

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Éverton Carlos Brezolin

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DO ESPECTRO OBSESSIVO-
COMPULSIVO EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À
ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA NEONATAL**

Porto Alegre

2018

Éverton Carlos Brezolin

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DO ESPECTRO OBSESSIVO-
COMPULSIVO EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À
ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA NEONATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Brezolin, Éverton Carlos
Análise do comportamento do espectro
obsessivo-compulsivo em ratos Wistar submetidos à
encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal / Éverton
Carlos Brezolin. -- 2018.
89 f.
Orientador: Carlos Alexandre Netto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Hipóxia-Isquemia. 2. Transtorno
Obsessivo-Compulsivo. 3. Cloridrato de quimpirol. 4.
Dopamina. 5. Núcleos da Base. I. Netto, Carlos
Alexandre, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

EPÍGRAFE

"Nós somos o que fazemos repetidas vezes. Portanto, a excelência não é um ato, mas um hábito."

Aristóteles

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família pelo apoio e compreensão de minhas ausências, assim como aos meus dois sobrinhos, Enzo (meu primeiro afilhado) e Bernardo, os quais nasceram durante o mestrado. Ademais, dedico ao meu estimado companheiro canino Urso (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu norteador e base de minhas conquistas.

Aos meus pais, Altair Carlos Brezolin e Rilde Terra Brezolin, por sempre me incentivarem, apoiarem e cooperarem com todas as ajudas possíveis para minha formação acadêmica.

À minha irmã, Eveline Carla Brezolin, por sempre me apoiar em meus sonhos e conquistas.

Aos meus sobrinhos, Enzo e Bernardo, por terem nascidos ao longo de meu mestrado. Sempre nos mostrando o quanto a alegria das crianças nos fazem bem.

Aos meus amigos, e em especial à Mirelle Casagrande, Bruna Deniz e Rossana Porto, por serem colegas de pós-graduação e mais ainda, por sempre acolherem meus anseios e alegrias.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto pelas orientações e por acreditar em meu potencial mesmo em momentos ao qual eu não via saída.

As Prof.^{as} Dras. do PPG em Neurociências, Renata Rossat e Lenir Orlandi, pelo apoio e ensinamentos para a realização dos estágios didáticos.

Aos demais professores e professoras dos PPGs em Neurociências, Psiquiatria, Genética e Biologia Animal, nos quais, pude adquirir conhecimentos sólidos e que me nortearam para um melhor discernimento das Neurociências.

Aos meus colegas por me acompanharem ao longo da formação e em especial, aos colegas organizadores/comissões de apoio e alunos dos VI, VII, VIII e IX Curso de Neurociências da UFRGS.

Aos meus colegas de laboratório (professores, alunos de iniciação científica e pós-graduandos) pelo apoio, soluções de dúvidas, acalmar meus anseios e ajuda nos experimentos. Em especial ao Fabrício Nicola e a Ana Paula Martini por auxiliarem na correção de meus escritos e trabalhos.

A todos os animais, que perderam a vida para que este estudo se realizasse.

Ao PPG em Neurociências e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Às agências de fomentos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Profissionais do Ensino Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Assim, agradeço aos demais que cooperaram, apoiaram e principalmente, acreditaram em mim.

Muito obrigado pela parceria e companheirismo!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
LISTA DE SÍMBOLOS	XII
LISTAS DE ILUSTRAÇÕES	XIII
LISTA DE TABELAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA NEONATAL.....	1
1.1.1. <i>Fisiopatologia da Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal</i>	2
1.1.2. <i>Modelos Experimentais de Indução de Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal</i>	5
1.2. TRANSTORNO DO ESPECTRO OBSESSIVO-COMPULSIVO.....	5
1.2.1. <i>Fisiopatologia do Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo</i>	6
1.2.2. <i>Modelos Experimentais de Indução do Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo</i>	8
1.3. RELAÇÃO ENTRE A ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA NEONATAL E O TRANSTORNO DO ESPECTRO OBSESSIVO-COMPULSIVO.....	13
1.4. HIPÓTESE DO TRABALHO.....	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. GERAL.....	16
2.2. ESPECÍFICOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	17
3.2. MODELOS EXPERIMENTAIS.....	17
3.3. DESENHO EXPERIMENTAL.....	18
3.4. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL.....	19
3.5. ADMINISTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS: CLORIDRATO DE QUIMPIROL.....	20
3.6. ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	20
3.6.1. <i>Teste do Enterramento de Esferas Vítreas (Marble Burying Test)</i>	21
3.6.2. <i>Teste do Campo Aberto (Open Field Test)</i>	22
3.6.3. <i>Análise do Comportamento de Grooming (Grooming Test)</i>	22
3.6.4. <i>Teste do Labirinto em Cruz Elevada (Elevated Plus Maze Test)</i>	24
3.7. EUTANÁSIA E PERFUSÃO TRANSCARDÍACA.....	25
3.8. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	26
3.8.1. <i>Volume de Lesão</i>	26
3.8.2. <i>Imunofluorescência</i>	27

3.8.2.1. Quantificação da imunofluorescência.....	28
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. TESTES COMPORTAMENTAIS	29
4.1.1. <i>Teste de Enterramento das Esferas Vítreas (Marble Burying Test)</i>	29
4.1.2. <i>Teste do Campo Aberto (Open Field Test)</i>	30
4.1.3. <i>Teste de Análise do Comportamento de Grooming (Grooming Test)</i>	31
4.1.4. <i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus Maze Test)</i>	34
4.2. ANÁLISES HISTOLÓGICAS E DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	34
4.2.1. <i>Volume de Lesão</i>	34
4.2.2. <i>Imunofluorescência</i>	37
5. DISCUSSÃO	40
5.1. TESTES COMPORTAMENTAIS	40
5.1.1. <i>Teste de Enterramento das Esferas Vítreas (Marble Burying Test)</i>	40
5.1.2. <i>Teste do Campo Aberto (Open Field Test)</i>	42
5.1.3. <i>Teste de Análise do Comportamento de Grooming (Grooming Test)</i>	45
5.1.4. <i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus Maze Test)</i>	46
5.2. ANÁLISES HISTOLÓGICAS E DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	48
5.2.1. <i>Volume da Lesão</i>	48
5.2.2. <i>Imunofluorescência</i>	49
6. CONCLUSÕES	53
7. PERSPECTIVAS.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPC: monofostato cíclico de adenosina

ANOVA: análise de variância

ATP: adenosina trifosfato

BDNF: (*brain-derived neurotrophic factor*) - fator neurotrófico derivado do encéfalo

CAT: enzima catalase

CCA: córtex cingulado-anterior

cct: crises completas totais

CETC: circuito córtico-estriado-tálamo-cortical

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

ci: crises incompletas

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CONT: grupo Controle

Cq: Cloridrato de quimpirol

crc: crises de região caudal

CRMV: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

ct: crises totais

DA: dopamina

DAT: transportador de dopamina

DDC: DOPA-descarboxilase

DOPAC: ácido 3,4-diidroxifenilacético

DPN: dias pós-natais

EHIN: encefalopatia Hipóxico-isquêmica neonatal

EROs: espécies reativas do oxigênio

et al.: entre outros

HE: hematoxilina-eosina

HI: Hipóxia-isquemia

HIN: Hipóxia-Isquemia Neonatal

HVA: ácido homovanílico

IL: Interleucina

IP: intraperitoneal

ISRSs: inibidores seletivos da recaptação da serotonina

L-DOPA: levodopa

ne: níveis de expressão

NGS: soro normal de cabra

PBS: (*phosphate buffered saline*) - salina tamponada com fosfato

PFA: paraformaldeído

PMADs: padrões moleculares associados ao dano

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

SC: subcutâneo

SNC: sistema nervoso central

SOD: enzima superóxido-dismutase

SP: São Paulo

TDAH: transtorno de déficit de atenção e Hiperatividade

TEOC: transtorno do espectro obsessivo-compulsivo

TH: tirosina-hidroxilase

TCA: Teste do Campo Aberto

TEEV: Teste do Enterramento das Esferas Vítreas

TG: Teste de *Grooming*

TLCE: Teste do Labirinto em Cruz Elevado

ti: transições incorretas

tia: transições incorretas abortadas

tif: transições incorretas fugazes

tii: transições iniciadas incorretamente

TNF: (*tumor necrosis factor*) - fator de necrose tumoral

tt: transições totais

LISTA DE SÍMBOLOS

5-HT_{1A}: receptores de serotonina do tipo 1A

Ca⁺: íons de cálcio

D1: receptores dopaminérgicos do tipo-D1

D2: receptores dopaminérgicos do tipo-D2

D3: receptores dopaminérgicos do tipo-D3

F: frequência

H₂O: água

K⁺: íons de potássio

µg/ml: microgramas por mililitro

µl: microlitros

mg/kg: miligramas por quilograma

mm: milímetros

mm³: milímetros cúbicos

Na⁺: íons de sódio

P: nível de significância estatística aceito

pH: escala ácido-base

s: segundos

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - HIPÓTESE TRIFÁSICA DO DANO NEURAL HIPÓXICO-ISQUÊMICO PERINATAL	4
FIGURA 2 - FORMAÇÃO DE OBSESSÕES E ALÍVIO DA ANSIEDADE.....	6
FIGURA 3 - TEOC E O CÉREBRO, EVIDENCIANDO O <i>LOOPING</i> DO CIRCUITO CETC.....	8
FIGURA 4 - SÍNTESE DA DOPAMINA	9
FIGURA 5 - DESENHO EXPERIMENTAL	18
FIGURA 6 - ESQUEMA DO MODELO DE LEVINE-RICE.....	19
FIGURA 7 - CADEIA SINTÁTICA DE <i>GROOMING</i>	23
FIGURA 8 - APARATOS UTILIZADOS NOS TESTES COMPORTAMENTAIS.....	24
FIGURA 9 - ESQUEMA DA TÉCNICA DE PERFUSÃO TRANSCARDÍACA.....	25
FIGURA 10 - SEQUÊNCIA DO ESQUEMA DE CORTES HISTOLÓGICOS.....	26
FIGURA 11 - ANÁLISE DO TESTE DE ENTERRAMENTO DAS ESFERAS VÍTREAS.....	29
FIGURA 12 - ANÁLISE DO TESTE DE CAMPO ABERTO	30
FIGURA 13 - ANÁLISE DO <i>GROOMING</i> : CRISES.....	32
FIGURA 14 - ANÁLISE DO <i>GROOMING</i> : TRANSIÇÕES.....	33
FIGURA 15 - ANÁLISE DE VOLUME TECIDUAL: ESTRIADOS E HEMISFÉRIOS	36
FIGURA 16 - ANÁLISE DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DO TIPO-D1 E D2 NO ESTRIADO ANTERODORSAL.....	38
FIGURA 17 - ANÁLISE DA RELAÇÃO DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DO TIPO-D1 E D2 EM ESTRIADO ANTERODORSAL IPSILATERAL.....	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RELAÇÃO DA REALIZAÇÃO DOS TESTES COMPORTAMENTAIS	21
TABELA 2 - LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA	34

RESUMO

A Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal (EHIN) tem como etiologia processos asfíxicos perinatais de variadas intensidades, que apresentam alta taxa de morbimortalidade. A neuropatologia da EHIN é oriunda da diminuição da taxa de oxigênio (Hipóxia) e do aporte de glicose, ocasionada pela isquemia encefálica, a qual está relacionada à fisiopatologia de distúrbios como a epilepsia, o autismo, o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), além das alterações na aprendizagem, ansiedade e na promoção de déficits motores. A EHIN apresenta relação direta com o desenvolvimento de ansiedade, assim como a possível promoção de Transtornos do Espectro Obsessivo-Compulsivo (TEOC). Os TEOC se caracterizam pelas alterações encefálicas estruturais e bioquímicas que geram condutas obsessivas, caracterizadas por pensamentos repetitivos para algum fator desencadeante como higiene, organização, etc. Essas obsessões, quando identificadas, podem ser neutralizadas e/ou aliviadas por meio de condutas compulsivas, caracterizadas por comportamentos repetitivos/estereotipados, que aliviam as altas taxas de ansiedade. O presente estudo teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de comportamentos do tipo-TEOC em ratos submetidos ao modelo de EHIN. O modelo de indução à EHIN ocorre pela oclusão unilateral permanente da artéria carótida, seguido da exposição à uma atmosfera hipóxica (8% de O₂) por 60 minutos no 7º dia de vida pós-natal (DPN). Esse modelo promove lesões, principalmente, no córtex cerebral, na substância branca periventricular e subcortical, nos núcleos da base e no Hipocampo. Para a indução de TEOC, controle positivo do estudo, utilizou-se o modelo de sensibilização ao comportamento do tipo-TEOC induzido pelo uso crônico do agonista de receptores dopaminérgicos do tipo-D2, Cloridrato de Quimpirol (Cq) na dose de 0,5 mg/kg, injetado intraperitonealmente. Foram 10 aplicações com intervalos de 3 dias entre elas, iniciando no 25ºDPN até o 60ºDPN. Utilizou-se ratos machos da linhagem Wistar, divididos nos grupos: HIN (ratos submetidos ao modelo de EHIN), Cq (ratos submetidos ao modelo de TEOC) e Controle. No 62ºDPN, na análise comportamental de estereotipias a partir da análise de *grooming*, ambos os grupos HIN e Cq, apresentaram um aumento nas crises de *grooming* e de transições incorretas em relação ao padrão de transições corretas no ato de autolimpeza. Pela análise de imunofluorescência no estriado anterodorsal, o grupo HIN apresentou uma redução nos receptores dopaminérgicos do tipo-D1, enquanto que o modelo de Cq aumentou a expressão dos receptores do tipo-D2. Em ambos os modelos, a expressão de D1 foi menor do que a expressão de D2. Com base nos achados comportamentais, pode-se concluir que o modelo de EHIN pode ser um possível candidato para estudos de comportamentos do tipo-TEOC, uma vez que causa comportamento do tipo ansioso e estereotipias semelhantes às presentes no modelo de indução de TEOC.

Palavras-chave: Asfixia Perinatal. Hipóxia-Isquemia. Encefalopatia Neonatal. Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica. Cloridrato de Quimpirol. Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo. TEOC. TOC. Obsessão. Compulsão.

ABSTRACT

Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy (NHIE) can result from perinatal asphyxia, which present a high morbidity and mortality rate. The neuropathology of NHIE is due to the decrease in the oxygen rate (hypoxia) and the glucose supply caused by brain ischemia, which is related to the pathophysiology of disorders such as epilepsy, autism, Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD), as well as changes in learning, anxiety and the promotion of motor impairments. NHIE is directly related to the development of anxiety, as well as the possible development of Obsessive-Compulsive Spectrum Disorders (OCSD). The OCSD is characterized by structural and biochemical encephalic changes that generate obsessive behaviors, characterized by repetitive thoughts for some triggering factor such as hygiene, organization, etc. These obsessions, when identified, can be neutralized and/or alleviated by compulsive behaviors characterized by repetitive/stereotyped behaviors that alleviate high anxiety rates. The present study aimed to evaluate the development of OCSD-like behaviors in rats submitted to NHIE model. The model of induction to NHIE occurs by permanent unilateral occlusion of the carotid artery, followed by exposure to a hypoxic atmosphere (8% O₂) for 60 minutes on the 7th day of postnatal life (DPN). This model promotes lesions, mainly in the cerebral cortex, in the periventricular and subcortical white matter, in the basal ganglia and in the Hippocampus. For the induction of OCSD, positive control of the study, we used the sensitization model to the OCSD-like behavior induced by the chronic use of the dopaminergic agonist of the D2-type, Quimpirole Hydrochloride (Cq) at a dose of 0.5 mg/kg, injected intraperitoneally. There were 10 applications with 3-day intervals between them, start in 25th DPN until 60th DPN. Male Wistar rats were divided into the groups: HIN (rats submitted to the NHIE model), Cq (rats submitted to the OCSD model) and Control. At 62nd DPN, in the behavioral analysis of stereotypies from the *grooming* analysis, both HIN and Cq groups showed an increase in *grooming* crises and incorrect transitions in relation to the correct transitions pattern in the self-cleaning act. By immunofluorescence analysis in the anterodorsal striatum, the HIN group promoted a reduction in dopaminergic D1-type receptors, whereas the Cq model increased the expression of D2-type receptors. In both models, D1 expression was lower than D2 expression. Based on the behavioral findings, it can be concluded that the NHIE model may be a possible candidate for studies of OCSD-like behaviors, since it presents an anxiety-like behavior and stereotypes similar to those present in the OCSD induction model.

Keywords: Perinatal Asphyxia. Hypoxia-Ischemia. Neonatal Encephalopathy. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. Quimpirole Hydrochloride. Obsessive-Compulsive Spectrum Disorder. OCSD. OCD. Obsession. Compulsion.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA NEONATAL

A encefalopatia neonatal em humanos é desencadeada principalmente pela hipóxia-isquemia (HI), sendo esta uma das principais causas de morte neonatal. A incidência da Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal (EHIN) é de 1-2/1000 nascidos vivos em países desenvolvidos, e de 10-20/1000 em países emergentes e subdesenvolvidos (LIU et al., 2016). Mundialmente, a EHIN acomete 2.7 milhões de neonatos, sendo que desses, 690 mil morrerão (KURINCZUK; WHITE-KONING; BADAWI, 2010). Ao redor da metade dos sobreviventes desenvolverão sequelas neuropsicológicas de longo prazo (AUSTIN, 2018).

Os fatores etiológicos em humanos são eventos antenatais (20%), durante o parto (35%), pós-natais (10%) e de sofrimento fetal (35%) (MARCONDES, 2002). Alterações na homeostasia do trabalho de parto como a hipóxia materna, infecções intrauterinas, descolamento prematuro da placenta e a compressão do cordão umbilical podem causar HI (BERGER; GARNIER, 1999; MCLEAN; FERRIERO, 2004; VOLPE, 2009). As complicações são sistêmicas e acometem o sistema cardiovascular, respiratório, renal e metabólico do feto; contudo, o sistema nervoso central (SNC) é o mais comprometido (VANNUCCI; PERLMAN, 1997).

Humanos que sofreram EHIN podem desenvolver incapacidades neurológicas após o evento, tais como diminuição do nível de consciência, anormalidades motoras, paralisia cerebral, retardo mental, déficits de aprendizagem, epilepsia (ROLAND; HILL, 1995; VANNUCCI; PERLMAN, 1997; VOLPE, 2009). Para além, estudos em humanos com caráter retrospectivo, demonstraram correlação entre agravos perinatais, tais como a HI, com manifestação tardia de traços do Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo (TEOC) (GELLER *et al.*, 2008; SAMPAIO *et al.*, 2009; SANTANGELO *et al.*, 1994; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Em modelos animais não-primatas de EHIN, são encontrados também déficits motores, cognitivos, de aprendizado e memória, comportamentos do tipo-déficit de atenção e hiperatividade e níveis elevados de comportamento tipo-ansioso (ARTENI *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2009; MIGUEL *et al.*, 2015; SANCHES *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2016). As mudanças comportamentais, vistas em murinos, podem ser

relacionadas à atrofia das estruturas cerebrais concomitantes com as alterações metabólicas e comprometimento das funções fisiológicas normais (ARTENI *et al.*, 2010; GERSTNER *et al.*, 2009; MESTRINER *et al.*, 2013; PAGNUSSAT *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2016).

1.1.1. Fisiopatologia da Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal

A fisiopatologia da Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal (EHIN) decorre do decréscimo do nível circulante de oxigênio (hipóxia) e de uma menor perfusão sanguínea (isquemia) devido a um processo asfíxico, que leva o desencadeamento de processos de lesão tecidual e morte celular tanto em humanos quanto em modelos animais não-primatas (BERGER; GARNIER, 1999). Com o desenvolvimento fetal as áreas suscetíveis à HI variam. Em recém-nascidos humanos com idade gestacional menor de 32 semanas, a área afetada é a substância branca periventricular, enquanto que em recém-nascidos a termo, os locais mais suscetíveis são córtex sensorio-motor, núcleos basais (principalmente estriado) e tálamo (MARTIN *et al.*, 1997), assim como o tronco cerebral (JOHNSTON *et al.*, 2001)

O processo fisiopatológico da EHIN, elucidado tanto em estudo com seres humanos quanto outros animais não-primatas, pode ser dividido em períodos (Figura 1) que transcorrem do momento do insulto HI à formação da lesão, tais períodos são: falha energética primária, falha energética secundária e falha energética terciária (DAVIDSON *et al.*, 2015; RUMAJOGEE *et al.*, 2016; VAN STEENWINCKEL *et al.*, 2014). Essas fases se sobrepõem e apresentam uma retroalimentação positiva, o que ocasiona piora dos processos lesivos (HASSELL *et al.*, 2015). Conforme as fases progridem, as células perdem a integridade metabólica e capacidade de recuperação, tais como vista em estudo com modelos experimentais de HI (HOSSMANN, 2008). Com as alterações patológicas, a resposta imunológica em modelos experimentais é acionada, sendo o sistema imune um dos principais fatores determinantes do tamanho do agravo (FATHALI *et al.*, 2013; JIN; SILVERMAN; VANNUCCI, 2009).

