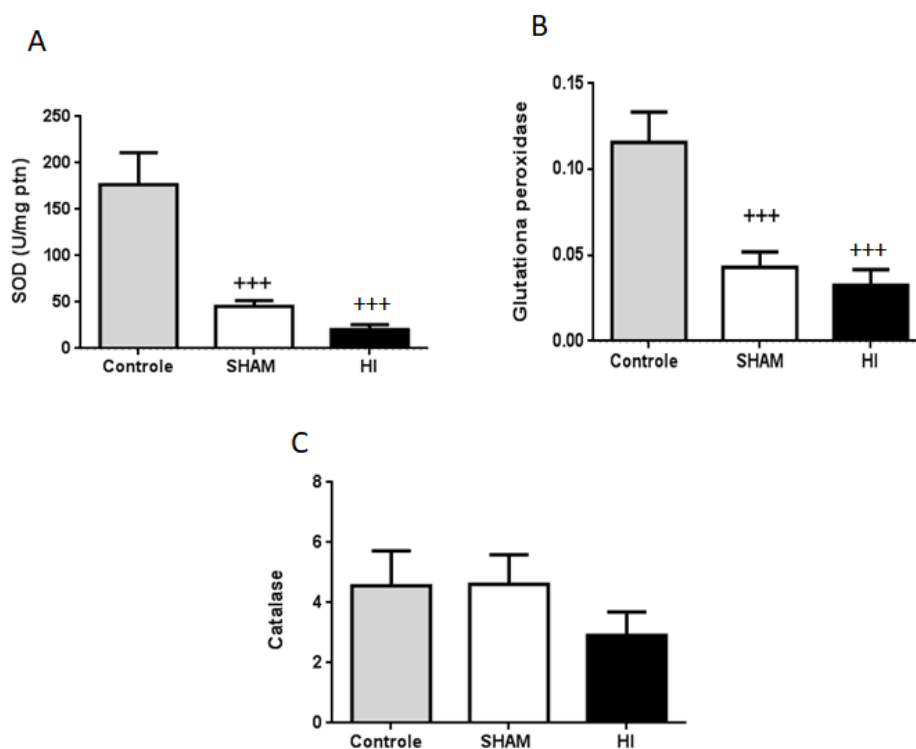
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n = 5 - 16 ratos Wistar machos por grupo. \* significativamente diferente do grupo SHAM ; + Significativamente diferente do grupo Controle considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2019.

### 3.8 Ensaios antioxidantes

A Figura 17 apresenta os resultados da atividade das enzimas antioxidantes nas aortas torácicas de ratos com quatro meses de idade que sofreram HI pré-natal. Pode-se observar que houve uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) na atividade da glutaciona peroxidase (B), assim como da superóxido dismutase (C) nos grupos HI e SHAM em relação ao controle não manipulado e uma tendência na redução da atividade da catalase (A) no grupo HI em relação aos grupos controles, sem entretanto ter sido observada diferença significativa entre os grupos.

Figura 17 - Efeitos da HI pré-natal na atividade enzimática da catalase (A), da glutaciona peroxidase (B) e da superóxido dismutase (C) em aortas torácicas



Legenda: Efeito da hipóxia isquemia pré-natal na atividade enzimática da catalase (A), da glutaciona peroxidase (B) e da superóxido dismutase (C) em aortas torácicas de animais dos grupos Controle, SHAM e HI, em P120.

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 6 - 15$  ratos Wistar machos por grupo. \* significativamente diferente do grupo SHAM; + Significativamente diferente do grupo Controle considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

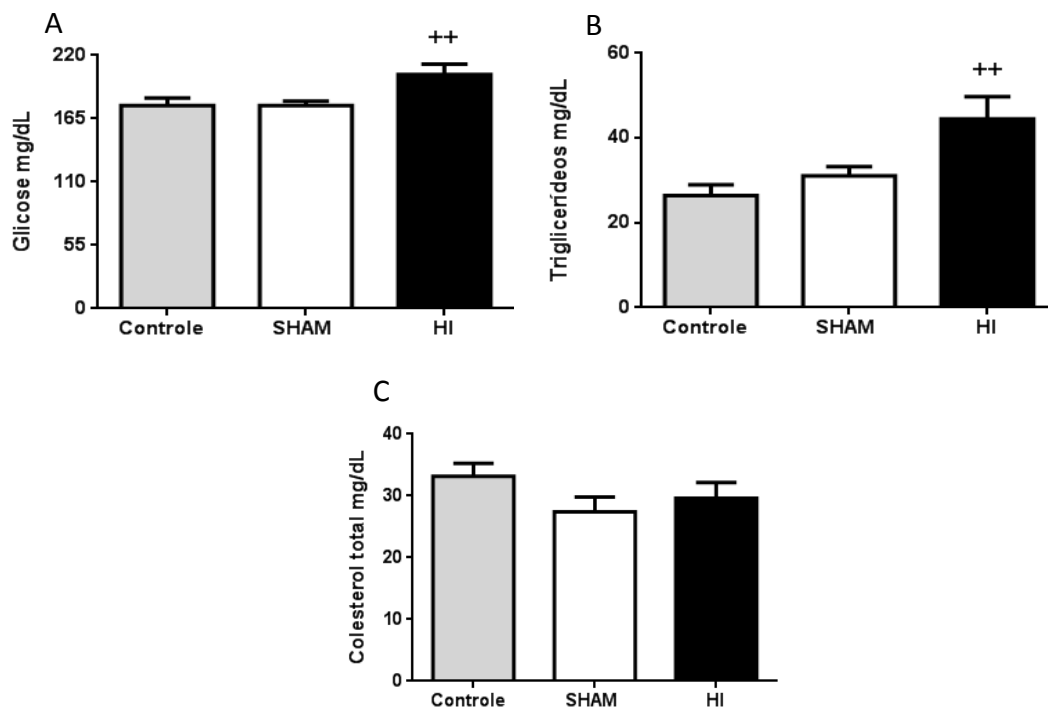
Fonte: A autora, 2019.



