



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

Paulo Cesar da Costa Araujo

Efeitos da privação de sono paradoxal na expressão de receptores para corticosteróides no hipocampo, de moléculas envolvidas na modulação do sono e no aprendizado e memória de ratos submetidos a modelo de hipóxia isquemia pré-natal

Rio de Janeiro

2016

Paulo Cesar da Costa Araujo

Efeitos da privação de sono paradoxal na expressão de receptores para corticosteróides no hipocampo, de moléculas envolvidas na modulação do sono e no aprendizado e memória de ratos submetidos a modelo de hipóxia isquemia pré-natal

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Olga Maria Martins Silva de Almeida

Rio de Janeiro

2016

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

A663 Araujo, Paulo Cesar da Costa.
Efeitos da privação de sono paradoxal na expressão de receptores para corticosteroides no hipocampo, de moléculas envolvidas na modulação do sono e no aprendizado e memória de ratos submetidos a modelo de hipóxia isquemia pré-natal / Paulo Cesar da Costa Araújo. – 2016.
80 f.

Orientadora: Olga Maria Martins da Silva de Almeida.

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

1. Privação de sono - Complicações. 2. Corticosteroides. 3. Hipóxia fetal - Teses. 4. Hipocampo (Cérebro) - Teses. 5. Distúrbios cognitivos. I. Almeida, Olga Maria Martins da Silva de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.8-009.836

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Paulo Cesar da Costa Araujo

Efeitos da privação de sono paradoxal na expressão de receptores para corticosteróides no hipocampo, de moléculas envolvidas na modulação do sono e no aprendizado e memória de ratos submetidos a modelo de hipóxia isquemia pré-natal

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 23 de agosto de 2016.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Olga Maria Martins Silva de Almeida (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Frank Tenório de Almeida Costa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

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

Prof.^a Dra. Mônica Santos Rocha
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe e minha irmã por terem me ensinado e me transformarem na pessoa que sou hoje.

Ao Beto e a Fátima por terem me ajudado e apoiado sempre.

A Prof^a, Olga por ser sempre atenciosa e por ser sempre compreensiva.

Ao Prof. Frank, a Prof^a. Penha e ao Prof. Marcos por estarem sempre atentos as dúvidas, por ouvirem minhas besteiras e por darem puxões de orelha quando necessário.

A Skinner, minha gordinha favorita, por ser uma grande amiga, atender meus telefonemas às 9 da manhã aos domingos e por estar sempre disposta a me ajudar.

A Bela por ser sempre tão prestativa, carinhosa e bem humorada.

A Bruninha pelo carinho, por estar sempre presente e pelos conselhos.

Ao LO pela diversão e cantoria de todos os dias no laboratório.

A Martinha pelo carinho, pelas conversas, conselhos, ajudas e desabafos.

Aos outros amigos do Lab (Guedes, Michael, Gabizinha, Aline e todos os outros) pela diversão e bagunça.

A meus amigos Podão, Latino e Leo pelo bar de quase toda sexta-feira e pela companhia.

RESUMO

ARAÚJO, Paulo Cesar da Costa. *Efeitos da privação de sono paradoxal na expressão de receptores para corticosteroides no hipocampo, de moléculas envolvidas na modulação do sono e no aprendizado e memória de ratos submetidos a modelo de hipóxia isquemia pré-natal*. 2016. 80 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A diminuição no nível de oxigênio durante a gestação, a hipóxia isquemia (HI) pré-natal, pode gerar diversos prejuízos na juventude e também na vida adulta como a hiperatividade, dificuldade de concentração, dificuldade de aprendizado, déficit de memória, distúrbios de sono, dor e em casos mais graves a epilepsia e a paralisia cerebral. Receptores de Glicocorticóide (RGc) e Mineralocorticóide (RMn) são co-expressos em grande quantidade em neurônios hipocampais e o equilíbrio nas ações de ambos é fundamental para a atividade destes neurônios. A hipóxia aumenta os níveis de RGc que estão relacionados à morte celular e diminui os níveis de RMn que estão relacionados à sobrevivência celular. No modelo de hipóxia hipobárica foram observados danos em neurônios do hipocampo nas regiões CA1 e CA3 assim como aumento no estresse oxidativo e nas respostas antioxidantes no cerebelo e ponte. Além disso, a hipóxia hipobárica modifica a arquitetura do sono e altera os níveis de biomoléculas envolvidas na regulação do sono-vigília. A privação ou restrição de sono paradoxal (PSP) durante a hipóxia hipobárica induz aumento na resposta antioxidativa. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos morfo-funcionais da PSP, na vida adulta, em um modelo de HI sistêmica pré-natal. Avaliamos os níveis da enzima GAD; a distribuição de receptores de corticoesteróides; o aprendizado e memória e, a interação entre PSP e HI. Ratas no 18º dia de gestação, tiveram as quatro artérias uterinas obstruídas por 45 minutos (HI). Animais controle tiveram os úteros expostos sem sofrer a obstrução (SH). A gestação prosseguiu e apenas filhotes nascidos a termo foram utilizados. Aos 90 dias, os grupos foram subdivididos e metade deles submetido a PSP através da técnica do tanque de água com plataformas múltiplas. A GAD foi avaliada pela técnica de western blotting. Foi utilizado o teste da esQUIVA passiva para avaliação do aprendizado e memória. Após o teste, os animais foram eutanasiados, e os encéfalos imunoreagidos para anticorpos anti-RGc e anti-RMn. Nossos resultados demonstraram um aumento no nível da enzima GAD na região do lócus coeruleus (LC) e no hipocampo no grupo HI quando comparado ao grupo SH. Após a PSP o nível da enzima GAD, nos animais do grupo HI, apresentou redução significativa quando comparada ao grupo HI controle somente no LC. Na avaliação dos receptores de corticosteróides, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos HI e SH. Após a PSP, o grupo HI apresentou um aumento da intensidade de marcação para o RGc na região do giro dentado do hipocampo. Não foram encontradas diferenças significativas no aprendizado e memória, entre os grupos SH e HI, mesmo após a PSP. Podemos concluir que houve alteração em enzima que sintetiza um dos neurotransmissores envolvido na modulação do sono, Havendo uma possível reversão das alterações após a PSP. No balanço dos RGc/RMn, a HI não foi capaz de alterar o balanço entre os receptores de corticosterona na região do hipocampo, havendo alteração somente nos receptores de GD após a PSP. Apesar das alterações neuroquímicas no hipocampo, não foram encontradas alterações no aprendizado e memória.

Palavra-chave: Hipóxia. GAD. Hipocampo. Sono. Corticosteroides.

ABSTRACT

ARAÚJO, Paulo Cesar da Costa *Effects of paradoxical sleep deprivation on hippocampal corticosteroid receptors, on molecules involved in sleep modulation and on learning and memory of rats submitted to prenatal hypoxia-ischemia*. 2016. 80 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The decrease of oxygen during gestation, prenatal hypoxia-ischemia (HI), can generate damages in youth and adult life such as hyperactivity, impaired concentration and learning, memory deficit, sleep disturbances, pain and in more severe cases epilepsy and cerebral palsy. Glucocorticoid receptors (GcR) and mineralocorticoid receptors (MnR) are largely co-expressed in hippocampal neurons and the balance of their actions is essential for the activity of these neurons. Hypoxia is known to increase GcR which is related to cell death and to decrease MnR level, related to cell survival. Hypobaric hypoxia models have already shown damages in hippocampal neurons in CA1 and CA3 regions as well as increased oxidative stress and antioxidant responses in the cerebellum and brainstem. Furthermore the hypobaric hypoxia changes the architecture of sleep and alters the levels of biomolecules involved in the regulation of sleep and wakefulness. Paradoxical sleep deprivation (PSD) during hypobaric hypoxia induces an increase in antioxidative response. The objective of this study was to evaluate the morphological and functional effects of PSD in adulthood in a prenatal systemic HI model. We evaluated the levels of GAD enzyme; the distribution of corticosteroid receptors; learning and memory and the interaction between PSD and HI. Rats on the 18th day of gestation had the four uterine arteries blocked for 45 minutes (HI). Control animals had wombs exposed without the obstruction (SH). The pregnancy continued and only pups born at term were used. At 90 postnatal days, the groups were divided and half of them submitted to PSD through the multiple platforms water tank. GAD was analysed by western blotting technique. The test of passive avoidance for evaluation of learning and memory was used. After the test the animals were euthanized and their brains histologically reacted with anti-GcR and anti-MnR antibodies. Our results showed an increase in the level of the GAD enzyme in the locus coeruleus (LC) and in the hippocampus in the HI group compared to the SH group. After PSD, the levels of GAD enzyme in HI group showed a significant reduction when compared to the HI control group only in the LC. In the evaluation of corticosteroid receptors, there were no significant differences between HI and SH groups. After PSD the HI group showed an increase in GcR staining intensity in the hippocampal dentate gyrus (DG). There were no significant differences in learning and memory between SH and HI groups, even after PSD. We can conclude that there was a change in the enzyme that synthesizes one of the neurotransmitters involved in the modulation of sleep with a possible reversal of the changes after PSD. Concerning GcR/MnR, HI was not able to alter the balance between corticosteroid receptors in the hippocampal region, with the only change been observed in DG receptors after PSD. Despite the neurochemical changes in the hippocampus, there were no changes in learning and memory.

Keywords: Paradoxical sleep. Sleep deprivation. Glucocorticoid receptor. Hippocampus. Memory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Impactos do estresse materno no desenvolvimento de órgãos fetais.....	12
Figura 2 –	Linha de tempo mostrando os períodos do desenvolvimento neural, em ratos e humanos e os eventos que ocorrem nos períodos pré e pós-natal.....	16
Tabela 1 –	Estratégias e intervenções terapêuticas para tratamento da HI pré-natal.....	18
Figura 3 –	Registros elétricos do sono NREM e sono paradoxal.....	20
Figura 4 –	Arquitetura do sono de humanos jovens.....	22
Figura 5 –	Minutos de uma noite de sono gastos em cada estágio ao longo da vida.....	23
Figura 6 –	Representação do mecanismo neural envolvido no início e manutenção do sono REM.....	24
Figura 7 –	Representação esquemática longitudinal da topografia do hipocampo mostrando ligações intrahipocampais.....	29
Tabela 2 –	Principais testes usados para avaliar funções cognitivas.....	30
Figura 8 –	Modelo de Hipóxia-isquemia.....	37
Figura 9 –	Desenho experimental.....	37
Figura 10 –	Tanque de privação de sono Paradoxal.....	39
Figura 11 –	Fotomicrografia representativa de secções hipocampais das regiões CA1/3 e GR reagidas com anticorpos anti-RGc e anti-RMn.....	42
Figura 12 –	Aparelho de esquiva passiva.....	43
Figura 13 –	Representação da densidade óptica da enzima GAD ₆₇ na região do LC.....	45
Figura 14 –	Representação da densidade da enzima GAD ₆₇ na região do hipocampo.....	46
Figura 15 –	Imunoreatividade dos RGc na CA1.....	47
Figura 16 –	Quantificação da imunomarcção dos RGc na camada Alveus da CA1 do hipocampo.....	48
Figura 17 –	Quantificação da imunomarcção dos RGc na Camada Alveus da CA 1 no hipocampo.....	48

Figura 18 –	Imunorreatividade do RGc na CA3.....	49
Figura 19 –	Quantificação da imunomarcção dos RGc na região CA3 do hipocampo.....	50
Figura 20 –	Imunorreatividade do RGc na GD.....	51
Figura 21 –	Quantificação da imunomarcção dos RGc na região GD do hipocampo.....	52
Figura 22 –	Imunorreatividade do RMn na CA1.....	54
Figura 23 –	Quantificação da imunomarcção dos RMn na região CA1 do hipocampo.....	54
Figura 24 –	Quantificação da imunomarcção dos RMn na região CA1 do hipocampo.....	54
Figura 25 –	Imunorreatividade do RMn na CA3.....	55
Figura 26 –	Quantificação da imunomarcção dos RMn na região CA3 do hipocampo.....	56
Figura 27 –	Imunorreatividade do RMn na GD.....	57
Figura 28 –	Quantificação da imunomarcção dos RMn na região GD do hipocampo.....	58
Figura 29 –	Latência de entrada na câmara escura.....	59
Figura 30 -	Latência de entrada na câmara escura.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF	fator básico de crescimento de fibroblasto
CA	Corno de Ammon
CHAT	colina acetiltransferase
E18	décimo oitavo dia de gestação
E22	vigésimo segundo dia de gestação
EEG	eletroencefalograma
EHI	Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica
EMG	eletromiograma
EOG	eletro-oculograma
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA-T	GABA transaminase
GAD	<i>L-glutamic acid descarboxylase</i>
GAT	transportadora de GABA
GD	Giro denteado
HI	Hipóxia-isquemia
HIC	grupo hipóxia-isquemia controle
HIC 0	grupo HI controle
HIC 72h	Grupo HI controle após 72 horas
HIP 0	grupo HI antes da PSP
HIP72h	Grupo HI PSP por 72 horas
HIP	grupo hipóxia-isquemia privado
HPA	Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal
LC	<i>Locus coeruleous</i>
LTD	depressão de longo prazo
LTP	potenciação de longa duração
NREM	sono não REM
P9	9 dias pós nascimento
PSP	Privação de sono paradoxal
RGc	Receptores de Glicocorticóides
REM	rapid eye movement
RMn	Receptores de Mineralocorticóides

SHC	grupo SHAM controle
SHC 0	Grupo Sham controle
SHC72h	Grupo Sham controle após 72 horas
SHP72h	Grupo Sham PSP por 72 horas
SHP 0	Grupo Sham antes da PSP
SHP	grupo SHAM privado
SWS	slow wave sleep
TH	tirosina hidroxilase
VGAT	transportador vesicular de GABA

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	OBJETIVOS	35
1.1	Objetivo geral	35
1.2	Objetivos específicos	35
2	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1	Animais	36
2.2	Procedimento cirúrgico para indução de Hipóxia-isquemia	36
2.3	Privação de sono Paradoxal (PSP)	36
2.4	Avaliação dos níveis da enzima GAD	38
2.5	Imunohistoquímica para RGc e RMn	39
2.5.1	<u>Quantificação de imunomarcção de receptores de corticosteroides</u>	40
2.6	Avaliação do aprendizado e memória - teste da esquiua passiva	40
2.7	Análise estatística	42
2.7.1	<u>Teste comportamental</u>	44
2.7.2	<u>Densidade de imunomarcção</u>	44
2.7.3	<u>Níveis de GAD</u>	44
3	RESULTADOS	45
3.1	Níveis da enzima GAD	45
3.2	Densidade de imunomarcção de RGc e RMn	46
3.3	Receptores de Mineralocorticoide	52
3.4	Avaliação de aprendizado e memória Esquiua passiva	58
3.4.1	<u>Protocolo I</u>	59
3.4.2	<u>Protocolo II</u>	61
4	DISCUSSÃO	66
	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	67

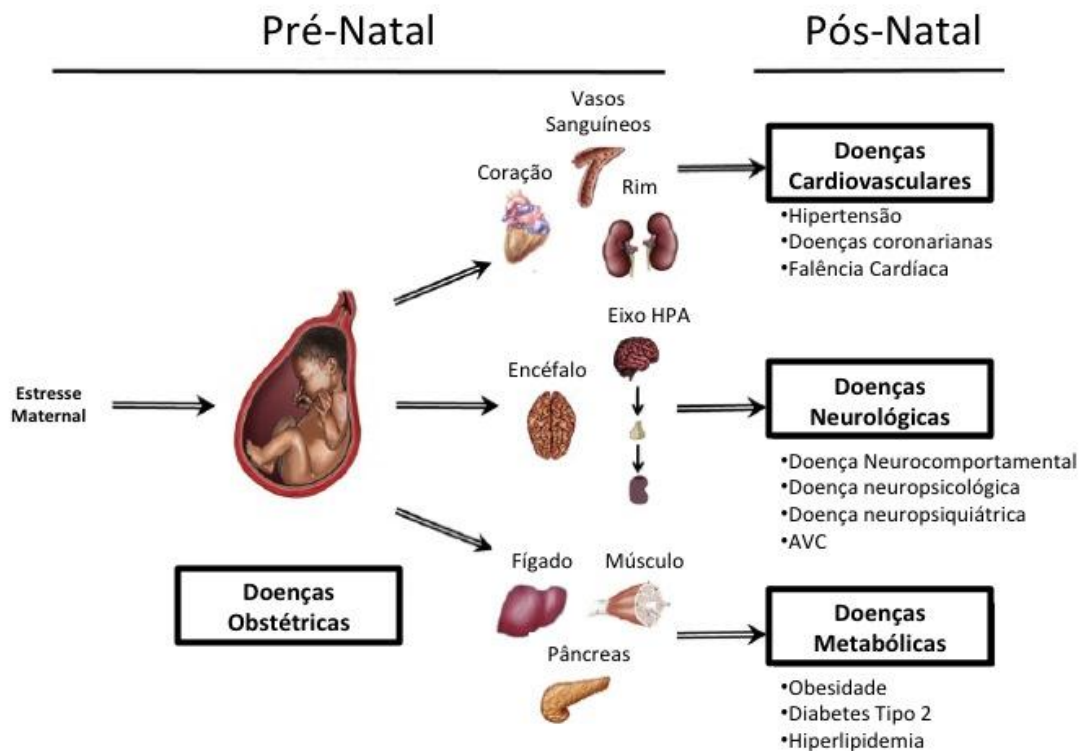
INTRODUÇÃO

O crescimento e desenvolvimento fetal são processos complexos e dinâmicos que dependem de uma perfeita interação entre a mãe, a placenta e o feto. Essa interação garante o crescimento ideal e a sobrevivência do feto (Warner e Ozanne, 2010). Vários estudos já demonstraram que alterações no ambiente intra-uterino podem gerar danos que comprometem de forma sutil ou severamente a vida adulta (Cottrell e Seckl, 2009; Dudley et al., 2011). Essas alterações podem levar a complicações fetais e estão associadas a um aumento no risco de desenvolvimento de hipertensão, doenças cardíacas, diabetes tipo 2, obesidade, hiperlipidemia e alguns distúrbios neuropsiquiátricos (Barker et al., 1993, 2009; Dudley et al., 2011; Gluckman e Hanson, 2004; Gluckman et al., 2008; Harris e Seckl, 2011), (figura 1).

O encéfalo é um dos alvos mais afetados pelo estresse e também o órgão central responsável pela resposta ao estresse. Ele determina uma resposta adaptativa e/ou inadequada a diversos tipos de estresse que pode ser crônico ou agudo, fazendo com que haja uma alteração em estruturas e funções cerebrais (McEwen, 2008).

O encéfalo na fase de desenvolvimento do feto é altamente plástico e especialmente sensível a inúmeros fatores ambientais. Considerando-se os traços genéticos específicos, as alterações do encéfalo fetal contribuem para uma elevada incidência de desordens do neurodesenvolvimento na vida pós-natal. Já foi demonstrado que estresses durante o desenvolvimento fetal, tais como a hipóxia, a malnutrição, a exposição a determinadas substâncias (nicotina, álcool e cocaína) e glicocorticoides em excesso (endógenos ou exógenos) têm grande impacto sobre a ontogenia, organização, estrutura e funções e sobre a trajetória de desenvolvimento e de remodelação do encéfalo, bem como na reprogramação ou resiliência de alguns distúrbios na vida adulta (Chen e Zhang, 2011; Chiriboga, 1998; Harris e Seckl, 2011; Seckl e Meaney, 2004; Zhang et al., 2005).

Figura 1 - Impactos do estresse materno no desenvolvimento de órgãos fetais



Legenda: Impactos do estresse materno sobre os diferentes órgãos do feto.
 Fonte: Adaptado de Li et al., 2012

Hipóxia-isquemia pré-natal

A hipóxia é uma forma comum de estresse intrauterino, e o feto pode experimentar um período de estresse hipóxico sob uma variedade de condições, incluindo a gravidez em alta altitude, a gravidez com anemia, insuficiência placentária, compressão da medula, pré-eclampsia, doença de coração, pulmão e rim ou com hemoglobinopatias (Volpe, 2001). A hipóxia-isquemia (HI) pré-natal é definida como a diminuição do fluxo sanguíneo, com consequente redução nos níveis de oxigênio para o feto durante o desenvolvimento. A HI contribui para alteração no desenvolvimento dos tecidos e/ou órgãos, principalmente do encéfalo. O encéfalo representa apenas 2% do peso corporal, mas consome 20% das necessidades de oxigênio do corpo. O encéfalo fetal imaturo é particularmente sensível a

mudanças no nível de oxigênio (Hallak et al. 2000), que podem causar deficiências no desenvolvimento do sistema nervoso e *déficits* neurológicos que podem permanecer até a idade adulta. A encefalopatia hipóxico-isquêmica perinatal (EHI) afeta de 1 a 3 em cada mil nascidos a termo (Lai e Yang, 2011). Destas crianças, 15 a 20% morrem no período pós-natal, caracterizando a EHI como uma das mais expressivas causas de mortalidade neonatal. Das que sobrevivem, 25% apresentam alterações neurofisiológicas permanentes (Chen et al., 2009; Vannucci, 2000).

Atualmente várias pesquisas concentram-se em descobrir terapias para os danos provocados pela HI. Alguns danos provenientes da HI, tais como, *déficits* cognitivos persistem até a idade adulta também em modelos animais. Estudos já demonstraram que humanos com paralisia cerebral apresentam danos relacionados a memória (Romeo et al., 2014), danos emocionais (Weber et al., 2016) e relacionados ao sono (ver revisão: Lélis et al., 2016).

A HI acarreta um atraso na maturação do encéfalo. Por um lado, isso pode ser entendido como um processo adaptativo que provavelmente contribui para a recuperação da lesão. Por outro lado, um atraso de maturação pode também ser prejudicial para os processos de desenvolvimento que ocorrem durante um período crítico específico ou em eventos sequenciais sensíveis ao tempo, que são críticos para as fases subsequentes do desenvolvimento. Certamente, a persistência de *déficits* comportamentais sugere que anormalidades encefálicas relacionadas a esses comportamentos devem existir. Essas anormalidades podem existir em um ou vários níveis de estrutura/função (Ma et al., 2014).

Animais que sofreram HI pré-natal apresentam alterações comportamentais que podem afeta-los de formas diferentes, pois diferentes regiões são afetadas. Northington e colaboradores (2001) demonstraram que o córtex do encefalo, o hipocampo e a zona sub-ventricular são as regiões mais vulneráveis e afetadas durante a HI. Foi demonstrado que no hipocampo de ratos que passaram por HI há um aumento da expressão e atividade da fosfolipase A2, que está envolvida no processo inflamatório e que desempenha um papel na degeneração celular (Arai et al., 2001). Yang e colaboradores (2011) demonstraram que ratos que sofreram HI pré-natal tem aumento de neurônios caspase-positivos nos primeiros dias de vida, indicando um aumento na morte neuronal.

Como a HI é um evento sistêmico, não só o sistema nervoso é afetado, mas também outros órgãos vitais para a sobrevivência. Estudos em ratos demonstraram que HI durante a gestação causa alteração de estrutura do coração e isso aumenta a suscetibilidade à isquemia

(Tong et al., 2011; Tong and Zhang, 2011; Li et al., 2003; Patterson et al., 2010; Rueda-Clausen et al., 2009).

