LETÍCIA DE CAMPOS BRANDÃO

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR HIPÓXIA NEONATAL EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2008

LETÍCIA DE CAMPOS BRANDÃO

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR HIPÓXIA NEONATAL EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia D'Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Tufik

SÃO PAULO
2008

Brandão, Letícia de Campos
Alterações bioquímicas, moleculares e comportamentais induzidas por hipóxia neonatal em camundongos / Brandão, Letícia de Campos. – São Paulo, 2008.
xxvii, 106f

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Biochemical, molecular and behavioral alterations induced by neonatal hypoxia in mice.

1. Hipóxia. 2. Estresse oxidativo. 3. Neofobia.
4. Glutationa peroxidase.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Maria Lúcia de Souza Formigoni

Coordenadora do Curso de Pós-graduação: Profa. Dra. Maria Gabriela Menezes de Oliveira

Letícia de Campos Brandão

"ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS, MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR HIPÓXIA NEONATAL EM CAMUNDONGOS"

Orientadora: Profa. Dra. Vânia D'Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Tufik

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Dalva Poyares

Prof. Dr. José Nóbrega

Prof. Dr. Pio Colepicolo

Suplente:

Profa. Dra. Regina Helena da Silva

Aprovado em: ___/___/___

DEDICATÓRIA

A meus pais, Ulisses e Sílvia,

e a meus irmãos, Elisa e André,

pelo amor indescritível e incondicional

dedicado a mim todos os dias.

AGRADECIMENTOS

“Esse eu que é vós pois não agüento ser apenas mim, preciso dos outros para me manter em pé (...). E – e não esquecer que a estrutura do átomo não é vista mas sabe-se dela. Sei de muita coisa que não vi. E vós também. Não se pode dar uma prova da existência do que é mais verdadeiro, o jeito é acreditar. Acreditar chorando (...). Amém para nós todos.”

Clarice Lispector

À minha orientadora Profa. Dra. Vânia D’Almeida, por ter idealizado este trabalho, acreditado que eu fosse capaz de desenvolvê-lo e por ter me orientado. Pela confiança, pela dedicação e por estar presente,

A todos os professores do Departamento de Psicobiologia - UNIFESP, especialmente ao Prof. Dr. Sergio Tufik, por ter sido inicialmente meu orientador, pela co-orientação e disponibilidade, e à Profa. Dra. Helena Hachul de Campos, pelo apoio e por ter inicialmente me trazido ao departamento,

A todos os colegas do Departamento de Psicobiologia, principalmente ao Ivan, pela ajuda ao tratamento com os animais, a Sebastião, João e Nelson, pela simpatia de todos os dias,

A todos os amigos e colegas do LEIM (e agregados):

À Nessa, pela sensatez,
À Mayra, pela compreensão,
Ao Grego, pela paciência,
À Perpétua, pela fé,
À Kênia, pela ternura,
À Alice, pela doçura,
À Lara, pelo olhar,
À Elaine, pela sutileza,
Ao Allan, pela perseverança,
À Laurinha, pela alegria,
À Hayanne, pela receptividade,
Ao Leandro, pela simpatia,
Ao Prof. Jair, pela originalidade,
À Bruna, pela companhia,
Ao Renan, pelo interesse-em-tudo,
À Márcia, pela disponibilidade,
Ao Lisandro, pela coragem,
À Francine(ide), pela tranqüilidade,
À Flávia, por ser autêntica,
Ao Marcos, pela humildade,
À Karen, pela perspicácia,
À Mônica, pela intensidade,
Ao Calegare, pela diversão,
À Cida, pela espontaneidade e

À Karina, pela amizade, pela cumplicidade e pela ajuda durante todo o desenvolvimento técnico do trabalho, sem as quais o dia-a-dia teria ficado insosso e árduo,

A todos aqueles que deixaram o LEIM (mais especialmente à Tuka e ao Luciano) e que tenham de alguma forma me auxiliado,

Ao Prof. Roberto Frussa Filho, ao Cleomar e à Sônia, pela ajuda com a esquiva discriminativa, com o protocolo de hipóxia e com os sacrifícios,

À Profa. Dra. Mariana da Silva Araújo, do Departamento de Bioquímica, por ter me acompanhado durante os primeiros passos na ciência,

À Profa. Dra. Ângela Cristina do Valle, pela prontidão e tranquilidade ao me ensinar a ler registros de sono de camundongos,

Aos animais de experimentação, por possibilitarem a realização deste estudo,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP) pelo apoio financeiro,

À UNIFESP, por ser palco de boa parte do meu cotidiano nos últimos seis anos e, portanto, ser lugar do desafio,

À toda a minha família, a meus pais, irmãos, avós, bisavós, tios e primos, pelo amor, pela partilha de tudo, pelas orações, pelas preocupações e pelo amparo,

Ao Felipe, por incondicionalmente me dar suporte sempre (inclusive na formatação desta dissertação), pelo amor que eu não mereço e, principalmente, por me ajudar a focar no Mistério,

A todos os meus amigos de Comunhão e Libertação, de maneira mais especial ao meu grupo de fraternidade, e a Luigi Giussani, pela companhia constante sem a qual eu certamente me perderia ao percorrer o caminho da vida,

Aos meus queridos amigos de faculdade da BIO 36 (especialmente à Ká, ao Vini, ao Fabíolo, à Tina, à Tiane, à Lílian e à Thaís), por estarem sempre por perto,

À Nossa Senhora e à Elisa, por serem meu socorro e auxílio constantes,

A Deus, por tudo.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos n° 2005/03532-7; 2005/04366-3 e CEPID 1998/14303-3, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo n° 473924/2003-0 e da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP).

SUMÁRIO

Sumário

Dedicatória vi

Agradecimentos viii

Lista de figuras xvii

Lista de tabelas xx

Lista de abreviaturas xxiii

Resumo xxv

1. Introdução 2

1.1 Hipóxia 2

1.2 Modelos experimentais 3

1.3 Hipóxia Neonatal 4

1.4 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo 7

1.4.1 Estresse oxidativo e hipóxia neonatal 9

1.5 Homocisteína 12

1.5.1 Homocisteína e hipóxia neonatal 14

1.6 Comportamento e hipóxia neonatal 14

2. Objetivos 20

2.1 Objetivo geral 20

2.2 Objetivos específicos 20

3. Metodologia 22

3.1 Animais 22

3.2 Procedimento de hipóxia 23

3.3 Testes comportamentais 24

3.3.1 Esquiva discriminativa 24

3.3.2 Caixa de atividade 26
3.3.3 Registro de sono 27
3.3.3.1 Implante de eletrodos 27
3.3.3.2 Polissonografia 30
3.3.3.2 Parâmetros para análise 31
3.4 Sacrifício dos animais 31
3.4.1 Coleta e processamento de amostras 31
3.5 Análise bioquímica 33
3.5.1 Análise das enzimas antioxidantes 33
3.5.1.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase 33
3.5.1.2 Determinação da atividade da glutationa peroxidase 34
3.5.1.3 Determinação da atividade da catalase eritrocitária 35
3.5.1.4 Determinação da atividade da catalase cerebral 36
3.5.2 Dosagem de glutationa total (GSHt) 36
3.5.3 Dosagem de hemoglobina 37
3.5.4 Dosagem de quantidade total de proteína 38
3.5.5 Dosagem de homocisteína e cisteína plasmáticas 39
3.5.6 Dosagem de vitamina B-6 41
3.6 Análise molecular 41
3.6.1 Extração de RNA 41
3.6.2 Medição da concentração de RNA nas amostras 42
3.6.3 Avaliação da integridade das amostras 43
3.6.4 Transcrição reversa 43
3.6.5 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) 44
3.7 Análise estatística 46

4. Resultados 49
4.1 Avaliação da massa corpórea dos animais 49
4.2 Avaliação comportamental 51
4.2.1 Esquiva discriminativa 51
4.2.2 Caixa de atividade locomotora 54
4.2.3 Registro de sono 55
4.3 Análise bioquímica 56
4.3.1 Atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias 56
4.3.2 Atividade de CAT cerebral 59
4.3.3 Dosagem de GSHt eritrocitária 60
4.3.4 Dosagens de Hcy, Cys e vitamina B6 61
4.4 Análise molecular 63
5. Discussão 66
5.1 Avaliação da massa corpórea 66
5.2 Análise comportamental 69
5.3 Análise bioquímica e molecular 73
5.3.1 Parâmetros relacionados ao estresse oxidativo 73
5.3.3 Expressão de CAT e GPx no hipocampo 76
5.3.3 Fatores relacionados ao metabolismo da homocisteína 78
6. Conclusões 81
7. Anexos 83
7.1 CEP UNIFESP 83
8. Referências Bibliográficas 86
9. Abstract 103
10. Bibliografia consultada 106

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

Figura 1. Demonstração do processo de neutralização das ERO pelo sistema de defesa antioxidante..... 8

Figura 2. Metabolismo da homocisteína 12

Figura 3. Filhotes de camundongos de uma ninhada sendo submetidos ao protocolo de hipóxia dentro da câmara utilizada 24

Figura 4. Imagem do aparato utilizado para a avaliação da memória e ansiedade dos animais 25

Figura 5. Sistema de detecção da atividade locomotora de camundongos..... 27

Figura 6. Evolução ponderal dos animais desde o desmame até o sacrifício . 49

Figura 7. Evolução ponderal dos animais em três datas após o desmame..... 50

Figura 8. Efeitos da hipóxia e da separação materna sobre os animais testados na esquiva discriminativa..... 52

Figura 9. Efeitos da hipóxia e da separação materna sobre os animais testados na esquiva discriminativa..... 53

Figura 10. Evolução da porcentagem de tempo gasto no braço aversivo em cada minuto durante a sessão de treino 54

Figura 11. Atividade de SOD eritrocitária dos animais na vida adulta 57

Figura 12. Atividade de GPx eritrocitária dos animais na vida adulta..... 58

Figura 13. Atividade de CAT eritrocitária dos animais na vida adulta..... 58

Figura 14. Atividade de CAT nos hipocampos dos animais na vida adulta 59

Figura 15. Atividade de CAT nos estriados dos animais na vida adulta 60

Figura 16. Concentração plasmática de GSHt eritrocitária dos animais na vida adulta..... 61

Figura 17. Concentração plasmática de Hcy dos animais na vida adulta..... 62

Figura 18. Concentração plasmática de Cys dos animais na vida adulta..... 62

Figura 19. Concentração sérica de vitamina B6 dos animais na vida adulta..... 63

Figura 20. Expressão relativa de CAT e GPx nos hipocampos dos animais na vida adulta 64

LISTA DE TABELAS

Lista de tabelas

Tabela 1. Iniciadores utilizados, temperaturas de *melting* e tamanho dos fragmentos amplificados por qPCR dos genes CAT, GPx e GAPDH..... 44

Tabela 2. Efeitos da hipóxia e da separação materna na atividade locomotora durante um teste de 30 minutos. 55

Tabela 3. Média dos parâmetros de sono obtidos na polissonografia dos camundongos durante a fase escura. 56

Tabela 4. Média dos parâmetros de sono obtidos na polissonografia dos camundongos durante a fase escura. 56

LISTA DE ABREVIATURAS

Lista de abreviaturas

AIF	Fator indutor de apoptose
AOPP	*Advanced oxidation protein products*
ANOVA	Análise de variância
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfato
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
ECoG	Eletrocorticograma
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMG	Eletromiograma
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutationa Peroxidase
GSHt	Glutationa total
H	Hipóxia
Hb	Hemoglobina
Hcy	Homocisteína
HPLC	Cromatografía líquida de alto desempenho
LG-ABN	*Licking, grooming and arched back nursing*
MDA	Malondialdeído
MTHFR	Metilenotetraidrofolato redutase

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NM	Não manipulado
PBS	Tampão de salina fosfato
PND	*Postnatal day*
P-SH	Proteína tiol
qPCR	*Quantitative polymerase chain reaction*
®	Marca registrada
RNA	Ácido ribonucléico
SBD-F	7-fluorobenzeno-2-oxi-1,3-diazólico-4-sulfato de amônio
SM	Separação materna
SOD	Superóxido dismutase
TBOOH	Peróxido de t-butila
TCA	Ácido tricloroacético
TCEP	Tricarboxi-etil-fosfina
™	*Trademark*
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
U	Unidades
XO	Xantina oxidase

RESUMO

Resumo

Introdução: A hipóxia-isquemia neonatal é um dos fatores mais significativos que pode levar recém-nascidos à morte. Também está associada a doenças na vida adulta, como a esquizofrenia. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi o de investigar efeitos em longo prazo da hipóxia neonatal na evolução ponderal, no comportamento, em parâmetros da defesa antioxidante e do metabolismo da homocisteína em camundongos machos adultos. **Métodos:** Camundongos Suíços de sete dias foram submetidos a: hipóxia (H), separação materna (SM) ou não foram manipulados (NM). Quando eles completaram 3 meses de idade, a avaliação comportamental foi realizada (por meio de caixas de atividade, esquiva discriminative e registro de sono. Catalase, superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), glutationa total, vitamina B6, homocisteína and cysteína foram medidas no sangue, assim como a atividade de catalase hipocampal e estriatal e a expressão de catalase e de GPx hipocampais. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via ou de medidas repetidas, seguidos pelos testes de Duncan ou Bonferroni. **Resultados:** Os camundongos expostos à hypoxia neonatal apresentaram na vida adulta diminuição da atividade locomotora durante os 5 primeiros minutos de avaliação e um decréscimo na duração dos episódios de sono dessincronizado na fase escura, quando comparados ao grupo NM. Além disso, foi observado um aumento do tempo gasto nos braços abertos nos grupos SM e H, quando comparados ao grupo NM. Em relação aos parâmetros bioquímicos, somente a GPx eritrocitária estava significativamente reduzida no grupo H e a glutationa total diminuída no grupo SM, ambas quando comparadas ao grupo NM. Não encontraram-se diferenças na expressão de GPx e catalase hipocampais. Os grupos MS e H apresentaram um

aumento no ganho de peso quando comparados ao NM. **Conclusão:** A hypoxia produziu alterações duradouras no sono dessicronizado, na evolução ponderal, no comportamento neótico e na atividade de glutationa peroxidase eritrocitária, enquanto que a separação materna induziu um aumento do comportamento ansioso, uma redução da glutationa total e um aumento do ganho de peso em camundongos.

“A verdade do intelecto humano tem

sua regra e medida na essência da coisa.

Uma opinião é verdadeira ou falsa

de acordo com que a coisa é ou não é.”

São Tomás de Aquino

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Hipóxia

Durante a evolução, os organismos vivos tiveram que se adaptar a mudanças nas concentrações atmosféricas de nitrogênio, oxigênio e de dióxido de carbono. Com o passar do tempo, as quantidades de oxigênio e de nitrogênio aumentaram e a de dióxido de carbono diminuiu, e essa mudança foi acompanhada de um crescimento da complexidade dos seres vivos.

Até hoje, diminuições na saturação de oxigênio podem ser observadas em condições fisiológicas - como em grandes altitudes, exercício físico e envelhecimento - e em condições não-fisiológicas - como em tumores, disfunções cardiovasculares e respiratórias, problemas de placenta e de parto (Brahimi-Horn e Pouyssegur, 2007).

O achado que deu início aos estudos sobre hipóxia foi o de Paul Bert, que relatou em 1878 que a falta de O_2 leva a uma saturação incompleta do sangue e, conseqüentemente, há sintomas como hiperventilação durante o exercício, náuseas, dores de cabeça e depressão (Kellogg, 1978; Marotte, 2006). Assim, iniciaram-se uma série de estudos sobre a hipóxia, sendo que um trabalho importante foi realizado por Joseph Barcroft na década de 1920. Ele observou as respostas agudas e crônicas no organismo de expedidores nos Andes em diversas altitudes. Entre os fatores analisados, estavam os respiratórios (ventilação, saturação arterial de CO_2 e O_2) e alguns parâmetros sangüíneos, sendo que o de maior relevância foi a concentração de células reticulares, que são precursoras de células sangüíneas. O pico da concentração dessas células deu-se na primeira semana a aproximadamente 4300 metros de altitude, sendo

que em seguida, elas começaram a diminuir até alcançar novamente a concentração basal. Contudo, com o retorno dos integrantes da expedição ao nível do mar as concentrações de células reticulares ficaram abaixo do nível basal (Barcroft, 1923). Assim, Barcroft constatou que havia mudanças na concentração de moléculas no sangue em diferentes altitudes e a elas atribuiu uma "função respiratória do sangue. Mais tarde, esses dados esclareceram que a molécula responsável pelo transporte de oxigênio era a hemoglobina.

A hipóxia foi definida como disponibilidade de O_2 insuficiente para suprir a produção aeróbica de ATP (Connett et al., 1990). A defesa contra a falta de oxigênio em animais que a toleram implica em uma modificação no *turnover* de energia e/ou uma melhora da eficiência energética nos processos metabólicos (Hochachka, 1997).

1.2 Modelos experimentais

Para melhor estudo das conseqüências de submeter-se a condições que levam à diminuição do suprimento de O_2, fez-se necessária a criação de modelos experimentais. Muitas espécies de mamíferos já foram utilizadas como modelo de hipóxia-isquemia. Importantes estudos com neonatos já utilizaram primatas (Brann e Myers, 1975; Myers, 1975), ovinos (Bagenholm et al., 1998; De Haan et al., 1997; Gunn et al., 1992) e suínos (McPhee e Maxwell, 1987; Zwiener et al., 1986), porém os animais até agora mais utilizados como modelos de hipóxia são os roedores.

No início da década de 80, Rice e colaboradores elaboraram um modelo de hipóxia-isquemia neonatal em ratos no qual se fazia uma combinação da

obstrução unilateral da artéria carótida comum com uma exposição a 8% de oxigênio (Rice et al., 1981). Este modelo vem sendo ainda muito utilizado e, por isso, comentado na literatura científica.

Há outros paradigmas que foram introduzidos posteriormente e também são bastante utilizados em roedores neonatos, como o controle da saturação de oxigênio por meio de câmaras (Eden e Hanson, 1987; Mortola et al., 1986) e também a realização de anóxia por meio da retirada e imersão do útero (pouco antes do nascimento) em solução salina (Bjelke et al., 1991; El-Khodor e Boksa, 1997).

1.3 Hipóxia Neonatal

Muito do que se sabe hoje sobre a condição neurológica de neonatos provém de investigações neuroradiológicas de bebês nascidos a termo e pré-termo que passaram por algum grau de asfixia (Banker e Larroche, 1962; Towbin, 1970). Destes dados, é possível concluir que o padrão de danos observado em neonatos depende do tempo de gestação e da duração e gravidade do insulto hipóxico.

O dano cerebral neonatal é um dos maiores causadores de morbidade e mortalidade perinatais, sendo que a interrupção da perfusão e oxigenação do cérebro é a principal causa deste dano (Nyakas et al., 1996). Aproximadamente de 2,9 a 9,0 bebês a cada mil nascidos sofrem algum grau de insulto isquêmico-anóxico ou anóxia prolongada (Tuor et al., 1996) e estima-se que a hipóxia seja a causa de 8% de todas as mortes até os 5 anos de idade (Bryce et al., 2005). Seqüelas importantes da hipóxia-isquemia neonatal a termo já foram relatadas em

cerca de 50 a 75% das crianças que passaram por tal condição (Dilenge et al., 2001).

Insultos isquêmicos-anóxicos geralmente são decorrentes de comprometimentos clínicos determinados como disfunção placentária, trabalho de parto prolongado, nascimento prematuro e ressuscitação cardiorespiratória (Nyakas et al., 1996; Tuor et al., 1996). A hipóxia aguda é um problema comum e muito sério nos neonatos (Jensen et al., 1992; Mikati et al., 2003), sendo que ela geralmente ocorre durante complicações ao nascimento ou distúrbios transientes à circulação, e é particularmente desfavorável quando combinada à hipóxia fetal crônica (Brunel et al., 2004).

Muitas das conseqüências a longo-prazo da hipóxia aguda no cérebro em desenvolvimento vêm sendo descritas. Seqüelas neurológicas seguem desde uma sucessão de comprometimentos motores e cognitivos permanentes e graves - assim como aqueles observados na encefalopatia crônica - até a morte (Roland et al., 1998; Tuor et al., 1996). Já foi proposto que a hipóxia neonatal pudesse causar doenças graves na vida adulta, como a epilepsia (Bergamasco et al., 1984) e a esquizofrenia (Dalman et al., 1999; Zornberg et al., 2000).

Por isso, modelos de hipóxia neonatal vêm sendo bastante desenvolvidos e explorados como possíveis causadores de distúrbios psiquiátricos na vida adulta. Já é amplamente reconhecido que há uma associação entre complicações obstétricas envolvendo hipóxia e desenvolvimento de esquizofrenia na vida adulta (Cannon et al., 2002; McNeil et al., 2000).

Assim, os insultos hipóxico-isquêmicos são preocupantes e responsáveis por graves conseqüências no neonato porque este responde diferentemente a tal

exposição quando comparado ao organismo do adulto. Curiosamente, o cérebro de mamíferos recém-nascidos é considerado mais resistente à hipóxia e à anóxia do que o sistema nervoso central de um adulto (Haddad e Donnelly, 1990). Entretanto, a resistência do cérebro imaturo contra a hipóxia tem sua limitação e deve ser considerada como um fenômeno relativo (Nyakas et al., 1996).

O funcionamento normal do cérebro é inevitavelmente dependente de suprimento adequado de oxigênio e de glicose. A redução aguda da distribuição cerebral de oxigênio leva a uma interrupção do metabolismo energético neuronal durante alguns minutos (Berger et al., 1991). A bomba de Na^+/K^+ deixa, então, de funcionar e as células depletadas de energia capturam íons de Na^+, Ca^{2+} e Cl^-. A assim chamada sobrecarga de cálcio ativa lipases, proteases e endonucleases, as quais destroem o citoesqueleto (Siesjo et al., 1995).