### 3.9 Dosagens séricas

A Figura 18 apresenta os resultados das dosagens séricas em amostras de plasma de ratos com quatro meses de idade que sofreram HI pré-natal. Pode-se observar que houve um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) nos níveis séricos de glicose (A) e triglicerídeos (B) no grupo HI em relação aos controles. Não foi observada diferença na dosagem sérica de colesterol total (C) entre os grupos.

Figura 18 - Efeitos da HI pré-natal na concentração de glicose (A), triglicerídeos (B) e colesterol total (C) em amostra de plasma



Legenda: Efeito da hipóxia isquemia pré-natal na concentração de glicose (A), triglicerídeos (B) e do colesterol total (C) em mg/dL em amostras de plasma dos animais dos grupos Controle, SHAM e HI, em P120.

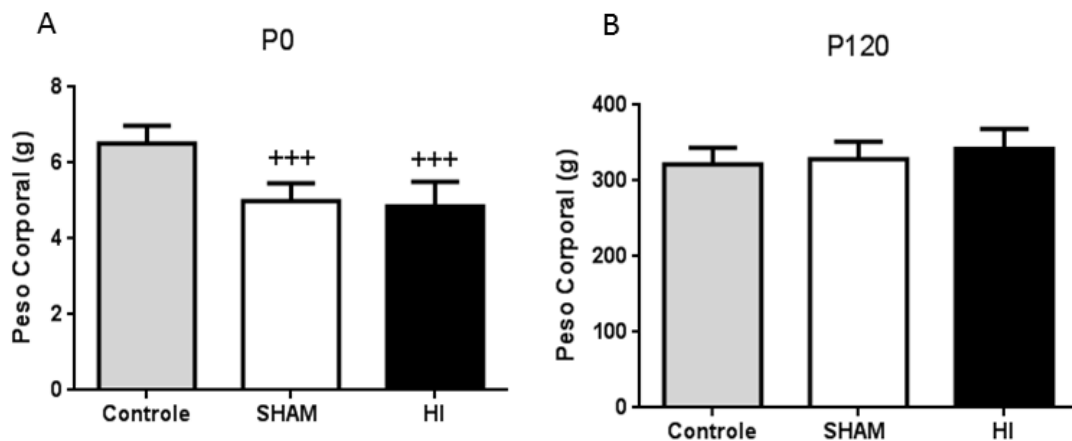
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 12 - 15$  ratos Wistar machos por grupo. + Significativamente diferente do grupo Controle considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2019.

### 3.10 Peso corporal

A figura 19 apresenta o peso corporal dos animais HI, SHAM e Controle em P0 (A) e P120 (B). Pode-se observar que houve uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) no peso corporal dos animais HI e SHAM em P0 em relação ao controle (A). Em P120 não foi observada diferença no peso corporal entre os três grupos (B).

Figura 19 – Efeito da HI pré-natal no peso corporal dos animais HI, SHAM e Controle em P0 (A) e P120 (B)



Legenda: Efeito da hipóxia isquemia pré-natal no peso corporal em P0 (A) e P120 (B) entre os animais Controle, SHAM e HI.

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 6 - 10$  ratos Wistar machos por grupo. + Significativamente diferente do grupo Controle, considerando  $p \leq 0,05$  pelo teste estatístico *One way ANOVA* e pós-teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2020.

## 4 DISCUSSÃO

O presente trabalho revela originalmente a relação entre a isquemia pré-natal e alterações permanentes, tanto no sistema cardiovascular quanto uma mudança comportamental sugestiva de depressão, envolvendo a via serotoninérgica.

O nado forçado é um modelo que prediz se determinado tratamento farmacológico ou não farmacológico produz efeitos antidepressivos (Porsolt, 1977). O paradigma do modelo se baseia no fato de que antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade dos animais. Alguns autores, no entanto, consideram que o aumento pronunciado no tempo de imobilidade está associado a sintomas depressivos (Rhees e col., 2001), de modo que o teste pode ser utilizado para análise do comportamento tipo depressivo.

Nagano e colaboradores, usando um modelo de HI pré-natal semelhante, mas em camundongos, revelou que há diferença significativa no tempo de imobilidade entre os animais HI e SHAM no *forced swim test*. O aumento do tempo de imobilidade nos camundongos HI foi suprimido pelo tratamento com fármacos antidepressivos como a fluoxetina e escitalopram, dois inibidores seletivos da recaptção de serotonina (Wolak e col., 2015). Animais HI tratados com fluoxetina, do terceiro ao vigésimo primeiro dia pós-natal, apresentaram redução do tempo de imobilidade em relação ao grupo controle (Nagano e col., 2017). Nos resultados obtidos, podemos corroborar a hipótese de que a hipóxia pré-natal pode levar ao aumento do tempo de imobilidade em animais que sofreram esse insulto em relação ao grupo controle não operado. Nosso resultado também pode ser corroborado pelas pesquisas do grupo de Congli Hu em 2017 que demonstraram aumento no tempo de imobilidade pelo *forced swim test* em animais que foram expostos a um estresse pós - natal por seis semanas.

Atualmente, existem evidências que sugerem que algumas drogas agonistas de receptores serotoninérgicos como o receptor 5-HT<sub>2</sub>, são responsáveis por gerarem comportamento estereotipado da cabeça, denominado *head shakes* (Yape Taylor, 1983). Pesquisas clássicas de Hemmie H.G. Berendsen e Chris L.E. Broekkamp em 1990 demonstraram essa relação entre o número de *head shakes* mediado pelo receptor 5-HT<sub>2</sub>. Com isso, os resultados obtidos nessa pesquisa sugeriram que a resposta no número de *head shakes* pode ser atenuada através de

antagonistas serotoninérgicos que inibem funcionalmente a resposta biológica mediada pelo receptor 5-HT<sub>2</sub>.

