



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

Mariana Alencar Cavalheira

Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal e da separação materna no risco cardiovascular e no comportamento de ratos

Rio de Janeiro

2022

Mariana Alencar Cavalheira

Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal e da separação materna no risco cardiovascular e no comportamento de ratos

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Dayane Teixeira Ognibene

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz

Rio de Janeiro

2022

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

C377 Cavalheira, Mariana Alencar.
Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal e da separação materna no risco cardiovascular e no comportamento de ratos / Mariana Alencar Cavalheira. - 2022.
84f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Dayane Teixeira Ognibene
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz

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

1. Hipóxia-Isquemia Encefálica – Teses. 2. Endotélio – Teses. 3. Depressão – Teses. 4. Ansiedade de Separação. I. Ognibene, Dayane Teixeira. II. Ferraz, Marcos Rochedo. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-053.31

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Mariana Alencar Cavalheira

Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal e da separação materna no risco cardiovascular e no comportamento de ratos

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

Aprovada em 21 de fevereiro de 2022.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Dayane Teixeira Ognibene (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Fernanda Carla Ferreira de Brito

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho para Maria Adelaide
Carvalho, minha avó e maior saudade. A senhora esteve presente todos os dias. Te amo, para
sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que permitiu que eu chegasse até aqui. Esses anos não foram fáceis e tenho certeza que o Senhor me abençoou e guiou os meus passos durante a trajetória.

Agradeço a melhor parte de mim. Meus melhores amigos, confidentes, espelhos e fortaleza. Meus pais, Patricia e Carlos. Sou muito privilegiada por ter pais tão maravilhosos, que sempre me ofereceram a melhor educação, por me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos e me darem o apoio necessário. Sem vocês eu certamente não seria nada. Como sempre digo, o meu dia pode ter sido péssimo, mas se terminar com nós três assistindo a uma série na sala, junto do nosso Apolinho, estarei completa. Eu amo vocês. Estendo aqui os meus agradecimentos para toda a minha família, por todo carinho e amor.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Dayane Teixeira Ognibene, por ter aceito essa orientação. Sempre com muito carinho, dedicação, apoio e incentivo me ajudou muito durante todo o mestrado. Sem dúvidas tenho muita sorte e serei eternamente grata pela oportunidade.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz, por estar nessa jornada desde a iniciação científica e por ter aberto as portas da ciência para mim. Agradeço tudo o que o senhor fez por mim ao longo de todos esses anos.

Agradeço aqueles que me ajudaram imensamente durante o mestrado. À Sabrina, por ter dividido o início desse projeto comigo, compartilhando tardes e finais de semana de separação materna e testes de comportamento. Aos meus novos amigos do LFCPM que foram sempre solícitos e pelo ambiente tão agradável e acolhedor. Em especial, agradeço aqueles que foram essenciais para que eu conseguisse finalizar esse trabalho: Beatriz, Ricardo, Dafne, Matheus Pontes, Flávia e Douglas. Obrigada por toda a ajuda, parceria e paciência. Agradeço também a todas as professoras do LFCPM, pelo espaço e por manterem um laboratório que nos oferece tudo de melhor e permite que os trabalhos sejam desenvolvidos da melhor forma possível.

À minha amiga/irmã Thamires por estar comigo em todos os momentos da minha vida, segurando minha mão e me apoiando. A nossa irmandade é um presente. Agradeço também as minhas eternas biogatas, Anna, Carolina, Caroline e Karina pela amizade que construímos desde a graduação.

À Deise Figueiredo, por me ajudar a buscar a minha melhor versão, sempre com muito carinho e empatia.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Sem dúvidas eu não teria conseguido realizar esse trabalho sem a ajuda de cada um de vocês. Obrigada a todos que estiveram comigo ao longo desses anos.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

CAVALHEIRA, Mariana Alencar. **Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal e da separação materna no risco cardiovascular e no comportamento de ratos**, 2022. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Eventos estressantes no período perinatal podem ser determinantes para a gênese de patologias, tendo em vista que a presença de estressores no período perinatal tem sido associado ao aumento da susceptibilidade a desordens psiquiátricas, como a ansiedade e a depressão, e doenças cardiovasculares. No presente estudo, ratos foram submetidos à hipóxia-isquêmica pré-natal (HI) e à separação materna (SM), para mimetizar estressores pré e pós-natal, respectivamente. Logo, o objetivo do presente estudo consiste em avaliar os efeitos da HI e SM, isoladamente e em combinação, no risco cardiovascular e nos comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo. No 18º dia gestacional, fêmeas *Wistar* grávidas foram divididas aleatoriamente em grupo controle (CN), controle cirúrgico (SHAM) e hipóxia-isquêmica (HI). As ratas HI tiveram seus cornos uterinos expostos e suas artérias uterinas foram clampeadas durante 45 minutos. No grupo SHAM, as fêmeas foram submetidas ao mesmo procedimento, exceto pelo clampeamento das artérias uterinas. Após o nascimento a termo dos filhotes, as ninhadas dos três grupos foram subdivididas em não separadas e separação materna. O protocolo de SM ocorreu do primeiro ao décimo quinto dia pós-natal por 180 minutos. Em P30 e P90, os animais dos seis grupos foram submetidos ao *plus maze* e *open field test*, para avaliar o comportamento tipo-ansioso, e ao teste de preferência à sacarose e do nado forçado para investigar o comportamento tipo-depressivo. Os parâmetros hemodinâmicos, vasculares e análise do estresse oxidativo foram realizados para avaliar o perfil cardiovascular. A HI e a SM *per se* parecem gerar de forma consistente alterações cardiovasculares, como a disfunção endotelial, diminuição da atividade da GPx e da produção de nitrito, além do aumento da pressão arterial sistêmica. Além disso, o estresse precoce levou os animais a desenvolverem comportamento tipo-depressivo. A combinação dos dois estresses mantém o comportamento tipo-depressivo, no entanto, parece não levar à disfunção cardiovascular. O conjunto de dados sugere que o estresse precoce produz alterações permanentes nos animais, que são consistentes com o aumento no risco cardiovascular e na susceptibilidade a transtornos psiquiátricos.

Palavras-chave: Hipóxia-isquêmica pré-natal. Separação materna. Depressão. Disfunção endotelial.

ABSTRACT

CAVALHEIRA, Mariana Alencar. **Effects of prenatal hypoxia-ischemic and maternal separation on cardiovascular risk and behavior in rats.** 2022. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Stressful events in the perinatal period can be determinant for the genesis of pathologies, considering that the presence of stressors in the perinatal period has been associated with increased susceptibility to psychiatric disorders, such as anxiety and depression, and cardiovascular diseases. In the present study, rats were submitted to prenatal hypoxia-ischemic (HI) and maternal separation (SM) to mimic prenatal and postnatal stressors, respectively. Therefore, the aim of the present study is to evaluate the effects of HI and MS, alone and in combination, on cardiovascular risk and on anxiety-like and depressive-like behaviors. On the 18th day of gestation, pregnant Wistar females were randomly divided into control (NC), surgical control (SHAM) and hypoxia-ischemic (HI) groups. The HI rats had their uterine horns exposed and their uterine arteries were clamped for 45 minutes. In the SHAM group, the females were submitted to the same procedure, except for the clamping of the uterine arteries. After the full-term birth of the pups, the litters of the three groups were subdivided into non-separated and maternal separation. The MS protocol took place from the first to the fifteenth postnatal day for 180 minutes. At P30 and P90, the animals of the six groups were submitted to the plus maze and open field test, to assess anxiety-like behavior, and to the sucrose preference test and forced swimming to investigate depressive-like behavior. Hemodynamic, vascular parameters and oxidative stress analysis were performed to assess the cardiovascular profile. HI and MS per se seem to consistently generate cardiovascular changes, such as endothelial dysfunction, decreased GPx activity and nitrite production, in addition to increased systemic blood pressure. In addition, early stress led the animals to develop depressive-like behavior. The combination of the two stresses maintains the depressive-like behavior, however, it does not appear to lead to cardiovascular dysfunction. The dataset suggests that early stress produces permanent changes in animals that are consistent with increased cardiovascular risk and susceptibility to psychiatric disorders.

Keywords: Prenatal. Hypoxia-ischemic. Maternal separation. Depression. Endothelial dysfunction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ilustração das três camadas dos vasossanguíneos.....	25
Figura 2 –	Ilustração do mecanismo de ação das enzimas antioxidantes em seus respectivos substratos.....	28
Figura 3 –	Desenho experimental do trabalho.....	31
Figura 4 –	Etapas do ciclo estral da rata <i>Wistar</i> visualizadas pela técnica de esfregaço vaginal.....	33
Figura 5 –	Cirurgia de indução de hipóxia-isquêmica (HI): clampeamento das artérias uterinas em quatro porções distintas com pinças de aneurisma.....	35
Figura 6 –	Cirurgia do grupo SHAM- controle cirúrgico, exposição dos cornos uterinos por 45 minutos, porém sem o clampeamento.....	35
Figura 7 –	Separação materna que ocorreu do P1-P15 com duração de 180 minutos	36
Figura 8 –	Ilustração do aparato do <i>plus maze test</i>	38
Figura 9 –	Ilustração do aparato do <i>open field test</i>	39
Figura 10 –	Esquema do teste de preferência a sacarose.....	40
Figura 11 –	Ilustração do teste do nado forçado.....	41
Figura 12 –	Análise da pressão arterial sistêmica a partir da técnica de pletismografia caudal.....	42
Figura 13 –	Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM).....	44
Figura 14 –	Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no peso corporal.....	49
Figura 15 –	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso em P30 no <i>plus maze test</i>	50
Figura 16 –	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso em P90 no <i>plus maze test</i>	51
Figura 17 –	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso em P30 no <i>open field test</i>	51
Figura 18 –	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso em P90 no <i>open field test</i>	52

Figura 19–	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no consumo de sacarose em P30.....	53
Figura 20–	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-depressivo em P30.....	54
Figura 21–	Efeitos da da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no consumo de sacarose em P90.....	55
Figura 22–	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-depressivo em P90.....	55
Figura 23–	Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses nos níveis plasmáticos de corticosterona.....	56
Figura 24–	Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na pressão arterial sistêmica.....	57
Figura 25–	Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na resposta vasodilatadora no LAM.....	58
Figura 26–	Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na resposta vasoconstritora no LAM.....	59
Figura 27–	Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na resposta vasodilatadora nos anéis de aorta.....	60
Figura 28–	Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na resposta vasoconstritora nos anéis de aorta.....	61
Figura 29–	Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na espessura da camada média da aorta.....	62
Figura 30–	Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses nos níveis plasmáticos de nitrito.....	63
Figura 31–	Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses sobre a carbonilação de proteínas.....	64
Figura 32–	Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses sobre os níveis de TBARS.....	65
Figura 33–	Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na atividade das enzimas antioxidantes.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	Acetilcolina
CETC	Alça corticoestriadotalamocortical
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
CAT	Catalase
P120	Cento e vinte dias de nascimento
SHAM	Controle cirúrgico
SHAM-S	Controle cirúrgico separado
CN	Controle não manipulado
CN-S	Controle não manipulado separado
E18	Décimo oitavo dia gestacional
P15	Décimo quinto dia pós-natal
P0	Dia do nascimento
FAD	Dinucleotídeo de flavina adenina
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
EPM	Erro padrão da media
ROS	Espécie reativa de oxigênio
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
GPx	Glutathiona peroxidase
HI	Hipóxia isquêmica pré-natal
HI-S	Hipóxia isquêmica pré-natal separado
ACTH	Hormônio corticotrófico
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
LPCN	Laboratório de Psicobiologia, Comportamento e Neuroquímica
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
NE	Noraepinefrina
P90	Noventa dias de nascimento
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase

eNOS	Óxido nítrico sintase endothelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
P1	Primeiro dia pós-natal
•OH	Radical hidroxila
SM	Separação maternal
TBARS	Substâncias reativas ao ácido barbitúrico
SOD	Superóxido dismutase
BH4	Tetraidrobiopterina
TAB	Transtorno bipolar
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TDM	Transtorno de depressão maior
TEPT	Transtorno do estresse pós-traumático
TOC	Transtorno obsessivo compulsivo
P30	Trinta dias de nascimento
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
P21	Vigésimo primeiro dia pós-natal
E23	Vigésimo terceiro dia pré-natal

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	30
1.1	Objetivo geral	30
1.2	Objetivos específicos	30
2	METODOLOGIA	31
2.1	Modelo animal	31
2.2	Acasalamento controlado	32
2.3	Cirurgia de hipóxia isquêmica	34
2.4	Separação materna	36
2.5	Testes comportamentais	37
2.5.1	<i>Plus maze test</i>	37
2.5.2	<i>Open field test</i>	38
2.5.3	<u>Teste de preferência à sacarose</u>	39
2.5.4	<u>Teste do nado forçado</u>	40
2.6	Análise da pressão arterial sistêmica	41
2.7	Eutanásia	42
2.8	Reatividade do Leito Arterial Mesentérico (LAM)	42
2.9	Reatividade vascular no anel de aorta	44
2.10	Morfologia da aorta	45
2.11	Dosagem de proteínas	45
2.12	Ensaio de dano oxidativo	45

2.12.1	<u>Substâncias reativas ao ácido barbitúrico (TBARS)</u>	45
2.12.2	<u>Carbonilação de proteínas</u>	46
2.13	Ensaio das enzimas antioxidantes	46
2.13.1	<u>Catalase</u>	46
2.13.2	<u>Glutaciona peroxidase</u>	47
2.14	Dosagens do nitrito no plasma	47
2.15	Dosagem de corticosterona no plasma	48
2.16	Análise estatística	48
3	RESULTADOS	49
3.1	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no peso corporal	49
3.2	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso	50
3.3	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-depressivo	52
3.4	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses nos níveis plasmáticos de corticosterona	56
3.5	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na pressão arterial sistêmica	57
3.6	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na reatividade vascular	58
3.7	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na espessura da camada média da aorta	61
3.8	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses nos níveis plasmáticos de nitrito	63
3.9	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses nos marcadores de dano oxidativo	64
3.10	Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na atividade das enzimas antioxidantes	65
4	DISCUSSÃO	67
	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	76

INTRODUÇÃO

Programação fetal

O período perinatal é primordial para o desenvolvimento satisfatório dos sistemas que compõem o indivíduo. O conceito da plasticidade do desenvolvimento diz respeito à fase em que o genótipo está vulnerável a modificações que podem ser morfológicas e/ou fisiológicas, sendo essa etapa definida como período crítico (SECO e MATIAS, 2009). Os órgãos e sistemas em formação vão ser influenciados a partir do estresse externo ao qual são expostos, que podem variar de acordo com a duração e intensidade do insulto, além da fase do desenvolvimento em que o indivíduo se encontra (THOMPSON e AL-HASAN, 2012).

A programação fetal é o mecanismo mais aceito que explica a origem intrauterina de patologias que vão surgir na idade adulta. Os estímulos e insultos externos no período crítico podem desencadear efeitos pontuais ou até mesmo permanentes (KWON e KIM, 2017; SECO e MATIAS, 2009). Alterações na nutrição fetal, exposição elevada a glicocorticoides, modificações epigenéticas e a hipóxia pré-natal são exemplos de eventos de programação fetal descritos na literatura (SECO e MATIAS, 2009; THOMPSON e AL-HASAN, 2012).

O estresse é definido como um desequilíbrio fisiológico e comportamental que atinge o indivíduo ao longo da vida. Ao responder à ação de estressores presentes no ambiente, o organismo promove a liberação e ativação de mediadores e vias importantes, como exemplo do eixo metabólico hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o Sistema Nervoso Simpático, cuja ações permitem que as alterações mediadas por esse agente externo sejam compensadas e o organismo retorne à homeostase (GODOY e col., 2018). A partir da resposta dos sistemas biológicos ao estresse acredita-se que ele promova a adaptação e contribua para a sobrevivência do indivíduo (GODOY e col., 2018). Entretanto, este deve estar compreendido em um nível ótimo, de modo que o estresse crônico parece desencadear alterações significativas no organismo e ocasionar patologias ao longo da vida (GODOY e col., 2018; SCHNEIDERMAN e col., 2005).

O estresse provocado durante a fase de plasticidade, por exemplo, pode levar a alterações em circuitos cerebrais e no sistema cardiovascular, o que torna esses indivíduos que já foram previamente sensibilizados mais vulneráveis à ação de futuros estressores ao longo da vida (FAJERSZTAJN e VERAS, 2017; STAHL, 2014, pp 249; THOMPSON e AL-HASAN, 2012).

Hipóxia isquêmica pré-natal

A hipóxia isquêmica pré-natal (HI) é caracterizada pela redução crítica nos níveis de oxigênio e nutrientes disponíveis para o feto durante a gestação. Existem algumas condições que podem desencadear a hipóxia, como por exemplo a pré-eclâmpsia, insuficiência placentária (THOMPSON e AL-HASAN, 2012), asfixia pós-parto, múltiplos partos (SMITH e col., 2016), ação do hormônio cortisol (CHARIL e col., 2010), obesidade materna, diabetes gestacional, infecções, doenças inflamatórias e o uso de álcool e cigarro pela mãe (FAJERSZTAJN e VERAS, 2017; HUSSAIN e TRIPATHI, 2018; BAKAN, 1991).

A hipóxia pré-natal é uma das principais causas da mortalidade e prematuridade de recém-nascidos no Brasil, com índice de morte entre os neonatos de 23%. Segundo a Sociedade Brasileira de Pediatria (2020), cerca de 2% dos neonatos podem apresentar essa condição e entre aqueles que conseguem sobreviver são comuns o surgimento de lesões e distúrbios neurológicos (DE PAULA e col., 2010; THOMPSON e AL-HASAN, 2012).

Durante o desenvolvimento do feto, o sangue rico em nutrientes e oxigênio é direcionado, preferencialmente, para os órgãos nobres, como o cérebro e o coração (BELL e col., 2020; CARTER, 2015). Em uma situação de hipóxia, a partir da ocorrência de grandes variações na concentração do oxigênio, a maturação e o funcionamento desses sistemas são diretamente afetados. Na região cerebral, é possível observar apoptose de neurônios e de oligodendrócitos, como também a hipomielinização, astrogliose e alteração na formação de estruturas corticais (BELL e col., 2020; SAB e col., 2012; ZHAO e col., 2017). Além disso, a HI pode desencadear alterações morfofuncionais no coração, disfunções vasculares e danos a vasos de resistência, como as artérias mesentéricas, o que compromete a dinâmica da pressão arterial sistêmica. Tais modificações podem ser determinantes no surgimento de doenças cardiovasculares na vida adulta (NEUMAN e col., 2009; THOMPSON e AL-HASAN, 2012).

Além das modificações citadas, indivíduos submetidos à HI podem apresentar baixo peso ao nascer, atraso cognitivo e na aprendizagem (FAJERSZTAJN e VERAS, 2017; THOMPSON e AL-HASAN, 2012), paralisia cerebral, alterações no desenvolvimento motor (MESQUITA e col., 2007; ROBINSON e col., 2005), transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), além de distúrbios do afeto, como o transtorno de depressão maior (TDM) e a ansiedade (SMITH e col., 2016; ZHAO e col., 2017). A queda nos níveis de oxigênio propiciado pela hipóxia e a subsequente reperfusão também estão associadas à expressão de moléculas que potencializam o dano, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e citocinas

pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF α) e interleucinas, como exemplo da IL-1, IL-6 e IL-18 (DAMMANN e O'SHEA, 2008; ZHAO e col., 2017).

No presente estudo foi adotado o modelo de hipóxia isquêmica pré-natal desenvolvido por Robinson e colaboradores (2005), que consiste na oclusão das artérias uterinas por 45 minutos durante o décimo oitavo dia gestacional de roedores (E18). O E18, corresponde, em humanos, ao desenvolvimento celular presente no final do segundo trimestre para o início do terceiro trimestre gestacional. Além disso, é nessa fase que ocorre a diferenciação e maturação de oligodendrócitos, bem como a implementação de circuitos neurais (ROBINSON e col., 2005). Existem na literatura outros modelos de HI pós-natal, como a partir da oclusão da artéria carótida direita do animal e posterior exposição a um sistema com 8% de oxigênio (LEVINE, 1960), além da hipóxia intermitente por meio da implementação de uma câmara hipobárica. O modelo adotado no presente estudo, baseado nos achados de Robinson e pelo nosso grupo, demonstram que é o mais indicado e satisfatório de acordo com os nossos objetivos (DA SILVA e col., 2021; FERRAZ e col., 2015; SAB e col., 2013).

Separação materna

Durante o período pós-natal, os recém-nascidos apresentam grande dependência de suas matrizes, o que demanda constante contato entre os neonatos e suas mães. Além de serem totalmente dependentes com relação à alimentação e segurança, os primeiros momentos de vida conseguem moldar como serão as respostas fisiológicas e psicológicas desse indivíduo durante a vida adulta (VETULANI, 2013). Esse período crítico do desenvolvimento desempenha importante papel na cognição, comportamento emocional e maturação de sistemas, como nas conexões neurais e no eixo metabólico, o que inclui o sistema cardiovascular (MURPHY e col., 2017; VARGAS e col., 2016).