A interrupção aguda do metabolismo energético também prejudica a síntese protéica. Como já demonstrado em animais experimentais, ela está reduzida tanto na fase logo após quanto durante a isquemia em regiões vulneráveis e não-vulneráveis do cérebro (Kleihues et al., 1975). Ao fim do período isquêmico, a síntese protéica nas áreas não-vulneráveis retorna aos níveis pré-isquêmicos, enquanto que nas regiões vulneráveis ela permanece inibida (Bodsch et al., 1985). Entretanto, a síntese protéica é retomada muito mais rapidamente em cérebros de fetos após insultos isquêmicos do que em cérebros de adultos (Berger et al., 1996).

O principal mecanismo descrito para a inibição da síntese protéica é a desagregação de polirribossomos após a isquemia, envolvendo a dissociação dos monorribossomos em suas subunidades (Kleihues et al., 1975).

De qualquer forma, o metabolismo energético é restabelecido muito rapidamente nos tecidos cerebrais com condições de se recuperar após a isquemia (Berger et al., 1996). Algumas horas depois, todavia, o *status* energético é novamente diminuído no tecido afetado. Simultaneamente, um edema celular secundário se desenvolve, seguido de uma atividade epileptogênica, que pode ser monitorada por eletroencefalograma. Esses eventos provavelmente são causados, ou ao menos modulados, por reações inflamatórias, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e, principalmente, por espécies reativas de oxigênio.

1.4 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Em 1954, Gerschman e colaboradores (Gerschman et al., 1954) demostraram, pela primeira vez, a hipótese de que a toxicidade do oxigênio e a injúria resultante da radiação tinham pelo menos uma base de ação comum, possivelmente a formação de radicais livres oxidantes.

As espécies reativas do oxigênio (ERO) são moléculas instáveis e quimicamente reativas que podem ser geradas endogenamente durante várias atividades metabólicas celulares. Isso ocorre devido à necessidade constante de oxigênio em muitos mecanismos biológicos nas células aeróbicas. Contudo, muitos fatores ambientais como agentes infecciosos, poluição, luz ultravioleta e radiação podem interferir no balanço entre estas espécies. Uma superprodução de ERO pode resultar em danos celulares como oxidação protéica, formação de adutos de DNA e inativação enzimática, os quais são capazes de causar morte celular. Entretanto, um nível moderado de ERO intracelular é considerado

importante para que o balanço redox apropriado seja mantido e para estimular a proliferação celular e a defesa imunológica (McCord, 1995; Preeta e Nair, 1999).

Os níveis ideais de ERO são sustentados por um sistema de defesa antioxidante altamente regulado, o qual previne o dano oxidativo (Figura 1). Tal sistema inclui as defesas enzimática e não enzimática. A primeira é composta pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) - que catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio -, catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx); as quais catalisam a degradação de peróxidos. Já a defesa não enzimática inclui uma série de substâncias, como o peptídeo glutationa e um grande grupo de vitaminas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

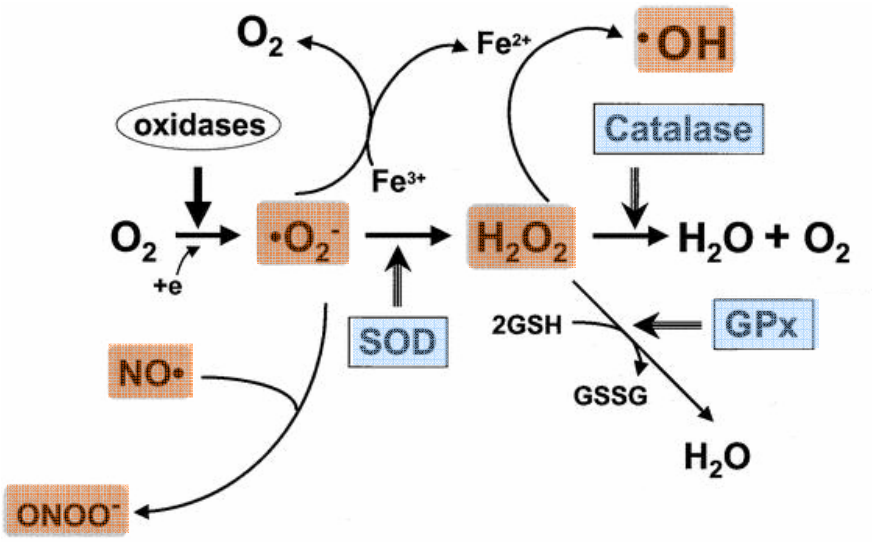

Figura 1. Demonstração do processo de neutralização das ERO pelo sistema de defesa antioxidante (modificado de Griendling e FitzGerald, 2003).

A enzima SOD exerce uma função fundamental na defesa do organismo contra as ERO, por atuar na remoção do radical superóxido. Existem diferentes tipos de SOD, dependendo do metal que atua como cofator em seu sítio catalítico, mas todas elas agem essencialmente de acordo com a mesma reação (Figura 1)

descrita por McCord e Fridovich (1969), que foram os primeiros a descrever o papel da SOD.

A CAT, por sua vez, é encontrada na maioria das células aeróbicas, sendo que em animais está presente principalmente no fígado, nos rins e nos eritrócitos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Intracelularmente, a maior parte dos estoques de CAT ficam dispostos nos perixossomos. Em 1818, Thénard já havia constatado que o peróxido de hidrogênio era decomposto em animais, com a liberação de oxigênio. Após 83 anos, Loew atribuiu esse efeito a uma enzima específica, à qual denominou catalase.

A enzima GPx foi descrita pela primeira vez por Mills em 1957 em tecidos de mamíferos. Sua função biológica é reduzir hidroperóxidos lipídicos em seus correspondentes álcoois e reduzir peróxido de hidrogênio livre em água. Nestas reações a GPx utiliza a glutationa, que é um tripeptídeo encontrado na maioria dos animais, como doadora de hidrogênio formando glutationa oxidada (Figura 1).

O equilíbrio da atividade destas três enzimas é de grande importância para a remoção dos intermediários tóxicos de oxigênio nos espaços intracelulares. Assim sendo, um desarranjo em seu funcionamento pode ocasionar um aumento do dano em importantes estruturas celulares.

1.4.1 Estresse oxidativo e hipóxia neonatal

Já foi descrito que geralmente durante um período de hipóxia, a formação de ERO é menor (de Groot e Littauer, 1989). Porém, após isquemia ou hipóxia, durante o período de reoxigenação, a geração de espécies altamente oxidantes

nos sistemas biológicos aumenta e provoca sérios danos com a possível perda de algumas funções celulares (Chan, 2001).

A significância das espécies reativas de oxigênio para o desenvolvimento da perda de células neuronais foi demonstrada por meio de estudos do efeito neuroprotetor de inibidores da xantina oxidase (Palmer et al., 1993). Já foi realizado também um experimento em que após 21 dias de hipóxia hipobárica observou-se um aumento da peroxidação lipídica, sem alteração da defesa antioxidante (Nakanishi et al., 1995).

Mais recentemente, Rauchova e colaboradores (Rauchova et al., 2005) observaram a atividade de catalase nos eritrócitos de ratos após a exposição à hipóxia hipobárica. Eles estudaram ratos de ambos os sexos e de várias idades (7, 15, 21, 35, 60 e 90 dias de idade). Foi verificado um aumento da atividade de catalase em quase todos os grupos. A única idade em que isso não foi observado em nenhum dos sexos foi a de 7 dias.

Já foi relatado também que a hipóxia é capaz de induzir uma produção aumentada de peróxido de hidrogênio em córtex cerebral e hipocampo de camundongos neonatos, mas não de camundongos adultos (Lafemina et al., 2006). Atribuiu-se este efeito à imaturidade dos neurônios nesta fase, que por isso seriam mais vulneráveis à toxicidade do peróxido.

Além disso, Zhu e colaboradores (Zhu et al., 2007) propuseram que o fator indutor de apoptose (AIF) contribuiria significativamente para a perda neuronal induzida pela hipóxia cerebral em neonatos. Esses autores usaram camundongos com uma mutação hipomórfica para o gene do AIF, a qual causa diminuição nas produções de AIF, de complexo I da cadeia respiratória e de catalase (CAT)

quando comparados aos animais selvagens. Quando esses grupos de animais foram expostos à hipóxia, observou-se que o estresse oxidativo por nitrosilação e peroxidação lipídica foi mais proeminente no grupo mutado. Entretanto, com a administração prévia do antioxidante edaravona, os animais mutados apresentaram uma redução do dano avaliado pela nitrosilação e por peroxidação lipídica, o que não foi observado nos camundongos selvagens.

O antioxidante edavarona já havia sido estudado previamente em ratos Wistar expostos a dano cerebral hipóxico-isquêmico neonatal e, apesar de se tratar de uma linhagem selvagem, tal substância inibiu a peroxidação lipídica e a produção de óxido nítrico cerebrais nesses animais (Noor et al., 2005). Outro antioxidante estudado em ratos neonatos expostos à hipóxia foi a melatonina (Eskiocak et al., 2007). Apesar da hipóxia não gerar um aumento significativo de produtos de oxidação protéica avançada (*advanced oxidation protein products – AOPP*) e de proteína tiol (P-SH), os níveis de AOPP diminuíram com a administração de melatonina, ao contrário dos níveis de proteína tiol, os quais permaneceram os mesmos.

Esses dados poderiam indicar que a defesa antioxidante de animais muito jovens é ainda frágil e apresentaria uma maior dificuldade frente a insultos como a hipóxia.

Sabe-se também que a defesa antioxidante pode ser modificada por distúrbios psiquiátricos. Já é bem difundido que parâmetros de estresse oxidativo ficam alterados na esquizofrenia (Buckman et al., 1987; Yao et al., 2001; Young et al., 2007; Zhang et al., 2006), que – como já foi descrito anteriormente - é uma doença para cujo desenvolvimento a hipóxia neonatal colabora.

1.5 Homocisteína

Outro parâmetro bioquímico que parece estar modificado na esquizofrenia é a homocisteína. A homocisteína é um aminoácido sulfurado, que é o último intermediário na via de biossíntese da metionina, na qual as vitaminas B6, B12 e o folato agem como cofatores (Figura 2). Nessa via, a metionina é convertida em um derivado ligado ao radical adenila, a S-adenosilmetionina, a qual doa um grupo metila para um aceptor apropriado. A hidrólise da assim formada S-adenosil-homocisteína forma a homocisteína, que pode então sofrer transulfuração por meio da reação da homocisteína com a serina. Como produto desta tem-se a cistationina que é então hidrolisada para formar cisteína.

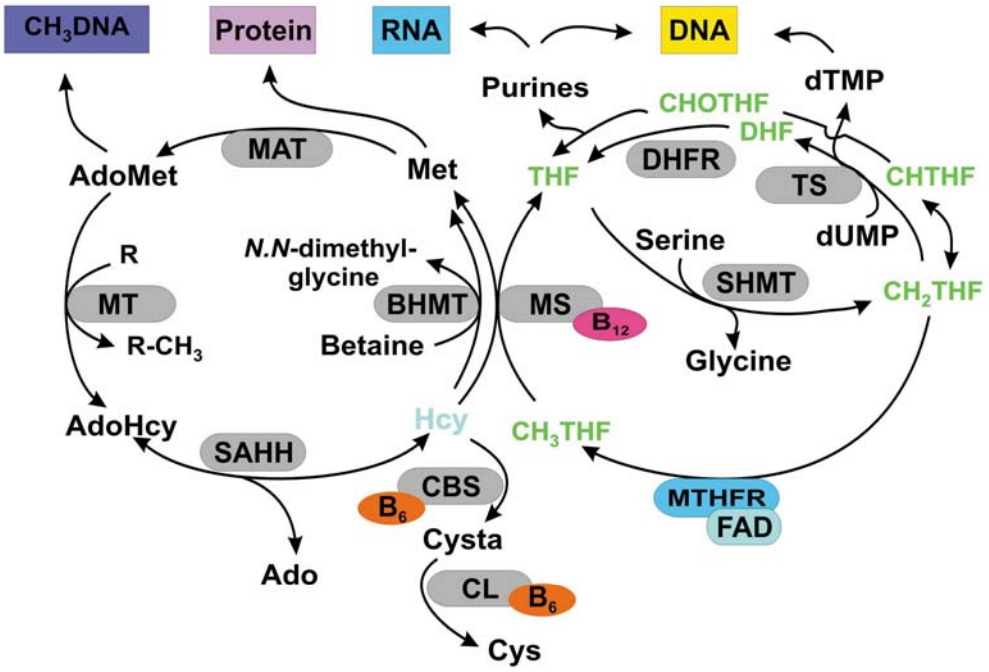

Figura 2. Metabolismo da homocisteína (modificado de Ueland et al., 2001). Abreviações: homocisteína (Hcy), S-adenosil-homocisteína (AdoHcy), S-adenosilmetionina (AdoMet), metionina (Met),metionina sintase (MS), cobalamina (B_{12}), 5-metiltetraidrofolato (CH_3THF), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), 5,10-

metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), adenosina (Ado), betaína-homocisteína S-metiltransferase (BHMT), cistationina β–sintase (CBS), 5,10-metilenotetraidrofolato (CH_2THF), DNA metilado (CH_3DNA), formiltetraidrofolato (CHOTHF), meteniltetraidrofolato (CHTHF), cistationina liase (CL), cisteína (Cys), cistationina (Cysta), diidrofolato (DHF), diidrofolato redutase (DHFR), deoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP), deoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP), metionina adenosiltransferase (MAT), metiltransferase (MT), S-adenosil-homocisteína hidrolase (SAHH), serina-hidroximetiltransferase (SHMT), tetraidrofolato (THF), timidilato sintase (TS).

Diversos fatores genéticos, farmacológicos, patológicos e fisiológicos podem afetar as concentrações de homocisteína (Jakubowski, 2006; Selhub, 1999). Alguns estudos vêm mostrando que um polimorfismo no gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) está associado com a esquizofrenia (Arinami et al., 1997; Joober et al., 2000). Essa enzima catalisa a conversão de metilenotetraidrofolato em metiltetraidrofolato e esse processo gera um grupo metila que é doado à homocisteína em sua conversão à metionina. Assim, uma deficiência de MTHFR está associada a elevações das concentrações plasmáticas de homocisteína.

Entretanto, o aumento plasmático das concentrações de homocisteína em pacientes com esquizofrenia ainda é um pouco controverso. Embora haja trabalhos indicando para concentrações plasmáticas elevadas do aminoácido nesses indivíduos (Applebaum et al., 2004; Regland et al., 1995); alguns estudos não encontraram essa relação (Virgos et al., 1999).

1.5.1 Homocisteína e hipóxia neonatal

Como há indícios de que a hipóxia aguda pode contribuir para o surgimento de distúrbios psiquiátricos como a esquizofrenia, seria interessante verificar o efeito desse insulto na concentração de homocisteína. Recentemente, Blaise e colaboradores (Blaise et al., 2005) estudaram o efeito de dietas deficientes em vitaminas associado à hipóxia e concluíram que esta intensificou a queda da razão S-adenosilmetionina (SAM) / S-adenosil-homocisteína (SAH), a qual é conhecida como um índice da metilação global celular (Burke et al., 1992). Isso porque elas são o substrato e o produto de reações essenciais das metiltransferases nas células. Dessa forma, a intensificação da queda dessa razão pela hipóxia pode ter alterado a metilação de DNA e, conseqüentemente, a expressão gênica.

1.6 Comportamento e hipóxia neonatal

A hipóxia neonatal pode também provocar diversas conseqüências a longo-prazo. Já foi constatado que animais nascidos por cesareana e posteriormente expostos à anóxia apresentam um aumento de receptores de dopamina no sistema nervoso central (El-Khodor e Boksa, 2001).

Além disso, Decker e colaboradores (Decker et al., 2003) verificaram que ratos neonatos expostos à hipóxia intermitente tiveram mudanças no padrão do sono, apresentaram aumento de locomoção, demonstraram uma memória operacional prejudicada e um aumento na expressão estriatal do transportador vesicular de monoaminas e nas proteínas do receptor D1.

Também já foram verificadas algumas diferenças no aprendizado de ratos submetidos à anóxia neonatal (Buwalda et al., 1995). Os animais neste caso foram expostos a 0% de O_2 durante 20 minutos/dia – a contagem de tempo se iniciava após os animais começarem a ficar ofegantes – nos 3 primeiros dias de vida dos animais. Em relação ao controle, esses animais apresentaram uma piora em um teste de memória espacial e uma redução na resposta comportamental de orientação/atenção ao silêncio repentino. Porém não foram constatadas diferenças no estado emocional desses ratos, o que foi verificado pelo desempenho no labirinto em cruz elevado e avaliação do comportamento defensivo.

Mikati e colaboradores (Mikati et al., 2005) observaram o comportamento e a histologia do hipocampo de grupos de ratos submetidos à hipóxia neonatal aguda, à crônica e à sobreposição de ambas. Os autores relataram que os animais submetidos à hipóxia aguda apresentaram, quando adultos, um aumento da agressividade, déficit de memória (verificado pelo teste no labirinto aquático de Morris), e uma diminuição da quantidade de neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo. Os ratos dos grupos hipóxia crônica e sobreposição demonstraram hiperatividade (no teste de campo-aberto), como também um aumento da agressividade e uma diminuição no número de neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo.

Por outro lado, McAuliffe e colaboradores (McAuliffe et al., 2006), demonstraram que em camundongos neonatos há uma persistência do aprendizado com pistas (apesar do aumento das latências) com o aumento do tempo de hipóxia, enquanto que a memória espacial diminuiu em função do

tempo de hipóxia. Um dado semelhante foi encontrado por Pereira e colegas (Pereira et al., 2007), que demonstraram que a estimulação diária por enriquecimento do ambiente pode recuperar os déficits de memória espacial causados por hipóxia-isquemia sem afetar, porém, a redução de volume causada por esse procedimento no hipocampo e no córtex. Em ambos os trabalhos, os autores utilizaram adaptações do protocolo criado por Rice e colaboradores (Rice et al., 1981), ou seja, obstrução da carótida, seguida por exposição a 8% de O_2.

No que diz respeito ao sono, poucos são os estudos que descreveram diferenças na qualidade do sono geradas por hipóxia-isquemia neonatal. E sono é um comportamento muito interessante a ser estudado, já que suas características podem ser usadas como preditivos para o desenvolvimento neurológico (Lombroso e Matsumiya, 1985; Scher et al., 1996). Já é sabido que o ciclo sono-vigília está presente em recém-nascidos a termo e é sinal de integridade cerebral (Thornberg e Thiringer, 1990). Além disso, o sono também é um fator importante a ser considerado em diversos transtornos psiquiátricos, como por exemplo, a esquizofrenia (Benson, 2006).

Já foram realizados muitos estudos sobre o sono de pacientes esquizofrênicos. Alguns deles foram feitos comparando-se um grupo de pacientes esquizofrênicos nunca medicados com um grupo controle saudável (Jus et al., 1973; Lauer et al., 1997; Tandon et al., 1992; Ueda et al., 2006). A maioria deles pôde encontrar as seguintes alterações nos indivíduos doentes: latência para o estágio 2 do sono aumentada, aumento do tempo de vigília após início do sono, aumento do número de despertares, diminuição do tempo total de sono, eficiência do sono reduzida e diminuição do estágio 2 do sono.

Em recém-nascidos humanos, já foi constatado que a presença de um ciclo vigília-sono normal logo após o nascimento é um preditor valioso para um bom desenvolvimento neurológico de bebês nascidos a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica (Osredkar et al., 2005; ter Horst et al., 2004; Thorngren-Jerneck et al., 2003).

Dois importantes estudos já foram realizados com animais neste sentido. Antier e colaboradores (Antier et al., 1998) desenvolveram um estudo em que ratos Wistar foram submetidos no período neonatal à hipóxia-isquemia pelo método de Rice e colaboradores (Rice et al., 1981) e eram avaliados juntamente com o grupo controle às 13 semanas de vida por eletrocorticografia (ECoG) por sistema de monitoramento da atividade locomotora. Os autores encontraram um aumento significativo na porcentagem do sono de ondas lentas (durante o período total avaliado e individualmente nas fases clara e escura), uma diminuição significativa na porcentagem de sono dessincronizado (durante o período total avaliado e individualmente nas fases clara e escura), bem como na porcentagem de tempo de vigília (durante o período total avaliado e individualmente na fase escura). Todas essas alterações foram observadas no grupo hipóxia quando comparados ao controle.

Outro trabalho relevante foi o de Decker e colegas (Decker et al., 2003). Este grupo submeteu ratos Sprague-Dawley à hipóxia intermitente dentro de câmaras na fase neonatal e os observaram juntamente com dois grupos controle (separação materna e não manipulado) com um mês de idade por ECoG e eletromiografia (EMG). Eles relataram uma diminuição da porcentagem de tempo

em vigília e um aumento da porcentagem de sono dessincronizado na fase clara do registro no grupo hipóxia quando comparado ao grupo não manipulado.

Como os resultados parecem bastante controversos e até onde sabemos não há estudos em que houve registro de sono em modelos de hipóxia neonatal com camundongos, acreditamos que registros de-sono em um novo modelo possa auxiliar no esclarecimento dessa condição.

Sabendo, portanto, que a hipóxia neonatal é epidemiologicamente importante e que as conseqüências deste insulto não foram plenamente exploradas, estudos sobre o efeito em longo prazo da hipóxia neonatal são necessários para investigar as repercussões que podem ser desencadeadas na vida adulta de indivíduos que a ela tenham sido submetidos.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos a longo prazo da hipóxia neonatal em parâmetros bioquímicos e moleculares de estresse oxidativo, marcadores da via metabólica da homocisteína e alterações comportamentais em camundongos machos adultos.

2.2 Objetivos específicos

1 – Verificar os níveis de glutationa total e das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) nos eritrócitos;

2 – Quantificar as concentrações de homocisteína e de cisteína plasmáticas e de vitamina B6 sérica;

3 – Avaliar a atividade da enzima catalase nos estriados e nos hipocampos e a expressão de glutationa peroxidase e de catalase nos hipocampos;

4 - Avaliar parâmetros comportamentais (comportamento ansioso, atividade locomotora, sono e memória) dos animais;

5 – Acompanhar a evolução ponderal desde o desmame até o sacrifício nos três grupos experimentais Hipóxia (H), Separação materna (SM) e Não manipulado (NM).