Modelos de Hipóxia-Isquemia perinatal

Técnicas de imagem, como ressonância magnética, ajudam a definir lesões encefálicas, entretanto modelos animais oferecem uma abordagem essencial para elucidar os mecanismos celulares envolvidos nos eventos de HI e que causam a vulnerabilidade do encéfalo em desenvolvimento. Os modelos de HI nos permitem determinar os efeitos de um insulto específico, em um determinado estágio específico de desenvolvimento, na estrutura e função do encéfalo.

Levine foi um dos pioneiros no estudo de HI em ratos adultos e em 1960 criou o primeiro modelo que consistia no clampeamento unilateral da artéria carótida. Esse clampeamento era realizado e podia ser momentâneo ou permanente. Já em 1981, Rice e colaboradores fizeram modificações no modelo, onde o clampeamento era realizado em animais com 7 dias de idade, que é considerado equivalente ao recém-nato humano. Neste modelo sugerido por Rice, os danos são observados no hemisfério ipsolateral e o hemisfério contralateral é usado como controle. O modelo de clampeamento unilateral de artéria carótida é um dos modelos mais utilizados para mimetizar hipóxia e como resultados foram encontradas alterações na plasticidade cerebral durante o desenvolvimento (com lesões nas regiões: córtex cerebral, substância branca periventricular, estriado e hipocampo) (Silverstein e Johnston, 1984; Romijin et al., 1992), na neurotoxicidade glutamatérgica, pois há um aumento no influxo de glutamato na região do hipocampo (Silverstein et al., 1991; Gordon et al., 1991), na neurotoxicidade do óxido nítrico, apresentando um aumento nos níveis das enzimas produtoras nas regiões do córtex do encéfalo e hipocampo (Ferriero et al., 1988; Ferriero et al., 1995) e em sistemas de neurotransmissores durante o evento de HI, como aumento na expressão da enzima tirosina hidroxilase (Burke et al., 1991). Apesar dos inúmeros resultados obtidos, este modelo pode sofrer a crítica de não mimetizar o efeito sistêmico de HI, como observado em humanos.

Uma das adaptações feitas neste modelo para mimetizar melhor o que ocorre em humanos foi, além do clampeamento da artéria, os animais serem colocados em uma câmara hipobárica e assim as células serem expostas a baixos níveis de oxigênio. Isso resultou em

danos no hipocampo, tálamo, áreas corticais e núcleos da base devido ao aumento da morte por apoptose nessas regiões (Nakajima et al., 2000).

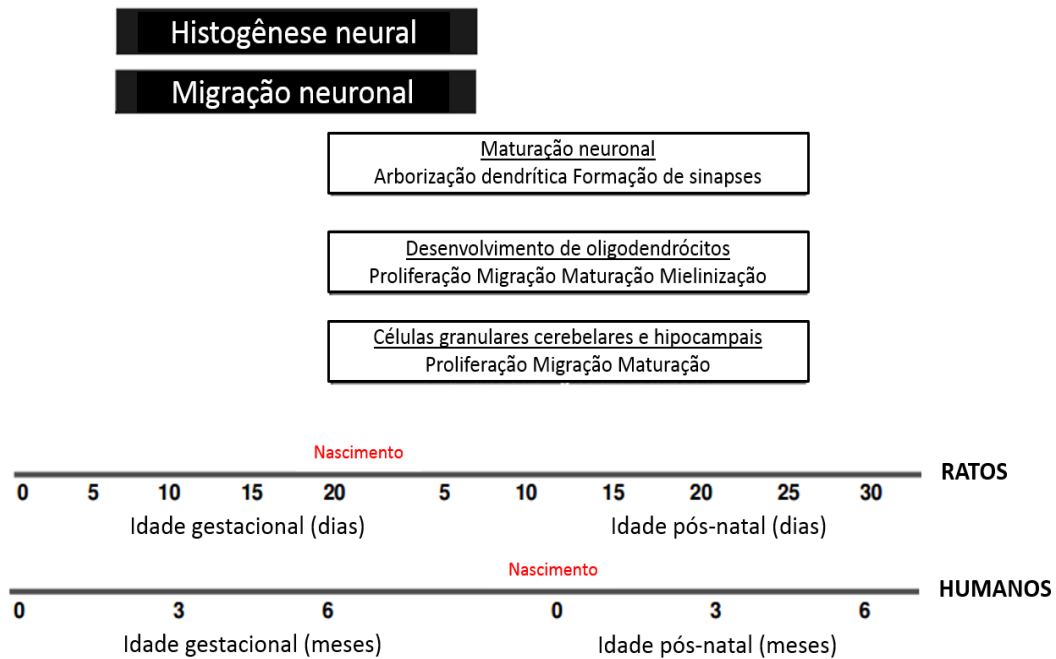
Bjelke e colaboradores, em 1991, desenvolveram um outro modelo onde os cornos uterinos da fêmea são expostos e imersos em água a 37° C por 15 a 21 minutos, no vigésimo segundo dia de gestação (E22). Depois da asfixia, os filhotes são retirados do útero e ressuscitados, sendo o filhote controle retirado por cesariana antes do procedimento de asfixia. Através deste modelo, foi verificado um aumento no número de corpos celulares imunorreativos para a enzima (TH) na zona compacta da substância negra. O aumento do número de neurônios dopaminérgicos marcados foi associado a aumento da expressão do gene do fator básico de crescimento de fibroblasto (bFGF) tanto na substância negra quanto na área tegmental ventral e esse aumento permanece até 4 semanas após o nascimento (Andersson et al., 1995).

Em 2005, Robinson e colaboradores desenvolveram mais um modelo de HI, em que é feita a obstrução das quatro artérias uterinas da rata por 15, 30 e 45 minutos no décimo oitavo dia de gestação (E18), havendo assim uma redução no fluxo sanguíneo para os fetos. Com este modelo observou-se astrogliose na substância branca, morte de oligodendrócitos, e lesão axonal tanto na substância branca como no córtex cerebral, principalmente nos animais com 9 dias pós nascimento (P9) e submetidos à HI pré-natal por 45 minutos (Robinson et al., 2005). Morfologicamente, 87% dos ratos adultos jovens que foram submetidos a este modelo de isquemia têm lesão na substância branca detectável em secções coronais. Mas, dentre estes animais, nem todos possuem a mesma severidade de lesão: 27% possuem lesões leves, 33% moderadas e 27% lesões críticas severas. Algumas hipóteses para as lesões celulares ocorridas após HI são a vulnerabilidade das linhagens celulares de oligodendrócitos em desenvolvimento (Kinney e Back, 1998), o aumento do nível de radicais livres (Volpe, 2001), o aumento anormal da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Baud et al, 1999; Dammann e Leviton, 1997; Nelson et al, 2003) e da toxicidade excitatória glutamatérgica (Kavanaugh et al., 2000, Itoh et al., 2002; Tekkok e Golberg, 2001).

O modelo desenvolvido por Robinson e colaboradores (2005) pode ser o que mimetiza melhor eventos ocorridos em humanos, pois há uma interação mãe/feto com intercorrência materna, inflamação e reperusão do fluxo sanguíneo após a isquemia. A idade gestacional em que é feito o clampeamento nesse modelo corresponde, grosso modo, ao início do terceiro trimestre de gestação em humanos, que é um período crítico, em que muitas complicações podem levar a uma redução de oxigênio e nutrientes para o feto levando a um quadro de prematuridade e HI. Nesse período também acontecem eventos importantes no

desenvolvimento do sistema nervoso como a maturação neuronal, proliferação de células hipocâmpais e cerebelares, conforme resumido na figura 2.

Figura 2 - Linha de tempo mostrando os períodos do desenvolvimento neural, em ratos e humanos e os eventos que ocorrem nos períodos pré e pós-natal



Legenda: Linha de tempo mostrando os períodos do desenvolvimento neural, em ratos e humanos e os eventos que ocorrem nos períodos pré e pós-natal.

Fonte: Adaptado de Andersson *et al.*, 2003

Intervenções terapêuticas pós-isquemia

Apesar das diferenças em relação à lesão em humanos, modelos animais têm sido úteis no desenvolvimento de uma compreensão dos mecanismos envolvidos na lesão cerebral causada por HI e na avaliação de possibilidades terapêuticas nas lesões subsequentes.

Terapias eficazes para tratamento de recém-nascidos expostos a HI ainda não são conhecidas. A hipotermia como intervenção terapêutica tem sido extensivamente investigada em bebês diagnosticados como portadores de EHI (Simbruner *et al.*, 2010; Higgins *et al.*, 2011) Alguns estudos demonstram que a indução de hipotermia moderada seria capaz de reduzir a mortalidade e os danos motores, resultando em melhorias significativas para

neonatos que sofreram insultos moderados, mas não graves (Higgins et al., 2011). Apesar disto, outros autores demonstraram que tais efeitos benéficos estariam limitados a nascidos a termo (Perlman, 2006; Rees et al., 2011) e que para uma maior eficácia, o tratamento deveria ser iniciado dentro de 6h após o nascimento, indicando uma “janela de oportunidade” para a redução dos danos derivados de HI (Higgins et al., 2011).

Outras estratégias podem ser utilizadas com o intuito de reduzir os danos como aumento na produção de radicais livres (Guo et al., 2013), excitotoxicidade (Brose et al., 2014), resposta inflamatória exagerada (Fann et al., 2013) e aumento da apoptose e necrose (Northington et al., 2001) provocados pela HI. A Tabela 1 mostra algumas intervenções farmacológicas possíveis para tentar reduzir os danos provocados pela HI.

Tabela 1 – Estratégias e intervenções terapêuticas para tratamento da HI pré-natal

Estratégia	Intervenção
Reduzir metabolismo cerebral ¹	Hipotermia
Bloqueio de receptores de NMDA ²	Magnésio
Redução de liberação de Glutamato ³	Adenosina Agonista de Adenosina Inibidor de recaptção de Adenosina
Inibição de canais de voltagem sensíveis a cálcio ⁴	Bloqueadores de canais de cálcio
Redução de Radicais livres ⁴	Captador de radicais livres Alopurinol Vitamina C e E Super óxido dismutase
Prevenir formação de Radicais Livres ⁵	Inibidores de óxido nítrico sintase Indometacina Alopurinol Quelantes de ferro
Redução da resposta inflamatória ⁶	Alopurinol Antagonistas inflamatórios Bloquear IL-1 e TNF- α
Atenuar vias de apoptose ⁷	Inibidores de caspase
Bloqueio de Receptores de Glicocorticoides ⁸	RU 486

Legenda: ¹ - Laptook e Corbett, 2002; ² - Vannucci e Perlman, 1997; ³ - Volpe, 2001; ⁴ - Palmer, 1995; ⁵ - Peeters-Scholte et al., 2003, ⁶ - Bruce et al., 1996; ⁷ - Edwards e Mehmet, 1996; ⁸ - Feng e Bhatt, 2015.

Fonte: Adaptado de www.emedicine.medscape.com

Ray e colaboradores (2011) observaram que a hipóxia hipobárica em ratos adultos altera a arquitetura do sono e a privação de sono paradoxal durante a hipóxia hipobárica induz a um aumento na resposta antioxidante (Ramanathan e Siegel, 2011). Alterações no padrão de sono, tais como dificuldade na iniciação e na sua manutenção, tem sido descritas em crianças que sofreram HI e que apresentam paralisia cerebral (Mol et al., 2012). Além disso, pior qualidade de sono (Newman et al., 2006) e um maior risco de apresentarem apneia

obstrutiva também já foram descritos (Simard-Tremblay et al., 2012). Desta forma, as alterações no sono provocadas por HI podem levar a respostas adaptativas, que podem, por exemplo, atenuar o estresse oxidativo.

Sono

O sono é uma função crítica que é necessária para o funcionamento cognitivo ideal em todas as idades. O sono pode ser definido como um estado natural e reversível de capacidade reduzida de resposta a estímulos externos e relativa inatividade, acompanhado por uma perda de consciência. O sono ocorre em intervalos regulares e é regulado homeostaticamente, podendo ser diferenciado do estado de vigília através de registros eletroencefalográficos e análises fisiológicas (Chen e Kushida, 2005). Ele ocupa cerca de um terço da vida de uma pessoa, mas o seu impacto na saúde e condições médicas permanece parcialmente desconhecido. O sono provavelmente ocorre em todos os vertebrados, incluindo aves, peixes, e répteis, e estados similares ao sono são igualmente observados em invertebrados, como moscas, abelhas e baratas (Cireli e Tononi, 2008).

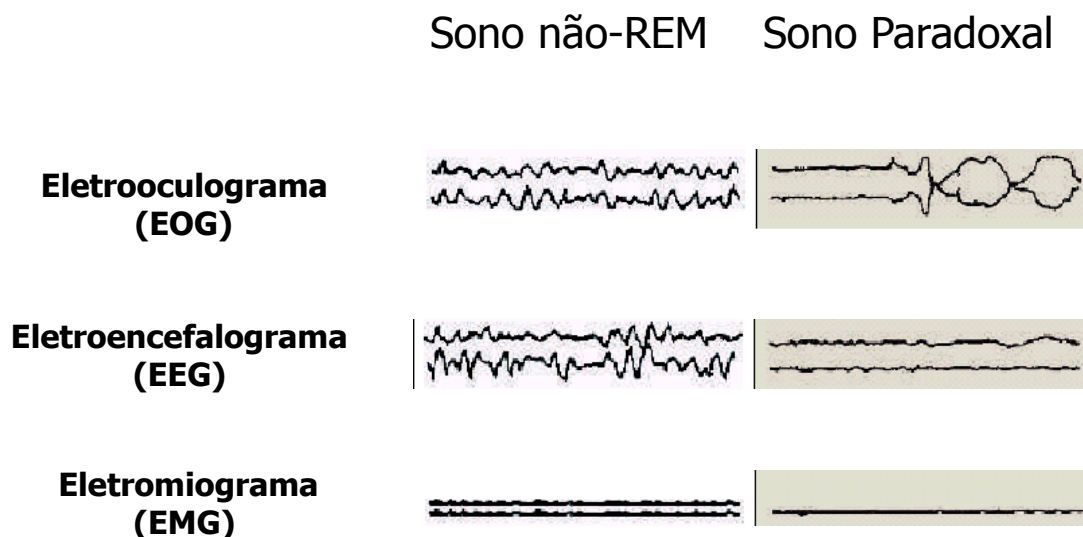
Dormir em mamíferos é composto por duas fases do sono: Sono não REM (NREM) e sono REM (rapid eye movement) ou paradoxal, que se dá devido a alta atividade de neurônios corticais e atonia da musculatura esquelética, que se alternam de forma cíclica. No sono noturno humano, o sono NREM é predominante durante a parte inicial e diminui em intensidade e duração ao longo do período de sono, enquanto que o sono paradoxal acontece em maior frequência e tempo ao fim do período de Sono. O sono NREM é caracterizado comportamentalmente por inconsciência associada a uma diminuição da atividade simpática, com redução na pressão sanguínea e na atividade cardíaca (Jouvet et al., 1964). Há uma redução da atividade elétrica cortical, e a taxa metabólica e a temperatura corporal apresentam seus valores mais baixos. Quando analisado o registro elétrico da musculatura nota-se que há uma redução do tônus muscular (Rechtschaffen e Siegel, 2000) e o registro da musculatura ocular mostra uma ausência de movimentos (Jouvet et al., 1964).

Essa fase é convencionalmente dividida em 4 estágios (que se sobrepõem). Os estágios espelham um aumento progressivo na "profundidade" do sono. O estágio 3 apresenta 20 a 50% de ondas lentas e o estágio 4 mais de 50% de ondas lentas. Assim os estágios 3 e 4 são comumente referidos como "sono de ondas lentas" ou "SWS".

Já o sono REM, também chamado de sono paradoxal, é caracterizado por uma alta atividade encefálica, movimentos da musculatura ocular e uma atonia da musculatura esquelética. Em 1962, Jouvét criou o termo sono paradoxal, pois apesar de uma atividade cortical semelhante à encontrada na vigília, ocorre também uma atonia muscular (figura 3). Nessa fase há um alto gasto energético devido a alta atividade encefálica e um aumento da atividade respiratória e cardíaca para suprir a necessidade energética encefálica.

É durante a fase de sono paradoxal que acontece a maior parte dos sonhos. Também podem acontecer nos estágios de sono profundo da fase não REM, sendo qualitativamente indistinguíveis dos que acontecem no sono paradoxal (Antrobus, 1983). Durante o sono paradoxal é observada uma alta atividade encefálica em diversas áreas, inclusive nas relacionadas à memória como o córtex do encéfalo e hipocampo (Amzica e Steriade, 1996). É durante essa fase que ocorrem os sonhos mais bem estruturados (Reinoso-Suarez et al., 2001). Ao se despertar durante o sono paradoxal, relatam-se detalhes de sonhos, indicando que o sonho é um comportamento associado com a ativação do encéfalo no sono paradoxal.

Figura 3 - Registros elétricos do sono NREM e sono paradoxal



Legenda – Registros elétricos da musculatura ocular, de neurônios corticais e de musculo esquelético durante o Sono NREM e sono paradoxal.

Fonte: Adaptado de Jouvét, 1962

Dormir e descansar podem ser satisfatoriamente explicados como estados de adaptação, cuja função central é a conservação de energia e regulação do comportamento

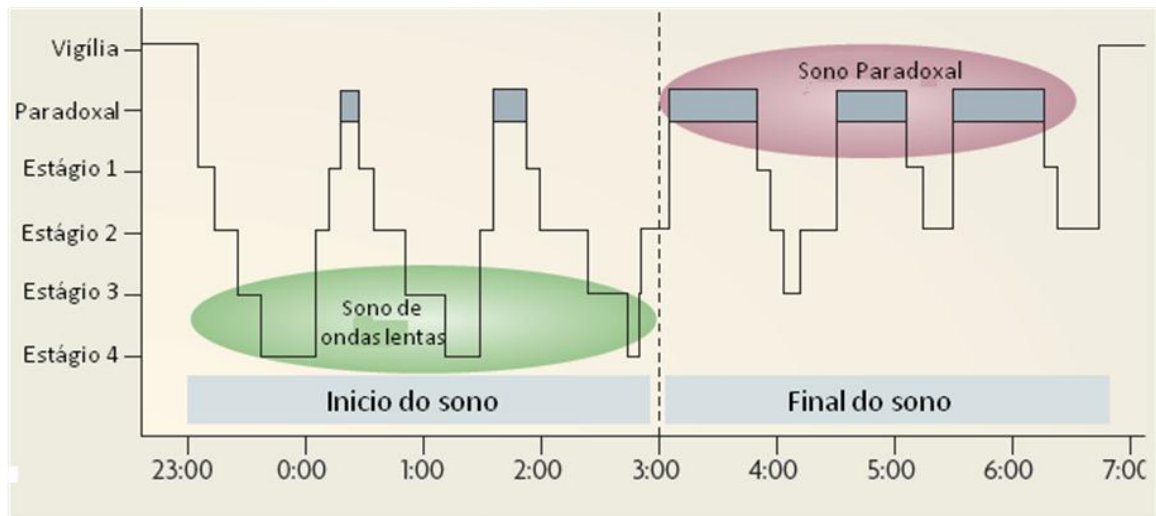
(Siegel, 2009). Além dessas funções, certos processos de recuperação, como redução da temperatura do encéfalo (Kharakoz, 2013) podem ser realizados durante o sono. Vários trabalhos associam a fase de sono paradoxal a determinadas funções e comportamentos, como por exemplo, a consolidação de memória, no entanto, o papel adaptativo dessa fase permanece ainda um mistério.

O sono pode ser alterado devido ao estresse, que muitas vezes é visto como um dos principais causadores de distúrbios de sono (Lavie, 2001). Estudos já demonstraram que estresse pode afetar neurônios noradrenérgicos envolvidos na modulação do sono (Mallick et al, 2001). A relação entre estresse e sono geralmente é estudada em modelos animais, que permitem controlar o tipo de estresse, crônico ou agudo. Assim foi demonstrado que ratos apresentam um aumento de sono NREM após interagirem com outros machos agressivos (Meerlo et al., 1997). Meerlo e colaboradores (2001) demonstraram também que no modelo de estresse causado por imobilidade ocorre um aumento do sono paradoxal. Já Cartwright e Wood (1991) demonstraram que condição de estresse crônico é um fator de risco para o desenvolvimento de insônia.

Arquitetura do sono

Durante todo o período de sono, as fases de sono paradoxal e NREM se alternam de forma cíclica e organizada (figura 4 -Hobson, 1999), e acontecem normalmente de 4 a 6 ciclos de sono por noite. Os estágios 1 e 2 do sono NREM são os primeiros a aparecer durante o período de sono, e muitas vezes alternam com breves episódios de vigília antes do início do sono profundo (estágios 3 e 4). O sono NREM predomina nas primeiras horas de sono enquanto que o tempo de sono paradoxal aumenta nas últimas (para revisão ver: Tufik et al., 2009).

Figura 4 - Arquitetura do sono de humanos jovens



Legenda: O sono é caracterizado pela ocorrência cíclica de sono paradoxal e sono NREM, que inclui sono de ondas lentas (estágios 3 e 4)

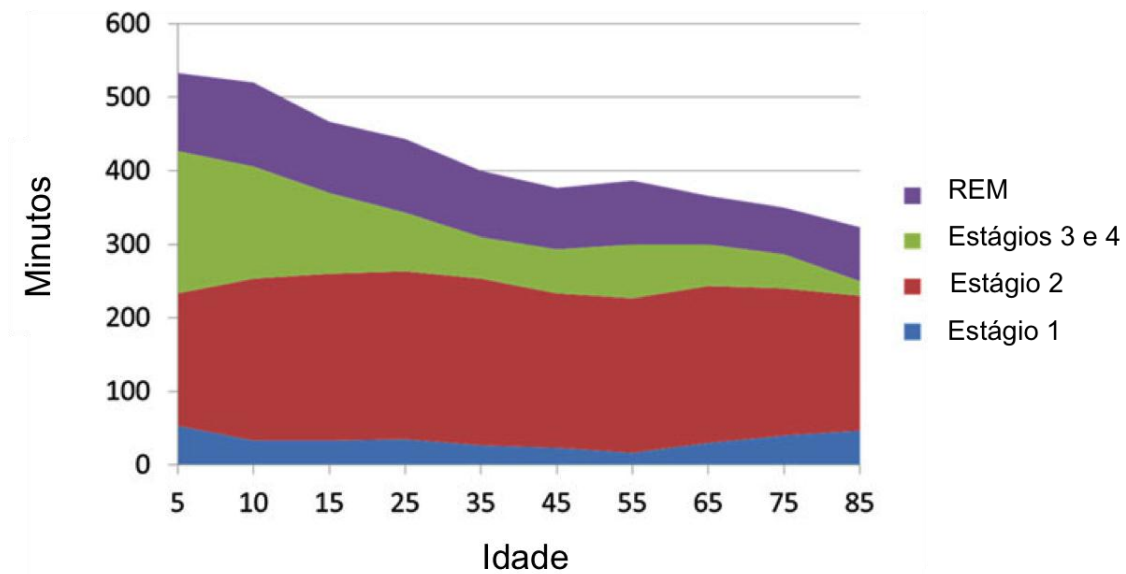
Fonte: Adaptado de Diekelmann e Born, 2011.

Através de registros eletroencefálicos pode-se caracterizar cada fase do sono. Durante o sono NREM, registros de EEG identificam ondas de alta amplitude e baixa frequência. Já no sono paradoxal, as ondas observadas são de baixa amplitude e alta frequência (Diekelmann e Born, 2011)..

O estagiamento da fase NREM é feito avaliando-se padrões eletroencefalográficos específicos e ritmos cerebrais (ondas alfa, ondas delta, fusos do sono, complexos K e outros) juntamente com o tônus muscular e os movimentos musculares (Ohayon et al., 2004).