Eventos traumáticos durante essa janela crítica, como a interrupção da relação mãe-filho, abandono parental, negligência ou abuso, podem contribuir para alterações agudas que geram efeitos permanentes (TRACTENBERG e col. 2016; VETULANI, 2013). Modificações no comportamento ansioso e depressivo, disfunção cognitiva, reduções em marcadores de plasticidade sináptica (TATA e col., 2015) e aumento da vulnerabilidade à adição (ALVES e col., 2019) são algumas das alterações desencadeadas pelo estresse precoce. Além disso, o estresse nessa fase parece programar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, tornando-o disfuncional ao longo da vida (SCHNEIDERMAN e col., 2005; TRACTENBERG e col., 2016;

VARGAS e col., 2016).

As alterações no eixo HPA desencadeada pelo estresse tem efeitos deletérios sistêmicos, uma vez que existem receptores para glicocorticoides na maioria dos tecidos (THAU e col., 2020). Além dos efeitos neurobiológicos descritos acima, recentemente tem sido relacionado a ação de estressores sobre o sistema cardiovascular, o que representa um fator de risco independente para o surgimento de hipertensão, aumento da reatividade vascular e isquemia cardíaca (MURPHY e col., 2017).

A separação materna (SM) é um modelo de estresse precoce em roedores bastante utilizado na literatura para mimetizar o que acontece em humanos (MURTHY e GOULD, 2018). Existe uma grande variação entre os protocolos de SM, que se diferenciam de acordo com a fase do desenvolvimento, o tempo de separação por dia e o número de dias em que ela ocorre. A separação materna corresponde ao protocolo que separa os filhotes de suas matrizes por mais de uma hora, geralmente 180 minutos. Tempos inferiores de separação são ditos como protocolo de manejo precoce, que na natureza, reflete o momento em que a mãe se afasta da ninhada em busca de alimento ou outros recursos (JIN e col., 2018; VENTULANI, 2013). Os efeitos gerados a partir do estresse provocado pela separação materna são distintos entre os sexos e diferentes protocolos, o que corroboram para um leque de achados entre os trabalhos (MURTHY e GOULD, 2018; VENTULANI, 2013).

Transtornos do afeto

Ansiedade

A ansiedade é um processo fisiológico de longa duração em resposta a situações de ameaça iminente ou eventos com sinais de perigo mal definidos aos quais se acredita que possam afetar o indivíduo. Esse mecanismo é adaptativo, uma vez que toda uma rede comportamental, psicológica e cognitiva é formada para manter a integridade do indivíduo frente a uma situação perigosa (KANDEL, 2014, pp 1235). Entretanto, quando as manifestações fisiológicas referentes à ansiedade apresentam intensidade e/ou frequência exacerbadas configuram transtorno patológico (BRAGA, 2010; STAHL, 2014, pp 359).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2020), 9,3% dos brasileiros apresentam algum transtorno de ansiedade. Essa condição gera sofrimento, angústia e paralisa atividades rotineiras do indivíduo, além de interferir nas relações pessoais e sociais (KANDEL, 2014, pp

1235; STAHL, 2014, pp 359). É comum observar clinicamente a sobreposição dos sintomas da ansiedade com outras condições, principalmente com o transtorno de depressão maior, ou até mesmo, uma sobreposição entre os distintos transtornos de ansiedade em um mesmo paciente (KANDEL, 2014; pp 1235; STAHL, 2014, pp 359).

A etiologia dos transtornos ansiosos ainda não está bem definida, porém, já existe a associação dessa neuropatologia com fatores psicossociais, como trauma, adversidades nas fases iniciais do desenvolvimento, estresse crônico, lesão cerebral em áreas específicas, além da vulnerabilidade genética (BABAIEV e col., 2018; BANDELOW e col., 2017). Segundo o DSM- IV, os transtornos de ansiedade são divididos em cinco categorias: transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), transtorno do pânico, transtorno fóbico e social e o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). Embora ocorram diferenças entre si, todos os transtornos de ansiedade apresentam como sintomas centrais o medo associado à preocupação e expectativa excessiva acerca de um evento ou acontecimento que pode ou não ocorrer (STAHL, 2014, pp 361; LENT, 2010, pp 727).

Os sintomas centrais dos transtornos ansiosos apresentam circuitos cerebrais distintos. O medo é regulado pelo circuito presente na amígdala. A amígdala é representada por um aglomerado de núcleos neurais que são responsáveis por captar informações sensoriais e cognitivas recebidas do meio externo e produzir a resposta associada ao medo (CANNISTRARO e RAUCH, 2003; STAHL, 2014, pp 362). A amígdala estabelece importantes conexões neurais com outras estruturas cerebrais que vão mediar essa resposta, como o córtex cingulado anterior e orbitofrontal, substância cinzenta periaquedutal, núcleo parabraquial, locus coeruleus, hipocampo e o hipotálamo (LENT, 2010, pp 724-725; STAHL, 2014, pp 362-364). Já o segundo sintoma central da ansiedade, representado pela preocupação excessiva, é regulado pela alça corticoestriadotalamocortical (CETC). Sintomas como sofrimento, pensamentos excessivos e obsessões estão relacionados à disfunção da CETC (STAHL, 2014, pp 364-365). Os circuitos cerebrais citados são regulados por diversos neurotransmissores, como a serotonina, dopamina, noradrenalina, glutamato, GABA, além de canais iônicos regulados por voltagem e o CRH, este responsável pela ativação do eixo HPA. Alguns desses neurotransmissores e seus respectivos receptores são alvos farmacológicos para o desenvolvimento de ansiolíticos, sendo representado, em sua maioria, pelos benzodiazepínicos que têm como mecanismo intensificar a ação do neurotransmissor inibitório GABA em seu receptor (LYDIARD, 2003; STAHL, 2014, pp 367).

Transtorno de depressão maior

Os transtornos do humor são divididos em duas categorias de acordo com os sintomas, padrão de ocorrência e resposta ao tratamento: depressão unipolar e transtorno bipolar (KANDEL, 2014, pp 1223). A depressão unipolar está relacionada aos transtornos cujos sintomas são caracterizados apenas por episódios depressivos, e inclui o transtorno de depressão maior (TDM) e a distímia. Já o transtorno bipolar (TAB) é representado por pacientes que apresentam episódios depressivos alternados com episódios de mania e, embora apresente vários subtipos, os mais conhecidos e retratados na clínica são o TAB-1 e TAB-2 (KANDEL, 2014, pp 1223; STAHL, 2014, pp 220-221).

A depressão é caracterizada por alterações fisiológicas, comportamentais e cognitivas, como: apatia, desânimo, tristeza, pessimismo, culpa, redução da motivação, ideações suicidas, distúrbios do sono, anedonia, alterações na ingestão alimentar e no peso, perda de energia e libido, dificuldade de concentração, além de alterações na memória e psicomotoras (KANDEL, 2014, pp 1223; STAHL, 2014, 253-255). Tendo em vista a gama de sintomas e sua complexidade, a depressão é retratada como uma das patologias mais incapacitantes do mundo (KALTENBOECK e HARMER, 2018).

Estudos na literatura demonstram que a etiologia da depressão está envolvida com a combinação de fatores genéticos e ambientais (BECKER e col., 2021; KWONG e col., 2019; SAVEANU e NEMEROFF, 2012). Embora essa relação ainda não esteja tão bem esclarecida, existem pontos importantes que conseguem construir e apontar caminhos terapêuticos para essa patologia. A redução na atividade das vias de monoaminas cerebrais e os efeitos deletérios do estresse crônico são pontos relevantes da condução da neurofisiologia da depressão (BECKER e col., 2021; STAHL, 2014, pp 239-245).

O estresse parece desempenhar um papel importante no surgimento dos transtornos do afeto. No caso da depressão, o estímulo mediado pelo estresse consegue alterar a funcionalidade de importantes genes envolvidos na viabilidade de neurônios, como por exemplo o gene CREB que é responsável pela expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), cuja função envolve o crescimento de neurônios, fortalecimento de sinapses e sobrevivência celular (MARKOSTAMOU e col., 2016). A repressão do gene do BDNF modifica os níveis de monoaminas cerebrais e, conseqüentemente, influencia os circuitos encefálicos aos quais elas estão envolvidas (STAHL, 2014, pp 245-246). Além de desregular as vias monoaminérgicas, a supressão do BDNF está relacionada com a atrofia de regiões cerebrais, como o hipocampo. A

atrofia hipocampal está presente em pacientes com depressão e alguns transtornos de ansiedade, como o TEPT (SANTOS e col., 2018; STAHL, 2014, pp 246). O hipocampo, por apresentar receptores para o cortisol, consegue regular a atividade do eixo HPA por *feedback* negativo. Na depressão, por conta da atrofia dessa região cerebral, a regulação não consegue ser mantida, corroborando, dessa forma, para a manutenção do eixo HPA disfuncional. A manutenção desse ambiente altamente lesivo para o organismo parece ser uma das bases biológicas para diversas patologias, como o caso de desordens psiquiátricas e também distúrbios metabólicos, como as alterações cardiovasculares (BECKER e col., 2021; BURFORD e col., 2017; STAHL, 2014, pp 247).

Transtornos do afeto e distúrbios cardiovasculares

Existem na literatura estudos que propõem uma relação entre o surgimento de desordens psiquiátricas e doenças cardiovasculares. Sabe-se que a depressão é um fator de risco independente para o risco cardiovascular, ao passo que indivíduos com doenças cardiovasculares pré-existentes que apresentam depressão possuem um aumento de 2,5 à 4 vezes maior do risco de mortalidade (DO CARMO e col., 2015; PINTO e col., 2012).

Embora estejam associados, nem todos os mecanismos biológicos envolvidos na combinação dessas patologias estão esclarecidos. Entretanto, existem pontos importantes que podem responder a condução da gênese de alterações psiquiátricas e cardiovasculares. Indivíduos com transtornos do afeto apresentam desregulação da atividade do Sistema Nervoso Simpático e do eixo HPA, vias que são ativadas de forma constante por conta da presença do estresse crônico (DHAR e BARTON, 2016). As ativações exacerbadas dessas vias biológicas levam a efeitos deletérios para o organismo, como exemplo disfunção endotelial, hipertrofia ventricular (RYDER e COHEN, 2021), distúrbios do ritmo cardíaco, vasoconstrição coronariana, alteração na atividade plaquetária, produção de citocinas inflamatórias e aumento do estresse oxidativo (DHAR e BARTON, 2016; DO CARMO e col., 2015; PINTO e col., 2012). Tais alterações podem predispor a eventos coronarianos, como arritmias cardíacas e aumento do risco de infarto agudo do miocárdio (BARANYI e col., 2015; WITTSTEIN e col., 2005).

Nesse sentido, estudos que buscam entender a associação entre a gênese de doenças psiquiátricas e cardiovasculares vêm investigando de maneira mais particular o papel do óxido nítrico (NO). O NO é um gás inorgânico que apresenta vários alvos biológicos e participa da ativação/mediação de importantes vias no organismo. O NO atua na neurotransmissão, resposta

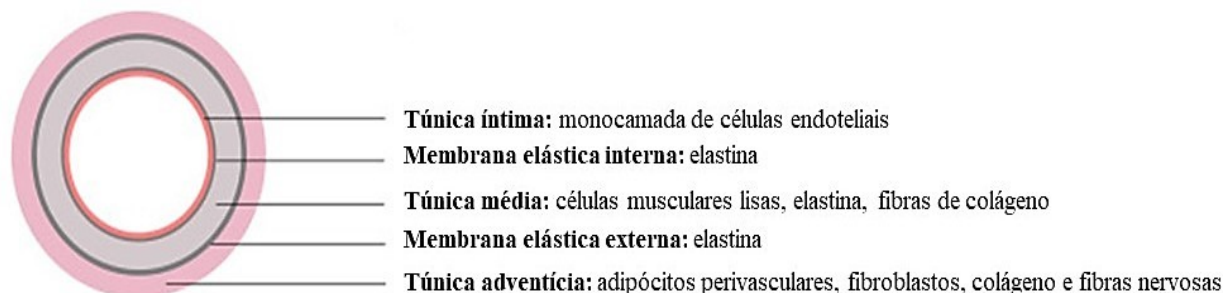
imunológica, sinalização celular, controle do tônus vascular, participa da vasodilatação, além de contribuir para a homeostase (FÖRSTERMANN e SESSA, 2012; PINTO e col., 2012). O NO é sintetizado a partir da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que é responsável por converter o aminoácido L-arginina em óxido nítrico e L-citrulina. A ação da NOS é mediada pela presença de L-arginina com o oxigênio molecular, além do auxílio de importantes cofatores como dinucleótido de flavina adenina (FAD), fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), tetraidrobiopterina (BH4) e complexo cálcio-calmodulina (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002; ZHAO e col., 2015). Quando a NOS se encontra sem os cofatores citados e no seu estado desacoplado, a enzima passa a produzir ânion superóxido ao invés de NO, fato esse que contribui para a manutenção do estresse oxidativo local, além de contribuir para a disfunção endotelial (ZHAO e col., 2015).

A NOS apresenta três isoformas distintas a partir do local onde são encontradas e funções exercidas. A eNOS, encontrada nas células endoteliais, pode ser ativada de forma dependente ou independente do cálcio; nNOS, isoforma neuronal que tem importância na comunicação celular no SNC; iNOS, forma induzível, que está presente em condições de infecções, inflamações crônicas e tumores (NASEEM, 2005; ZHAO e col., 2015). Alterações na biossíntese e biodisponibilidade de óxido nítrico parecem ser o link de associação entre doenças cardiovasculares e a depressão. Estudos anteriores demonstram que pacientes deprimidos apresentam uma baixa produção de NO por conta da diminuição do cofator BH4, fundamental para o funcionamento adequado da NOS (CHRAPKO e col., 2004). Dessa forma, a queda na produção e disponibilidade de NO leva à disfunção endotelial, agregação plaquetária e liberação de citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para a manutenção de alterações cardiovasculares (NASEEM, 2005; PINTO e col., 2012).

Disfunção Endotelial

Os vasos sanguíneos são compostos de células vasculares, colágeno, elastina e fibroblastos. A composição da parede dos vasos sanguíneos está organizada em três camadas principais (Figura 1): túnica íntima, túnica média e túnica adventícia, além de duas membranas elásticas intercaladas (CAMASÃO e MANTOVANI, 2021).

Figura 1 – Ilustração das três camadas dos vasos sanguíneos



Fonte: Adaptado de CAMASÃO e MANTOVANI, 2021.

A túnica íntima ou endotélio é a estrutura mais interna do vaso sanguíneo composta por células endoteliais que cobrem a superfície do lúmen do vaso, funcionando como uma barreira entre o sangue e os tecidos adjacentes. O endotélio tem um papel fundamental no controle do tônus vascular, a partir da liberação de substâncias vasoconstritoras, como a endotelina-1, e vasodilatadoras, tendo como principal exemplo o óxido nítrico (CAMASÃO e MANTOVANI, 2021; ZHAO e col., 2015). A segunda camada, representada pela túnica média é composta por células musculares lisas, elastina e fibras de colágeno. A túnica média, a partir da ação das células musculares lisas, será responsável por mediar o mecanismo de contração e dilatação dos vasos sanguíneos (ZHAO e col., 2015). A túnica adventícia é composta por fibroblastos e colágeno, que conferem aderência aos órgãos, além de terminações nervosas e adipócitos perivasculares. Essa estrutura é importante para o remodelamento vascular, na resposta imunológica, além de regular o tônus vascular a partir da secreção de adipocinas, leptina e componentes do sistema renina- angiotensina-aldosterona pelos adipócitos perivasculares (MILUTINOVIĆ e col., 2020; ZHAO e col., 2015).

As células endoteliais responsáveis pela secreção de NO estabelecem uma comunicação com as células musculares lisas da túnica média que permite que ocorra o mecanismo de vasodilatação que depende de forma direta da ação do endotélio (DURAND e GUTTERMAN

2013). A acetilcolina, neurotransmissor importante no processo de vasodilatação, se liga aos seus receptores muscarínicos específicos presentes nas células endoteliais. Essa sinalização permite que a NOS converta L-arginina em NO e L-citrulina. O NO, por ser um gás altamente difusível, alcança as células musculares lisas e ativa a guanilato ciclase, que produz o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), responsável pela ativação da proteína cinase dependente de GMPc (PKG). A PKG fosforila os canais de potássio e hiperpolariza a membrana plasmática, fazendo com que os canais de cálcio dependente de voltagem não sejam ativados. A redução de cálcio no citosol das células musculares permite que ocorra a vasodilatação. O mecanismo de hiperpolarização e consequente fechamento dos canais de cálcio mediado pelo NO pode ocorrer de forma independente do endotélio, tendo em vista que moléculas como a nitroglicerina podem promover a liberação de óxido nítrico diretamente nas células musculares lisas (DEANFIELD e col., 2007; DURAND e GUTTERMAN, 2013; ZHAO e col., 2015).

As células musculares, além de promoverem a vasodilatação, também respondem a agentes vasoconstritores, como a norepinefrina (NE). A NE ao se ligar aos receptores α na membrana do vaso permitem a abertura dos canais de cálcio, o que promove o aumento da concentração dessa molécula no citosol das células. O cálcio em maior concentração permite que a proteína cinase da cadeia leve da miosina fosforile a miosina, promovendo, dessa forma, a contração do músculo liso (DEANFIELD e col., 2007; ZHAO e col., 2015).

De forma fisiológica, o endotélio em indivíduos saudáveis é responsável por manter o balanço da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio, que promovem a vasodilatação, e dos fatores de contração derivados do endotélio, que favorece a vasoconstrição (CAHILL e REDMOND, 2016). Para que o endotélio funcione de maneira eficiente, as células que revestem a túnica íntima devem estar íntegras. Alguns estudos demonstraram que em situações de injúria as células endoteliais conseguem promover o remodelamento vascular, a partir da reposição de células danificadas e pela ação de células progenitoras endoteliais circulantes, sendo esse mecanismo dependente de NO (DEANFIELD e col., 2007).

A falha no reparo endógeno e remodelamento vascular acelerado mediante a uma situação adversa pode ser uma das causas do surgimento da disfunção endotelial (DEANFIELD e col., 2007). Algumas condições podem estar associadas à disfunção do órgão, como exemplo o estresse. A ativação crônica do Sistema Nervoso Simpático e do eixo HPA em resposta ao estresse crônico promove desgaste cumulativo dos vasos, levando à propagação do dano endotelial, principalmente pela maior resposta vasoconstritora (LIMA e col., 2019). A HI, modelo de estresse pré-natal, leva ratos adultos a apresentarem alterações em vasos de

resistência, como o leito arterial mesentérico (LAM). Nesses animais, ocorre uma menor resposta vasodilatadora, como também maior depósito de colágeno na aorta (DA SILVA e col., 2021). A menor biodisponibilidade de NO e o aumento do estresse oxidativo contribuem para a disfunção endotelial e estão relacionadas ao surgimento de doenças metabólicas, como distúrbios cardiovasculares e aterosclerose (CAHILL e REDMOND, 2016; DEANFIELD e col., 2007; MILUTINOVIĆ e col., 2020).

Estresse oxidativo

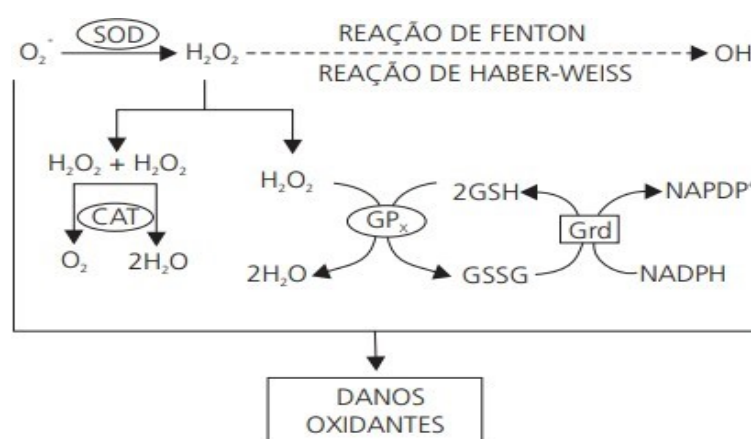
As ERO são consideradas subprodutos do metabolismo biológico e tem como principal local de geração a mitocôndria, principalmente pela cadeia transportadora de elétrons durante o processo de respiração celular (BURTON, 2011; ZOROV e col., 2014). Além da mitocôndria, as EROs podem ser formadas a partir da ação das enzimas da família das NOX, óxido nítrico sintase e xantina oxidase (BURTON, 2011; PATEL e col., 2017).

As EROs são produzidas a partir do oxigênio molecular e podem ser divididas em radicais livres e não radicais. Durante o metabolismo celular, o oxigênio é reduzido a água por meio da incorporação de elétrons. Esse processo quando não ocorre de forma satisfatória leva à formação das espécies reativas de oxigênio (BIRDEN e col., 2012). De forma mais específica, os três tipos de EROs de maior importância fisiológica são o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($\bullet OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Cada um deles apresenta reatividade distinta, local de formação e tempo de meia-vida variáveis (BIRDEN e col., 2012; PIZZINO e col., 2017). Em condições fisiológicas, as EROs são fundamentais para diversos processos biológicos, como sinalização intracelular, regulação do ciclo celular e apoptose programada, estimulam a integridade e o crescimento de células do músculo liso vascular e auxiliam na manutenção do sistema imunológico (BURTON, 2011; PATEL e col., 2017; ZOROV e col., 2014).