3. METODOLOGIA

3. Metodologia

3.1 Animais

Camundongos fêmeas prenhes da linhagem *Swiss* foram obtidos no Biotério do Departamento de Psicobiologia e cada uma delas foi colocada em uma caixa plástica (28×18×13cm). Duas semanas após a concepção, todas as caixas eram verificadas diariamente para documentação do dia do nascimento da prole.

Apenas filhotes machos foram utilizados neste estudo. Após o nascimento, os filhotes permaneceram intocados e mantidos com suas mães até o dia pós-nascimento (PND) 7, quando as ninhadas foram aleatoriamente distribuídas em um dos três seguintes grupos: hipóxia (H), separação materna (SM) ou não-manipulado (NM). Os tamanhos amostrais para cada experimento foram dependentes do número de filhotes nascidos nas ninhadas destinadas a cada um dos grupos. Cada experimento possui o seu tamanho amostral descrito no item 4 (**Resultados**).

Quando os filhotes completaram um mês de idade, foi realizado o desmame e os filhotes passaram a ser mantidos em novas caixas (38×32×16,5 cm) em grupos de 10 a 12. Os animais desde então foram pesados toda a semana até o sacrifício. Durante todos os procedimentos envolvidos no projeto, os animais foram mantidos em salas com temperatura controlada (22 ± 1ºC), com a fase clara entre às 07:00 e 19:00 horas e água e comida foram fornecidas à vontade. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP-EPM, nº 0018/06 (Anexo 1).

3.2 Procedimento de hipóxia

O grupo H foi submetido a 10% de oxigênio durante 6 horas/dia por 6 dias. Durante o procedimento, cada ninhada era individualmente disposta em um pequeno recipiente (10,5×10,5×11cm) e mantida separada da respectiva mãe. Entretanto, as 6 horas diárias de hipóxia eram divididas em 3 sessões de 2 horas intercaladas por períodos de 45 minutos, quando os filhotes retornavam ao contato materno. Os animais do grupo SM foram mantidos em normóxia, porém foram separados das mães da mesma maneira que o grupo H. Ambos os grupos foram mantidos sobre uma manta elétrica, para evitar a hipotermia durante o procedimento. O grupo NM foi mantido intocado durante todo esse período experimental. Os procedimentos de hipóxia e separação materna se iniciaram às 7:30 e terminaram por volta das 15:00 horas.

A hipóxia contínua foi induzida em uma câmara de acrílico especializada (Figura 3, 30×20×20 polegadas, Oxycycler modelo A44X0, Biospherix, Redfield, NY, USA) conectada a suprimentos dos gases N_2 e O_2. Sensores internos podiam medir as concentrações de O_2 e CO_2 (<0,01%) e a temperatura (22-25ºC). O influxo de N_2 e O_2 na câmara foi controlado por um computador que estava programado para manter o suprimento de O_2 sempre em 10%.

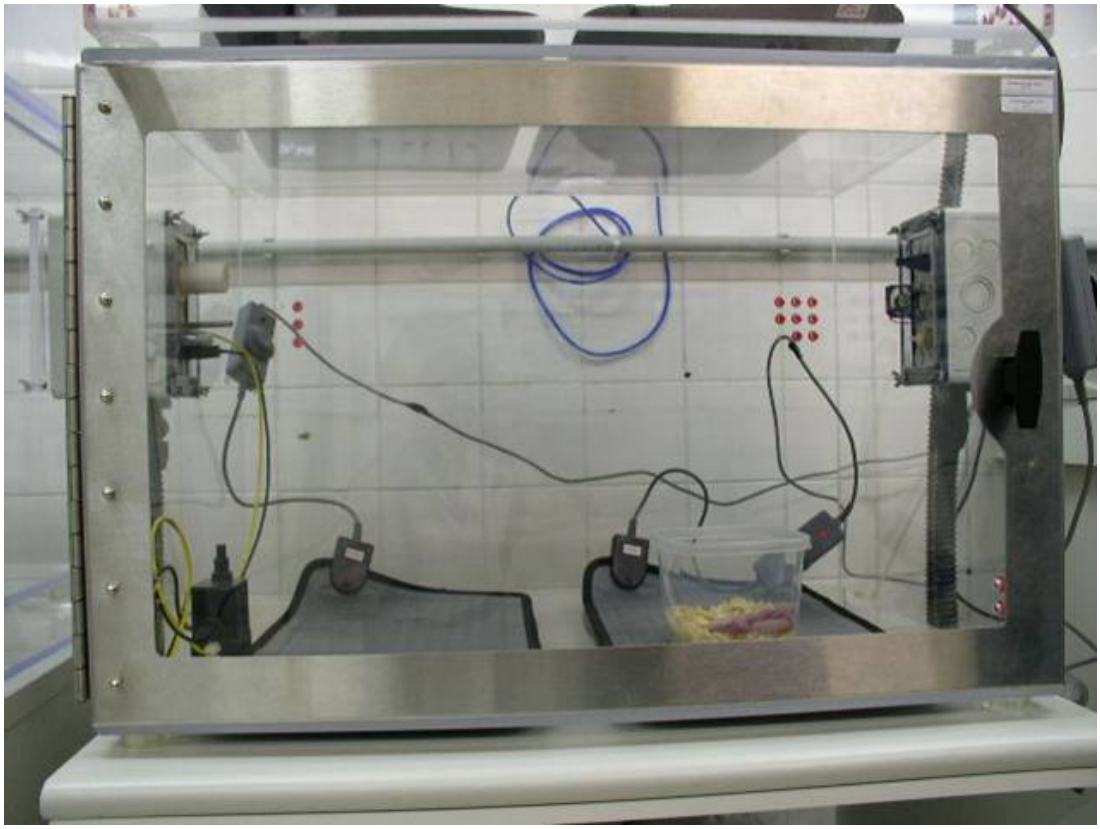

Figura 3. Filhotes de camundongos de uma ninhada sendo submetidos ao protocolo de hipóxia dentro da câmara utilizada.

Terminados os 6 dias de manipulação neonatal, os filhotes dos grupos H e SM retornaram às suas caixas e não foram mais manipulados até o desmame. Quando os animais completaram 3 meses de idade, eles foram testados na esquiva discriminativa, nas caixas de atividade locomotora ou passaram por uma cirurgia de implantação de eletrodos para o registro de sono.

3.3 Testes comportamentais

3.3.1 Esquiva discriminativa

O modelo escolhido para a avaliação da memória e do comportamento ansioso dos animais foi a esquiva discriminativa. Esta é uma adaptação do

labirinto em cruz elevado convencional (Figura 4), em que os camundongos são condicionados a escolher entre os dois braços fechados (um aversivo e outro não-aversivo), enquanto evitam os braços abertos (Silva et al., 1997).

Figura 4. Imagem do aparato utilizado para a avaliação da memória e ansiedade dos animais (Silva et al., 1997).

O aparato utilizado é feito de madeira e contém dois braços fechados com paredes também de madeira abertas no topo (28,5×7×14 cm), opostos a dois braços abertos (28,5×7 cm). Uma lâmpada incandescente de 100 W fica fixada ao meio de um dos braços fechados (braço aversivo). Na sessão de treino, cada camundongo pôde explorar o aparato por 10 minutos e cada vez que o animal entrava no braço com a lâmpada, uma situação aversiva era produzida até que o animal saísse do braço. Os estímulos aversivos eram o acionamento da luz e de

um barulho de 80 dB. As emissões de luz e de som não eram iniciadas pelo experimentador até que o camundongo entrasse no braço aversivo. Na sessão de teste, cada camundongo foi colocado novamente no aparato por 3 minutos, porém sem receber o estímulo aversivo. A temperatura da sala em ambas as sessões foi mantida em 22 ± 1ºC.

O tempo gasto e o número de entradas em cada braço foram registrados minuto a minuto na sessão de treino e ao fim da sessão de teste.

3.3.2 Caixa de atividade

Para a avaliação da atividade locomotora, os animais foram submetidos por 30 minutos à caixa de atividade (Figura 5, Opto-Varimex Mini Columbus Instruments, com 20 cm de largura × 40 cm de comprimento × 25 cm de altura), que detecta a locomoção por interrupções de pares de sensores fotoelétricos horizontais. Os resultados foram registrados como contagem total de movimentação a cada 5 minutos de avaliação. A temperatura da sala foi mantida em 22 ± 1ºC.

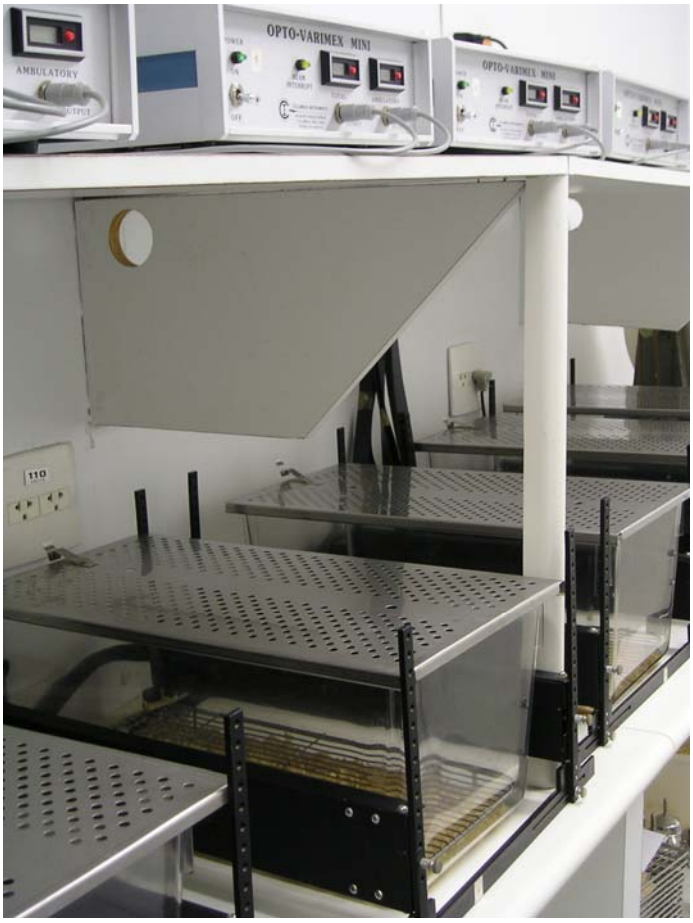

Figura 5. Sistema de detecção da atividade locomotora de camundongos (Opto-Varimex Mini Columbus Instruments).

3.3.3 Registro de sono

3.3.3.1 Implante de eletrodos

Os animais foram submetidos a uma cirurgia para a implantação de eletrodos para o monitoramento eletrocorticográfico e eletromiográfico do sono, possibilitando assim classificar e quantificar suas diferentes fases.

Para o registro da atividade elétrica cortical dos animais, como único intuito de caracterizar e quantificar o sono e suas respectivas fases (vigília, sono sincronizado e sono dessincronizado), foram feitas duas derivações corticais

bipolares longas e contralaterais. Uma de localização rostral, para o registro do ECoG com uma atividade *theta* mínima (**eletrodos 1 e 2**) e outro de localização caudal, para o registro do ECoG com máxima atividade *theta* (**eletrodos 3 e 4**; Veasey et al., 2000). Também foram implantados dois eletrodos no músculo dorsal do pescoço (trapézio), um do lado direito e outro do lado esquerdo, possibilitando assim o EMG, também necessário para a caracterização das fases do sono.

Eletrodo 1: 1mm anterior ao *bregma* e 2mm à direita da sutura sagital;

Eletrodo 2: 1mm anterior ao *bregma* e 2mm à direita da sutura sagital;

Eletrodo 3: 3mm anterior ao *bregma* e 2mm à esquerda da sutura sagital;

Eletrodo 4: 3mm anterior ao *bregma* e 2mm à direita da sutura sagital;

Eletrodo 5: músculo dorsal do pescoço (trapézio), lado esquerdo;

Eletrodo 6: músculo dorsal do pescoço (trapézio), lado direito;

A indução anestésica foi feita com a associação de cloridrato de cetamina, a 140,0mg/Kg, xilazina 4,0 mL/Kg e diazepam, a 5,5 mg/Kg, intraperitoneal. Após a administração anestésica, os animais foram submetidos a uma tricotomia na região superior da cabeça, sendo posteriormente fixados a um aparelho estereotáxico (Insight do Brasil). Na base do aparelho estereotáxico, foi colocada uma manta aquecedora, com o objetivo de manter a temperatura do animal entre 36 e 38°C. A assepsia local foi feita com polividina. Como hemostático foi administrado subcutaneamente, na região da futura incisão, cerca de 0,2mL de cloridrato de lidocaína com norepinefrina 1:50000. Foi feita uma incisão circular, com cerca de 1,0 cm de diâmetro, no escalpo do animal. A pele foi desprezada e

o tecido subjacente removido, até expor a tábua óssea, sendo possível então visualizar as suturas interósseas.

Em seguida, foram demarcadas as coordenadas estereotáticas, de acordo com as localizações descritas anteriormente. Com o auxílio de uma broca odontológica, foram feitos os quatro orifícios, com extrema cautela para não lesionar a dura-máter desses animais. Foram atarraxados quatro microparafusos (1,4mm de diâmetro) de aço inoxidável (**eletrodos 1, 2, 3 e 4**), também com cuidado para apenas tocarem a dura-máter (± 1,0mm de profundidade). Dessa maneira, foram minimizados quaisquer danos ao córtex cerebral dos animais, o que poderia influenciar nos padrões elétricos gerados.

Todos os eletrodos corticais foram ligados, através de fios de níquel-cromo revestidos com Teflon^{TM} (California Fine Wire^{TM}, 0,008mm de diâmetro) a um conector, adaptado a partir de uma porta serial de informática modelo FC-14. Também foram implantados dois eletrodos (**5 e 6**) feitos de fio níquel-cromo revestidos com Teflon^{TM} (California Fine Wire^{TM}, 0,004mm de diâmetro), no músculo dorsal do pescoço (trapézio), direito e esquerdo, possibilitando o registro eletromiográfico, necessário à caracterização do sono.

O conector foi fixado ao crânio do animal com acrílico autopolimerazante odontológico. Tivemos o cuidado de não selar a pele da borda da ferida cirúrgica, o que poderia gerar uma gangrena, oriunda de um processo infeccioso anaeróbio. Também não deixamos espaços mortos ou disposição óssea durante o acabameto com o acrílico, justamente para facilitar o processo de cicatrização e evitar complicações infecciosas, o que comprometeria a qualidade e durabilidade do implante.

Os camundongos receberam uma dose de 0,5 mL/Kg, intramuscular, de uma suspensão poliantibiótica com estreptomicinas e penicilinas (Pentabiótico® WYETH®), como profilático ao risco de infecção.

Em seguida, os camundongos foram levados para uma unidade de fototermoestimulação por aproximadamente 12 horas a fim de evitar o choque hipotérmico, comum no período pós-anestésico, Após este período, os animais foram levados para as suas gaiolas, com livre acesso à água e comida, onde permaneceram por mais 1 semana antes de qualquer intervenção experimental.

3.3.3.2 Polissonografia

Os camundongos avaliados foram registrados por polígrafos digitais (Embla Medical, Reykjavik) de 16 canais. Cada animal foi registrado por meio de três canais, sendo dois para o registro de ECoG e o terceiro para o registro do EMG. A freqüência de amostragem do sinal foi de 200 Hz; a calibração foi padronizada em 50μV; a sensibilidade, ou ganho, foi de 15μV para o ECoG e de 30μV para o EMG; a constante de tempo ou filtro de baixa freqüência, foi de 0,1 segundo para o ECoG e de 0,03 segundos para o EMG; o filtro de alta freqüência, foi ajustado a 35 Hz para o ECoG e 70 Hz para o EMG; o filtro de corrente alternada, para 60 Hz.

Os animais foram colocados em gaiolas específicas, com disponibilidade de água e comida, 24 horas anteriores ao início do registro (como período de adaptação) e lá permaneceram durante o registro, que durou 48 horas.

A aquisição do sinal foi automaticamente digitalizada e armazenada em disco rígido até a leitura. A leitura dos registros foi feita manualmente, utilizando-

se o programa *Somnologica* e em épocas de 10 segundos, em que o traçado dominante por um período maior do que 50% da época caracterizaria a mesma. Em épocas em que, pela presença de artefatos e/ou ruídos, não fosse possível caracterizar a fase do sono, foi feita uma análise das épocas imediatamente anterior e posterior. Após a leitura de cada período de 12h de registro, foi impresso um laudo para cada animal.

3.3.3.2 Parâmetros para análise

Os parâmetros obtidos no registro polissonográfico foram: tempo de sono sincronizado, tempo de sono dessincronizado, tempo de vigília, duração média dos episódios de sono dessincronizado, número de despertares e número de transições de estágios de sono.

Para melhor representação gráfica, os valores dos tempos gastos em cada fase do sono foram expressos em porcentagem do tempo total de registro.

3.4 Sacrifício dos animais

Os animais que passaram pela esquiva discriminativa e pela caixa de atividade foram sacrificados por decapitação, e as amostras de sangue foram utilizadas nas análises bioquímicas.

3.4.1 Coleta e processamento de amostras

O cérebro de cada animal foi extraído e seus hipocampos e estriados foram rapidamente dissecados, sendo cada par de estruturas depositado em um tubo estéril livre de nucleases (para análise molecular) ou em um tubo limpo (para

análise bioquímica), depositados em recipiente com gelo seco e, em seguida armazenados no freezer a -80°C para posterior análise.

O sangue foi coletado em tubos sem anticoagulante, contendo heparina ou EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético). As amostras colhidas foram mantidas a 4°C até o momento da centrifugação para evitar qualquer alteração.

Os tubos contendo heparina foram centrifugados a 3000rpm durante 10 min a 4°C, para separação dos eritrócitos, que foram utilizados para os ensaios de GSHt, SOD, CAT, GPx e hemoglobina (Hb). Após a retirada do plasma, adicionou-se o tampão de lavagem ($NaPO_4$ 10mM, NaCl 140mM, pH 7,4) aos eritrócitos e a mistura foi centrifugada a 3000rpm por 10min a 4°C. O tampão foi retirado do tubo após a centrifugação e o procedimento foi repetido por mais duas vezes, para a obtenção de uma massa eritrocitária.

Foram separados 150µL dessa massa em um microtubo, aos quais foram adicionados 150µL de tampão de lavagem. Desta mistura retiraram-se 200 µL que foram então adicionados a outro microtubo contendo 200 µL de $HClO_4$ 2M EDTA 4mM. Essa nova solução foi centrifugada a 14000rpm por 2min à temperatura ambiente, e o sobrenadante (extrato ácido) foi então retirado para dosagem de GSHt. Os 100µL que restaram da preparação massa eritrocitária/tampão de lavagem foram utilizados para a dosagem de Hb.

Para a análise da atividade das enzimas foi preparado um hemolisado por meio da adição de 50µL da massa eritrocitária a 450µL de solução de lise (EDTA 2,7mM – pH 7,0 e β-mercaptoetanol) em um outro microtubo. A dosagem de Hb para normalização dos cálculos das atividades enzimáticas foi realizada a partir deste mesmo hemolisado.

Os tubos contendo EDTA foram centrifugados a 3000rpm durante 10 min a 4°C, para a obtenção de plasma utilizado na dosagem de Hcy e Cys.

Os tubos secos foram centrifugados a 3000rpm durante 10 min a temperatura ambiente, após a retenção de coágulo, para a separação do soro, que foi utilizado na dosagem de vitamina B-6.

Todas as amostras processadas foram armazenadas a -80°C até a realização das dosagens.

3.5 Análise bioquímica

3.5.1 Análise das enzimas antioxidantes

Os tubos de hemolisados foram retirados do freezer -80°C, descongelados em água corrente e congelados em seguida em um recipiente contendo gelo seco e acetona. Este procedimento foi repetido três vezes para realizar a lise da membrana plasmática dos eritrócitos. Os tubos foram então centrifugados a 15000rpm/40min a 4ºC e o sobrenadante transferido para outros microtubos.

Estas amostras foram utilizadas na análise da atividade das enzimas SOD, GPx e CAT.

3.5.1.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase

A atividade de SOD eritrocitária foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por McCord e Fridovich (McCord e Fridovich, 1969).

A enzima xantina oxidase (XO) catalisa a transformação de xantina em ácido úrico, produzindo $O_2^{\bullet-}$ a partir do oxigênio molecular. A reação é acoplada à oxidação do citocromo C, que pode ser quantificada por espectrofotometria. A

adição de SOD contida na amostra diminui a velocidade de oxidação do citocromo C, pela competição por $O_2^{\bullet -}$. A atividade da SOD é medida na presença de cianeto, em concentração adequada à inibição da atividade da citocromo C oxidase.

O hemolisado foi diluído em tampão fosfato 0,05M pH 7,8 na proporção 1:5. O meio de reação foi preparado utilizando a seguinte proporção: 18mL de tampão fosfato 0,05M pH 7,8, 3mL de citocromo C (100µM), 3mL de xantina (500µM), 3mL de EDTA (1mM) e 3mL de cianeto de potássio (200µM), para um volume final de 30mL de meio de reação. A XO foi diluída na proporção 1:10, em tampão fosfato. A reação foi feita diretamente na cubeta de vidro colocando 10µL de hemolisado diluído, 10-12µL de XO (quantidade suficiente para que a absorbância fosse igual a 0,030/min no meio de reação sem amostra) e 1mL do meio de reação, com posterior agitação. Em seguida, realizou-se a leitura no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 550nm a 25ºC e a atividade foi calculada em U/mg Hb. Uma unidade (1U) é a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do citocromo C, por minuto, a 25ºC e pH 7,8.

3.5.1.2 Determinação da atividade da glutationa peroxidase

O ensaio para determinação da atividade da GPx eritrocitária foi baseado no método espectrofotométrico descrito por Sies e colaboradores (Sies et al., 1979), que utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como marcador de sua atividade. A reação se baseia na redução do

hidroperóxido de t-butila (TBOOH) pela glutationa peroxidase, que usa o NADPH como redutor nesta reação.