No primeiro momento, a HI ocasiona rápida depressão nos níveis de glicose e oxigênio necessários à glicólise aeróbica e conseqüentemente a diminuição da síntese de adenosina trifosfato (ATP). Com a diminuição da disponibilidade desses dois substratos, ocorre recrutamento de outras fontes energéticas e atuação do

metabolismo de glicólise anaeróbica. Em resposta à glicólise anaeróbica ocorre o acúmulo de ácido láctico, que em excesso se torna lesivo às células. As alterações dos níveis de ATP provocam falha energética, principalmente no funcionamento das bombas iônicas que regulam a homeostasia celular, como a bomba Na^+/K^+ e a de Ca^+ (JOHNSTON *et al.*, 2001).

Após minutos do insulto, instaura-se a falha energética primária, com intensa despolarização de membrana neuronal devido a alterações em canais iônicos e receptores, com amplo influxo de Na^+ e liberação de neurotransmissores excitatórios, entre eles o glutamato. Concomitante à liberação de neurotransmissores e desregulação da bomba Na^+/K^+ , ocorre o acúmulo intracelular de íons de Ca^+ , promovendo edema pela entrada de água, por osmose, ocasionada pelo acúmulo de íons intracelulares e, conseqüente, lise celular (DAVIDSON *et al.*, 2015; JOHNSTON *et al.*, 2001; RUMAJOGEE *et al.*, 2016; VAN STEENWINCKEL *et al.*, 2014).

Após a falha energética primária, ocorre a reperfusão sanguínea tecidual. Esse período é o mais deletério aos tecidos e é onde aumenta o nível de oxidação por recuperação parcial dos processos metabólicos (OHSHIMA *et al.*, 2012). Com a reperfusão, instaura-se a falha energética secundária entre 7 e 72 horas após o insulto; porém, com o seu auge em 24 horas (DAVIDSON *et al.*, 2015). Essa fase ocasiona disfunção mitocondrial devido à entrada desenfreada de Ca^+ , aumento da produção de radicais livres, produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e conseqüentemente aumento da liberação de neurotransmissores excitotóxicos, principalmente glutamato (DUGAN *et al.*, 1999). Há elevação da expressão de citocinas pró-inflamatórias pela detecção de padrões moleculares associados ao dano (PMADs) (ZHAO *et al.*, 2013) com recrutamento de células gliais (micróglia e astrócitos) e desenvolvimento do quadro de gliose reativa, que promove retroalimentação positiva com a liberação de citocinas e a intensificação da ação fagocítica pelos macrófagos (BURDA; SOFRONIEW, 2014; LIU; MCCULLOUGH, 2013). O aumento da produção de EROs em conjunto com as demais alterações, principalmente o aumento do influxo de Ca^+ , levam à deturpação no funcionamento de importantes enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT) e superóxido-dismutase (SOD), que indiretamente promovem a programação da morte celular tardia (apoptose) e necrose tecidual (DAFRE *et al.*, 2003; DAVIDSON *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2014; LOW *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2009; ROSSITER *et al.*, 2002).

Dias ou meses após o insulto, instaura-se a falha energética terciária, onde ocorre a continuação dos mecanismos excitotóxicos e apoptóticos (BARKS; SILVERSTEIN, 1992; BURDA; SOFRONIEW, 2014; PORTERA-CAILLIAU; PRICE; MARTIN, 1997). Juntamente com a excitotoxicidade e apoptose, há diminuição na ativação de fatores pró-inflamatórios pelo aumento dos anti-inflamatórios, além da diminuição da neurogênese e sinaptogênese, déficit de maturação/crescimento axonal e mudanças epigenéticas. Tais processos ocasionam a formação da lesão cerebral propriamente dita, que segue com a ativação astrogliar e microglial, após semanas do insulto, formação da cicatriz neural, e conseqüentemente, redução do volume das áreas afetadas (ARTENI *et al.*, 2003; BURDA; SOFRONIEW, 2014; DAVIDSON *et al.*, 2015; LIU; MCCULLOUGH, 2013).

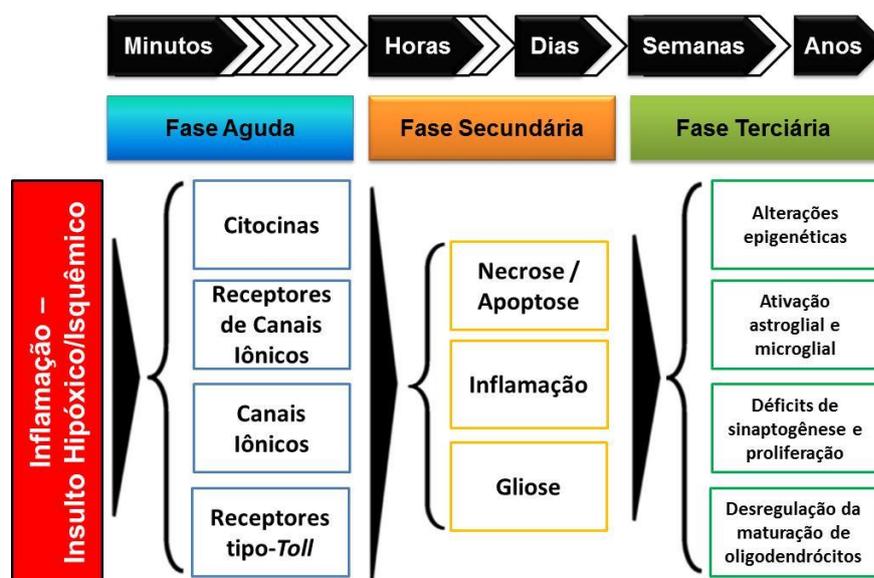


Figura 1 - Hipótese trifásica do dano neural hipóxico-isquêmico perinatal. Fonte: adaptado de Rumajogee *et al.* (2016).

A excitotoxicidade glutamatérgica, o estresse oxidativo, a ativação de caspases e da apoptose (CHENG *et al.*, 1998; MCLEAN; FERRIERO, 2004) com a ativação das vias imunológicas, aumentam a severidade da lesão e conseqüentemente estabelecem um prognóstico negativo a longo prazo. Tais características nos trazem a necessidade de desenvolvimento de estudos para elaboração de estratégias terapêuticas cada vez mais eficientes, assim como atenções às alterações no neurodesenvolvimento.

1.1.2. Modelos Experimentais de Indução de Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas e o melhor conhecimento do insulto fisiopatológico da EHIN requer o uso de modelos experimentais em pesquisas pré-clínicas (YAGER; ASHWAL, 2009; YAGER, 2004). O método de anóxia-hipóxia em roedores adultos de Levine (1960), modificado para o uso em neonatos é frequentemente escolhido para mimetizar a EHIN (RICE; VANNUCCI; BRIERLEY, 1981). As principais características da lesão ocorrem no hemisfério cerebral ipsilateral à oclusão arterial da carótida eleita para o procedimento, com o acometimento do hipocampo, estriado e córtex; porém, o hemisfério contralateral é afetado em menor grau ou não apresenta acometimentos morfológicos (JANSEN; LOW, 1996; RICE; VANNUCCI; BRIERLEY, 1981).

O modelo de EHIN é realizado no 7º dia de vida (DPN7) do rato a fim de mimetizar o período a termo de humanos (CLANCY; DARLINGTON; FINLAY, 2001; VOLPE, 2009). Esse modelo causa lesões no córtex cerebral, substância cinzenta profunda (estriado e tálamo), substância branca periventricular e subcortical, e hipocampo (ARTENI *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2007; RUMAJOGEE *et al.*, 2016). Em pesquisas prévias em nosso grupo de trabalho, demonstrou-se tanto danos histológicos quanto bioquímicos nas regiões acima descritas, tais como a perda do volume encefálico, o aumento na formação de EROs e na diminuição das defesas antioxidantes (DAFRE *et al.*, 2003; SANCHES *et al.*, 2015).

1.2. TRANSTORNO DO ESPECTRO OBSESSIVO-COMPULSIVO

Estudos prévios relacionando lesões encefálicas neonatais e desenvolvimento de Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo (TEOC) na pesquisa experimental são inexistentes. Porém, em pesquisa com humanos, insultos perinatais, e provavelmente a HI, estão intimamente relacionados com o desenvolvimento de traços do TEOC precoce e tardio, como obsessões, compulsões, aumento de comportamento tipo-ansioso, presença de tics e grooming patológico (GELLER *et al.*, 2008; SAMPAIO *et al.*, 2009; SANTANGELO *et al.*, 1994; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O TEOC afeta de 2 a 3% dos humanos (TORRES *et al.*, 2006), sem diferenças epidemiológicas por sexo após os 18 anos (KESSLER *et al.*, 2005). Contudo, afeta mais meninos do que meninas na infância (GELLER, 2006). É caracterizado por obsessões e rituais compulsivos, sendo os processos obsessivos, pensamentos recorrentes e persistentes, que causam grande ansiedade. Os indivíduos tendem a lidar com esses pensamentos ignorando-os, suprimindo-os ou neutralizando-os com outros pensamentos ou ações (Figura 2). Já as ações realizadas, tendem a definir as compulsões, que são basicamente comportamentos repetitivos (estereotipados) ou atos mentais e são resultados da necessidade do alívio da ansiedade gerada pela obsessão (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000).

As compulsões/estereotipias vistas em seres humanos podem ser percebidas no comportamento animal de outras espécies (EILAM *et al.*, 2006; KALUEFF *et al.*, 2016). Em roedores, as estereotipias ocasionam exacerbação comportamental e podem ser analisadas em seis condutas: locomoção, *rearing* (levantamento sobre patas traseiras para observação), *sniffing* (farejar); *grooming* (comportamento de auto-limpeza), atividade oral (lamber, mastigar e morder) e *burying* (enterramento) (MELLER; EORDI; BOHMAKER, 1988; THOMAS *et al.*, 2009).



Figura 2 - Formação de obsessões e alívio da ansiedade. Fonte: adaptado de Pauls *et al.* (2014).

1.2.1. Fisiopatologia do Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo

A fisiopatologia em humanos do Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo (TEOC) envolve alterações na regulação serotoninérgica, glutamatérgica, dopaminérgica, distúrbios genéticos, alterações morfológicas, ou até por fatores ambientais e infecções (Figura 3), podendo ser únicos ou inter-relacionados

(ABRAMOWITZ; TAYLOR; MCKAY, 2009). O envolvimento do sistema dopaminérgico tem base elucidada nos estudos experimentais com o fármaco Cloridrato de quimprirol que atua em receptores do tipo-D2, presentes nos núcleos da base, com efeitos de compulsividade para objetos (DVORKIN *et al.*, 2010). Para colaborar com essa teoria, foi verificada uma maior concentração de transportadores de dopamina (DAT) no estriado de ratos com características tipo-TEOC (KIMMEL *et al.*, 2001).

Em relação à morfologia de estruturas em pacientes com TEOC, visualizou-se atrofia de córtex orbito-frontal medial (PUJOL *et al.*, 2004), do córtex orbito-frontal direito e esquerdo, do giro fronto-medial, da região insular opercular esquerda, e aumento bilateral da parte ventral do putamên, do tálamo (ATMACA *et al.*, 2007) e da parte anterior do cerebelo (PUJOL *et al.*, 2004). Pacientes com TEOC também apresentam um aumento na massa cinzenta em regiões orbito-frontais posteriores e para-hipocampais, diminuição no córtex cingulado anterior e tálamo (VALENTE *et al.*, 2005); além, há presença de volume diminuído da massa cinzenta e branca nos lobos parietais em pacientes pediátricos (LÁZARO *et al.*, 2009). Nos modelos experimentais de indução de comportamento tipo-TEOC, os estudos carecem de avaliação volumétrica das estruturas encefálicas.

Na análise do suprimento sanguíneo, visualizou-se aumento de fluxo sanguíneo em córtex órbito-frontal e estriado em pacientes portadores do TEOC (SAXENA *et al.*, 1998; SAXENA; RAUCH, 2000). Além disso, visualiza-se uma hiperativação do circuito córtico-estriado-tálamo-cortical (CETC) (SAXENA *et al.*, 1998), principalmente no segmento frontoestriatal (ABRAMOVITCH *et al.*, 2015). Por meio de estudos clínicos com humanos, sabe-se que o TEOC resulta em baixos níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* / BDNF) e níveis elevados de Fator de Necrose Tumoral - Alpha (*Tumor Necrosis Factor* - alpha / TNF-alpha) e Interleucina-6 (Interleukin-6 / IL-6) demonstrando o caráter imunológico envolvido no agravo (KONUK *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2011).

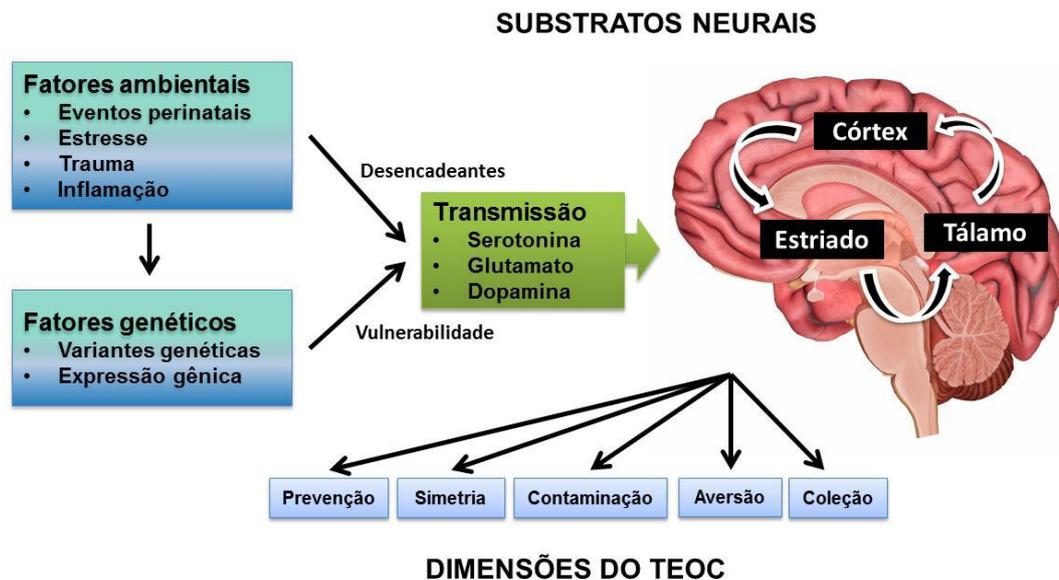


Figura 3 - TEOC e o cérebro, evidenciando o *looping* do circuito CETC. Siglas: Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo (TEOC); Circuito córtico-estriado-tálamo-cortical (CETC). **Fonte:** adaptado de Pauls *et al.* (2014) e imagem do encéfalo de Innerbody¹.

1.2.2. Modelos Experimentais de Indução do Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo

Vários modelos de Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo (TEOC) em roedores foram desenvolvidos ao longo dos anos, uma vez que as características fisiopatológicas do transtorno são variadas. Encontram-se 21 modelos possíveis de indução do TEOC em animais não-primatas, sendo que nesses 21 modelos, sete são de cunho etológico, quatro genético, três farmacológico, três comportamental e quatro modelos variados (BOULOUGOURIS; CHAMBERLAIN; ROBBINS, 2009).

Para este estudo, objetivou-se utilizar o modelo do TEOC farmacológico induzido pela aplicação crônica de Cloridrato de quimpirol (Cq), agonista dopaminérgico dos receptores do tipo-D2/D3 (SZECHTMAN; SULIS; EILAM, 1998; RAUCH; SAVAGE, 1997). Ratos Sprague-Dawley, que receberam por via oral 2 mg/kg de Cq, excretaram 75% da dose na urina e 14% da mesma nas fezes em análise nas 72 horas, já o pico no plasma foi em 25 minutos no total de 0,074 µg/ml (69%) e a

¹ Imagem do encéfalo obtida em <<http://www.innerbody.com/image/nerv02.html>>. Acesso em 27 jan 2018.

meia vida do fármaco de 9,5 horas com taxa de eliminação de 15 horas (WHITAKER; LINDSTROM, 1987).

As propriedades farmacológicas do Cq quando testados em roedores incluem alterações na síntese, transporte e ligação da DA em seus receptores, assim como alterações em receptores dopaminérgicos. Com a necessidade da síntese de Dopamina (DA) tanto em roedores como em humanos (Figura 4), ocorre a ativação da via de síntese monoaminérgica. Resumidamente, a enzima Tirosina-Hidroxilase (TH) converte a Tirosina em Levodopa (L-DOPA); após, a L-DOPA com o auxílio de DOPA- Descarboxilase (DDC) sintetiza a DA, que será armazenada em vesículas no neurônio pré-sináptico, à espera do potencial de ação para ser liberada na fenda sináptica e se ligar em seus respectivos receptores (tipo-D1 e tipo-D2 nos neurônios espinhosos médios do estriado). A DA pode ser transportada pelo Transportador de Dopamina (DAT) para a sua reutilização ou para ser degradada. Os produtos da degradação da dopamina são DOPAC (Ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético) e HVA (Ácido homovanílico) que podem estar com níveis alterados em modificações de síntese e degradação da Dopamina (MARSDEN, 2006; MEISER; WEINDL; HILLER, 2013).

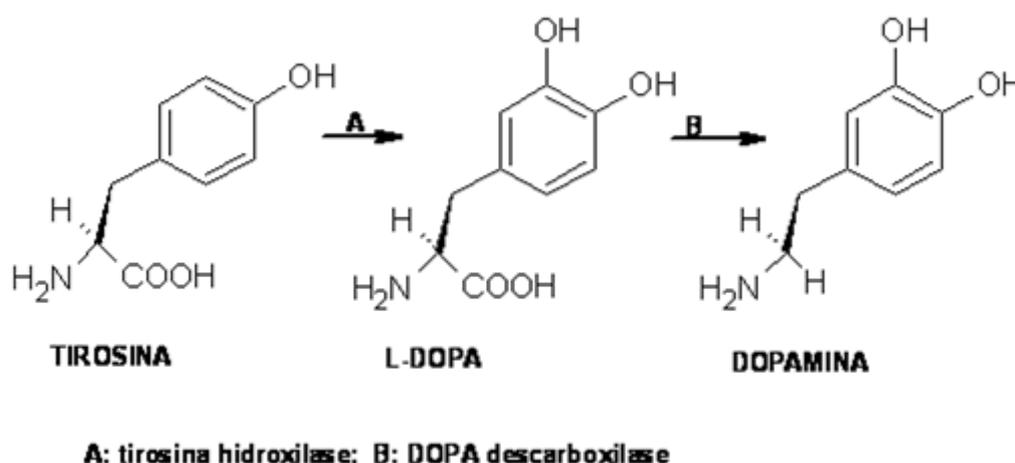


Figura 4 – Síntese da Dopamina. Fonte: adaptado de Qnint².