Para a adequada produção/eliminação das EROs e consequente equilíbrio redox, o sistema biológico conta com a defesa antioxidante, que pode ser dividida em enzimáticas ou não-enzimáticas (Figura 2). Dentre as enzimáticas, estão incluídas a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Essas enzimas são responsáveis por controlar e/ou inibir a produção de ERO, e consequentemente, diminuir os efeitos deletérios provocados pelo excesso de ERO no organismo (BARBOSA e col., 2010).

Deve-se haver um equilíbrio na produção e degradação das EROs, de modo que a sua produção excessiva e/ou baixa eliminação leva ao desbalanço redox e consequente manutenção do estresse oxidativo. O estresse oxidativo é um processo prejudicial e pode levar a alterações nos componentes das membranas celulares, proteínas, disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica e modificações no DNA (PATEL e col., 2017; PIZZINO e col., 2017).

Figura 2 – Ilustração do mecanismo de ação das enzimas antioxidantes em seus respectivos substratos



Legenda: O $O_2^{\bullet-}$ é dismutado em H_2O_2 a partir da ação da SOD. Por sua vez, o peróxido de hidrogênio é substrato para a catalase e a glutatona peroxidase. A CAT dismuta o H_2O_2 em O_2 e H_2O , enquanto a GPx reduz o peróxido à H_2O . A ação das enzimas antioxidantes permite a redução dos danos oxidativos provocados pelo excesso de ERO no organismo.

Fonte: BARBOSA e col., 2010.

Estudos na literatura relacionam o estresse oxidativo com diversas patologias, como aterosclerose, doenças psiquiátricas e neurodegenerativas, além de desordens cardiovasculares (VAVÁKOVÁ, e col., 2015). Nas doenças cardiovasculares observa-se que a ação da NADPH oxidase e NOS no seu estado desacoplado levam à inativação do NO, contribuindo para a disfunção endotelial por meio da excessiva produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Tais condições originam o estresse oxidativo vascular, favorecendo a manutenção de alterações cardíacas (PATEL e col., 2017; SENONER e DICHTL, 2019). Além disso, a maior atividade de enzimas envolvidas na produção de ERO, como a família da NOX e a xantina oxidase estão presentes em pacientes com depressão, o que demonstra o impacto do estresse oxidativo no surgimento de desordens psiquiátricas (VAVÁKOVÁ, e col., 2015; PIZZINO e col., 2017).

Tendo em vista a gama de alterações sistêmicas que o estresse precoce pode provocar e a sua contribuição para o surgimento de patologias ao longo da vida, o melhor entendimento de como tais modificações ocorrem são imprescindíveis para a compreensão do tema. Diante do exposto, os modelos experimentais são necessários para que seja possível investigar de maneira detalhada o papel que o estresse precoce desempenha. O estudo dos efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal e da separação materna, modelos de estresse pré e pós-natal, respectivamente, buscam elucidar o impacto do estresse precoce nos momentos iniciais do desenvolvimento e suas consequências ao longo da vida.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Tendo em vista a importância do período perinatal para a maturação dos sistemas e que eventos estressantes nessa fase podem ser determinantes para o desenvolvimento do indivíduo, o objetivo geral do presente estudo é avaliar os efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal e da separação materna, isoladamente e em combinação, no risco cardiovascular e na susceptibilidade aos transtornos do afeto em ratos.

1.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, da separação materna e da combinação dos estresses sobre:

- a) A pressão arterial sistêmica e frequência cardíaca em P120;
- b) Os comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo em P30 e P90;
- c) A reatividade vascular no leito arterial mesentérico e na artéria aorta torácica em resposta a agentes vasoconstritores e vasodilatadores;
- d) A morfometria da artéria aorta;
- e) A atividade de enzimas antioxidantes, o dano oxidativo e os níveis de nitrito e corticosterona em amostras de plasma.

2 METODOLOGIA

2.1 Modelo animal

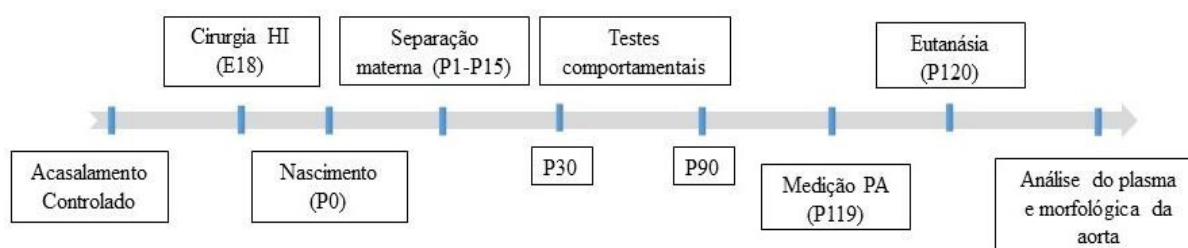
Os protocolos de uso animal foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), protocolo de CEUA 056/2018. Todos os experimentos foram realizados de acordo com a declaração de Helsinki e de acordo com o guia de cuidados e uso de animais de laboratórios.

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar, que foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia (IBRAG/UERJ), com livre acesso à água e ração comercial. A sala onde os animais foram alocados apresentava temperatura em $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro (12 horas cada ciclo).

Para esse trabalho, foram utilizados 127 ratos machos, que foram divididos em seis grupos experimentais pré-determinados. Durante a fase gestacional, ratas Wistar grávidas foram divididas aleatoriamente em controle não manipulado (CN), controle cirúrgico (SHAM) e hipóxia isquêmica (HI). No dia do nascimento, os grupos descritos foram subdivididos em não separados (CN, SHAM e HI) e separação materna (CN-S, SHAM-S e HI-S), dispondo no final de seis grupos.

O presente estudo apresenta importantes etapas, desde a produção dos grupos experimentais até os experimentos para a avaliação comportamental e cardiovascular. A figura 3 abaixo exemplifica cada fase do trabalho que serão detalhadas durante a metodologia.

Figura 3 – Desenho experimental do trabalho.



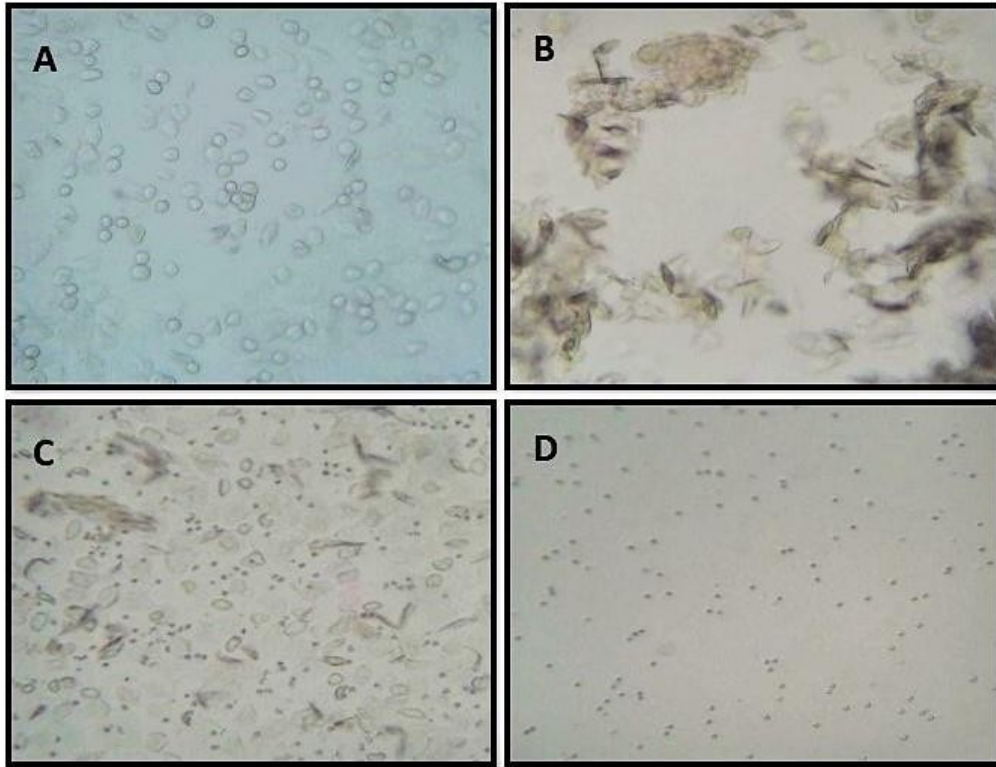
Fonte: A autora, 2022.

2.2 Acasalamento controlado

Ratas *Wistar* virgens com 90 dias alocadas no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia (ciclo claro/escuro: 12 horas cada) com água e comida comercial e temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ foram submetidas à técnica de esfregaço vaginal para a identificação da fase do ciclo estral. Para isso, é necessário a utilização de uma pipeta de 200 μl com 40 μl de solução salina (NaCl 0.9%). A ponta da pipeta libera parte do líquido na vagina da fêmea e capta o mucopresente na região vaginal, o qual é disposto em uma lâmina para a visualização em microscópio.

Sob o aumento de 10x, é possível determinar em qual fase do ciclo estral a rata se encontra. O ciclo reprodutivo da fêmea é composto por quatro fases: pró-estro, estro, diestro I e diestro II (Figura 4). A ovulação ocorre no início do pró-estro até o final do estro (MARCONDES e col., 2002). Dessa forma, fêmeas que apresentavam perfil histológico consistente com essa fase foram colocadas na presença de machos por 12 horas (1:1). No final desse período, elas retornavam para a caixa de origem e tinham o seu peso corporal aferido duas vezes na semana para a confirmação da gravidez.

Figura 4 – Etapas do ciclo estral da rata *Wistar* visualizadas pela técnica de esfregaço vaginal



Legenda: Etapas do ciclo estral da fêmea *Wistar* visualizadas pela técnica de esfregaço vaginal. A ilustração A e B representam a fase de pró-estro e estro, respectivamente. Nessas duas fases são observados tipos celulares que correspondem à receptividade das fêmeas.

Fonte: LPCN/UERJ.

2.3 Cirurgia de hipóxia isquêmica

No décimo oitavo dia gestacional (E18), as fêmeas que tiveram a sua gravidez confirmada foram alocadas em caixas separadas e divididas aleatoriamente nos grupos HI, SHAM e CN, sendo as ratas do grupo controle não manipulado mantidas no biotério sem nenhum tipo de intervenção. Foram utilizadas ninhadas que continham de 8 à 10 animais, sendo os mesmos submetidos à alimentação regular, sem nenhuma restrição.

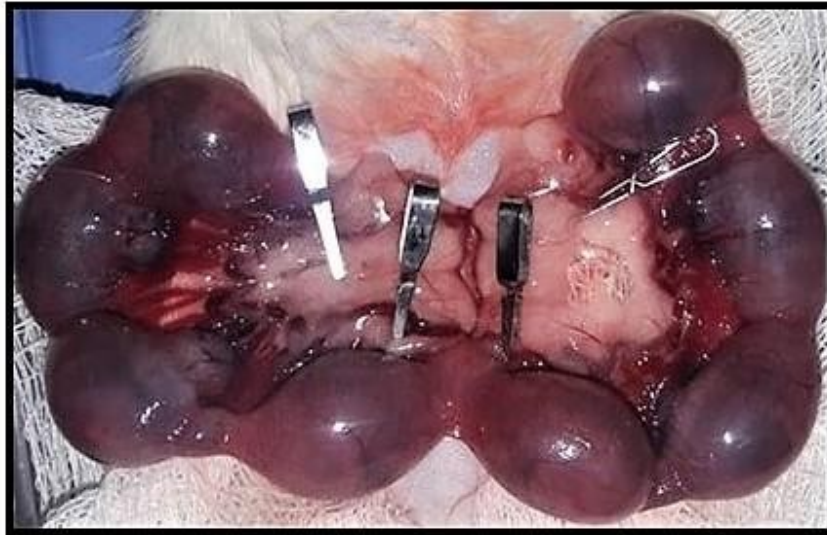
O modelo realizado nesse estudo para a indução da hipóxia isquêmica foi adaptado a partir de Robinson e colaboradores (2005). A cirurgia ocorreu no E18, que em humanos, corresponde ao segundo trimestre gestacional. Essa fase é fundamental para o desenvolvimento de estruturas e conexões neurais. Portanto, qualquer insulto ou estresse durante essa etapa do período gestacional poderia ocasionar danos para o indivíduo após o nascimento (ROBINSON e col., 2005).

Para o procedimento cirúrgico, as ratas dos grupos HI e SHAM foram anestesiadas com Isoflurano (4% para hipnose + 1.0 L/min de O₂). Posteriormente, a fêmea foi transferida para a mesa cirúrgica e a dosagem do anestésico ajustada para a dose de manutenção (2% de Isoflurano +

0.8 L/min de O₂), onde permaneceu de forma constante sob essas concentrações até o final da cirurgia. Foi administrada solução oftálmica estéril (carmelose sódica 5mg/mL), para evitar o ressecamento dos olhos e realizada a tricotomia da região abdominal com antisséptico (digliconato de clorexidina 10mg/mL) para a remoção dos pelos.

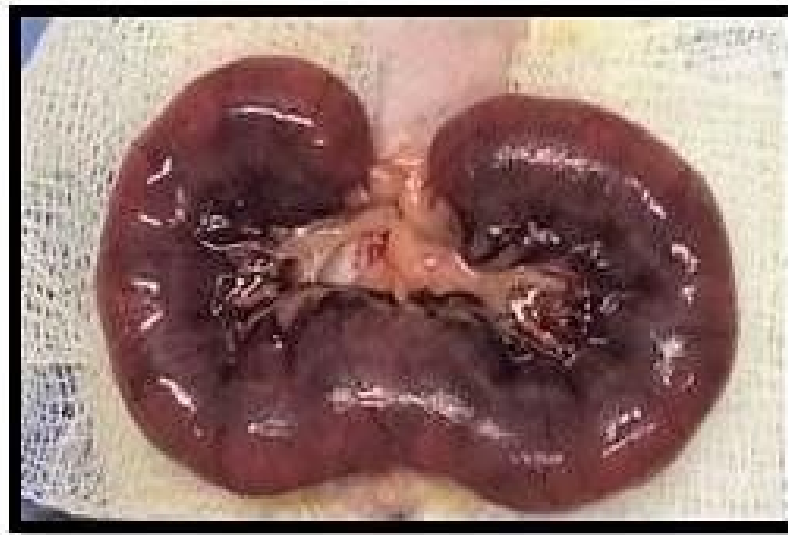
A laparotomia foi iniciada com o auxílio de um bisturi e os cornos uterinos expostos. As matrizes do grupo HI tiveram o clampeamento das artérias uterinas com pinças de aneurisma em quatro porções distintas por 45 minutos (Figura 5), de modo que o aporte de fluxo sanguíneo e nutrientes fosse diminuído. O controle cirúrgico SHAM teve seus cornos uterinos expostos pelo mesmo período, com exceção do clampeamento (Figura 6). Durante o procedimento cirúrgico, a região abdominal e os cornos uterinos foram protegidos com gazes umedecidas com solução salina (NaCl 0.9%) para impedir o ressecamento local.

Figura 5 – Cirurgia de indução de hipóxia-isquêmica (HI): clampeamento das artérias uterinas em quatro porções distintas com pinças de aneurisma



Fonte: LPCN/UERJ.

Figura 6 – Cirurgia do grupo SHAM- controle cirúrgico, exposição dos cornos uterinos por 45 minutos, porém sem o clampeamento



Fonte: LPCN/UERJ.

Ao final dos 45 minutos, as pinças de aneurisma foram removidas do grupo HI e os cornos uterinos de ambos os grupos devolvidos para a cavidade abdominal. A sutura foi realizada com fios absorvíveis e a analgesia com dipirona sódica (100mg/100g de peso corporal, via intraperitoneal), e posterior anestesia local com lidocaína entre os pontos. Após a assepsia local, o anestésico foi removido e as fêmeas mantidas em um ambiente controlado ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) com água e comida comercial, onde foram acompanhadas diariamente até o parto natural no vigésimo terceiro dia gestacional (E23).

2.4 Separação materna

O protocolo de separação materna, adaptado a partir de Markostamou e colaboradores (2016), ocorreu do primeiro dia pós-nascimento até o décimo quinto dia pós-nascimento (P1-P15). No dia do nascimento dos filhotes, determinado como P0, as ratas dos grupos CN, SHAM e HI foram subdivididas em não separadas (CN, SHAM e HI) e separadas (CN-S, SHAM-S, HI-S). Aquelas que pertenciam ao grupo separação materna, ao longo dos quinze dias, foram levadas para uma sala com controle de temperatura ($26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) onde os filhotes foram alocados em potes individuais e permaneciam neles por três horas, das 9hrs às 12hrs. (Figura 7). É importante salientar que as mães, logo que os neonatos foram removidos das caixas, retornavam ao biotério, de modo que se evitava possíveis barulhos e odores da matriz e de outros animais que pudessem afetar o protocolo de separação materna.

Figura 7 – Separação materna que ocorreu do P1-P15 com duração de 180 minutos



Fonte: A autora, 2022.

Ao final dos quinze dias de separação materna, os animais não foram mais importunados e somente manipulados para a troca de caixas duas vezes na semana. No

vigésimo primeiro dia pós-nascimento (P21), foi realizado o desmame e sexagem dos grupos. Nesse trabalho, foram utilizados ratos machos.

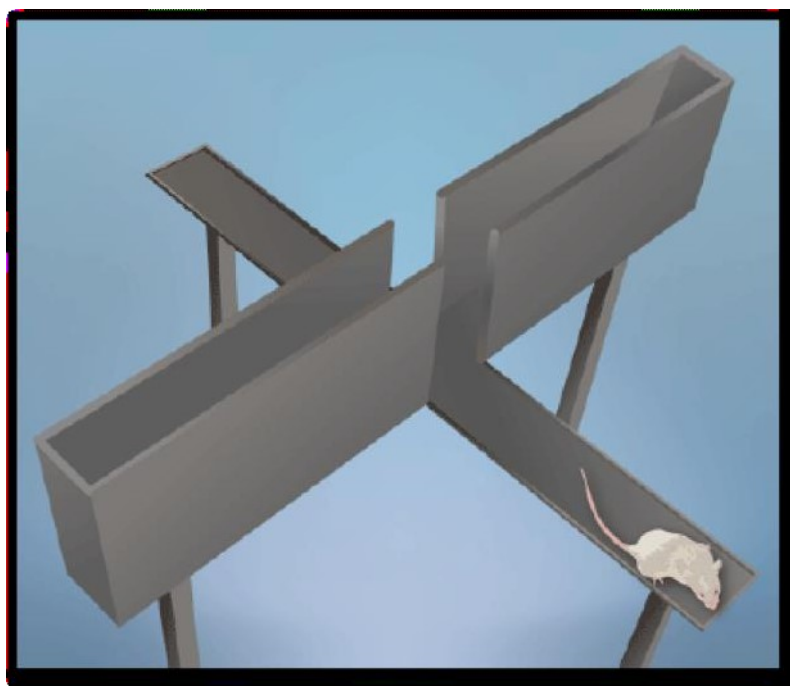
2.5 Testes comportamentais

Os testes comportamentais para avaliar os comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo dos animais foram realizados a partir do P30 e P90. Os animais foram removidos do biotério e levados a uma sala de comportamento sob condições semelhantes ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Permaneciam no local para a ambientação por cerca de 30 minutos e após às 14hrs se iniciavam os testes etológicos. Todos os experimentos foram filmados com uma câmera para posterior análise dos vídeos.

2.5.1 *Plus maze test*

O plus maze test foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e tem como objetivo avaliar o comportamento inato de roedores em explorar um ambiente novo associado ao medo inato desses animais a altura e locais abertos, de modo que eles fiquem expostos ao possível perigo (KUMAR e col., 2013; CRUZ e LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). O aparato consiste em uma cruz elevada, composta por dois braços abertos e dois fechados (Figura 8). O teste é considerado padrão-ouro para avaliar o comportamento tipo-ansioso, de modo que aqueles animais que apresentam tal comportamento tendem a explorar e permanecer menos tempo nos braços abertos (CRUZ e LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Figura 8 – Ilustração do aparato do *plus maze test*



Fonte: Imagem obtida no Google Imagens, no dia 20 de março de 2021 às 17:31.

O animal foi colocado no centro do aparelho e o experimento tinha duração de cinco minutos. Foram mensurados a % do número total de entradas e permanência nos braços abertos. Após o final de cada teste, o animal foi removido, devolvido à caixa de origem e o aparato limpo com álcool 70%.

2.5.2 Open field test

O *open field test* foi descrito por Hall (1934) e é um teste utilizado para mensurar atividade motora, comportamento exploratório e ansiedade. Consiste em um aparato quadrangular cujo assoalho é demarcado por quadrados, sendo centrais e periféricos (Figura 9). O teste tem o objetivo de quantificar o número de quadrados centrais que o animal percorreu, assim como a quantidade de quadrados periféricos que foram explorados. O roedor com comportamento tipo- ansioso tende a explorar mais os quadrados laterais, uma vez que ficar nos centrais levaria a uma alta exposição, o que confere um maior perigo (KUMAR e col., 2013; CRUZ e LANDEIRA- FERNANDEZ, 2012).

O animal foi colocado no centro do aparato e o experimento tinha duração de cinco

minutos. Foram mensurados a % de deambulação nos quadrados centrais (quadrados centrais/total de quadrados percorridos) e a deambulação total (quadrados centrais + quadrados periféricos). Ao final de cada sessão, o animal foi removido, devolvido à caixa de origem e o aparelho limpo com álcool 70%.