O hemolisado foi diluído em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0 na proporção 1:10. O meio de reação foi preparado utilizando a seguinte proporção: 30 mL de tampão Tris 0,1M EDTA 0,5 mM pH 8,0, 10µL (3U) de glutationa redutase, 0,005 g de NADPH e 0,0092 g de glutationa reduzida; para um volume final de 30mL de meio de reação. A reação foi feita diretamente na cubeta de quartzo colocando-se 20µL de hemolisado diluído e 970mL do meio de reação com posterior agitação. Após isso, as cubetas foram incubadas por 1min e, em seguida, foram adicionados 10µL de TBOOH 50mM para acionar a reação. A leitura no espectrofotômetro foi feita a um comprimento de onda de 340nm por 3min a 37ºC e a atividade calculada em U/g Hb.

3.5.1.3 Determinação da atividade da catalase eritrocitária

O ensaio para determinação da atividade de CAT eritrocitária foi baseado no método espectrofotométrico descrito por Adamo e colaboradores (Adamo et al., 1989), que avalia a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima.

O hemolisado foi diluído em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 na proporção 1:20. O meio de reação foi preparado utilizando a seguinte proporção: 1mL de tampão Tris 1M EDTA 5mM pH 8,0, 18mL de H_2O_2 10mM e 1mL de H_2O milli Q, para um volume final de 20mL de meio de reação. A reação foi feita diretamente na cubeta de quartzo colocando-se 10µL de hemolisado diluído e 990mL do meio

de reação com posterior agitação. A leitura no espectrofotômetro foi feita em comprimento de onda de 230nm a 37ºC e a atividade calculada em U/mg Hb.

3.5.1.4 Determinação da atividade da catalase cerebral

A dosagem de catalase no tecido cerebral também foi realizada pelo método de Adamo e colaboradores (Adamo et al., 1989). Os tubos contendo as amostras de estriado e de hipocampo destinadas a esta dosagem foram retirados do freezer -80°C. Os tecidos foram individualmente homogeneizados com tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0, (para cada miligrama de tecido foram acrescidos 3µL de tampão). Após esse processo, os tubos com os homogenatos foram centrifugados por 15 minutos a 3000 rpm e 4ºC. O sobrenadante foi então ser transferido para outro microtubo limpo e centrifugado novamente por 15 minutos a 12000 rpm e 4ºC. O sobrenadante resultante foi enfim coletado e utilizado na análise.

O meio de reação foi então preparado de acordo com a seguinte proporção: para 9mL de H_2O_2 10mM, foram acrescidos 0,9mL de tampão PO_4^-K 50 mM pH 7,4. A reação foi realizada em cubeta de quartzo e foi feita em duplicata. Foram colocados 960µL do meio de reação às cubetas e 40µL de amostra em cada uma. A leitura no espectrofotômetro foi realizada em λ = 240nm a 30°C e a atividade foi calculada em U/mg de proteína.

3.5.2 Dosagem de glutationa total (GSHt)

A determinação da concentração de GSHt eritrocitária foi baseada no método espectrofotométrico descrito por Tietze (Tietze, 1969).

Do extrato ácido armazenado a -80°C, foram retirados 150µL, os quais foram neutralizados com uma quantidade suficiente de hidróxido de potássio 2M e ácido propanosulfônico 3-[N-morfolino] 0,3M para atingir o pH 7,0. As amostras foram então centrifugadas a 14000rpm/2min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e depositado em um microtubo limpo e identificado. Foram retirados 10µL desse sobrenadante, colocando-os numa cubeta de vidro juntamente com: 990µL de tampão fosfato, 50µL de NADPH (240µM), 20µL de DTNB (ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico) 76µM e 20µL de glutationa redutase (0,12 U/mL). A leitura foi feita a 412nm e a concentração de glutationa expressa em µmol/g Hb. Nesse ensaio, o DTNB reage com a glutationa reduzida para a formação de 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB).

3.5.3 Dosagem de hemoglobina

A dosagem de Hb foi realizada para a normalização das atividades enzimáticas eritrocitárias e da concentração de GSHt entre as amostras.

Aos tubos de ensaio foram adicionados 2,5mL de solução de Drabkin (Newprov) e 50 µL do hemolisado (para as amostras dos ensaios enzimáticos), ou 10µL da papa eritrocitária diluída (para as amostras do ensaio da GSHt). A solução foi agitada em vórtex e transferida para cubetas de vidro. As absorbâncias das amostras foram registradas em 535nm a temperatura ambiente, juntamente com um branco (somente a solução de Drabkin) e uma solução padrão de Hb (Doles Reagentes). Os valores referentes à concentração foram expressos em mg/mL.

3.5.4 Dosagem de quantidade total de proteína

A dosagem da quantidade total de proteína foi realizada para a normalização da atividade de catalase nos hipocampos e estriados pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). Para isso, foram preparadas algumas soluções, como descrito abaixo.

Na solução A, foram acrescidos 10g de bicarbonato de sódio e 0,1g de tartarato de sódio/potássio em q.s.p. 300mL de água destilada. Em seguida foram acrescidos 2g de hidróxido de sódio e o volume foi completado para 500 mL. Na solução B, 0,5g de sulfato cúprico foi dissolvida em 100 mL de água destilada. Estas soluções foram mantidas a 4˚C.

Para a confecção da solução mãe de albumina (1mg/mL), 10mg de albumina bovina liofilizada foram dissolvidas em 10mL de água destilada e a solução foi mantida a -20˚C. A solução mãe de reagente de Folin-Ciocalteau (50%) foi feita por meio da diluição do reagente de Folin (Queel – Industria Química) e mantida a temperatura ambiente.

Assim, foi preparada a solução C (que não deve ser estocada, mas sim utilizada no dia do preparo), que é composta de 980µL da solução A e 20µL da solução B, sendo estas as quantidades necessárias para cada amostra a ser dosada.

Com as soluções prontas, todas as amostras foram diluídas na proporção 1:21 em tampão PO_4^- K 0,1M pH 7,0, e foi preparada uma curva padrão com concentrações crescentes de solução de albumina (0mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,2mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,8mg/mL e 1,0mg/mL).

A cada 200µL de amostra foram acrescentados 1,0 mL de solução C e incubou-se à temperatura ambiente por 15min. Em seguida, acrescentou-se 1,0mL de solução de Folin sob agitação no vórtex. Posteriormente, incubou-se por 30min as amostras e, por fim, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro a 750nm, tendo-se a leitura da água como referência.

3.5.5 Dosagem de homocisteína e cisteína plasmáticas

A dosagem dos níveis de homocisteína (Hcy) e cisteína (Cys) plasmáticas foi baseada no método de Pfeiffer (Pfeiffer et al., 1999) para aplicação em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC – *high performance liquid chromatography*) com detecção fluorimétrica e eluição isocrática.

Para realizar a análise quantitativa, construiu-se uma curva de calibração a partir de 5 soluções de Hcy (em concentrações crescentes de 3,125µM, 6,25µM, 12,5µM, 25,0µM e 50,0µM), outra curva com 5 soluções de Cys (em concentrações crescentes de 50µM, 100µM, 200µM, 400µM e 800µM) e um padrão interno de cistamina com concentração constante de 40µM. Por interpolação, o computador forneceu a equação correspondente à quantificação dos níveis de Hcy e Cys plasmáticas nos ensaios.

As soluções de Hcy e Cys de concentrações conhecidas e as amostras a serem analisadas no HPLC passaram por uma seqüência de atividades para a reação, envolvendo as etapas redução, precipitação das proteínas e derivatização.

Na etapa de redução, incubaram-se à temperatura ambiente por 30 minutos, 50µL de plasma adicionado a 60µL de meio I, no qual havia tampão de

fosfato de sódio (PBS), tricarboxi-etil-fosfina (TCEP) 10% e padrão interno (cistamina 40μM) diluído. Assim, ocorreu a redução dos adutos tióis e sua liberação das proteínas plasmáticas.

Na etapa de precipitação das proteínas, adicionaram-se as amostras da etapa anterior a 100μL de ácido tricloroacético (TCA) na proporção de 0,5g em 5mL, diluído em EDTA. Após esta adição, cada amostra foi agitada no vórtex por 30 segundos e centrifugada a 13000rpm por 10 minutos.

Na etapa de derivatização, 50μL do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos contendo cada um 185μL de meio II, composto por NaOH 1,55M; tampão borato 0,125M (pH 9,5) contendo 4 μmol/L de EDTA; e 7-fluorobenzeno-2-oxi-1,3-diazólico-4-sulfato de amônio (SBD-F) 1g/L. Após uma breve agitação, os microtubos foram incubados em banho maria a 60°C por 1 hora. O SBD-F, ao reagir com os grupamentos SH disponíveis, produziu um composto fluorescente. Para análise no HPLC, 200μL de cada amostra preparada foi transferida para um *vial* e colocada para leitura no aparelho.

O equipamento de HPLC utilizado é da marca Shimadzu e é composto por um injetor automático de amostras SIL-10Advp, um detector de fluorescência RF-10AXL, uma coluna analítica C18 modelo Prodigy ODS2 (150mm x 3,2mm e micropartículas de 5,0μm) e uma pré-coluna C18 modelo Alltech ODS (30mm x 3,2mm e micropartículas de 5,0μm). A separação é feita nas colunas, enquanto a detecção da fluorescência dos compostos separados é feita com detector ajustado para excitação a 385ηm e emissão a 515ηm. A análise cromatográfica foi realizada com uma fase móvel composta de tampão ácido acético/acetato

0,1M (pH 5,5) com 30mL/L de metanol grau cromatográfico num fluxo de 0,7ml/minuto.

3.5.6 Dosagem de vitamina B-6

A concentração sérica de vitamina B6 também foi determinada por HPLC, de acordo com o método descrito por Sharma e Dakshinamurti (Sharma e Dakshinamurti, 1992). Para cada amostra, foi separado um microtubo âmbar (uma vez que a vitamina B-6 é fotossensível) e nele foi colocada uma alíquota de soro de 10µL. Em seguida, foram acrescidos 300µL de ácido metafosfórico 10% em cada amostra e todas elas foram agitadas no vórtex por 30 segundos e centrifugadas por 20 minutos a 14000rpm. Esses procedimentos foram realizados para desproteinizar as amostras. Uma solução de piridoxal fosfato 1mg/dL foi usada como padrão. Para análise no HPLC, 200µL de cada amostra preparada foi transferida para um *vial* e colocados para leitura no aparelho (λ=290nm e fluxo de 1,0 mL/min).

O procedimento cromatográfico foi realizado utilizando-se o mesmo aparato relatado na dosagem de Hcy e Cys, porém um detector SPD-10VP UV-VIS e uma coluna Phenomenex Bondclone C18 (10µ, 300 x 3.9mm) foram usados.

3.6 Análise molecular

3.6.1 Extração de RNA

Os tubos contendo as amostras de estriado e de hipocampo foram retirados do freezer -80ºC e iniciou-se a extração de RNA, acrescentando-se 1mL de solução de TRIZOL® a cada 50-100mg de tecido. Logo após o ajuste do

volume de TRIZOL®, homogeneizou-se a mistura e a incubou por 5min a 25°C. Em seguida, foram adicionados 200µL de clorofórmio por mL de TRIZOL®, os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados por 3min a 25°C.

Logo após isso, os tubos foram centrifugados a 12000rpm por 15min a 4°C. A fase aquosa com o RNA de cada tubo foi transferida para um microtubo de 2mL e a ela foi acrescentado 500µL de isopropanol por mL de TRIZOL®. A solução foi novamente agitada e incubada por 10 min a 25°C e, em seguida, os microtubos foram centrifugados a 12000rpm por 10min a 4°C. O sobrenadante obtido foi descartado cuidadosamente, separando-se o *pellet* de RNA. A seguir, acrescentou-se 1 mL de etanol 75% por microtubo, e houve mais uma centrifugação de 7500rpm por 5min a 4°C. O sobrenadante obtido foi novamente descartado com cuidado e esperou-se que os *pellets* de RNA secassem a temperatura ambiente. Em seguida, os *pellets* foram ressuspendidos em 40µL de água Milli Q. De cada solução resultante, foram retiradas uma alíquota de 1µL para fazer uma diluição (1:100) a fim de medir a concentração de RNA em cada amostra e outra alíquota de 2µL para avaliação da integridade do material extraído. As amostras foram, por conseguinte, armazenadas a -80°C.

3.6.2 Medição da concentração de RNA nas amostras

As diluições preparadas tiveram sua concentração de RNA medidas espectrofotometricamente pelo aparelho GeneQuant Pro (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala – Sweden).

3.6.3 Avaliação da integridade das amostras

Para a avaliação da integridade do material, todas as alíquotas retiradas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%.

3.6.4 Transcrição reversa

Para se preparar o RNA para a transcrição, uma alíquota de 1µg de cada amostra foi separada em um microtubo para a síntese do DNA complementar (cDNA – *complementary DNA*) com a utilização da enzima transcriptase reversa Improm II™ (Promega) utilizando-se iniciadores hexâmeros randômicos (Invitrogen). No microtubo de cada amostra, foram adicionados 0,5µg dos iniciadores randômicos e completou-se o volume com água livre de nucleases para 5µL. Em seguida, as amostras foram incubadas a 70°C por 5min seguidos de 5min a 4°C.

Posteriormente, adicionou-se ao meio da reação anterior os seguintes elementos para a realização da transcrição reversa: 1x Improm II™ 5X Reaction Buffer, 0,5 mM da mistura de dNTPs (deoxinucleotídeos trifosfato), 1u/µL de Recombinat Rnasin™ Ribonuclease Inhibitor, 3mM de $MgCl_2$, 1µL de Improm II™ Reverse Transcriptase e água livre de nucleases sufuciente para completar o volume de 15µL, finalizando um meio de reação de 20µL no microtubo.

As amostras eram, então, levadas ao termociclador (MJ Research Modelo PTC-200), submetidas ao seguinte programa: anelamento dos iniciadores a 25°C por 5min, extensão da primeira fita de cDNA a 42ºC por 60 min e inativação da enzima Improm II™ a 70°C por 15min. Ao fim da reação todos os tubos eram, enfim, armazenados a -20°C.

3.6.5 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

A taxa de expressão relativa de RNA mensageiro dos genes de GPx e de CAT foi determinada usando-se o gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como referência. Os iniciadores das reações de qPCR (Tabela 1) foram desenhados no software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/) e sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*). Teve-se o cuidado de selecionar as seqüências iniciadoras senso em um éxon diferente das seqüências iniciadoras anti-senso. As reações de qPCR foram realizadas usando-se o SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) e o aparelho utilizado foi o Gene Engine Opticon-2 (*MJ Research* – incorporada pelo *BioRad Laboratories*). As reações foram feitas em placas brancas de 96 poços com capacidade para 200µL (*MJ Research* – incorporada pelo *BioRad Laboratories*). As placas foram seladas com filmes de qualidade óptica (*Applied Biosystems*)

Gene	Iniciadores (5' → 3')	Tm	Fragmento
CAT	S: AGCGGATTCCTGAGAGAGTG AS: GAGAATCGAACGGCAATAGG	56°C	142 pb
GPx	S: GGTTTCCCGTGCAATCAG AS: CTCACCATTCACTTCGCACTT	56°C	138 pb
GAPDH	S: TGCACCACCAACTGCTTA AS: GGATGCAGGGATGATGTT	56°C	177 pb

Tabela 1. Iniciadores utilizados, temperaturas de *melting* e tamanho dos fragmentos amplificados por qPCR dos genes CAT, GPx e GAPDH.
Abreviações: senso (S), anti-senso (AS) e temperatura de *melting* (Tm).

Antes do ensaio com as amostras, otimizou-se e determinou-se a eficiência da reação de cada gene. A determinação das eficiências das reações foi realizada a partir de uma curva de diluição seriada de um “pool’ de cDNA das amostras. A análise da expressão relativa foi feita utilizando-se a ferramenta de *software* para expressão relativa (*Standard curve based method for relative real time PCR data processing*) que executa os cálculos na planilha do Microsoft Excel (Larionov et al., 2005).

As reações foram preparadas colocando-se em cada poço da placa as sequências iniciadoras senso e anti-senso (concentração final de 400ηM cada), 10μL da mistura comercial contendo a polimerase, dNTP e SYBR® Green (*Applied Biosystems* #4367659), 1μL da amostra de cDNA (diluída 1:8) e água livre de nucleases q.s.p. 20μL. Foram preparadas também duas soluções para o registro da fluorescência basal (que continham 1μL de água ao invés de amostra). Além disso, a cada placa feita era também incluída a curva de diluição seriada do *pool* de amostras. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

A reação era programada com os seguintes passos:

1) Ativação da polimerase – 50°C por 2min

2) Ativação da polimerase - 95°C por 10min

3) Denaturação - 95°C por 15 segundos

4) Anelamento - 56°C por 30 segundos

5) Extensão - 72°C por 30 segundos

6) Registro da fluorescência

7) Retorno ao passo 3 por 39 vezes

8) Curva de melting – 65 a 95°C (0,5°C por 1 segundo)

As eficiências das reações atingidas foram de 98% para CAT, de 76% para GPx e de 83% para o GAPDH.

3.7 Análise estatística

A análise estatística utilizada para a avaliação dos parâmetros bioquímicos e moleculares foi a análise de variância (ANOVA) de uma via. Quando necessário, foi feito o ajuste de Bonferroni.

Em relação às medições de massa corpórea dos animais, o teste escolhido foi a ANOVA de medidas repetidas. Foi utilizado o ajuste de Bonferroni, quando apropriado.

Os dados obtidos na caixa de atividade foram separados em duas categorias: valores obtidos nos 5 primeiros minutos (considerados como resposta à novidade) e valores obtidos em 10 minutos ou mais de experimentação (considerados como atividade locomotora *per se*). A primeira categoria foi comparada por ANOVA de uma via e a segunda por ANOVA de medidas repetidas (ambas seguidas do teste de Duncan, quando se fez necessária análise post-hoc).

As variáveis observadas no registro de sono foram analisadas por ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan, se necessária comparação *a posteriori*.

Já a análise estatística da esquiva discriminativa, foi realizada da seguinte maneira: o número total de entradas em todos os braços, porcentagem de tempo gasto no braço aversivo (tempo gasto no braço aversivo/ tempo gasto em ambos os braços fechados) e porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (tempo gasto nos braços abertos/tempo gasto em todos os braços) durante a duração

total de cada sessão foram calculadas e comparadas por ANOVA de uma via. O decréscimo na porcentagem de tempo gasto no braço aversivo durante a sessão de treino foi utilizado para avaliar a tarefa de aprendizado e foi analisado por ANOVA de medidas repetidas. A retenção foi avaliada pelos tempos gastos no braço aversivo *versus* não-aversivo (comparados por ANOVA de duas vias) e pela porcentacem de tempo gasto no braço aversivo na sessão de teste. O comportamento ansioso foi avaliado pela porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do aparato. Após todas as análises de variância utilizadas na esquiva discriminativa, foi realizado o teste de Duncan, quando necessário.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software STATISTICA 6.0. Os dados estão todos representados como média ± erro padrão. O nível de significância foi fixado em $p<0,05$.

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Avaliação da massa corpórea dos animais

A massa corporal dos animais foi avaliada por 12 semanas após o desmame. É possível observar que a variação da massa corporal entre os grupos foi significativamente diferente (p<0,001 – Figura 6).

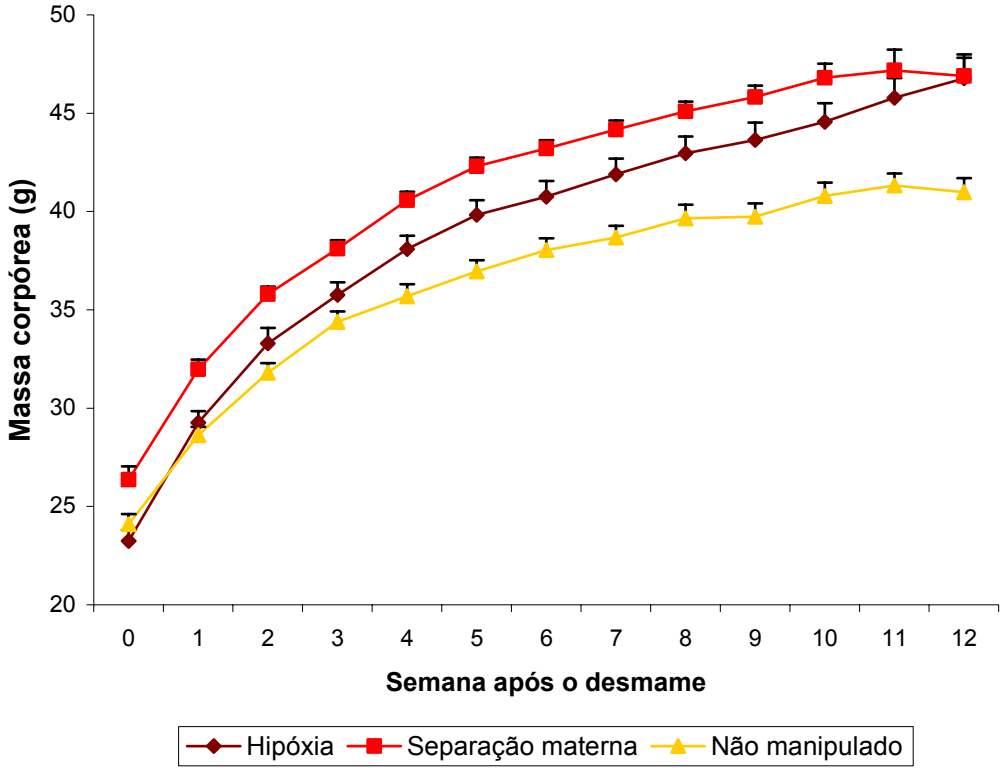

Figura 6. Evolução ponderal dos animais desde o desmame até o sacrifício (ANOVA de medidas repetidas – p<0,001)

Para a análise post-hoc, foram escolhidas três datas de pesagem (uma ao início, outra intermediária e mais uma ao fim) para comparação (Figura 7). Já é possível observar no ponto intermediário uma diferença significativa do grupo SM em relação ao NM (p=0,0057). No último ponto, há diferença dos grupos SM e H quando comparados ao NM (p=0,0027 e p=0,018, respectivamente).