Em humanos, a arquitetura do sono é alterada ao longo da vida. Na infância há uma prevalência da fase de sono paradoxal e estágios 3 e 4 do NREM. Com o passar do tempo, há uma redução nesses estágios. O estágio 1 e 2 do sono NREM permanece praticamente inalterado ao longo da vida (figura 5).

Figura 5 – Minutos de uma noite de sono gastos em cada estágio ao longo da vida



Legenda: Representação gráfica dos minutos gastos em cada estágio do sono ao longo da vida humana. Cada cor representa uma fase/estágio do sono, conforme indicado.

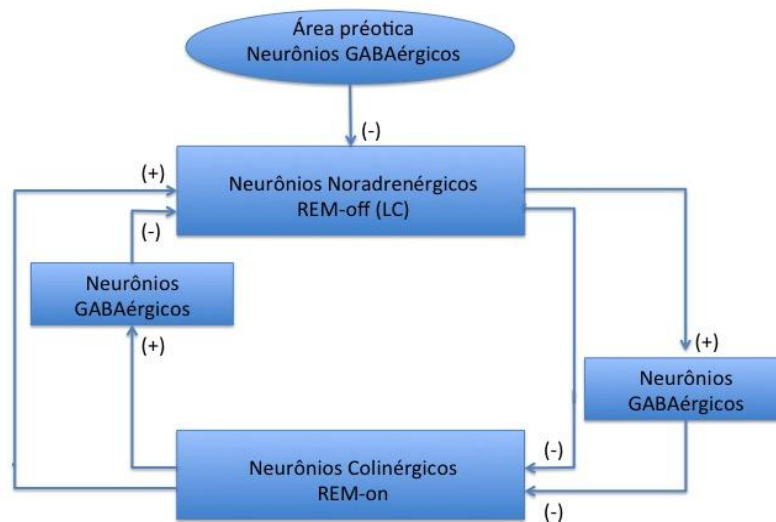
Fonte: Adaptado de Ohayon et al., 2004

Mecanismos neurais do sono paradoxal

No início do sono, há um aumento na despolarização de neurônios relacionados ao sono, incluindo alguns neurônios da área pré-ótica, que são GABAérgicos. Esses neurônios emitem projeções para o *am* (LC) (Williams e Reiner, 1993; Greene e Carpenter, 1985).

No sono, há um aumento gradual nos níveis de GABA no LC. Esse aumento também é notado no estágio de transição entre vigília e sono. Os neurônios GABAérgicos encontram-se ativados durante o estágio de sono paradoxal. O aumento na liberação de GABA, conseqüentemente, diminui a atividade de neurônios noradrenérgicos do tipo REM-off no LC. Neurônios colinérgicos fazem conexões tanto com neurônios noradrenérgicos REM-off quanto com neurônios GABAérgicos no LC. Com a inibição dos neurônios noradrenérgicos REM-off do LC, o resultado é a iniciação do sono paradoxal (Alam et al, 1995; Ali et al, 1999). Uma vez inibidos, a noradrenalina não será liberada pelos neurônios, mas os neurônios colinérgicos REM-on continuarão sendo ativados e o GABA continua sendo liberado para manter o sono paradoxal (Aghajanian et al, 1977) (figura 6).

Figura 6 - Representação do mecanismo neural envolvido no início e manutenção do sono paradoxal



Legenda: Esquema representativo das vias de ativação (+) e inibição (-) do sono paradoxal.
Fonte: Adaptado de Mallick et al 2001.

Estudos já demonstraram que alterações nos níveis dos neurotransmissores ou nos seus respectivos receptores envolvidos no início e manutenção do sono paradoxal podem alterar essa fase em quantidade e qualidade. Kaur e colaboradores (1997) demonstraram que micro injeção de picrotoxina, um antagonista competitivo do receptor GABA_A, afeta a duração do sono paradoxal devido ao aumento nos níveis de noradrenalina, que é responsável por cessar a fase paradoxal. Já Gais e colaboradores (2011) demonstraram que humanos que receberam injeção de inibidor da recaptção de noradrenalina apresentaram uma acentuada redução no tempo total de sono paradoxal.

Ácido GAMA-aminobutírico

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório no encéfalo. Sua biossíntese é feita a partir da descarboxilação de glutamato pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico descarboxílase (GAD do inglês *L-glutamic acid descarboxylase*). Já foi descrito na literatura que alterações na neurotransmissão de GABA

estão relacionadas com muitos problemas como epilepsia (Freichel et al., 2006), doença de Parkinson (Goufinkel-An et al., 2003) e distúrbios de sono (Ray et al., 2011).

O GABA é o único, dentre todos os neurotransmissores, que utiliza duas formas de enzima, GAD₆₅ e GAD₆₇, onde ambas produzem GABA, mas para fins diferentes (Bu et al., 1992). A enzima GAD₆₅ encontra-se nos terminais e o GABA produzido é utilizado, somente, na neurotransmissão (Martin and Rimvall, 1993). A enzima GAD₆₇ encontra-se distribuída de forma uniforme no citoplasma do neurônio e o GABA produzido é utilizado para neurotransmissão GABAérgica e, também, como fator trófico na formação sináptica durante o desenvolvimento e proteção após danos neuronais, já que desempenha o papel de manter o equilíbrio excitatório/inibitório no SNC (Pinal e Tobin, 1998; Waagepetersen et al., 1999; Martin e Rimvall, 1993).

No encéfalo, a concentração de GABA depende da síntese pela enzima GAD (GAD₆₅ e GAD₆₇). Após sua síntese, o transportador vesicular de GABA (VGAT) leva o neurotransmissor para dentro das vesículas sinápticas, para posteriormente ser utilizado. Na fenda sináptica, o GABA é transportado para o interior celular novamente pela proteína transportadora de GABA (GAT) e em seguida degradada pela GABA transaminase (GABA-T)(Dionisio et al., 2011; Tillakaratne et al., 1995).

No SNC existem três principais tipos de receptores de GABA. Os receptores GABA a são um grupo heterogêneo de receptores de células-membrana pentaméricos, ionotrópicos, com propriedades fisiológicas e farmacológicas distintas. São esses os receptores encontrados no LC (Mendu et al. 2012; Olsen et al. 2008). Existe também um segundo tipo de receptor chamado de GABA b (GABAbR) e ele é um receptor acoplado a proteína G (Bettler et al. 2004). O terceiro tipo de receptor que é o GABA c. Ele é um receptor do tipo ionotrópico e encontra-se distribuído em algumas regiões do SNC e na retina (Gamel-Didelon et al., 2003). Há quem acredite que o receptor GABA c é somente uma subunidade do receptor GABA a (Barnard et al., 1998)

Privação de Sono

O sono é uma parte essencial da vida humana e é necessário para a saúde. Distúrbios do sono causados por doenças, exigências profissionais ou até lazer, contribuem para a diminuição do rendimento no trabalho e na escola. A sonolência é atualmente reconhecida

como um fator com grande contribuição nas taxas de acidentes devido à perda de respostas condicionadas (Phillip e Akerstedt, 2006). A prevalência de distúrbios do sono é cada vez maior nas sociedades modernas, onde a exposição constante à luz artificial e atividades interativas, como a televisão e a internet, combinam com as pressões sociais e econômicas para reduzir o tempo gasto no sono. Por esse motivo tem-se uma privação parcial de sono paradoxal, pois é no final da noite que os episódios de sono paradoxal acontecem com maior duração e frequência. Nos últimos cinquenta anos ocorreu uma redução de aproximadamente 2 horas na duração diária do sono (Banks e Dinges, 2007). Este débito de sono tende a ser compensado com um aumento de tempo de sono nos finais de semana, contudo, a reposição ou rebote ocorre para os estágios 2 e 3 da fase de sono NREM (Banks e Dings, 2007).

Uma das formas de se estudar as funções do sono é através da observação das alterações em sistemas de neurotransmissores e seus receptores quando há a privação do mesmo (Rechtschaffen et al., 1989; Rechtschaffen e Bergmann, 2002, Tufik et al., 2009). A privação de sono paradoxal (PSP) gera várias alterações comportamentais em animais e humanos. Em ratos essa privação leva a um aumento da atividade motora, irritabilidade, ingestão de alimento, diminuição do limiar de dor, aumento da atividade sexual e alteração na memória (Cohen e Dement, 1965; Albert et al., 1970; Sloan, 1972; Onen et al., 2001; Ferraz et al., 2001; Damasceno et al., 2008; 2009, Skinner et al., 2011; McCoy e Strecker, 2011).

Algumas alterações, como déficits de memória e aprendizado (Tiba et al., 2008), causadas pela privação de sono são decorrentes de mudanças primárias em vários sistemas de neurotransmissores centrais. A privação de sono também pode causar alteração na expressão de diferentes genes no encéfalo, incluindo genes que codificam proteínas envolvidas em processos metabólicos, plasticidade neural e em genes que codificam enzimas da síntese de neurotransmissores, receptores hormonais e transportadores (para revisão ver: Tufik et al., 2009).

As técnicas de privação de sono paradoxal consistem em manter os animais experimentais acordados durante essa fase específica. Grande parte dos modelos utilizados para PSP são modificações de um modelo desenvolvido por Jouvet et al. (1964), conhecido como técnica de pote de flor invertido. Essa técnica consiste na utilização de plataformas circulares estreitas de 6 centímetros de diâmetro, alocadas no interior de tanques contendo água até cerca de 1 centímetro abaixo da superfície da plataforma, onde cada rato é mantido durante o período de privação. Neste modelo, durante a vigília e a fase de sono NREM o animal equilibra-se sobre a plataforma. No início da fase de sono paradoxal, em função da atonia da musculatura esquelética característica desta fase, o animal entra em contato com a

água, acordando subsequentemente. Através desta técnica a fase de sono paradoxal é eliminada completamente. Ocorre também uma pequena redução no sono de ondas lentas (Machado et al., 2004).

Aprendizado e memória

O aprendizado é definido como o processo de adquirir novas informações ou conhecimento e a memória é tipicamente definida como a capacidade de retenção da informação aprendida (Thompson et al., 2002). O processo de memória é dinâmico e pode ser modificado através de diversos fatores como, por exemplo, uso de drogas (Claro et al., 1999), estresse (McEwen e Sapolsky, 1995; Sandi e Pinelo-Nava, 2007), doenças (Zhang et al., 2012), idade (Silver et al., 2012) e privação de sono (para revisão ver: Rauchs et al., 2005). Do ponto de vista fisiológico, o aprendizado e a memória são interdependentes, estando ligados ao processo de desenvolvimento de prolongamentos neuronais e ao estabelecimento de circuitos (para revisão ver: Battaglia et al., 2011).

O hipocampo, uma parte do sistema límbico, tem sido descrito como essencial para a memória relacional (ou seja, a memória espacial e episódica), desempenhando um papel fundamental nas adaptações comportamentais a fatores ambientais (Kesner et al., 2007).

A formação hipocampal, que inclui os córtices entorrinal e perirrinal, está envolvida com a memória não-relacional, estímulo de reconhecimento e associações entre estímulos (Burgess et al., 2002; Langston et al., 2010).

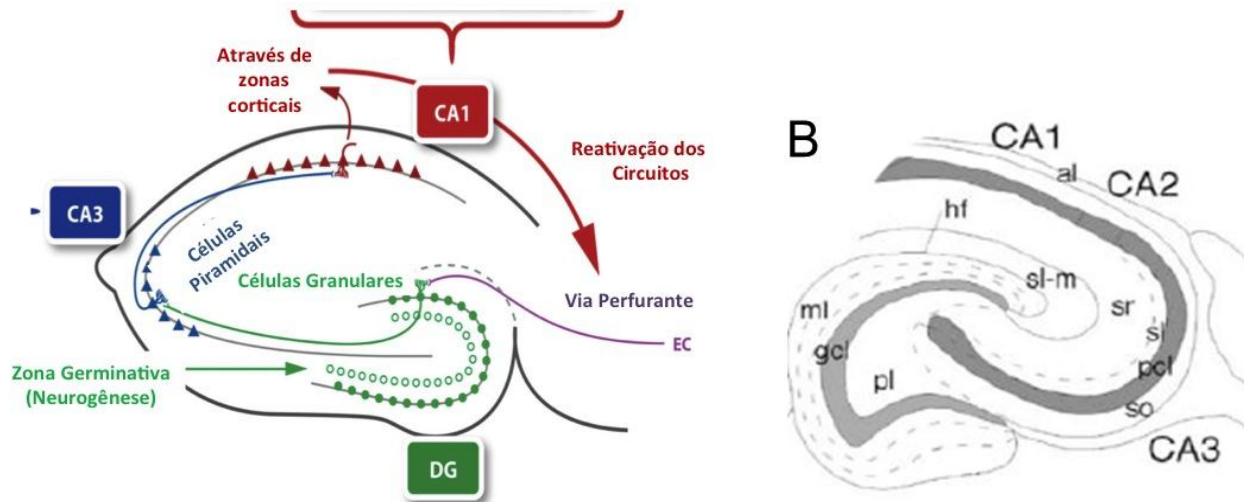
A neurogênese tem um papel significativo na aquisição de novas memórias e na retenção de memória de longo prazo (Shors et al., 2001; Jessberger et al., 2009). No hipocampo de mamíferos adultos a neurogênese que inclui a proliferação, migração e diferenciação de neurônios, ocorre principalmente no giro denteado (GD) (revisado em Zhao et al., 2008), e o GABA é um dos neurotransmissores responsáveis pela modulação desse processo, que acontece via ativação de receptores do tipo GABA_B. Além de participar do processo de neurogênese no hipocampo, o GABA também está envolvido no refinamento de axônios e a criação de novas espinhas dendríticas (Mohapatra et al., 2016). Tem sido descrito que a plasticidade do hipocampo é importante na aquisição de memória, mas não na sua expressão ou no seu armazenamento ao longo prazo (Shors et al., 2004).

Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura bilateral e é composto por diferentes camadas que estão interligadas. A principal estrutura do hipocampo é formada pelo giro denteado (GD) e pelos cornos de Amon, também chamados Cornus Ammonis (CA) e contém as regiões CA 1, 2 e 3 (figura 7). As regiões do CA são divididas em camadas: camada Alveus, que é a camada mais superficial do hipocampo e onde estão os axônios dos neurônios piramidais; Estrato oriens, camada seguinte ao Alveus; Estrato Piramidal, onde estão os principais corpos celulares do CA; Estrato Lucido, é o mais fino do hipocampo e apresenta algumas fibras das células granulares; Estrato Radiato, que apresenta alguns interneurônios; Estrato Lacunoso, que é formado por ramificações dos dendritos de células piramidais; e Estrato Molecular, que é o mais profundo e que também contém dendritos de células piramidais. Já o GD é dividido em: Camada polimórfica ou Hilo, que é a camada mais superficial e contém axônios de células granulares do GD; Camada Granulosa, contém os corpos celulares das células granulares; e Camada molecular, a camada mais profunda do GD. O CA é caracterizado por uma via específica que vai do GD, passando pela região CA3, que, em seguida, se projeta para a camada de células piramidais da região CA1. Projeções saem a partir da região CA1 para diferentes áreas corticais, voltam e se ligam ao GD, formando assim um circuito fechado. Este circuito contribui para o funcionamento em longo prazo desta estrutura encefálica.

O hipocampo é bem conservado ao longo de todas as espécies, e por esta razão, os estudos em modelos animais podem ser usados para extrapolações aos seres humanos nos campos molecular, celular e tecidual. Especial atenção deve ser dada às investigações comportamentais que examinam as relações entre neurotransmissores e testes comportamentais (tabela 2).

Figura 7 - Representação esquemática longitudinal da topografia do hipocampo mostrando ligações intrahipocampais



Legenda: À esquerda, encontra-se as vias hipocâmpicas e à direita, os estratos e camadas do hipocampo. Siglas CA1 – Corno de Ammon 1; CA2 – Corno de Ammon 2; CA3 – Corno de Ammon 3; DG- Giro dentado; Al – Alveus; SR – Estrato Radiato; SL – Estrato Lacunoso; SO – Estrato Oriens; PL – Camada polimórfica; ML – Camada Molecular; GCL – Camada Granulosa.

Fonte: Adaptado de: Beck e Pourié, 2013

Informações sensoriais ligadas a estímulos ambientais chegam ao hipocampo para ativar as células granulares do GD. Se esta ativação é originada a partir de um estímulo forte, com base na frequência dos potenciais de ação, a transmissão excitatória ignora a regulação inibidora, que pode ser acionada por outros estímulos sensoriais perturbadores ou emoções. Eferências da região CA1 geralmente se projetam para pelo menos dois alvos: 1) áreas corticais, que integram informações para a formação da memória e/ou decisões conscientes, e 2) o caminho perfurante hipocâmpal, em que há o retorno das projeções na estrutura e consolidação da informação. Este último mecanismo de reativação específico, que é conduzido através de todo o sistema límbico, foi descrito como o circuito Papez em 1937.

Tabela 2 - Principais testes usados para avaliar funções cognitivas

Teste	Função cognitiva avaliada*	Referências
Dependente de atividade Hipocampal		
Labirinto aquático de Morris	Memória visuoespacial	Morris (1984)
Labirinto T	Memória espacial	Raffaella et al. (1989)
Labirinto radial	Memória de trabalho	Knowlton et al. (1989)
Esquiva passiva	Memória associativa	Azami et al. (2010)
Independente de atividade hipocampal		
Reconhecimento de objetos	Memória discriminativa	Rothblat e Kromer (1991)
Teste de condicionamento Aversivo	Memória associativa	Buresova e Bures (1973)
Outros Testes		
Labirinto em cruz elevada	Ansiedade	Pellow et al. (1985)
Teste do campo aberto**	Atividade locomotora, excitação e estresse	Denenberg e Whimby (1963)

Legenda: * Algumas variações de protocolos podem permitir a avaliação de funções além das mostradas aqui. **

O teste de campo aberto permite sugerir uma avaliação do status da ansiedade e de estresse.

Fonte: Adaptado de Diekelmann e Born, 2011.

Todas as regiões do hipocampo apresentam um fenômeno conhecido como potenciação de longa duração (LTP), que é a base da consolidação da memória (Lomo, 2003; Lynch, 2004). Existe também a depressão de longo prazo (LTD), que diminui o desempenho encefálico (para revisão ver: Beck e Pourié, 2013).

A base celular da LTP, especialmente na região CA1, é sustentada pela presença de receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Bennett, 2000). Estes receptores permitem a passagem de cátions, tais como sódio, potássio e, especialmente, íons cálcio. O influxo de cálcio, na neuroativação, leva à ativação de uma cinase dependente de cálcio, resultando em uma modificação estrutural e funcional no neurônio pós-sináptico. Dentre as modificações há um aumento na produção de óxido nítrico, que passa livremente através das membranas celulares e produz uma mensagem retrógrada para aumentar a liberação de neurotransmissor, glutamato, pelos neurônios pré-sinápticos.

Hormônios Corticosteróides

O eixo Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal (HPA) está envolvido na modulação da secreção de hormônios corticosteróides pelas glândulas adrenais (cortisol no homem ou corticosterona em ratos), que desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase. Esses hormônios são fundamentais para o início e o término adequado da

resposta ao estresse. Suas ações incluem regulação de funções cerebrais como excitabilidade neuronal e liberação de neurotransmissores (Joels, 2008), modulação da neurogênese e aprendizado e memória (Herbert et al., 2006); regulação de vários comportamentos e regulação neuroendócrina (Oitzl et al., 1997).

Níveis elevados de hormônios corticosteróides podem prejudicar a homeostase e causar danos graves às funções encefálicas e por isso são considerados fatores de risco para incidência de transtornos relacionados ao estresse como depressão (para revisão ver: De Kloet et al., 2005).

Na resposta ao estresse os hormônios corticosteróides agem de forma a manter a atividade basal do sistema HPA e controlar a sensibilidade da resposta ao estresse. Desta forma, promovem a coordenação de eventos circadianos como a ingestão alimentar e sono-vigília, estão envolvidos no processo de integração sensorial e atenção seletiva e por mecanismos de retroalimentação negativa facilitam o término da ativação do HPA (para revisão ver: De Kloet et al., 1998).

Características dos receptores de Corticosteróides

Quando os hormônios corticosteróides penetram no encéfalo, se ligam a receptores intracelulares. Os receptores fazem parte de complexos multiproteicos que se localizam no citoplasma celular. Após a ligação do hormônio ocorre dissociação de chaperonas, aumento da afinidade receptor-ligante e migração do complexo receptor-hormônio para o núcleo. Esse complexo funciona como um fator de transcrição gênica (Munck et al., 1990; Brink et al., 1992).

Existem dois subtipos de receptores de corticosteróides no encéfalo: Receptores de Mineralocorticóides (RMn) e Receptores de Glicocorticóides (RGc) (Joels et al., 2008). RMn e RGc coexistem em neurônios e a ação dos hormônios corticosteróides é mediada por esses receptores que agem de forma sinérgica ou antagônica dependendo da função celular (Van Eekelen et al., 1988).

Os RMn estão localizados predominantemente em áreas límbicas, particularmente na região do hipocampo nas regiões do CA e GD. Esses receptores apresentam uma alta afinidade pelos hormônios corticosteróides e são necessárias baixas concentrações de corticosteróides para a sua ativação (Herman et al., 1989; Pryce, 2008).

Já os RGc se encontram amplamente distribuídos em todas as regiões do encéfalo inclusive no hipocampo. São necessárias altas concentrações de hormônios corticosteróides para ativá-los e a afinidade do hormônio ao receptor é cerca de dez vezes menor quando comparado ao RMn (para revisão ver: De Kloet et al., 1993).

Com a presença de ambos os receptores em neurônios hipocampais é necessário que haja um equilíbrio adequado na ação dos hormônios corticosteróides, pois o equilíbrio é fundamental para a atividade neuronal, capacidade de resposta ao estresse e na consolidação do aprendizado e memória (McEwen e Sapolsky, 1995; De Kloet et al., 1998; Lai et al., 2007; Pryce, 2008; Rogalska, 2010). Alterações na relação de equilíbrio para os receptores RMn/RGc tem efeitos sobre a regulação na resposta ao estresse, riscos crescentes de neuropatologias e danos no aprendizado e memória (Hássan et al., 1996; Almeida et al., 2000; Sapolsky, 2000; Rogalska 2010).

Memória e Glicocorticóides

A função de hormônios corticosteróides na aquisição, consolidação e recuperação da memória já vem sendo estudada há décadas em modelos animais e humanos (Luine et al., 1993, 1994; Kim e Haller, 2007; Lupien et al., 2007; Shors, 2006).

Existem vários trabalhos relatando o efeito do aumento dos níveis de glicocorticóides relacionados a estresse, aprendizado e memória. Os resultados relatados variam de melhora a enfraquecimento, dependendo de muitas variáveis como, sexo, idade, tempo (efeito agudo ou crônico) e intensidade do fator estresse. Entretanto, um bom número de trabalhos descreve que aumento nos níveis de glicocorticóides no hipocampo e consequente super ativação de RGc gera inibição da LTP, e como consequência prejuízos no aprendizado e memória (Foy et al., 1987; Diamond et al., 1992; Pavlides et al., 1995). Alterações estruturais no hipocampo, como redução nas espinhas dendríticas e morte neuronal estariam associadas a estes efeitos (para revisão ver: Wolf, 2003; Li et al., 2011). Já foi também demonstrado que o tratamento agudo com glicocorticóides modula a eficácia sináptica nos neurônios do hipocampo (Diamond et al., 1992; Pavlides et al., 1993; Xu et al., 1997).