Figura 9 – Ilustração do aparato do *open field test*

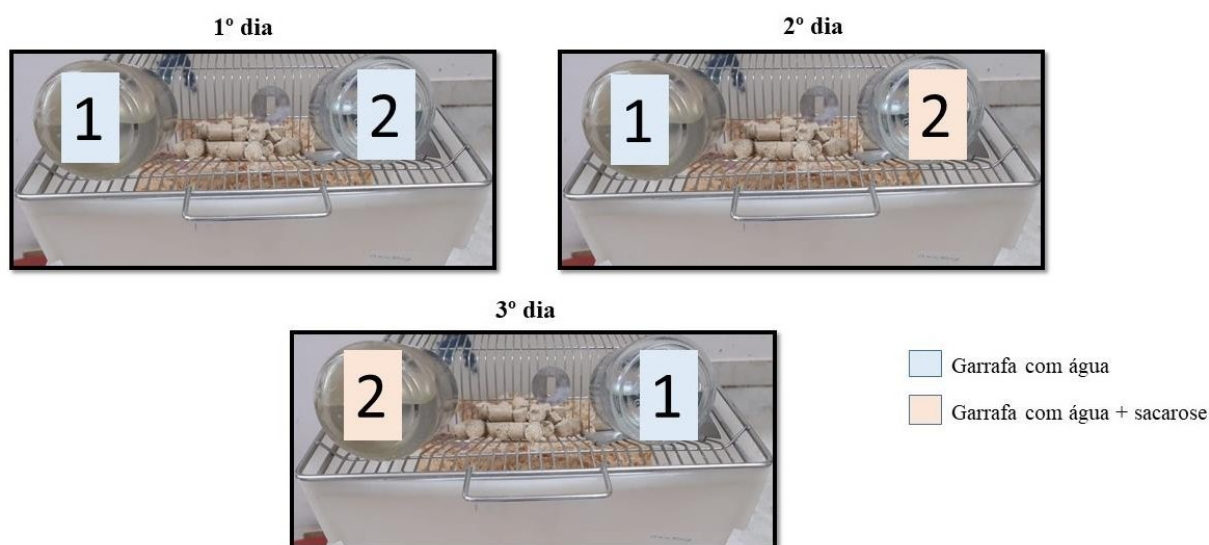


Fonte: A autora, 2022.

2.5.3 Teste de preferência à sacarose

O teste de preferência à sacarose foi realizado para avaliar o comportamento de anedonia em roedores, sendo esse um dos sintomas do transtorno de depressão maior. O protocolo foi baseado na escolha livre de duas garrafas de água, sendo uma delas compostas por uma solução água + sacarose (concentração = 0.8%). O teste ocorreu em quatro dias. No primeiro, os animais foram dispostos em caixas individuais, com livre acesso à comida e a duas garrafas de água usuais. No segundo dia, uma dessas garrafas de água foi trocada por uma garrafa de água + sacarose 0.8%. No terceiro dia, a posição das garrafas foi invertida, para evitar o viés do local específico (Figura 10). No quarto e último dia de teste, os animais retornaram às caixas usuais (TADAIESKY e col., 2008; SLATTERY e col., 2007).

Figura 10 – Esquema do teste de preferência à sacarose.



Legenda: No primeiro dia, duas garrafas de água foram oferecidas aos animais. No segundo, uma das garrafas (2) continha solução água + sacarose. No terceiro dia, a posição das garrafas foi invertida.

Fonte: A autora, 2022.

Foram realizadas as pesagens das garrafas de água e água + sacarose 24 e 48 horas após o contato com a solução de sacarose. O consumo das duas soluções foram somados e a preferência a sacarose foi determinada a partir da seguinte fórmula: $[\text{consumo de sacarose}/\text{consumo total de líquido (sacarose+água)}] * 100$. Os animais que apresentam anedonia tendem a consumir menos sacarose.

2.5.4 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado foi desenvolvido por Porsolt e colaboradores (1977) e tem como o objetivo testar o efeito de antidepressivos em roedores. Nesse paradigma, os animais em que o fármaco foi administrado apresentavam alta mobilidade durante o teste, de modo que esse tipo de teste etológico é utilizado para avaliar o comportamento tipo-depressivo de roedores, a partir da sua resposta em uma situação de estresse e desamparo (PORSOLT e col., 1977).

O protocolo foi dividido em dois dias. No primeiro dia, determinado como pré-teste, os animais foram colocados em um cilindro de vidro (50cm X 20cm) preenchido com $\frac{3}{4}$ de água (Figura 11). Nesse dia, o animal permaneceu no recipiente durante 15 minutos. Após 24 horas,

o animal foi novamente colocado no cilindro, porém com duração de 5 minutos.

Foram mensurados o tempo de imobilidade, o que representaria, segundo o postulado, um comportamento tipo-depressivo. É importante salientar que imobilidade diz respeito aos movimentos básicos que o animal realiza para não afogar. Além desse parâmetro, foi avaliado o tempo de mobilidade, que configura natação e tentativa de escape.

Figura 11– Ilustração do teste do nado forçado



Fonte: Imagem obtida no Google Imagens, no dia 20 de março de 2021 às 17:35.

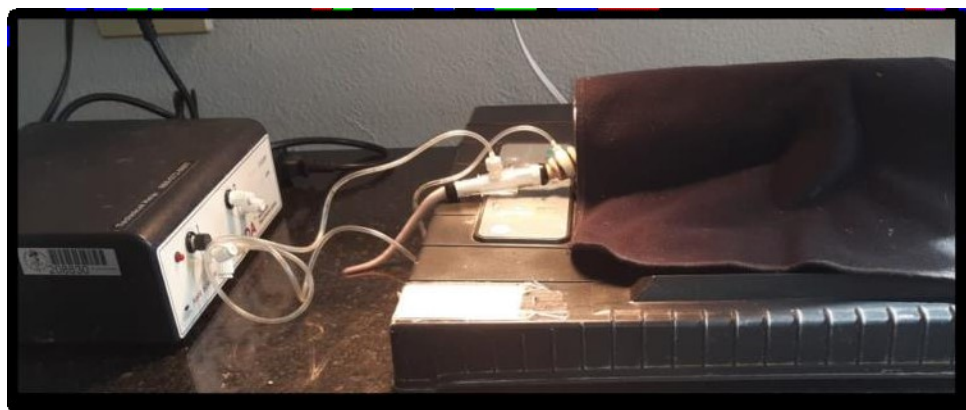
2.6 Análise da pressão arterial sistêmica

A análise da pressão arterial sistêmica foi realizada a partir da técnica de pletismografia caudal por meio do programa Coda Non-invasive Blood Pressure System (CODAHT2; Kent Scientific). Durante o experimento, o animal permaneceu consciente, imobilizado em contensor de acrílico e com os medidores acoplados na cauda (Figura 12). A pressão arterial foi aferida durante uma semana, afim de que os animais se ambientassem à técnica. As medições dos seis primeiros dias não foram contabilizadas, sendo considerados os dados apenas do último dia de medição (P119).

Ao longo dos sete dias de análise, os animais foram colocados durante 20 minutos sob luz incandescente para promover a vasodilatação da cauda. Após esse período, o animal foi transferido para o contensor de acrílico e coberto por uma manta térmica. Antes de ser iniciada a medição, a temperatura do animal foi aferida e deveria estar entre 32 °C- 35 °C. Dentre as primeiras medições, uma lâmpada foi mantida sob a cauda do animal para não

ocorrer perda de calor. Foram avaliadas a pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e a frequência cardíaca.

Figura 12 – Análise da pressão arterial sistêmica a partir da técnica de pletismografia caudal



Fonte: a autora.

2.7 Eutanásia

Em P120, os animais foram anestesiados com tiopental sódico via intraperitoneal (50mg/kg). Quando não apresentavam mais nenhum tipo de reflexo, foi realizada a laparotomia para a exposição da artéria aorta abdominal, onde foi realizada punção para coleta do sangue. Em seguida, o leito arterial mesentérico (LAM) e a aorta torácica foram isolados.

A aorta foi dividida, onde parte foi destinada para a morfologia e a outra porção para o experimento de reatividade.

2.8 Reatividade do Leito Arterial Mesentérico (LAM)

Após a laparotomia, o LAM, que é composto por vasos de resistência, foi estendido para o exterior da cavidade abdominal, método esse descrito por McGregor em 1965. Os ramos pancreático, duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE 50, Clay Adams Brand CA – Becton Dickinson). Durante o isolamento é necessário cautela, uma vez que a artéria mesentérica deve estar íntegra e ser fechada na extremidade distal, de modo que as soluções que sejam

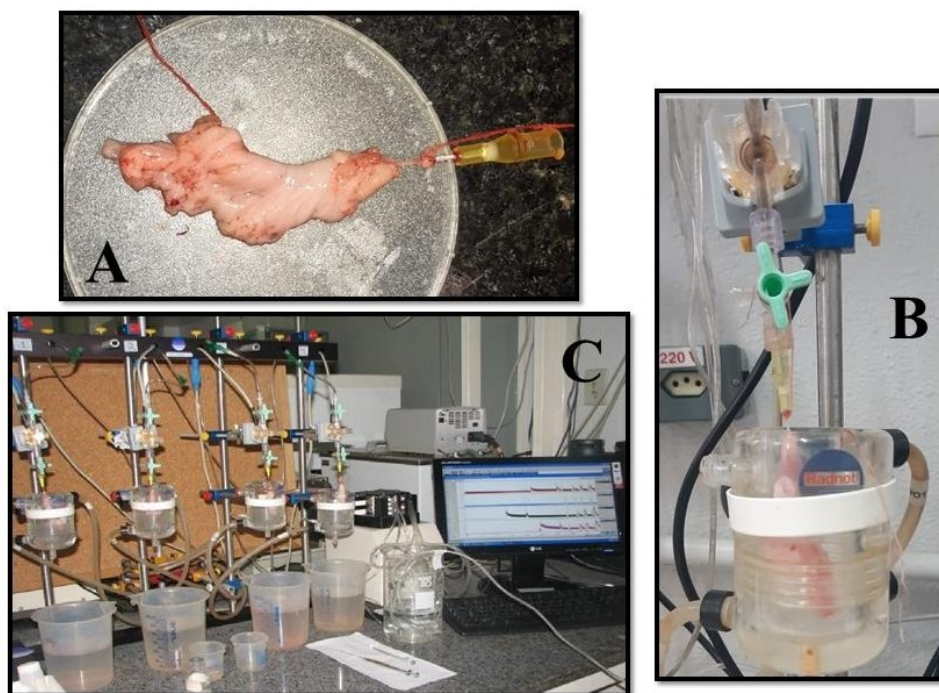
administradas consigam passar por toda sua extensão. Posteriormente, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs para os experimentos de reatividade vascular.

Uma vez o LAM isolado, foi colocado em uma cuba (10 mL), constantemente perfundido a partir da cânula acoplada na artéria mesentérica superior que foi conectada a uma bomba peristáltica (Model MINIPULS 3, Gilson®, LB, França). A solução de Krebs foi mantida a 37 °C e aerada com mistura carbogênica (95% O₂ /5% CO₂) infundida à velocidade constante de 4 mL/min e a pressão de perfusão registrada de forma concomitante em um computador (Figura 13) através do programa LabChart Reader 7 (SP, Brasil), por meio de um transdutor de pressão (PowerLab 4/30, SA, Austrália).

Os experimentos foram iniciados após 30 minutos para a estabilização completa do tecido, o qual durante o período a pressão de perfusão basal foi mantida próxima de 20 a 40 mm Hg (COSTA e col., 2012). Posteriormente, a viabilidade dos vasos do LAM foi avaliada a partir de injeção “in bolus” de 120 µmol de Cloreto de Potássio (KCl). Uma vez viáveis, a norepinefrina (NE; 30 µM) foi combinada à solução de perfusão de Krebs para que a pressão aumentasse e fosse mantida em torno de 80-100 mm Hg. A partir da resposta pressora mediada pela NE no LAM, foi avaliada a resposta à substância vasodilatadora acetilcolina. Foram realizadas injeções de acetilcolina em doses crescentes (ACh; 1-1000 pmol), onde por meio dessa foi possível avaliar a resposta do endotélio vascular a partir do efeito vasodilatador que depende diretamente da liberação de óxido nítrico.

Ao final da curva dose-resposta da ACh, o tecido foi mantido com a solução de perfusão e pressão de perfusão basal. Para avaliar a resposta vasoconstritora do LAM, foram realizadas injeções de NE em doses crescentes (1-300nmol).

Figura 13 – Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM)



Legenda: LAM isolado (Figura A); LAM canulado para o início do experimento (Figura B);
Aparatoda reatividade vascular do leito arterial mesentérico.
Fonte: A autora, 2022.

2.9 Reatividade vascular no anel de aorta

A análise da reatividade vascular no anel da aorta, que é um vaso de condutância, foi realizada a partir de Furchgott e Zawadzki (1980) e adaptado por Zanichelli e colaboradores (2004, 2007). A aorta, previamente isolada a partir da laparotomia, foi dividida em dois anéis de aproximadamente 4mm de comprimento. Cada um deles foi colocado em ganchos em forma de triângulo que estavam conectados a um transdutor de força isométrica (PanlabS.I. TRI202P). Os anéis acoplados aos ganchos foram acoplados individualmente em uma cuba (40 mL) preenchida com solução de Krebs e areada com mistura carbogênica (95% O₂ /5% CO₂), mantida a 37°C.

Os anéis de aorta na cuba foram submetidos a uma tensão basal de 2g, e permaneceram em estabilização por 1 hora. Um transdutor isométrico de tensão acoplado a um sistema amplificador foi utilizado para mensurar as tensões geradas (PanlabS.I. TRI202P; ADInstruments, Quad bridge amp ML224). Posteriormente, curvas de concentração à NE (10⁻¹⁰ mol/L– 10⁻⁴ mol/L) e ACh 10⁻¹⁰ mol/L– 10⁻⁴ mol/L) foram avaliadas, sendo essa última

com o anel pré-contraído com fenilnfrina (Phe) na concentração de 3×10^{-7} mol/L. Os gráficos de tensão foram registrados por meio do programa de computador (PowerLab4/30).

2.10 **Morfologia da aorta**

Metade da aorta destinada para a morfologia foi fixada em paraformoldeído 4%, pH 7.4 e incluída em blocos de paraplast plus (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). Cortes de espessura de $3 \mu\text{m}$ foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise da espessura da camada média do vaso. Posteriormente, as imagens digitais foram capturadas (formato JPEG, colorida 36-bit, 1360-1024 pixels, objetiva de 20x para camada íntima-média) com uma câmera LC Evolution e um microscópio de luz Olympus BX51 e as análises foram realizadas com o programa Image-Pro Plus versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

2.11 **Dosagem de proteínas**

A dosagem de proteínas totais nas amostras de plasma foi realizada a partir do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Foi utilizada a albumina bovina (SIGMA®) como padrão e placa de ELISA (Jamef®) para posterior leitura.

2.12 **Ensaio de dano oxidativo**

2.12.1 Substâncias reativas ao ácido barbitúrico (TBARS)

A técnica utilizada foi descrita por Draper e Hadley (1990) e adaptada para medida em plasma. Esse ensaio é realizado para avaliar o estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano oxidativo em lipídeos de membrana é determinado a partir da formação de subprodutos da peroxidação lipídica (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA), formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microsossomos. O MDA reage com o TBA e gera um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532 nm).

Foram utilizados 200 µL de plasma absoluto para 400 µL de ácido tricloroacético (TCA). As amostras foram centrifugadas por quinze minutos em 2000 rpm à 25°C. Foi disposto 500 µL do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e foi adicionado 500 µL de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (95°C) por trinta minutos. Aguardou-se 5 minutos para o esfriamento dos tubos e posteriormente foi realizada a leitura em placa de ELISA (532 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

2.12.2 Carbonilação de proteínas

Este método descrito por Levine e colaboradores (1990) tem o objetivo de avaliar a dosagem de oxidação de proteínas e baseia-se no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de aminoácidos de proteínas (histidina, lisina, arginina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonil, que pode ser mensurado através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonil é determinado espectrofotometricamente em 380 nm usando um coeficiente 22.0000 molar⁻¹ em nmol/mg de proteínas.

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

2.13 **Ensaio das enzimas antioxidantes**

2.13.1 Catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio, o que permite que o oxigênio molecular e a água sejam formados. A atividade da enzima foi avaliada através do consumo de peróxido de hidrogênio pela reação.

Foram utilizados 20µL de plasma em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato e peróxido de hidrogênio (0.32%). A concentração de H₂O₂ foi avaliada durante sessenta segundos por espectrofotometria (240 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) (AEBI, 1984).

2.13.2 Glutathione peroxidase

A glutathione peroxidase (GPx) é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H₂O e álcool, usando a GSH como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol, quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, por espectrofotometria, no comprimento de onda de 340 nm.

Foram utilizados 200 µL de plasma em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 1450 µL de tampão fosfato, glutathione reduzida (2 mM), GR (0.11 mg/mL) e azida sódica (0,065 mg/mL) durante dez minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e se aguardou 3 minutos. Posteriormente, H₂O₂ (3%) foi adicionado e a leitura foi realizada durante 300 segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé e Gunzler (1984).

2.14 **Dosagens do nitrito no plasma**

O óxido nítrico apresenta um tempo de vida curto, por isso a medida da produção do mesmo é mensurada a partir da formação do nitrito (NO₂), um produto de degradação estável e não volátil. A dosagem de nitrito pode ser realizada pelo método de Griess, no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto. Primeiramente, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina formando um composto azo estável de coloração púrpura. Foram pipetados em cada poço de uma placa de ELISA 100ul de plasma. Posteriormente, foram adicionados 50 ul da solução 1 (sulfanilamida 1% em solução de ácido

fosfórico a 2,5% = 200 mg sulfanilamida + 600 µl de ácido fosfórico + 19,4 ml de H₂O deslizada). Após 10 minutos, foram adicionados 50 µl da solução 2 (N- naftiletilenodiamina 0,1% em solução de ácido fosfórico a 2,5% = 20 mg de N- naftiletilenodiamina + 600 µl de ácido fosfórico + 19,4 ml de H₂O). A placa permaneceu no agitador por 5 minutos e analisada em comprimento de onda de 540 nm (GREEN e col., 1982; SUN e col., 2003)

2.15 Dosagem de corticosterona no plasma

A dosagem de corticosterona foi realizada como descrito no datasheet do kit ALPCO, 2017. A partir do método de ELISA foram pipetados em cada poço 10 µl de amostra seguido dos respectivos reagentes e soluções. Posteriormente, foi analisada por espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm e representado em ng/ml.

2.16 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa Graph-Pad Prism 8.0 (GraphPad softwares, Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram submetidos ao teste de Kolmogorov- Smirnov para verificar se os mesmos se encontravam dentro da normalidade. Quando estavam nessa faixa, foram submetidos ao teste de análise de variância two-way ANOVA seguido do pós- hoc com teste de múltiplas comparações de Sidak. Dados não-paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis.

Para analisar o efeito da HI per se foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do pós- hoc de Tukey; já o efeito da separação materna entre os grupos separados e seus respectivos controles de separação foi avaliado por meio de teste T-Student; para dados não paramétricos, essa comparação foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

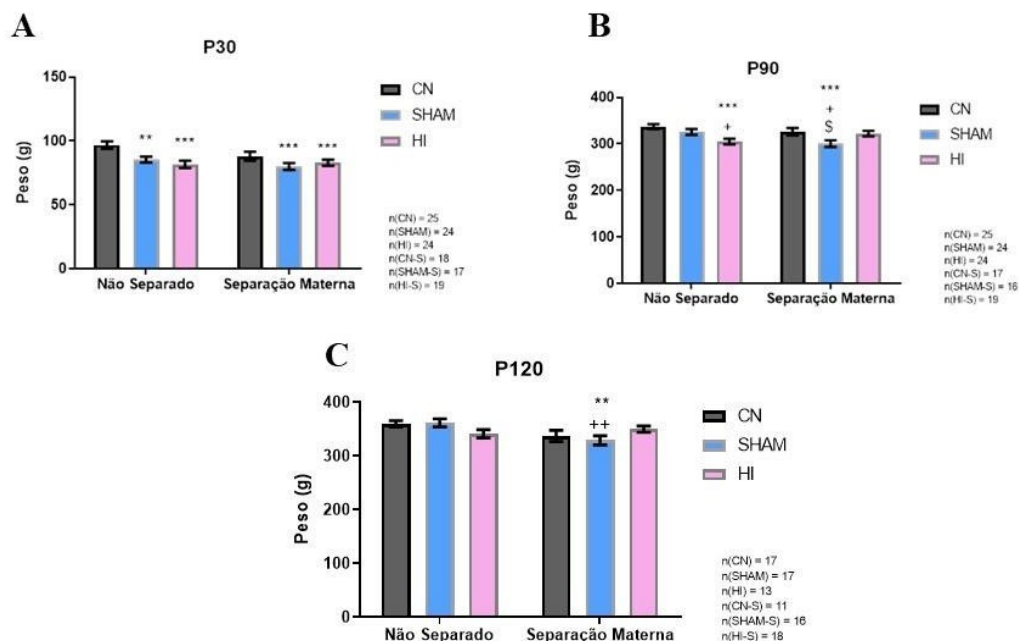
Os resultados foram apresentados na forma média ± erro padrão (EPM) e foi considerado significativo quando $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no peso corporal.