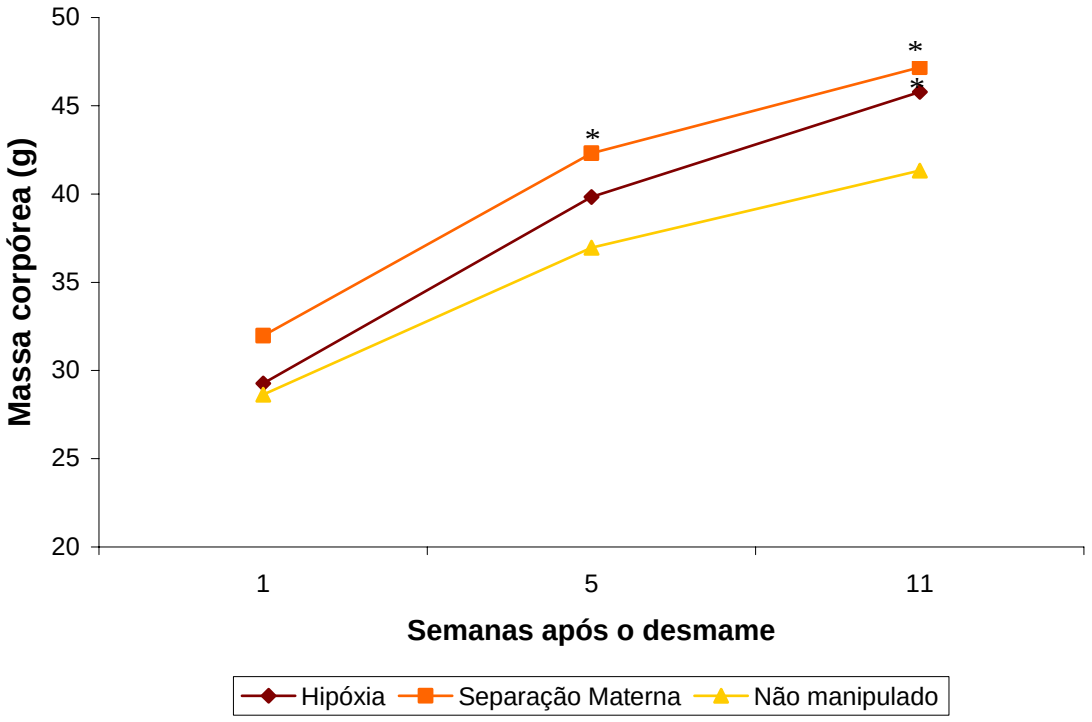

Figura 7. Evolução ponderal dos animais em três datas após o desmame (ajuste de Bonferroni * p<0,05 comparado ao valor do grupo NM no mesmo ponto)

4.2 Avaliação comportamental

4.2.1 Esquiva discriminativa

Com a esquiva discriminativa, foi possível observar uma diferença significativa na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos nos grupos hipóxia e separação materna quando comparados ao não manipulado, na sessão de treino, mas não na sessão de teste (Figuras 6 e 7). Isso poderia indicar um aumento da ansiedade na vida adulta causado pela separação materna no período neonatal. Entretanto, a memória desses animais parece não ter se alterado, já que o tempo gasto no braço aversivo foi, em todos os grupos, significativamente menor do que o tempo gasto no braço não-aversivo, tanto na sessão de treino, quanto na de teste (Figuras 8 e 9). Além disso, o aprendizado durante a sessão de treino (dado pela curva de tempo gasto no braço aversivo minuto a minuto) não foi diferente entre os grupos (Figura 10). Tampouco foi detectável uma diferença na atividade motora por esse método, pois o total de entradas não diferiu entre os grupos em nenhuma das sessões (Figuras 8 e 9)

O tamanho amostral nesse experimento foi de 12 animais por grupo.

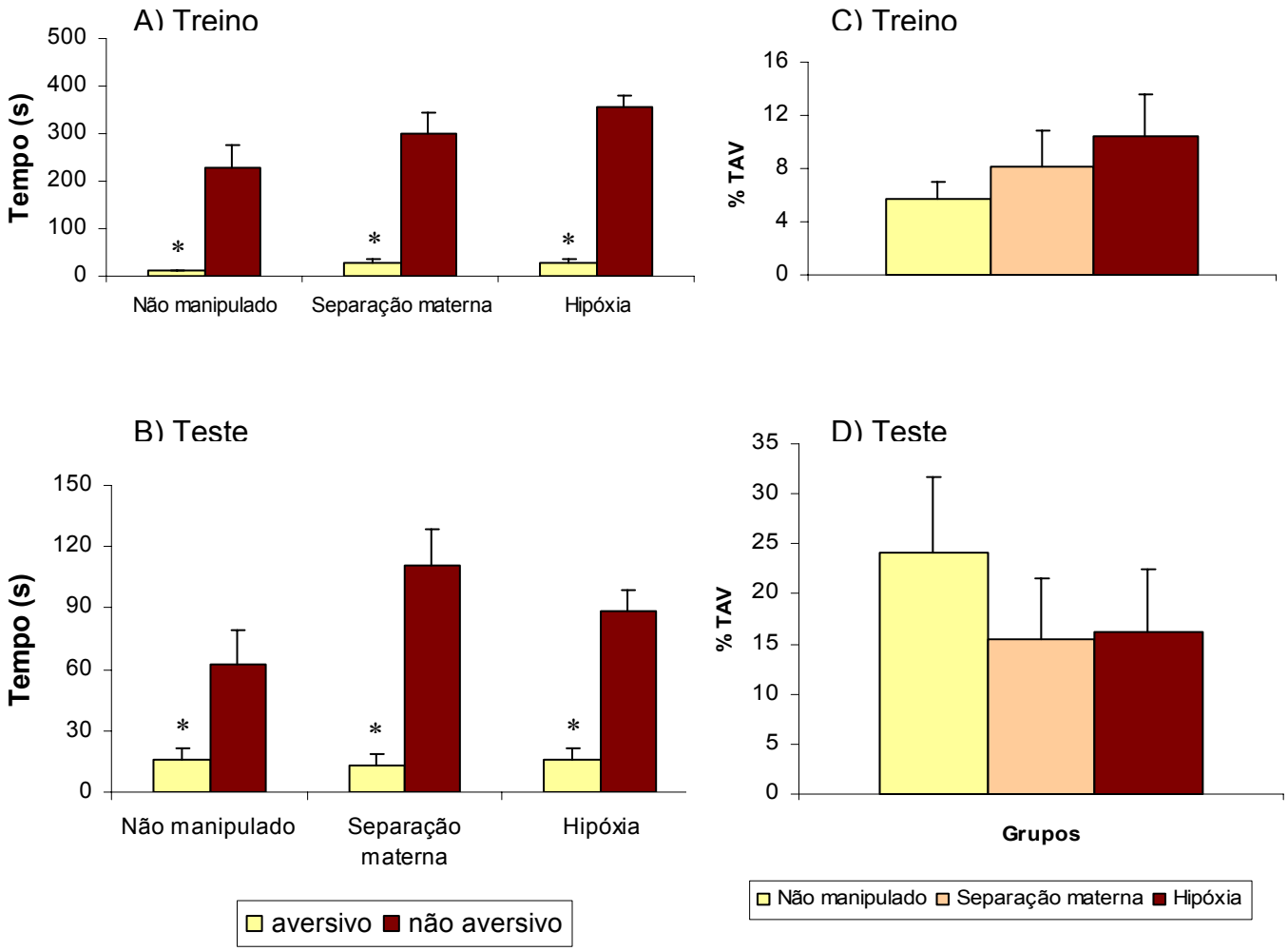

Figura 8. Efeitos da hipóxia e da separação materna sobre os animais testados na esquiva discriminativa. A, B - Tempo (s) gasto nos braços aversivo e não-aversivo. *p<0.05 comparado ao braço não-aversivo (ANOVA de 2 vias e teste de Duncan). C, D – Porcentagem de tempo gasto no braço aversivo (ANOVA de uma via e teste de Duncan). Valores expressos como média ± erro padrão.

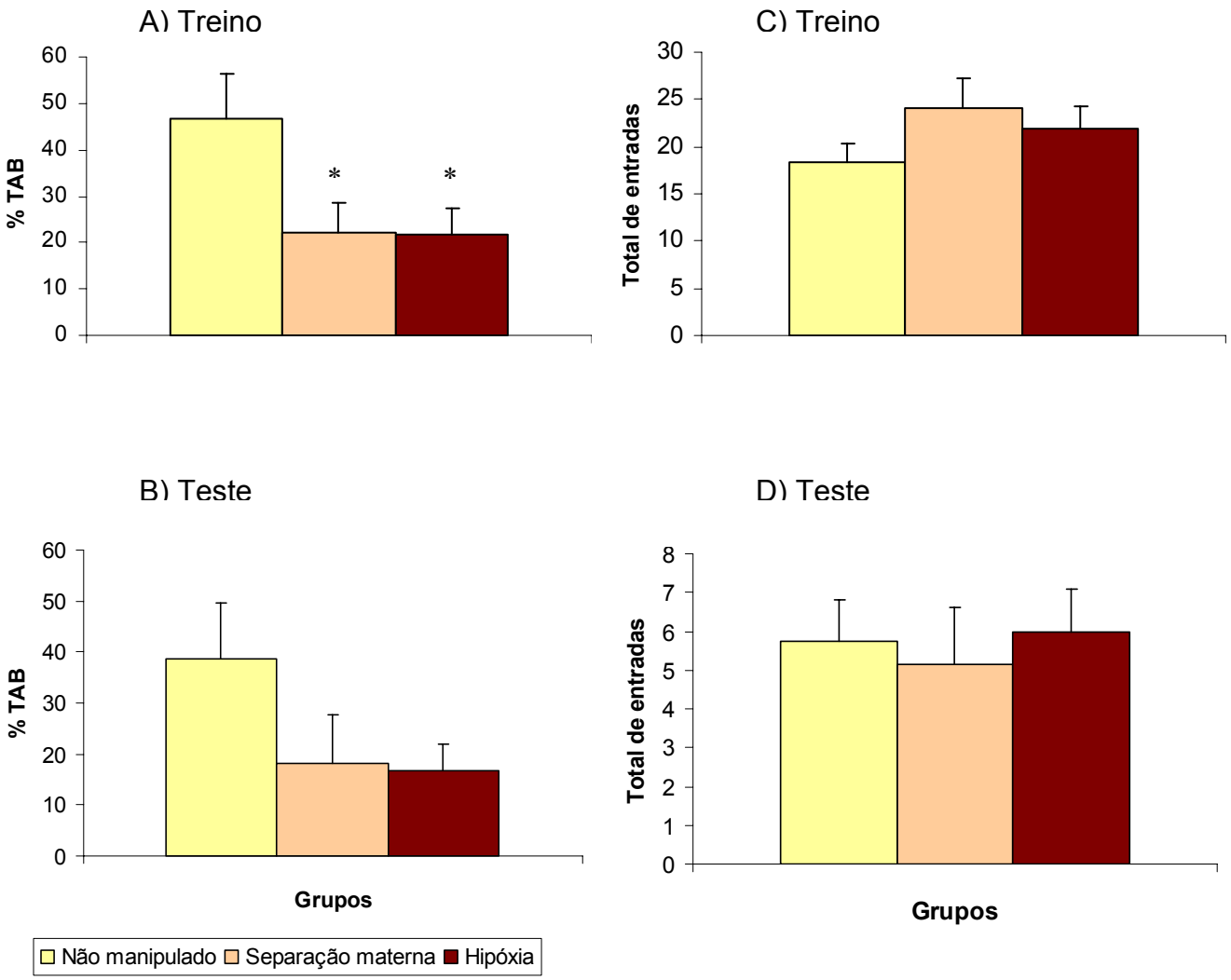

Figura 9. Efeitos da hipóxia e da separação materna sobre os animais testados na esquiva discriminativa. A, B Porcentagem de tempo nos braços abertos *p<0.05 comparado ao grupo NM (ANOVA de uma via e teste de Duncan). C, D Número total de entradas (ANOVA de uma via e teste de Duncan). Valores expressos como média ± erro padrão.

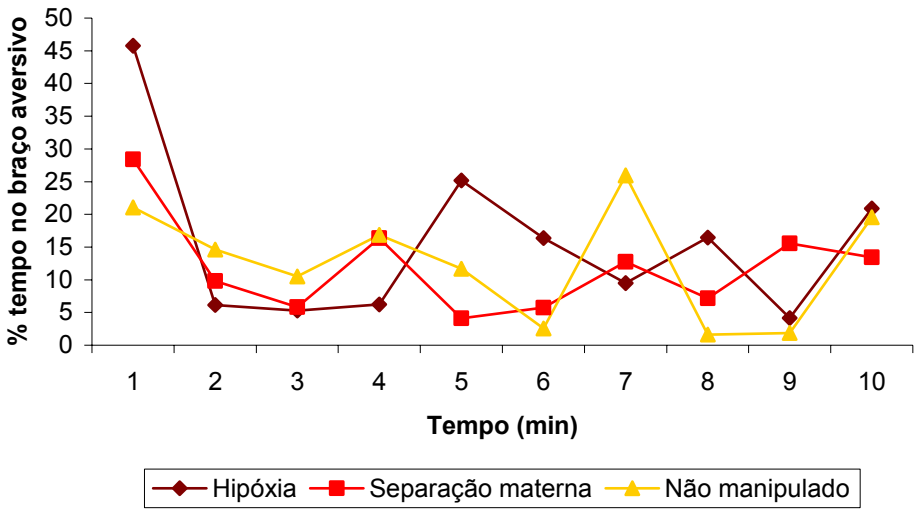

Figura 10. Evolução da porcentagem de tempo gasto no braço aversivo em cada minuto durante a sessão de treino (dados analisados por ANOVA de medidas repetidas).

4.2.2 Caixa de atividade locomotora

Os camundongos adultos expostos à hipóxia no período neonatal exibiram uma diminuição na atividade locomotora nos primeiros 5 minutos de avaliação nas caixas, quando comparados aos animais dos grupos SM e NM (respectivamente com p=0,042 e p=0,030, Tabela 2). Por outro lado, não foi observada nenhuma mudança entre os grupos nos minutos subseqüentes (Tabela 2).

O tamanho amostral nesse experimento foi de 12 animais por grupo.

	Não manipulado	Separação materna	Hipóxia
5'	1054,4 ± 90,1	1007,0 ± 73,9	760,7 ± 73,5 *
10'	900,8 ± 83,9	834,9 ± 44,0	715,4 ± 51,3
15'	848,2 ± 79,1	715,7 ± 46,8	713,5 ± 61,7
20'	797,1 ± 64,1	722,4 ± 52,5	645,1 ± 39,1
25'	673,3 ± 63,8	705,8 ± 64,1	671,7 ± 47,8
30'	678,3 ± 81,6	672,5 ± 51,4	575,2 ± 40,0

Tabela 2. Efeitos da hipóxia e da separação materna na atividade locomotora durante um teste de 30 minutos. Os dados estão apresentados como contagens de movimento. A linha hachurada representa os primeiros minutos que representam a reação ao novo ambiente. *p<0.05 comparado ao grupo NM (ANOVA de uma via e teste de Duncan). Valores expressos como média ± erro padrão.

4.2.3 Registro de sono

Quanto aos dados obtidos por meio do registro de sono, todas as variáveis foram analisadas no total (soma de todas as fases) e separadamente na fase clara e fase escura. Assim, foi possível observar que houve uma diminuição do tempo médio da duração de episódios de sono dessincronizado durante a fase escura no grupo H, quando comparado aos grupos SM e NM (p=0,033 e p=0,028 respectivamente – Tabela 3). Em todos os outros dados, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabelas 3 e 4).

O tamanho amostral nesse experimento foi igual a 6 para os grupos NM e H e igual a 5 para o grupo SM.

	FASE ESCURA		
	Não manipulado	Separação Materna	Hipóxia
Tempo em vigília (%)	55,9 ± 2,8	57,5 ± 2,6	57,2 ± 2,7
Tempo em sono sincronizado (%)	37,9 ± 2,5	36,1 ± 2,2	37,7 ± 2,5
Tempo em sono dessincronizado (%)	9,8 ± 0,9	10,0 ± 1,0	8,2 ± 0,7
Duração dos episódios de sono dessincronizado	60,0 ± 2,6	60,7 ± 1,8	52,5 ± 2,3*
Número de transições de estágio do sono	611,3 ± 25,8	535,4 ± 45,4	606,5 ± 46,3
Número de despertares	570,2 ± 35,0	550,2 ± 55,1	644,0 ± 34,0

Tabela 3. Média dos parâmetros de sono obtidos na polissonografia dos camundongos durante a fase escura. Valores expressos como média ± erro padrão. * p<0,05 em comparação aos grupos SM e NM (ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan).

	FASE CLARA		
	Não manipulado	Separação Materna	Hipóxia
Tempo em vigília (%)	44,6 ± 2,8	46,7 ± 2,3	47,6 ± 1,2
Tempo em sono sincronizado (%)	48,5 ± 2,6	46,4 ± 2,0	44,7 ± 2,9
Tempo em sono dessincronizado (%)	11,2 ± 1,2	11,2 ± 0,5	10,0 ± 0,7
Duração dos episódios de sono dessincronizado	63,8 ± 5,3	53,8 ± 4,2	51,9 ± 3,5
Número de transições de estágio do sono	867,5 ± 73,6	916,4 ± 102,9	848,0 ± 61,4
Número de despertares	380,3 ± 32,2	398,6 ± 50,9	361,3 ± 27,9

Tabela 4. Média dos parâmetros de sono obtidos na polissonografia dos camundongos durante a fase clara (comparação por ANOVA de uma via). Valores expressos como média ± erro padrão.

4.3 Análise bioquímica

4.3.1 Atividade das enzimas antioxidantes eritrocitárias

Os resultados referentes ao estresse oxidativo nos eritrócitos demonstram não haver diferença significativa na atividade de SOD (Figura 11; p= 0,59), uma diminuição significativa da enzima GPx em relação ao grupo NM (Figura 12;

p=0,018) e uma tendência da diminuição da CAT no grupo H, também em comparação ao grupo NM (Figura 13; p=0,064). O grupo SM, por sua vez, possui valores muito mais próximos ao grupo NM do que ao H.

O tamanho amostral para a dosagem de SOD e GPx foi > 15 em cada grupo. Já para a dosagem de CAT utilizou-se um número de animais > 12 por grupo.

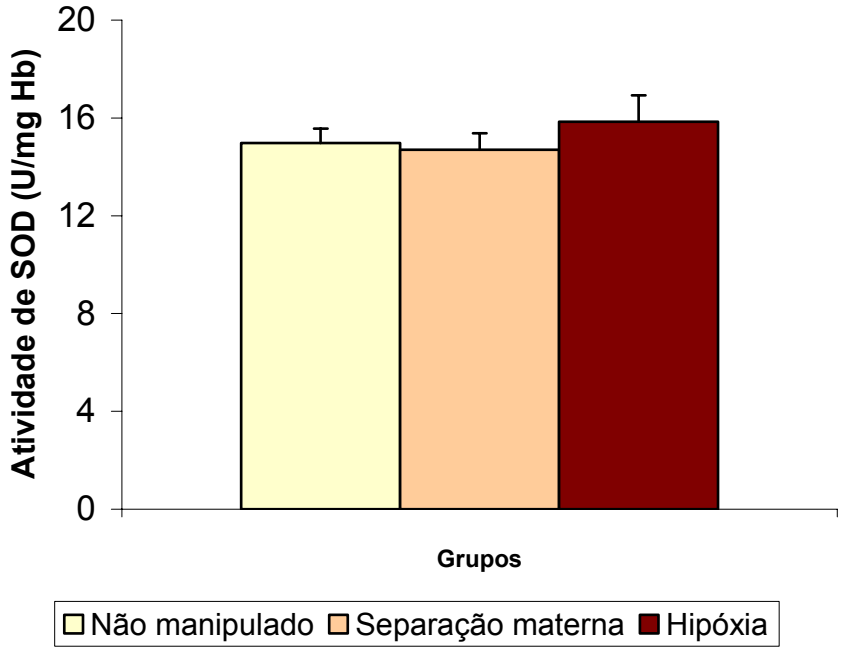

Figura 11. Atividade de SOD eritrocitária dos animais na vida adulta. Valores expressos como média + erro padrão.

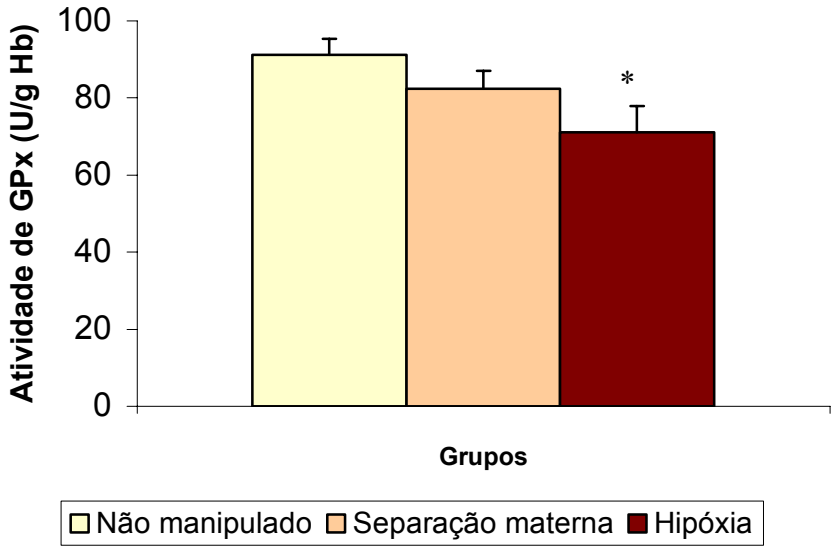

Figura 12. Atividade de GPx eritrocitária dos animais na vida adulta. Valores expressos como média + erro padrão. * Diferente do grupo NM (p=0,018).