Nossos estudos demonstraram que há uma redução no número de *head shakes* nos animais HI em relação ao controle não manipulado, e os dados obtidos pela cromatografia líquida de alta eficiência sugerem hipoatividade serotoninérgica no mesencéfalo basal dos animais que sofreram hipóxia pré-natal e o controle cirúrgico em comparação com o grupo controle não manipulado.

Os resultados do presente estudo sugerem que animais submetidos à HI pré-natal no décimo oitavo dia gestacional (E18) apresentaram, quando adultos, aumento da resposta pressora à noradrenalina em vasos de condutância e redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina em vasos de resistência.

O fato de os animais HI apresentarem aumento na responsividade à noradrenalina pode estar relacionado ao aumento na concentração vascular de receptores  $\alpha_1$  ou aumento na expressão e/ou sensibilidade dos fatores envolvidos na via de sinalização intracelular. Outra possibilidade seria o aumento da atividade enzimática da enzima cinase II ou enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável por converter a angiotensina I em angiotensina II. Essa via é fundamental para regular o sistema cardiovascular a partir da modulação da pressão arterial e do tônus vascular.

Os resultados também indicaram a redução na resposta vasodilatadora da acetilcolina no leito arterial mesentérico, nos animais HI, em relação ao controle operado SHAM. A acetilcolina é um vasodilatador dependente de NO, de forma que atuando nos receptores M1 e/ou M3, presentes no endotélio vascular, promove a ativação da via de sinalização intracelular que leva a formação de GMPc e ativação de seu efetor, a PKG (Evora e col., 1994; Moncada e Higgs, 2006). Dependendo do tipo de vaso (condutância ou resistência), a PKG pode promover relaxamento através de um ou mais mecanismos, como a regulação de proteínas da maquinaria contrátil ou ativação de canais de K e hiperpolarização do músculo liso vascular (Resende et al., 1998). Portanto, o fato de os ratos HI apresentarem menor resposta vasodilatadora à acetilcolina poderia ser explicado por uma falha em algum ponto dessa via.

Diversos estudos comprovam o papel do endotélio no controle do tônus vascular (Bode-Böger e col., 2007; Ignarro, 2007; Chen e col., 2017). O endotélio íntegro produz substâncias vasodilatadoras, como o NO, a prostaciclina (Pgl<sub>2</sub>) e o

fator de hiperpolarização derivado do endotélio (FHDE), e vasoconstrictoras, como a endotelina e a angiotensina II (Chen e col., 2017). Na disfunção endotelial, no entanto, ocorre redução na produção dos fatores vasodilatadores, persistindo os agentes vasoconstrictores. Portanto, a DE aumenta o tônus contrátil vascular e contribui para a etiologia da doença hipertensiva e o risco cardiovascular (Chen e col., 2017; Femlak e col., 2017). A disfunção endotelial pode ser provocada pelo tabagismo, pelo diabetes mellitus, pela dislipidemia e pela hipertensão arterial sistêmica (Chen e col., 2017; Femlak e col., 2017). O conjunto de dados obtidos neste estudo sugere que os animais HI apresentam disfunção endotelial, de modo que ficam mais sensíveis ao efeito vasoconstrictor da noradrenalina.

A redução da resposta vasodilatadora da acetilcolina dependente de endotélio, no grupo HI, sugere que animais que sofreram HI pré-natal desenvolvem disfunção endotelial na fase adulta, o que aumenta o risco cardiovascular e a morbimortalidade por doença cardiovascular (Chen e col., 2017; Femlak e col., 2017). Portanto, demonstramos pela primeira vez, a relação entre HI pre-natal e distúrbio vascular na fase adulta.

Outra hipótese alternativa para explicar os efeitos da HI sobre a reatividade vascular pode ser creditada ao aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em um período crítico do neurodesenvolvimento. Considerando-se que o cortisol modifica a funcionalidade de circuitos neurais (Kapoor e col., 2006; Antonijevic, 2008; O'Donnell e col., 2012). Está bem estabelecido na literatura que o estresse pré-natal altera circuitos neurais relacionados à ansiedade e ao medo e produzem alterações comportamentais que persistem na idade adulta (Thompson, 1957; Vallee e col., 1997; Weitzdoerfer e col., 2004; Chung et al. 2005; Fumagalli e col., 2007; Brunton e Russell 2010). O aumento da ansiedade, por outro lado, sobrecarrega o sistema simpático e, por sua vez, o aumento do *drive* simpático produz aumento na pressão arterial sistêmica (Westfall e Westfall, 2012. P. 277).

A ausência de hipertensão arterial sistêmica, conforme revelaram nossos resultados, é consistente com o fato de a prevalência da doença hipertensiva ser diretamente proporcional à idade. Os animais utilizados nesse estudo são adultos jovens. É factível supor que viessem apresentar doença hipertensiva no futuro. Vários estudos salientam o valor prognóstico da disfunção endotelial em diversas condições clínicas (Leman et al, 2005). Portanto, a disfunção endotelial observada

nos animais HI pode representar um evento primário que predispõe ao desenvolvimento da hipertensão em fase posterior.

O presente estudo mostrou desequilíbrio no estado oxidativo de animais HI, caracterizado por um aumento de 8-isoprostano e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes em aortas, o que caracteriza o estresse oxidativo que promove dano nas estruturas celulares. Já é bem estabelecido que alterações mitocondriais estão intimamente relacionadas com o aumento da produção de ROS (Miao e col., 2013). Estudos de Chen e colaboradores mostram aumento da liberação de ânion superóxido, em animais que sofreram hipóxia pré-natal em amostras de plasma e artérias mesentéricas, assim como redução na atividade enzimática da superóxido dismutase e da catalase.