Durante o período experimental, nas idades de 30, 90 e 120 dias o peso corporal dos animais foi aferido (Figura 14). Em P30, houve uma redução no peso corporal dos animais HI (P=0,0004), HI-S (P= 0,0009), SHAM (P=0,0099) e SHAM-S (P= 0,0002) quando comparados ao grupo CN (Figura 14 a). O mesmo perfil de redução de peso corporal se manteve nos animais HI e SHAM-S em P90 (Figura 14 b). Nessa idade, os animais HI demonstraram menor peso quando comparados aos grupos CN (P= 0,0007) e SHAM (P= 0,0409). Já os animais SHAM-S apresentaram menor peso corporal se comparados aos grupos CN (P= 0,0001), SHAM (P= 0,0137) e CN-S (P= 0,0410). Com 120 dias, a redução do peso corporal se manteve nos animais SHAM-S quando comparados ao grupo CN (P= 0,0050) e SHAM (P= 0,0068), demonstrando efeito consistente da separação materna nos animais SHAM em diminuir o peso corporal (Figura 14 c).

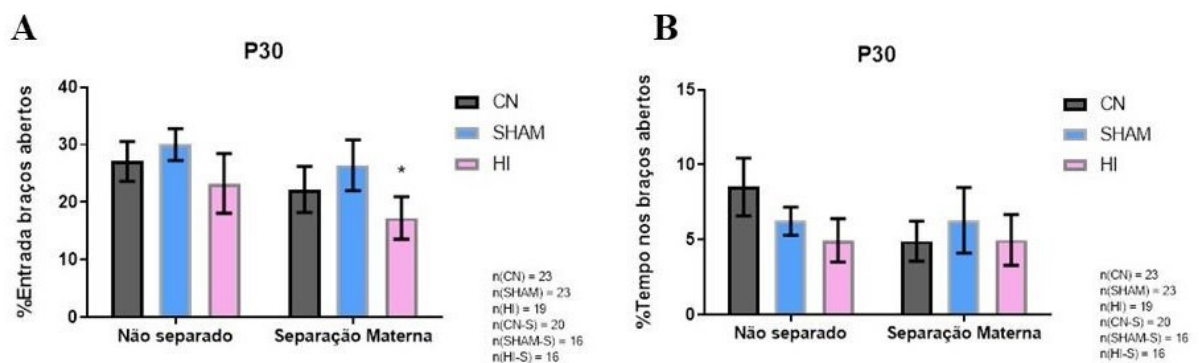
Figura 14 – Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no peso corporal



3.2 Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso.

A figura 15 demonstra os efeitos dos estresses perinatais sob o comportamento tipo-ansioso no paradigma do plus maze test em P30. A combinação da hipóxia isquêmica pré-natal com a separação materna levou os animais a apresentarem um comportamento tipo-ansioso (Figura 15 a), tendo em vista a redução na % de entrada nos braços abertos nesse grupo se comparado aos animais CN ($P= 0,0377$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no parâmetro de % tempo de permanência nos braços abertos (Figura 15 b).

Figura 15 – Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso em P30 no *plus maze test*

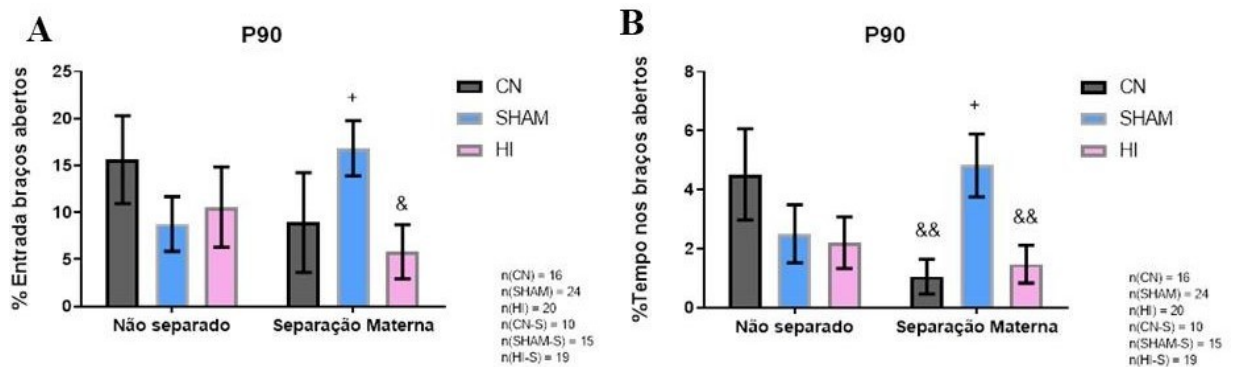


Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso no *plus maze test* em P30.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: * Significativamente diferente do grupo CN, conforme determinado pelo teste Kruskal-Wallis.

Em P90, foi observado um comportamento curioso dos animais SHAM-S em ambos os parâmetros do *plus maze test* (Figura 16). Na % de entrada nos braços abertos (Figura 16a), os animais SHAM-S entram mais vezes quando comparado aos grupos HI-S ($P= 0,0115$) e SHAM ($P= 0,0488$). Esse mesmo perfil ocorre na % tempo de permanência nos braços abertos nesse mesmo grupo (Figura 16 b) quando comparado aos animais HI-S ($P= 0,0045$), CN-S ($P= 0,0066$) e SHAM ($P= 0,0140$).

Figura 16 – Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso em P90 no *plus maze test*.

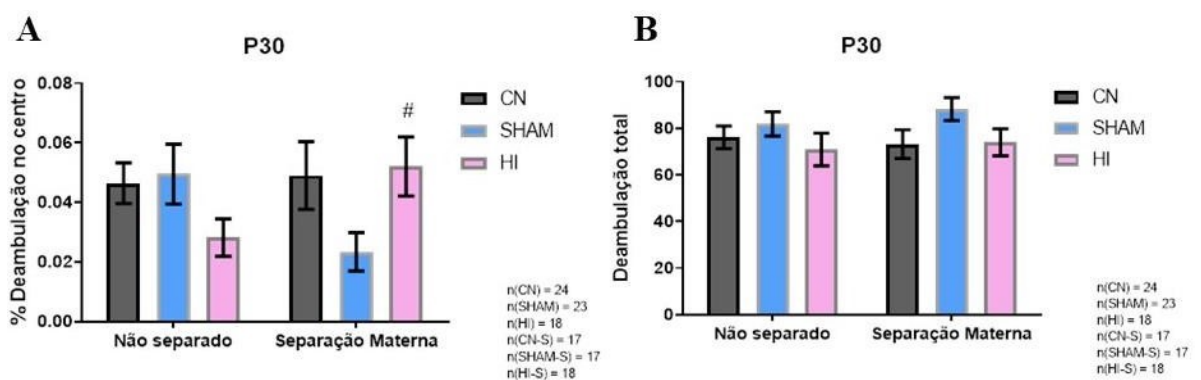


Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso no *plus maze test* em P90.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: + Significativamente diferente do grupo SHAM, & Significativamente diferente do grupo SHAM-S, conforme determinado pelo teste Kruskal-Wallis.

No aparato do open field test em P30 (Figura 17) os animais do grupo HI-S em P30 demonstraram maior deambulação nos quadrados centrais (Figura 17 a) quando comparados ao grupo HI ($P=0,0497$). Entretanto, a deambulação total não foi diferente entre os grupos (Figura 17 b). Já em P90, a HI per se quando comparada ao grupo CN reduz a deambulação nos quadrados centrais ($P=0,0318$), enquanto aumenta a deambulação nos quadrados totais ($P=0,0384$; Figura 18 a,b).

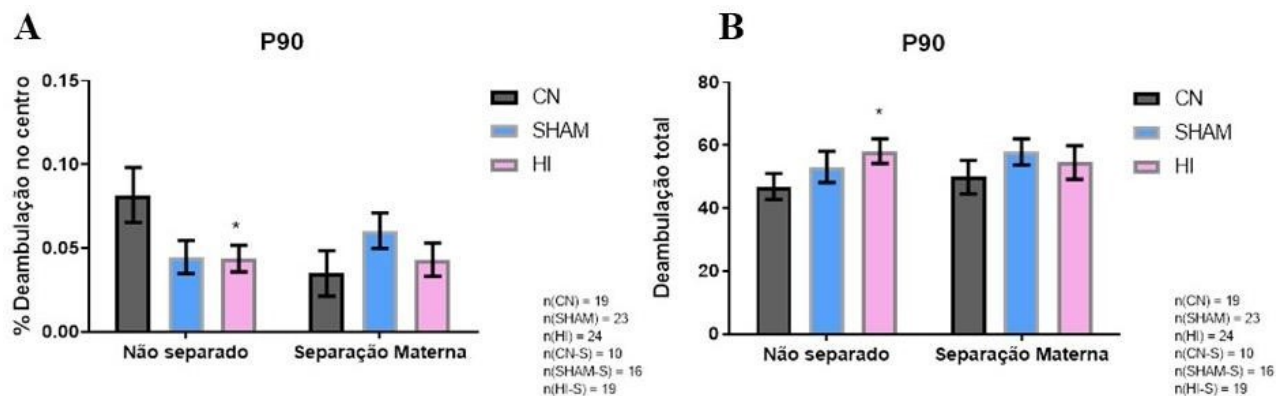
Figura 17 – Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso em P30 no *open field test*.



Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso no *open field test* em P30.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: # Significativamente diferente do grupo HI, conforme determinado pelo teste ANOVA.

Figura 18 – Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso em P90 no *open field test*.



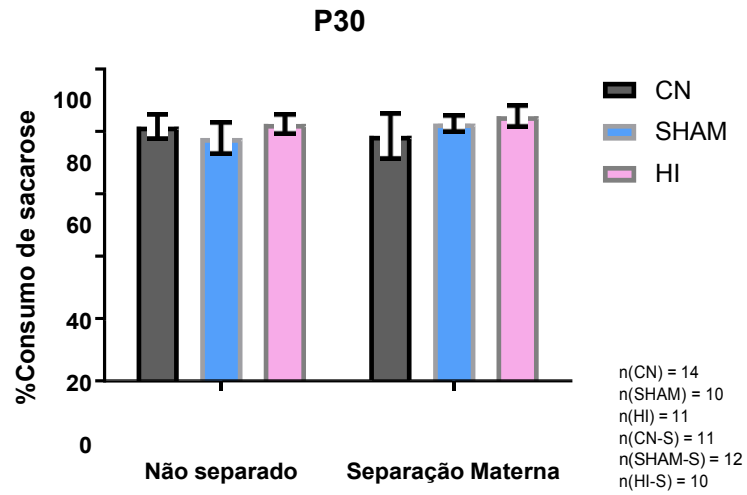
Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-ansioso no *open field test* em P90.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: * Significativamente diferente do grupo CN, conforme determinado pelo teste ANOVA.

3.3 Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e combinação dos dois estresses no comportamento tipo-depressivo.

O comportamento tipo-depressivo foi avaliado a partir de dois testes comportamentais: teste de preferência à sacarose e do nado forçado. Em P30, no teste de preferência à sacarose, não houve diferença significativa no comportamento de anedonia entre os grupos (Figura 19). Entretanto, no teste do nado forçado houve efeito da hipóxia e da separação materna isoladamente (Figura 20). Os animais do grupo HI apresentam menor tempo de mobilidade quando comparados aos grupos CN ($P=0,0073$) e SHAM ($P=0,0460$). Nesse parâmetro (Figura 20 a), os animais CN-S demonstram menor mobilidade se comparado ao CN ($P=0,0120$), assim como os animais SHAM-S quando comparados ao grupo CN ($P=0,0047$) e SHAM ($P=0,0064$). Em conjunto, a HI aumenta o tempo de imobilidade (Figura 20 b) quando comparado ao grupo CN ($P=0,0100$), assim como o grupo CN-S se comparado ao controle CN ($P=0,0129$). O grupo SHAM-S também apresenta aumento da imobilidade quando comparado aos grupos CN ($P=0,0054$) e SHAM ($P=0,0058$).

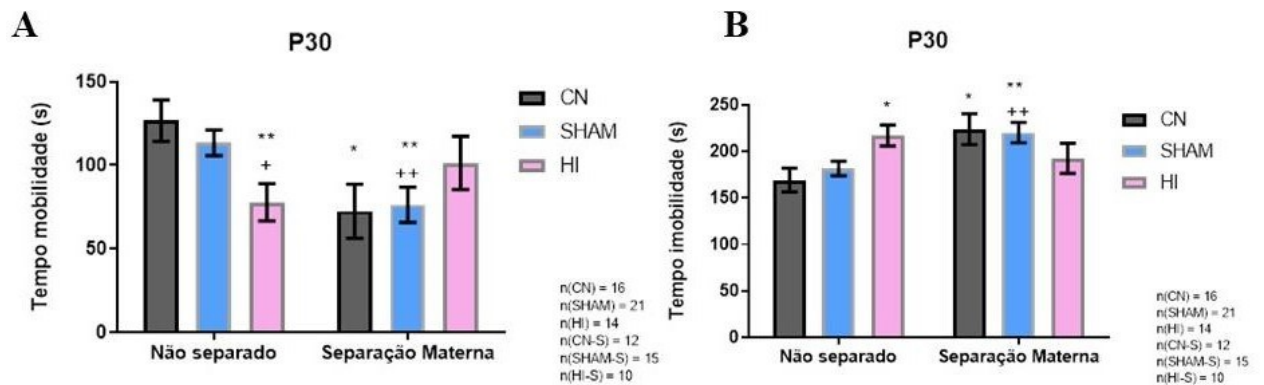
Figura 19 - Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no consumo de sacarose em P30.



Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no teste de preferência à sacarose em P30.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão, conforme determinado pelo teste Kruskal-Wallis.

Figura 20 – Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-depressivo em P30



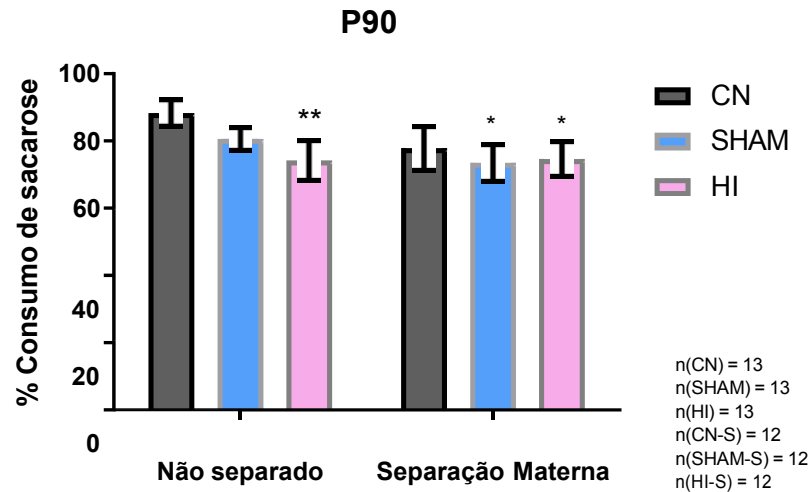
Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no teste do nado forçado em P30.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: * Significativamente diferente do grupo CN, + Significativamente diferente do grupo SHAM, conforme determinado pelo teste ANOVA.

O comportamento de anedonia foi observado em P90 no teste de preferência à sacarose (Figura 21). A HI *per se* reduz o consumo de sacarose quando comparado aos animais CN ($P=0,0029$). Esse mesmo perfil do aumento na anedonia ocorre nos grupos SHAM-S ($P=0,0457$) e HI-S ($P=0,0135$) quando comparado aos animais CN.

As modificações no comportamento tipo-depressivo reveladas pelo teste do nado forçado em P30 foram mantidas com 90 dias (Figura 22 a,b). O grupo HI apresenta menor mobilidade ($P=0,0302$) e imobilidade maior ($P=0,0421$) quando comparado ao CN. Os animais do grupo CN-S também apresentam o mesmo perfil, com redução na mobilidade ($P=0,0127$) e aumento da imobilidade ($P=0,0103$) se comparado aos animais CN. De forma semelhante, o grupo SHAM-S apresenta o mesmo resultado, quando comparado ao grupo CN ($P=0,0102$; $P=0,0097$) e SHAM ($P=0,0113$; $P=0,0123$). Entretanto, de forma distinta aos resultados em P30, com 90 dias os animais HI-S também apresentam redução no tempo de mobilidade ($P=0,0053$) e aumento da imobilidade ($P=0,0067$) se comparado ao grupo CN.

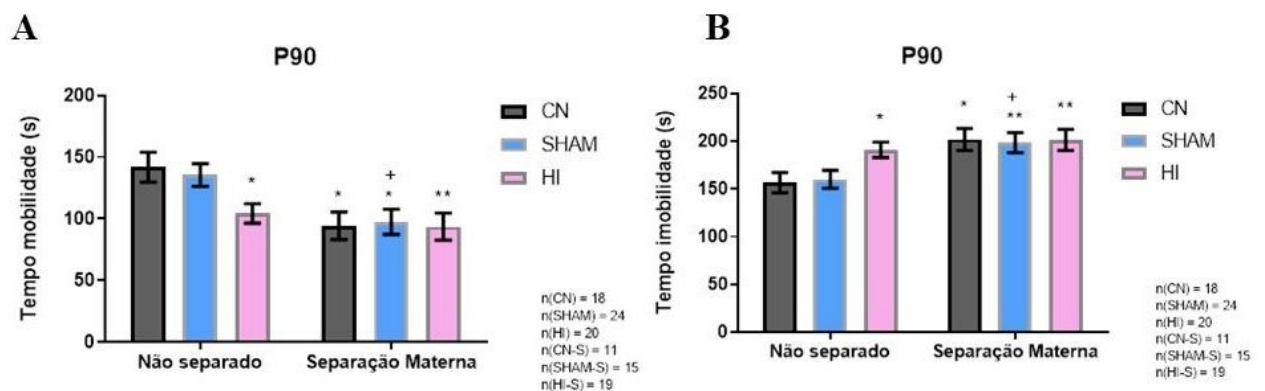
Figura 21 – Efeitos da da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no consumo de sacarose em P90



Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no teste de preferência à sacarose em P90.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: * Significativamente diferente do grupo CN, conforme determinado pelo teste Kruskal-Wallis.

Figura 22 – Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no comportamento tipo-depressivo em P90



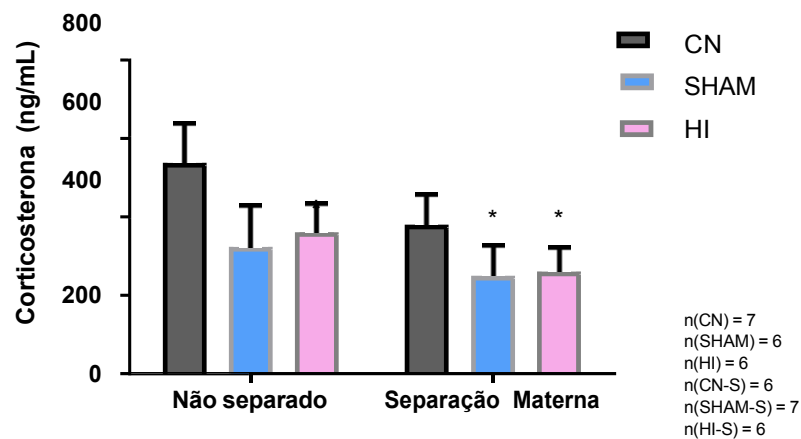
Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses no teste do nado forçado em P90.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: * Significativamente diferente do grupo CN, + Significativamente diferente do grupo SHAM, conforme determinado pelo teste ANOVA.

3.4 Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses nos níveis plasmáticos de corticosterona.

A figura 23 demonstra os níveis plasmáticos de corticosterona dos animais. Foi observado uma redução de corticosterona nos animais HI-S ($P=0,0446$) e SHAM-S ($P=0,0421$) se comparado ao grupo CN.

Figura 23 – Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses nos níveis plasmáticos de corticosterona



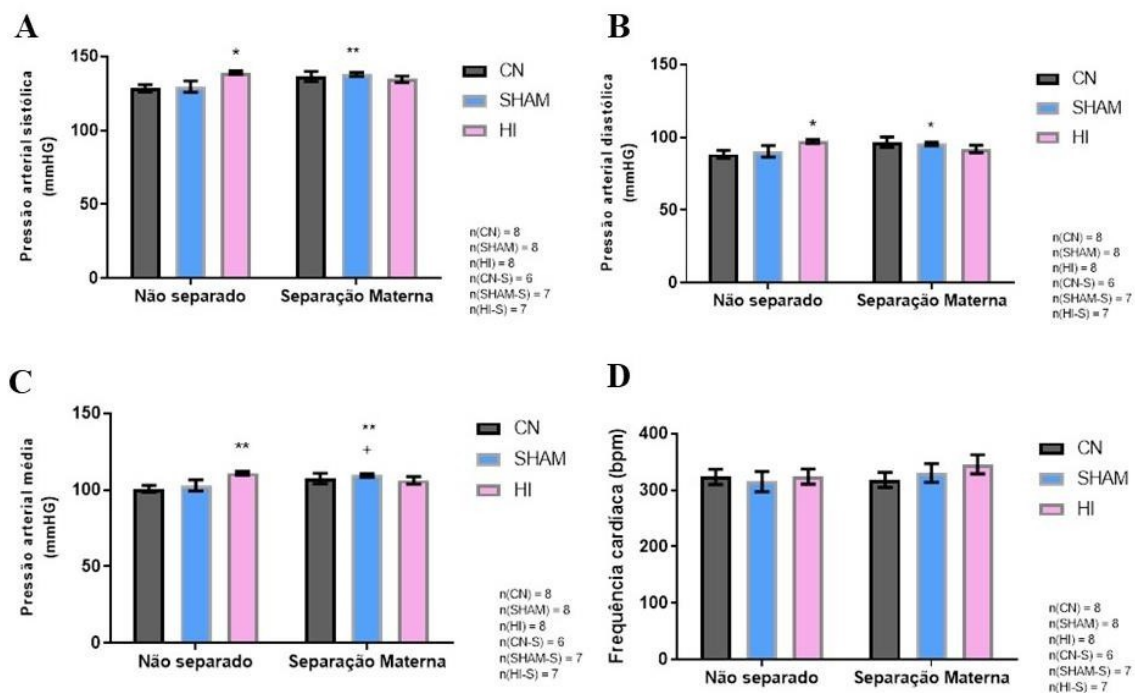
Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses nos níveis plasmáticos de corticosterona

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: * Significativamente diferente do grupo CN, conforme determinado pelo teste *T-Student*.