Ao analisar os substratos da síntese de dopamina, evidenciam-se mudanças em TH, L-DOPA e em DDC. O uso de Cq ocasiona a diminuição na expressão da TH (20%) no estriado (baixa expressão em zero minuto, voltando ao normal em três horas

² Disponível em: <<http://qnint.sbg.org.br/qni/>>. Acesso em 1º fev 2018.

após a administração) com 3mg/kg (CHO; NEFF; HADJICONSTANTINO, 1997). A redução da expressão é possivelmente mediada pela atenuação da produção de Ser40 (presumível processo via autorreceptores-D2), embora não se evidencie alterações na fosforilação da Ser19 ou Ser31 que são necessárias para indução da síntese de TH conforme demonstrado em estudo *in vitro* com 1µM de Cq (LINDGREN *et al.*, 2001). O Cq, na dosagem de 1mg/kg, não altera o número de neurônios estriatais positivos para TH intrínseca (BUSCETI *et al.*, 2012). O Ácido Ribonucleico mensageiro (RNAm) para TH também não sofre modificações quando avaliada após a aplicação do fármaco (CHO *et al.*, 1999; CHO; NEFF; HADJICONSTANTINO, 1997). Salienta-se que a Tirosina-Hidroxilase (TH) está armazenada em vesículas que estão mais próximas do receptor dopaminérgico do tipo-D2 (alvo molecular do Cq), do que do tipo-D1, embora os receptores do tipo-D1 também possuam compartimentos de TH, esses se apresentam em menor quantidade em comparação com os receptores do tipo-D2 (KIMMEL *et al.*, 2001; JANSSON *et al.*, 1999). Em relação à L-DOPA, o uso de Cq em 1µM reduziu seus níveis basais (LINDGREN *et al.*, 2001). Quanto à DOPA Descarboxilase (DDC), nenhuma alteração na atividade dela e na expressão de seu RNAm foi visualizada em 0,1; 0,3; 1 e 3mg/kg e em concentrações *in vitro* de 10⁻⁹ a 10⁻⁴ M de Cq (CHO; NEFF; HADJICONSTANTINO, 1997; ZHU *et al.*, 1994, 1993). Conforme achados, interpretasse em consenso, redução de TH e de L-DOPA, porém nenhuma redução da enzima DDC que converteria L-DOPA em dopamina, dessa forma, supõem-se que a disponibilidade dopaminérgica sináptica está afetada.

Ao analisar especificamente o neurotransmissor dopamina (DA), em protocolos *in vitro* a 10 µM de Cq, verificou-se após 10 minutos de incubação redução em 51% em sua síntese sinaptosomal (ONALI; OLIANAS; BUNSE, 1988) e; após 30 minutos de incubação, inibição de 15 a 25% da síntese de DA mediada por K⁺, e por receptores dopaminérgicos tipo-D2 e tipo-D3 (O'HARA *et al.*, 1996). A aplicação crônica de Cq, na dose de 3 mg/kg, gera alterações no metabolismo da DA, com a redução da produção de metabólitos de sua degradação (DOPAC e HVA) na 1ª hora, e um pequeno aumento dos mesmos após 18 horas da última aplicação (CHO *et al.*, 1999). Conforme espera-se, após alterações na via da síntese dopaminérgica, a dopamina em sua disponibilidade foi afetada. Diretamente com um menor fornecimento

sináptico, os produtos de sua degradação tendem a diminuir em relação aos níveis basais.

Auxiliando o processo de redução da disponibilidade de dopamina, está o Transportador de Dopamina (DAT). O DAT possui meia-vida de dois dias e é sintetizado em maior abundância no estriado devido a maior quantidade de DA nessa área (KIMMEL; CARROLL; KUHAR, 2000), porém com alterações na síntese de DA, sua atividade está alterada. Na aplicação de 0,1 μ M de Cq *in vitro* evidenciase aumento da sua atividade (BATCHELOR; SCHENK, 1998). No entanto, na dose de 0,3 mg/kg de Cq, a sua meia-vida diminua no estriado e aumenta no núcleo accumbens (obs.: revertida/inibida com antagonista para receptores do tipo-D2) (KIMMEL et al., 2001). Além, o aumento da atividade do DAT está envolvido no comportamento de adicção à cocaína (ZAHNISER; SORKIN, 2004). Processo de adicção semelhante também é visualizado na sensibilização dopaminérgica com o uso crônico de Cq (RICHARDS; PAZDERNIK; LEVANT, 2005).

Quanto aos receptores dopaminérgicos presentes no Estriado, submetidos ao uso do Cq na dose de 8 μ mol/kg/h, nenhuma alteração foi verificada na expressão dos receptores do tipo-D1 e nem RNAm para esses, embora o Cq regulou negativamente (diminuiu/*down-regulation*) em 17% os receptores do tipo-D2 no estriado, explicada em partes pela diminuição do nível de RNAm do receptor tipo-D2 (18%). Essas mudanças podem ser devido ao resultado persistente estimulação dos receptores do tipo-D2 (CHEN; ALOYO; WEISS, 1993).

Assim, as alterações elucidadas na síntese, disponibilidade de dopamina, seu transportador, produtos da degradação e seus alvos moleculares, evidenciam efeitos amplos do Cq no sistema dopaminérgico. Tais alterações, de diminuição da síntese e alterações no receptor do tipo-D2 podem estar por trás das alterações comportamentais evidenciadas em animais experimentais, tanto em aplicação aguda quanto crônica desse fármaco.

O Cloridrato de quimpirol aplicado agudamente em roedores via bolus intravenoso e estimulação via eletrodos em Córtex Cingulado-Anterior (CCA) e estriado induz dois tipos de respostas locomotoras, supressão e efeito bifásico (inibição/facilitação locomotora) relacionadas diretamente com a dosagem (HUANG et al., 2013). A aplicação de Cq diminui a atividade motora no primeiro momento de

avaliação no teste do Campo Aberto, aumentando após 30 minutos e permanecendo com efeito platô por 2 horas, indicando uma supressão seguida de ativação. O efeito bifásico ocorre em doses altas (0,5 mg/kg, via subcutâneo (SC); 0,4 mg/kg), já em baixas doses (0,03 mg/kg, SC; 0,1 mg/kg, via intraperitoneal (IP)) ocasiona inibição da locomoção (DREHER; JACKSON, 1989; EILAM; SZECHTMAN, 1989; HUANG *et al.*, 2013; JUNG; SHIM, 2011; SALMI *et al.*, 2000; SZECHTMAN *et al.*, 1994; VAN HARTESVELDT, 1997). A intensidade da inibição locomotora pelo Cq tende a aumentar com a idade, tal como foi avaliado em ratos com 30 e 60 dias (VAN HARTESVELDT, 1997). Doses altas (0,4 mg/kg; 0,5 mg/kg; 1 mg/kg e 10 mg/kg) também induzem *sniffing* (HORVITZ; WILLIAMS; JOY, 2001; SALMI *et al.*, 2000) e estereotipias orais (SZECHTMAN *et al.*, 1994). Durante o período de supressão motora reduz *rearing* e *grooming* (HORVITZ; WILLIAMS; JOY, 2001) e não se visualiza estereotipias, tanto com aplicação aguda quanto crônica (CARPENTER; PAZDERNIK; LEVANT, 2003). A manifestação do efeito supressor do Cq em baixas doses pode ser mediada pela ativação dos autoreceptores tipo-D2, porém pode ocorrer o recrutamento dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos em doses altas, mudando a atividade fisiológica esperada, assim como já foi vista com o agonista dopaminérgico não seletivo Apomorfina no estudo de Fox (FOX; SILLMAN, 1979).

Na aplicação crônica, utilizando o protocolo de 10 aplicações com intervalos de três dias entre cada uma, e na dosagem de 0,5 mg/kg (SZECHTMAN; SULIS; EILAM, 1998) também se observou aumento da distância percorrida (CARPENTER; PAZDERNIK; LEVANT, 2003; CULVER; ROSENFELD; SZECHTMAN, 2000; SZUMLINSKI *et al.*, 1997). Em ratos sensibilizados para aumento da locomoção pela cronicidade do tratamento com Cq, foi encontrado que uma maior eficácia³ da droga é ocasionada quando os processos de tratamento e testagem são realizados em ambientes diferentes, já a realização de ambos os processos em ambiente familiar aumenta a potência⁴ farmacológica (SZUMLINSKI *et al.*, 1997). Outra característica do efeito da aplicação crônica, é que os animais não-primatas desenvolvem checagem compulsiva no teste de Campo Aberto com o Reconhecimento de Objetos, que

³ Eficácia farmacológica: capacidade do fármaco em iniciar alterações funcionais depois de ligado ao seu alvo molecular.

⁴ Potência farmacológica: é a resposta esperada pela ação do fármaco, é dependente da afinidade (ligação ao alvo molecular) e da eficácia (capacidade de gerar efeito).

também são sinais que podem translacionar com aqueles evidenciados em humanos com TEOC (CAMPOS-GARCÍA ROJAS *et al.*, 2015; SZECHTMAN *et al.*, 2001; SZECHTMAN; SULIS; EILAM, 1998). Em 60 minutos após a 11ª aplicação do Cq, observou-se uma diminuição nas taxas de glicose, além de diminuição na atividade neuronal estriatal, CCA (CARPENTER; PAZDERNIK; LEVANT, 2003) e no córtex pré-frontal (RICHARDS; PAZDERNIK; LEVANT, 2005).

1.3. RELAÇÃO ENTRE A ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA NEONATAL E O TRANSTORNO DO ESPECTRO OBSESSIVO-COMPULSIVO

A Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal (EHIN) ocasiona alterações em córtex cerebral, substância cinzenta profunda (estriado e tálamo), substância branca periventricular e subcortical e hipocampo em modelos animais não-primatas (ARTENI *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2007; RUMAJOGEE *et al.*, 2016) e em humanos (ARAUJO; Diniz *in* MARCONDES, 2002), assim como possíveis alterações no desenvolvimento e maturação de elementos neurais do circuito CETC (RAUCH; SAVAGE, 1997). Eventos perinatais, como hipóxia e inflamação, já são bem descritas por aumentar as chances para desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas ao longo do neurodesenvolvimento e na fase adulta (LI; GONZALEZ; ZHANG, 2012; TOHMI *et al.*, 2004). Essas alterações tanto estruturais como funcionais, induzidas pela HI, apresentam correlação com as bases morfofisiopatológicas das características do TEOC. O TEOC, como já evidenciado, apresenta alterações principalmente em regiões do circuito CETC (ABRAMOVITCH *et al.*, 2015; SAXENA *et al.*, 1998; SAXENA; RAUCH, 2000).

Estudos com humanos encontram que crianças com diagnóstico de TEOC apresentam uma maior incidência de insultos perinatais em comparação aos controles; nesses insultos encontram-se complicações durante e após o parto, que são transferíveis àquelas vistas nos quadros de EHIN (GELLER *et al.*, 2008). Evidenciou-se que a morbidade após o uso de instrumentos de parto, como o fórceps, aumentam os riscos para distocia, hipóxia e estresse fetal e que tais eventos precoces podem estar relacionados às psicopatologias tardias de vida, principalmente no aumento do risco de desenvolvimento de TEOC (SAMPAIO *et al.*, 2009). Procedimentos invasivos durante a gestação, atraso no trabalho de parto ou parto

precoce, enforcamento pelo cordão umbilical, assim como o nascimento por cesárea, grande permanência em incubadoras e patologias preexistentes na mãe (uso de medicamentos durante gestação, ganho excessivo de peso, inchaço em mãos, pés e face, hiperemese gravídica) levam a uma maior incidência do RN a vir a desenvolver TEOC (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Desse modo, há duas variáveis perinatais relacionadas à manifestação de TEOC, sendo trabalho de parto prolongado e edema materno durante a gestação (VASCONCELOS *et al.*, 2007). O trabalho de parto prolongado está correlacionado com primiparidade, distocias, traumas obstétricos, hipóxia e estresse fetal (SANTANGELO *et al.*, 1994) e o edema durante a gestação relacionado ao trabalho prematuro, cesárea e complicações neonatais (REY; COUTURIER, 1994; SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005). Vasconcelos e colaboradores (2007) concluíram que a hipóxia e o estresse fetal estão mais proximamente relacionados ao desenvolvimento de TEOC do que o uso de fórceps, embora se saiba que na clínica obstétrica o uso de fórceps é apenas utilizado em dificuldades de parto, como modo de auxílio à expulsão do feto (SANO *et al.*, 2018; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Uma maior suscetibilidade ao TEOC devido a imaturidade encefálica é também sugerida (SANTANGELO *et al.*, 1994).

Poucas bibliografias existem para embasar a relação de fatores não genéticos no desenvolvimento de TEOC em jovens com atenção principalmente em relação ao desenvolvimento (GELLER *et al.*, 2008). Como forma de suprir essas lacunas ainda abertas na literatura, devido aos poucos estudos existentes com humanos e uma ausência de modelos animais não-primatas no que tange ao desenvolvimento de psicopatologias após agravos perinatais, evidenciasse a necessidade da realização de novas pesquisas com caráter analítico tanto de modelos já bem padronizados de EHIN, assim como de TEOC. Tais modelos devem ser submetidos a uma bateria de testes comportamentais e análises histológicas e bioquímicas a fim de atender as demandas científicas. Essas novas pesquisas, atendem além do processo desenvolvimental psicopatológico, o hiato ainda aberto na literatura acerca dos modelos animais de estudo do TEOC. Sabe-se que até o momento, nenhum modelo animal desenvolvido atendeu em conjunto a grande parte das questões translacionais vistas em humanos com TEOC (HOFFMAN; CANO-RAMÍREZ, 2018).

1.4. HIPÓTESE DO TRABALHO

A EHIN desenvolve comportamentos do tipo-ansioso e estereotipados, assim como alterações morfológicas também vistas em quadros de TEOC. Acredita-se que o modelo animal de EHIN possa vir a ser um possível modelo animal candidato no estudo pré-clínico do comportamento do tipo-TEOC, a fim de elucidar os possíveis mecanismos que possam estar alterados durante o neurodesenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Analisar comportamentos do tipo-Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo em ratos Wistar machos submetidos ao modelo experimental de Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal.

2.2. ESPECÍFICOS

a) Identificar comportamento do tipo compulsivo e de ansiedade no modelo de Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal e Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo por meio de testes específicos (Enterramento de Esferas Vítreas, Campo Aberto, Análise de *Grooming* e Labirinto em Cruz Elevada);

b) Avaliar o volume da lesão no estriado e hemisférios no modelo de Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal por meio de técnica histológica;

c) Quantificar a expressão dos receptores dopaminérgicos do tipo-D1 e tipo-D2 no estriado anterodorsal por meio da técnica de imunofluorescência;

d) Correlacionar os achados comportamentais, histológicos e imunobioquímicos nos modelos Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal e Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo, e sugerir mecanismos e vias de ações fisiopatológicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Para este projeto, seguiram-se as normas de manejo e uso de animais em laboratório conforme a Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008), as diretrizes, portarias, resoluções e decretos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)⁵ e os Princípios Internacionais e Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences*) (MACRAE, 2007). O projeto foi aprovado em 23/01/2017 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS sob o número 32163.

3.2. MODELOS EXPERIMENTAIS

Utilizou-se 75 filhotes machos de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar⁶, obtidos no Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Optou-se por não utilizar filhotes fêmeas uma vez que o estradiol influencia no controle dopaminérgico encefálico (PAOLO; POYET; LABRIE, 1981; YOEST; CUMMINGS; BECKER, 2014), podendo afetar o estudo.

As carcaças das progenitoras e dos filhotes utilizados no estudo foram descartadas seguindo as normas éticas padronizadas (BRASIL, 2002, 2004, 2018). Estimou-se perda inferior a 10% dos ratos Wistar submetidos à cirurgia de HI conforme a literatura (PEREIRA *et al.*, 2008, 2009, WEIS *et al.*, 2011, 2012). Os ratos Wistar foram mantidos com alimentação (ração Quimtia[®] - NUVILAB CR-1) e água tratada e filtrada *ad libitum*⁷, em ciclos de 12 horas claro (início: 7 horas) e escuro (início: 19

⁵ Informações sobre legislação em experimentação animal acessar:
<<https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/index.html>>

⁶ Informações sobre taxonomia da espécie acessar:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=10116>>

⁷ *Ad libitum*: do latim, que significa: à vontade, sem restrições.

horas) em salas climatizadas (22°C ± 2°C) e com controle de umidade (40% a 60%) no Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

3.3. DESENHO EXPERIMENTAL

Os ratos foram divididos em três grupos, sendo: Hipóxia-Isquemia Neonatal (HIN), Cloridrato de quimpirol (Cq) e Controle (CONT). A anestesia para marcação das patas com tinta nanquim, com finalidade de diferenciação dos grupos, ocorreu no momento da cirurgia no DPN7.

Conforme figura 5, no grupo HIN os ratos foram submetidos no DPN7 ao protocolo de HI de Levine (1960, adaptado por Rice *et al.*, 1981), conforme descrito no item 1.1.2. Já no grupo Cq, os ratos sofreram injeção do fármaco Cq, conforme protocolo descrito no item 1.2.2. Para o grupo CONT, os ratos foram anestesiados e submetidos apenas à incisão cutânea no pescoço, sem submetê-los à oclusão da artéria carótida e à atmosfera hipóxica, após também sofreram a aplicação crônica de veículo (água (H₂O) destilada) seguindo o mesmo protocolo do Cq. Optou-se por não utilizar um quarto grupo (indução à HI concomitante à aplicação crônica de Cq) uma vez que o Cq demonstrou evidências neuroprotetoras ao reduzir a toxicidade de NMDA e ácido caínico em estriado (BOZZI; BORRELLI, 2006; CEPEDA, 1998; KIHARA *et al.*, 2002; SAWADA *et al.*, 1998), o que poderia vir a interferir no processo lesivo do modelo de EHIN.

Dias Pós-Natais		7 ^o	21 ^o	25 ^o - 60 ^o	61 ^o - 63 ^o
75 Ratos Wistar	HIN	A, I, HI	Separação materna	Nenhuma manipulação	
	Cq	A		<Cq	
	CONT	A, I		<veículo	
					Testes comportamentais

Figura 5 - Desenho Experimental. Legenda: A (anestesia), I (incisão), HIN (hipóxia-isquemia neonatal), <veículo (injeção de veículo), <Cq (injeção de Cloridrato de quimpirol)

Não foi realizado o desmame precoce, o que poderia acarretar em alteração nos dados em análise. A separação materna ocorreu no DPN21 em todos os grupos e as eutanásias das ratas cuidadoras que não foram utilizados ao longo da pesquisa foram realizadas. Para a eutanásia das cuidadoras no DPN21 utilizou-se uma dose

de lidocaína (5mg/kg) associada a uma dose letal de tiopental sódico (100mg/kg) via IP, além de decapitação por guilhotina. Os ratos machos que serão utilizados nos experimentos sofreram mixagem aleatória atendendo aos critérios de haver o menor número possível de irmãos na mesma caixa, assim como uma variabilidade de grupo no mesmo recinto, e alojados de 4 a 6 ratos em novas caixas moradia.

3.4. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL

Para o grupo HIN, os filhotes machos foram submetidos ao protocolo de indução de HI de Levine (1960, adaptado por Rice *et al.*, 1981) no DPN7 (Figura 6), de uso recorrente no laboratório (ARTENI *et al.*, 2003; ODORCYK *et al.*, 2018). Os ratos foram anestesiados com Isoflurano por via inalatória e em seguida foi realizada a oclusão unilateral permanente da artéria carótida direita; permaneceram em recuperação junto às mães por 1 hora mais a metade do tempo entre a primeira cirurgia e a cirurgia final da ninhada, para posterior transferência em uma atmosfera hipóxica (8% de O₂ e 92% de N₂) a 37°C, onde permaneceram por 60 minutos. Logo após serem submetidos à atmosfera hipóxica, os filhotes retornaram até as suas respectivas cuidadoras, até a separação materna no DPN21. Os demais grupos foram anestesiados pela mesma técnica para marcação da pata a fim de diferenciação dos grupos. Para o grupo CONT, além da anestesia, ocorreu a incisão na linha medial do pescoço sem obstrução arterial, além de não submissão à atmosfera hipóxica.

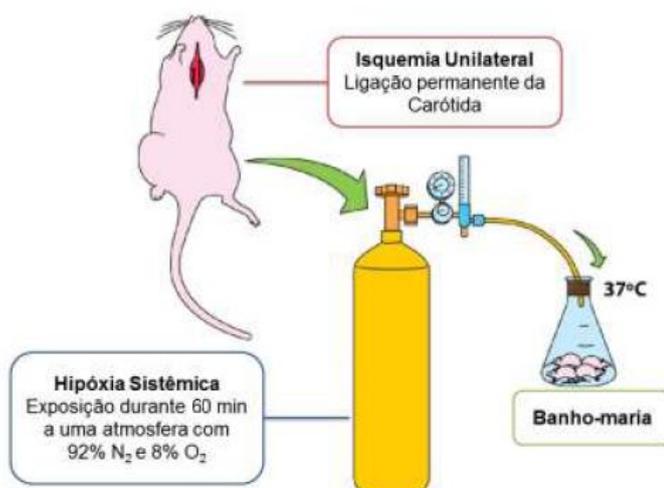


Figura 6 – Esquema do modelo de Levine-Rice. Siglas e símbolos: minuto (min), porcentagem (%), nitrogênio (N₂), oxigênio (O₂), Graus Celsius (°C). **Fonte:** adaptado de Bruna Lora.