O aumento na ativação de RMn por sua vez, induz a LTP hipocampal e leva a melhora em testes de memória espacial (De Kloet et al., 1999; Pavlides et al., 1993; Joels et al., 2004).

Em acordo com esses dados, o bloqueio experimental desse receptor através de fármacos antagonistas provoca perda de rendimento em testes de memória (Douma et al., 1998).

Sono, Glicocorticóides e Memória

O sono é tido como um estado que otimiza a consolidação de memória de novas informações adquiridas (para revisão: Diekelmann e Born, 2011). Sabe-se também da importância da regulação através de ação em receptores específicos dos hormônios corticosteróides deste estado (para revisão ver: Wagner e Born, 2008). Níveis baixos de glicocorticóides ocorrem durante o sono de ondas lentas que precede episódios de sono paradoxal, levando a uma associação entre esses hormônios, sono e memória. A privação de sono paradoxal pode induzir alterações no aprendizado e memória, descritas em vários trabalhos na literatura que poderiam ser consequentes a alterações nos níveis de glicocorticóides, induzidos pela privação dessa fase específica de sono, ou pelas técnicas de privação utilizadas. Trabalhos envolvendo privação de sono paradoxal e avaliação de aprendizado e memória têm sido bastante criticados pelos efeitos não específicos induzidos pela técnica, como por exemplo aumento na atividade locomotora e aumento da atividade do eixo HPA (aumento nos níveis de corticosterona), que poderiam ser responsáveis pelas alterações nos testes de aprendizado e memória (Siegel, 2001). O trabalho de Ruskin et al., (2006) contudo, avaliou os efeitos da PSP em ratos adrenalectomizados, cujos níveis de corticosterona foram mantidos estáveis através da liberação por um *pellet* implantado e verificaram que nesses animais a PSP continuou induzindo um enfraquecimento na consolidação de memória, o que mostra que a técnica usada não estaria influenciando no resultado final.

Sono, hipóxia, receptores de corticosteróides e memória

Rybnikova e colaboradores (2011) observaram que animais que sofreram hipóxia hipobárica apresentam alteração na expressão dos RGc e RMn nas regiões CA1 e GD do hipocampo. Também já foi demonstrado que a hipóxia é capaz de afetar o aprendizado e

memória de animais. Tata e colaboradores (2015) demonstraram, no modelo de oclusão da artéria uterina no sétimo dia de vida, que ratos hipóxico-isquêmico adultos apresentam déficits de aprendizado e memória no teste do labirinto aquático de Morris. Já Yang e colaboradores (2011) demonstraram, no modelo de HI pré-natal sistêmica, que ratos hipóxico-isquêmico permanecem menos tempo no quadrante onde encontra-se a plataforma de escape no teste do Labirinto aquático.

Além de alterações nos receptores de corticosteróides e na memória e aprendizado, estudos já demonstram que a Hipóxia gera alterações na arquitetura do sono e em enzimas que sintetizam neurotransmissores envolvidos na modulação do mesmo. Panjwani (2007) demonstrou que as pessoas que viajam para ambientes de altura elevada, mimetizando hipóxia hipobárica, apresentam alteração na arquitetura do sono de forma que há um aumento nos estágios 1 e 2 do sono NREM e redução dos estágios 3 e 4. Em 2011, Ray e colaboradores demonstraram que a hipóxia pode afetar a excitabilidade celular de áreas relacionadas ao sono como LC, tegumento laterodorsal e tegumento pedúnculo-pontino. Utilizando o modelo de hipóxia hipobárica em adultos, eles demonstraram que na região do LC há um aumento na densidade de neurônios contendo a enzima Tirosina Hidroxilase e redução na densidade de neurônios contendo a enzima GAD. Já no tegumento laterodorsal e tegumento pedúnculo-pontino foi encontrada uma redução na densidade de neurônios contendo as enzimas colina acetiltransferase (CHAT) e GAD. No mesmo trabalho foi demonstrado que, além dessas alterações, a hipóxia hipobárica é capaz de reduzir o tempo total de sono, aumentar a latência e reduzir o tempo total de sono paradoxal.

Sabendo que muitos danos provocados pela Hipóxia hipobárica estão relacionados com o aumento de radicais livres, Ramanathan e Siegel (2011) demonstraram que apesar de ter muitos efeitos negativos, a PSP é capaz de reverter alguns desses danos, devido a um aumento nas proteínas antioxidantes. Desta forma, as alterações no sono provocada pela hipóxia funcionariam como resposta adaptativa na prevenção do estresse oxidativo, o que sugere a PSP como um possível tratamento para pessoas que sofreram hipóxia em lugares de grandes altitudes.

Sabendo-se que a hipóxia hipobárica altera o sono, o equilíbrio entre receptores para corticosteróides e o níveis da enzima GAD no LC, bem como que a PSP pode reverter os danos causados por este modelo de hipóxia, seria possível a PSP atenuar possíveis danos provocados pelo modelo de HI pré-natal proposto por Robinson e colaboradores (2005)?

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos morfo-funcionais da privação de sono paradoxal, na vida adulta, em um modelo de HI sistêmica pré-natal.

1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os níveis da enzima GAD, no Locus coeruleus, de ratos adultos submetidos a hipóxia isquemia pré-natal, realizada através do modelo de oclusão de artérias uterinas modificado de Robinsosn e colaboradores (2005);
- b) Avaliar a distribuição de receptores de glicocorticóides e mineralocorticóides, que estão envolvidos no processo de memória e aprendizado, no hipocampo dos animais submetidos ao modelo de HI;
- c) Avaliar os efeitos da privação paradoxal (PSP) por 72 horas na distribuição da enzima GAD e na distribuição de receptores de glicocorticóides e mineralocorticóides;
- d) Avaliar os efeitos da interação HI/PSP nos níveis da GAD e na distribuição dos receptores de glicocorticóides e mineralocorticóides;
- e) Avaliar o processo de memória e aprendizado, em ratos adultos submetidos ao modelo de HI, em animais PSP e na interação HI/PSP.

2 METODOLOGIA

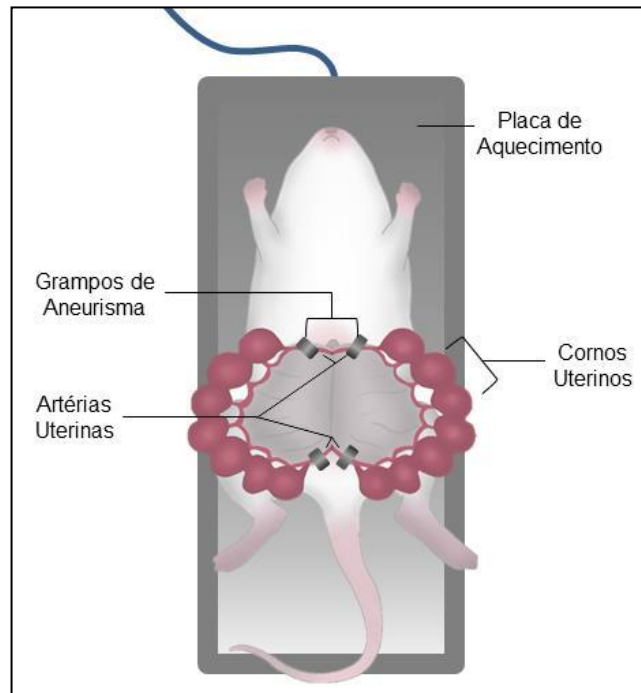
2.1 Animais

Neste trabalho utilizamos ratos Wistar, provenientes do biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, mantidos em ciclo claro e escuro de doze horas (6:00-18:00). Todos os protocolos empregados neste trabalho foram aprovados pela comissão de ética para o cuidado e uso de animais experimentais do IBRAG/UERJ (CEUA/032/2010) e (CEUA/019/2010).

2.2 Procedimento cirúrgico para indução da hipóxia-Isquemia

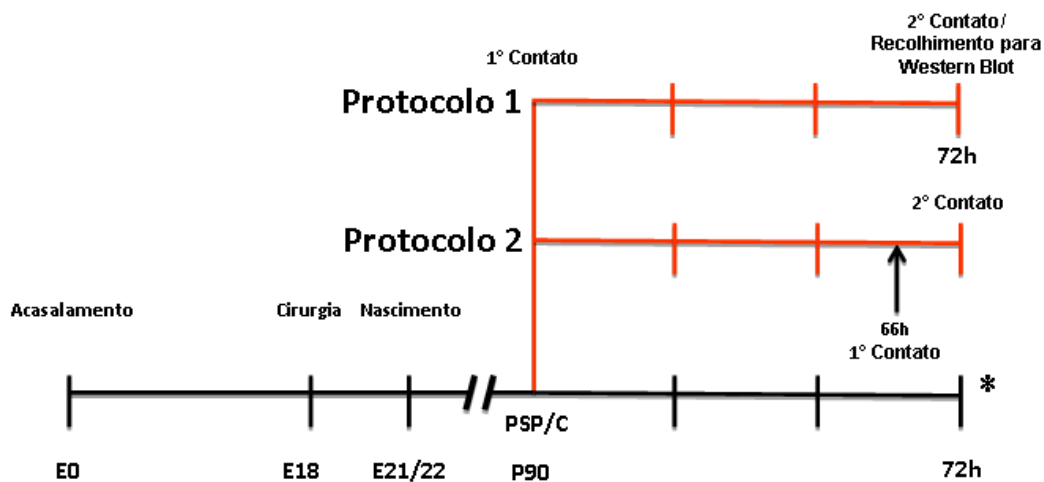
Nesse estudo foram utilizados ratos que passaram por hipóxia-isquemia pré-natal e animais que passaram pelo procedimento cirúrgico mas não sofreram hipóxia-isquemia. Foi utilizada a técnica de clampeamento das quatro artérias uterinas em E18, esse procedimento foi descrito por Robinson e colaboradores em 2005. Ratas wistar grávidas no 18º dia de gestação foram anestesiadas com 5mL de Avertin® (0,5g de tribromoetanol+ 0,31mL de 2-metil-2-butanol+ 39,5mL de água destilada), durante a cirurgia foram aplicadas doses fracionadas do anestésico. Após serem anestesiadas, foi feita a raspagem dos pelos da região abdominal e a laparotomia. Os cornos uterinos foram retirados e expostos da cavidade peritoneal. As quatro artérias uterinas foram obstruídas com grampos para aneurisma por 45 minutos, grupo HI. No grupo SHAM (SH), as ratas tiveram os cornos uterinos retirados da cavidade peritoneal, mas não tiveram as artérias uterinas obstruídas. Passados os 45 minutos, os grampos de aneurisma foram retirados de cada fêmea, os cornos recolocados na cavidade peritoneal e o abdômen suturado (figura 8). Foi administrado cloridrato de lidocaína nos pontos de sutura como anestésico local. A gestação prosseguiu normalmente e o parto ocorreu sem intervenção. Após o nascimento ninhadas com menos de 6 animais foram descartadas e ninhadas com um número superior a 8 filhotes tiveram os excedentes sacrificados, para que não haja interferência do potencial lactotrófico sobre os resultados. A prole permanece com sua respectiva mãe até o desmame aos 22 dias de vida (P22).

Figura 8 - Modelo de Hipóxia-isquemia



Legenda: Figura representativa da cirurgia realizada na rata no 18º dia de gestação para realização da HI.

Figura 9 - Desenho experimental



Legenda: Linha do tempo demonstrando o momento da cirurgia e os procedimentos experimentais realizados na vida adulta. As linhas vermelhas indicam os dois protocolos utilizados para avaliar aprendizado e memória. O asterisco representa o processamento histológico para imunohistoquímica. Foram constituídos 4 grupos: SHC, HIC, SHP e HIP. Siglas: E0 – dia embrionário 0; E18 – dia embrionário 18; E21/22 – dia embrionário 21/22; P90 – 90 dias pós-natal; PSP – privação de sono paradoxal; C – Controle; 72h – 72 horas; 66h – 66 horas.

Fonte: O autor, 2016.

2.3 Privação de sono paradoxal (PSP)

Os animais que passaram pelo procedimento cirúrgico, HI e SH, foram submetidos à privação de sono paradoxal por um período de 72 horas através do método de múltiplas plataformas (Van Hulzen e Coenen, 1980). O aparato consiste em um tanque (120x40x40cm) cheio de água e com plataformas onde os animais vão permanecer por 72 horas. Foi utilizado o mínimo de 3 animais e o máximo de 5 animais por tanque. O número de plataformas utilizadas era o dobro do número de animais. Este método permite que os ratos se movam de plataforma para plataforma e mantenham contato com os outros ratos do mesmo grupo experimental (figura 10).

No experimento, ao alcançar a fase de sono paradoxal, há uma atonia da musculatura esquelética, característica presente nessa fase do sono, fazendo com que o animal entre em contato com a água do tanque e desperte. O acesso à alimentação e água é permitido para todos os grupos. A técnica permite a privação de 100% da fase de sono paradoxal e aproximadamente de 30% da fase de sono de ondas lentas (Machado et al., 2004). O grupo que não sofreu PSP foi mantido em um tanque similar, sendo a água substituída por maravalha. A PSP foi realizada em uma sala de avaliação comportamental, sendo os animais retirados do biotério e mantidos em ambientação por 2 dias antes do início da privação de sono ou das avaliações comportamentais.

Figura 10 - Tanque de privação de sono paradoxal



Legenda: A esquerda vemos os animais sobre as plataformas e na direita o modo de alimentação dos animais.
Fonte: O autor, 2016.

2.4 Avaliação dos níveis da enzima GAD

Animais dos grupos SH e HI aos noventa (P90) dias pós-natal foram eutanasiados por decapitação sob analgesia e tiveram seus encéfalos removidos (n=5) (figura 9). Mergulhados em tampão fosfato, os Locus Coeruleos e Hipocampus foram dissecados e, então, homogeneizados em tampão de lise através do uso de pistilo e dounce. Os homogenatos foram submetidos à centrifugação a 4°C por 15 minutos a 13000 rpm em centrífuga Eppendorf, sendo os sobrenadantes retirados para os ensaios e os precipitados descartados. As amostras tiveram sua concentração de proteína definida através do método de Bradford em placa de 96 poços. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Ao volume de cada amostra referente a 30µg de proteína adicionou-se 80% de tampão de amostra. Feito isto, as proteínas das amostras sofreram desnaturação por meio de fervura por 3 min. Estas amostras foram submetidas, assim, à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Utilizou-se o sistema de eletroforese Bio-rad, além de gel em concentrações de 12%, e padrão de peso molecular Full Range Rainbow(GE Healthcare). Foi empregado o sistema de transferência iBlot (Life Technologies), de forma que as proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Ao final desta etapa, as membranas foram hidratadas em água destilada. Para o bloqueio das membranas, utilizou-se solução de TBSt/BSA 5% sob agitação por 1h30. Em seguida, as mesmas foram incubadas durante 2

horas com anticorpo primário anti-GAD_{65/67} na concentração de 1:7500 (Chemicon – IgG de coelho –Policlonal), também diluído em TBSt. Logo após a retirada do anticorpo primário, foram feitas lavagens com TBSt e adicionou-se o anticorpo (Anti-IgG de Coelho Conjugado com HRP, produzido em burro) na Concentração de 1:10000, o qual permaneceu em contato com a membrana por 2h. Foram realizadas mais lavagens com TBSt para retirar o excesso de anticorpo. Então, foi realizada a revelação das membranas, utilizando o detector de quimiluminescência ChemiDoc (Bio-Rad). As membranas foram incubadas com ECL para serem reveladas.

Apesar do anticorpo anti-GAD_{65/67} se ligar as duas enzimas, neste trabalho foi analisada a densidade optica somente das bandas de GAD₆₇, pois as bandas da GAD₆₅ não ficaram bem definidas, não permitindo sua quantificação.

2.5 Imunohistoquímica para RGc e RMn

Ratos SH e HI submetidos ou não a 72 horas de PSP foram eutanasiados usando-se a técnica de perfusão intracardíaca, para posterior análise imuno-histoquímica (n=4)(figura 9).

Os animais foram anestesiados com 70mg/kg de tiopental sódico e tiveram sua caixa torácica aberta por remoção do gradil costal para a exposição do coração. As soluções da perfusão foram infundidas no ventrículo esquerdo por intermédio de uma cânula acoplada a uma bomba peristáltica. Uma incisão realizada no átrio direito permitia o escoamento do sangue e das soluções após percorrerem o sistema vascular do animal. Foram utilizadas as seguintes soluções, solução salina 0,9% que visava à remoção do sangue do animal; solução de paraformaldeído 4% que realizava a fixação dos tecidos; solução paraformaldeído acrescida de sacarose a 10% que finalizava a fixação e iniciava a crioproteção.

Ao término de cada perfusão, iniciava-se a dissecação do encéfalo, para que esse fosse mantido em uma solução fixadora acrescida de 10% de sacarose por 3 horas e, depois transferido para uma solução de tampão fosfato 0,1M pH 7,4 acrescido de sacarose a 20% durante a noite a 4°C.

Após esse período os encéfalos foram cortados em plano coronal contendo a região de interesse, hipocampo, segundo as indicações obtidas no atlas de coordenadas estereotáxicas (Bregma -3,14 a -4,3 mm) (Paxinos e Watson, 1998). Essas regiões foram então armazenadas em pequenos poços de papel laminado, contendo meio de inclusão (OCT tissuetek), para

serem congeladas em nitrogênio líquido e seccionadas em criostato (Leica CM1850, Alemanha) a -20°C na espessura de 20 μm . As secções foram colhidas (4/lâmina) em lâminas cobertas com gelatina-alúmen de cromo 2% e estocadas a -20°C para posterior processamento imunohistoquímico.

As lâminas destinadas à reação de RGc e RMn foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos e foram submetidas a reativação antigênica (tampão citrato, 0,01M; pH 6) no micro-ondas por 40 segundos. Após isso, elas foram lavadas 6 vezes com PBS (salina tamponada com fosfato:KCl 2,7mM; KH_2PO_4 1,47 mM; NaCl 136 mM e NaHPO_4 8 mM; pH 7,4) com Triton 0,3%, por 5 minutos. Após a incubação com soro bovino 5% (BSA) por 1 hora, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-RGc na concentração de 1:200 (ABcam, anti-RGc produzido em rato - IgG2) por um período de 24 horas a 4°C e anticorpo primário anti-RMn na concentração de 1:50 (ABcam, anti-RMn produzido em rato - IgG2) por um período de 48 horas a temperatura ambiente. Após este período as lâminas ambientavam por duas horas para então serem lavadas novamente com PBS. Depois foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente (25°C) com o anticorpo-secundário (anti-IgG de rato produzido em burro e conjugado com alexa 555 - Life Technology, IgG) na concentração de 1:400. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS e montadas utilizando N-propilgalato como meio.

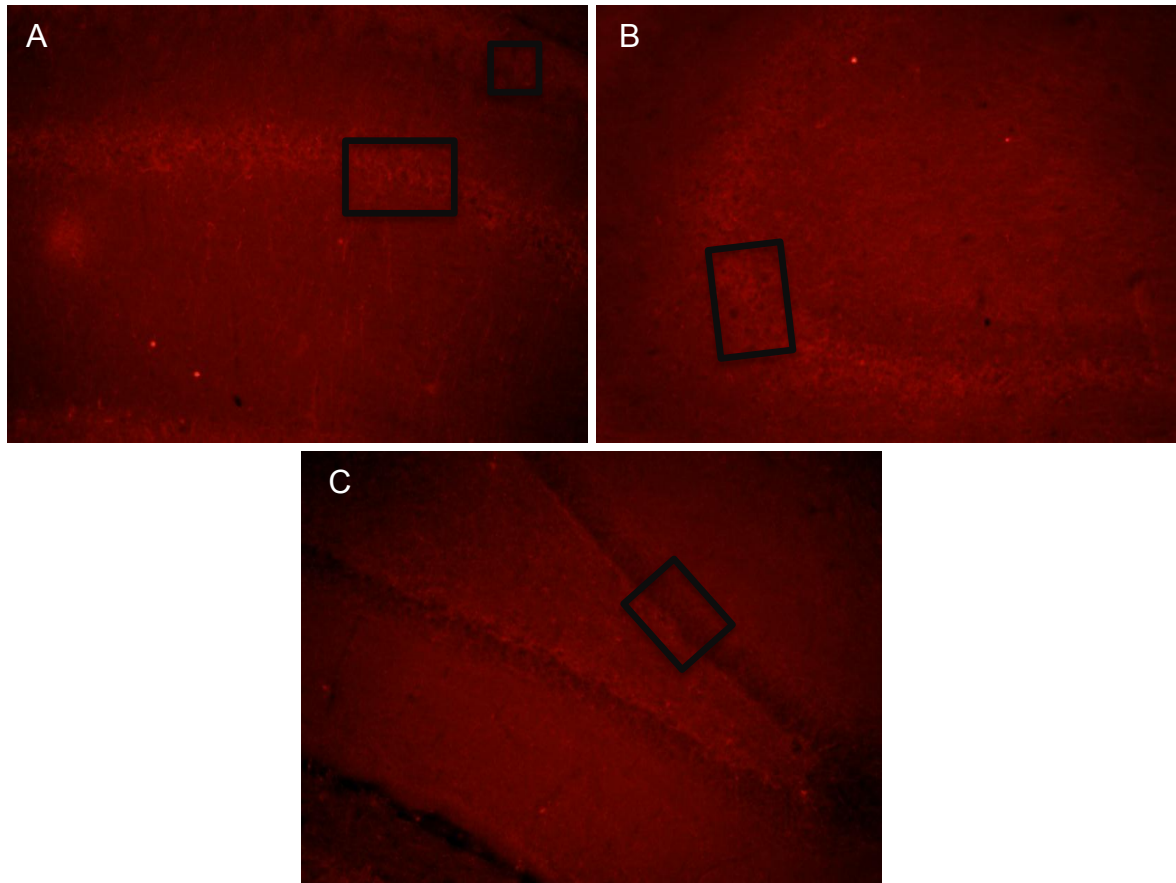
As lâminas foram observadas em microscópio epi-fluorescente Olympus BX40 e fotomicrografias de imagens em um aumento de 200x foram obtidas para posterior avaliação, através da câmara Olympus DP 71.

2.5.1 Quantificação da imunomarcção de receptores de corticosteróides

Para a análise de densidade de imunomarcção de receptores de corticosteróides, foi utilizado o Image-Pro Plus (versão 4.5; Mídia Cibernética, Inc). A ferramenta de segmentação foi inicialmente utilizada para diferenciar melhor o fundo da marcação. O procedimento ferramenta de segmentação foi repetido três vezes, em ocasiões separadas, para cada imagem. A imagem então foi convertida em tons de cinza (pixels brilhantes que indicam etiquetagem forte). Posteriormente a este processo foi realizada a quantificação, a qual consistiu de cálculo da densidade média do brilho do pixel da imagem inteira com auxílio da ferramenta do histograma, o qual fornece o percentual de área em tons de cinza sobre a área total em preto.

Em seguida, calculou-se a densidade média dos pixels que representa a densidade de imunomarcacão para receptores de corticosteróides para as três imagens tratadas de cada original, e este resultado final foi utilizado como referência figura 11).

Figura 11 - Fotomicrografias representativas de secções hipocampais das regiões CA1/3 e GD reagidas com anticorpos anti-RGc e anti-RMn



Legenda: rea selecionada para avaliação de densidade celular. (A – CA3; B – CA 1; C – GD).
Fonte: O autor, 2016.