3.5 Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na pressão arterial sistêmica.

A hipóxia isquêmica e a separação materna, isoladamente, alteram os parâmetros avaliados na pressão arterial sistêmica (Figura 24). O grupo HI ($P=0,0194$) e SHAM-S ($P=0,0065$) apresentam maior pressão arterial sistólica se comparado aos animais CN (Figura 24 a). Na pressão arterial diastólica ocorre o mesmo perfil, em que os animais HI ($P=0,0211$) e SHAM-S ($P=0,0403$) são maiores que o grupo CN (Figura 24 b). De forma semelhante, os animais HI apresentam maior pressão arterial média ($P=0,0033$) se comparado ao CN, bem como os animais SHAM-S em comparação aos grupos CN ($P=0,0043$) e SHAM ($P=0,0401$; Figura 24 c). Já no parâmetro da frequência cardíaca não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 24 d).

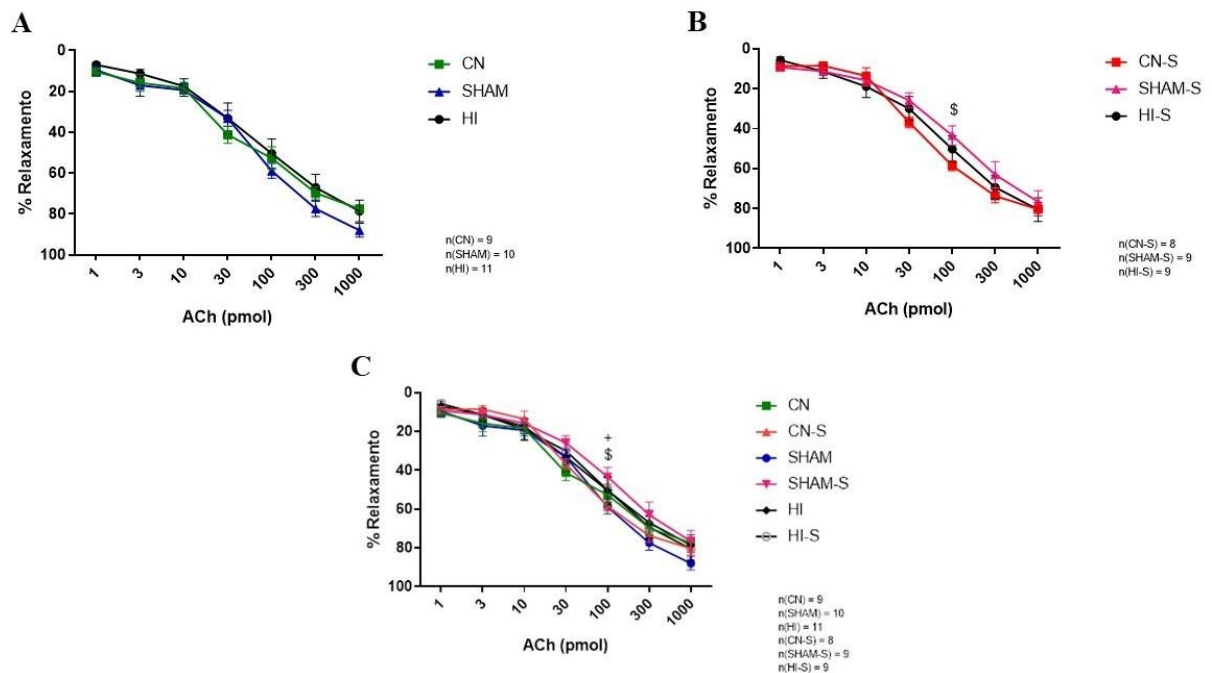
Figura 24 – Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na pressão arterial sistêmica



3.6 Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na reatividade vascular

A reatividade vascular no leito arterial mesentérico pode ser observada na figuras 25 e 26. Não foram observadas diferenças significativas no grupo HI quando comparado aos controles (Figura 25 a). Por outro lado, entre os grupos submetidos à SM, os animais SHAM-S apresentam menor resposta vasodilatadora na dose de 100pmol ($P=0,0405$) se comparado ao CN-S (Figura 25 b). Na mesma dose, a separação materna nos animais SHAM-S também parece reduzir a vasodilatação em comparação aos animais SHAM ($P= 0,0463$; Figura 25 c). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na resposta vasoconstritora induzida pela noraepinefrina nesses vasos de resistência (Figura 26 a-c).

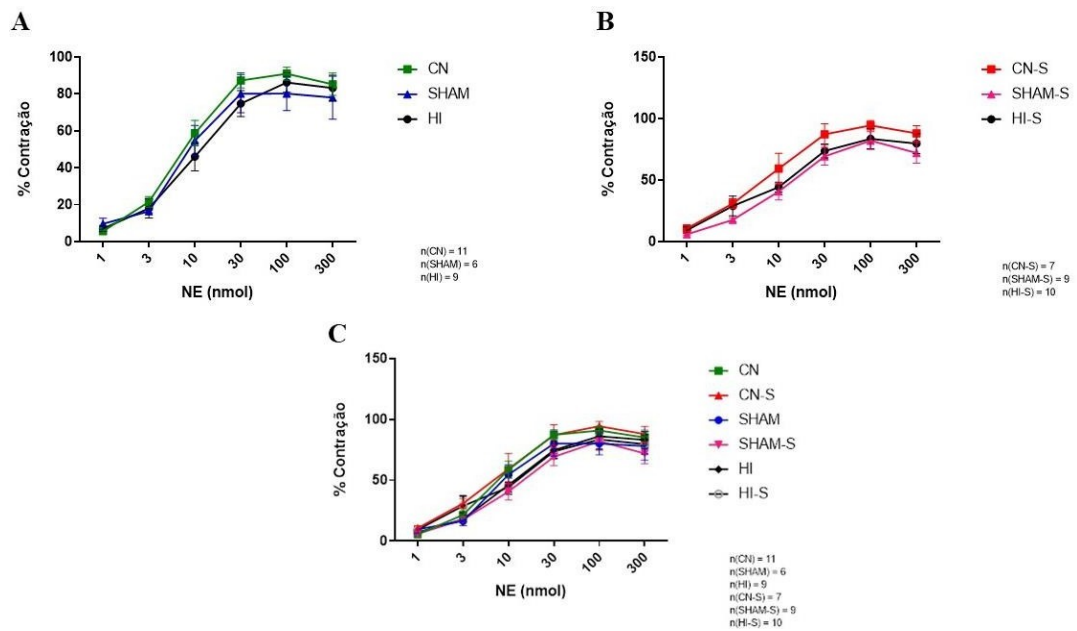
Figura 25 – Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na resposta vasodilatadora no LAM



Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na resposta vasodilatadora no LAM.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: \$ Significativamente diferente do grupo CN-S, + Significativamente diferente do grupo SHAM, conforme determinado pelo teste ANOVA.

Figura 26 – Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na resposta vasoconstritora no LAM.

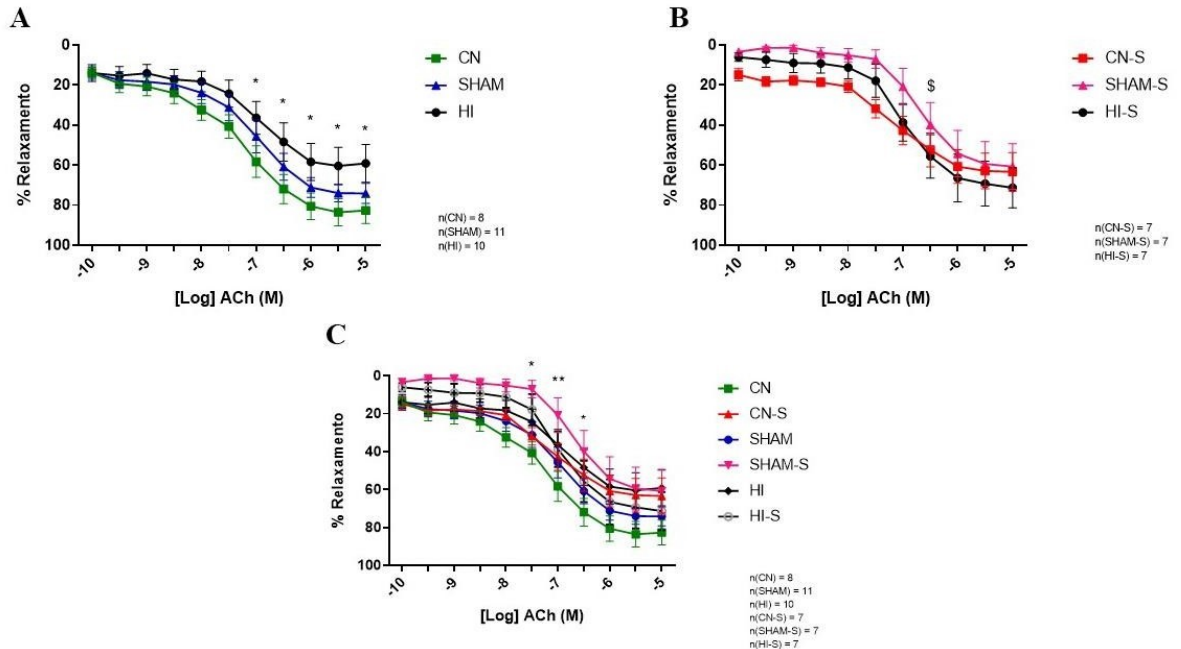


Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na resposta vasoconstritora no LAM.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão, conforme determinado pelo teste ANOVA.

A figura 27 apresenta os resultados obtidos na reatividade vascular nos anéis de aorta. A HI de forma isolada reduz a resposta vasodilatadora quando comparado aos animais CN nas concentrações 1×10^{-7} ($P=0,0474$), 3×10^{-7} ($P=0,0300$), 1×10^{-6} ($P=0,0440$), 3×10^{-6} ($P=0,0334$) e 1×10^{-5} ($P=0,0299$), como pode ser observado na figura 27 a. Entre os grupos separados, os animais SHAM-S na concentração 3×10^{-8} ($P= 0,0484$) apresentam vasodilatação menor se comparados ao grupo CN-S (Figura 27 b). Também é observado o efeito da separação materna nos animais SHAM em reduzir a resposta vasodilatadora nas concentrações 3×10^{-8} ($P=0,0115$), 1×10^{-7} ($P=0,0030$), 3×10^{-7} ($P=0,0196$) quando comparado ao grupo CN (Figura 27 c).

Figura 27 – Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na resposta vasodilatadora nos anéis de aorta.

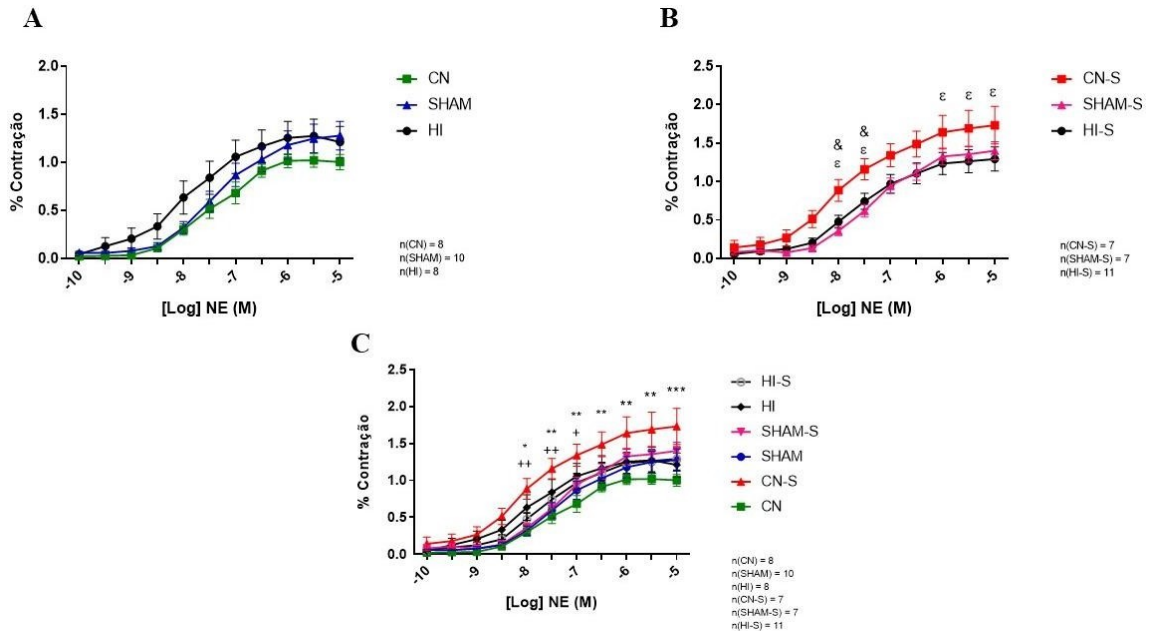


Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na resposta vasodilatadora nos anéis de aorta.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: * Significativamente diferente do grupo CN, \$ Significativamente diferente do grupo CN-S, conforme determinado pelo teste ANOVA.

Com relação a resposta vasoconstritora nos anéis de aorta (Figura 28), não foi observado diferença nos animais HI quando comparado aos controles (Figura 28 a). Por outro lado, a separação materna *per se* aumenta a resposta vasoconstritora no vaso de condutância. Os animais CN-S apresentam maior contração quando comparado com os seguintes grupos e respectivas concentrações: SHAM-S, 1×10^{-8} (P=0,0133) e 3×10^{-8} (P=0,0108); HI-S, 1×10^{-8} (P=0,0414), 3×10^{-8} (P=0,0356), 1×10^{-6} (P=0,0418), 3×10^{-6} (P=0,0302) e 1×10^{-5} (P=0,0251); CN, 1×10^{-8} (P=0,0104), 3×10^{-8} (P=0,0031), 1×10^{-7} (P= 0,0022), 3×10^{-7} (P=0,0125), 1×10^{-6} (P=0,0045), 3×10^{-6} (P=0,0017), 1×10^{-5} (P=0,0004); SHAM, 1×10^{-8} (P=0,0104), 3×10^{-8} (P=0,0085) e 1×10^{-7} (P=0,0490; Figura 28 b,c).

Figura 28 – Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na resposta vasoconstritora nos anéis de aorta



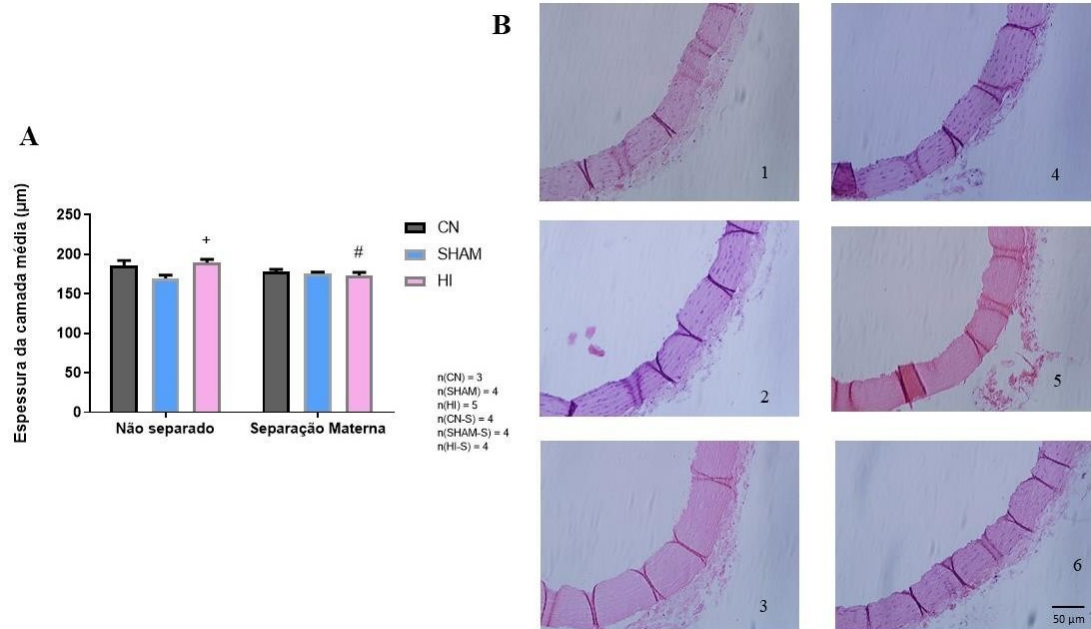
Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na resposta vasoconstritora nos anéis de aorta.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: * Significativamente diferente do grupo CN, + Significativamente diferente do grupo SHAM, & Significativamente diferente do grupo SHAM-S, ϵ Significativamente diferente do grupo HI-S, conforme determinado pelo teste ANOVA.

3.7 Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na espessura da camada média da aorta

A hipóxia isquêmica pré-natal de forma isolada aumenta a espessura da camada média da aorta nos animais quando comparado ao grupo SHAM ($P=0,0181$). Esse mesmo perfil não ocorre nos animais submetidos a separação materna, de modo que o grupo HI-S apresenta espessura menor se comparado ao seu respectivo controle de separação HI ($P=0,0256$; Figura 29 a,b).

Figura 29 – Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na espessura da camada média da aorta



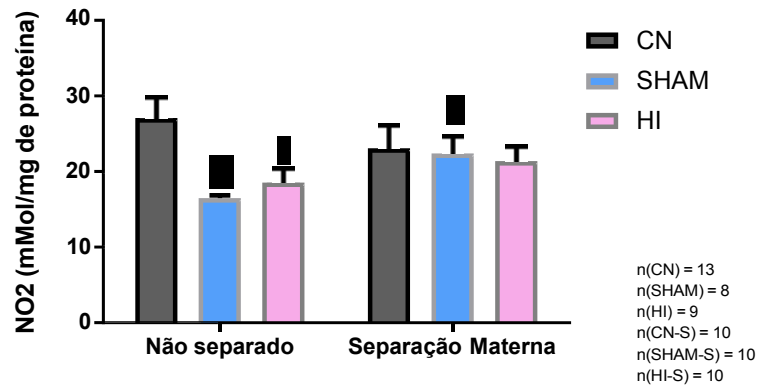
Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na espessura da camada média da aorta (Figura A) e as imagens representativas dos seguintes grupos CN (1), SHAM (2), HI (3), CN-S (4), SHAM-S (5) e HI-S (6).

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: + Significativamente diferente do grupo SHAM, # Significativamente diferente do grupo HI, conforme determinado pelo teste ANOVA.

3.8 Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses nos níveis plasmáticos de nitrito

Os níveis plasmáticos de nitrito estão demonstrados na figura 30. Os animais do grupo HI (P= 0,0308) e SHAM (P= 0,0077) apresentam menores níveis de nitrito quando comparado ao grupo CN. Por outro lado, ocorre um aumento nos níveis de nitrito nos animais SHAM-S (P= 0,0299) se comparados ao grupo SHAM.

Figura 30 – Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses nos níveis plasmáticos de nitrito



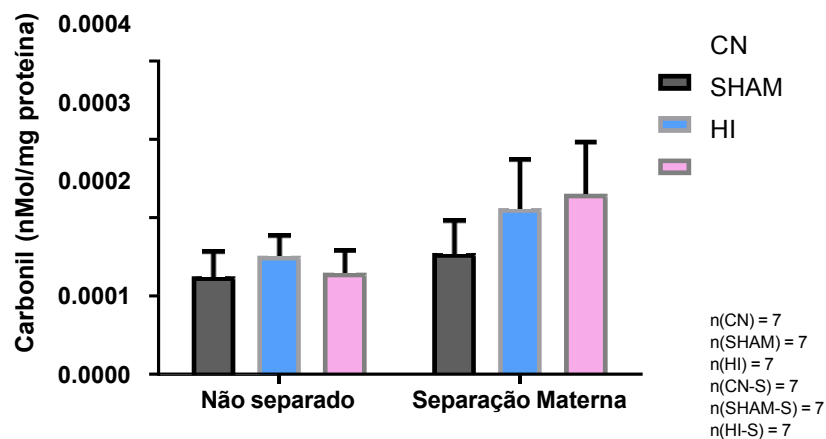
Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses nos níveis plasmáticos de nitrito.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: * Significativamente diferente do grupo CN, + Significativamente diferente do grupo SHAM, conforme determinado pelo teste ANOVA.