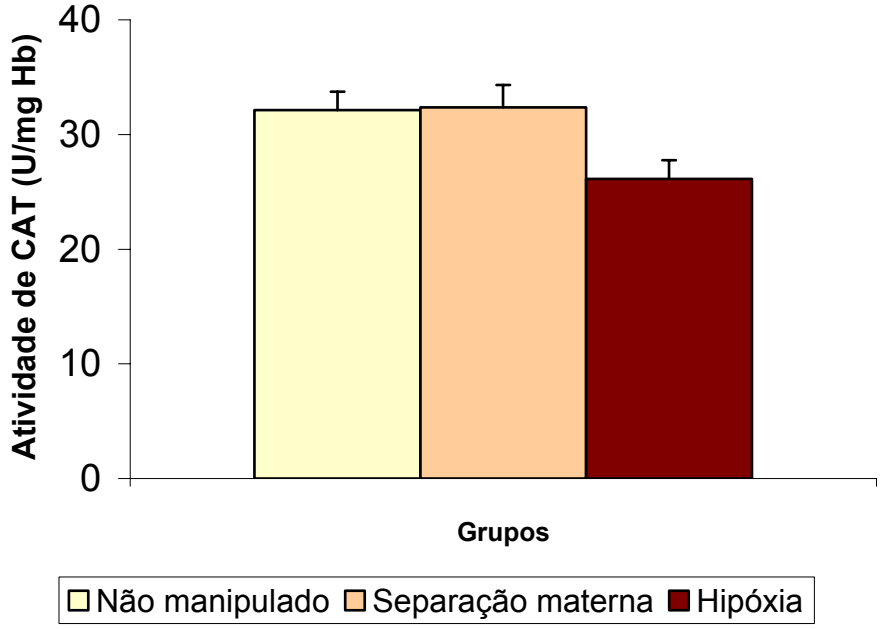

Figura 13. Atividade de CAT eritrocitária dos animais na vida adulta. Valores expressos como média + erro padrão.

4.3.2 Atividade de CAT cerebral

Não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos quanto à atividade de CAT nos hipocampos (p=0,54, Figura 14) e estriados (p=0,33, Figura 15).

O tamanho amostral usado na dosagem de CAT nos hipocampos foi o seguinte: grupo NM=12, SM=7 e H=7 e nos estriados: grupo NM=12, SM=6 e H=6.

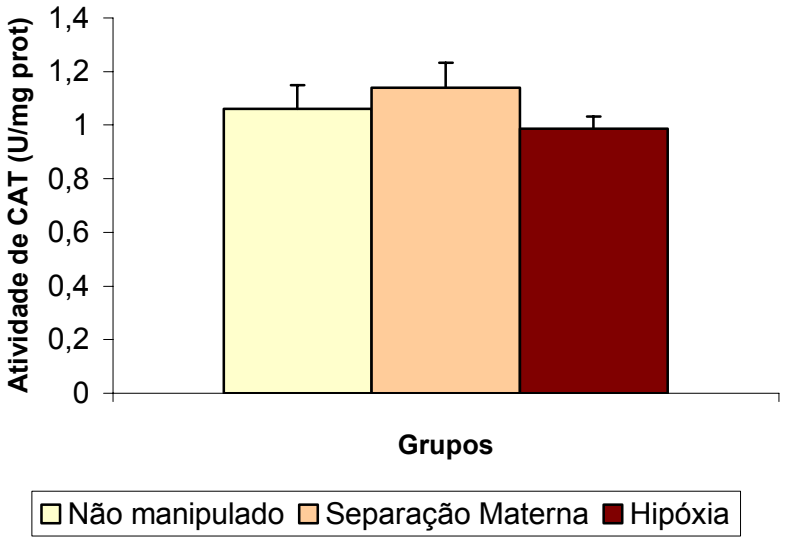

Figura 14. Atividade de CAT nos hipocampos dos animais na vida adulta. Valores expressos como média + erro padrão.

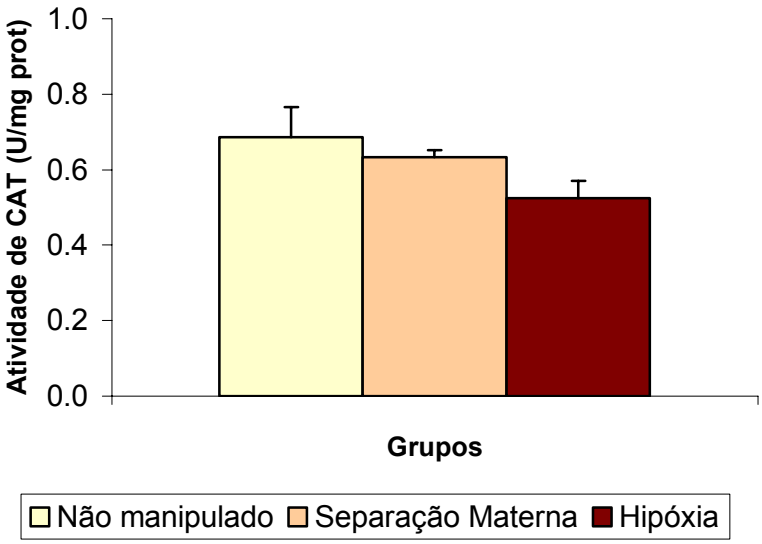

Figura 15. Atividade de CAT nos estriados dos animais na vida adulta. Valores expressos como média + erro padrão.

4.3.3 Dosagem de GSHt eritrocitária

Quanto aos resultados referentes à análise do antioxidante não-enzimático GSHt, observa-se uma diminuição significativa dos valores no grupo SM quando comparados aos dados do grupo NM (Figura 16, p=0,02), tendo o grupo H um valor intermediário.

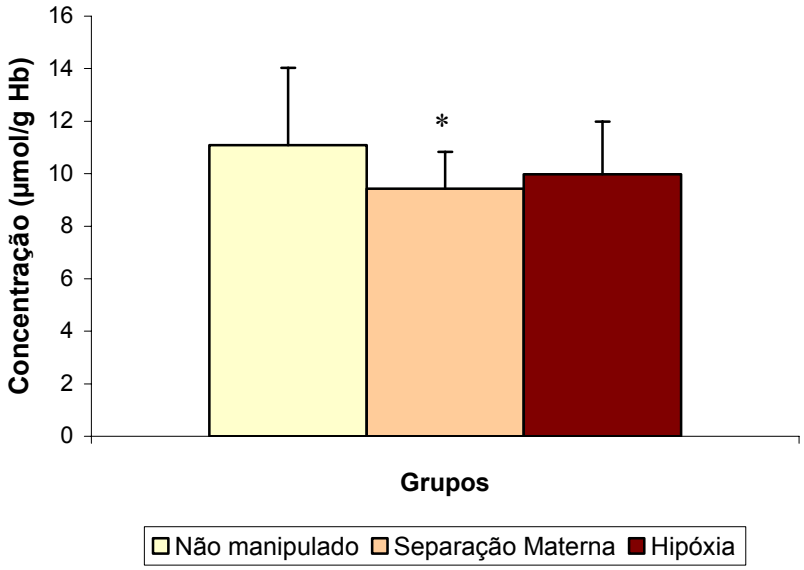

Figura 16. Concentração plasmática de GSHt eritrocitária dos animais na vida adulta. Valores expressos como média + erro padrão. * p<0,05 comparado ao grupo NM (ANOVA de uma via e ajuste de Bonferroni).

4.3.4 Dosagens de Hcy, Cys e vitamina B6

Os três grupos não diferiram significativamente nos três parâmetros avaliados envolvidos no metabolismo da Hcy. Não foram observadas mudanças nas concentrações de Hcy (p=0,13, Figura 17), Cys (p=0,20, Figura 18) ou de vitamina B-6 (p=0,24, Figura 19).

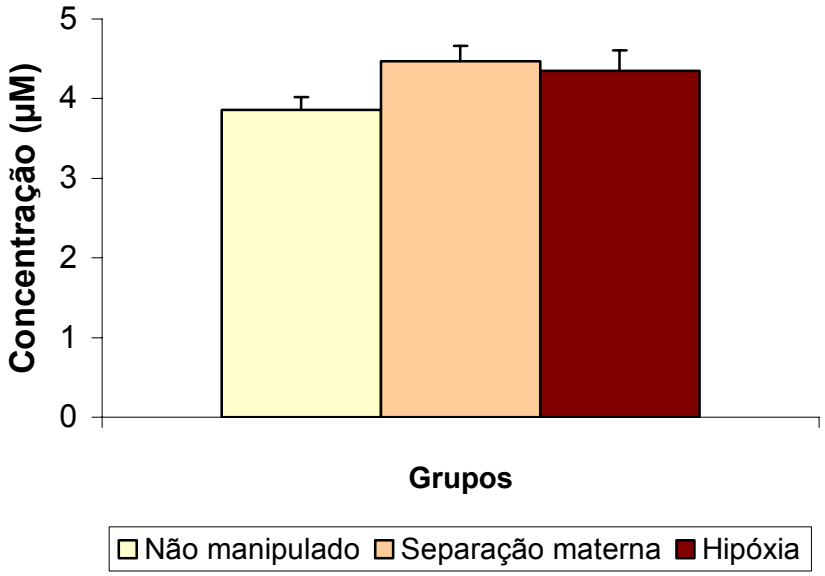

Figura 17. Concentração plasmática de Hcy dos animais na vida adulta. Valores expressos como média + erro padrão.

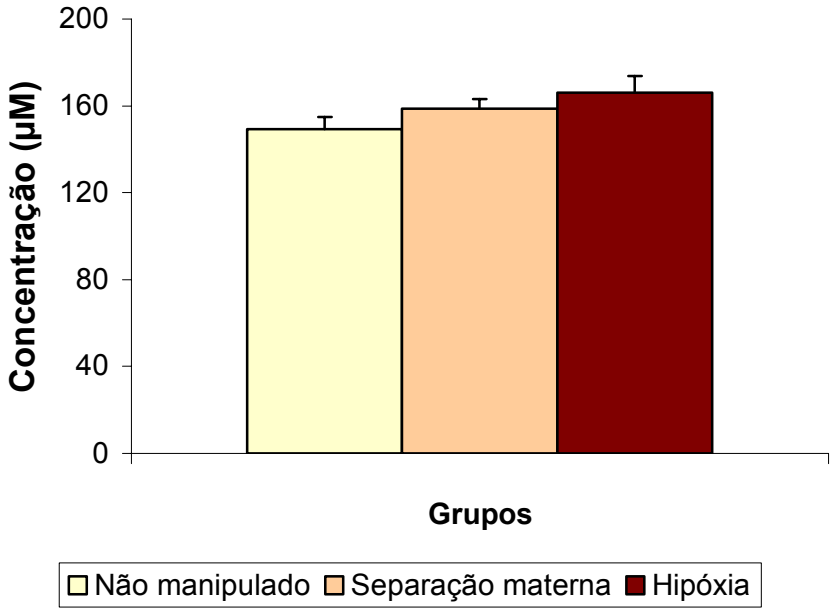

Figura 18. Concentração plasmática de Cys dos animais na vida adulta. Valores expressos como média + erro padrão.

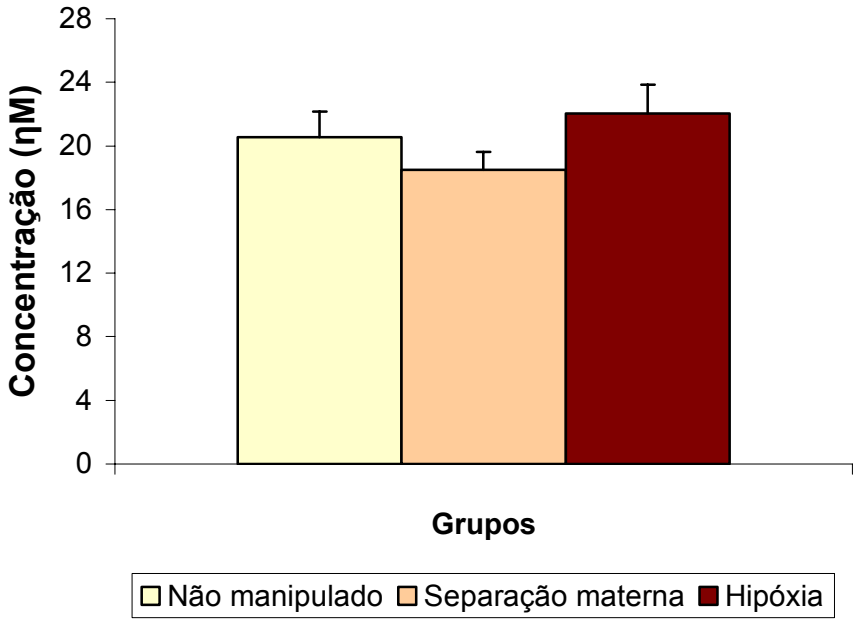

Figura 19. Concentração sérica de vitamina B6 dos animais na vida adulta. Valores expressos como média + erro padrão.

4.4 Análise molecular

Em relação aos dados obtidos na análise molecular dos hipocampos, não foram observadas diferenças significativas na expressão relativa de CAT (p=0,45) ou de GPx (p=0,39) entre os três grupos (Figura 20).

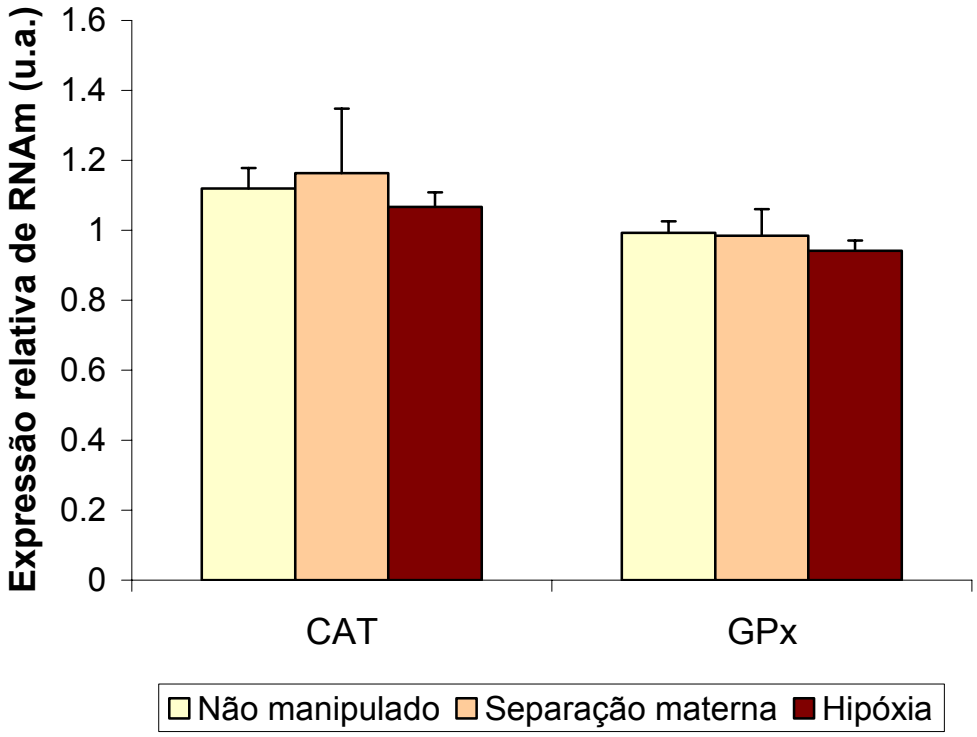

Figura 20. Expressão relativa de CAT e GPx nos hipocampos dos animais na vida adulta. Valores expressos como média + erro padrão. Abreviação: u.a. (unidade arbitrária)

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

No presente trabalho, nós analisamos os efeitos em longo prazo da hipóxia neonatal em parâmetros bioquímicos, moleculares e comportamentais de camundongos machos. Nosso escopo era o de explorar as possíveis conseqüências deletérias duradouras dessa manipulação e verificar se esta foi capaz de causar deficiências na vida adulta dos animais.

5.1 Avaliação da massa corpórea

No que diz respeito à massa corpórea, os grupos de animais possuem valores em média relativamente parecidos logo após o desmame. Porém, com o passar do tempo (a partir de 5 semanas após o desmame), o grupo SM apresentou um aumento de peso maior, que parece ser alcançado pelo grupo H com a chegada da vida adulta (11 semanas após o desmame).

Já foi proposto que a separação materna em camundongos fosse capaz de gerar um aumento da massa corpórea em longo prazo. Esse fenômeno já foi constatado anteriormente por outros autores. Recentemente, Slotten e colegas (Slotten et al., 2006) demonstraram que ratas Long-Evans que passaram por separação materna no período neonatal apresentavam um aumento de peso em relação àquelas que não foram manipuladas. A separação materna nesse trabalho foi feita do PND 3 ao 15, durante 3 horas por dia e os animais foram pesados nos PND 15, 22, 30, 60 e 90. Os autores já observaram uma diferença entre os grupos a partir do PND 30. A mesma avaliação foi feita com os machos nesse trabalho, porém não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre o grupo separação materna e o controle nesse gênero. Em outro estudo (Loizzo et

al., 2006) constatou-se que manipulações durante o período neonatal podem levar ao sobrepeso de camundongos da linhagem CD-1 na vida adulta. Nesse caso, os autores compararam dois grupos: um não era manipulado durante o período neonatal (controle) e o outro foi separado diariamente das respectivas mães durante 10 minutos por dia e neste intervalo de tempo também era injetado subcutaneamente 1mL/kg de salina estéril no dorso de cada filhote manipulado. Esses autores observaram a massa corpórea dos animais nos dias 25, 60, 95, 120 e 135 e verificaram que os camundongos manipulados passaram a apresentar um sobrepeso em relação ao grupo controle desde o PND 60 até o final da observação (PND 135).

Entretanto, tais constatações são ainda controversas. Já foi descrita uma perda de peso causada pela separação materna (McIntosh et al., 1999). Nesse caso, ratos Sprague-Dawley foram distribuídos em três grupos que foram por eles denominados da seguinte maneira: grupo manipulado (em que os animais eram diariamente afagados por 15s, em seguida permaneciam por 15min separados de suas mães e novamente afagados por 15s para então retornarem às mães desde o PND 2 até o PND 21), separação materna (em que os filhotes eram separados de suas mães durante 3 horas por dia durante o mesmo período) e não manipulado. Os filhotes dos dois primeiros grupos foram pesados diariamente durante o período de manipulação neonatal e verificou-se que a partir do PND 9 (para as fêmeas) e do PND 11 (para os machos) os animais do grupo separação materna apresentaram uma diminuição significativa do ganho de peso quando comparados ao grupo manipulado. Os ratos dos três grupos foram pesados após o desmame nos PND 22, 29, 40, 50 e 62 e observou-se uma diminuição no ganho

de peso no grupo separação materna em comparação aos outros dois grupos até o PND 40 e em comparação apenas ao grupo manipulado até PND 62. Além disso, uma revisão da literatura sobre nutrição durante a infância e adiposidade na vida adulta, que coletou especialmente estudos feitos em humanos, considerou que a condição metabólica até a infância pode interferir na adiposidade na vida adulta (Martorell et al., 2001).

O efeito encontrado em nosso estudo poderia ser gerado pela restrição calórica decorrente da separação da mãe na vida neonatal, já que eles ficam sem acesso ao leite durante o período de experimentação e/ou pelo estresse gerado pelo afastamento materno. Pode ser que a separação materna tenha gerado uma nutrição inadequada no período neonatal nos animais a ela submetidos.

Além disso, já foi bem descrita a perda de peso e de crescimento gerada pela hipóxia neonatal (Elia et al., 1985; Fan et al., 2005; Gloster et al., 1974; Lee et al., 2003; Singh et al., 1996). O mecanismo pelo qual esse efeito ocorre ainda não foi plenamente estabelecido, porém ele já foi atribuído a uma diminuição da ingestão de alimento e a uma diminuição do hormônio do crescimento (GH – *growth hormone*) e do IGF-1 (*insulin-like growth factor*) (Gloster et al., 1974; Moromisato et al., 1999; Singh et al., 1996; Zhang et al., 1997; Zhang e Du, 2000). Nesse sentido, já foi realizado um estudo (Raff et al., 2001) em que ninhadas de ratos Sprague-Dawley foram mantidas com suas mães durante seus 14 primeiros dias de vida dentro de uma câmara em normóxia (21% de O_2) ou de uma câmara em hipóxia (12% de O_2). Ambas as câmaras foram abertas diariamente desde o PND 1 para a administração de GH ou somente com o veículo (0,01M de bicarbonato de sódio). A diminuição do ganho de peso pela hipóxia foi

encontrada, como era esperado. Entretanto, os filhotes aos quais foi administrado GH apresentaram uma diminuição do ganho de peso e da porcentagem de gordura corporal, quando comparados àqueles aos quais foi administrado veículo em ambos os grupos. Este dado é um pouco controverso, pois outros autores encontraram uma pequena melhora no ganho de peso com tal administração (Moromisato et al., 1999). Nesse trabalho, os autores submeteram ratos Sprague-Dawley de 1 dia de vida a 18 dias consecutivos de hipóxia, mantendo-os em uma câmara a 12% de O_2, sendo que diariamente, era administrado GH à metade de cada ninnhada (dose muito semelhante à utilizada por Raff e colaboradores). Assim, eles observaram uma melhora no ganho de peso dos animais que haviam sido submetidos à hipóxia com a administração de GH.

De qualquer forma, o que aparentemente acontece em nosso modelo é que o efeito orexígeno da separação materna em longo prazo acaba por vencer o efeito de perda de massa que ocorre devido à hipóxia. Isso porque nosso grupo hipóxia inicialmente não difere do grupo não manipulado, porém com a chegada da vida adulta passa a alcançar os valores atingidos pelo grupo separação materna e diferir significativamente do grupo não manipulado.