3.5. ADMINISTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS: CLORIDRATO DE QUIMPIROL

Para o grupo Cq foi seguido o protocolo de Szechtman e colaboradores (1998), no qual é feita a aplicação crônica de Cq (Sigma-Aldrich®, lote: #023M4617V), na concentração de 0,5mg/Kg, 2x/semana, com intervalos de 3 dias entre as aplicações e com duração de cinco semanas, ou seja, 10 aplicações via IP, iniciando no DPN25 e seguindo até o DPN60. O cálculo médio de fármaco seguiu a curva de peso *versus* idade da Linhagem Wistar segundo o Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP da Universidade de São Paulo (MENEZES, 2013), cada animal recebeu em média 158 µl de fármaco diluído em 7,3 mg/ml de veículo. Para o grupo CONT foi feita apenas feita a aplicação de veículo (H₂O destilada), sendo que foi seguido o mesmo protocolo descrito acima.

3.6. ANÁLISE COMPORTAMENTAL

No DPN61, 24 horas após o fim do protocolo da injeção de Cq (SZECHTMAN; SULIS; EILAM, 1998), os três grupos foram submetidos aos testes comportamentais para verificação de comportamentos do tipo-ansioso, *grooming* e estereotípias, que são sugestivos do comportamento tipo-TEOC. Os testes comportamentais foram realizados até o DPN63.

Os testes utilizados foram: a) Teste do Enterramento de Esferas Vítreas (*Marble Burying Test*) (NJUNG'E; HANDLEY, 1991); b) Teste do Campo Aberto (*Open Field Test*) (CAMPOS-GARCÍA ROJAS *et al.*, 2015) concomitante à c) Análise de Comportamento de Autolimpeza (*Grooming*) (KYZAR; STEWART; KALUEFF, 2016) e; d) Teste do Labirinto em Cruz Elevada (*Elevate Plus Maze Test*) (VIEIRA *et al.*, 2013). Conforme a tabela 1, os testes seguiram a lógica do menos aversivo ao mais aversivo, sendo no 1º dia o de Enterramento de Esferas Vítreas; no 2º dia Campo Aberto e Análise do Comportamento de *Grooming* e; no 3º dia o Teste do Labirinto em Cruz Elevada. Como complemento aos testes, foi descartado a presença de qualquer distúrbio motor pela análise do Teste de Campo Aberto (*Open Field Test*), o que se houvesse poderiam interferir na análise de comportamento tipo-ansioso e estereotípias/compulsões.

abela 1 - Relação da realização dos testes comportamentais

Dias Pós-Natais		61º	62º	63º
Testes Comportamentais	TEEV	X		
	TCA		X	
	TG		X	
	TLCE			X

Legenda: TEEV: Teste do Enterramento das Esferas Vítreas; TCA: Teste do Campo Aberto; TG: Teste de *Grooming*; TLCE: Teste do Labirinto em Cruz Elevada.

3.6.1. Teste do Enterramento de Esferas Vítreas (*Marble Burying Test*)

Segundo Njung'e e Handley (1991), o teste do Enterramento de Esferas Vítreas caracteriza-se pela análise de comportamento tipo-ansioso, comportamento motor e traços de estereotipia por enterramento. Contudo sabe-se que o *burying* (enterramento) não é estimulado por novidade, mas reflete um comportamento de escavação tipo obsessivo-compulsivo (THOMAS *et al.*, 2009). Utilizou-se uma caixa de teste idêntica à caixa-moradia (Figura 8a), medindo 390x320x170 mm, forrada com 30 mm de maravalha friccionada levemente para não haver ondulações e 20 esferas vítreas de 17 mm de diâmetro. A caixa teste foi tampada com gradil durante o uso. Os modelos experimentais foram habituados por 5 minutos apenas na maravalha. Após habituação, retornados à caixa moradia, e assim, as 20 esferas foram distribuídas uniformemente na caixa teste, dispostas em 4 colunas com 5 esferas em cada coluna, espaçadas com 55mm entre cada uniformemente, não as friccionando. Os ratos habituados foram repostos na caixa de teste e deixados durante 10 minutos. Ao final, os ratos foram retirados e feita a análise, por dois avaliadores, anotando quantas esferas vítreas tiveram mais de 2/3 de enterramento na maravalha. Desse modo, o protocolo usado segue as adaptações de Njung'e e Handley (1991) para camundongos, no entanto já se demonstrou que ratos também possuem características de enterramento, os quais checam, cheiram e enterram as esferas vítreas com movimentos circulares do focinho e das patas dianteiras (NJUNG'E; HANDLEY, 1991; POLING; CLEARY; MONAGHAN, 1981).

3.6.2. Teste do Campo Aberto (*Open Field Test*)

O teste do Campo Aberto caracteriza-se pela análise de comportamento tipo-ansioso e locomoção (CAMPOS-GARCÍA ROJAS *et al.*, 2015; SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). Utilizou-se um aparato (Figura 8b) em forma de caixa, medindo 470x480x500mm, que foi dividido em 9 quadrantes de iguais medidas, com a parede frontal do aparato de vidro. Os ratos foram sempre postos no primeiro quadrante esquerdo, próximos à parede de vidro e analisados pelo software ANY-Maze® (Stoelting Co.; Wood Dale, IL, USA; versão 5.2, 2018) por 10 minutos cada animal. Foi utilizada uma câmera filmadora Sony® (Sony Handycam DCR-SR85 Digital) em frente a parede de vidro para captura do vídeo utilizado na análise do Comportamento de Autolimpeza (vide protocolo em 3.6.3). Para a análise do teste foram anotadas as variáveis: distância percorrida, velocidade média, cruzamentos na linha entre o centro e a periferia, entradas na periferia, tempo na periferia, distância percorrida na periferia, entradas no centro, tempo no centro, distância percorrida no centro e latência para primeira entrada no centro.

3.6.3. Teste de Análise do Comportamento de *Grooming* (*Grooming Test*)

O Teste de *Grooming* compreende a análise do comportamento de autolimpeza que é nato aos hábitos dos murinos e apresentasse com um padrão característico (KYZAR; STEWART; KALUEFF, 2016; MAIO *et al.*, 2014; SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992). Esse padrão, conhecido também como cadeia sintática de *grooming*⁸ (Figura 7), quando típico, é caracterizado por uma organização sequencial complexa de movimentos que tem por característica padrões de ação-fixa de progressão cefalocaudal (BERRIDGE *et al.*, 2005). Quando o padrão típico desse comportamento mostrasse alterado, pode ser indicativo de comportamento tipo-TEOC (KALUEFF *et al.*, 2007).

As análises experimentais do *grooming* podem ser realizadas avaliando a sua microestrutura pela divisão do animal em cinco quadrantes (patas dianteiras, face/cabeça, corpo, patas traseiras e genital/cauda), de acordo, as passagens de um quadrante ao outro compreendem as transições e ao conjunto de transições dá-se o

⁸ Cadeia sintática de *grooming*: tradução livre do inglês “*syntactic grooming chain*”.

nome de crises⁹ de *grooming*, sendo que entre uma crise e outra se deve haver um intervalo maior ou igual a 5 segundos, caso contrário caracteriza sequência da mesma crise (KALUEFF *et al.*, 2007). Características de aumento ou diminuição de crises e transições dos níveis controles, alterações no padrão cefalocaudal (incompletudes, incorreções e inversões), designam *grooming* patológico por interferência de comportamento do tipo-ansiedade ou estresse (KALUEFF *et al.*, 2007, 2016; KALUEFF; TUOHIMAA, 2004).

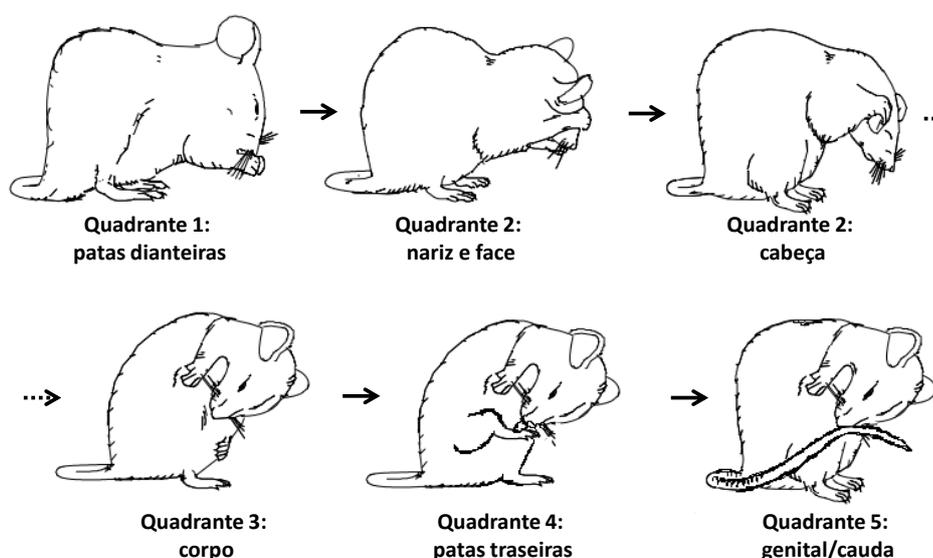


Figura 7 – Cadeia sintática de *grooming*: demonstração das transições pelos quadrantes 1 ao 5 do animal. **Fonte:** adaptado de Berridge *et al.* (2005).

Para esta avaliação, utilizaram-se os vídeos frontais de 10 minutos filmados durante o Teste de Campo Aberto (Figura 8b), anotando as variáveis quanto ao número de: crises totais, crises em múltiplas regiões, crises em região rostral, crises em região caudal, crises completas totais, crises incompletas, crises interrompidas caudal, crises interrompidas rostral, transições totais, transições incompletas, transições interrompidas, transições corretas, transições incorretas, transições incorretas abortadas, transições incorretas fugazes, transições iniciadas invertidas, transições iniciadas incorretamente (KALUEFF *et al.*, 2007, 2016; KALUEFF; TUOHIMAA, 2004) bem como o tempo geral (soma de tempo de todas as crises) de *grooming*. Para região rostral se entende os quadrantes das patas dianteiras e

⁹ Crises de *grooming*: tradução livre do inglês “*bouts*”.

face/cabeça, e para a região caudal considera-se o corpo, as patas traseiras e o genital/cauda (KALUEFF *et al.*, 2007).

3.6.4. Teste do Labirinto em Cruz Elevada (*Elevated Plus Maze Test*)

O teste do Labirinto em Cruz Elevada consiste na avaliação de comportamento tipo-ansiedade, exploração e comportamento motor (ANDREWS; PAPAKOSTA; BARNES, 2014; GULINELLO, 2004; VIEIRA *et al.*, 2013) O mesmo é formado por aparato em forma de cruz, onde os 4 braços apresentam comprimento de 400 mm por diâmetro de 200 mm, e a 500 mm de altura do chão (Figura 8c). Dois dos braços opostos possuem paredes com a altura de 300 mm. O teste foi realizado por 5 minutos para cada animal, sendo o teste analisado por dois avaliadores que observam e anotam as variáveis: número de entradas nos braços fechados e abertos (tanto braços esquerdos quanto direitos) e tempo perdido nesses locais. O comportamento natural do animal é a permanência nos braços fechados sendo os braços abertos aversivos (SIMPSON; KELLY, 2011).

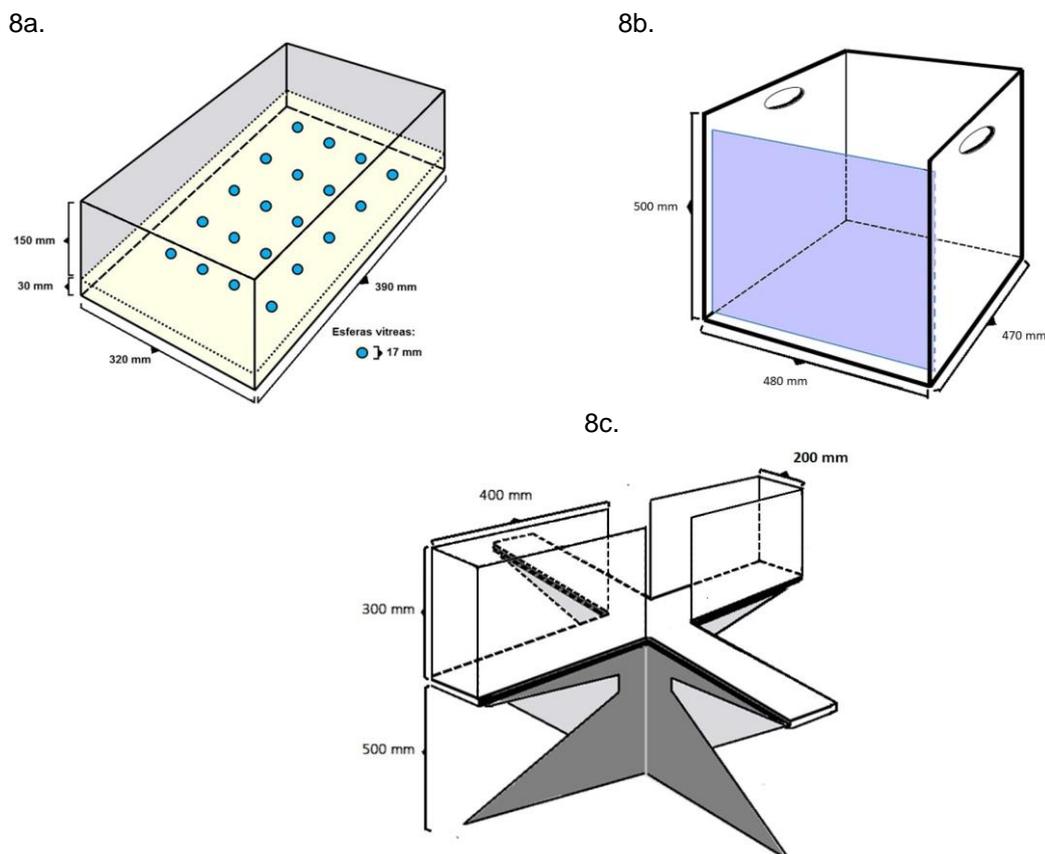


Figura 8 - Ilustração dos aparatos utilizados nos testes comportamentais. 8a: Enterramento de Esferas Vítreas; 8b: Campo Aberto e Comportamento de *Grooming*; 8c: Labirinto em Cruz Elevada. Legenda: mm (milímetro). **Fonte:** autoria própria.

3.7. EUTANÁSIA E PERFUSÃO TRANSCARDÍACA

No DPN64, após os testes comportamentais, os ratos dos três grupos foram eutanasiados para as análises histológicas e bioquímicas. Para as análises histológicas, volume de lesão hipóxico-isquêmica e imunofluorescência, os ratos foram anestesiados com Isoflurano e submetidos à perfusão transcárdica com 150 ml de solução salina 0.9% - solução de lavagem - seguido de 150 ml de paraformaldeído (PFA) 4% - solução fixadora - (75 mL de PFA 8% diluído em 75 mL de solução tampão fosfato com pH 7,4) (Figura 9). Após a perfusão, ocorreu a decapitação e extração imediata dos encéfalos, sendo acondicionados em vials contendo paraformaldeído 4% por 4 horas em temperatura de 4°C. De acordo com o protocolo, depois de retirados do PFA 4%, os encéfalos foram crioprotetidos por 48 horas em solução de sacarose 15% e 30%. Após, as amostras foram congeladas por imersão em isopentano resfriado em nitrogênio líquido, em uma temperatura entre -30 e -40 °C. As amostras foram imediatamente identificadas e embaladas em papel alumínio e acondicionadas em freezer na temperatura de -80°C até o momento do processamento e análise.

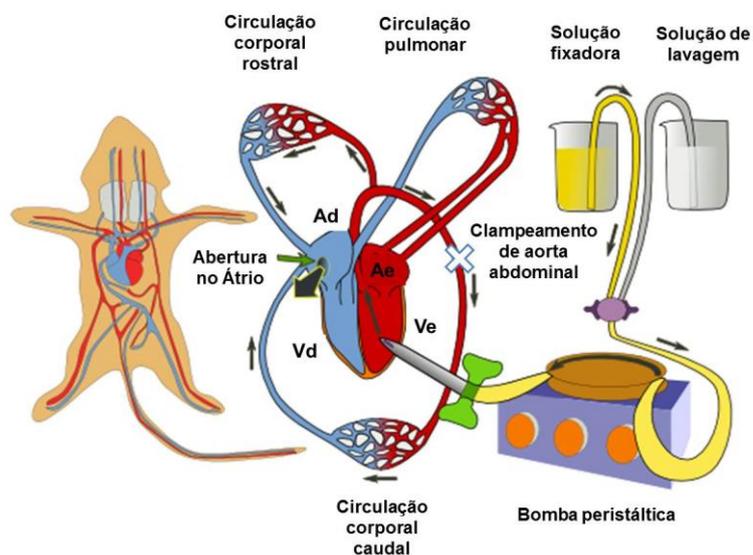


Figura 9 - Esquema da Técnica de Perfusão Transcárdica. Legenda: átrio direito (Ad), átrio esquerdo (Ae), ventrículo direito (Vd), ventrículo esquerdo (Ve). **Fonte:** adaptado do Protocolo de Perfusão da Universidade de Vigo, Espanha¹⁰.

¹⁰ Disponível em <<https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/2-metodos-fijacion.php>>. Acesso em 03 fev 2018.

3.8. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a perfusão transcardíaca, decapitação, extração do encéfalo e a conservação das amostras em freezer a -80°C no Departamento de Bioquímica, foram realizados os cortes no criostato (SLEE medical MEV V1.31 20140613) em secções coronais de $30\ \mu\text{m}$ de espessura como início no Bregma 2.20 e final aproximadamente em Bregma -2.56 (WATSON; PAXINOS, 2012), conforme figura 10, onde coletou-se 3 seqüências de 5 lâminas com ênfase no estriado, sendo que cada lâmina possuía 5 fatias histológicas.

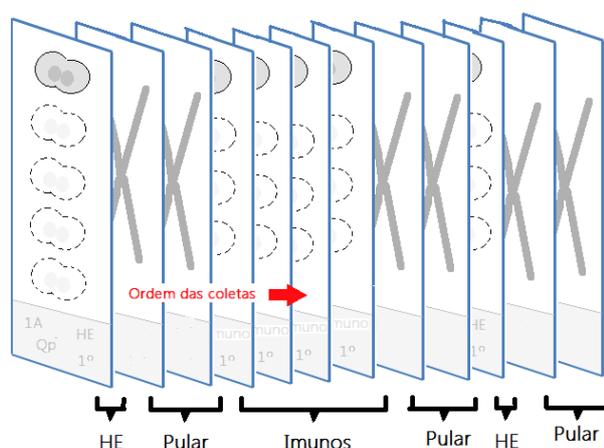


Figura 10 - Sequência do Esquema de Cortes Histológicos. Legenda: HE - lâmina de hematoxilina-eosina (marcação de volume de lesão). **Fonte:** acervo pessoal.

As lâminas indicadas na figura 10 como HE tiveram um espaçamento de $320\ \mu\text{m}$ entre 1º HE e 2º HE e foram coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) para análise do volume da lesão (ver tópicos 3.8.1). As lâminas descritas como Imunos na seqüência 1ª e 3ª, ao menos uma dessas foi submetida à técnica de imunofluorescência (ver tópico 3.8.2.1) para marcação de receptores tipo-D1 e tipo-D2 respectivamente no estriado anterodorsal.