3.9 Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses nos marcadores de dano oxidativo

A carbonilação de proteínas não demonstrou diferença entre os grupos (Figura 31). Por outro lado, a formação do subproduto (malondialdeído-MDA) de peroxidação lipídica apresentou diferenças entre os grupos experimentais (Figura 32). Os animais do grupo HI-S apresentam menor peroxidação lipídica quando comparado aos grupos CN (P= 0,0004), HI (P= 0,0026) e CN-S (P= 0,0003). Esse mesmo perfil ocorre nos animais SHAM-S, uma vez que os mesmos apresentam menor formação do subproduto se comparados aos grupos CN(P= 0,0073), SHAM (P= 0,0031) e CN-S (P= 0,0162).

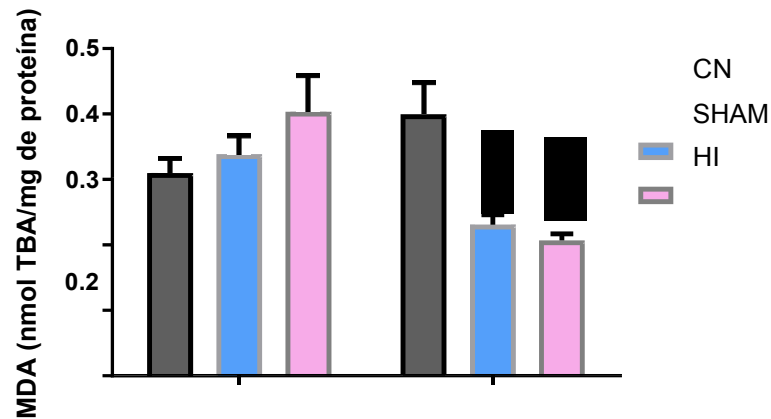
Figura 31 – Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses sobre a carbonilação de proteínas



Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na carbonilação de proteínas.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão, conforme determinado pelo teste ANOVA.

Figura 32 – Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses sobre os níveis de TBARS



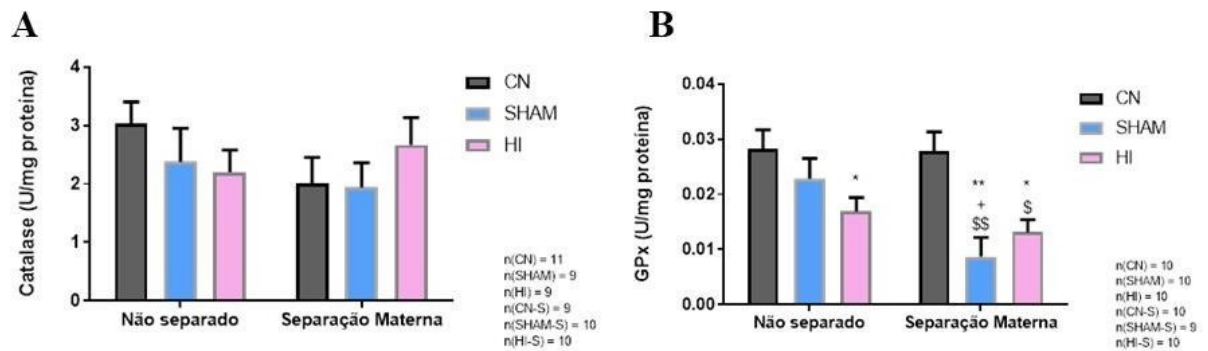
Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses sobre os níveis de TBARS.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: * Significativamente diferente do grupo CN, + Significativamente diferente do grupo SHAM, \$ Significativamente diferente do grupo CN-S, # Significativamente diferente do grupo HI, conforme determinado pelo teste ANOVA.

3.10 Efeitos da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na atividade das enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes estão representadas na figura 33. A atividade da catalase não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 33 a). Entretanto, a atividade da glutathiona peroxidase foi distinta entre eles (Figura 33 b). A HI reduz a atividade da GPx nos animais quando comparados ao grupo CN ($P=0,0138$). A combinação dos dois estresses presente nos animais HI-S também reduziu a atividade da enzima se comparado aos animais CN ($P=0,0185$) e CN-S ($P=0,0262$). Esse mesmo perfil de redução da atividade da GPx foi observado nos animais SHAM-S quando comparados aos grupos CN ($P=0,0011$), CN-S ($P=0,0016$) e SHAM ($P=0,0453$).

Figura 33 – Efeitos da hipóxia isquêmica, separação materna e a combinação dos dois estresses na atividade das enzimas antioxidantes



Legenda: Efeito da hipóxia isquêmica pré-natal, separação materna e a combinação dos dois estresses na atividade das enzimas antioxidantes.

Nota: Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas: * Significativamente diferente do grupo CN, + Significativamente diferente do grupo SHAM, § Significativamente diferente do grupo CN-S, conforme determinado pelo teste ANOVA.

4 DISCUSSÃO

Tendo em vista a importância do período perinatal para a maturação dos sistemas biológicos e o papel significativo do estresse precoce na gênese de diversas doenças, buscamos investigar, no presente estudo, os efeitos provocados por dois estresses perinatais, representados pela hipóxia isquêmica pré-natal e a separação materna, de forma isolada e combinada, na susceptibilidade aos transtornos afetivos e ao risco cardiovascular em ratos.

Estudos prévios na literatura ao utilizar modelos distintos de HI e SM revelam que os estresses pré e pós-natal, respectivamente, são capazes de modificar circuitos e estruturas neurais que potencializam o surgimento de desordens psiquiátricas ao longo da vida, como a ansiedade e a depressão. Além disso, conseguem desregular importantes vias metabólicas, causa disfunção mitocondrial, aumento do estresse oxidativo e modificação de estruturas cardíacas e vasculares, sendo um fator de risco para a disfunção cardiovascular (BARBOSA e col., 2014; GIUSSANI, 2021; GUAQUIL e col., 2004; MANHANES e col., 2020; ROQUE e col., 2014; WANG e col., 2021).

Para a análise do comportamento tipo-ansioso empregamos os paradigmas plus maze e open field test, amplamente estabelecidos na literatura. Embora apresentem diferenças entre si, ambos os testes buscam avaliar a resposta do animal frente a uma situação de exposição relacionada a resposta de ansiedade. Os ratos estão situados nas posições mais inferiores da cadeia alimentar, de modo que são presas potenciais para diferentes predadores (SOARES, 1997, pp 313). Essa característica explica o comportamento inato de roedores em evitar locais abertos e iluminados, tendo em vista que os colocam sob ameaça iminente (CRUZ e LANDEIRA- FERNANDEZ, 2013). Embora a baixa exposição seja comum entre os ratos, eventos de estresse precoce que desregulam circuitos cerebrais envolvidos na resposta à ansiedade podem desencadear o comportamento tipo-ansioso (WEI e col., 2010).

Observamos comportamentos distintos entre os diferentes grupos experimentais. Os animais submetidos a HI de forma isolada não apresentam modificações no comportamento no paradigma do plus maze test quando comparado aos controles em ambas as idades. Por outro lado, na idade adulta, a hipóxia isquêmica reduz a deambulação nos quadrados centrais no open field, enquanto aumenta a deambulação no total de quadrantes, sugerindo aumento do comportamento tipo-ansioso. Sab e colaboradores (2013), empregando o mesmo modelo de HI de nosso estudo, demonstraram que os ratos submetidos ao estresse pré-natal permanecem

menos tempo nos braços abertos do *plus maze* quando comparados aos controles, o que não está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. Entretanto, Markostamou e colaboradores (2016), ao utilizar o modelo de oclusão da carótida esquerda seguida de exposição a ambiente com baixas concentrações de oxigênio, revelou que animais HI apresentam menor tempo de deambulação nos quadrados centrais e percorrem mais os quadrados totais, o que sugere comportamento tipo- ansioso. Nossos achados estão de acordo com esse estudo, uma vez que observamos aumento do comportamento tipo-ansioso dos animais HI adultos no *open field test*.

A separação materna per se não afetou o comportamento tipo-ansioso nos paradigmas do plus maze e open field test. Os nossos resultados não estão consistentes com os da literatura nesse parâmetro. Jin e colaboradores (2018) observaram que animais submetidos a separação materna apresentam redução na entrada nos braços abertos e nos quadrados centrais nos dois aparatos. Entretanto, os animais HI-S submetidos a combinação dos dois estresses quando jovens entram menos vezes nos braços abertos no plus maze se comparado aos animais controle, o que está de acordo com estudos prévios que apontam que a combinação dos dois modelos de estresse precoce levam a um comportamento tipo-ansioso nesse paradigma (MARKOSTAMOU e col., 2016). Por outro lado, de forma conflitante com os resultados anteriores, foi observado que esses animais quando adultos percorrem mais os quadrados centrais quando comparados ao seu respectivo de controle de separação HI.

A separação materna nos animais SHAM não apresentou diferenças entre os grupos no open field em ambas as idades e no plus maze com 30 dias. Entretanto, em P90, esses animais quando comparados aos grupos separados CN-S e HI-S apresentam redução no comportamento tipo-ansioso pelo aumento significativo na entrada e permanência nos braços abertos. Esse achado sugere que a separação materna no grupo cirúrgico SHAM levou a um comportamento disfuncional, tendo em vista que esses animais apresentam alta exposição a locais abertos, comportamento esse não observado em animais controle. Não podemos descartar, no entanto, que variáveis externas, como variações das condições sonoras, por exemplo, possam ter interferido nos resultados. Embora tenhamos observado diferenças consistentes com a literatura, principalmente com o papel da HI em provocar o aumento do comportamento tipo-ansioso, mais estudos devem ser realizados de modo a solucionar e entender as questões que não ficaram tão bem esclarecidas.

De forma complementar, investigamos os efeitos do estresse da hipóxia isquêmica pré-natal e da separação materna, de forma isolada e combinada, no comportamento tipo-depressivo. O comportamento de anedonia, caracterizado pela perda de prazer, é um dos

sintomas centrais da depressão e pode ser mensurado a partir do teste de preferência à sacarose, onde é possível avaliar o comportamento do animal frente a uma recompensa alimentar, que no caso é a água adocicada. Esse teste prediz que o animal com anedonia não irá consumir tanto a água com sacarose em comparação aos demais (SCHEGGI e col., 2018).

Observamos efeitos significativos da HI e SM, isolada e combinada, em gerar comportamento de anedonia nos animais adultos. Em P90, os animais HI, SHAM-S e HI-S apresentam menor consumo de sacarose do que os animais controles. Esses achados são consistentes com dados da literatura que revelam comportamento de anedonia em animais submetidos ao estresse precoce (CUI e col., 2020; HUANG e col., 2021).

O teste do nado forçado é um paradigma amplamente utilizado para investigar o comportamento tipo-depressivo de roedores. Segundo o postulado, o animal é colocado em uma situação de desamparo, que consiste em um cilindro de água, e durante um tempo considerável tentará escapar, porém em algum momento desistirá e ficará imóvel. Estudos demonstram que a administração de antidepressivos aumenta a mobilidade do animal, considerando, portanto, que o tempo de imobilidade é um parâmetro associado ao comportamento tipo-depressivo (PORSOLT, 1977; YANKELEVITCH-YAHAV e col., 2015).

O presente estudo revelou alterações importantes dentre os distintos grupos experimentais. A HI per se aumenta o tempo de imobilidade e reduz a mobilidade em ambas as idades. Tais achados corroboram com estudos na literatura que apontam que a HI é capaz de gerar comportamento tipo-depressivo nos animais (DA SILVA e col., 2021; MARKOSTAMOU e col., 2016). A separação materna também é eficiente em promover o comportamento tipo-depressivo nos animais CN-S e SHAM-S em ambas as idades e nos HI-S quando adultos, ao passo que reduz a mobilidade e aumenta a imobilidade, o que está de acordo com estudos prévios (CUI e col., 2020; HUANG e col., 2021; MARKOSTAMOU e col., 2016; VARGAS e col., 2016). O conjunto

de dados sugere que os modelos de estresse precoce adotados no presente estudo são eficientes em gerar comportamento tipo-depressivo nos animais, tendo em vista os resultados obtidos nos testes de preferência à sacarose e do nado forçado. Além disso, a HI a partir do clampeamento das artérias uterinas em E18, de forma isolada e combinada com a separação materna, ainda não tinha sido associada com os dados de anedonia, demonstrando, portanto, a consistência do modelo adotado como objeto de estudo para a investigação dos mecanismos biológicos envolvidos na depressão.

O estresse crônico em momentos cruciais do desenvolvimento desregulam importantes vias metabólicas, como o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (VARGAS e col., 2016). Estudos apontam que o estresse vivenciado em fases precoces do desenvolvimento consegue induzir mudanças significativas na habilidade em responder ao estresse durante a vida adulta, principalmente por desencadear alterações significativas no eixo HPA. Tais modificações aumentam a susceptibilidade do indivíduo desenvolver depressão (TOFOLI e col., 2011).

O presente estudo revelou níveis baixos de corticosterona em animais SHAM-S e HI-S quando comparado ao grupo CN. Vargas e colaboradores (2016) ao realizar o protocolo de separação materna semelhante ao de nosso estudo demonstrou que os animais submetidos a SM apresentam corticosterona basal elevada se comparado aos controles. Outro protocolo adotado de separação única de 24 horas entre P14-P15 apontou que os níveis basais de cortisol não são afetados nesses animais (PENKE e col., 2001). Pinheiro e colaboradores (2011) também observaram redução nos níveis de corticosterona em camundongos submetidos à 1 hora diária de separação do P0-P13. Durante as duas primeiras semanas pós-natais, mais especificamente entre o P4-P14, os roedores neonatos apresentam níveis basais de corticosterona baixos, o que constitui o chamado período hiporresponsivo ao estresse. A hiporresponsividade do eixo HPA é fundamental para a maturação adequada dos sistemas biológicos. Entretanto, o manejo inadequado, interrupção do cuidado materno e o estresse precoce conseguem prejudicar o desenvolvimento satisfatório do eixo (HUANG, 2014; VÁZQUEZ, 1998). Ratos adultos separados de suas matrizes durante as primeiras semanas pós-nascimento além de responderem de forma mais intensa a um estímulo estressante ao longo da vida, apresentam níveis do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e do hormônio corticotrófico (ACTH), liberados pelo hipotálamo e hipófise, respectivamente, maiores do que animais não separados (PLOTSKY e MEANEY, 1993).

O cortisol, quando em excesso, consegue regular por feedback negativo as glândulas adrenais, hipófise e o hipotálamo. Embora o presente estudo tenha demonstrado que os animais HI-S e SHAM-S apresentem níveis basais de corticosterona inferiores ao grupo CN não podemos descartar possíveis alterações no eixo HPA, tendo em vista que não avaliamos os níveis de CRH e ACTH. O entendimento do panorama geral dos principais reguladores da via torna-se fundamental para complementar os achados do estudo, e assim, compreender como a HI e SM, combinada e isolada, interferem no desenvolvimento do eixo.

O estresse precoce durante janelas críticas do desenvolvimento parece afetar e ser a base biológica de diversas doenças metabólicas, como a obesidade, dislipidemia, resistência a insulina, diabetes e alterações cardiovasculares (SANCHES e col., 2016). Corroborando com

dados da literatura, observamos os efeitos da HI, SM e a combinação dos fatores em reduzir o peso corporal dos animais, o que demonstra o papel significativo do estresse em modificar o perfil metabólico dos animais ao longo da vida (DA SILVA e col., 2021; ROBINSON e col., 2005; SÖDERHOLM e col., 2002).

A HI produz efeitos consistentes em diversos parâmetros cardiovasculares. No presente estudo, os animais hipoxiados apresentam maior pressão arterial sistêmica quando comparados ao grupo CN. A hipóxia pré-natal consegue alterar os mecanismos de controle da pressão e aumenta consideravelmente a atividade simpática em ratos adultos. Tais modificações sugerem que esse evento pré-natal é um potencial fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial (SVITOK e col., 2016). Da Silva e colaboradores (2021), ao empregar o mesmo modelo de hipóxia não observou diferenças significativas na pressão dos animais. Sugerimos que o resultado revelado por nosso estudo seja por conta da pressão arterial dos animais controle estar compreendida em uma faixa satisfatória para um animal normotenso. Esse achado é interessante pois conseguimos observar, pela primeira vez, que a HI consegue modificar a pressão arterial sistêmica dos animais.

De forma semelhante, foi revelado pela primeira vez o papel da hipóxia em reduzir a resposta vasodilatadora na aorta torácica em relação aos controles durante o experimento de reatividade vascular. Associado a esse dado, observamos que a HI leva ao aumento da espessura da camada média do vaso de condutância, além de reduzir os níveis plasmáticos de nitrito. Estudos prévios do nosso grupo já haviam demonstrando o aumento da resposta vasoconstritora na aorta, bem como sua maior espessura, e menor vasodilatação do leito arterial mesentérico nos animais HI (DA SILVA e col., 2021). O conjunto de dados reafirmam os efeitos consistentes da hipóxia isquêmica pré-natal em desenvolver o quadro de disfunção endotelial. O mecanismo de vasodilatação mediado pela acetilcolina é dependente do endotélio. A partir da ligação em receptores muscarínicos M1 e/ou M3 nas células endoteliais ocorre a ativação da via que irá produzir óxido nítrico. O NO promove a vasodilatação ao atuar diretamente nas células musculares lisas (CHEN e col., 2018). O fato dos animais HI apresentarem menor resposta vasodilatadora pode ser explicado por alguma alteração em uma das etapas dessa via de sinalização. A disfunção endotelial configura na menor produção e biodisponibilidade de agentes vasodilatadores, como o NO (MATHER e col., 2004). Os resultados obtidos pelo presente estudo corroboram com essa hipótese, uma vez que observamos nos animais HI redução significativa nos níveis de nitrito, um subproduto do metabolismo do óxido nítrico.

Os animais CN-S e SHAM-S apresentam alterações diversas nos parâmetros cardiovasculares. O grupo SHAM-S demonstrou maior pressão arterial sistêmica quando comparado aos controles, além de uma menor resposta vasodilatadora no LAM e na aorta. Por outro lado os níveis de nitrito foram significativamente maiores se comparado ao SHAM. Embora os animais do grupo CN-S não tenham apresentado alterações na pressão arterial e nos níveis plasmáticos de nitrito, observamos uma maior resposta pressora mediada pela noraepinefrina nos anéis de aorta quando comparado aos animais SHAM-S, HI-S, SHAM e CN.

Estudos presentes na literatura demonstram que a separação materna é um modelo experimental que consegue reproduzir de maneira significativa as modificações cardiovasculares mediadas pelo estresse precoce, uma vez que aumenta o risco de hipertensão arterial e da resposta vasoconstritora (MURPHY e col., 2017). Loria e colaboradores (2011) revelaram que animais separados de suas matrizes nas primeiras semanas de vida apresentam maior pressão arterial do que os animais controles. Além disso, a separação materna aumentou a resposta vasoconstritora induzida pela angiotensina II na aorta desses animais, possivelmente por alterações funcionais no receptor AT₂ da angiotensina. No presente estudo, observamos aumento da resposta vasoconstritora mediada pela noraepinefrina nos animais CN-S e uma redução da vasodilatação por acetilcolina nos animais SHAM-S em ambos os vasos. A disfunção endotelial configura no desbalanço da produção/liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstritores, o que corrobora para o aumento do tônus contrátil dos vasos (CHEN e col., 2018; LORIA e col., 2011). Logo, a partir dos dados obtidos, podemos sugerir que tanto a HI quanto a SM de forma isolada conseguem promover a disfunção endotelial nos animais, o que torna esses indivíduos mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. De forma contrária à hipótese inicial de que a combinação dos dois modelos de estresse precoce poderiam potencializar os efeitos deletérios observados, o grupo HI-S não revelou alterações nos parâmetros hemodinâmicos e vasculares. Entretanto, não podemos descartar que esses animais não possam apresentar modificações cardiovasculares durante a vida. Mais estudos se fazem necessários para compreender melhor como se comportam e que tipo de resposta é gerada a partir da associação da HI e SM nos indicadores cardíacos.

A disfunção endotelial, além de estar associada com a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, apresenta uma estreita relação com o estresse oxidativo. As ERO formadas, ao passo que contribuem para a manutenção do estresse oxidativo, levam ao desgaste cumulativo das células endoteliais (SENA e col., 2018). No presente estudo não observamos redução na

atividade enzimática da CAT dentre as amostras dos animais. Entretanto, houve uma redução significativa da atividade da GPx nos animais HI, SHAM-S e HI-S, o que corrobora com estudos prévios (DA SILVA e col., 2021; MALCON e col., 2020). A glutathiona peroxidase está localizada na mitocôndria e na região citoplasmática, onde utilizando a glutathiona reduzida como substrato, atua na conversão de H_2O_2 em água, e assim previne a ação do peróxido de hidrogênio nas células (SAB e col., 2013). Combinado à baixa atividade das enzimas antioxidantes, a interação entre o superóxido com o NO leva à formação do peroxinitrito ($ONOO^-$), molécula altamente reativa que afeta diretamente a redução da biodisponibilidade de NO, por meio do desacoplamento da NOS (SILVA e col., 2012). Os resultados obtidos pelo presente estudo revelam importantes alterações em parâmetros cardiovasculares e na atividade antioxidante, o que confirma o papel do estresse precoce em gerar a disfunção endotelial.