2.6 Avaliação de aprendizado e memória - Teste da esquiua passiva

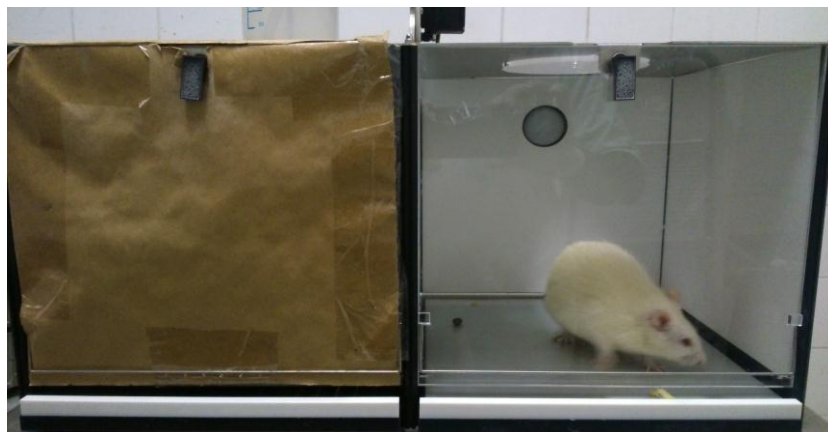
Os ratos foram submetidos ao teste da esquiua passiva para avaliação do aprendizado e memória. O aparelho consiste em duas câmaras, uma iluminada e outra escura, ligadas por uma porta que pode se fechar para evitar a passagem do rato de uma câmara para outra. O chão das câmaras  feito de uma grade que pode transmitir uma corrente elétrica para a pata

dos ratos. O aparelho é conectado a um computador que está programado para controlar e realizar o teste (figura 8). Foram utilizados dois protocolos para o teste:

Protocolo 1 - Os ratos passaram por uma sessão de treino antes da privação. Esse treino foi feito no primeiro dia, onde os ratos foram colocados individualmente na câmara clara para que pudessem explorá-la. Após 30 segundos, a porta que liga as duas câmaras foi aberta, possibilitando a passagem para a câmara escura. Após o rato entrar na câmara escura a porta se fechou e o rato recebeu um choque na pata (0,5mA) por 3 segundos (1º. Contato). Ao termino do teste, os ratos foram colocados no tanque de PSP e após o período de 72 horas os ratos foram testados novamente (2º. Contato). Os ratos tiveram o período de 60 segundos como tempo máximo para entrar na câmara escura. O tempo de entrada na câmara escura foi registrado (n=20).

Protocolo 2 – Com a intenção de avaliar se ratos já privados do sono paradoxal apresentariam alterações na aquisição da memória, os ratos foram submetidos à PSP e 6 horas antes do término do período de privação foram submetidos a uma sessão de treinamento onde, foram colocados individualmente na câmara clara para que pudessem explorá-la. Após 30 segundos, a porta que liga as duas câmaras foi aberta, possibilitando a passagem para a câmara escura. Após o rato entrar na câmara escura a porta se fechava e o rato recebia um choque na pata (0,5mA) por 3 segundos (1º contato). Após o treino, os ratos foram recolocados no tanque de privação por mais 6 horas e ao completar 72 horas, foram testados novamente (2º. Contato) (n=13) (figura 9).

Figura 12 - Aparelho de esquiva passiva



Legenda: À esquerda, observa-se a câmara escura do aparato de esquiva passiva, local onde o animal recebe a descarga elétrica. À direita, observa-se a câmara clara.

Fonte: O autor, 2016.

2.7 Análise Estatística

2.7.1 Teste comportamental

Os dados de teste comportamental dos animais foram analisados utilizando o software Graphpad Prisma 5.0. Os dados de teste comportamental são expressos em média \pm EPM.

Os dados apresentaram distribuição normal. Os dados comportamentais foram analisados com Anova-Two way (tendo como fator de variação a HI e PSP). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

2.7.2 Densidade de imunomarcção

Dados de densidade de imunomarcção foram analisados utilizando o software Graphpad Prisma 5.0. Os dados de densidade são expressos em média \pm EPM.

Os dados apresentaram distribuição normal. Os dados de densidade de imunomarcção foram analisados com Anova-Two way (tendo como fator de variação a HI e PSP). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

2.7.3 Níveis de GAD

A leitura das imagens obtidas deu-se por meio do programa ImageJ (NIH) e a análise estatística dos dados foi realizada através do software SPSS.

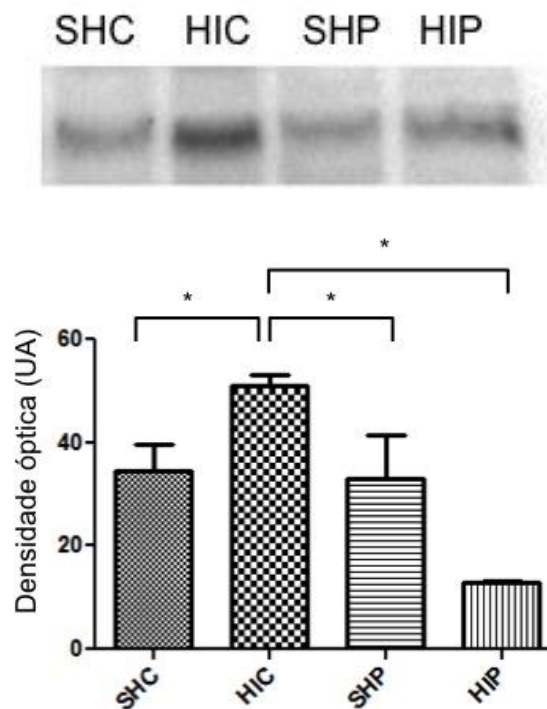
Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados de níveis de GAD foram analisados com Anova-Two way (tendo como fator de variação a HI e PSP). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Níveis da enzima GAD₆₇

A análise quantitativa da enzima GAD₆₇ revelou alterações em seus níveis nos ratos HI dos grupos privados (P) e não privados (C) na região do LC. O grupo HIC apresentou um aumento nos níveis da enzima quando comparado ao grupo SHC. Após a PSP, o grupo HIP apresentou uma redução ($P < 0,05$) nos níveis da enzima quando comparado ao grupo HIC e também é menor quando comparado ao grupo SHP (figura 13).

Figura 13 - Representação da densidade óptica da enzima GAD₆₇ na região do LC

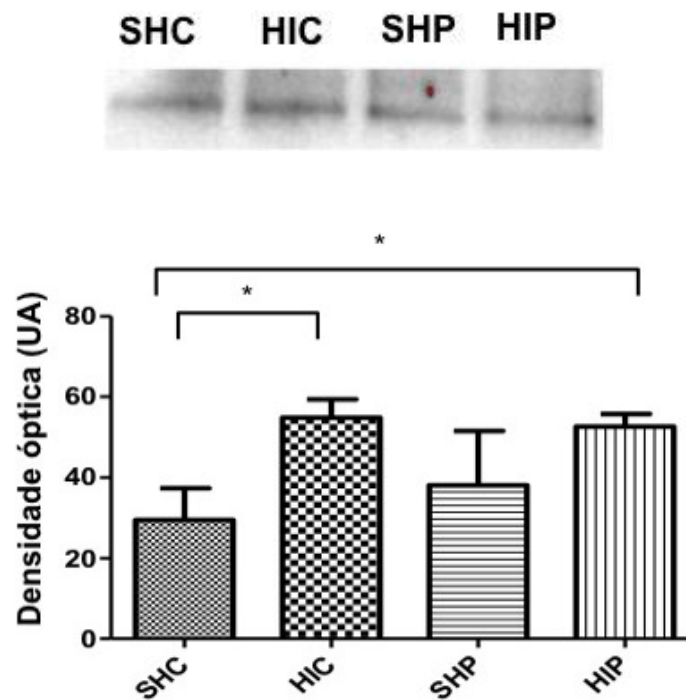


Legenda: Representação da densidade óptica da enzima GAD₆₇ na região do LC. SHC – Grupo Sham controle; HIC – Grupo HI controle; SHP – Grupo Sham PSP; HIP – Grupo HI PSP. Os dados representam média \pm EPM, em unidades arbitrárias (UA). Os asteriscos representam onde observamos a variação dos níveis de acordo com o tratamento ($p < 0,05$).

Fonte: O autor, 2016.

A análise quantitativa da enzima GAD67 na região do hipocampo revelou alterações em seus níveis nos ratos submetidos à HI, que não sofreram alterações com a PSP. O grupo HIC apresentou um aumento ($p < 0,05$) nos níveis da enzima quando comparado ao grupo SHC. Não houve alterações nos níveis da enzima, após a PSP (figura 14).

Figura 14 - Representação da densidade óptica da enzima GAD₆₇ na região do Hipocampo



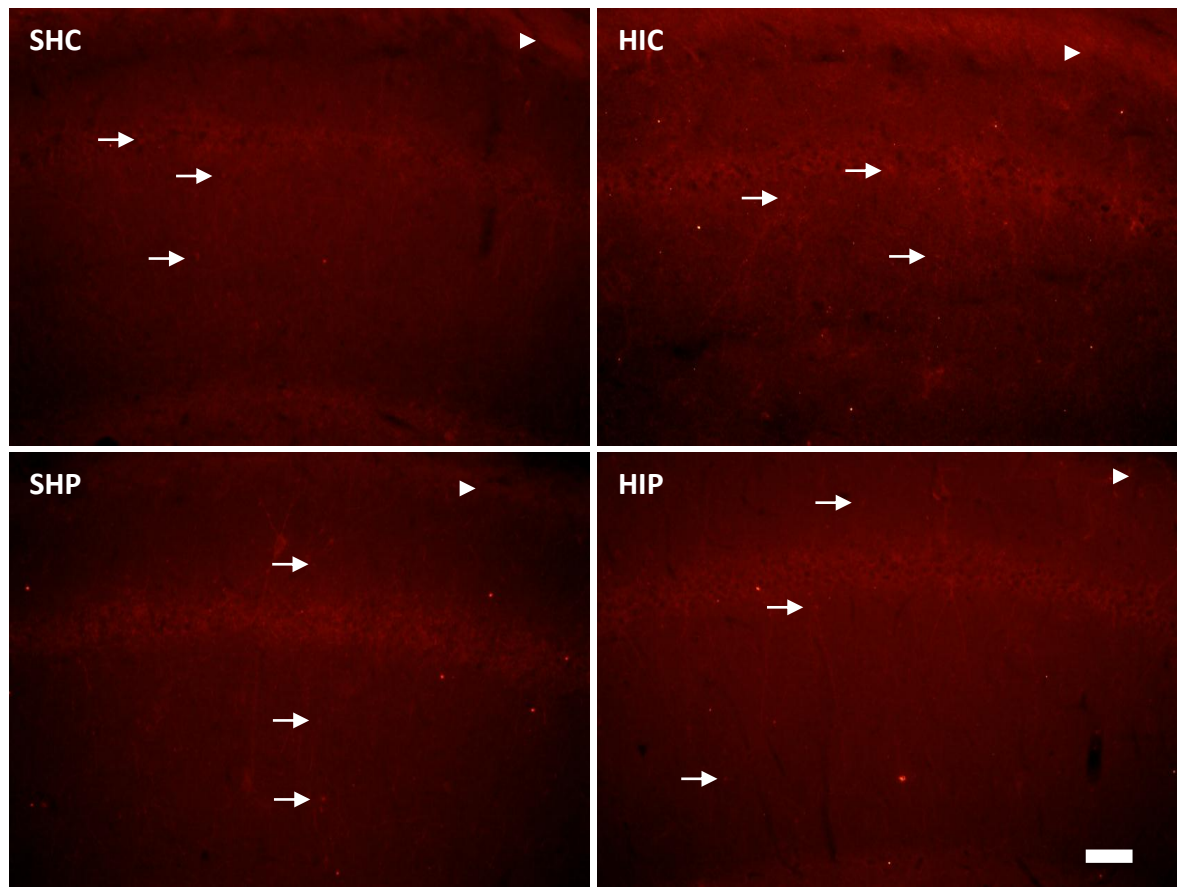
Legenda: Os dados representam média \pm EPM, em unidades arbitrárias (UA). Os asteriscos representam onde observamos a variação dos níveis de acordo com o tratamento ($p < 0,05$).

Fonte: O autor, 2016.

3.2 Densidade de Imunomarcação de RGc e RMn

Os cortes foram imunoreagidos para RGc e RMn. Nas regiões do CA1 a marcação para os receptores, RGc, se encontra predominantemente na camada de neurônios piramidais. Nesta camada a marcação aparenta ser puntiforme e abrange todo o corpo celular. Algumas células isoladas foram encontradas no estrato radiato, em ambos os grupos, assim como no estrato Oriens (setas). Ambos os grupos apresentam marcação na Camada Alveus, estando aparentemente mais intensa no grupo HIC (cabeças de seta) (figura 14).

Figura 15 – Imunorreatividade do RGc na CA1

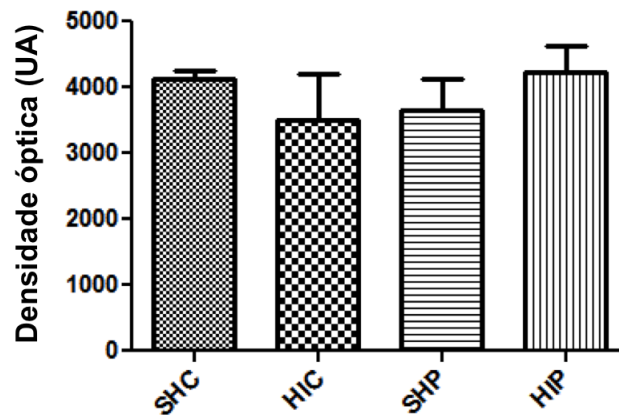


Legenda: Fotomicrografias representativas de secções da região CA 1 do hipocampo reagidas com anticorpos para RGc (SHC – Grupo Sham controle; HIC – Grupo HI controle; SHP – Grupo Sham PSP; HIP – Grupo HI PSP) (barra de 50 μ m).

Fonte: O autor, 2016.

A avaliação de densidade de imunomarcção de RGc na região CA1 não mostrou diferença significativa entre os grupos tanto na camada piramidal (figura 16), quanto na Camada Alveus (Figura 17).

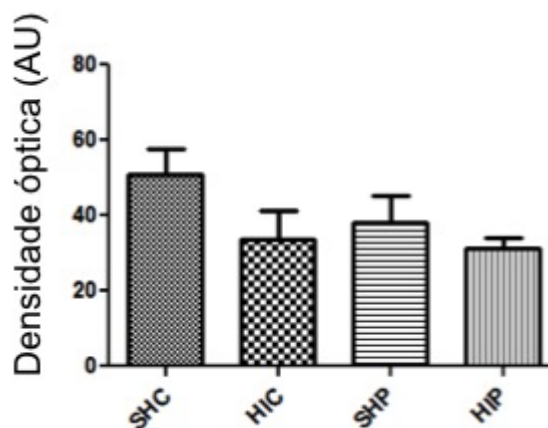
Figura 16 – Quantificação da imunomarcção dos RGc na região CA1 do hipocampo



Legenda: Representação gráfica da densidade de imunomarcção dos RGc na região CA1 do hipocampo, em unidades arbitrárias (UA), de ratos SH e HI submetidos a PSP. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

Fonte: O autor, 2016.

Figura 17 - Quantificação da imunomarcção dos RGc na Camada Alveus da CA 1 no hipocampo



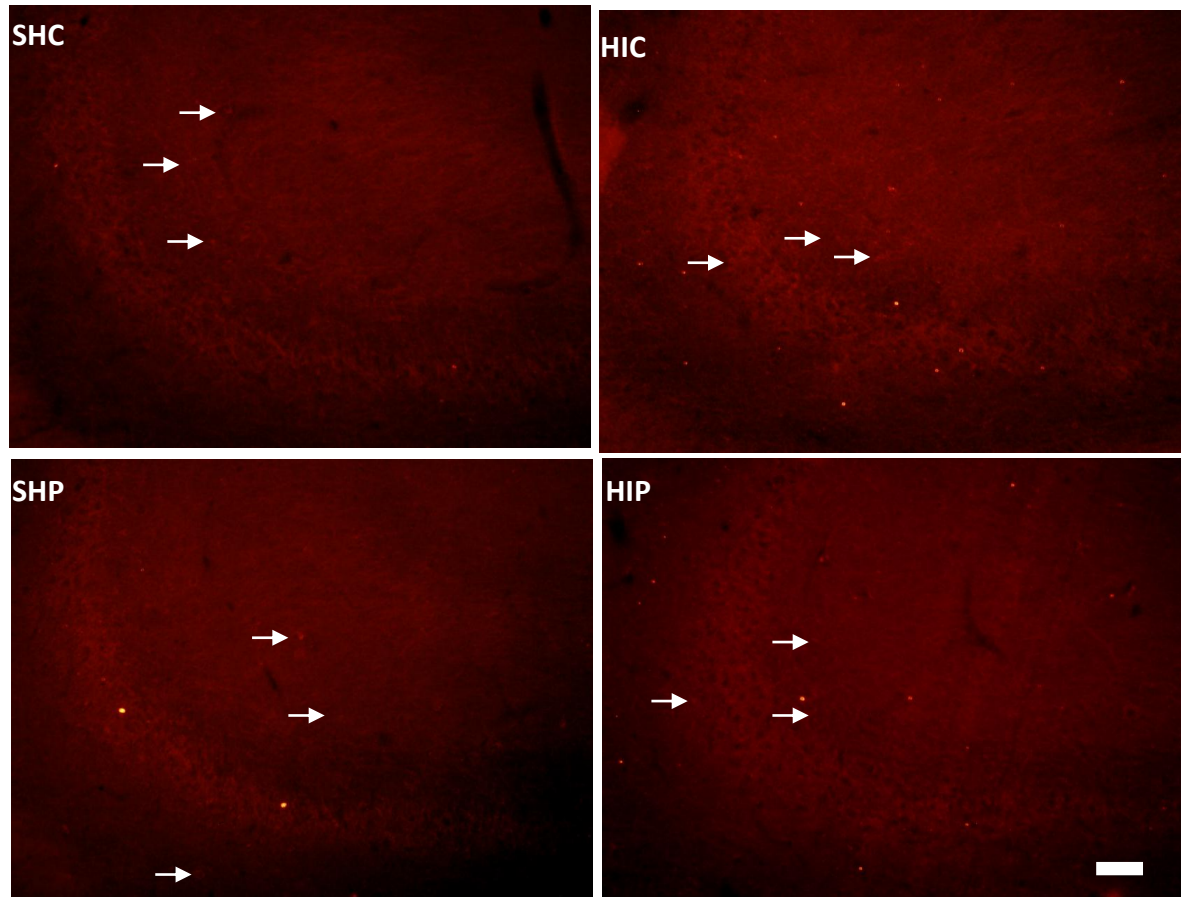
Legenda: Representação gráfica da densidade de imunomarcção dos RGc na Camada Alveus da CA 1 no hipocampo, em unidades arbitrárias (UA), de ratos SH e HI submetidos a PSP. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

Fonte: O autor, 2016.

Assim como Nas regiões do CA1, na região CA3 a marcação para os receptores, RGc, se encontra predominantemente na camada de neurônios piramidais. Nesta camada a marcação aparenta ser puntiforme e abrange todo o corpo celular. Algumas células isoladas

foram encontradas no estrato radiato, em ambos os grupos, assim como no estrato Oriens (setas) (figura 18).

Figura 18 - Imunorreatividade do RGc na CA3

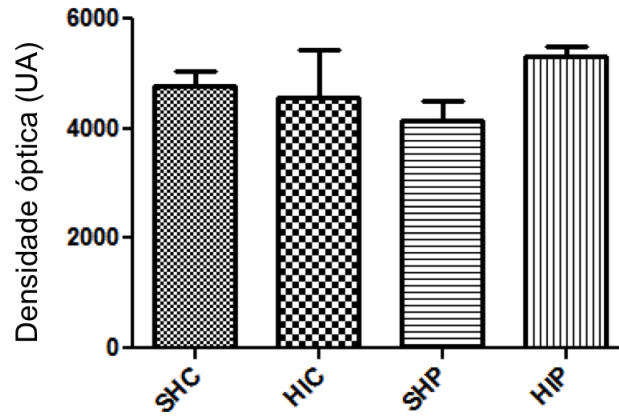


Legenda: Fotomicrografias representativas de seções da região CA 3 do hipocampo reagidas com anticorpos para RGc.

Fonte: O autor, 2016.

Em relação ao receptores de glicocorticoides na região CA3 (figura 19), a avaliação de densidade óptica não mostrou diferença significativa entre os grupos.

Figura 19 - Quantificação da imunomarcção dos RGc na região CA3 do hipocampo

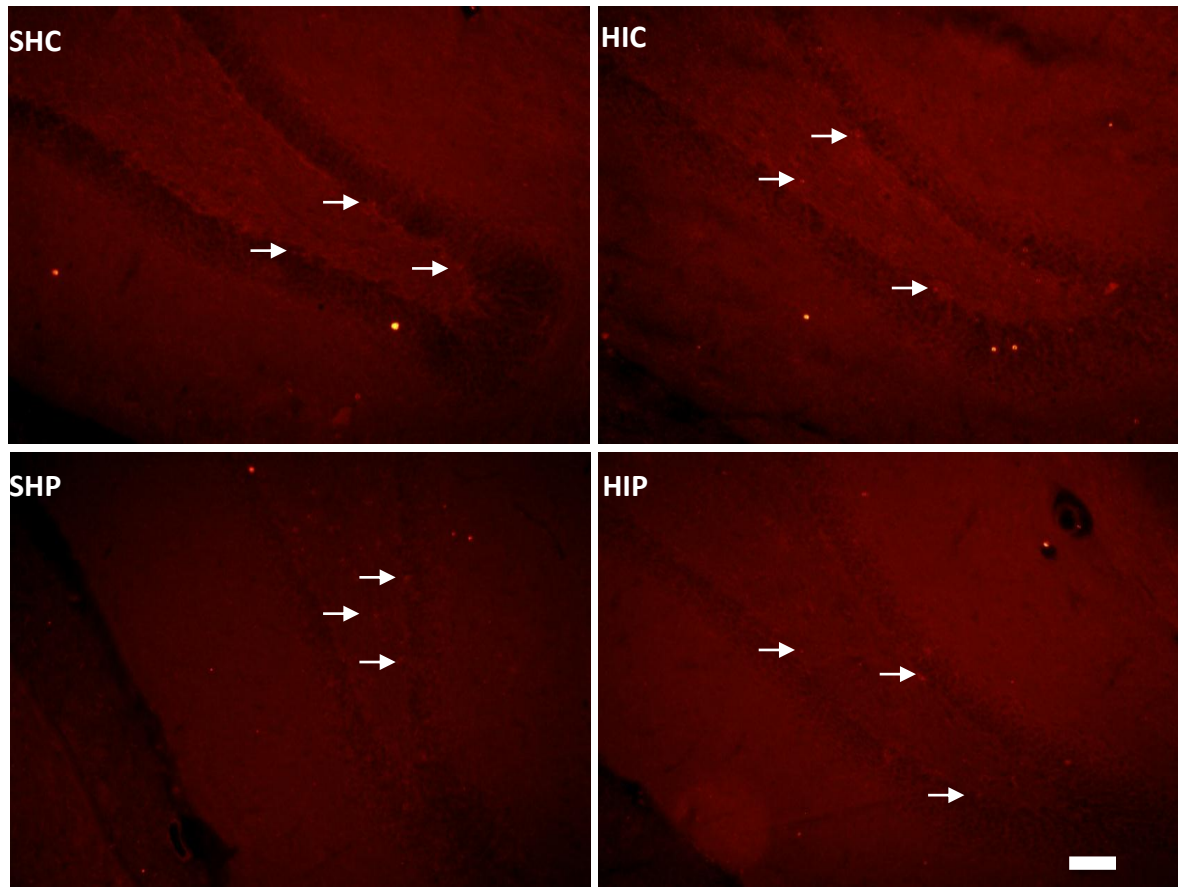


Legenda: Representação gráfica da densidade de imunomarcção do RGc na região CA3 do hipocampo, em unidades arbitrárias (UA), de ratos SH e HI submetidos a PSP. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

Fonte: O autor, 2016.