Os resultados desse grupo também apresentaram aumento da NOX 1. As ROS podem rapidamente reagir com o NO e formar o ânion peróxinitrito e assim diminuir a biodisponibilidade do NO, sugerindo redução no relaxamento vascular (Dikalova e col., 2010; Troiano e col., 2016). Esses achados corroboram com os resultados do presente estudo que mostraram redução no relaxamento vascular induzido pela acetilcolina em aortas, e aumento do estresse oxidativo vascular em animais HI pelo aumento da peroxidação lipídica e redução da atividade antioxidante (GPx e SOD). Ressaltamos que o controle cirúrgico, SHAM, também apresentou redução na atividade da glutathione o que pode ser explicado pelo estresse cirúrgico causado às fêmeas grávidas. Portanto, em conjunto nossos resultados sugerem que existe uma forte correlação entre o estresse oxidativo e a disfunção endotelial em animais que sofreram HI pré-natal.

Estudos mostram também uma relação entre o aumento do estresse oxidativo e a proliferação das células do músculo liso vascular em distúrbios cardiovasculares (Touyz e col., 2011). No presente estudo demonstramos um aumento significativo na espessura da camada média em aortas dos animais que sofreram estresse pré-natal em comparação com os grupos controles. Esse aumento na camada média vascular é um importante marcador de remodelamento hipertrófico e pode ser associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Belo e col., 2015). Em nosso estudo, demonstramos pela primeira vez que a HI pré-natal predispõe ao desenvolvimento de hipertrofia vascular na fase adulta, o que contribui para a disfunção vascular e conseqüentemente, o aumento do risco cardiovascular.

O remodelamento pode ser explicado por diferentes vias intracelulares como por exemplo a via da SAPK/JNK e pela sinalização extracelular pela quinase (ERK)1/2 e p38MAPK. As atividades dessas proteínas são desencadeadas pela ação de ROS nos vasos e assim, contribuem para proliferação das células do músculo liso vascular (Kyaw e col., 2004). Além disso, o estresse oxidativo contribui diretamente para o aumento da expressão de metaloproteinases tipo 2 (MMP-2) e da sua atividade *in vitro* (Grote e col., 2003). Em estudos com ratos hipertensos, o aumento da atividade de MMP-2 contribuiu para o aumento da espessura da camada média vascular (Castro e col., 2009, Costa et al., 2012). A MMP-2 geralmente é ativada quando secretada para matriz extracelular e a partir da proteólise do seu domínio pró-peptídeo, expondo seu sítio catalítico, capaz de clivar outros componentes da matriz, o que facilita a liberação das células do músculo liso vascular para proliferação e migração levando ao remodelamento hipertrófico (Belo e col., 2015; Newby., 2006). Além disso, após a proliferação das células do músculo liso vascular as mesmas resintetizam nova matriz extracelular rica em colágeno e elastina de baixa qualidade o que leva ao aumento da rigidez vascular (Touyz e Herrmann, 2018). Esses achados corroboram com nossos resultados que mostraram o aumento da deposição de colágeno nos animais que sofreram hipóxia pré-natal em relação aos controles.

Evidências epidemiológicas em estudos com animais sugerem que os eventos no início da vida representam uma janela de plasticidade fenotípica e são fundamentais para o desenvolvimento metabólico ao longo da vida (Gluckman e col., 2008). Dessa forma, o ambiente intrauterino pode impor uma influência significativa a longo prazo no peso corporal, homeostase energética e função metabólica na prole (Khalyfa e col., 2014a).

Um estudo de Abdelnaby Khalyfa de 2019 em modelo animal de hipóxia intermitente revelou diversas alterações metabólicas associada à dislipidemia, resistência à insulina e diabetes tipo 2. Assim como os resultados desse trabalho, onde foi observado um aumento das concentrações de glicose e triglicerídeos em amostras de plasma dos animais HI, podemos sugerir que há uma relação consistente entre insulto pré-natal e alterações metabólicas da prole na vida adulta. Além disso, de acordo com a literatura que mostra uma redução no peso corporal dos animais que passaram por um estresse pré-natal (Robinson e col., 2005) nossos resultados também mostraram redução no peso corporal dos animais HI e SHAM em

P0 e uma recuperação do peso em P120, em que não há diferença entre os grupos. Essas alterações podem ser explicadas através de mecanismos epigenético, visto que evidências sugerem uma relação entre a metilação do DNA e alterações metabólicas em camundongos que sofreram esse tipo de hipóxia gestacional (Dick e col., 2014). Análises de bioinformática mostram que o aumento da metilação do DNA está associado a vias bioquímicas relacionadas à produção de energia através do metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos, em particular degradação da metionina e biossíntese de cisteína, enquanto amostras com metilação reduzida do DNA estão associadas à degradação de colina e às vias de degradação do glutaril-CoA. Já foi estabelecido que o metabolismo da metionina na dieta desempenha um papel fundamental na adipogênese, na sensibilidade à insulina e na inflamação (Hasek e col., 2013).

Contudo, mais estudos são necessários para elucidar as questões abordadas nesse projeto de pesquisa. É importante ressaltar as limitações encontradas para avaliar o estudo cardiovascular e metabólico em animais mais velhos devido as dificuldades de manutenção e cuidados com os mesmos. Assim como a dificuldade para realização de alguns experimentos devido limitação de recursos. Apesar das dificuldades encontradas, essa pesquisa é de fundamental importância para o esclarecimento de lacunas na literatura para o melhor entendimento dos efeitos da hipóxia isquemia a longo prazo nas alterações tanto fisiológicas quanto comportamentais. Dessa forma, este trabalho possibilita o desenvolvimento de estratégias precoces para prevenir ou minimizar o risco cardiovascular de pessoas que sofreram hipóxia pré-natal.