5.2 Análise comportamental

No que diz respeito aos resultados da esquiva discriminativa, parte de nossos dados está de acordo com a literatura, já que os camundongos dos grupos SM e H demonstraram um comportamento ansioso (diminuição no tempo gasto nos braços abertos na sessão de treino). A separação materna já foi descrita como causadora de comportamento ansioso na prole após alcançarem a

vida adulta tanto em ratos (Kalinichev et al., 2002) como em camundongos (Romeo et al., 2003; Veenema et al., 2007), apesar de alguns autores terem encontrado o contrário (Moles et al., 2004) ou nenhuma diferença (Slotten et al., 2006). Porém, em nosso modelo a hipóxia não foi capaz de minimizar ou exacerbar esse efeito, uma vez que não observamos nenhuma diferença entre os grupos SM e H. De qualquer forma, nós também não encontramos nenhuma diferença nos resultados que refletem o desempenho dos animais referentes a memória e aprendizagem, como outros autores já reportaram previamente (Arteni et al., 2003; Decker et al., 2003; Fan et al., 2005; Mikati et al., 2005). Diferenças nesses parâmetros, além de já terem sido observadas em diversos protocolos de hipóxia, também seriam esperadas em um modelo animal de esquizofrenia (Powell e Miyakawa, 2006). Isso pode ter ocorrido devido ao nosso protocolo de hipóxia - o qual pode não ter sido suficientemente danoso para gerar um prejuízo de memória - ou às limitações do teste comportamental escolhido (esquiva discriminativa).

Outra constatação intrigante foi que nossos dados indicam que a hipóxia causa neofobia. Os animais do grupo H apresentaram uma atividade locomotora reduzida nos primeiros 5 minutos nas caixas de atividade. Esse resultado sugere que os animais submetidos à hipóxia apresentam diferentes reações à novidade quando comparados ao grupo NM. Dois estudos já tinham descrito efeitos similares. Em um deles (de Vos-Korthals e van Hof, 1984) os autores constataram que a hipóxia hipobárica pode exacerbar a neofobia por gosto em ratos. Enquanto que em outro trabalho (Laviola et al., 2004), foi relatado que a hipóxia neonatal diminuiu a exploração de ambientes novos por ratos adolescentes. Assim sendo,

os autores propuseram que, por essa neofobia acontecer naturalmente na adolescência de roedores a hipóxia neonatal pudesse exercer um efeito exacerbatório sobre esse comportamento e ainda indicaram que a neofobia é um sintoma comum na esquizofrenia. Isso é um pouco controverso, uma vez que uma revisão recente da literatura sobre modelos animais de esquizofrenia apontou para uma hiperatividade diante de novos ambientes nesses animais (Powell e Miyakawa, 2006). Nós avaliamos camundongos na fase adulta e constatamos o mesmo fenômeno observado por Laviola e colaboradores (Laviola et al., 2004) em ratos adolescentes.

Uma hipótese possível para explicar tal achado é que a hipóxia poderia levar a algum grau de dano cerebral capaz de interferir nas preferências neóticas dos camundongos. Há muitas estruturas que poderiam ser afetadas para gerar esse efeito. Um bom candidato é o hipocampo, uma vez que ele é conhecido como uma das regiões cerebrais mais suscetíveis à hipóxia. Estudos anteriores já demonstraram que lesões no hipocampo reduzem a responsividade à novidade (Hughes, 2007). Porém, não foi nosso objetivo investigar a morfologia das lesões cerebrais e, por isso, mais estudos são necessários para se entender melhor os mecanismos neurobiológicos envolvidos no fenômeno observado.

Por outro lado, nós não encontramos nenhuma diferença significativa na atividade locomotora após a habituação dos camundongos nas caixas (de 10 a 30 minutos de experimentação), apesar de muitos autores já terem descrito um aumento nessa variável em ratos que foram submetidos a protocolos de hipóxia (Decker et al., 2003; Fan et al., 2005; Mikati et al., 2005; Tejkalova et al., 2006). Além disso, a hiperatividade é condizente com um modelo animal de

esquizofrenia, e é um dos traços comportamentais característicos detectados em um paradigma como esse (Powell e Miyakawa, 2006), que muitas vezes é estudado com a administração de anfetamina. A razão para não termos encontrado tal efeito é incerta, porém propomos que talvez 30 minutos não tenham sido suficientes para permitir a observação de tal diferença no nosso protocolo, uma vez que Decker e colegas (Decker et al., 2003) registraram a atividade locomotora dos animais durante um período de 48 horas e observaram que a hipóxia neonatal era capaz de produzir uma hiperatividade em ratos em longo prazo. Nesse estudo, os autores submeteram os animais à hipóxia intermitente - na qual a cada minuto, durante 20 segundos as câmaras permaneciam a 10% de O_2 e durante os 40 restantes permaneciam a 21% de O_2 - enquanto que, no nosso protocolo, os animais foram submetidos à hipóxia contínua e, por isso, as câmaras ficaram sempre a 10% de O_2.

Já no registro de sono, o único dado significativo que obtivemos foi a diminuição da duração dos episódios de sono dessincronizado na fase escura dos animais submetidos à hipóxia quando comparados aos outros dois grupos. Tal achado difere do encontrado por Decker e colegas (Decker et al., 2003), e está mais condizente com os resultados de Antier e colaboradores (Antier et al., 1998) que encontraram uma diminuição muito grande da porcentagem desse tipo de sono nas duas fases do sono separadamente e no tempo total de sono em ratos submetidos à hipóxia neonatal. Os autores propuseram que tal diminuição do sono dessincronizado se devesse a alguma disfunção nos substratos neuroanatômicos que geram o ritmo *theta* ou que produzem as ondas *theta*, pois reduções nos episódios de sono dessincronizado estão associadas a um ritmo

theta modificado. Entretanto, muitos dos efeitos observados por esses autores em ratos não foram confirmados por nós ao utilizarmos camundongos. No que diz respeito à similaridade com os sintomas da esquizofrenia, já é bem difundido que pacientes esquizofrênicos sofrem uma redução na qualidade do sono. No entanto, a maioria dos autores constata uma diminuição na porcentagem de sono de ondas lentas nesses pacientes (Monti e Monti, 2004).

De qualquer maneira, o dado encontrado é muito significativo, uma vez que o sono dessincronizado corresponde ao mais restaurador entre as fases do sono e uma diminuição de sua duração poderia significar uma queda da qualidade do sono nos animais submetidos à hipóxia.

5.3 Análise bioquímica e molecular

5.3.1 Parâmetros relacionados ao estresse oxidativo

A hipóxia neonatal também alterou em longo prazo parâmetros relacionados à defesa antioxidante dos animais. Diferenças em curto prazo em marcadores de estresse oxidativo causadas pela hipóxia neonatal já haviam sido descritas (Gulcan et al., 2005; Lafemina et al., 2006; Nakanishi et al., 1995; Rauchova et al., 2005; Singh et al., 1999). Alguns desses autores encontraram um aumento nas atividades de CAT e de SOD, porém não constataram mudanças na de GPx em humanos que desenvolveram encefalopatia hipóxico-isquêmica (Singh et al., 1999). Além disso, sabe-se que os níveis de GPx são baixos na fase neonatal e aumentam aos poucos até atingir seus níveis máximos na vida adulta (Aspberg e Tottmar, 1992). Sheldon e colaboradores (Sheldon et al., 2004) investigaram os níveis de GPx em camundongos submetidos à hipóxia pelo

método de Rice e colaboradores (Rice et al., 1981). Em uma avaliação em curto prazo, eles constataram que no córtex cerebral de camundongos selvagens (não modificados geneticamente) da linhagem CD1 não havia mudanças na atividade de GPx após hipóxia ou hipóxia-isquemia. Entretanto, foi observado um aumento da atividade dessa enzima no mesmo tecido de camundongos hSOD-Tg (transgênicos com inserção do gene humano de SOD) em ambas as condições e um incremento dos níveis de GPx nos animais hGPx-Tg (transgênicos com inserção do gene humano de GPx) somente após hipóxia-isquemia. Esses dados poderiam indicar que o cérebro de um neonato saudável já está naturalmente desprotegido contra o dano gerado pela hipóxia. Tal necessidade de proteção antioxidante poderia ser compensada por uma superexpressão gênica após o insulto, o que não seria possível nos animais selvagens. Consequentemente, os camundongos selvagens estariam mais suscetíveis ao dano oxidativo, o que poderia levar a uma reprogramação em longo prazo na produção e/ou ativação da GPx eritrocitária.

Outro tipo de manipulação neonatal (Nasuti et al., 2007) foi relatada como geradora de um efeito duradouro similar na atividade antioxidante enzimática no plasma. Foi observado que a ingestão neonatal de inseticidas piretróides causaram uma diminuição em longo prazo da atividade de GPx plasmática em ratos.

Além disso, alguns pesquisadores já encontraram diferenças nos níveis de GPx entre pacientes esquizofrênicos e indivíduos saudáveis. Já foi descrita (Buckman et al., 1987) uma forte correlação negativa entre os níveis de GPx em plaquetas e eritrócitos e medidas de tomografia computadorizada de atrofia

cerebral e das razões de ventrículos cerebrais nos pacientes esquizofrênicos. Tal correlação não foi observada nos indivíduos saudáveis.

Também foi observada uma diminuição nas atividades de SOD e de GPx plasmáticas e um aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em pacientes esquizofrênicos quando comparados a pessoas saudáveis (Zhang et al., 2006). E em outro estudo *postmortem* (Yao et al., 2006), constatou-se uma diminuição de GPx, de glutationa redutase, de glutationa e da razão glutationa reduzida/glutationa oxidada na região do núcleo caudado de pacientes esquizofrênicos, quando comparados ao grupo controle. Tais dados indicariam que o nosso modelo de hipóxia neonatal produziu uma resposta semelhante em sua defesa antioxidante àquela constatada em pacientes esquizofrênicos.

No que diz respeito às duas outras enzimas (SOD e CAT), não encontramos diferenças significativas. Contudo, foi possível observar uma tendência de diminuição da CAT ($p=0,064$) nos eritrócitos, que não foi extensiva aos hipocampos e estriados.

Além disso, nós constatamos uma redução da GSHt no grupo SM. Em um estudo prévio (Weaver et al., 2004), observou-se um aumento nos comportamentos maternos característicos de lamber e cuidar dos filhotes (*licking, grooming and arched-back nursing*, LG-ABN) em ratas capaz de modificar a programação epigenética na região promotora do gene do receptor de glicocorticóide nos hipocampos de seus filhotes. As proles de ratas que apresentavam aumento de tais comportamentos apresentavam diferenças na metilação de DNA, alterações nos padrões de acetilação de histonas e em fatores de transcrição ligados à região promotora daquele gene nos hipocampos. Os

autores também demonstraram que estes efeitos poderiam durar até a vida adulta e posteriormente demonstraram que eles são reversíveis com a infusão de metionina, que é um doador de grupos metila (Weaver et al., 2005).

Esta é uma forte evidência de que o comportamento materno poderia interferir de maneira duradoura na epigenética dos filhotes e isso poderia estar ligado ao nosso achado em relação à glutationa. Inclusive, já foi demonstrado que os mesmos comportamentos (LG-ABN) que modificaram a epigenética dos filhotes nos trabalhos supracitados são diminuídos em mães que foram separadas de seus filhotes (Francis e Meaney, 1999).

5.3.3 Expressão de CAT e GPx no hipocampo

Em alguns estudos realizados anteriormente os autores objetivaram buscaram investigar parâmetros da defesa antioxidante e do dano oxidativo nos hipocampos de animais expostos à hipóxia. Maiti e colaboradores (Maiti et al., 2006) distribuíram ratos adultos *Sprague-Dawley* em três grupos: um grupo exposto por 3 dias à hipóxia hipobárica (por meio de câmaras, de maneira a simular uma altitude de 6100m acima do nível do mar), outro exposto à mesma condição por 7 dias e um terceiro que foi mantido em normóxia durante todo o experimento. Esses autores observaram que a hipóxia provocou uma diminuição nos parâmetros de defesa antioxidante (glutationa reduzida, GPx, glutationa redutase, SOD e a razão glutationa reduzida/oxidada) dosados e um aumento nos marcadores de dano oxidativo (peroxidação lipídica, produção de radicais livres, níveis de óxido nítrico e de lactato desidrogenase) no hipocampo, no córtex e no estriado desses ratos. Os autores também constataram que as mudanças tinham

maior magnitude no grupo exposto por 7 dias do que no grupo submetido por apenas 3 dias à hipóxia.

Outro trabalho do mesmo grupo também obteve resultados semelhantes (Hota et al., 2007). Nesse caso, a linhagem e a idade dos ratos era a mesma, porém a altitude simulada na câmara foi de 7600m, foi incluído um grupo experimental de 14 dias de exposição e as regiões cerebrais escolhidas para a dosagem foram o hipocampo, o córtex e o cerebelo. Os parâmetros analisados foram os mesmos, exceto pelos níveis de óxido nítrico e de lactato desidrogenase, os quais não foram verificados, porém foram incluídas as dosagens da atividade de glutamato desidrogenase e da expressão do transportador vesicular de glutamato. Os autores descreveram novamente o mesmo fenômeno: uma diminuição nos parâmetros de defesa antioxidante e um aumento nos indicadores de dano e também afirmaram ter encontrado uma situação de *status* oxidativo particularmente desfavorável no hipocampo, que se mostrou mais vulnerável à hipóxia.

Em relação a estudos dos efeitos da hipóxia no hipocampo de neonatos, também já foram verificadas mudanças causadas pela hipóxia em parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo de ratos (Dafre et al., 2003). Nesse estudo, foram utilizados ratos *Wistar* de 7 dias, que foram expostos à hipóxia-isquemia pelo método adaptado de Rice e colaboradores. Os animais foram sacrificados logo em seguida ou 2, 12, 24 horas ou 7 dias após o procedimento de hipóxia. Posteriormente, eles tiveram os hipocampos, estriados e córtex frontal dissecados para as dosagens de glutationa oxidada, glutationa total e de proteína tiol. Foi encontrada uma diminuição nos níveis de glutationa total no hipocampo causada

pela hipóxia que se estendeu até 24 horas após o procedimento. Também foi constatado um decréscimo dos níveis de proteína tiol que não foi recuperado 7 dias após a hipóxia.

Nossos dados, entretanto, indicam que as mudanças nos parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo podem não ser duradouras a ponto de serem detectáveis na vida adulta dos camundongos, uma vez que não observamos diferenças na expressão de CAT e de GPx. Nossos dados moleculares também estão de acordo com os dados obtidos em nossos ensaios bioquímicos, já que não havíamos encontrado diferenças na atividade de CAT hipocampal.

5.3.3 Fatores relacionados ao metabolismo da homocisteína

Já é difundido que problemas relacionados ao metabolismo da Hcy podem refletir em doenças nos fetos (Botto et al., 1999; Huhta e Hernandez-Robles, 2005; Martin et al., 2007). Entretanto, as concentrações plasmáticas de Hcy e de Cys não foram significativamente diferentes no grupo hipóxia. Esse achado é consistente com a literatura, uma vez que alguns autores (Blaise et al., 2005) relataram que níveis de Hcy não aumentaram significativamente com a hipóxia neonatal em ratos, apesar de a hipóxia ter exacerbado o aumento de Hcy causado por uma dieta deficiente de vitaminas.

Além disso, nós não encontramos nenhuma mudança significativa nos níveis de vitamina B-6 sérica. Já foi observado (Sridharan et al., 1991) que a hipóxia aguda pode levar à diminuição da disponibilidade de piridoxal fosfato, que é reversível por um prévio tratamento com piridoxina. Porém, essa não parece ser uma condição duradoura, já que nós não encontramos reduções na vitamina B-6

em nossos animais que passaram pelo procedimento de hipóxia quando avaliados na vida adulta.

Por fim, é útil de se lembrar que muitas das controvérsias observadas na literatura sobre eventos hipóxico-isquêmicos podem ser devidas à grande diversidade dos protocolos de indução de hipóxia disponíveis e também à população estudada. Alguns autores (Sheldon et al., 1998) já descreveram que linhagens de camundongos reagiram diferentemente ao mesmo protocolo de hipóxia-isquemia. Em determinadas linhagens o grau de dano cerebral e a mortalidade foram muito mais altas do que em outras. Esse é um tópico importante de se levar em consideração quando se comparam resultados obtidos em condições diferentes.

6. CONCLUSÕES

6. Conclusões

6.1 – A hipóxia neonatal e a separação materna se mostraram capazes de gerar mudanças duradouras em parâmetros da defesa antioxidante em nosso modelo.

6.2 – Em nosso protocolo, as manipulações realizadas não se mostraram aptas a modificar fatores relacionados ao metabolismo da homocisteína.

6.3 – O procedimento de hipóxia por nós realizado não foi capaz de alterar a expressão de CAT e de GPx nos hipocampos dos camundongos em longo prazo.

6.4 – A hipóxia neonatal pode causar em longo prazo alterações comportamentais nos camundongos, como neofobia, e diminuição da duração média dos episódios de sono dessincronizado na fase escura, enquanto que a separação materna é capaz de aumentar o comportamento ansioso dos animais.

6.5 – Tanto a hipóxia neonatal, quanto a separação materna foram capazes de exercer efeitos duradouros na massa corpórea de camundongos.

6.6 – O protocolo utilizado em nosso estudo não resultou em um modelo completo de esquizofrenia.

7. ANEXOS

7. Anexos
7.1 CEP UNIFESP

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 13 de abril de 2006.
CEP 0018/06

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) LETÍCIA DE CAMPOS BRANDÃO
Co-Investigadores: Vania D'Almeida, Sergio Tufik (orientador)
Disciplina/Departamento: Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: AFIP/FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Alterações bioquímicas, epigenéticas e comportamentais induzidas por hipóxia neonatal em roedores".**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: experimental - categoria C.
RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.
OBJETIVOS: Avaliar os efeitos da hipóxia neonatal em parâmetros de estresse oxidativo, marcadores da via metabólica da homocisteína, indicadores de metilação de DNA e as possíveis alterações comportamentais em animais adultos..
RESUMO: Estudo com 180 camundongos Swiss e 90 ratos Wistar. Eutanásia: decapitação. Os animais serão submetidos à hipóxia(10% de oxigênio) durante 6h por dia, dos dias 7 a 12 de vida. Um grupo controle será exposto a oxigênio 21% durante o mesmo intervalo de tempo. Os animais serão expostos ao gás sem a presença das mães. Um grupo controle não serão separados de suas mães. Aos 2 meses e meio de vida,os animais serão sacrificados e coletado sangue para dosagens bioquímicas, de vitamina B6 e folato, catalase e glutationa total e homocisteína. Será retirado o tecido cerebral (estriado e hipocampo) para análise da expressão de metiltransferase e atividade da enzima catalase. Os animais serão avaliados em relação ao comportamento locomotor e memória.
FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo fundamentado, visando avaliar alterações bioquímicas, epigenéticas e comportamentais induzidas por hipóxia neonatal em roedores..
MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos, com metodologia de domínio da equipe envolvida.
DETALHAMENTO FINANCEIRO: AFIP, CNPq e FAPESP - R$ 35 190,00.
CRONOGRAMA: 24 meses.
OBJETIVO ACADÊMICO: mestrado.
ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **8/4/2007** e **2/4/2008**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

Adamo AM, Llesuy SF, Pasquini JM, Boveris A. Brain chemiluminescence and oxidative stress in hyperthyroid rats. Biochem J 1989, 263(1): 273-7.

Antier D, Zhang BL, Mailliet F, Akoka S, Pourcelot L, Sannajust F. Effects of neonatal focal cerebral hypoxia-ischemia on sleep-waking pattern, ECoG power spectra and locomotor activity in the adult rat. Brain Res 1998, 807(1-2): 29-37.

Applebaum J, Shimon H, Sela BA, Belmaker RH, Levine J. Homocysteine levels in newly admitted schizophrenic patients. J Psychiatr Res 2004, 38(4): 413-6.

Arinami T, Yamada N, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H, Toru M. Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression. Am J Med Genet 1997, 74(5): 526-8.

Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. Brain Res 2003, 973(2): 171-8.

Aspberg A, Tottmar O. Development of antioxidant enzymes in rat brain and in reaggregation culture of fetal brain cells. Brain Res Dev Brain Res 1992, 66(1): 55-8.

Bagenholm R, Nilsson UA, Gotborg CW, Kjellmer I. Free radicals are formed in the brain of fetal sheep during reperfusion after cerebral ischemia. Pediatr Res 1998, 43(2): 271-5.

Banker BQ, Larroche JC. Periventricular leukomalacia of infancy. A form of neonatal anoxic encephalopathy. Arch Neurol 1962, 7: 386-410.

Barcroft J. Observations upon the effect of high altitude on the physiological processes of the human body, carried out in the Peruvian Andes. Transactions of the Royal Society of London 1923, 211: 351-480.

Benson KL. Sleep in schizophrenia: impairments, correlates, and treatment. Psychiatr Clin North Am 2006, 29(4): 1033-45.

Bergamasco B, Benna P, Ferrero P, Gavinelli R. Neonatal Hypoxia and Epileptic Risk - a Clinical Prospective-Study. Epilepsia 1984, 25(2): 131-6.

Berger R, Djuricic B, Jensen A, Hossmann KA, Paschen W. Ontogenetic differences in energy metabolism and inhibition of protein synthesis in hippocampal slices during in vitro ischemia and 24 h of recovery. Brain Res Dev Brain Res 1996, 91(2): 281-91.

Berger R, Jensen A, Krieglstein J, Steigelmann JP. Effects of acute asphyxia on brain energy metabolism in fetal guinea pigs near term. J Dev Physiol 1991, 16(1): 9-11.

Bjelke B, Andersson K, Ogren SO, Bolme P. Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. Brain Res 1991, 543(1): 1-9.

Blaise S, Alberto JM, Nedelec E, Ayav A, Pourie G, Bronowicki JP, et al. Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. Pediatr Res 2005, 57(6): 777-82.

Bodsch W, Takahashi K, Barbier A, Ophoff BG, Hossmann KA. Cerebral protein synthesis and ischemia. Prog Brain Res 1985, 63: 197-210.

Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. N Engl J Med 1999, 341(20): 1509-19.

Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. FEBS Lett 2007, 581(19): 3582-91.

Brann AW, Jr., Myers RE. Central nervous system findings in the newborn monkey following severe in utero partial asphyxia. Neurology 1975, 25(4): 327-38.