Nas regiões do GD, a marcação para RGc encontra-se predominantemente nas regiões do Hilo, camada granular e camada sub-granular. A marcação aparenta ser puntiforme e abrange todo o corpo celular (figura 20).

Figura 20 - Imunorreatividade do RGc na GD

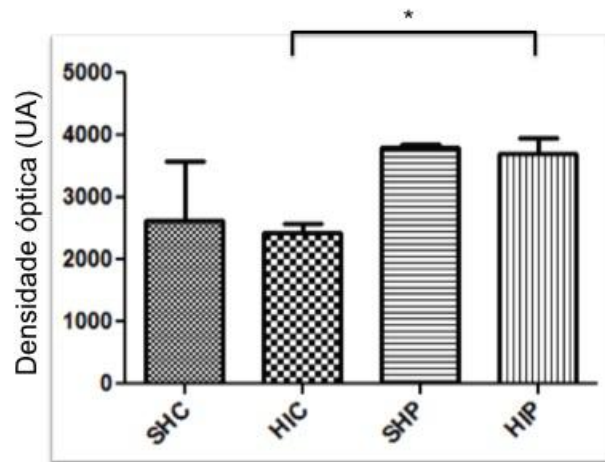


Legenda: Fotomicrografias representativas de secções da região GD do hipocampo reagidas com anticorpos para RGc.

Fonte: O autor, 2016.

A avaliação de densidade de imunomarcacão mostrou que a HI não afetou os RGc até a idade adulta. Após a PSP houve um aumento na densidade de imunomarcacão dos RGc no grupo HIP ($p < 0,05$). Os grupos SH não apresentaram diferença significativa, mesmo após a PSP (figura 21).

Figura 21 - Quantificação da imunomarcção dos RGc na região GD do hipocampo



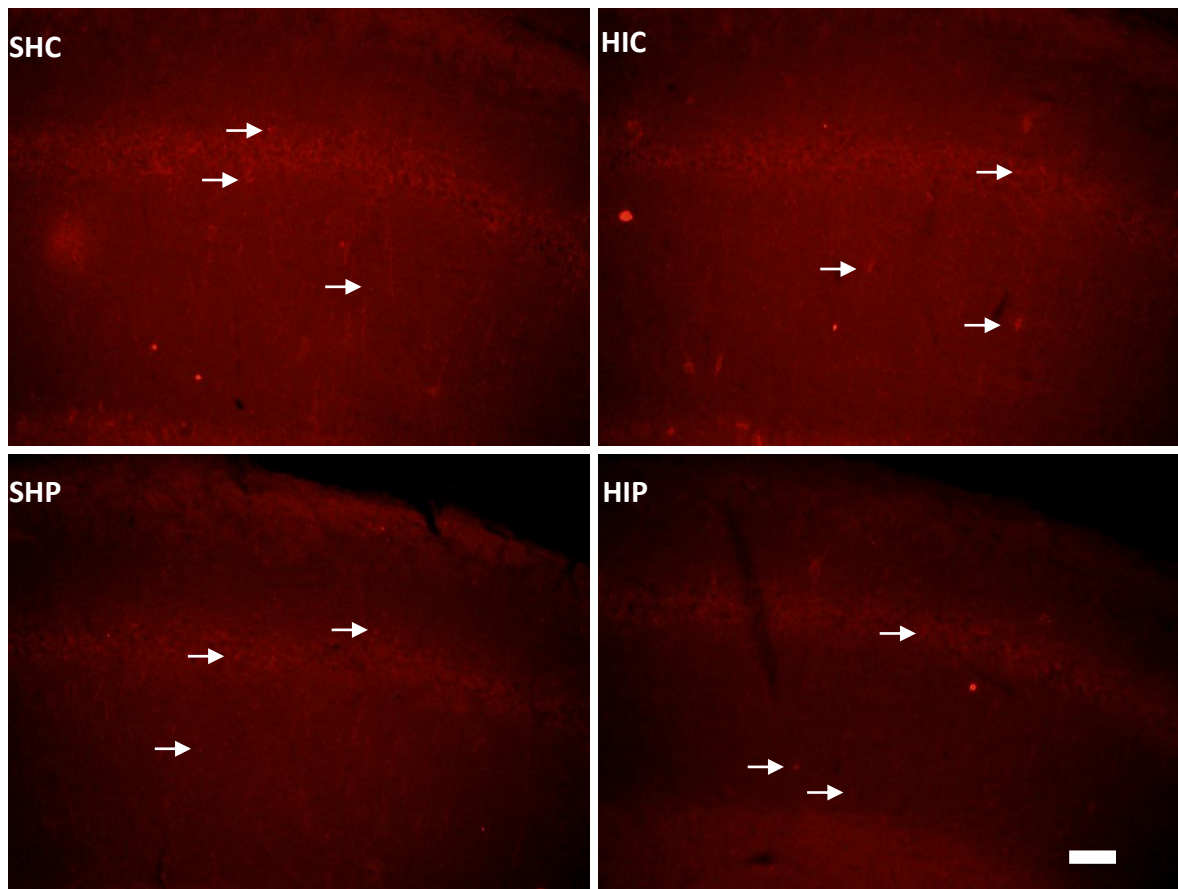
Legenda: Representação gráfica da densidade de imunomarcção do RGc na região GD do Hipocampo, em unidades arbitrárias (UA), de ratos SH e HI submetidos a PSP. Os valores estão expressos como média \pm EPM ($p < 0,05$).

Fonte: O autor, 2016.

3.3 Receptores de Mineralocorticoides

Nas regiões do CA1 a marcação para os RMn se encontra predominantemente na camada de neurônios piramidais. Nesta camada a marcação aparenta ser puntiforme e abrange todo o corpo celular. Algumas células isoladas foram encontradas no estrato radiato, em ambos os grupos, assim como no estrato Oriens (setas) (figura 22). Da mesma forma que com os RGc, observa-se uma marcação aparentemente mais intensa no estrato alveus no Grupo HIC (cabeças de seta).

Figura 22 - Imunorreatividade do RMn na CA1

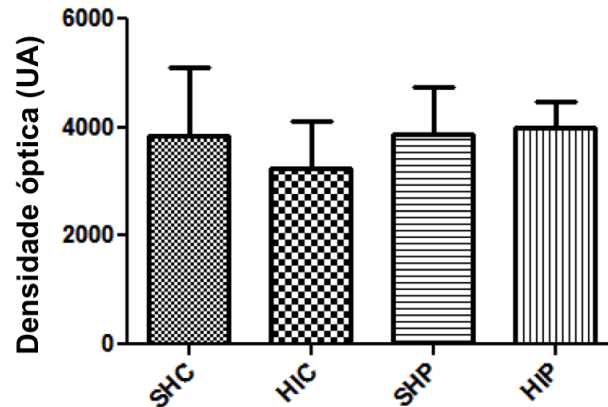


Legenda: Fotomicrografias representativas de secções da região CA1 do hipocampo reagidas com anticorpos para RMn.

Fonte: O autor, 2016.

Em relação aos RMn na região CA1, a avaliação de densidade de imunomarcção de RMn não mostrou diferença significativa entre os grupos tanto na camada piramidal (figura 23), quando na camada Alveus(figura 24).

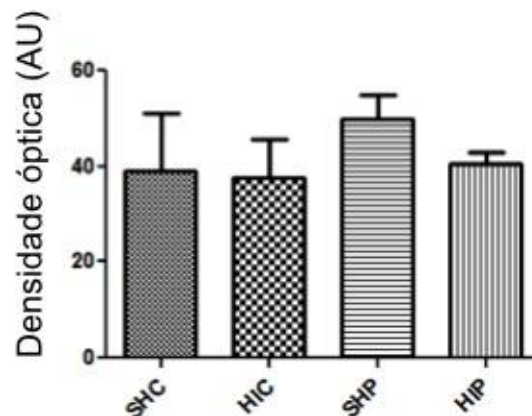
Figura 23 - Quantificação da imunomarcção dos RMn na região CA1 do hipocampo



Legenda: Representação gráfica da densidade de imunomarcção do RMn na região CA1 do hipocampo, em unidades arbitrárias (UA), de ratos SH e HI submetidos a PSP. Os valores estão expressos como média \pm EPM

Fonte: O autor, 2016.

Figura 24 - Quantificação da imunomarcção dos RMn na região CA1 do hipocampo



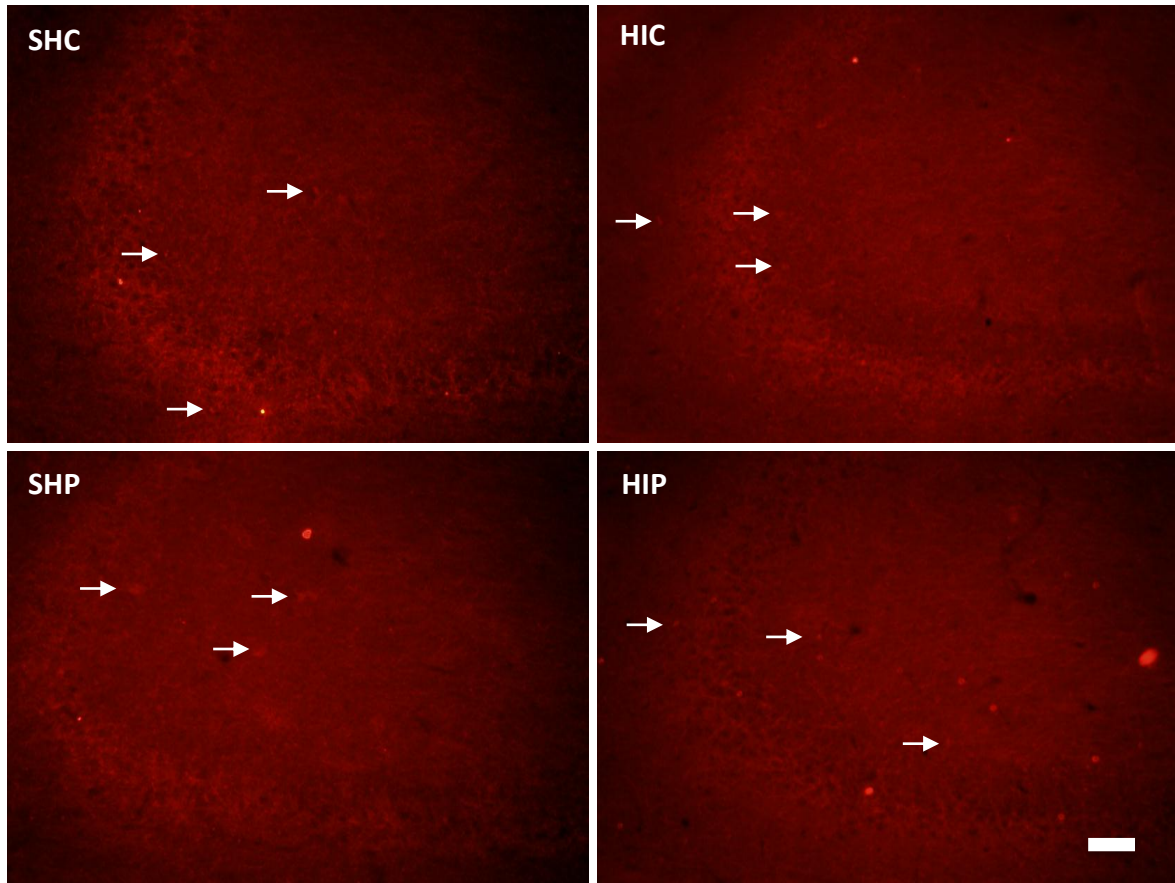
Legenda: Representação gráfica da densidade de imunomarcção do RMn na camada Alveus da região CA1 no hipocampo, em unidades arbitrárias (UA), de ratos SH e HI submetidos a PSP. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

Fonte: O autor, 2016.

Assim como Nas regiões do CA1, na região CA3 a marcação para os receptores RMn, se encontra predominantemente na camada de neurônios piramidais. Nesta camada a marcação aparenta ser puntiforme e abrange todo o corpo celular. Algumas células isoladas

foram encontradas no estrato radiato, em ambos os grupos, assim como no estrato Oriens (setas) (figura 25).

Figura 25 - Imunorreatividade do RMn na CA3

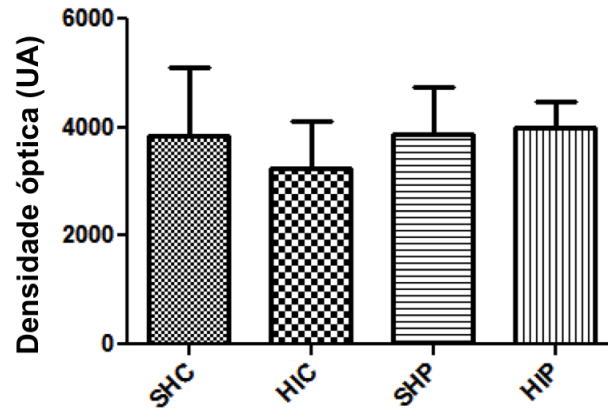


Legenda: Fotomicrografias representativas de secções da região CA3 do hipocampo reagidas com anticorpos para RMn.

Fonte: O autor, 2016.

Em relação ao receptores de Mineralocorticoidesna região CA3 (figura 26), a avaliação da densidade de imunomarcção não mostrou diferença significativa entre os grupos.

Figura 26 - Quantificação da imunomarcção dos RMn na região CA3 do hipocampo

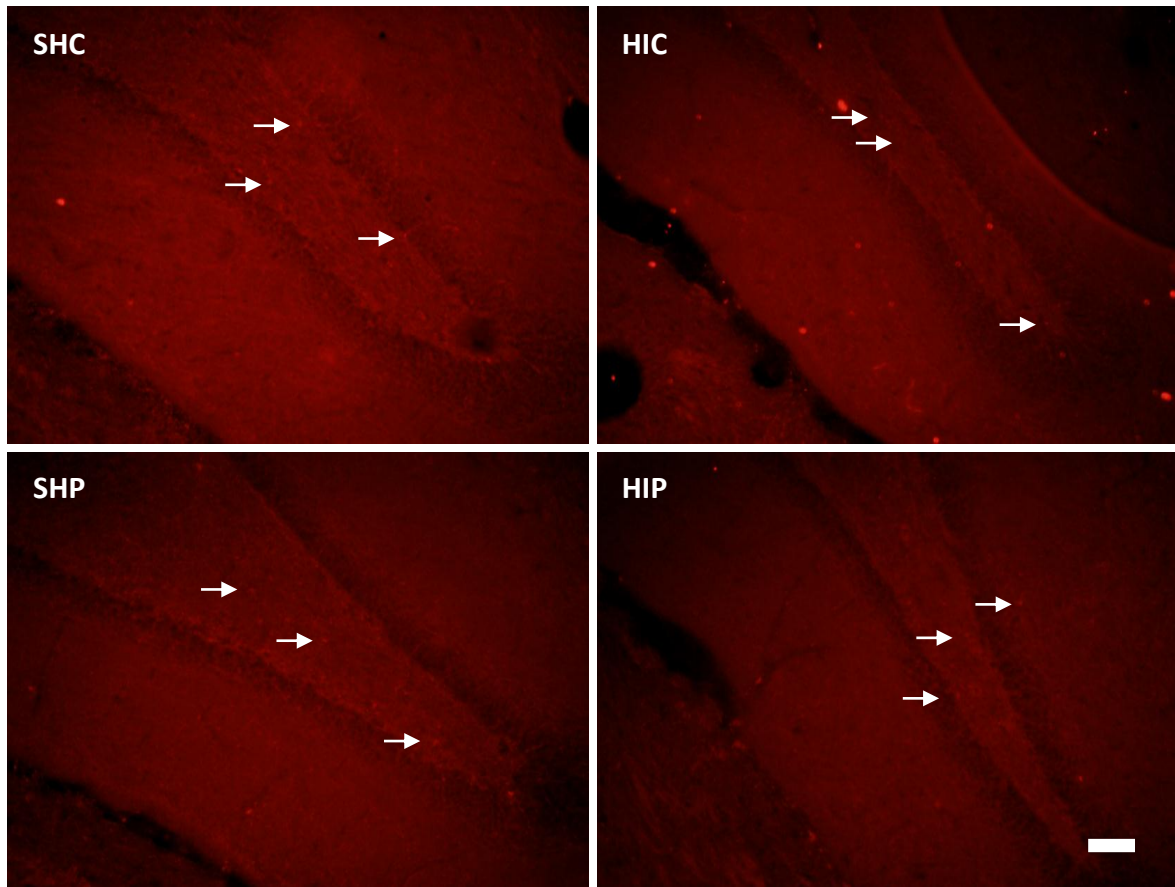


Legenda: Representação gráfica da densidade de imunomarcção do RMn na região CA3 do hipocampo, em unidades arbitrárias (UA), de ratos SH e HI submetidos a PSP. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

Fonte: O autor, 2016.

Nas regiões do GD, a marcação para RMn encontra-se predominantemente nas regiões do Hilo, camada granular e camada sub-granular. A marcação aparenta ser puntiforme e abrange todo o corpo celular (figura 27).

Figura 27 - Imunorreatividade do RMn na GD

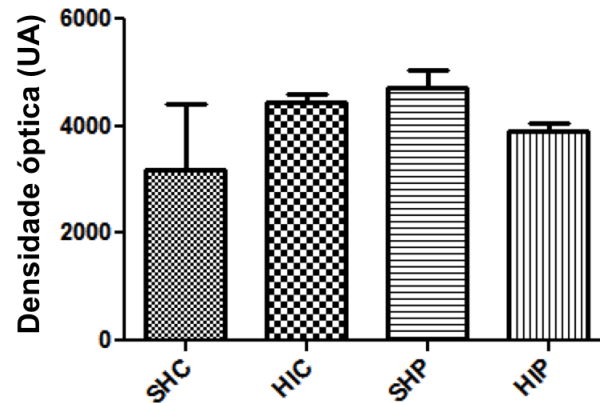


Legenda: Fotomicrografias representativas de secções da região GD do hipocampo reagidas com anticorpos para RMn.

Fonte: O autor, 2016.

Em relação ao receptores de Mineralocorticoides na região GD (figura 28), a avaliação da densidade de imunomarcção não mostrou diferença significativa entre os grupos.

Figura 28 - Quantificação da imunomarcção dos RMn na região GD do hipocampo



Legenda: Representação gráfica da densidade de imunomarcção do RMn na região GD do hipocampo, em unidades arbitrárias (UA), de ratos SH e HI submetidos a PSP. Os valores estão expressos como média ± EPM.

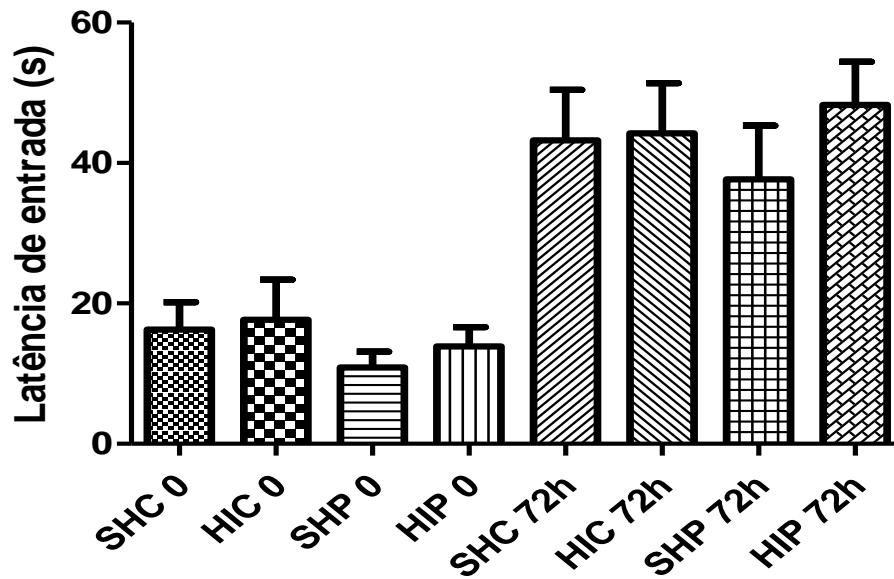
Fonte: O autor, 2016.

3.4 Avaliação de aprendizado e memória - Esquiva passiva

3.4.1 Protocolo I

No protocolo I, onde os animais foram treinados antes da privação, podemos observar que no primeiro momento todos os grupos apresentaram uma baixa latência de entrada. Após 72 horas, nota-se que ambos os grupos apresentam um aumento na latência de entrada, mostrando que houve o aprendizado (figura 29). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, (N=20). ($p > 0,05$)

Figura 29 - Latência de entrada na câmara escura



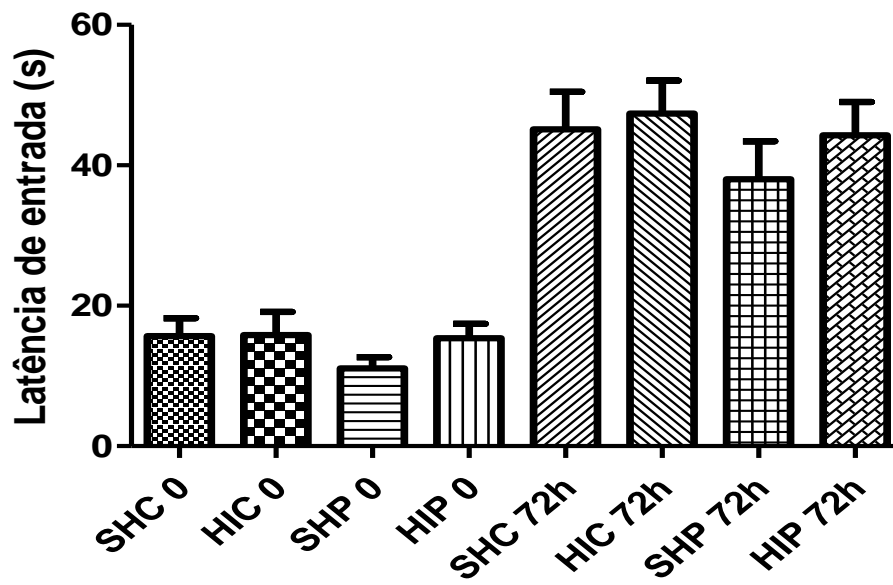
Legenda: Cada grupo é representado por uma barra e os dados são representados como média \pm EPM para cada grupo. HIC 0 – grupo HI controle; SHC 0 – Grupo Sham controle; HIP 0 – Grupo HI antes da PSP; SHP 0 – Grupo Sham antes da PSP; HIC 72h – Grupo HI controle após 72 horas; SHC72h – Grupo Sham controle após 72 horas; HIP72h – Grupo HI PSP por 72 horas; SHP72h – Grupo Sham PSP por 72 horas.