## CONCLUSÃO

Neste estudo demonstramos originalmente que a diminuição do aporte de oxigênio para os fetos, induzida pela HI pré-natal em E18, está intimamente relacionada com a presença de distúrbios cardiovasculares assim como metabólicos, na vida adulta. As alterações vasculares (disfunção endotelial e hipertrofia do músculo liso vascular) cursam com o estresse oxidativo e podem ser responsáveis pelo aumento do risco cardiovascular em idade mais avançada. Além disso, foram observadas alterações comportamentais do tipo depressivo em animais HI que podem estar associadas a via serotoninérgica. O nosso trabalho, portanto, possibilita o desenvolvimento de estratégias precoces para prevenir ou minimizar o risco cardiovascular de pessoas que sofreram hipóxia pré-natal. Todavia, mais estudos são necessários para avaliar a progressão das doenças cardiovasculares e das alterações metabólicas nos animais HI em diferentes idades, bem como para avaliar se há relação entre a hipoatividade serotoninérgica observada e as alterações cardiovasculares ou como fenômenos independentes.

## REFERÊNCIAS

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
2. Amaral TAS, Ognibene DT, Carvalho LCRM, Rocha APM, Costa CA, de Moura RS, Resende AC. Differential responses of mesenteric arterial bed to vasoactive substances in L-NAME-induced preeclampsia: Role of oxidative stress and endothelial dysfunction, *Clinical and Experimental Hypertension*, 2017. DOI: 10.1080/10641963.2017.1339073
3. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
4. Antonijevic, I. HPA axis and sleep: identifying subtypes of major depression. *Stress.* 2008. 11(1):15–27.
5. Arborelius L, Wallsten C, Ahlenius S, Svensson TH. The 5-HT(1A) receptor antagonist robalzotan completely reverses citalopram-induced inhibition of serotonergic cell firing *Eur J Pharmacol.* 1999. 382(2):133-8.
6. Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet.* 2000. 24(4):410-4.
7. Bale TL, Lee KF, Vale WW The role of corticotropin-releasing factor receptors in stress and anxiety. *Integr Comp Biol.* 2002. 42(3):552-5.
8. Barnes P. J. (1995) Nitric oxide and airways disease. *Ann. Med.* 21, 289-293. *IntSocUltrasoundObstetGynecol.* 1997;9: 162–72.
9. Bell AH, Miller SL, Castillo-Melendez M, Malhotra A. The Neurovascular Unit: Effects of Brain Insults During the Perinatal Period. *Front Neurosci.* 2020 Jan 22;13:1452.
10. Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther.* 2007. 114(3):295-306.
11. Bouvet C, Gilbert LA, Girardot D, deBlois D, Moreau P (2005). Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* 45: 432–437.
12. Brunini T, Moss M, Siqueira M, Meirelles L, Rozentul A, Mann G, Ellory J, Soares de Moura R, Mendes-Ribeiro A. Inhibition of L-arginine transport in platelets by asymmetric dimethylarginine and N-monomethyl-L-arginine: effects of arterial hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004. 31(10):738-40.

13. Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Ellory JC, Mann GE. Platelet nitric oxide synthesis in uremia and malnutrition: a role for L-arginine supplementation in vascular protection? *Cardiovasc Res.* 2007. 73(2):359-67.
14. Brunton PJ, Russell JA. Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects. *J Neuroendocrinol.* 2010. 22(4):258-71.
15. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin ObstetGynaecol* 2011; 25: 287–299.
16. C.A.Lemarie, P.L. Tharoux, S. Lehoux, Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48 (2010) 433e439
17. Camm EJ, Martin-Gronert MS, Wright NL, et al. Prenatal hypoxia independent of undernutrition promotes molecular markers of insulin resistance in adult offspring. *FASEB J.* 2011; 25, 420–427
18. Cai Z, Xiao F, Lee B, Paul IA, Rhodes PG. Prenatal hypoxia-ischemia alters expression and activity of nitric oxide synthase in the young rat brain and causes learning deficits. *Brain Res Bull.* 1999. 49(5):359-65.
19. Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL et al. (2008). Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* 198: 320–331.
20. Castro M.M, Rizzi E, Rodrigues G.J, et al., Antioxidant treatment reduces Matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension, *FreeRadic. Biol. Med.* 46 (2009) 1298e1307
21. Chen JY, Ye ZX, Wang XF, Chang J, Yang MW, Zhong HH, Hong FF, Yang SL. Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis. *Biomed Pharmacother.* 2017. 97:423-428.
22. Congli Hu, YingLuo, Hong Wang, ShengnanKuang, GuojuanLiang, Yang Yang, Shaoshan Mai, Junqing Yang Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, the Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing, China
23. da Costa CA, de Oliveira PR, de Bem GF, de Cavalho LC, Ognibene DT, da Silva AF, Dos Santos Valença S, Pires KM, da Cunha Sousa PJ, de Moura RS, Resende AC. *Euterpe oleracea* Mart-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *NaunynSchmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012. 385(12):1199–1209
24. Davignon J. The cardioprotective effects of statins. *Curr Atheroscler Rep.* 2004. 6(1):27-35.

25. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aissi D, Wahl S, Meduri E, Morange PE, Gagnon F, Grallert H, Waldenberger M, Peters A, Erdmann J, Hengstenberg C, Cambien F, Goodall AH, Ouwehand WH, Schunkert H, Thompson JR, Spector TD, Gieger C, Tregouet DA, Deloukas P & Samani NJ. (2014). DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet* 383, 1990-1998.
26. Dikalova AE, Gongora MC, Harrison DG, Lambeth JD, Dikalov S, Griendling KK. Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299: H673–679.
27. Dong Y, Wang X, Zhou Y, Zheng Q, Chen Z, Zhang H, Sun Z, Xu G, Hu G. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis imbalance and inflammation contribute to sex differences in separation- and restraint-induced depression. *Horm Behav.* 2020 Mar 16;122:104741
28. Dremencov E, Gur E, Lerer B, Newman ME. Effects of chronic antidepressants and electroconvulsive shock on serotonergic neurotransmission in the rat hypothalamus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2002. 26(6):1029-34.
29. Evora PRB, Pearson PJ, Schaff HV - Impaired endothelium-dependent relaxation after coronary reperfusion injury: evidence for G-protein dysfunction. *Ann Thorac Surg* 1994. 57:1550-6.
30. Femlak M, Gluba-Brzózka A, Ciałkowska-Rysz A, Rysz J. The role and function of HDL in patients with diabetes mellitus and the related cardiovascular risk. *Lipids Health Dis.* 2017. 16(1):207. doi: 10.1186/s12944-017-0594-3.
31. Fink M. Controversies in the diagnosis and treatment of manic-depressive illness. *World J Biol Psychiatry.* 2000. 1(4):219.
32. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 114-121.
33. Folkerth, R., Keefe, R., Haynes, R., Trachtenberg, F., Volpe, J., Hinney, H., 2004. Interferon-g expression in periventricular leukomalacia in the human brain. *Brain Pathol.* 14, 265 – 274.
34. Fountoulakis KN, Vieta E, Siamouli M, Valenti M, Magiria S, Oral T, Fresno D, Giannakopoulos P, Kaprinis GS. Treatment of bipolar disorder: a complex treatment for a multi-faceted disorder. *Ann Gen Psychiatry.* 2007. 6:27.
35. Fumagalli F, Molteni R, Racagni G, Riva MA. Stress during development: Impact on neuroplasticity and relevance to psychopathology. *Prog Neurobiol.* 2007. 81(4):197-217.
36. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980

37. G.J. Rodrigues, C.N. Lunardi, R.G. Lima, et al., Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats, *Nitric Oxide* 18 (2008) 176e183
38. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart CircPhysiol* 2008; 294: H541–H550.
39. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C & Thornburg KL. (2008). Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *New Engl. J. Med.* 359, 61-73.
40. Grote K., Flach, I., Luchtefeld, M., et al., Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species, *Circ. Res.* 92 (2003) e80e86.
41. Hasek BE, Boudreau A, Shin J, Feng D, Hulver M, Van NT, Laque A, Stewart LK, Stone KP, Wanders D, Ghosh S, Pessin JE & Gettys TW. (2013). Remodeling the integration of lipid metabolism between liver and adipose tissue by dietary methionine restriction in rats. *Diabetes* 62, 3362-3372.
42. Haynes, R., Folkerth, R., Keefe, R., Sung, I., Swzeda, L., Rosenberg, P., Volpe, J., Kinney, H., 2003. Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62 (3), 441 – 450.
43. Hemmie H.G. Berendsen & Chris L.E. Broekkamp (1990) Behavioural evidence for functional interactions between 5-HT-receptor subtypes in rats and mice. *Dept. CNS Pharmacology, Organon International B.V., P.O. Box 20, 5340 BH OSS, The Netherlands Br. J. Pharmacol.* (1990), 101, 667-673
44. Huang RC, Mori TA, Beilin LJ. Early life programming of cardiometabolic disease in the Western Australian pregnancy cohort (Raine) study. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012; 39, 973–978
45. Huynh DTN, Heo KS Therapeutic targets for endothelial dysfunction in vascular diseases. *Arch Pharm Res.* 2019 Oct; 42(10):848-861.
46. Ignarro LJ, Balestrieri ML, Napoli C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. *Cardiovasc Res.* 2007. 73(2):326-40.
47. inhibiting ROS-NF- $\kappa$ B pathways. *Int Immunopharmacol.* 2016; 33:119–27.
48. J.A. Moraes, A.C. Frony, A.M. Dias, et al., Alpha1beta1 and integrin-linked kinase interact and modulate angiotensin II effects in vascular smooth muscle cells, *Atherosclerosis* 243 (2015) 477e485.
49. Kaiser, S.; Sachser, N. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2005, 29, 283.

50. Kapoor, A., et al., 2006. Foetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J. Physiol.* 572: 31–44.
51. Kawashima T, Sato F. Clarifying the anatomy of the atrioventricular node artery. *Int J Cardiol.* 2018 Oct 15; 269:158-164. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.07.022. Epub 2018 Jul 5.
52. Khalyfa A, Mutskov V, Carreras A, Khalyfa AA, Hakim F & Gozal D. (2014a). Sleep fragmentation during late gestation induces metabolic perturbations and epigenetic changes in adiponectin gene expression in male adult offspring mice. *Diabetes* 63, 3230-3241.
53. Kitada Y, Miyauchi T, Satoh A, Satoh S. Effects of antidepressants in the rat forced swimming test. *Eur J Pharmacol.* 1981. 72(2-3):145-52.
54. Kleemann R, Verschuren L, Morrison M, et al., Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models, *Atherosclerosis* 218 (2011) 44e52.
55. Kokras N, Polissidis A, Antoniou K, Dalla C. Head shaking in the forced swim test: A robust but unexplored sex difference. *Pharmacol Biochem Behav.* 2017 Jan; 152:90-96. doi: 10.1016/j.pbb.2016.05.007. Epub 2016 May 13.
56. Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K et al., Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases, *Acta Pharmacol. Sin.* 25 (2004) 977e985
57. Lemke MR. Antidepressant effects of dopamine agonists. Experimental and clinical findings. *Nervenarzt.* 2007. 78(1):31-8.
58. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation.* 2005; 111(3):363-8.
59. Levine RI, Garland D, Oliver CN, Amici A. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 1990; 186: 464-478.
60. M.H. Ali, P.T. Mungai, P.T. Schumacker, Stretch-induced phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells: role of mitochondrial oxidants, *Am.J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 291 (2006) L38eL45.
61. Maes M, Meltzer HY, D'Hondt P, Cosyns P, Blockx P. Effects of serotonin precursors on the negative feedback effects of glucocorticoids on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression. *Psycho neuroendocrinology.* 1995. 20(2):149-67.
62. Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 2003. 83(1):183-252.