3.8.1. Volume de Lesão

As laminas histológicas foram montadas e a área de interesse (estriados e hemisférios com e sem ventrículos) foi delineada em todos os cortes corados com HE, conforme protocolo instituído no laboratório. As lâminas depois de coradas foram

escaneadas por impressora multifuncional e as imagens das áreas foram analisadas pelo software Image-J[®] v.1.46 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), para aferição de volume de lesão. A análise volumétrica seguiu o Princípio de Cavalieri, $V=A.IS.NS$, onde “V” é a variável volume de lesão, “A” a área da estrutura analisada, “IS” é o intervalo entre as secções e “NS” o número de secções. A área foi analisada em mm², o volume em mm³, e o intervalo em mm (ARTENI *et al.*, 2010).

3.8.2. Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi realizada utilizando-se secções coronais dos encéfalos coletados. O protocolo consistiu resumidamente em: as lâminas contendo os cortes encefálicos foram lavados com salina tamponada com fosfato (PBS) e, após, bloqueadas por 30 min em uma solução contendo 3% de soro normal de cabra (NGS) (Sigma-Aldrich, USA) diluído em PBS Triton X-100 à 0,3% (PBS-Tx) em temperatura ambiente (NICOLA *et al.*, 2016). Em seguida, as secções foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários anti-D1 (1:200, MAB5290 da Chemicon[®]) para a identificação dos receptores dopaminérgicos do tipo-D1 e anti-D2 para identificação dos receptores dopaminérgicos do tipo-D2 (1:500, AB5084P da Chemicon[®]) diluídos em PBS-Tx e NGS e mantidas em câmara fria (4°C). No dia seguinte, as secções foram lavadas em PBS e incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes compatíveis, anti-mouse para tipo-D1 (Alexa-Fluor 555, Molecular Probes, Invitrogen, EUA) e anti-rabbit para tipo-D2 (Alexa-Fluor 488, Molecular Probes, Invitrogen, EUA) diluídos em PBS-Tx e NGS por 2 horas em uma sala escura (temperatura ambiente), seguida de lavagem em PBS. Após as lâminas foram cobertas com meio de montagem PVA-DABCO (Fluka Analytical) e lamínulas. Para o controle negativo, alguns cortes foram incubados apenas com os anticorpos secundários. Todas as amostras foram processadas concomitantemente e incubadas durante o mesmo tempo médio. Decorrido o procedimento acima descrito, se utilizou o microscópio confocal (Olympus FV1000) para a visualização das marcações fluorescentes e captura das imagens (NICOLA *et al.*, 2016).

3.8.2.1. Quantificação da imunofluorescência

Para comparar quantitativamente a marcação de imunofluorescência para as marcações de receptores tipo-D1 e tipo-D2, nós escolhemos a região anterodorsal do estriado para a análise de intensidade de fluorescência uma vez que esse local é onde ocorre a entrada do circuito vindo do córtex pré-frontal (CHOI; DING; HABER, 2017; MORRIS *et al.*, 2016). Uma área de interesse foi estipulada (3800 μm^2), e para a análise da intensidade de tipo-D1 e tipo-D2 foi utilizada uma lâmina histológica contendo cinco cortes da região estriatal anterodorsal, capturadas ao total de 10 imagens (5 para cada hemisfério).

Após a captura, as imagens foram analisadas com o programa Image-J[®], onde o valor da densidade integrada por unidade de área foi obtida. Os valores das áreas de interesse de cada imagem foram usados para obter a intensidade de coloração média de receptores tipo-D1 e tipo-D2 para cada secção, se utilizando da densidade integrada / área de interesse (NICOLA *et al.*, 2016).

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram descritos em média e erro padrão, e submetidos à análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações seguido do teste de *post-hoc* de Duncan. As comparações entre dois grupos foram realizadas pelo Teste *T* de *Student* para Amostras Independentes. O nível de significância aceito foi de $p \leq 0,05$ para todos os testes estatísticos. Os testes comportamentais e análises histológicas/bioquímicas foram realizadas utilizando o programa SPSS[®] versão 19.0 e os gráficos montados pelo *Microsoft Excel*[®] versão 14.0 (32 bits).

4. RESULTADOS

4.1. TESTES COMPORTAMENTAIS

Ao total foram avaliados 68 ratos Wistar, sendo 22 HI, 20 Cq e 26 CONT. Ocorreram 7 mortes (9,34%) antes do início dos testes comportamentais, sendo 6 (8%) durante a cirurgia de HI e 1 (1,34%) Controle. A perda menor de 10% nos modelos submetidos à HI seguiu o previsto na literatura (PEREIRA *et al.*, 2008, 2009, WEIS *et al.*, 2011, 2012). Como desfecho primário, escolheu-se o Teste de Análise de *Grooming* e nesse a variável de crises incorretas (KALUEFF *et al.*, 2007).

4.1.1. Teste de Enterramento das Esferas Vítreas (*Marble Burying Test*)

O teste de enterramento de bolas-vítreas é sensível a comportamentos estereotipados. Em nosso estudo não evidenciamos resultados significativos pelo teste de ANOVA ($F(2,66) = 0,428$, $p = 0,654$) conforme figura 11. As médias de enterramento foram de $10,2 \pm 0,7$ enterradas para o Controle, $10,9 \pm 1,0$ para HI e $9,7 \pm 0,9$ para Cq. Assim sendo, tal protocolo utilizado para esse teste, não foi sensível de expressar comportamentos perseverantes do tipo enterramento.

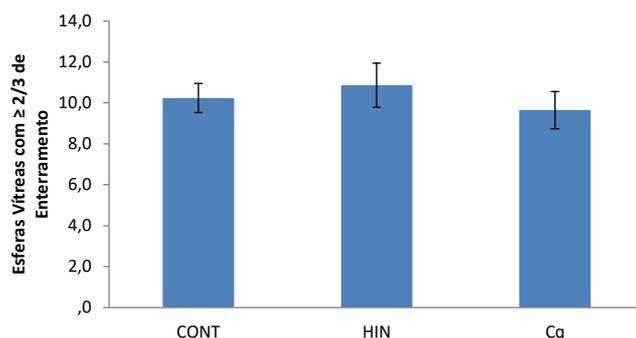


Figura 11 – Análise do teste de enterramento das esferas vítreas. Número de esferas vítreas com mais de 2/3 de enterramento - Dados expressos pela média por grupo \pm erro padrão. N = 20-25 por grupo. ANOVA, $p > 0,05$. Legenda: Controle (CONT), Hipóxia-Isquemia Neonatal (HIN) e Cloridrato de quimpirol (Cq).

4.1.2. Teste do Campo Aberto (*Open Field Test*)

No teste do campo aberto, o qual é sensível para análises de locomoção e comportamento tipo-ansioso, não se encontrou diferenças nas variáveis: distância percorrida ($F(2,66) = 0,729$, $p = 0,487$); número de cruzamentos na linha ($F(2,66) = 0,667$, $p = 0,517$); número de entradas na periferia ($F(2,66) = 0,510$, $p = 0,603$); distância percorrida na periferia ($F(2,66) = 0,544$, $p = 0,583$); número de entradas no centro ($F(2,66) = 0,891$, $p = 0,415$); tempo na área central ($F(2,66) = 2,330$, $p = 0,105$); e distância percorrida no centro ($F(2,66) = 1,257$, $p = 0,291$). No tempo na periferia, os do grupo HIN ($553,2 \pm 6,6$ s) apresentaram uma redução no tempo de permanência nesse quadrante do campo aberto, quando comparados com o grupo CONT ($1767,1 \pm 435,3$ segundos) e com o grupo Cq ($2611,8 \pm 575,4$ segundos) ($F(2,66) = 6,046$, $p = 0,004$) conforme demonstrado na figura 12a. Em relação à latência para primeira entrada na área central do campo aberto, o grupo HIN ($17,7 \pm 4,3$ segundos) apresentou menor latência em comparação com o grupo Cq ($212,4 \pm 63,8$ segundos), ambos os grupos, HIN e Cq, não apresentaram diferenças em relação ao grupo CONT ($114,7 \pm 35,2$ segundos) ($F(2,66) = 5,525$, $p = 0,006$) como evidencia a figura 12b. Conforme os achados, evidencia-se que o grupo HIN permaneceu menos tempo na periferia do aparato, demonstrando menor ansiedade e/ou impulsividade.

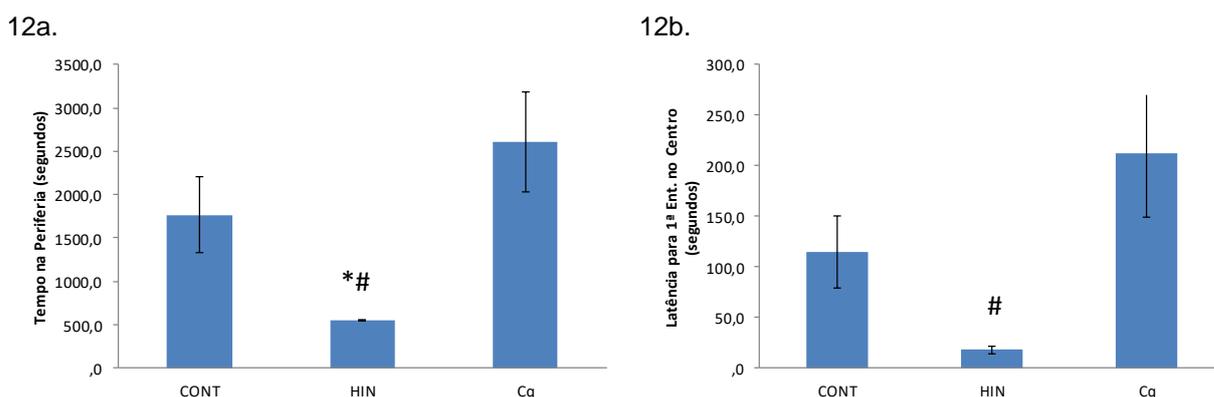


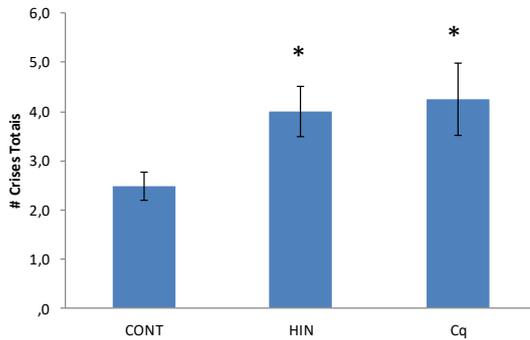
Figura 12 - Análise do teste de Campo Aberto – imagem 12a. Tempo na Periferia, expresso em segundos; Imagem 12b: Latência para a Primeira Entrada na Área Central, também expressa em segundos. Dados expressos pela média por grupo \pm erro padrão. N = 20-25 por grupo. ANOVA de uma via seguida por *post-hoc* de Duncan. * Diferença para o grupo Controle; # Diferença para o grupo Cq. Legenda: Controle (CONT), Hipóxia-Isquemia Neonatal (HIN) e Cloridrato de quimpirol (Cq).

4.1.3. Teste de Análise do Comportamento de *Grooming* (*Grooming Test*)

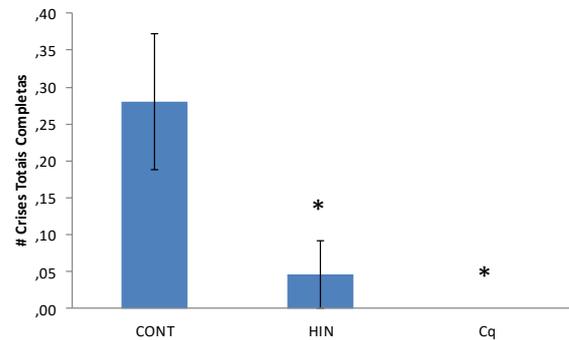
O teste de análise de *grooming*, como já mencionado, é passível de correlação com comportamentos estereotipados/compulsivos (KYZAR; STEWART; KALUEFF, 2016; MAIO *et al.*, 2014; SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992). Nesse teste não se evidenciou diferenças entre os grupos experimentais nas variáveis: crises em múltiplas regiões ($F(2,66) = 0,735$, $p = 0,484$), crises em região rostral ($F(2,66) = 1,902$, $p = 0,158$), crises caudais interrompidas ($F(2,66) = 1,716$, $p = 0,188$), crises rostrais interrompidas ($F(2,66) = 2,308$, $p = 0,108$), transições interrompidas ($F(2,66) = 2,213$, $p = 0,118$), transições corretas ($F(2,66) = 0,439$, $p = 0,647$), transições iniciadas invertidas ($F(2,66) = 2,666$, $p = 0,077$) e tempo de *grooming* em segundos ($F(2,66) = 2,533$, $p = 0,087$).

Nas variáveis crises de *grooming*, encontrou-se que no número de crises totais (ct), o grupo HIN ($4 \pm 0,5$ ct) e o Cq ($4,25 \pm 0,7$ ct) mostraram um aumento em relação ao grupo Controle ($2,48 \pm 0,3$ ct) ($F(2,66) = 3,718$, $p = 0,03$) (Figura 13a). Pelo número de crises completas totais (cct), o grupo HIN ($0,0455 \pm 0,0$ cct) demonstrou uma redução e Cq ($0,0 \pm 0,0$ cct) ausência comportamental em comparação com o grupo Controle ($0,28 \pm 0,1$ cct) ($F(2,66) = 5,606$, $p = 0,006$) (Figura 13b). No número de crises incompletas (ci), o grupo HIN ($3,95 \pm 0,5$ ci) e o grupo Cq ($4,25 \pm 0,7$ ci) foram diferentes do grupo Controle ($2,2 \pm 0,3$ ci), apresentando um maior número de crises ($F(2,66) = 5,075$, $p = 0,009$) (Figura 13c). Em relação ao número de crises na região caudal (crc), o grupo Cq ($1,1 \pm 0,3$ crc) se demonstrou diferente do grupo controle ($0,32 \pm 0,1$ crc), mas permaneceu igual ao grupo HIN ($0,95 \pm 0,2$ crc) ($F(2,66) = 3,539$, $p = 0,035$) (Figura 13d). Conforme os achados, são encontradas similaridades no comportamento da microestrutura de *grooming* entre os grupos HIN e Cq.

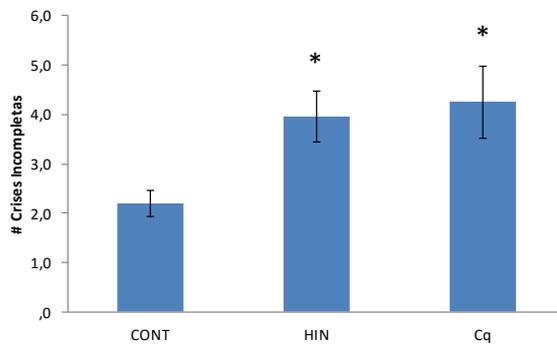
13a.



13b.



13c.



13d.

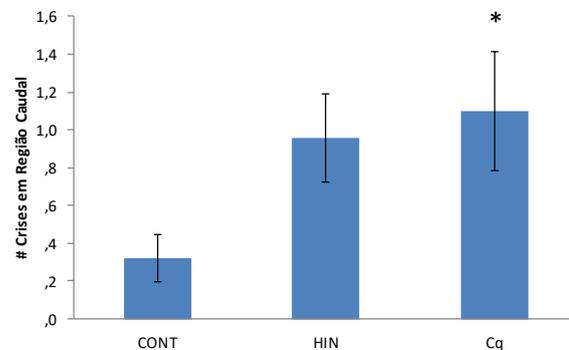


Figura 13 - Análise do *Grooming*: crises – Imagem 13a. Crises Totais; Imagem 13b. Crises Totais Completas; Imagem 13c. Crises Incompletas e; Imagem 13d. Crises em Região Caudal. Dados expressos pela média por grupo \pm erro padrão. N = 20-25 por grupo. ANOVA de uma via seguida por *post-hoc* de Duncan. * Diferença para o grupo Controle. Legenda: Controle (CONT), hipóxia-Isquemia Neonatal (HIN) e Cloridrato de quimpirol (Cq). Obs.: na imagem 13b., o grupo Cq não apresentou nenhuma crise total completa.

Nas transições de *grooming*, encontrou-se que na variável número de transições totais (tt) os grupos HIN ($16,2 \pm 2,5$ tt) e Cq ($16,5 \pm 2,7$ tt) mostraram um aumento com relação ao grupo Controle ($9,44 \pm 1,2$ tt) ($F(2,66) = 3,667$, $p = 0,031$) (Figura 14a). No número de transições incorretas (ti), o HI ($8,41 \pm 1,6$ ti) e o Cq ($8,85 \pm 2$ ti) mostraram também aumento quando comparado ao grupo Controle ($3,32 \pm 0,4$ ti) ($F(2,66) = 5,018$, $p = 0,009$) (Figura 14b). Em relação ao número de transições iniciadas incorretamente (tii), os grupos HIN ($1,86 \pm 0,4$ tii) e Cq ($2,45 \pm 0,8$ tii) mostraram também aumento das mesmas com relação ao Controle ($0,52 \pm 0,1$ tii) ($F(2,66) = 4,606$, $p = 0,014$) (Figura 14c). Quanto ao número de transições incorretas fugazes (tif), o grupo HIN ($1,09 \pm 0,3$ tif) mostrou aumento só quando comparado ao

grupo Controle ($0,08 \pm 0,1$ tif), mas nenhum efeito com relação ao grupo Cq ($0,6 \pm 0,2$ tif) ($F(2,66) = 5,295$, $p = 0,007$) (Figura 14d) e já no número de transições incorretas abortadas (tia), o grupo Cq ($4,25 \pm 0,9$ tia) mostrou um efeito de aumento só com relação ao grupo Controle ($2,12 \pm 0,2$ tia), mas não para o grupo HIN ($3,09 \pm 0,5$ tia) ($F(2,66) = 3,699$, $p = 0,030$) (o gráfico da variável transições incorretas abortadas não foi demonstrado na imagem 14). Conforme análise dos resultados, os grupos HIN e Cq foram semelhantes na análise da microestrutura do *grooming* em questão do fator transições.

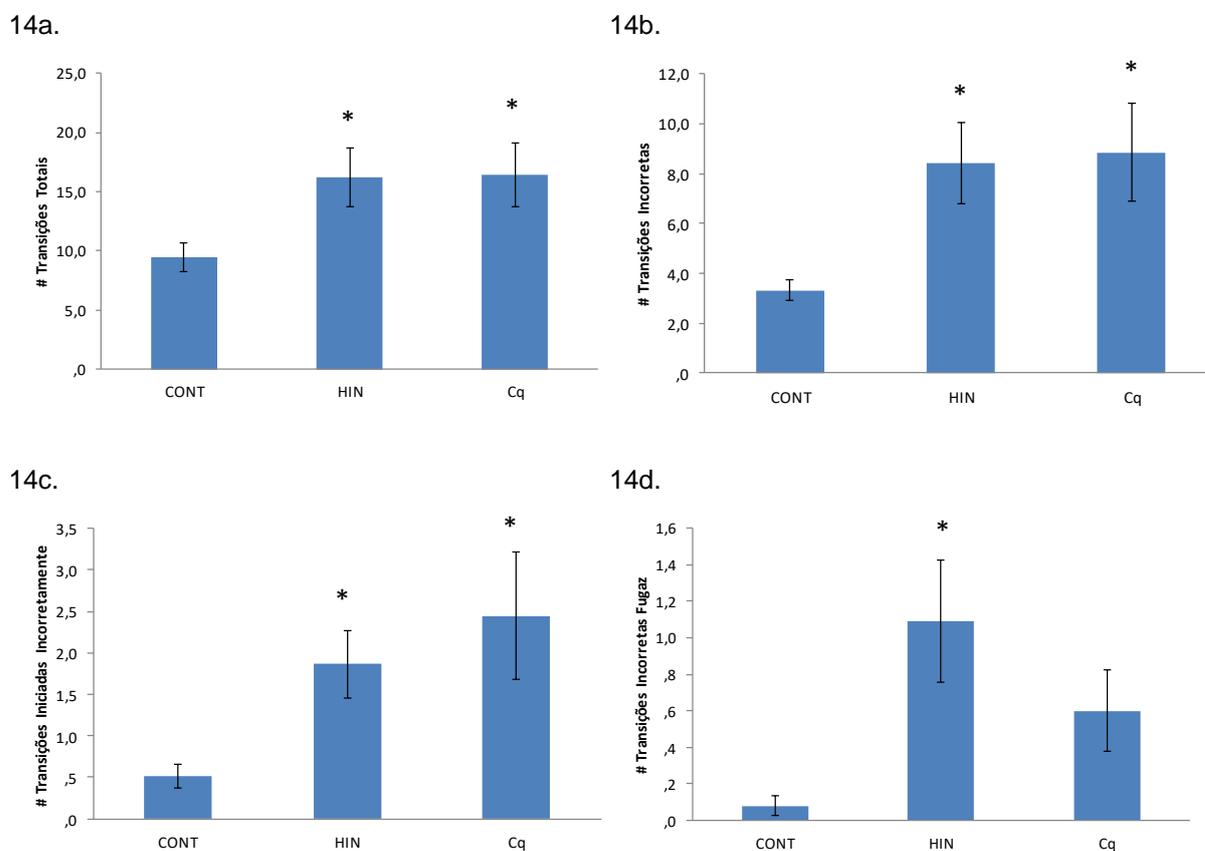


Figura 14 - Análise do *Grooming*: transições - Imagem 14a. Transições Totais; Imagem 14b. Transições Incorretas; 14c. Transições Iniciadas Incorretamente e; 14d. Transições Incorretas Fugaz. Dados expressos pela média por grupo \pm erro padrão. N = 20-25 por grupo. ANOVA de uma via seguida por *post-hoc* de Duncan. * Diferença para o grupo Controle. Legenda: Controle (CONT), Hipóxia-Isquemia Neonatal (HIN) e Cloridrato de quimpirol (Cq).