Avaliamos de forma complementar marcadores pró-oxidantes em amostras de plasma dos animais. Não foram observadas diferenças significativas na carbonilação de proteínas entre os grupos. Por outro lado, a peroxidação lipídica através da formação do subproduto MDA apresentou resultados distintos. A HI isolada não aumentou os níveis de TBARS quando comparado ao grupo controle, o que corrobora com estudos prévios da literatura (SAB e col., 2013). Entretanto, a separação materna nos animais SHAM-S e HI-S reduziu de forma significativa os níveis de peroxidação lipídica. Camundongos Balb/cJ submetidos a separação materna do P1-P15 demonstraram aumento significativo da peroxidação lipídica quando comparado aos controles (MALCON e col., 2020), o que não está consistente com os resultados do presente estudo. A avaliação do TBARS é um dos principais mecanismos para monitorar a oxidação lipídica, embora não consiga mensurar de forma direta a atividade de enzimas antioxidantes (GHANI e col., 2017). Os resultados obtidos da diminuição significativa dos níveis de TBARS em animais SHAM-S e HI-S não se relacionam com a redução observada da atividade da GPx. No entanto, não podemos descartar que a separação materna não seja capaz de gerar dano oxidativo nos animais, ao passo que observamos alterações no perfil antioxidante. Outras avaliações, dentre elas a marcação por 8-isoprostano poderia apontar caminhos de como o dano oxidativo está representado em animais separados, sendo necessário mais estudos para melhor compreensão desse tópico.

É importante salientar as limitações do presente estudo. Além da dificuldade em manter os animais até os quatro meses de idade para a investigação das alterações cardiovasculares, o tempo hábil para alcançar o n amostral satisfatório dos seis grupos experimentais e a realização de todas as etapas do projeto frente à pandemia foram pontos desafiadores. Em conjunto aos problemas citados, alguns experimentos que poderiam auxiliar na discussão e fomentar os

resultados não puderam ser executados, como as análises de dano oxidativo na aorta a partir da marcação por 8- isoprostano, atividade da enzima antioxidante SOD no plasma, morfologia de estruturas cardíacas, além da avaliação de parâmetros metabólicos, como exemplo da glicemia e do perfil lipídico, afim de se estabelecer uma relação com a disfunção metabólica associada ao estresse precoce. Apesar das dificuldades encontradas, o presente estudo traz contribuições valiosas dos efeitos do estresse em períodos críticos do desenvolvimento, as quais podem contribuir para o esclarecimento de lacunas na literatura e auxiliar no desenvolvimento de estratégias de prevenção.

CONCLUSÃO

Nesse estudo observamos o papel do estresse precoce durante janelas críticas do desenvolvimento na gênese de alterações neurobiológicas e cardiovasculares. Ao implementar modelos experimentais conseguimos observar como o estresse pré-natal e pós-natal conseguem modular essas respostas e serem determinantes nas modificações de estruturas biológicas. As alterações em parâmetros hemodinâmicos e vasculares provocados pela hipóxia isquêmica pré-natal e a separação materna cursam com a disfunção endotelial e o estresse oxidativo, que aumentam consideravelmente o risco do desenvolvimento de hipertensão arterial. Além disso, observamos modificações consistentes no comportamento tipo-depressivo em ambos os estresses que foram mantidas até a vida adulta, o que corrobora com o objetivo do estudo.

De forma contrária a hipótese inicial, de que a combinação dos dois estresses perinatais poderia potencializar os efeitos deletéricos provocados pela HI e SM per se, observamos que os animais HI-S mantém o perfil tipo-depressivo observado nos demais grupos, porém não apresentam alterações cardiovasculares significativas. No entanto, não podemos descartar que a combinação dos dois estresses não possa aumentar o risco cardiovascular de forma mais tardia. Mais estudos devem ser realizados a fim de observar se existe algum mecanismo de compensação nos animais HI-S que os torna, de certa forma, mais resilientes.

O conjunto de dados, embora tenham apresentado algumas limitações e pontos a serem aperfeiçoados e debatidos com maior profundidade, possibilita o desenvolvimento de estratégias de intervenção que possam ser utilizadas de modo a atenuar os efeitos deletérios provocados pelo estresse precoce. Nesse sentido, mais estudos são necessários com o objetivo de compreender melhor os mecanismos envolvidos e a progressão dos mesmos ao longo da vida.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Oxygen Radicals in Biological Systems*, 121–126. **MethodsEnzymol**, v. 105, p.121-126, 1984.
- ALVES, Renata L. et al. Maternal separation effects on mother rodents' behaviour: Asystematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2019.
- BABAEV, O; PILETTI CHATAIN, C; KRUEGER-BURG, D. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 50, p. 18, 2018.
- BAKAN, P. Handedness and maternal smoking during pregnancy. **International Journal of Neuroscience**, v. 56, p. 161-168, 1991.
- BANDELOW, Borwin; MICHAELIS, Sophie; WEDEKIND, Dirk. Treatment of anxietydisorders. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 93, 2017.
- BARANYI, Andreas et al. Nitric oxide-related biological pathways in patients with majordepression. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0143397, 2015.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatoresmodulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BARBOSA, Luana Porto et al. Relationship between maternal depression as a risk factor for childhood trauma and mood disorders in young adults. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 41, p. 72-76, 2014.
- BECKER, Maria; PINHASOV, Albert; ORNOY, Asher. Animal models of depression: what can they teach us about the human disease?. **Diagnostics**, v. 11, n. 1, p. 123, 2021.
- BELL, Alexander H. et al. The neurovascular unit: Effects of brain insults during the perinatalperiod. **Frontiers in neuroscience**, v. 13, p. 1452, 2020.
- BIRBEN, Esra et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v.73, n.1-2,p. 248-254, 1976.
- BRAGA, J; PORDEUS, L; DA SILVA, A; PIMENTA, F; DINIZ, M; ALMEIDA, R.
Ansiedade Patológica: Bases Neurais E Avanços Na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, p. 93-100, 2011.
- BURFORD, Natalie G.; WEBSTER, Natalia A.; CRUZ-TOPETE, Diana.

Hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of glucocorticoids in the cardiovascular system. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 10, p. 2150, 2017.

BURTON, Graham J.; JAUNIAUX, Eric. Oxidative stress. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011.

CAHILL, Paul A.; REDMOND, Eileen M. Vascular endothelium–Gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**, v. 248, p. 97-109, 2016.

CAMASÃO, Dimitria B.; MANTOVANI, Diego. The mechanical characterization of blood vessels and their substitutes in the continuous quest for physiological-relevant performances. A critical review. **Materials Today Bio**, p. 100106, 2021.

CANNISTRARO, P; RAUCH, S. Neural circuitry of anxiety: evidence from structural and functional neuroimaging studies. **Psychopharmacology bulletin**, v. 37, p. 8-25, 2003.

CARTER, A. Placental gas exchange and the oxygen supply to the fetus. **Comprehensive Physiology**, v. 5, p. 1381-1403, 2015.

CERQUEIRA, Nereide Freire; YOSHIDA, Winston Bonetti. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 417-423, 2002.

CHARIL, A; LAPLANTE, D; VAILLANCOURT, C; KING, S. Prenatal stress and brain development. **Brain research reviews**, v. 65, p. 56-79, 2010.

CHEN, Jing-yi et al. Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 423-428, 2018.

CHRAPKO, Wendy E. et al. Decreased platelet nitric oxide synthase activity and plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder. **Biological psychiatry**, v. 56, n. 2, p. 129-134, 2004.

COSTA, C.A.; OLIVEIRA, P.R.B.; DE BEM, G.F.; et al. Euterpe oleracea Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: Role of oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n.12, p. 1199–1209, 2012.

CRUZ, A; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. **Métodos em neurociência**. 1ª edição. São Paulo: Manole, 2012.

CUI, Yongfei et al. Early-life stress induces depression-like behavior and synaptic-plasticity changes in a maternal separation rat model: gender difference and metabolomics study. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 102, 2020.

DA SILVA, Thainá Ferraz Gonçalves et al. Prenatal hypoxia predisposes vascular functional and structural changes associated with oxidative stress damage and depressive behavior in adult offspring male rats. **Physiology & Behavior**, v. 230, p. 113293, 2021.

DAMMANN, Olaf; O'SHEA, T. Michael. Cytokines and perinatal brain damage. **Clinics in perinatology**, v. 35, n. 4, p. 643-663, 2008.

DE PAULA, S; GREGGIO, S; DA COSTA, J. Use of stem cells in perinatal asphyxia: from bench to bedside. **Journal of Pediatric**, v. 86, p. 451-464, 2010.

DEANFIELD, John E.; HALCOX, Julian P.; RABELINK, Ton J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, n. 10, p. 1285-1295, 2007.

DHAR, Arup K.; BARTON, David A. Depression and the link with cardiovascular disease. **Frontiers in psychiatry**, v. 7, p. 33, 2016.

DO CARMO, Monique BO Ormonde et al. Major depression induces oxidative stress and platelet hyperaggregability. **Journal of psychiatric research**, v. 61, p. 19-24, 2015.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DURAND, Matthew J.; GUTTERMAN, David D. Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. **Microcirculation**, v. 20, n. 3, p. 239-247, 2013.

FAJERSZTAJN, Lais; VERAS, Mariana Matera. Hypoxia: from placental development to fetal programming. **Birth defects research**, v. 109, n. 17, p. 1377-1385, 2017.

FERRAZ, Marcia MD et al. Prenatal hypoxia ischemia increases male rat sexual behavior. **The journal of sexual medicine**, v. 12, n. 10, p. 2013-2021, 2015.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FÖRSTERMANN, Ulrich; SESSA, William C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

GIUSSANI, Dino A. Breath of life: heart disease link to developmental hypoxia. **Circulation**, v. 144, n. 17, p. 1429-1443, 2021.

GUAQUIL, Victor H. et al. Vitamin C inhibits hypoxia-induced damage and apoptotic signaling pathways in cardiomyocytes and ischemic hearts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 9, p. 1419-1429, 2004.

GHANI, Md Ahsan et al. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food chemistry**, v. 230, p. 195-207, 2017.

GODOY, Lívea Dornela et al. A comprehensive overview on stress neurobiology: basic concepts and clinical implications. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 12, p. 127, 2018.

HUANG, Jiawen et al. The Effect of Early Maternal Separation Combined With Adolescent Chronic Unpredictable Mild Stress on Behavior and Synaptic Plasticity in Adult Female Rats. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, p. 208, 2021.

HUANG, Li-Tung. Early-life stress impacts the developing hippocampus and primes seizure occurrence: cellular, molecular, and epigenetic mechanisms. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 7, p. 8, 2014.

HUSSAIN, S; TRIPATHI, V. Smoking under hypoxic conditions: A potent environmental risk factor for inflammatory and autoimmune diseases. **Military Medical Research**, v. 5, p. 1-14, 2018.

JIN, S; ZHAO, Y; JIANG, Y; WANG, Y; LI, C; ZHANG, D; LIAN, B; DU, Z; SUN, H; SUN, L. Anxiety-like behaviour assessments of adolescent rats after repeated maternal separation during early life. **NeuroReport**, v. 29, p. 643-649, 2018.

KALTENBOECK, Alexander; HARMER, Catherine. The neuroscience of depressive disorders: A brief review of the past and some considerations about the future. **Brain and neuroscience advances**, v. 2, p. 2398212818799269, 2018.

KANDEL, E; SCHWARTZ, J; JESSELL, T; SIEGELBAUM, S.; HUDSPETH, A. Princípios de neurociências. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.

KUMAR, V; BHAT, Z; KUMAR, D. Animal models of anxiety: A comprehensive review. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, p. 175-183, 2013.

KWON, Eun Jin; KIM, Young Ju. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. **Obstetrics & gynecology science**, v. 60, n. 6, p. 506-519, 2017.

KWONG, Alex SF et al. Genetic and environmental risk factors associated with trajectories of depression symptoms from adolescence to young adulthood. **JAMA network open**, v. 2, n. 6, p. e196587-e196587, 2019.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociências. 2ª edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins **Meth Enzymol**. 1990.

LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. **The American Journal of Pathology**, v. 36, p. 1-17, 1960.

LIMA, Bruno B. et al. Association of transient endothelial dysfunction induced by mental stress with major adverse cardiovascular events in men and women with coronary artery disease. **JAMA cardiology**, v. 4, n. 10, p. 988-996, 2019.

LORIA, Analia S. et al. Early Life Stress Enhances Angiotensin II-Mediated Vasoconstriction by Reduced Endothelial Nitric Oxide Buffering Capacity.

Hypertension, v. 58, n. 4, p. 619-626, 2011.

LYDIARD, R. Bruce. The role of GABA in anxiety disorders. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 64, p. 21-27, 2003.

MAHANES, Timothy M. et al. Maternal separation-induced increases in vascular stiffness are independent of circulating angiotensinogen levels. **Journal of Applied Physiology**, v. 129, n. 1, p. 58-65, 2020.

MALCON, Luiza Martins Costa et al. Maternal separation induces long-term oxidative stress alterations and increases anxiety-like behavior of male BALB/cJ mice. **Experimental Brain Research**, v. 238, n. 9, p. 2097-2107, 2020.

MARCONDES, F; BIANCHI, F; TANNO, A. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.

MARKOSTAMOU, Ioanna et al. Maternal separation prior to neonatal hypoxia-ischemia: Impact on emotional aspects of behavior and markers of synaptic plasticity in hippocampus. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 52, p. 1-12, 2016.

MATHER, Kieren J. et al. Interactions between endothelin and nitric oxide in the regulation of vascular tone in obesity and diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 8, p. 2060-2066, 2004.

MESQUITA, A; PÊGO, J; SUMMAVIELLE, T; MACIEL, P; ALMEIDA, O; SOUSA, N. Neurodevelopment milestone abnormalities in rats exposed to stress in early life. **Neuroscience**, v. 147, p. 1022-1033, 2007.

MILUTINOVIĆ, Aleksandra; ŠUPUT, Dušan; ZORC-PLESKOVIČ, Ruda. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. **Bosnian journal of basic medical sciences**, v. 20, n. 1, p. 21, 2020.

MURPHY, Margaret O.; COHN, Dianne M.; LORIA, Analia S. Developmental origins of cardiovascular disease: Impact of early life stress in humans and rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 74, p. 453-465, 2017.

MURTHY, Sahana; GOULD, Elizabeth. Early life stress in rodents: animal models of illness or resilience?. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 12, p. 157, 2018.

NASEEM, Khalid M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 33-65, 2005.

NEUMAN, Nicole A. et al. The four-and-a-half LIM domain protein 2 regulates vascular smooth muscle phenotype and vascular tone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 19, p. 13202-13212, 2009.

PATEL, Roma et al. Reactive oxygen species: The good and the bad. **Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells**, v. 7, 2018.

PENKE, Zsuzsa et al. Postnatal maternal deprivation produces long- lasting modifications of the stress response, feeding and stress- related behaviour in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 747-755, 2001.

PINHEIRO, Milena Lobão et al. Long-term maternal separation differentially alters serum corticosterone levels and blood neutrophil activity in A/J and C57BL/6 mouse offspring. **Neuroimmunomodulation**, v. 18, n. 3, p. 184-190, 2011.

PINTO, Vivian Liane Mattos et al. Low plasma levels of L-arginine, impaired intraplatelet nitric oxide and platelet hyperaggregability: implications for cardiovascular disease in depressive patients. **Journal of affective disorders**, v. 140, n. 2, p. 187-192, 2012.

PIZZINO, Gabriele et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

PLOTSKY, Paul M.; MEANEY, Michael J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress- induced release in adult rats. **Molecular brain research**, v. 18, n. 3, p. 195-200, 1993.

PORSOLT, Roger D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. L. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-732, 1977.

ROBINSON, S; PETELENZ, K; LI, Q; COHEN, M; DECHANT, A; TABRIZI, N; BUCEK, M; LUST, D; RUMAJOGEE, P; BREGMAN, T; MILLER, S; YAGER, J; FEHLINGS, M. Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: A systematic review. **Frontiers in Neurology**, v. 7, p. 1-20, 2016.

ROQUE, Susana et al. The behavioral and immunological impact of maternal separation: a matter of timing. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, p. 192, 2014.

RYDER, Annie L.; COHEN, Beth E. Evidence for depression and anxiety as risk factors for heart disease and stroke: implications for primary care. **Family Practice**, v. 38, n. 3, p. 365- 367, 2021.

SAB, I. M. et al. Prenatal hypoxia, habituation memory and oxidative stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 107, p. 24-28, 2013.

SANCHES, Andrea et al. Relationship among stress, depression, cardiovascular and metabolic changes and physical exercise. **Fisioterapia em Movimento**, v. 29, p. 23-36, 2016.

SANTOS, Marcelo Antônio Oliveira et al. Global hippocampal atrophy in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. **Trends**

in psychiatry and psychotherapy, v. 40, p. 369-378, 2018.

SAVEANU, Radu V.; NEMEROFF, Charles B. Etiology of depression: genetic and environmental factors. **Psychiatric Clinics**, v. 35, n. 1, p. 51-71, 2012.

SCHEGGI, Simona; DE MONTIS, Maria Graziella; GAMBARANA, Carla. Making sense of rodent models of anhedonia. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n.11, p. 1049-1065, 2018.

SCHNEIDERMAN, Neil; IRONSON, Gail; SIEGEL, Scott D. Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. **Annu. Rev. Clin. Psychol.**, v. 1, p. 607-628, 2005.

SECO, Sandra; MATIAS, Alexandra. Origem fetal das doenças do adulto: revisitando a teoriade barker Fetal origins of adult disease: revisiting barkers theory. **Acta Obstet Ginecol Port**, v. 3, n. 3, p. 158-168, 2009.

SENA, Cristina M. et al. Vascular oxidative stress: impact and therapeutic approaches. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 1668, 2018.

SENONER, Thomas; DICHTL, Wolfgang. Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target?. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2090, 2019.

SILVA, Bruno Rodrigues; PERNOMIAN, Laena; BENDHACK, Lusiane Maria. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Frontiers in physiology**, v. 3,p. 441, 2012.

SLATTERY, D. A., A. Markou e J. F. Cryan. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. **Psychopharmacology** (Berl), v.190, n.4, Mar, p.555-68. 2007.

SMITH, T; SCHMIDT-KASTNER, R; MCGEARY, J; KACZOROWSKI, J; KNOPIK, V.
Pre- and Perinatal Ischemia-Hypoxia, the Ischemia-Hypoxia Response Pathway, and ADHD Risk. **Behavior Genetics**, v. 46, p. 467-477, 2016.

SOARES, J. *Biologia*: volume único. 9ª edição. São Paulo: Scipione, 1997.

SODERHOLM, Johan D. et al. Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. **American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 6, p. G1257-G1263, 2002.

STAHL, S. *Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas*. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

SVITOK, Pavel et al. Prenatal hypoxia in rats increased blood pressure and sympathetic drive of the adult offspring. **Hypertension Research**, v. 39, n. 7, p. 501-505, 2016.

TADAIESKY, M. T., P. A. Dombrowski, C. P. Figueiredo, E. CarginFerreira, C. Da Cunha R. N. Takahashi. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v.156, n.4, Oct 28, p.830-40. 2008.

TATA, Despina A. et al. Effects of maternal separation on behavior and brain damage in adult rats exposed to neonatal hypoxia–ischemia. **Behavioural brain research**, v. 280, p. 51-61, 2015.

THAU, L.; GANDHI, J.; SHARMA, S. Physiology, Cortisol.[Updated 2020 May 29]. **StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.**

THOMPSON, Loren P.; AL-HASAN, Yazan. Impact of oxidative stress in fetal programming. **Journal of pregnancy**, v. 2012, 2012.

TOFOLI, Sandra Marcia de Carvalho et al. Early life stress, HPA axis, and depression. **Psychology & Neuroscience**, v. 4, p. 229-234, 2011.

TRACTENBERG, S; LEVANDOWSKI, M; ARAÚJO, L; ORSO, R; ROITHMANN, L; HOFFMANN, E; VANNUCCI, R; VANNUCCI, S. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: Evolution of an animal model. **Developmental Neuroscience**, v. 27, p. 81-86, 2005.

VARGAS, Javier et al. Early life stress increases metabolic risk, HPA axis reactivity, and depressive-like behavior when combined with postweaning social isolation in rats. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162665, 2016.

VAVÁKOVÁ, Magdaléna; ĎURAČKOVÁ, Zdeňka; TREBATICKÁ, Jana. Markers of oxidative stress and neuroprogression in depression disorder. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

VÁZQUEZ, Delia M. Stress and the developing limbic–hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, n. 7, p. 663-700, 1998.

VETULANI, Jerzy. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. **Pharmacological reports**, v. 65, n. 6, p. 1451-1461, 2013.

WANG, Bin et al. Effects of Prenatal Hypoxia on Nervous System Development and Related Diseases. **Frontiers in Neuroscience**, p. 1429, 2021.

WITTSTEIN, Ilan S. et al. Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress. **New England journal of medicine**, v. 352, n. 6, p. 539-548, 2005.

YANKELEVITCH-YAHAV, Roni et al. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 97, 2015.

ZHAO, F; YANG, J; CUI, R. Effect of Hypoxic Injury in Mood Disorder. **Neural Plasticity**, v. 2017, p. 1-10, 2017.

ZHAO, Yingzi; VANHOUTTE, Paul M.; LEUNG, Susan WS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of pharmacological sciences**, v. 129, n. 2, p. 83-94, 2015.

ZOROV, Dmitry B.; JUHASZOVA, Magdalena; SOLLITT, Steven J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiological reviews**, v. 94, n. 3, p. 909-950, 2014.