Brunel H, Girard N, Confort-Gouny S, Viola A, Chaumoitre K, D'Ercole C, et al. Fetal brain injury. J Neuroradiol 2004, 31(2): 123-37.

Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. Lancet 2005, 365(9465): 1147-52.

Buckman TD, Kling AS, Eiduson S, Sutphin MS, Steinberg A. Glutathione peroxidase and CT scan abnormalities in schizophrenia. Biol Psychiatry 1987, 22(11): 1349-56.

Burke G, Robinson K, Refsum H, Stuart B, Drumm J, Graham I. Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels. N Engl J Med 1992, 326(1): 69-70.

Buwalda B, Nyakas C, Vosselman HJ, Luiten PG. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. Behav Brain Res 1995, 67(1): 85-90.

Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. Am J Psychiatry 2002, 159(7): 1080-92.

Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. J Cereb Blood Flow Metab 2001, 21(1): 2-14.

Connett RJ, Honig CR, Gayeski TE, Brooks GA. Defining hypoxia: a systems view of VO2, glycolysis, energetics, and intracellular PO2. J Appl Physiol 1990, 68(3): 833-42.

Dafre AL, Arteni NS, Siqueira IR, Netto CA. Perturbations in the thiol homeostasis following neonatal cerebral hypoxia-ischemia in rats. Neurosci Lett 2003, 345(1): 65-8.

Dalman C, Allebeck P, Cullberg J, Grunewald C, Koster M. Obstetric complications and the risk of schizophrenia: a longitudinal study of a national birth cohort. Arch Gen Psychiatry 1999, 56(3): 234-40.

de Groot H, Littauer A. Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. Free Radic Biol Med 1989, 6(5): 541-51.

De Haan HH, Gunn AJ, Williams CE, Gluckman PD. Brief repeated umbilical cord occlusions cause sustained cytotoxic cerebral edema and focal infarcts in near-term fetal lambs. Pediatr Res 1997, 41(1): 96-104.

de Vos-Korthals WH, van Hof MW. The effect of hypobaric hypoxia on taste neophobia in rats. Behav Brain Res 1984, 14(2): 157-9.

Decker MJ, Hue GE, Caudle WM, Miller GW, Keating GL, Rye DB. Episodic neonatal hypoxia evokes executive dysfunction and regionally specific alterations in markers of dopamine signaling. Neuroscience 2003, 117(2): 417-25.

Dilenge ME, Majnemer A, Shevell MI. Long-term developmental outcome of asphyxiated term neonates. J Child Neurol 2001, 16(11): 781-92.

Eden GJ, Hanson MA. Effects of chronic hypoxia from birth on the ventilatory response to acute hypoxia in the newborn rat. J Physiol 1987, 392: 11-9.

El-Khodor B, Boksa P. Caesarean section birth produces long term changes in dopamine D1 receptors and in stress-induced regulation of D3 and D4 receptors in the rat brain. Neuropsychopharmacology 2001, 25(3): 423-39.

El-Khodor BF, Boksa P. Long-term reciprocal changes in dopamine levels in prefrontal cortex versus nucleus accumbens in rats born by Caesarean section compared to vaginal birth. Exp Neurol 1997, 145(1): 118-29.

Elia R, Elgoyhen AB, Bugallo G, Rio ME, Bozzini CE. Effect of acute exposure to reduced atmospheric pressures on body weight, food intake and body composition of growing rats. Acta Physiol Pharmacol Latinoam 1985, 35(3): 311-8.

Eskiocak S, Tutunculer F, Basaran UN, Taskiran A, Cakir E. The effect of melatonin on protein oxidation and nitric oxide in the brain tissue of hypoxic neonatal rats. Brain Dev 2007, 29(1): 19-24.

Fan LW, Lin S, Pang Y, Lei M, Zhang F, Rhodes PG, et al. Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. Behav Brain Res 2005, 165(1): 80-90.

Francis DD, Meaney MJ. Maternal care and the development of stress responses. Curr Opin Neurobiol 1999, 9(1): 128-34.

Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. Science 1954, 119(3097): 623-6.

Gloster J, Hasleton PS, Harris P, Heath D. Effects of chronic hypoxia and diet on the weight and lipid content of viscera in the guinea-pig. Environ Physiol Biochem 1974, 4(6): 251-8.

Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. Circulation 2003, 108(16): 1912-6.

Gulcan H, Ozturk IC, Arslan S. Alterations in antioxidant enzyme activities in cerebrospinal fluid related with severity of hypoxic ischemic encephalopathy in newborns. Biol Neonate 2005, 88(2): 87-91.

Gunn AJ, Parer JT, Mallard EC, Williams CE, Gluckman PD. Cerebral histologic and electrocorticographic changes after asphyxia in fetal sheep. Pediatr Res 1992, 31(5): 486-91.

Haddad GG, Donnelly DF. O2 deprivation induces a major depolarization in brain stem neurons in the adult but not in the neonatal rat. J Physiol 1990, 429: 411-28.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 4rd ed., Oxford, Clarendon Press, 2007.

Hochachka PW. Oxygen—a key regulatory metabolite in metabolic defense against hypoxia. Integr. Comp. Biol. 1997, 37(6): 595-603.

Hota SK, Barhwal K, Singh SB, Ilavazhagan G. Differential temporal response of hippocampus, cortex and cerebellum to hypobaric hypoxia: a biochemical approach. Neurochem Int 2007, 51(6-7): 384-90.

Hughes RN. Neotic preferences in laboratory rodents: issues, assessment and substrates. Neurosci Biobehav Rev 2007, 31(3): 441-64.

Huhta JC, Hernandez-Robles JA. Homocysteine, folate, and congenital heart defects. Fetal Pediatr Pathol 2005, 24(2): 71-9.

Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. J Nutr 2006, 136(6 Suppl): 1741S-9S.

Jensen FE, Holmes GL, Lombroso CT, Blume HK, Firkusny IR. Age-dependent changes in long-term seizure susceptibility and behavior after hypoxia in rats. Epilepsia 1992, 33(6): 971-80.

Joober R, Benkelfat C, Lal S, Bloom D, Labelle A, Lalonde P, et al. Association between the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T missense mutation and schizophrenia. Mol Psychiatry 2000, 5(3): 323-6.

Jus K, Bouchard M, Jus AK, Villeneuve A, Lachance R. Sleep EEG studies in untreated, long-term schizophrenic patients. Arch Gen Psychiatry 1973, 29(3): 386-90.

Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. Pharmacol Biochem Behav 2002, 73(1): 131-40.

Kellogg RH. "La Pression barometrique": Paul Bert's hypoxia theory and its critics. Respir Physiol 1978, 34(1): 1-28.

Kleihues P, Hossmann KA, Pegg AE, Kobayashi K, Zimmermann V. Resuscitation of the monkey brain after one hour complete ischemia. III. Indications of metabolic recovery. Brain Res 1975, 95(1): 61-73.

Lafemina MJ, Sheldon RA, Ferriero DM. Acute hypoxia-ischemia results in hydrogen peroxide accumulation in neonatal but not adult mouse brain. Pediatr Res 2006, 59(5): 680-3.

Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC Bioinformatics 2005, 6: 62.

Lauer CJ, Schreiber W, Pollmacher T, Holsboer F, Krieg JC. Sleep in schizophrenia: a polysomnographic study on drug-naive patients. Neuropsychopharmacology 1997, 16(1): 51-60.

Laviola G, Adriani W, Rea M, Aloe L, Alleva E. Social withdrawal, neophobia, and stereotyped behavior in developing rats exposed to neonatal asphyxia. Psychopharmacology (Berl) 2004, 175(2): 196-205.

Lee PC, Struve M, Raff H. Effects of hypoxia on the development of intestinal enzymes in neonatal and juvenile rats. Exp Biol Med (Maywood) 2003, 228(6): 717-23.

Loizzo A, Loizzo S, Galietta G, Caiola S, Spampinato S, Campana G, et al. Overweight and metabolic and hormonal parameter disruption are induced in adult male mice by manipulations during lactation period. Pediatr Res 2006, 59(1): 111-5.

Lombroso CT, Matsumiya Y. Stability in waking-sleep states in neonates as a predictor of long-term neurologic outcome. Pediatrics 1985, 76(1): 52-63.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951, 193(1): 265-75.

Maiti P, Singh SB, Sharma AK, Muthuraju S, Banerjee PK, Ilavazhagan G. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. Neurochem Int 2006, 49(8): 709-16.

Marotte H. [The exposure of man to altitude when flying: from Paul Bert to today]. J Soc Biol 2006, 200(3): 251-5.

Martin H, Lindblad B, Norman M. Endothelial function in newborn infants is related to folate levels and birth weight. Pediatrics 2007, 119(6): 1152-8.

Martorell R, Stein AD, Schroeder DG. Early nutrition and later adiposity. J Nutr 2001, 131(3): 874S-80S.

McAuliffe JJ, Miles L, Vorhees CV. Adult neurological function following neonatal hypoxia-ischemia in a mouse model of the term neonate: water maze performance is dependent on separable cognitive and motor components. Brain Res 2006, 1118(1): 208-21.

McCord JM. Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes. Proc Soc Exp Biol Med 1995, 209(2): 112-7.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 1969, 244(22): 6049-55.

McIntosh J, Anisman H, Merali Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. Brain Res Dev Brain Res 1999, 113(1-2): 97-106.

McNeil TF, Cantor-Graae E, Ismail B. Obstetric complications and congenital malformation in schizophrenia. Brain Res Brain Res Rev 2000, 31(2-3): 166-78.

McPhee AJ, Maxwell GM. The effect of theophylline on regional cerebral blood flow responses to hypoxia in newborn piglets. Pediatr Res 1987, 21(6): 573-8.

Mikati MA, Abi-Habib RJ, El Sabban ME, Dbaibo GS, Kurdi RM, Kobeissi M, et al. Hippocampal programmed cell death after status epilepticus: evidence for NMDA-receptor and ceramide-mediated mechanisms. Epilepsia 2003, 44(3): 282-91.

Mikati MA, Zeinieh MP, Kurdi RM, Harb SA, El Hokayem JA, Daderian RH, et al. Long-term effects of acute and of chronic hypoxia on behavior and on hippocampal histology in the developing brain. Brain Res Dev Brain Res 2005, 157(1): 98-102.

Moles A, Rizzi R, D'Amato FR. Postnatal stress in mice: does "stressing" the mother have the same effect as "stressing" the pups? Dev Psychobiol 2004, 44(4): 230-7.

Monti JM, Monti D. Sleep in schizophrenia patients and the effects of antipsychotic drugs. Sleep Med Rev 2004, 8(2): 133-48.

Moromisato DY, Moromisato MY, Brasel JA, Cooper DM. Effect of growth hormone therapy in mitigating hypoxia-induced and food restriction-induced growth retardation in the newborn rat. Crit Care Med 1999, 27(10): 2234-8.

Mortola JP, Morgan CA, Virgona V. Respiratory adaptation to chronic hypoxia in newborn rats. J Appl Physiol 1986, 61(4): 1329-36.

Myers RE. Four patterns of perinatal brain damage and their conditions of occurrence in primates. Adv Neurol 1975, 10: 223-34.

Nakanishi K, Tajima F, Nakamura A, Yagura S, Ookawara T, Yamashita H, et al. Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. J Physiol 1995, 489 (Pt 3): 869-76.

Nasuti C, Gabbianelli R, Falcioni ML, Di Stefano A, Sozio P, Cantalamessa F. Dopaminergic system modulation, behavioral changes, and oxidative stress after neonatal administration of pyrethroids. Toxicology 2007, 229(3): 194-205.

Noor JI, Ikeda T, Ueda Y, Ikenoue T. A free radical scavenger, edaravone, inhibits lipid peroxidation and the production of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain damage of neonatal rats. Am J Obstet Gynecol 2005, 193(5): 1703-8.

Nyakas C, Buwalda B, Luiten PG. Hypoxia and brain development. Prog Neurobiol 1996, 49(1): 1-51.

Osredkar D, Toet MC, van Rooij LG, van Huffelen AC, Groenendaal F, de Vries LS. Sleep-wake cycling on amplitude-integrated electroencephalography in term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. Pediatrics 2005, 115(2): 327-32.

Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. Pediatr Res 1993, 33(4 Pt 1): 405-11.

Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, da Rocha AP, Achaval M, Netto CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. Neurobiol Learn Mem 2007, 87(1): 101-8.

Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. Clin Chem 1999, 45(2): 290-2.

Powell CM, Miyakawa T. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? Biol Psychiatry 2006, 59(12): 1198-207.

Preeta R, Nair RR. Stimulation of cardiac fibroblast proliferation by cerium: a superoxide anion-mediated response. J Mol Cell Cardiol 1999, 31(8): 1573-80.

Raff H, Bruder ED, Jankowski B, Oaks MK, Colman RJ. Growth hormone therapy during neonatal hypoxia in rats: body composition, bone mineral density, and insulin-like growth factor-1 expression. Endocrine 2001, 16(2): 139-43.

Rauchova H, Vokurkova M, Koudelova J. Developmental changes of erythrocyte catalase activity in rats exposed to acute hypoxia. Physiol Res 2005, 54(5): 527-32.

Regland B, Johansson BV, Grenfeldt B, Hjelmgren LT, Medhus M. Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia. J Neural Transm Gen Sect 1995, 100(2): 165-9.

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

Roland EH, Poskitt K, Rodriguez E, Lupton BA, Hill A. Perinatal hypoxic-ischemic thalamic injury: clinical features and neuroimaging. Ann Neurol 1998, 44(2): 161-6.

Romeo RD, Mueller A, Sisti HM, Ogawa S, McEwen BS, Brake WG. Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. Horm Behav 2003, 43(5): 561-7.

Scher MS, Steppe DA, Banks DL. Prediction of lower developmental performances of healthy neonates by neonatal EEG-sleep measures. Pediatr Neurol 1996, 14(2): 137-44.

Selhub J. Homocysteine metabolism. Annu Rev Nutr 1999, 19: 217-46.

Sharma SK, Dakshinamurti K. Determination of vitamin B6 vitamers and pyridoxic acid in biological samples. J Chromatogr 1992, 578(1): 45-51.

Sheldon RA, Jiang X, Francisco C, Christen S, Vexler ZS, Tauber MG, et al. Manipulation of antioxidant pathways in neonatal murine brain. Pediatr Res 2004, 56(4): 656-62.

Sheldon RA, Sedik C, Ferriero DM. Strain-related brain injury in neonatal mice subjected to hypoxia-ischemia. Brain Res 1998, 810(1-2): 114-22.

Sies H, Koch OR, Martino E, Boveris A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. FEBS Lett 1979, 103(2): 287-90.

Siesjo BK, Katsura K, Zhao Q, Folbergrova J, Pahlmark K, Siesjo P, et al. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. J Neurotrauma 1995, 12(5): 943-56.

Silva RH, Bellot RG, Vital MA, Frussa-Filho R. Effects of long-term ganglioside GM1 administration on a new discriminative avoidance test in normal adult mice. Psychopharmacology (Berl) 1997, 129(4): 322-8.

Singh SB, Sharma A, Sharma KN, Selvamurthy W. Effect of high-altitude hypoxia on feeding responses and hedonic matrix in rats. J Appl Physiol 1996, 80(4): 1133-7.

Singh SK, Dua T, Tandon A, Kumari S, Ray G, Batra S. Status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in hypoxic ischemic encephalopathy. Indian Pediatr 1999, 36(6): 561-6.

Slotten HA, Kalinichev M, Hagan JJ, Marsden CA, Fone KC. Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. Brain Res 2006, 1097(1): 123-32.

Sridharan K, Patil SK, Upadhyay TN, Mukherjee AK. Effects of pyridoxine supplementation on blood glucocorticoids level, aspartate aminotransferase activity and glucose tolerance pattern under acute hypoxic stress. Horm Metab Res 1991, 23(2): 62-5.

Tandon R, Shipley JE, Taylor S, Greden JF, Eiser A, DeQuardo J, et al. Electroencephalographic sleep abnormalities in schizophrenia. Relationship to positive/negative symptoms and prior neuroleptic treatment. Arch Gen Psychiatry 1992, 49(3): 185-94.

Tejkalova H, Kaiser M, Klaschka J, Stastny F. Does neonatal brain ischemia induces schizophrenia-like behaviour in young adult rats? Physiol Res 2006.

ter Horst HJ, Sommer C, Bergman KA, Fock JM, van Weerden TW, Bos AF. Prognostic significance of amplitude-integrated EEG during the first 72 hours after birth in severely asphyxiated neonates. Pediatr Res 2004, 55(6): 1026-33.

Thornberg E, Thiringer K. Normal pattern of the cerebral function monitor trace in term and preterm neonates. Acta Paediatr Scand 1990, 79(1): 20-5.

Thorngren-Jerneck K, Hellstrom-Westas L, Ryding E, Rosen I. Cerebral glucose metabolism and early EEG/aEEG in term newborn infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. Pediatr Res 2003, 54(6): 854-60.

Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Anal Biochem 1969, 27(3): 502-22.

Towbin A. Central nervous system damage in the human fetus and newborn infant. Mechanical and hypoxic injury incurred in the fetal-neonatal period. Am J Dis Child 1970, 119(6): 529-42.

Tuor UI, Del Bigio MR, Chumas PD. Brain damage due to cerebral hypoxia/ischemia in the neonate: pathology and pharmacological modification. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1996, 8(2): 159-93.

Ueda S, Hatsuse K, Tsuda H, Ogata S, Kawarabayashi N, Takigawa T, et al. Potential crosstalk between insulin-like growth factor receptor type 1 and epidermal growth factor receptor in progression and metastasis of pancreatic cancer. Mod Pathol 2006, 19(6): 788-96.

Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. Trends Pharmacol Sci 2001, 22(4): 195-201.

Veasey SC, Valladares O, Fenik P, Kapfhamer D, Sanford L, Benington J, et al. An automated system for recording and analysis of sleep in mice. Sleep 2000, 23(8): 1025-40.

Veenema AH, Bredewold R, Neumann ID. Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. Psychoneuroendocrinology 2007, 32(5): 437-50.

Virgos C, Martorell L, Simo JM, Valero J, Figuera L, Joven J, et al. Plasma homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene variant: lack of association with schizophrenia. Neuroreport 1999, 10(10): 2035-8.

Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. Nat Neurosci 2004, 7(8): 847-54.

Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, et al. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. J Neurosci 2005, 25(47): 11045-54.

Yao JK, Leonard S, Reddy R. Altered glutathione redox state in schizophrenia. Dis Markers 2006, 22(1-2): 83-93.

Yao JK, Reddy RD, van Kammen DP. Oxidative damage and schizophrenia: an overview of the evidence and its therapeutic implications. CNS Drugs 2001, 15(4): 287-310.

Young J, McKinney SB, Ross BM, Wahle KW, Boyle SP. Biomarkers of oxidative stress in schizophrenic and control subjects. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2007, 76(2): 73-85.

Zhang J, Whitehead RE, Jr., Underwood LE. Effect of fasting on insulin-like growth factor (IGF)-IA and IGF-IB messenger ribonucleic acids and prehormones in rat liver. Endocrinology 1997, 138(8): 3112-8.

Zhang XY, Tan YL, Cao LY, Wu GY, Xu Q, Shen Y, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. Schizophr Res 2006, 81(2-3): 291-300.

Zhang YS, Du JZ. The response of growth hormone and prolactin of rats to hypoxia. Neurosci Lett 2000, 279(3): 137-40.

Zhu C, Wang X, Huang Z, Qiu L, Xu F, Vahsen N, et al. Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia. Cell Death Differ 2007, 14(4): 775-84.

Zornberg GL, Buka SL, Tsuang MT. Hypoxic-ischemia-related fetal/neonatal complications and risk of schizophrenia and other nonaffective psychoses: a 19-year longitudinal study. Am J Psychiatry 2000, 157(2): 196-202.

Zwiener U, Bauer R, Buchenau W, Hoyer D, Zieger M, Wagner H. Vascular resistance, metabolism and EEG within cerebral grey and white matter during hypoxia in neonatal piglets. Biol Res Pregnancy Perinatol 1986, 7(1): 23-9.

9. ABSTRACT

9. Abstract

Introduction: Neonatal hypoxia-ischemia is one of the most significant factors that can lead to death in newborns. It has been linked with pathology in adult life, such as schizophrenia. **Objectives:** The aim of this work was to investigate long-term effects of neonatal hypoxia on body weight, behavior, antioxidant defense status, factors related to homocysteine metabolism in adult male mice. **Methods:** Seven day old male Swiss mice were submitted to: hypoxia (H), maternal separation (MS) or no handling (NH). When they completed 3 months old, behavioral evaluation were performed (activity boxes, plus-maze discriminative avoidance task, sleep recording). Blood catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione, vitamin B6, homocysteine and cysteine were measured as well as hippocampal and striatal catalase activity, and hipoccampal GPx and catalase expression. Data were analyzed by one-way ANOVA test or repeated measures ANOVA, followed by Duncan or Bonferroni adjusted t tests. **Results:** Adult mice exposed to neonatal hypoxia exhibited lower locomotor activity on the first minutes of evaluation and also a decrease in paradoxical sleep episodes duration during dark phase compared to NH group. Moreover an increase in time spent in the open arms of the maze was observed in both MS and H groups when compared to NH. With respect to biochemical parameters, only erythrocyte GPx activity was significantly reduced in the H group, whereas total glutathione was significantly lower in the MS group, both compared to NH group. There were no differences in hippocampal GPx and CAT expression. Groups MS and H presented higher weight gain than NH. **Conclusion:** Neonatal hypoxia produced long-lasting alterations in paradoxical sleep, body weight, neotic behavior and glutathione peroxidase activity whereas maternal

separation induced an enhanced anxiety-like behavior, reduction in total and body weight increase.

10. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

10. Bibliografia consultada

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biologia molecular da célula, 4ª ed, Porto Alegre, Artmed, 2004.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford, Clarendon Press,1999.

Stryer L, Tymoczko JL, Berg JM. Bioquímica, 5ª ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

Vieira S. Introdução à bioestatística, 6ª ed. Rio de Janeiro, Editora Campus, 1997.