4.1.4. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated Plus Maze Test*)

O teste do Labirinto em Cruz Elevado avalia comportamentos do tipo-ansioso. As variáveis analisadas não demonstraram alterações nos grupos experimentais, são elas: *Entradas no Braço Fechado Esquerdo* ($F(2, 66) = 1,567, p = 0,216$), *Entrada no Braço Fechado Direito* ($F(2,66) = 1,561, p = 0,218$), *Entrada nos Braços Fechados* ($F(2,66) = 1,824, p = 0,170$), *Tempo nos Braços Fechados* ($F(2,66) = 2,075, p = 0,134$), *Entradas no Braço Aberto Esquerdo* ($F(2,66) = 2,761, p = 0,071$), *Entradas no Braço Aberto Direito* ($F(2,66) = 1,593, p = 0,211$), *Entradas nos Braços Abertos* ($F(2,66) = 2,307, p = 0,108$) e *Tempo nos Braços Abertos* ($F(2,66) = 1,577, p = 0,215$). Pela análise desse teste, e em comparação ao teste do campo aberto, evidencia-se que o comportamento do tipo-ansioso é uma medida pouco sensível nos protocolos utilizados. Na tabela 2 são apresentadas as médias \pm erros-padrões por grupo e variável deste teste, todos expressos em segundos.

	Cont	HIN	Cq
Ent BFE	5,68 \pm 0,53	5,73 \pm 0,43	4,55 \pm 0,58
Ent BFD	5,36 \pm 0,43	5,18 \pm 0,51	4,25 \pm 0,46
Ent Tot BF	11,04 \pm 0,89	10,91 \pm 0,88	8,8 \pm 0,95
Tempo BF	130,56 \pm 10,77 s	134,69 \pm 11,14 s	103,95 \pm 11,74 s
Ent BAE	3,88 \pm 0,33	3,73 \pm 0,26	4,85 \pm 0,47
Ent BAD	3,76 \pm 0,34	4,19 \pm 0,43	4,85 \pm 0,53
Ent Tot BA	7,64 \pm 0,64	7,91 \pm 0,63	9,7 \pm 0,91
Tempo BA	100,8 \pm 12,65 s	110,39 \pm 11,50 s	130,7 \pm 11,34 s

Tabela 2 - Labirinto em cruz elevada. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão nos diferentes grupos experimentais. N = 20-25 por grupo. Teste de ANOVA de uma via seguida. Legenda: Segundos (s), Entradas (Ent), Braço Fechado Esquerdo (BFE), Braços Fechado Direito (BFD), Braços Fechados (BF), Braço Aberto Esquerdo (BAE), Braço Aberto Direito (BAD), Braços Abertos (BA), Controle (CONT), Hipóxia-Isquemia Neonatal (HIN) e Cloridrato de quimpiról (Cq).

4.2. ANÁLISES HISTOLÓGICAS E DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

4.2.1. Volume de Lesão

A análise volumétrica de estruturas cerebrais é utilizada para verificar a extensão da lesão HI por meio da quantificação da perda tecidual cerebral em lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina (Figuras 15c, 15d e 15e). O volume da lesão é obtido conforme o método descrito anteriormente, tópico 3.8.1. Foram aferidas

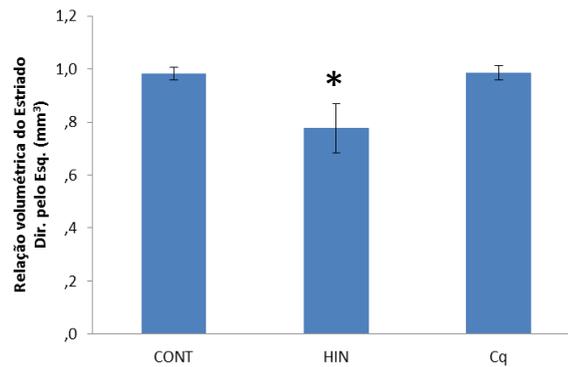
medidas para estriados e hemisférios (com e sem ventrículos) bilateralmente, assim como a relação dessas estruturas do lado direito pelo esquerdo.

Na análise volumétrica do estriado, não se mostrou evidências de alterações morfológicas bilateralmente: estriado direito ($F(2,26) = 3,270$, $p = 0,355$), estriado esquerdo ($F(2,26) = 3,270$, $p = 0,616$) (dados não ilustrados). Embora, na relação volumétrica do estriado direito (lesionado) pelo esquerdo, mostrou atrofia no grupo HIN ($0,78 \pm 0,93 \text{ mm}^3$) em relação ao grupo Controle ($0,98 \pm 0,25 \text{ mm}^3$), no entanto, o grupo Cq ($0,99 \pm 0,27 \text{ mm}^3$) não sofreu alterações em decorrência do fármaco ($F(2,26) = 3,773$, $p = 0,038$) (Figura 15a).

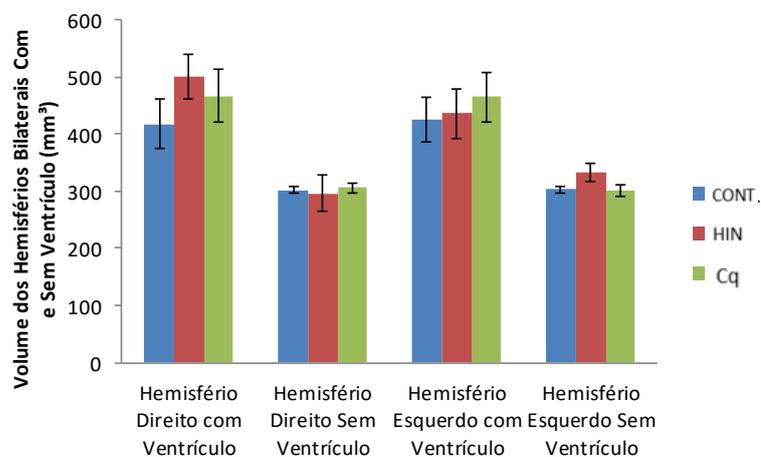
Na observação dos hemisférios com e sem ventrículos, nenhuma modificação volumétrica significativa foi encontrada: hemisfério direito com ventrículo ($F(2,26) = 3,270$, $p = 0,800$), hemisfério direito sem ventrículo ($F(2,26) = 0,048$, $p = 0,953$), hemisfério esquerdo com ventrículo ($F(2,26) = 3,270$, $p = 0,410$), hemisfério esquerdo sem ventrículo ($F(2,26) = 2,380$, $p = 0,114$) (Figura 15b). Da mesma forma das análises anteriores dos hemisférios, porém agora na relação do lado direito pelo esquerdo, não se evidenciou efeito entre os grupos com os ventrículos ($F(2,26) = 3,270$, $p = 0,055$) e sem os ventrículos ($F(2,26) = 1,913$, $p = 0,170$) (dados não ilustrados).

Conforme análise volumétrica das estruturas, o modelo de EHIN causou leve atrofia de estriado direito, mas não no hemisfério total de mesmo lado, tal atrofia deve-se possivelmente à perda de tecido estriatal pela necrose sem necessariamente afetar o tecido branco e o córtex cerebral. Já o grupo Cq, não apresentou alterações.

15a.



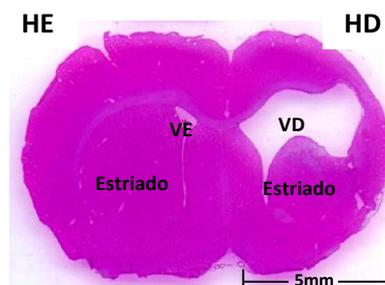
15b.



15c. CONT



15d. HIN



15e. Cq

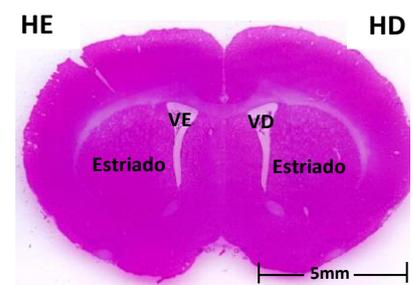
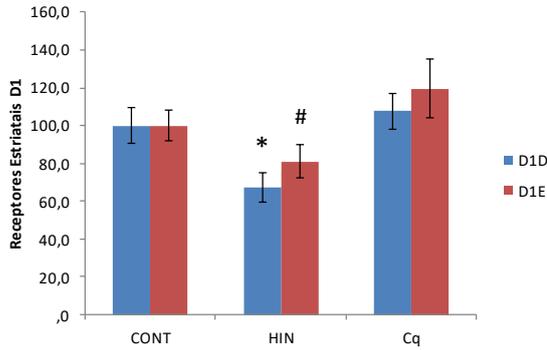


Figura 15 - Análise de volume tecidual: estriados e hemisférios. Imagem 15a. Relação Volumétrica do Estriado Direito pelo Esquerdo, em mm³; 15b. Volume de Hemisférios Bilaterais com e sem Ventriculos, em mm³; 15c, 15d e 15e. Cortes coronais do encéfalo corados com hematoxilina-eosina, e identificação de estruturas encefálicas de interesse (hemisférios, ventriculos e estriados bilaterais) nos três grupos experimentais. Relação do volume estriatal e hemisférico com e sem ventriculo, e amostras histológicas do grupo CONT, HIN e Cq. Dados expressos pela média por grupo ± erro padrão. N = 8-10 por grupo. ANOVA de uma via seguida por *post-hoc* de Duncan. * Diferença para o grupo Controle. Legenda: Controle (CONT), Hipóxia-Isquemia Neonatal (HIN), Cloridrato de quimpirol (Cq), Hemisfério Direito (HD); Hemisfério Esquerdo (HE), Ventriculo direito (VD) e Ventriculo Esquerdo (VE). **Fonte:** imagens de autoria própria.

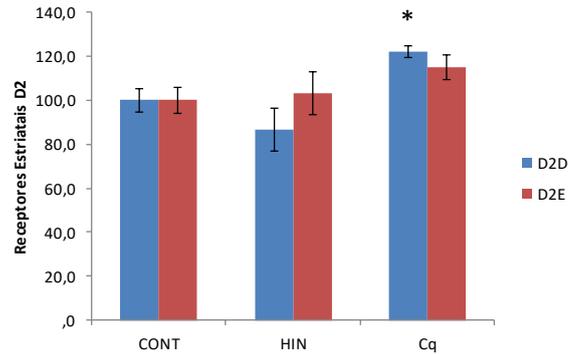
4.2.2. Imunofluorescência

A avaliação da imunofluorescência em região anterodorsal do estriado foi mensurada para cada hemisfério e tipos de receptores (D1 e D2). Quanto à expressão de receptores do tipo-D1, evidentes na figura 16a, o estriado direito apresentou diminuição dos níveis de expressão (ne) para o grupo HIN ($67,4 \pm 7,9$ ne) em relação ao Controle ($100 \pm 9,4$ ne), porém para o grupo Cq ($107,7 \pm 9,4$ ne) não ocorreu alterações (D1D: $F(2,19) = 6,345$, $p = 0,009$). Já em relação ao estriado esquerdo não se evidenciou diferenças significativas (D1E: $F(2,19) = 3,145$, $p = 0,069$). Quanto à análise do receptor do tipo-D2 conforme imagem 16b, o mesmo mostrou alterações estriado direito apenas em grupo Cq ($122,3 \pm 2,7$ ne) com relação ao Controle ($100 \pm 5,5$ ne), estando a expressão do grupo HIN ($86,6 \pm 9,5$ ne) inalterada (D2D: $F(2,18) = 6,740$, $p = 0,008$). Em relação à expressão de receptores do tipo-D2 em hemisfério esquerdo, não demonstrou diferenças significativas entre os grupos ($F(2,19) = 0,907$, $p = 0,422$). Para, além disso, as relações entre D1/D2 e ipsilateral/contralateral também foram aferidas e demonstradas nas figuras 16c (D1IpsiCont: $F(2,19) = 1,803$, $p = 0,195$ e D2IpsiCont: $F(2,19) = 3,567$, $p = 0,051$) e 16d (ReID1eD2D: $F(2,18) = 2,595$, $p = 0,104$ e ReID1eD2E: $F(2,19) = 1,735$, $p = 0,206$) onde nenhuma relação demonstrou resultados significativos entre os grupos.

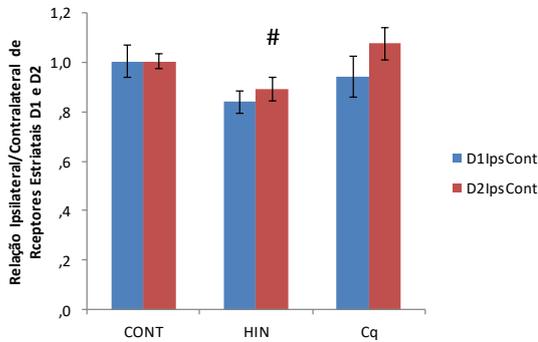
16a.



16b.



16c.



16d.

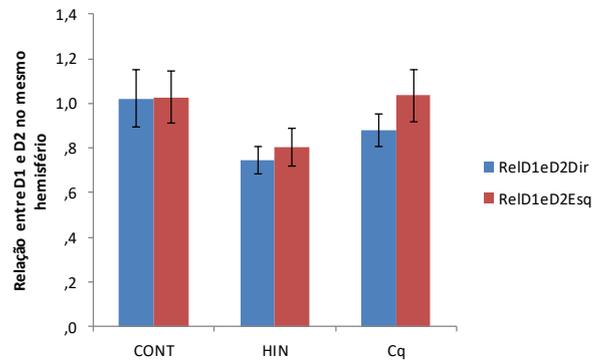


Figura 16 - Análise de Receptores Dopaminérgicos do tipo-D1 e D2 no Estriado Anterodorsal. Imagem 16a. Receptores Estriatais do tipo D1; 16b. Receptores Estriatais do tipo D2. 16c. Relação Ipsilateral/Contralateral de Receptores Estriatais D1 e D2; 16d. Relação entre D1 e D2 em mesmo hemisfério. (Figura a, b, c e d em % de níveis de fluorescência) - Dados expressos pela média por grupo \pm erro padrão. N = 6-8 por grupo. ANOVA de uma via seguida por *post-hoc* de Duncan para comparações com o controle. * Diferença para o grupo Controle; # Diferença para o grupo Cq. Legenda: Controle (CONT), Hipóxia-Isquemia Neonatal (HIN); Cloridrato de quimpirol (Cq); receptores dopaminérgicos tipo-D1 (D1); receptores dopaminérgicos tipo-D2 (D2); D1 estriado direito (D1D); D2 estriado direito (D2D); D1 estriado esquerdo (D1E); D2 estriado esquerdo (D2E); D1 relação ipsilateral/contralateral (D1IpsCont); D2 relação ipsilateral/contralateral (D2IpsCont); relação entre D1 e D2 no estriado direito (ReID1eD2Dir); relação entre D1 e D2 no estriado esquerdo (ReID1eD2Esq). Obs.: pelo resultado de D2IpsCont ser limítrofe ao $p = 0,05$, a diferença entre os grupos foi demonstrado com “#” no gráfico 16c.

Ao avaliarmos a diferença de expressão ipsilateral estriatal de receptores dopaminérgicos do tipo-D1 e D2 (Figuras 17a e 17b), o grupo Controle não apresentou diferenças, portanto demonstrou mesmas expressões em estriado direito (D1D: $368,7 \pm 40,6$ e D2D: $405 \pm 28,7$, $p = 0,482$) e estriado esquerdo (D1E: $323,8 \pm 32,2$ e D2E: $383,3 \pm 23,1$, $p = 0,165$), assim sendo, aferiu-se tais medidas para os grupos HIN e Cq. No grupo HIN, os receptores do tipo-D1 estão menos expressos que os receptores do tipo-D2 para estriado direito (D1D: $268 \pm 21,2$ e D2D: $373,2 \pm 27,9$, $p = 0,009$)

assim como para o esquerdo (D1E: $280,3 \pm 25,6$ e D2E: $402,6 \pm 37,7$, $p = 0,018$) e semelhante diferença de expressão também foi vista para o grupo Cq no estriado direito (D1D: $377 \pm 29,6$ e D2D: $473,9 \pm 8,2$, $p = 0,021$), porém nenhum efeito para o estriado esquerdo (D1E: $375,3 \pm 51,3$ e D2E: $438,7 \pm 23$, $p = 0,297$). Conforme análises, evidenciou-se que os receptores do tipo-D1 foram sensíveis à diminuição de sua expressão apenas em estriado anterodorsal ipsilateral ao insulto da HI e os receptores do tipo-D2 também em lado direito, porém como aumento de sua expressão devido à ação farmacológica. No entanto, em ambos os grupos, a expressão de receptores do tipo-D1 foi menor que a expressão de receptores do tipo-D2 em análise ipsilateral do estriado anterodorsal.

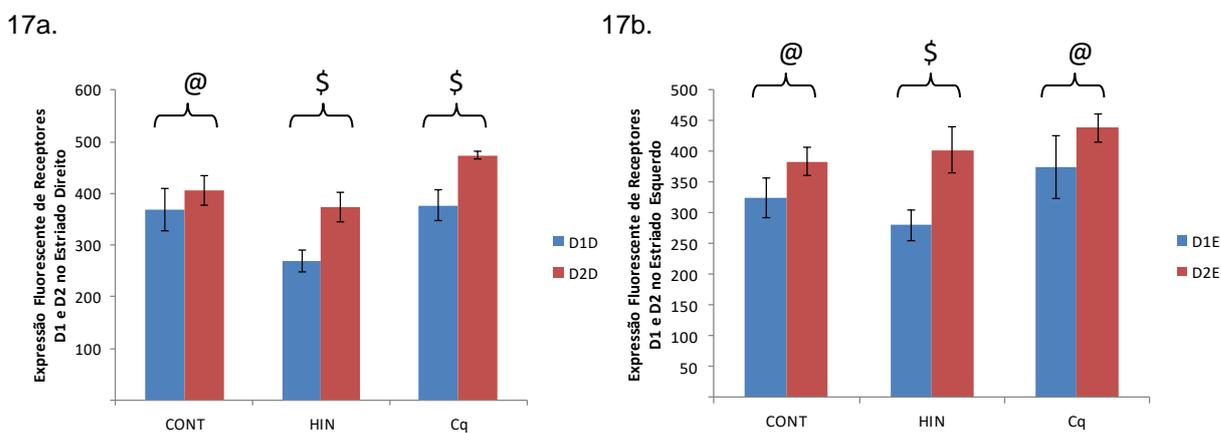


Figura 17 – Análise da Relação de Receptores Dopaminérgicos do Tipo-D1 e D2 em Estriado Anterodorsal Ipsilateral. Imagem 17a. Expressão da Fluorescência de Receptores D1 e D2 no Estriado Direito; Imagem 17b. Expressão Fluorescente de Receptores D1 e D2 no Estriado Esquerdo, ambas imagens demonstradas por níveis de fluorescência - Dados expressos pela média por grupo \pm erro padrão. N = 6-8 por grupo. Teste-T de *Student* para comparação em pares. Símbolos: @: igualdade entre os grupos; \$: diferença entre os grupos. Legenda: Controle (CONT), Hipóxia-Isquemia Neonatal (HIN); Cloridrato de quimpirol (Cq); D1 estriado direito (D1D); D2 estriado direito (D2D); D1 estriado esquerdo (D1E); D2 estriado esquerdo (D2E).

5. DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados confirmam a hipótese de trabalho em que o comportamento do tipo estereotipado/compulsivo está presente nos ratos Wistar que sofrem HIN, apresentando características similares às aquelas encontradas no modelo do tipo-TEOC. Embora, não se encontre a manifestação de estereotipia do tipo enterramento, evidenciaram-se alterações na microestrutura do *grooming* que se relaciona com o comportamento do tipo-TEOC. Além disso, animais submetidos à HIN apresentam comportamento do tipo-ansioso (sem controle inibitório de exploração) em comparação com os demais grupos experimentais, na análise do campo aberto. Na avaliação da expressão dos receptores dopaminérgicos, ratos submetidos à HIN apresentaram uma perda na expressão de receptores do tipo-D1, enquanto que aqueles que receberam administração de Cloridrato de quimpirol (Cq) tiveram aumento de receptores do tipo-D2. Porém, ambos os grupos demonstraram uma menor expressão de receptores dopaminérgicos do tipo-D1 quando comparados ao do tipo-D2. Tais alterações bioquímicas podem estar relacionadas às similaridades no comportamento entre ambos os modelos experimentais estudados.

5.1. TESTES COMPORTAMENTAIS

5.1.1. Teste de Enterramento das Esferas Vítreas (*Marble Burying Test*)

O Teste de Enterramento das Esferas Vítreas consiste na avaliação de estereotípias por enterramento que pode ser relacionada com o comportamento do tipo-TEOC (NJUNG'E; HANDLEY, 1991; THOMAS *et al.*, 2009). Na avaliação do enterramento das esferas, 54 dias após a HIN e 24 horas após a última aplicação de Cq, não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais.

Esse achado não é uma novidade, uma vez que na literatura outros estudos utilizando Cq demonstraram não encontrar resultados significativos entre os grupos experimentais (EAGLE *et al.*, 2014; VORHEES *et al.*, 2009), ou assim como uma diminuição do número de enterramentos de esferas vítreas (BROCCO *et al.*, 2006; EGASHIRA *et al.*, 2008). O protocolo do teste de Eagle e colaboradores foi de 10 aplicações de Cq (0.5 mg/kg, IP, em ratos Lister-Hooded/avaliados entre 85 e 107 dias após tratamento/9 esferas por 10 min) enquanto que o de Vohrees e coautores foi de

20 aplicações (1.0, 2.0 e 4.0 mg/kg, SC, em ratos Sprague-Dawley/30 dias após tratamento/18 esferas por 30 min). Já Brocco e grupo, em dosagens agudas (0.16 a 0.63 mg/kg, SC, em camundongos/teste após 30 min/24 esferas por 30 min) e Egashira e equipe utilizaram 1 mg/kg, IP, em camundongos ICR/teste pós 30-60 min/25 esferas por 30 min. Dessa forma, como evidenciado pela literatura, dosagens crônicas de Cq de 10 e 21 aplicações em dosagem de 0.5 a 4.0, não são o suficiente para provocar alterações no comportamento tipo enterramento, embora com testagem após aplicação aguda de 0,16 a 1,0, visualiza-se uma diminuição desse comportamento. Eagle e Vohrees (2014, 2009) informam que os ratos pós-chronicidade não apresentam propensão de comportamentos de enterramento relacionados à ansiedade (EAGLE et al., 2014; VORHEES et al., 2009). Assim, possivelmente a ansiedade seja a indutora do comportamento de enterramento, uma vez que já se demonstrou diminuição dessa estereotipia com o ansiolítico diazepam (BROEKKAMP et al., 1986). Brocco e Egashira (2006, 2008) supõem que a diminuição do comportamento de enterramento em dosagens agudas de Cq possa estar correlacionada com a via serotoninérgica, uma vez que em camundongos ocorreu inibição da redução do comportamento de enterramento quando os mesmos foram tratados com fármacos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs), antidepressivos tricíclicos ou agonista 5-HT_{1A}.

Quanto ao modelo de lesão encefálica neonatal, nosso estudo é o primeiro a utilizar o modelo de HI de Levine e a realizar a análise de estereotipias pelo teste de Enterramento de Esferas Vítreas. Embora já se tenha demonstrado na literatura que a lesão hipóxica-isquêmica em ratos Sprague-Dawley via ácido caínico (2 mg/kg, SC, DPN7/teste pós-HI no DPN90/16 esferas por 15 minutos) provoque uma redução do número de enterramentos, Bernard e colegas hipotetizam que essa diminuição do número de enterramento seja devido à atenção focada e rigidez cognitiva evidenciada em relação ao grupo controle, no qual os ratos que sofreram lesão experimental preferem apenas alguns objetos em vez de dissiparem igualmente a atenção para todos os demais, tais modificações comportamentais podem ser devido a alterações em receptores metabotrópicos de glutamato (BERNARD et al., 2015).

À vista disso, mostramos em nosso estudo, que a não manifestação de comportamento estereotipado de enterramento, sugestivo de alterações do tipo-TEOC, não apresentou alterações conforme esperado, ou seja, aumento dessa

estereotípias. Tais achados no grupo Cq estão conforme a literatura, em nossos testes sensíveis a comportamentos tipo-ansiedade, também não se encontraram alterações tais como Eagle e Vorhees (2014, 2009) já haviam evidenciado. Porém, há limitações de análise pela literatura ao analisar o grupo HIN, pois nosso estudo é o primeiro a utilizar o protocolo de Levine, com adaptações, para essa lesão. O modelo adaptado de Levine apresenta grandes alterações morfofisiológicas, que mesmo quando comparado ao modelo do ácido caínico, podem estar discrepantes entre ambos. Nesse sentido, mais estudos utilizando o modelo de HI de Levine são necessários para elucidar a não alteração comportamental para a estereotípias tipo-enterramento.

5.1.2. Teste do Campo Aberto (*Open Field Test*)

O Teste de Campo Aberto (TCA) é amplamente utilizado para análise de comportamento tipo-ansioso, assim como de locomoção (CAMPOS-GARCÍA ROJAS *et al.*, 2015; SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). Nosso estudo não evidenciou alteração locomotora nos grupos, contudo uma diminuição do tempo na periferia no grupo HIN, que pode ser sugestiva de menor comportamento tipo-ansioso e/ou impulsividade a comportamentos de risco. Na análise da literatura pela variável locomoção pós-aplicação de Cq, parece existir um efeito bifásico (inibição e diminuição/aumento da locomoção) dependente do tempo e da dosagem. Na avaliação de 30 minutos com a injeção de 0,25 mg/kg (IP, em ratos Wistar machos avaliados no TCA) não se verificou alteração locomotora (DE OLIVEIRA; REIMER; BRANDÃO, 2006). Porém, ratos Wistar machos de 30 a 90 minutos pós-injeção nas dosagens agudas entre 0,0025 a 2,5 mg/kg (SC) com efeitos nas doses de 0,01; 0,04; 0,16 e 2,5 mg/kg e camundongos machos NMRI de 30 a 60 minutos após injeção nas dosagens agudas entre 0,04 a 2,5 mg/kg (SC) com efeito em 0,16 mg/kg demonstraram diminuição, tais alterações na locomoção são possivelmente dose/dependente (BROCCO *et al.*, 2006). Em alguns estudos, demonstrou-se aumento locomotor entre 30 a 145 minutos pós-injeção do fármaco Cq (CARPENTER; PAZDERNIK; LEVANT, 2003; CULVER; ROSENFELD; SZECHTMAN, 2000; EILAM; SZECHTMAN, 1989; HORVITZ; WILLIAMS; JOY, 2001).

Os estudos de aumento locomotor citados utilizaram protocolos crônicos e agudos de injeção de Cq. Utilizando protocolos crônicos, Carpenter e colaboradores

(2003) avaliaram 1 hora no dia 1º e 10º da aplicação crônica e Culver e coautores (2000) por 90 minutos imediatamente após cada uma das 10 aplicações, ambos estudos utilizaram Cq à 0,5 mg/kg (SC, com intervalos de 3 dias, em ratos Long-Evans machos). Já na análise de protocolos agudos: a) Eilam e demais (1989), avaliaram 120 minutos imediatamente após cada aplicação de Cq nas dosagens de 0,03, 0,125; 0,5 e 8,0 mg/kg (SC/ratos Long-Evans machos) demonstrando que a dosagem e o tempo de análise modifica o comportamento locomotor, na dose de 0,03 induz diminuição da locomoção durante os 120 minutos; no entanto, 0,5 e 8,0 induz um efeito bifásico, com hipolocomoção inicial seguida de hiperlocomoção mantida até o final da análise, sendo que a dosagem de 0,125 é o limiar do efeito bifásico e; b) Horvitz e colaboradores (2001), avaliando por 145 minutos imediatamente após cada aplicação de 0,1; 0,5; 1,0 e 10,0 mg/kg (IP/ratos Sprague-Dawley machos) mostraram que nas dosagens de 0,1 ocorreu supressão da locomoção e nas dosagens de 0,5; 1,0 e 10,0 um efeito bifásico já demonstrado anteriormente por Eilam *et al.* (1989). Horvitz e colaboradores (2001) hipotetizam que a diminuição locomotora inicial no efeito bifásico seja devido a diminuição da liberação de dopamina via autorreceptores D2, sendo que o aumento da biodisponibilidade do fármaco com o tempo tende a ativar os receptores dopaminérgicos pós-sinápticos, exacerbando a hiperlocomoção. Com nosso estudo, acrescenta-se que em 48 horas após a 10ª aplicação de 0,5 mg/kg (IP) do fármaco Cq, avaliados por 10 minutos, o grupo Cq não apresentou nenhuma alteração locomotora, podendo a fase de hiperlocomoção estar na janela de tempo entre 120 minutos após aplicação do fármaco, até 48 horas.

O grupo HIN, também não apresentou efeito para locomoção em relação ao controle, estando de acordo com outros estudos: a) indução de 90 minutos de hipóxia em ratos Wistar avaliados no TCA em DPN60 por 5 minutos (MIGUEL *et al.*, 2015) e; b) 20 minutos de hipóxia em camundongos avaliados também no TCA no DPN56 por 60 minutos (TEN *et al.*, 2004), no entanto, a literatura já tenha demonstrado aumento da locomoção após 90 minutos de hipóxia em ratos Wistar avaliados no TCA por 5 minutos (MARCELINO *et al.*, 2016). Ten e equipe hipotetizam que a não alteração locomotora esteja poupada devido às características intrínsecas dos protocolos utilizados e do grau de gravidade da lesão. Já Marcelino e coautores supõem que a hiperatividade locomotora seja devido às alterações hipocampais, estrutura que poderia estar poupada no processo hipóxico-isquêmico em nosso estudo (não

avaliada). Embora se saiba que a atividade locomotora envolve circuitos para além do hipocampo, tais como estriado, núcleo *accumbens*, córtex pré-frontal, substância branca, entre outros e que possam estar alterados ou não em sua homeostase devido às alterações lesivas da HIN (ARTENI et al., 2010; FAN et al., 2006).

A análise de comportamentos tipo-ansioso também foi realizada a partir do Teste de Campo Aberto. O grupo Cq não foi diferente do controle. Em estudos prévios não se verificou nenhuma alteração comportamental tipo-ansiosa em ratos Sprague-Dawley tratados cronicamente com Cq (doses SC de 1.0, 2.0, 4.0 mg/kg, DPN1 ao DPN21) e avaliados nos testes do Labirinto Zero Elevado (DPN60, por 5 min) e na Caixa Claro-Escuro (DPN61, por 10 min) (VORHEES et al., 2009), e agora também no Teste do Campo Aberto. Quanto ao grupo HIN, um menor tempo de permanência na área periférica do aparato foi visualizado, e é possivelmente devido às alterações no controle de inibição do comportamento exploratório da área central sugestivo de tendência impulsiva a comportamentos de risco. Em ratos Wistar submetidos ao modelo de EHIN adaptado de Levine (90 minutos de hipóxia) e avaliados no DPN61-66, já foi verificado aumento de impulsividade/compulsividade cognitiva no teste *5-choice serial reaction time task* (5-CSRTT) (MIGUEL et al., 2015). Miguel e equipe hipotetizam que o aumento da impulsividade/compulsividade cognitiva seja oriunda dos déficits cognitivos e de aprendizagem, decorrentes do dano neural provocado pela lesão encefálica da hipóxia-isquemia neonatal. Alterações no controle inibitório, também podem estar correlacionadas com um aumento da impulsividade cognitiva associada a comportamentos de risco em pacientes com TEOC (GRASSI et al., 2015).

A não apresentação de alteração locomotora encontrada é compreensível em ambos os modelos aqui estudados, conforme a literatura já evidenciou (DE OLIVEIRA; REIMER; BRANDÃO, 2006; MIGUEL et al., 2015; TEN et al., 2004). Quanto aos critérios de comportamento tipo-ansioso, sabe-se que não necessariamente tenham que estar juntos a alguns tipos de estereotípias como *grooming* patológico e enterramento (REIMER et al., 2015), assim como nem sempre precisam acompanhar a fisiopatologia das compulsões em humanos (BERLIN, HEATHER A.; HOLLANDER, 2008; ISOLAN, 2008; ROBBINS et al., 2012; SIDDIQUI et al., 2018). Dessa forma, o TCA realizado em nosso estudo, apresentou resultados conforme a literatura para ambos os grupos, demonstrando possíveis semelhanças que podem ser levadas em

conta na validação do modelo de estudo de comportamento tipo-TEOC via modelo de EHIN.

5.1.3. Teste de Análise do Comportamento de *Grooming* (*Grooming Test*)

O *grooming* é um comportamento nato dos animais murinos, sendo que alterações no padrão de sua microestrutura indicam alterações comportamentais sugestivas às compulsões do tipo-TEOC (KYZAR; STEWART; KALUEFF, 2016; MAIO *et al.*, 2014; SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992). Pela análise da microestrutura proposta por Kalueff, os nossos achados demonstram que o modelo animal de EHIN e o tipo-TEOC apresentaram características compulsivas similares (KALUEFF *et al.*, 2007).

Os grupos HIN e Cq, em relação ao Controle, apresentam um aumento nas crises e de transições do *grooming*, executando de modo errôneo a sequência e as características naturais. Visualizou-se que o grupo HIN não apresenta crises em região caudal/genital, embora o grupo Cq sim. Para além, o grupo HIN é mais fugaz (isso é, pula fases das transições de *grooming*), embora o grupo Cq aborta mais transições, porém tanto HIN como Cq iniciam as transições incorretamente por regiões não primárias (as primárias seriam patas dianteiras e focinho/cabeça). Desse modo, infere-se que a lesão oriunda da HIN possa levar os animais experimentais a manifestarem comportamentos semelhantes aos vistos no modelo animal do tipo-TEOC. Nenhum estudo com o modelo de EHIN ou uso de Cq utilizou o algoritmo de Kallueff para avaliação de *grooming* até o momento. No entanto, já se tenha demonstrado em camundongos submetidos à lesão unilateral de estriado direito (anteroposterior, lateral e dorsoventral) via 6-OHDA na 8ª semana de idade e avaliados comportamentalmente 30 dias após, alterações no padrão de *grooming* conforme avaliação de Kalueff e colaboradores (2007) devido a possíveis alterações em receptores dopaminérgicos (PELOSI; GIRAULT; HERVÉ, 2015).

A ausência de *grooming* avaliada somente pelo tempo vai ao encontro da literatura, a qual já demonstrou que após 20 minutos da aplicação do fármaco não se verifica alterações no tempo das crises de *grooming*, assim como 35 dias após HIN. Horvitz e colaboradores, avaliando ratos Sprague-Dawley machos, por 145 minutos imediatamente após aplicação aguda de Cq, nas dosagens de 0,1; 0,5; 1,0 e 10,0

mg/kg (IP), não encontraram relação do efeito do Cq no tempo do *grooming*, nem sua interação com a dose, assim como na relação da dose pelo tempo entre 20 e 145 minutos de teste (HORVITZ; WILLIAMS; JOY, 2001). Já em relação a HIN, nosso achado está conforme estudo prévio, ao qual demonstrou nenhuma alteração em tempo de *grooming* após protocolo de HIN no 7º DPN (ratos Wistar, 100 minutos de hipóxia) (QUINZAÑOS-FRESNEDO et al., 2008). Com nosso estudo, acrescenta-se que após 48 horas da última aplicação crônica de 0,5 mg/kg (IP) e 55 dias após HIN, também não ocorreram alterações em tempo de manifestação de *grooming*.

A não correlação entre o tempo de *grooming* e as alterações em sua microestrutura vistas em nosso estudo, já foi demonstrada anteriormente em ratos Wistar submetidos à aquisição de tarefa operante com validade para comportamento de estereotipia (VELOSO et al., 2016). Ao analisarmos os animais experimentais para um comportamento tão complexo como o de autolimpeza, medidas finas de avaliação, tais como as da microestrutura do *grooming* (crises e transições com seus possíveis desfechos) devem ser utilizadas. Como foram evidenciados, os achados gerais de apenas tempo pode não se correlacionar com alterações nessas divisões finas do *grooming*. Essa nova metodologia de análise, que avalia a sequência dos padrões internos do *grooming*, nos abre uma lacuna de questionamentos sobre essa nova área, anteriormente não abrangida em muitos estudos. Como evidenciado, manifestações finas quando negligenciadas podem deixar de evidenciar resultados positivos para alterações comportamentais. Embora, os achados de tempo não condizem com o esperado, as alterações finas do *grooming* em ambos os grupos nos deixam claro a semelhança, e assim, o modelo de TEOC com foco em características estereotipadas pelo *grooming* pode vir a ser estudado no modelo de EHIN.

5.1.4. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated Plus Maze Test*)

O Teste do Labirinto em Cruz Elevado (TLCE) é bem conhecido por medir o comportamento do tipo-ansioso (ANDREWS; PAPAKOSTA; BARNES, 2014; GULINELLO, 2004). Em nosso estudo, os ratos Wistar de todos os grupos apresentaram médias semelhantes para número de entradas e tempo em braços abertos e fechados.

Conforme nossos achados, porém avaliando ratos Lister-Hooded (10 aplicações de Cq, 0,5 mg/kg (IP)/testados entre 93-94 dias após o tratamento por 5 min) também não foi demonstrado resultados nem nas estradas em braços abertos e fechados, assim como no tempo perdido nesses (EAGLE et al., 2014). Tal resultado de não alteração na variável tempo, já foi demonstrada com camundongos (aplicação aguda, 0,0625; 0,13; 0,25 e 0,5 mg/kg, (IP), 20 minutos antes do teste de 5 min), no entanto, verificou-se ação ansiolítica apenas na dosagem de 0,5 mg/kg (RODGERS; NIKULINA; COLE, 1994). Rodgers e equipe evidenciaram que o Cq não está ligado aos comportamentos tipo-ansiedade, assim como Eagle e colaboradores demonstraram que a ansiedade não se relaciona a comportamentos de checagem que podem ser visualizados após a aplicação crônica de Cq. De modo contrário, porém com limitações dimórficas por serem fêmeas, demonstrou-se um efeito ansiolítico na avaliação de ratas Wistar, quando o Cq (0,1 mg/kg, IP) é aplicado cronicamente por 14 dias (FEDOTOVA, 2012). Fedotova e colaboradores hipotetizam que as alterações hormonais ao longo do ciclo estral agem no sistema dopaminérgico, principalmente atuando em receptores dopaminérgicos do tipo-D2. Já está bem definido na literatura que os receptores dopaminérgicos do tipo-D2 estão vinculados a alterações na ansiedade (SIEMITKOWSKI et al., 2000). As bases fisiopatológicas da ligação entre Cq, ansiedade e comportamentos de checagem/estereotipias permanecem inconclusivas.