63. Martinez A, Oh HR, Unsworth EJ, Bregonzio C, Saavedra JM, Stetler-Stevenson WG et al. (2004). Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J* 383: 413–418.
64. Martinez ML, Lopes LF, Coelho EB, Nobre F, Rocha JB, Gerlach RF et al. (2006). Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase 9 activity in patients with hypertension. *J CardiovascPharmacol* 47:117–122.
65. Martinez ML, Castro MM, Rizzi E, Fernandes K, Demacq C, Bendhack LM et al. (2008). Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 Activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 591: 224–230.
66. Martínez-Mota L, López-Rubalcava C, Rodríguez-Manzo G. Ejaculation induces long-lasting behavioural changes in male rats in the forced swimming test: evidence for an increased sensitivity to the antidepressant desipramine. *Brain Res Bull.* 2005. 65(4):323-9.
67. Miao Y, Zhou J, Zhao M, Liu J, Sun L, Yu X, et al. Acetylcholine attenuates hypoxia/ reoxygenation-induced mitochondrial and cytosolic ROS formation in H9c2 cells via M2 acetylcholine receptor. *Cell Physiol Biochem: Int J Exp Cell Physiol, Biochem, Pharmacol.* 2013; 31:189–98.
68. Michel T, Hoffman BB. Em: Goodman e Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Cap. 27. Tratamento da isquemia miocárdica e da hipertensão. Editora McGraw Hill Artmed. 12ª Edição. 2014. pp. 745.
69. Minami T, Aird WC. Endothelial cell gene regulation. *Trends in cardiovascular medicine.* 2005;15(5):174-84.
70. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006. 147 Suppl 1: S193-201.
71. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006. 147 Suppl 1: S193-201.
72. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006. 147 Suppl 1: S193-201.
73. Moncada S. and Higgs A. (1993) The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J. Med* 329, 2002 2011.
74. Morley-Fletcher, S.; Rea, M.; Maccari, S.; Laviola, G. Eur. J. Neurosci., N. Escobales, M.J. Crespo, Oxidative-nitrosative stress in hypertension, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 3 (2005) 231e246

75. Nagano R, Nagano M, Nakai A, Takeshita T, Suzuki H. Neuroscience. Differential effects of neonatal SSRI treatments on hypoxia-induced behavioral changes in male and female offspring. 2017. 360:95-105.
76. Nemeroff CB, Krishnan KR, Reed D, Leder R, Beam C, Dunnick NR. Adrenal gland enlargement in major depression. A computed tomographic study. *ArchGenPsychiatry*. 1992. 49(5):384-7.
77. Neuman NA, Ma S, Schnitzler GR, Zhu Y, Lagna G, Hata A. The four-and-a-half LIM domain protein 2 regulates vascular smooth muscle phenotype and vascular tone. *J BiolChem*. 2009; 284:13202–12.
78. Newby, A.C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates, *Cardiovasc. Res.* 69 (2006) 614e624.
79. Noris M, Perico N, Remuzzi G. Mechanisms of disease: Preeclampsia. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2005. 1(2):98–114.
80. O'Donnell, K.J., et al., 2012. Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11 beta-HSD2. *Psychoneuroendocrinology* 37 (6): 818–826.
81. Ormonde do Carmo MBO, Mendes-Ribeiro AC, Matsuura C, Pinto VL, Mury WV, Pinto NO, Moss MB, Ferraz MR, Brunini TMC. Major depression induces oxidative stress and platelet hyperaggregability. *J Psychiatr Res*. 2014. 61:19-24.
82. Pan P, Wang X, Liu D. The potential mechanism of mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy. *J IntMed Res*. 2018;46: 2157–69.
83. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000;102(18):2165-8.
84. Peeters-Scholte C, Koster J, Veldhuis W, van der Tweel E, Zhu C, Kops N, et al. Neuro protection by selective nitric oxide synthase inhibition at 24 hours after perinatal hypoxia–ischemia. *Stroke* 2002; 33:2304–10
85. Pinto, VLM; Brunini, TMC; Ferraz, MR; Okinga, A and Mendes-Ribeiro, AC. Depression and Cardiovascular Disease: Role of Nitric Oxide. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008. 6(2):142-9.
86. Pinto VL, de Souza PF, Brunini TM, Oliveira MB, Moss MB, Siqueira MA, Ferraz MR, Mendes-Ribeiro AC. Low plasma levels of L-arginine, impaired intraplatelet nitric oxide and platelet hyperaggregability: implications for cardiovascular disease in depressive patients. *J Affect Disord*. 2012 Oct;140(2):187-92. doi: 10.1016/j.jad.2012.02.008. Epub 2012 Mar 14.
87. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977. 266(5604):730-2.



88. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 1978. 47(4):379-91.
89. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet.* 1987;2(8567):1057- 8.
90. Reddy NR, Krishnamurthy S, Chourasia TK, Kumar A, Joy KP. Glutamate antagonism fails to reverse mitochondrial dysfunction in late phase of experimental neonatal asphyxia in rats. *Neurochem Int* 2011; 58:582–90.
91. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005. 308:1592–94
92. Reser JE. Chronic stress, cortical plasticity and neuroecology. *Behav Processes.* 2016. 129:105-15.
93. Reul JM, Holsboer F. On the role of corticotropin-releasing hormone receptors in anxiety and depression. *Dialogues Clin Neurosci.* 2002. 4(1):31-46.
94. Rhee, RW, Lephart ED, Eliason, D. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behavioural Brain Research.* 2001. 123:1–10.
95. Richardson JS. Animal models of depression reflect changing views on the essence and etiology of depressive disorders in humans. *Prog Neuro psychopharmacol Biol Psychiatry.* 1991. 15(2):199-204.
96. Risbano MG, Gladwin MT. Therapeutics targeting of dysregulated redox equilibrium and endothelial dysfunction. *Handb Exp Pharmacol.* 2013; 218:315-49.
97. Rizzi E, Castro MM, Fernandes K, Barbosa F Jr, Arisi GM, Garcia-Cairasco N et al. (2009). Evidence of early involvement of matrix metalloproteinase-2 in lead-induced hypertension. *Arch Toxicol* 83:439–449
98. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, et al. Blood pressure in adults after prenatal exposure to famine. *J Hypertens.* 1999; 17, 325–330.
99. Rosenblum WI. Platelet adhesion and aggregation without endothelial denudation or exposure of basal lamina and/or collagen. *JVasc Res.* 1997. 34(6):409-17.
100. Rozanski, A., Blumenthal, J.A., Kaplan, J., 1999. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 99, 2192–2217.

101. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(4):731-6.
102. Sab I.M, Ferraz M.M.D, Amaral T.A.S, Resende A.C, Ferraz M.R, Matsuura C, Brunini T.M.C, Mendes-Ribeiro A.C. Prenatal hypoxia, habituation on memory and oxidative stress Laboratory of Membrane Transport, Department of Pharmacology and Psychobiology, State University of Rio de Janeiro, Brazil Laboratory of Cardiovascular Pharmacology and Medicinal Plants.
103. Sapolsky RM. Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem. Res*. 2003. 11:1735–1742.
104. Schulz R (2007). Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in Cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 211–242.
105. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359(6398):843-5
106. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997; 82:291–5.
107. Stahl, Stephen M. Em: Psicofarmacologia - Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas. Cap. 6, Transtornos de humor. Editora Guanabara Koogan, 4ª Ed. 2014. pp. 253-255
108. Tang J, Li N, Chen X, Gao Q, Zhou X, Zhang Y, et al. Prenatal hypoxia induced dysfunction in cerebral arteries of offspring rats. *J Am Heart Assoc*. 2017;6: e006630.
109. Thompson WR. Influence of prenatal maternal anxiety on emotionality in young rats. *Science*. 1957. 125(3250):698-9.
110. Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet*. 1998.19(2):162-6.
111. Touyz R.M, Briones A.M, Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension, *Hypertens. Res*. 34 (2011) 5e14.
112. Touyz RM, Herrmann J. Cardiotoxicity with vascular endothelial growth factor inhibitor therapy *NPJ Precis Oncol*. 2018 May 8;2:13.
113. Trindeer, P., *Ann. Clin. Biochem.*, 6-24, 1969
114. Troiano JA, Potje SR, Graton ME, Cavalari P, Pereira AA, Vale GT, et al. Decreased reactive oxygen species production and NOX1, NOX2, NOX4

- expressions contribute to hyporeactivity to phenylephrine in aortas of pregnant SHR. *Life Sci.* 2016;144: 178–84
115. Uno H, Lohmiller L, Thieme C, Kemnitz JW, Engle MJ, Roecker EB, Farrell PM. Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.* 1990. 53(2):157-67
116. Valença SS, Pimenta WA, Rueff-Barroso CR, Ferreira TS, Resende AC, Moura RS, et al. Involvement of nitric oxide in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Nitric Oxide* 2009; 20:175–81.
117. Vallée M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci.* 1997. 17(7):2626-36.
118. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia–ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 2004;207: 3149–54. Volume 81, 2018, Pages 241-330
119. Wang X, Wu Q, Liu A, Anadón A, Rodríguez JL, Martínez- Larrañaga MR, et al. Paracetamol: overdose-induced oxidative stress toxicity, metabolism, and protective effects of various compounds in vivo and in vitro. *Drug Metab Rev.* 2017;49: 395–437.
120. Weis SN, Pettenuzzo LF, Krolow R, Valentim LM, Mota CS, Dalmaz C, et al. Neonatal hypoxia–ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion* 2012; 12:271–9
121. Weitzdoerfer R, Pollak A, Lubec B. Perinatal asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions, and behavior. *Semin Perinatol.* 2004. 28(4):249-56.
122. Westfall, TC e Westfall, EP. Em: Goodman e Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. 12a. Edição. Ed. McGraw Hill, Artmed. 2012. Cap. 12. P. 277.
123. Wolak M, Siwek A, Szewczyk B, Poleszak E, Bystrowska B, Moniczewski A, Rutkowska A, Myniec K, Nowak G. Evaluation of the role of NMDA receptor function in antidepressant-like activity. A new study with citalopram and fluoxetine in the forced swim test in mice. *Pharmacol Rep.* 2015. 67:490–493.
124. Xu C, Tang F, Lu M, Yang J, Han R, Mei M, et al. Astragaloside IV improves the isoproterenol-induced vascular dysfunction via attenuating eNOS uncoupling-mediated oxidative stress and inhibiting ROS-NF-κB pathways. *Int Immunopharmacol.* 2016; 33:119–27.
125. YAP, CY. & TAYLOR, D.A. (1983). Involvement of 5HT<sub>2</sub> receptors in the wet dog shake behaviour induced by 5-hydroxy-tryptophan in the rat. *Neuropharmacol.*, 22, 801-804.

126. Yoshitake T, Iizuka R, Fujino K, Inoue O, Yamagata K, Nohta H, Yamaguchi M. Simultaneous determination of serotonin and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in human urine by automated precolumn derivatization and semi-microbore column liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Sci.* 2004 (12):1687
127. Zhang J. and Snyder S. H. (1995) Nitric oxide in the nervous system. *Ilh. Rec. PllN. To.uicol.* 35, 213-233.