Fonte: O autor, 2016.

3.4.2 Protocolo II

No protocolo II, onde os animais foram treinados 6 horas antes do final de 72 horas de privação de sono, podemos observar que no primeiro momento ambos os grupos apresentaram uma baixa latência de entrada. Após completar 72 horas, nota-se que ambos os grupos apresentam um aumento na latência de entrada, mostrando que houve o aprendizado (figura 30). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, (N=13). ($p > 0,05$).

Figura 30 - Latência de entrada na câmara escura



Legenda: Cada grupo é representado por uma barra e os dados são representados como média \pm EPM. HIC 0 – grupo HI controle; SHC 0 – Grupo Sham controle; HIP 0 – Grupo HI antes da PSP; SHP 0 – Grupo Sham antes da PSP; HIC 72h – Grupo HI controle após 72 horas; SHC72h – Grupo Sham controle após 72 horas; HIP72h – Grupo HI PSP por 72 horas; SHP72h – Grupo Sham PSP por 72 horas.

Fonte: O autor, 2016.

4 DISCUSSÃO

Estudos com diversos modelos de HI como ligadura unilateral da artéria carótida e hipóxia hipobárica, tem sido utilizados nas últimas décadas, mas nenhum deles realmente replica os possíveis danos no SNC com intercorrência materna, inflamação, reperfusão do fluxo sanguíneo após a isquemia, eventos que acontecem em seres humanos. Neste trabalho foi utilizado o modelo de oclusão das artérias uterinas, que melhor mimetiza os eventos que acontecem em humanos.

Partindo da hipótese que já foi descrito que HI pode interferir na neurotransmissão GABAérgica, neste trabalho demonstramos que ratos adultos que sofreram HI pré-natal apresentam um aumento nos níveis da enzima GAD 67, no LC e no hipocampo. Esse aumento provavelmente se traduz em um aumento na quantidade do neurotransmissor GABA, já que a quantidade de enzima é proporcional a quantidade de neurotransmissor (Para revisão, ver: Ben-Ari, 2002). Estudos não publicados de nosso grupo já demonstraram que ratos que sofreram HI pré-natal apresentam aumento nos níveis de transportadores de Glutamato durante o desenvolvimento e na vida adulta e que também apresentam aumento de GAD no hipocampo aos 45 dias de vida. Então o aumento de GAD pode ser uma resposta adaptativa para conter o aumento da descarga excitatória provocada pelo glutamato. Sendo o hipocampo uma região sensível ao estresse e que ainda apresenta neurogênese na idade adulta, essa alteração nos níveis de enzima pode influenciar a neurogênese nessa região, já que como falado anteriormente, o GABA é um dos neurotransmissores envolvidos na modulação da neurogênese na região do GD.

Não existem dados na literatura que avaliem os níveis de GABA e que utilizem o mesmo modelo de HI ou as mesmas regiões. Dados de outros modelos de HI já demonstraram alterações nos níveis de GABA no SNC. Jiang e colaboradores (2014) demonstraram que ratos que sofreram HI, através do modelo de oclusão unilateral da artéria carótida aos 7 dias de vida, apresentaram um aumento nos níveis de GABA até 7 dias após a HI, no hipocampo. Já Catektepe e colaboradores (1996), utilizando o mesmo modelo de HI, demonstraram que HI é capaz de aumentar a concentração do neurotransmissor GABA no líquido cefalorraquidiano logo após o insulto. Acredita-se que o aumento de GABA, em ratos que sofreram HI, é uma resposta adaptativa, já que há um aumento na excitabilidade encefálica desses ratos. Já se sabe que uma perturbação na sinalização GABAérgica está envolvida na etiologia de várias

doenças do SNC, incluindo ansiedade, distúrbios do sono, epilepsia, depressão e dor crônica. Mas também já se sabe que essas alterações podem também ser benéficas em algumas doenças associadas à excitabilidade (Para revisão, ver: Ben-Ari, 2002).

O aumento da GAD observado na região do LC de animais HI adultos pode alterar as fases do sono, visto que o GABA é um dos neurotransmissores envolvidos na modulação do mesmo. Ray e colaboradores (2011) demonstraram, em um modelo de hipóxia hipobárica em ratos adultos, que na região do LC há uma redução na densidade de células marcadas para GAD e um aumento na densidade de células marcadas para TH, após 7 dias. No mesmo trabalho foram demonstradas alterações na arquitetura do sono nos ratos, com redução das fases paradoxal e NREM. Os autores sugerem que, durante a hipóxia nesse modelo, a liberação de GABA encontra-se reduzida e os neurônios REM-off sejam mais ativados, havendo uma maior liberação de noradrenalina e diminuição do sono paradoxal. Nosso trabalho demonstrou um resultado inverso, com aumento do GAD na vida adulta. Entretanto, é preciso considerar que o evento de hipóxia-isquemia foi realizado na vida intra-uterina (E18) e o que está sendo observado são os resultados ao longo prazo na plasticidade do sistema GABAérgico. Não se conhecem os efeitos em outros neurotransmissores envolvidos com a modulação do sono, noradrenalina e/ou acetilcolina neste modelo.

O passo seguinte do trabalho foi avaliar o efeito da HI pré-natal sobre receptores de corticosteroides no hipocampo. Imunohistoquímicas foram realizadas e foram medidas as intensidades de marcação nas regiões CA1, CA 3 e GD. Não foram observadas diferenças nas intensidades de marcação de RGc nas regiões CA1 e CA3 e granular da GD de ratos HI quando comparados aos ratos do grupo SH. Em relação aos RMn, observou-se um resultado semelhante, em que a HI pré-natal não foi capaz de afetar os RMn nos hipocampos na idade adulta. Não se sabe o que acontece em idades mais jovens, sendo necessários mais estudos em diferentes idades. Nossos resultados mostram que um evento de hipóxia-isquemia pré-natal não modifica o padrão de marcação dos receptores de corticosteróides na idade adulta.

Não existem estudos, abordando a distribuição de receptores de corticosteróides no hipocampo que utilizem o mesmo modelo usado nesse trabalho, nem outros modelos de HI pré-natal. Entretanto, outros estudos em modelos de hipóxia em adultos demonstraram alterações provocadas pela Hipóxia. Rybnikova e colaboradores (2011) através do modelo de hipóxia hipobárica em adultos, observaram que não houve alterações no número total de neurônios na região CA1 do hipocampo, mas houve um aumento de quase duas vezes na intensidade da marcação de RGc, na camada piramidal. Já na região do GD, houve uma redução no número de neurônios marcados e na intensidade da marcação, na camada granular.

Quanto aos RMn, houve uma redução drástica na imunomarcção, porém não houve alteração no número de células marcadas, tanto na região CA1 quanto no GD.

O passo seguinte do trabalho foi avaliar o aprendizado e memória de ratos adultos que sofreram HI pré-natal. Para a avaliação, foi utilizado o teste da esQUIVA passiva. Em uma visão geral, o teste consiste em duas câmaras interligadas, uma clara e outra escura, onde a câmara escura apresenta o chão eletrificado. Em um primeiro contato com o aparelho, os animais rapidamente entraram na câmara escura e recebem um choque. No segundo contato com o aparato, a latência de entrada tende a aumentar, pois os animais aprendem que a câmara escura é relacionada a choque. Foram utilizados dois protocolos: no primeiro, o segundo contato aconteceu 72 horas após o primeiro contato; e no segundo, o segundo contato aconteceu 6 horas após o primeiro contato. Assim como esperado, os animais, em ambos os grupos e protocolos, apresentaram uma baixa latência de entrada no primeiro contato e um aumento na latência de entrada, mostrando que os ratos aprenderam que a câmara escura é aversiva. Mas não houve diferença significativa entre os grupos em ambos os protocolos utilizados. Caso tenha acontecido algum dano no aprendizado e memória, ele não permaneceu até a idade adulta. Outros dados do laboratório já demonstraram dados semelhantes. Costa (2014) em sua dissertação demonstrou que ratos adultos, que sofreram HI pré-natal, não apresentam alterações no aprendizado e memória no teste de reconhecimento de objetos, corroborando os dados obtidos neste trabalho. Entretanto, cabe ressaltar que dados não publicados de nosso laboratório demonstraram que ratos HI aos 45 dias de vida apresentam alteração na memória através do teste de reconhecimento de objetos (Rodrigues, dados não publicados).

Sabendo das alterações provocadas nos níveis da enzima GAD no hipocampo e LC, o passo seguinte foi avaliar se a privação de sono paradoxal seria capaz de reverter as alterações provocadas pela HI pré-natal. Estudos da literatura já demonstraram que a PSP é capaz de reverter alguns danos no SNC. No modelo de Hipóxia hipobárica, Ramanathan e Siegel (2011) demonstraram que a PSP é capaz de alterar os níveis de enzimas antioxidantes e reduzir os danos provocados pelo estresse oxidativo na hipóxia. Vogel (1999) demonstrou que a PSP pode ser uma possível intervenção terapêutica para pacientes psiquiátricos depressivos que apresentam redução de GABA no SNC. Com isso, quisemos avaliar se a PSP é capaz de modificar os níveis de GAD e o padrão de marcação de corticosteróides observado nos ratos que sofreram HI pré-natal.

Após 72 horas de PSP, os níveis da enzima GAD continuam aumentados no hipocampo no grupo HIP. No LC, a PSP não altera os níveis de GAD no grupo SH, porém foi

capaz de reduzir os níveis da enzima no grupo HIP, que apresenta valores bem abaixo do grupo SH. Estudos da literatura demonstram que animais não manipulados apresentam alterações nos níveis de GAD em diversas regiões do SNC. Majumdar e Mallick (2003) demonstraram que ratos que passaram por PSP por 6 dias, pela técnica do pote de flor invertido, apresentam um aumento de GAD na região do LC. Já Vogel (1999) também demonstrou que a privação PSP aumenta os níveis de GABA no LC de ratos. Acredita-se que esse aumento está relacionado com o aumento da resposta inibitória de neurônios GABAérgicos. No entanto em nosso trabalho utilizamos a técnica de privação por apenas 72 horas o que poderia justificar os nossos resultados no grupo SH. Nossos resultados demonstram que, a PSP tem um efeito agudo levando a redução drástica da GAD no grupo HI, o que demonstra que os mecanismos plásticos que levaram ao aumento dos níveis de GAD desencadeado pela hipoxia-isquemia pré-natal são afetados pela PSP. Como os níveis de GAD no grupo HIP estão bem abaixo dos do grupo SH, permanece a questão se a PSP pode reverter os danos oriundos da hipoxia nesse modelo, entretanto os resultados sugerem que esse grupo é mais susceptível a uma nova situação de estresse.

Em relação aos receptores de corticosteroides, investigamos se a PSP *per se* induziria alteração nesses receptores ou se alteraria os receptores dos ratos expostos à hipóxia isquemia. A PSP não altera a intensidade de marcação nos animais do grupo SH. Já no grupo HI observamos que não houve alteração na intensidade de marcação de RGc nas regiões CA1 e CA3 dos ratos do grupo HIP, enquanto que na região do GD, houve um aumento na intensidade de marcação no grupo HIP quando comparado ao grupo HIC. Esses resultados reforçam a hipótese que ratos que sofrem HI pré-natal podem estar mais susceptíveis ao estresse agudo na idade adulta, como o induzido pela privação de sono. Muitos trabalhos já demonstraram que a PSP é capaz de alterar a expressão de RGc. Azogu e colaboradores (2015) demonstraram que 4 horas de PSP por 5 dias (restrição de sono) já é capaz de aumentar a expressão de RGc. No nosso trabalho apesar dos ratos serem privados de sono paradoxal pelo período de 72 horas, o grupo SH não teve aumento na intensidade de RGc. Talvez o tempo maior de privação possa explicar os resultados diferentes.

Com relação aos RMn, após a PSP, ratos de ambos os grupos (SH e HI) não apresentaram diferença na intensidade de marcação, mostrando que diferente dos RGc, os RMn podem ser menos sensíveis aos efeitos da HI pré-natal e da PSP.

Sabendo das alterações provocadas pela PSP nesses receptores, fomos avaliar o aprendizado e memória desses animais após a PSP, utilizando também os dois protocolos de teste. Assim como nos animais dos grupos SH e HI não privados, em um primeiro contato

com o aparato, os grupos SHP e HIP apresentaram uma baixa latência de entrada. Houve um aumento na latência de entrada no segundo contato, mas não houve diferença entre os grupos, em ambos os protocolos.

Estudos já descreveram que diferentes tipos de hipóxia podem gerar danos no aprendizado e memória observados até na idade adulta. Smith e colaboradores (2015) demonstraram, no modelo de oclusão da artéria carótida, que animais adultos hipóxico-isquêmicos apresentaram déficits no teste de labirinto aquático de oito braços apresentando um aumento na quantidade de erros, possivelmente porque a HI gera danos sistêmicos que afetam áreas associadas ao reconhecimento e mapeamento. Já Chiu e colaboradores (2012) demonstraram que ratos adultos que sofrem hipóxia hipobárica apresentam déficits de aprendizado e memória no teste de reconhecimento de objeto.

Já estudos sobre privação de sono demonstraram também alterações no aprendizado e memória. Azogu e colaboradores (2015) Demonstraram que 4 horas de PSP em um único dia já é suficiente para alterar a memória e aprendizado de animais no teste Y maze. Já Tiba e colaboradores (2008) demonstraram que a PSP por 96 horas, modelo de múltiplas plataformas, reduz o freezing de animais submetidos ao teste de condicionamento ao medo contextual. No entanto isso não foi visualizado em nossos resultados, nem nos animais do grupo SH.

CONCLUSÕES

Nossos dados demonstram alterações na enzima que sintetiza um dos neurotransmissores envolvido na modulação do sono, podendo sugerir uma alteração na arquitetura do sono, induzida pela HI.

A PSP reverte o aumento dos níveis de GAD induzida pela HI, somente no LC, demonstrando que a PSP tem efeitos agudos nesse modelo, assim como no modelo de hipóxia hipobárica.

A HI não foi capaz de alterar o balanço entre os receptores de RGc/RMn na região do hipocampo. Ratos hipoxico-isquêmicos após a PSP apresentaram um aumento na intensidade de marcação para os RGc na região do GD, sugerindo que esses animais sofreram alterações plásticas que os tornaram mais sensíveis ao insulto provocado pela PSP na vida adulta.

Apesar das alterações neuroquímicas no hipocampo, região já bem descrita como a responsável pelo aprendizado e memória, tanto a HI pré-natal quanto a PSP não foram capazes de alterar o aprendizado e memória nos ratos adultos.

REFERÊNCIAS

- Aghajanian GK, Cedarbaum JM, Wang RY. Evidence for norepinephrine-mediated collateral inhibition of locus coeruleus neurons. *Brain Res.* 1977 Nov 18;136(3):570-7.
- Alam MN, McGinty D, Szymusiak R. Preoptic/anterior hypothalamic neurons: thermosensitivity in rapid eye movement sleep. *Am J Physiol.* 1995 Nov;269(5 Pt 2):R1240-9.
- Albert I, Cicala GA, Siegel J. The behavioral effects of REM sleep deprivation in rats. *Psychophysiol. Psychophysiology.* 1970 Mar; 6(5): 550-60.
- Ali M, Jha S, Kaur S, Mallick BN. Role of GABA-A receptor in the preoptic area in the regulation of sleep-wakefulness and rapid eye movement sleep. *Neurosci Res.* 1999 Mar; 33(3):245-50.
- Almeida OF, Condé GL, Crochemore C, Demeneix BA, Fischer D, Hassan AH, Meyer M, Holsboer F, Michaelidis TM. Shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J.* 2000 Apr; 14(5):779-90.
- Amzica F, Steriade M. Progressive cortical synchronization of ponto-geniculo-occipital potentials during rapid eye movement sleep. *Neuroscience.* 1996 May;72(2):309-14.
- Andersson K, Blum M, Chen Y, Eneroth P, Gross J, Herrera-Marschitz M, Bjelke B, Bolme P, Diaz R, Jamison L Perinatal asphyxia increases bFGF mRNA levels and DA cell body number in the mesencephalon of rats. *Neuroreport.* 1995 Jan 26; 6(2):375-8.
- Antrobus J. REM and NREM sleep reports: comparison of word frequencies by cognitive classes. *Psychophysiology.* 1983 Sep;20(5):562-8.
- Arai N, Furukawa N, Miyamae T, Goshima Y, Sasaki Y, Ohshima E, Suzuki F, Fujita K, Misu Y. DOPA cyclohexyl ester, a competitive DOPA antagonist, protects glutamate release and resultant delayed neuron death by transient ischemia in hippocampus CA1 of conscious rats. *Neurosci Lett.* 2001 Feb 23;299(3):213-6.
- Azogu I, de la Tremblaye PB1, Dunbar M1, Lebreton M1, LeMarec N1, Plamondon H2. Acute sleep deprivation enhances avoidance learning and spatial memory and induces delayed alterations in neurochemical expression of GR, TH, DRD1, pCREB and Ki67 in rats. *Behav Brain Res.* 2015 Feb 15;279:177-90.
- Banks S, Dinges DF. Behavioral and physiological consequences of sleep restriction. *J Clin Sleep Med.* 2007 Aug 15; 3(5):519-28.
- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet.* 1993 Apr 10; 341(8850):938-41.

- Barker DJ, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG. Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. *Ann Hum Biol.* 2009 Sep-Oct;36(5):445-58.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev.* 1998 Jun;50(2):291-313.
- Battaglia FP, Benchenane K, Sirota A, Pennartz CM, Wiener SI. The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends Cogn Sci.* 2011 Jul;15(7):310-8.
- Baud O, Emilie D, Pelletier E, Lacaze-Masmonteil T, Zupan V, Fernandez H, Dehan M, Frydman R, Ville Y. Amniotic fluid concentrations of interleukin 1h, interleukin-6 and TNFa in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome. *Br J Obstet Gynaecol.* 1999 Jan;106(1):72-7.
- Beck B, Pourié G. Ghrelin, neuropeptide Y, and other feeding-regulatory peptides active in the hippocampus: role in learning and memory. *Nutr Rev.* 2013 Aug;71(8):541-61.
- Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Sep;3(9):728-39.
- Bennett MR. The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog Neurobiol.* 2000 Feb;60(2):109-37.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84(3):835-67.
- Bjelke B, Andersson K, Ogren SO, Bolme P. Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase- immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Res.* 1991 Mar 8;543(1):1-9.
- Brink M, Humbel BM, De Kloet ER, Van Driel R.. The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm. *Endocrinology.* 1992 Jun;130(6):3575-81.
- Brose SA, Marquardt AL, Golovko MY. Fatty acid biosynthesis from glutamate and glutamine is specifically induced in neuronal cells under hypoxia. *J Neurochem.* 2014 May;129(3):400-12.
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtsberg FW, Mattson MP. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med.* 1996 Jul;2(7):788-94.
- Bu DF, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Wagner-McPherson CB, Evans GA, Tobin AJ. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Mar 15;89(6):2115-9
- Burgess N, Maguire EA, O'keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron.* 2002 Aug 15;35(4):625-41.

- Burke RE, Kent J, Kenyon N, Karanas A. Unilateral hypoxic-ischemic injury in neonatal rat results in a persistent increase in the density of striatal tyrosine hydroxylase immunoperoxidase staining. *Brain Res Dev Brain Res*. 1991 Feb 22;58(2):171-9.
- Cartwright RD, Wood E. Adjustment disorders of sleep: the sleep effects of a major stressful event and its resolution. *Psychiatry Res*. 1991 Dec;39(3):199-209.
- Cataltepe O, Towfighi J, Vannucci RC. Cerebrospinal fluid concentrations of glutamate and GABA during perinatal cerebral hypoxia-ischemia and seizures. *Brain Res*. 1996 Feb 19;709(2):326-30.
- Chen M, Zhang L. Epigenetic mechanisms in developmental programming of adult disease. *Dr Drug Discov Today*. 2011 Dec;16(23-24):1007-18.
- Chen W, Kushida CA. Sleep deprivation - Basic science, physiology and behavior (1-3). Ed Marcel Dekker, New York. 2005.
- Chen YY, Wu ML, Kao MH, Su TH, Chen CP. Perinatal outcome of recurrent pre-eclampsia versus pre-eclampsia in nulliparas. *J Obstet Gynaecol Res*. 2009 Dec;35(6):1042-6.
- Chiriboga CA. Neurological correlates of fetal cocaine exposure. *Annals of the New York Academy of Sciences, Ann N Y Acad Sci*. 1998 Jun 21;846:109-25.
- Chiu GS, Chatterjee D, Darmody PT, Walsh JP, Meling DD, Johnson RW, Freund GG. Hypoxia/reoxygenation impairs memory formation via adenosine-dependent activation of caspase 1. *J Neurosci*. 2012 Oct 3;32(40):13945-55.
- Cirelli C, Tononi G. Is sleep essential? *PLoS Biol*. 2008 Aug 26;6(8):e216.
- Claro FT, Silva RH, Frussa-Filho R. Bovine brain phosphatidylserine attenuates scopolamine-induced amnesia. *Physiol Behav*. 1999 Oct;67(4):551-4.
- Cohem HL, Dement WC. Sleep: Changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after privation of paradoxical phase. *Science*. 1965 Dec 3;150(3701):1318-9.
- Costa, Everton Luiz Nunes. Avaliação morfofuncional do complexo hipocampal em ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal. Dissertação apresentada em 12 de março de 2014.
- Cottrell EC, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front Behav Neurosci*. 2009 Sep 7;3:19.
- Damasceno F, Skinner GO, Cordeiro JF, Ferraz MR, Almeida OM. Sleep deprivation affects sexual behavior and tyrosine hydroxylase (TH) levels in sexually experienced male rats. *Physiol Behav*. 2008 Jun 9;94(3):405-11.
- Damasceno F, Skinner GO, Gomes A, Araújo PC, de Almeida OM. Systemic amitriptyline administration does not prevent the increased thermal response induced by paradoxical sleep deprivation. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009 Nov;94(1):51-5.

- Dammann O, Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res*. 1997 Jul;42(1):1-8.
- De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Jun;6(6):463-75.
- De Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell Mol Neurobiol*. 1993 Aug;13(4):433-55.
- De Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci*. 1999 Oct;22(10):422-6.
- De Kloet, ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. *Endocr Rev*. 1998 Jun;19(3):269-301.
- Diamond DM, Bennett MC, Fleshner M, Rose GM. Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus*. 1992 Oct;2(4):421-30.
- Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. *Nat. Rev. Neurosci*. 2011 V. 11, n. 2, p. 114-26.
- Dionisio L, José De Rosa M, Bouzat C, Esandi Mdel C. An intrinsic GABAergic system in human lymphocytes. *Neuropharmacology*. 2011 Feb-Mar;60(2-3):513-9.
- Douma BR, Korte SM, Buwalda B, la Fleur SE, Bohus B, Luiten PG.. Repeated blockade of mineralocorticoid receptors, but not of glucocorticoid receptors impairs food rewarded spatial learning. *Psychoneuroendocrinology*. 1998 Jan;23(1):33-44.
- Dudley KJ1, Li X, Kobor MS, Kippin TE, Bredy TW. Epigenetic mechanisms mediating vulnerability and resilience to psychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011 Jun;35(7):1544-51.
- Edwards AD, Mehmet H. Apoptosis in perinatal hypoxic-ischaemic cerebral damage. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1996 Dec;22(6):494-8.
- Fann DY, Lee SY, Manzanero S, Chunduri P, Sobey CG, Arumugam TV. Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes. *Ageing Res Rev*. 2013 Sep;12(4):941-66.
- Feng Y, Bhatt AJ. Corticosteroid responses following hypoxic preconditioning provide neuroprotection against subsequent hypoxic-ischemic brain injury in the newborn rats. *Int J Dev Neurosci*. 2015 Aug;44:6-13.
- Ferraz MR, Ferraz MM, Santos R. How REM sleep deprivation and amantadine affects male rat sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001 Jul-Aug;69(3-4):325-32.
- Ferriero DM, Arcavi LJ, Sagar SM, McIntosh TK, Simon RP. Selective sparing of NADPH-diaphorase neurons in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol*. 1988 Nov;24(5):670-6.

Ferriero DM, Sheldon RA, Black SM, Chuai J. Selective destruction of nitric oxide synthase neurons with quisqualate reduces damage after hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Pediatr Res*. 1995 Dec;38(6):912-8.

Foy MR, Stanton ME, Levine S, Thompson RF. Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. *Behav Neural Biol*. 1987 Jul;48(1):138-49.

Freichel C, Potschka H, Ebert U, Brandt C, Löscher W. 2006. Acute changes in the neuronal expression of GABA and glutamate decarboxylase isoforms in the rat piriform cortex following status epilepticus. *Neuroscience*. 2006 Sep 15;141(4):2177-94.

Vogel GW. REM Sleep deprivation and behavioral changes, in: B.N. Mallick, S. Inoue (Eds.), *Rapid Eye Movement Sleep*, Marcel Dekker, New York, 1999, pp. 355–366.

Gais S, Rasch B, Dahmen JC, Sara S, Born J. The memory function of noradrenergic activity in non-REM sleep. *J Cogn Neurosci*. 2011 Sep;23(9):2582-92.

Gamel-Didelon K, Kunz L, Fohr KJ, Gratzl M, Mayerhofer A. Molecular and physiological evidence for functional gamma-aminobutyric acid (GABA)-C receptors in growth hormone-secreting cells. *J Biol Chem*. 2003 May 30;278(22):20192-5.

Gluckman P, Hanson M. Echoes of the past: Evolution, development, health and disease. *Discov Med*. 2004 Dec;4(24):401-7.

Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med*. 2008 Jul;359(1):61-73.

Gordon KE, Simpson J, Statman D, Silverstein FS. Effects of perinatal stroke on striatal amino acid efflux in rats studied with in vivo microdialysis. *Stroke*. 1991 Jul;22(7):928-32.

Gourfinkel-An I, Parain K, Hartmann A, Mangiarini L, Brice A, Bates G, Hirsch EC. Changes in GAD67 mRNA expression evidenced by in situ hybridization in the brain of R6/2 transgenic mice. *J Neurochem*. 2003 Sep;86(6):1369-78.

Greene RW, Carpenter DO. Actions of neurotransmitters on pontine medial reticular formation neurons of the cat. *J Neurophysiol*. 1985 Sep;54(3):520-31.

Guo QH, Tian YL, Wang Z, Li AY, Ma ZH, Guo YJ, Weiss JW, Ji ES, Chu L. Endothelin receptors in augmented vasoconstrictor responses to endothelin-1 in chronic intermittent hypoxia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013 Jul;40(7):449-57.

Onen HS, Allowi A, Jourdan D, Eschalié A, Dubray C. Effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on pain sensitivity in the rat. *Brain Res*. 2001 May 11;900(2):261-7.

Hallak M, Hotra JW, Kupsky WJ. Magnesium sulfate protection of fetal rat brain from severe maternal hypoxia. *Obstet Gynecol*. 2000 Jul;96(1):124-8.

Harris A, Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav*. 2011 Mar;59(3):279-89.

- Hassan AH, von Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OF. Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp Neurol.* 1996 Jul;140(1):43-52.
- Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, de Kloet ER, Lightman SL, Lupien SJ, Roozendaal B, Seckl JR. Do corticosteroids damage the brain? *J Neuroendocrinol.* 2006 Jun;18(6):393-411.
- Herman JP, Patel PD, Akil H, Watson SJ. Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Mol Endocrinol.* 1989 Nov;3(11):1886-94.
- Higgins RD. *et al.* Hypothermia and other treatment options for neonatal encephalopathy: an executive summary of the Eunice Kennedy Shriver NICHD workshop. *J Pediatr.* 2011 Nov;159(5):851-858.e1.
- Hobson JA. *Sleep and dreaming: Fundamental neuroscience.* Academic Press, New York. 1999
- Itoh T, Beesley J, Itoh A, Cohen AS, Kavanaugh B, Coulter DA, Grinspan JB, Pleasure D. AMPA glutamate receptor-mediated calcium signaling is transiently enhanced during development of oligodendrocytes. *J Neurochem.* 2002 Apr;81(2):390-402.
- Jessberger S, Clark RE, Broadbent NJ. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn Mem.* 2009 Jan 29;16(2):147-54.
- Jiang H1, Lei JJ2, Zhang YH2. Protective effect of topiramate on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat. *Asian Pac J Trop Med.* 2014 Jun;7(6):496-500.
- Joëls M, Karst H, Alfarez D, Heine VM, Qin Y, van Riel E, Verkuyl M, Lucassen PJ, Krugers HJ. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress.* 2004 Dec;7(4):221-31.
- Joels M. Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 2008 Apr 7;583(2-3):312-21.
- Jouvet D, Vimont P, Delorme F, Jouvet M. Étude de la privation selective de la phase paradoxale de sommeil chez le chat. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1964;158:756-9.
- Jouvet M. Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep. *Arch Ital Biol.* 1962;100:125-206.
- Kaur S, Saxena RN, Mallick BN. GABA in locus coeruleus regulates spontaneous rapid eye movement sleep by acting on GABAA receptors in freely moving rats. *Neurosci Lett.* 1997 Feb 21;223(2):105-8.
- Kavanaugh B, Beesley J, Itoh T, Itoh A, Grinspan J, Pleasure D. Neurotrophin-3 (NT-3) diminishes susceptibility of the oligodendroglial lineage to AMPA glutamate receptor-

- mediated excitotoxicity. *J Neurosci Res.* 2000 Jun 15;60(6):725-32.
- Kesner RP. A behavioral analysis of dentate gyrus function. *Prog Brain Res.* 2007;163:567-76.
- Kharakoz DP. Brain temperature and sleep. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova.* 2013 Jan-Feb;63(1):113-24.
- Kim JJ, Haller J. Glucocorticoid hyper- and hypofunction: stress effects on cognition and aggression. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Oct;1113:291-303.
- Kinney HC, Back SA. Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia. *Semin Pediatr Neurol.* 1998 Sep;5(3):180-9.
- Lai M, Horsburgh K, Bae SE, Carter RN, Stenvers DJ, Fowler JH, Yau JL, Gomez-Sanchez CE, Holmes MC, Kenyon CJ, Seckl JR, Macleod MR. Forebrain mineralocorticoid receptor overexpression enhances memory, reduces anxiety and attenuates neuronal loss in cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci.* 2007 Mar;25(6):1832-42.
- Lai MC, Yang SN. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:609813
- Langston RF, Stevenson CH, Wilson CL, Saunders I, Wood ER. The role of hippocampal sub-regions in memory for stimulus associations. *Behav Brain Res.* 2010 Dec 31;215(2):275-91.
- Laptook AR, Corbett RJ. The effects of temperature on hypoxic-ischemic brain injury. *Clin Perinatol.* 2002 Dec;29(4):623-49.
- Lavie P. Sleep disturbances in the wake of traumatic events. *N Engl J Med.* 2001 Dec 20;345(25):1825-32.
- Lélis AL, Cardoso MV, Hall WA. Sleep disorders in children with cerebral palsy: An integrative review. *Sleep Med Rev.* 2015 Dec 11;30:63-71.
- Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *m J Pathol.* 1960 Jan;36:1-17.
- Li G, Xiao Y, Estrella JL, Duksay CA, Gilbert RD, Zhang L. Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat. *J Soc Gynecol Investig.* 2003 Jul;10(5):265-74.
- Li HB, Jackson MF, Yang K, Trepanier C, Salter MW, Orser BA, Macdonald JF. Plasticity of synaptic GluN receptors is required for the Src-dependent induction of long-term potentiation at CA3-CA1 synapses. *Hippocampus.* 2011 Oct;21(10):1053-61.
- Li Y, Gonzalez P, Zhang L. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: mechanisms and possible interventions. *Prog Neurobiol.* 2012 Aug;98(2):145-65.
- Lomo T. The discovery of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*

2003 Apr 29;358(1432):617-20.

Luine V, Spencer RL, McEwen BS. Effects of chronic corticosterone ingestion on spatial memory performance and hippocampal serotonergic function. *Brain Res.* 1993 Jul 9;616(1-2):65-70.

Luine V, Villegas M, Martinez C, McEwen BS. Stress-dependent impairments of spatial memory. Role of 5-HT. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Nov 30;746:403-4.

Lupien SJ, Maheu F, Tu M, Fiocco A, Schramek TE. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn.* 2007 Dec;65(3):209-37.

Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):87-136.

Machado RB, Hipólido DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: Quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res.* 2004 Apr 9;1004(1-2):45-51.

Majumdar S, Mallick BN. Increased levels of tyrosine hydroxylase and glutamic acid decarboxylase in locus coeruleus neurons after rapid eye movement sleep deprivation in rats. *Neurosci Lett.* 2003 Mar 6;338(3):193-6.

Mallick BN, Kaur S, Saxena RN. Interactions between cholinergic and GABAergic neurotransmitters in and around the locus coeruleus for the induction and maintenance of rapid eye movement sleep in rats. *Neuroscience.* 2001;104(2):467-85.

Rodrigues, Marta Cristina da Cunha. Efeito da Hipóxia-isquemia pré-natal durante o desenvolvimento: Receptores e transportadores glutamatérgicos e comunicação celular *in vitro*. Dissertação apresentada em 14 de março de 2014.

Martin DL, Rimvall K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem.* 1993 Feb;60(2):395-407.

McCoy JG, Strecker RE. The cognitive cost of sleep lost. *Neurobiol Learn Mem.* 2011 Nov;96(4):564-82.

McEwen BS, Sapolsky RM. Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol.* 1995 Apr;5(2):205-16.

McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol.* 2008 Apr 7;583(2-3):174-85.

Meerlo P, Easton A, Bergmann BM, Turek FW. Restraint increases prolactin and REM sleep in C57BL/6J mice but not in BALB/cJ mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001 Sep;281(3):R846-54.

Meerlo P, Pragt BJ, Daan S. Social stress induces high intensity sleep in rats. *Neurosci Lett.* 1997 Mar 28;225(1):41-4.

Mendu SK, Bhandage A, Jin Z, Birnir B. Different subtypes of GABA-A receptors are expressed in human, mouse and rat T lymphocytes. *PLoS One*. 2012;7(8):e42959.

Mohapatra N, Tønnesen J, Vlachos A, Kuner T, Deller T, Nägerl UV, Santamaria F, Jedlicka P. Spines slow down dendritic chloride diffusion and affect short-term ionic plasticity of GABAergic inhibition. *Sci Rep*. 2016 Mar 18;6:23196.

Mol EM, Monbaliu E, Ven M, Vergote M, Prinzie P. The use of night orthoses in cerebral palsy treatment: sleep disturbance in children and parental burden or not?. *Res Dev Disabil*. 2012 Mar-Apr;33(2):341-9.

Munck A, Mendel DB, Smith LI, Orti E.. Glucocorticoid receptors and actions. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Feb;141(2 Pt 2):S2-10.

Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, Blue ME, Johnston MV. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci*. 2000 Nov 1;20(21):7994-8004.

Nelson KB, Grether JK, Dambrosia JM, Walsh E, Kohler S, Satyanarayana G, Nelson PG, Dickens BF, Phillips TM. Neonatal cytokines and cerebral palsy in very preterm infants. *Pediatr Res*. 2003 Apr;53(4):600-7.

Newman C, O'Regan M, Hensey O. Sleep disorders in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol*. 2006 Jul;48(7):564-8.

Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ. Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiol Dis*. 2001 Apr;8(2):207-19.

Ohayon MM, Carskadon MA, Guilleminault C, Vitiello MV. Meta-analysis of quantitative sleep parameters from childhood to old age in healthy individuals: developing normative sleep values across the human lifespan. *Sleep*. 2004 Nov 1;27(7):1255-73.

Oitzl MS, van Haarst AD, de Kloet ER. Behavioral and neuroendocrine responses controlled by the concerted action of central mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid receptors (GR). *Psychoneuroendocrinology*. 1997;22 Suppl 1:S87-93.

Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev*. 2008 Sep;60(3):243-60.

Palmer C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. Therapeutic approaches against microvascular injury, and role of neutrophils, PAF, and free radicals. *Clin Perinatol*. 1995 Jun;22(2):481-517.

Panjwani U, Thakur L, Anand JP, Banerjee PK.. Sleep architecture at 3500 m in a sample of Indian. *Sleep Biol Rhythm*. 2007 5, 159–165.

- Patterson AJ, Chen M, Xue Q, Xiao D, Zhang L. Chronic prenatal hypoxia induces epigenetic programming of PKCe gene repression in rat hearts. *Circ Res*. 2010 Aug 6;107(3):365-73.
- Pavlidis C, Watanabe Y, Magariños AM, McEwen BS. Opposing roles of type I and type II adrenal steroid receptors in hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience*. 1995 Sep;68(2):387-94.
- Pavlidis C, Watanabe Y, McEwen BS. Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus*. 1993 Apr;3(2):183-92.
- Peeters-Scholte C, Braun K, Koster J, Kops N, Blomgren K, Buonocore G, van Buul-Offers S, Hagberg H, Nicolay K, van Bel F, Groenendaal F. Effects of allopurinol and deferoxamine on reperfusion injury of the brain in newborn piglets after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res*. 2003 Oct;54(4):516-22.
- Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther*. 2006 Sep;28(9):1353-65.
- Philip P, Akerstedt T. Transport and industrial safety, how are they affected by sleepiness and sleep restriction? *Sleep Med Rev*. 2006 Oct;10(5):347-56.
- Pinal CS, Tobin AJ. Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspect Dev Neurobiol*. 1998;5(2-3):109-18.
- Pinto, Camila Rodrigues Athayde. Avaliação da distribuição de receptores NMDA-2B e da astrogliose no hipocampo de ratos submetidos a um modelo de Hipóxia-isquemia pré-natal. Monografia apresentada em 2015.
- Pryce C. Postnatal ontogeny of expression of the corticosteroid receptor genes in mammalian brains: Inter-species and intra-species differences. *Brain Res Rev*. 2008 Mar;57(2):596-605.
- Ramanathan L, Siegel JM. Sleep deprivation under sustained hypoxia protects against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2011 Nov 15;51(10):1842-8.
- Rauchs G, Desgranges B, Foret J, Eustache F. The relationships between memory systems and sleep stages. *J Sleep Res*. 2005 Jun;14(2):123-40.
- Ray K, Dutta A, Panjwani U, Thakur L, Anand JP, Kumar S. Hypobaric hypoxia modulates brain biogenic amines and disturbs sleep architecture. *Neurochem Int*. 2011 Jan;58(1):112-8.
- Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Gilliland MA. Sleep deprivation in the rat: x. Integration and discussion of the findings. *Sleep*. 1989 Feb;12(1):68-87.
- Rechtschaffen A, Bergmann BM. Sleep deprivation in rats: an update of the 1989 paper. *Sleep*. 2002 Feb 1;25(1):18-24.
- Rechtschaffen A, Siegel J. Sleep and dreaming. Principles of neural science. 4th ed., McGraw-hill, New York, 2000.

Rees S, Harding R, Walker D. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. *Int J Dev Neurosci*. 2011 Oct;29(6):551-63.

Reinoso-Suárez F, de Andrés I, Rodrigo-Angulo ML, Garzón M. Brain structures and mechanisms involved in the generation of REM sleep. *Sleep Med Rev*. 2001 Aug;5(4):323-342.

Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*. 1981 Feb;9(2):131-41.

Robinson S, Petelenz K, Li Q, Cohen ML, Dechant A, Tabrizi N, Bucek M, Lust D, Miller RH. Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic-ischemic insults in rats. *Neurobiol Dis*. 2005 Apr;18(3):568-81.

Rogalska J. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in hippocampus: their impact on neurons survival and behavioral impairment after neonatal brain injury. *Vitam Horm*. 2010;82:391-419.

Romeo DM, et al. Sleep disturbances in preschool age children with cerebral palsy: a questionnaire study. *Sleep Med*. 2014 Sep;15(9):1089-93.

Romijn HJ, Janszen AW, van Voorst MJ, Buijs RM, Balázs R, Swaab DF. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. The proportion of GABA immunoreactive neurons in the cerebral cortex of the rat. *Brain Res*. 1992 Oct 2;592(1-2):17-28.

Rueda-Clausen CF, Morton JS, Davidge ST. Effects of hypoxia-induced intrauterine growth restriction on cardiopulmonary structure and function during adulthood. *Cardiovasc Res*. 2009 Mar 1;81(4):713-22.

Ruskin DN, Dunn KE, Billiot I, Bazan NG, LaHoste GJ. Eliminating the adrenal stress response does not affect sleep deprivation-induced acquisition deficits in the water maze. *Life Sci*. 2006 May 8;78(24):2833-8.

Rybnikova E, Glushchenko T, Churilova A, Pivina S, Samoilov M. Expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in hippocampus of rats exposed to various modes of hypobaric hypoxia: Putative role in hypoxic preconditioning. *Brain Res*. 2011 Mar 24;1381:66-77.

Sandi C, Pinelo-Nava MT. Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plast*. 2007 Apr 15;2007:78970.

Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 2000 Oct;57(10):925-35.

Seckl JR, Meaney MJ. Glucocorticoid programming. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Jun;1024:182-212.

Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*. 2001 Mar 15;410(6826):372-6.

Shors TJ. Memory traces of trace memories: neurogenesis, synaptogenesis and awareness. *Trends Neurosci.* 2004 May;27(5):250-6.

Shors TJ. Significant life events and the shape of memories to come: a hypothesis. *Neurobiol Learn Mem.* 2006 Mar;85(2):103-15.

Siegel JM. Sleep viewed as a state of adaptive inactivity. *Nat Rev Neurosci.* V. 10, n.10, p. 747-53, 2009.

Siegel JM. The REM sleep-memory consolidation hypothesis. *Science.* 2001 Nov 2;294(5544):1058-63.

Silver H, Goodman C, Bilker WB. Impairment in associative memory in healthy aging is distinct from that in other types of episodic memory. *Psychiatry Res.* 2012 May 15;197(1-2):135-9.

Silverstein F, Johnston MV. Effects of hypoxia-ischemia on monoamine metabolism in the immature brain. *Ann Neurol.* 1984 Apr;15(4):342-7.

Silverstein FS, Naik B, Simpson J. Hypoxia-ischemia stimulates hippocampal glutamate efflux in perinatal rat brain: An in vivo microdialysis study. *Pediatr Res.* 1991 Dec;30(6):587-90.

Simard-Tremblay E, Constantin E, Gruber R, Brouillette RT, Shevell M. Sleep in children with cerebral palsy: a review. *J Child Neurol* 2011 Apr 7;26:1303e10.

Simbruner G, Mittal RA, Rohlmann F, Mucche R. Systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: outcomes of neo. neuro. network RCT. *Pediatrics.* 2010 Oct;126(4):e771-8.

Skinner GO, Damasceno F, Gomes A, de Almeida OM. Increased pain perception and attenuated opioid antinociception in paradoxical sleep-deprived rats are associated with reduced tyrosine hydroxylase staining in the periaqueductal gray matter and are reversed by L-DOPA. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011 Jul;99(1):94-9.

Sloan MA. The effect of deprivation of rapid eye movement (REM) sleep on male learning and aggression in the albino rat. *J Psychiatr Res.* 1972 Jun;9(2):101-11.

Smith HK, Russell JM, Granger DN, Gavins FN. Critical differences between two classical surgical approaches for middle cerebral artery occlusion-induced stroke in mice. *J Neurosci Methods.* 2015 Jul 15;249:99-105.

Tata DA, Markostamou I, Ioannidis A, Gkioka M, Simeonidou C, Anogianakis G, Spandou E. Effects of maternal separation on behavior and brain damage in adult rats exposed to neonatal hypoxia-ischemia. *Behav Brain Res.* 2015 Mar 1;280:51-61.

Tekkök SB, Goldberg MP. AMPA/kainate receptor activation mediates hypoxic oligodendrocyte death and axonal injury in cerebral white matter. *J Neurosci.* 2001 Jun 15;21(12):4237-48.

- Tiba PA, Oliveira MG, Rossi VC, Tufik S, Suchecki D. Glucocorticoids are not responsible for paradoxical sleep deprivation-induced memory impairments. *Sleep* 2008;31:505–15.
- Tillakaratne NJ, Medina-Kauwe L, Gibson KM. Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1995 Oct;112(2):247-63.
- Tong W, Xue Q, Li Y, Zhang L. Maternal hypoxia alters matrix metallo- proteinase expression patterns and causes cardiac remodeling in fetal and neonatal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Nov;301(5):H2113-21.
- Tong W, Zhang L. Fetal hypoxia and programming of matrix metalloproteinases. *Drug Discov Today*. 2011 Feb;17(3-4):124-34.
- Tufik S, Andersen ML, Bittencourt LR, Mello MT. Paradoxical sleep Deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *An Acad Bras Cienc*. 2009 Sep;81(3):521-38.
- Van Eekelen JA, Jiang W, De Kloet ER, Bohn MC. Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. *J Neurosci Res*. 1988 Sep;21(1):88-94.
- Vannucci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*. 1997 Dec;100(6):1004-14.
- Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol*. 2000;17(3):113-20.
- Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res*. 2001 Nov;50(5):553-62.
- Waagepetersen HS, Sonnewald U, Schousboe A. The GABA paradox: multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent. *J Neurochem*. 1999 Oct;73(4):1335-42.
- Wagner U, Born J. Memory consolidation during sleep: Interactive effects of sleep stages and HPA regulation. *Stress*. 2008 Jan;11(1):28-41.
- Warner MJ, Ozanne SE. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J*. 2010 Apr 14;427(3):333-47.
- Weber P, Bolli P, Heimgartner N, Merlo P, Zehnder T, Kätterer C. Behavioral and emotional problems in children and adults with cerebral palsy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2016 Mar;20(2):270-4.
- Williams JA, Reiner PB. Noradrenaline hyperpolarizes identified rat mesopontine cholinergic neurons in vitro. *J Neurosci*. 1993 Sep;13(9):3878-83.
- Wolf OT. HPA axis and memory. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2003 Jun;17(2):287-99.

Xu L, Anwyl R, Rowan MJ. Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. *Nature*. 1997 May 29;387(6632):497-500.

Yang T, Zhuang L, Terrando N, Wu X, Johnson MR, Maze M, Ma D. A clinically relevant model of perinatal global ischemic brain damage in rats. *Brain Res*. 2011 Apr 6;1383:317-23.

Zhang X, Sliwowska JH, Weinberg J. Prenatal alcohol exposure and fetal programming: effects on neuroendocrine and immune function. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005 Jun;230(6):376-88.

Zhang Z, Deng L, Yu H, Shi Y, Bai F, Xie C, Yuan Y, Jia J, Zhang Z. Association of angiotensin-converting enzyme functional gene I/D polymorphism with amnesic mild cognitive impairment. *Neurosci Lett*. 2012 Apr 11;514(1):131-5.

Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):645-60.