Em relação ao grupo HIN, também não encontramos diferenças em relação ao grupo controle, como já demonstrado em machos e fêmeas. Os protocolos utilizados por cada equipe que não encontram evidências de alterações no comportamento tipo-ansiedade são: a) Arteni e colegas (ratos Wistar/DPN7 submetidos à 90 min de hipóxia/DPN90 testados por 2 minutos); b) Diaz e equipe (ratos Wistar/DPN7 submetidos à 90 min de hipóxia/DPN35-40 testados por 5 min) e; c) Ikeda e colaboradores (ratos Wistar/DPN7 submetidos à 120 min de hipóxia/semana 4^a a 18^a avaliados por 10 min) (ARTENI et al., 2010; DIAZ, 2012; IKEDA et al., 2001). Arteni e colegas hipotetizam que a não alteração comportamental vista no TLCE seja devido à extensão e difusão da lesão encefálica neonatal, assim como avaliação comportamental já na fase adulta, ou simplesmente pelo aparato possuir largura dos braços diferentes dos estudos acima (aparato utilizado em nosso estudo: 15 cm/estudos citados: 10 cm). Tais modificações no aparato do TLCE, entre diferentes

estudos, já foi sugerido por estar relacionado à comportamentos de exploração diferentes do esperado (HOGG, 1996). Já Ikeda e colegas, supõem que a não alteração comportamental visualizada nesse teste em animais lesionados pela HIN seja devido à alterações de aprendizagem seletivas e de longo prazo, sem afetar a questão motora. Em nosso estudo, também não visualizamos alterações motoras, via locomoção, pelo Teste do Campo Aberto.

Assim sendo, o uso do teste de Labirinto em Cruz Elevada não foi sensível o suficiente para revelar o comportamento do tipo-ansioso precursor das compulsões tipo-*grooming*. Tal correlação entre teste comportamental para ansiedade e *grooming*, já foi demonstrado anteriormente na avaliação de ratos Wistar machos por durante 10 minutos nos testes de Teste do Labirinto em Cruz Elevada e Campo Aberto: nenhuma diferença no grau de ansiedade em ambos os testes foi identificada, embora se tenha verificado um aumento da manifestação de *grooming* nos aparatos testados para ratos Wistar classificados previamente com *grooming* intermediário e *grooming* intenso (REIMER *et al.*, 2015).

5.2. ANÁLISES HISTOLÓGICAS E DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

5.2.1. Volume da Lesão

A avaliação do volume estriatal e do hemisfério total sem e com ventrículos foram aferidas tanto isoladamente (direito e esquerdo) quanto pela relação entre os lados. O volume estriatal e hemisférico de ambos os lados não apresentaram alterações significativas entre os grupos CONT, HIN e Cq, quando avaliados isoladamente ou entre suas relações. Porém, ao avaliar a relação entre o lado direito pelo esquerdo do estriado, demonstrou-se atrofia apenas no grupo HIN, principalmente devido à lesão ipsilateral pela HI.

Estudos com protocolos de hipóxia superiores de 60 minutos com ratos (HI média à severa), encontraram resultados significativos em atrofia ipsilateral à lesão tanto em estriado e/ou hemisfério total (ALEXANDER *et al.*, 2014; ALMLI *et al.*, 2000; ARTENI *et al.*, 2010; MARCELINO *et al.*, 2016; MIGUEL *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2008; SCHUCH *et al.*, 2016). Ao avaliar camundongos expostos por 20 minutos na hipóxia também foi encontrada atrofia hemisférica ipsilateral à lesão (TEN *et al.*, 2004).

Esses resultados nos mostram que a cirurgia de HI promoveu alterações no volume de estruturas encefálicas; porém, com características leves, não apresentando infarto cístico muito menos atrofia significativa nas estruturas analisadas. Atrófias maiores ou infartos poderiam ser um agravante ao relacionar o comportamento do grupo lesão com um grupo apenas induzido farmacologicamente.

Quanto aos volumes analisados no grupo Cq, o mesmo contradiz estudos em humanos, os quais demonstram alterações volumétricas de atrofia hemisférica e hipertrofia de estriado bilateral (ATMACA *et al.*, 2007; LÁZARO *et al.*, 2009; PUJOL *et al.*, 2004; VALENTE *et al.*, 2005). Estudos em pesquisa pré-clínica sobre volumes de estruturas em modelo de TEOC induzido por Cq são inexistentes, embora haja evidências de diminuição da utilização da glicose em córtex motor, caudado/putamên e habenula lateral em ratos Long-Evans submetidos à dose de 0,5 mg/kg (SC) do Cq em protocolo agudo ou crônico (10 aplicações) (CARPENTER; PAZDERNIK; LEVANT, 2003). A diminuição da taxa de glicose utilizada pode ser devido a menor atividade metabólica da estrutura cerebral, com possível ligação ao quadro de atrofia.

5.2.2. Imunofluorescência

O teste de imunofluorescência, com a finalidade de quantificar a expressão de receptores dopaminérgicos na região anterodorsal do estriado apresentou alterações nos receptores do tipo-D1 e do tipo-D2. O modelo de EHIN demonstrou atuar apenas diminuindo a expressão dos receptores do tipo-D1, já no modelo de TEOC os receptores do tipo-D2 tiveram sua expressão aumentada. Esses resultados foram significativos apenas para as análises do hemisfério direito. Para ambos os grupos, os receptores tipo-D1 continuaram menos expressos em relação ao tipo-D2.

Os nossos achados de expressão do receptor tipo-D1 no hemisfério ipsilateral à lesão de HI corroborou com estudos prévios com ratos Sprague-Dawley (HI no DPN7-8), uma vez que 2-3 semanas após HI (hipóxia 180min) de intensidade moderada verificou-se expressão reduzida de receptores do tipo-D1 no estriado, principalmente em região dorsolateral; porém, na classificação por HI leve não se verifica tais mudanças (PRZEDBORSKI *et al.*, 1991). Em avaliação de 10 dias após HI (hipóxia 150 min), também se encontrou redução de receptores do tipo-D1 em estriado na classificação de lesão grave (JOHNSON *et al.*, 1994). Essas reduções

podem ter caráter de decréscimo não uniforme ao longo do estriado, como já descrito em análise aguda de ratos Sprague-Dawley submetidos à HI (hipóxia 90 min) (ADAIR; FILLOUX, 1992). Ao contrário dos achados aqui expostos anteriormente, de 9-11 semanas após HI (hipóxia 180 min), não há diferenças na expressão de receptores do tipo-D1, inferindo que os níveis de receptores do tipo-D1 tendem a se normalizar após o insulto, diferente do receptor do tipo-D2 (KOSTIC *et al.*, 1991; PRZEDBORSKI *et al.*, 1991). A recuperação gradual nos níveis dos receptores do tipo-D1 já foi verificada em cinco períodos após HI (hipóxia 180 min): 2, 4, 10, 21 e 80 dias (FILLOUX; ADAIR; NARANG, 1996).

A não redução de receptores do tipo-D2 em estriado encontrada 57 dias pós-HI de intensidade leve em nosso estudo já foi demonstrada em período agudo após a HI (DPN7-8, Sprague-Dawley, hipóxia 90 min) (ADAIR; FILLOUX, 1992). Ademais, em estudo avaliando 2-3 semanas após HI também não demonstrou alteração na HI leve, mas apresentou redução na HI moderada (DPN7-8, Sprague-Dawley, hipóxia 180 min) (PRZEDBORSKI *et al.*, 1991). A redução de receptores do tipo-D2 também já foi verificada em lesão tecidual de classificação severa (DPN7-8, Sprague-Dawley, hipóxia 150 min) (JOHNSON *et al.*, 1994). A redução de receptores do tipo-D2 no estriado pode ser constante (KOSTIC *et al.*, 1991; PRZEDBORSKI *et al.*, 1991); porém, contrária à redução constante encontrada, também se verificou uma recuperação gradual nos níveis desses receptores após a HI (DPN7-8, Sprague-Dawley, hipóxia 180 min) (FILLOUX; ADAIR; NARANG, 1996). A diminuição de receptores do tipo-D1 e tipo-D2 no estriado pode ser ocasionada pela perda de neurônios e terminais dopaminérgicos devido à lesão HI (JOHNSTON, 1983; PRZEDBORSKI *et al.*, 1991).

Com base no modelo de Cq para indução de comportamento do tipo-TEOC, o aumento na expressão de receptores do tipo-D2, encontrado em nosso estudo, vai contra os achados de redução em 17% no estriado demonstrado anteriormente (CHEN; ALOYO; WEISS, 1993). Essa diminuição, possivelmente é devida a persistente estimulação agonista do Cq (CHEN; ALOYO; WEISS, 1993). Embora se saiba que a ação crônica de um fármaco vai além da diminuição da expressão de seu receptor, pode também ocorrer aumento de sua expressão pela tolerância (tal como o vício) ou pela diminuição de sua atividade fisiológica esperada (contrabalanço homeostático) (LITTLETON, 2001). Sobre a não alteração dos níveis de receptores

do tipo-D1, está conforme literatura publicada (CHEN; ALOYO; WEISS, 1993). A alteração não esperada em nosso estudo de aumento de receptores do tipo-D2 pode ser explicada por características distintas de protocolos utilizados. Chen e colegas utilizaram camundongos suíços machos, aplicando cronicamente o Cq por implante Alzet (8 $\mu\text{mol/kg/h}$) por 6 dias, diferindo do nosso protocolo. Embora tais protocolos sejam diferentes, os receptores do tipo-D1 permaneceram com resultados parecidos em ambos os estudos. Podemos assim inferir, que os receptores do tipo-D2 possuem uma maior sensibilidade para as alterações, independente do modelo animal e protocolo utilizado, quando comparados aos receptores do tipo-D1. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de aumento e diminuição de receptores dopaminérgicos do tipo-D1 e D2 após injeção de Cq, uma vez que na literatura tais dados são escassos.

Portanto, os grupos HIN e Cq divergiram na etiologia do correlato entre estriado (HIN perda de expressão de receptores do tipo-D1 e Cq aumento da expressão de receptores tipo-D2 – embora ambos grupos apresentem expressão menor de tipo-D1 em comparação aos do tipo-D2) e comportamento estereotipado, sugestivo de comportamento do tipo-TEOC. Conforme já elucidado na literatura, a perda de neurônios espinhais médios estriatais pode ser responsável pela atrofia do estriado no evento HI, assim como alterações em diferentes níveis de expressão de receptores dopaminérgicos nessa estrutura (JOHNSTON, 1983; PRZEDBORSKI *et al.*, 1991). Embora, as alterações vistas no grupo Cq ainda permanecem inconclusivas, vários fatores farmacológicos podem estar modulando a atividade dos receptores dopaminérgicos estriatais. Porém, analisando a similaridade nos testes bioquímicos entre os grupos e os níveis de expressão dos receptores, verificamos que ambos os grupos experimentais (HIN e Cq) apresentam médias significativamente menores de receptores do tipo-D1 do que do tipo-D2, tanto no grupo HIN quanto no grupo Cq no hemisfério direito (a seletividade unilateral do Cq já demonstrada em alguma estruturas, pode ser a responsável pela não visualização de significância em hemisfério esquerdo do grupo Cq) (SULLIVAN *et al.*, 1998)). A diferença de expressão entre receptores do tipo-D1 e do tipo-D2 pode explicar em parte a manifestação comportamental. Sabe-se que a função do receptor tipo-D2, que medeia a via inibitória, é dependente da atividade do receptor tipo-D1 em algumas situações (DREHER; JACKSON, 1989; LEE *et al.*, 2004; WALTERS *et al.*, 2016). Hipotetiza-se

que esse sinergismo de ativação, em momentos de alterações nos níveis de expressão desses receptores, tais como lesões encefálicas ou estimulação farmacológica, possa estar ocasionando as alterações comportamentais. Outra possível hipótese, porém mais ligada à questão fisiológica e não comportamental, é que a via pré-fronto-córtico-estriatal (hiperativada no TEOC e alterada em sua maturação na HI) pode ocasionar um aumento nos receptores inibitórios no estriado anterodorsal, como modo de manter a homeostasia da circuitaria, uma vez que a região anterodorsal do estriado é a região de entrada de sinais dessa via (CHOI; DING; HABER, 2017; MORRIS *et al.*, 2016).

Conforme hipóteses elencadas anteriormente, mais estudos bioquímicos e farmacológicos são necessários para elucidar os comportamentos semelhantes entre dois modelos dessas distintas neuropatologias. Entretanto, ressalva-se que em nossa pesquisa, até o momento, demonstramos que as alterações comportamentais de estereotipias e ansiedade, presentes no comportamento do tipo-TEOC, foram semelhantes no modelo de EHIN. Assim sendo, a indução de HIN pode ser um modelo para futuros estudos com foco nas características do TEOC, assim como, a HIN possa ser um fator desencadeante etiológico que pode promover o desenvolvimento desse quadro psicopatológico ao longo do neurodesenvolvimento.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que os ratos Wistar submetidos à HIN:

- Não diferem do grupo Cloridrato de quimpirol no teste de Enterramento de Esferas Vítreas e no teste do Labirinto em Cruz Elevada, porém demonstram maior comportamento tipo-ansiedade no teste do Campo Aberto. Em relação ao comportamento de *grooming*, não apresentaram alterações na avaliação da variável “tempo”; porém análise da microestrutura demonstra aumento de crises e transições incorretas. As variáveis da microestrutura do *grooming* estão em conformidade com as do grupo Cloridrato de quimpirol.
- Apresentam atrofia do estriado na relação ipsilateral pela contralateral à lesão da hipóxia-isquemia, embora não existam alterações teciduais em hemisférios, considerando ou não os ventrículos. Animais que receberam Cloridrato de quimpirol não apresentaram alterações morfológicas.
- Demonstram diminuição somente da expressão de receptores do tipo-D1 em hemisfério ipsilateral em estriado anterodorsal. Já os ratos que receberam Cloridrato de quimpirol apresentaram aumento da expressão de receptores do tipo-D2 em hemisfério direito. Ainda, ambos os grupos experimentais apresentaram menor expressão de receptores do tipo-D1 ipsilateral em comparação ao tipo-D2.
- Podem ser um futuro modelo de estudo das características tipo-TEOC, pois apresentam semelhanças comportamentais e bioquímicas. As alterações comportamentais encontradas em ambos os grupos experimentais, HIN e administração de Cloridrato de quimpirol, podem ser consequência da menor expressão de receptores dopaminérgicos do tipo-D1 em relação ao do tipo-D2.

7. PERSPECTIVAS

- Averiguar possíveis alterações comportamentais estereotipadas e compulsivas em outros testes comportamentais não utilizados nesse estudo.
- Compreender as alterações comportamentais do *grooming* por meio do isolamento das vias dos receptores dopaminérgicos do tipo-D1 e tipo-D2 com a utilização de fármacos antagonista e agonistas.
- Verificar possível diminuição das alterações comportamentais patológicas visualizadas após indução do modelo de EHIN com a utilização do fármaco Clomipramina que é padrão-ouro no tratamento do Transtorno do Espectro Obsessivo-Compulsivo em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVITCH, Amitai et al. Comorbidity between Attention Deficit/Hyperactivity Disorder and Obsessive-Compulsive Disorder Across the Lifespan: A Systematic and Critical Review. **Harvard Review of Psychiatry**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 245–262, 2015.

ABRAMOWITZ, Jonathan S.; TAYLOR, Steven; MCKAY, Dean. Obsessive-compulsive disorder. **The Lancet**, [s. l.], v. 374, n. 9688, p. 491–499, 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60240-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60240-3)>

ADAIR, John; FILLOUX, Francis. Effects of Hypoxic-Ischemic Brain Damage on Dopaminergic Markers in the Neonatal Rat: A Regional Autoradiographic Analysis. **Journal of Child Neurology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 199–207, 1992.

ALEXANDER, M. et al. Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 259, p. 85–96, 2014.

ALMLI, C.Robert et al. BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 166, n. 1, p. 99–114, 2000.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision. **American Psychiatric Association**, [s. l.], 2000.

ANDREWS, N. A.; PAPAKOSTA, M.; BARNES, N. M. Discovery of novel anxiolytic agents - The trials and tribulations of pre-clinical models of anxiety. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 61, p. 72–78, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2013.10.006>>

ARTENI, N. S. et al. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 210, n. 1, p. 92–98, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.02.015>>

ARTENI, Nice Sarmiento et al. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes

lateralized memory impairments in the adult rat. **Brain Research**, [s. l.], v. 973, n. 2, p. 171–178, 2003.

ATMACA, Murad et al. Volumetric MRI study of key brain regions implicated in obsessive-compulsive disorder. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 46–52, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16859819>>

AUSTIN, Topun. Therapeutic hypothermia for hypoxic–ischemic encephalopathy: challenges during transfer and global perspectives. **Jornal de Pediatria**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 221–223, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2017.09.002>>

BARKS, J. D.; SILVERSTEIN, F. S. Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 235–243, 1992.

BATCHELOR, M.; SCHENK, J. O. Protein kinase A activity may kinetically upregulate the striatal transporter for dopamine. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 18, n. 24, p. 10304–10309, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9852568>

BERGER, Richard; GARNIER, Yves. Pathophysiology of perinatal brain damage. **Brain Research Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 107–134, 1999.

BERLIN, HEATHER A.; HOLLANDER, Eric. Understanding the Differences Between Impulsivity and Compulsivity. **Psychiatric Times**, [s. l.], n. July 2008, p. 58–61, 2008.

BERNARD, Paul B. et al. Behavioral changes following a single episode of early-life seizures support the latent development of an autistic phenotype. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], v. 44, p. 78–85, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.01.006>>

BERRIDGE, Kent C. et al. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: A model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. **BMC Biology**, [s. l.], v. 3, p. 1–16, 2005.

BOULOUGOURIS, Vasileios; CHAMBERLAIN, Samuel R.; ROBBINS, Trevor W. Cross-species models of OCD spectrum disorders. **Psychiatry Research**, [s. l.], v. 170, n. 1, p. 15–21, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2008.07.016>>

BOZZI, Yuri; BORRELLI, Emiliana. Dopamine in neurotoxicity and neuroprotection: What do D2receptors have to do with it? **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 167–174, 2006.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada n. 305, de 18 nov. de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 1–9, 2002.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada n. 306, de 7 dez. de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 1–15, 2004.

BRASIL. Lei Federal n. 11.794, de 8 de Out. de 2008 (Lei Arouca). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 4–9, 2008.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada n. 222, de 28 mar. de 2018. . 2018, p. 1–32.

BROCCO, Mauricette et al. Antidepressant-like properties of the anti-Parkinson agent, piribedil, in rodents: Mediation by dopamine D2 receptors. **Behavioural Pharmacology**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 559–572, 2006.

BROEKKAMP, Chris L. et al. Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 126, n. 3, p. 223–229, 1986.

BURDA, Joshua E.; SOFRONIEW, Michael V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. **Neuron**, 2014.

BUSCETI, Carla Letizia et al. Lack or Inhibition of Dopaminergic Stimulation Induces a Development Increase of Striatal Tyrosine Hydroxylase-Positive Interneurons. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 0–8, 2012.

CAMPOS-GARCÍA ROJAS, C. et al. OCD in animal models using quinpirole as dopaminergic inductor of perseverative behaviour. **Revista Médica Del Hospital General De México**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 169–176, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0185106315000736>>

CARPENTER, Toni L.; PAZDERNIK, Thomas L.; LEVANT, Beth. Differences in quinpirole-induced local cerebral glucose utilization between naive and sensitized rats. **Brain Research**, [s. l.], v. 964, n. 2, p. 295–301, 2003.

CEPEDA, Carlos. Dopaminergic modulation of early signs of excitotoxicity in visualized rat neostriatal neurons. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 3491–3497, 1998.

CHEN, J. F.; ALOYO, V. J.; WEISS, B. Continuous treatment with the D2 dopamine receptor agonist quinpirole decreases D2 dopamine receptors, D2 dopamine receptor messenger RNA and proenkephalin messenger RNA, and increases mu opioid receptors in mouse striatum. **Neuroscience**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 669–680, 1993.

CHENG, Yu et al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 101, n. 9, p. 1992–1999, 1998.

CHO, S. et al. Tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase and dopamine metabolism after chronic treatment with dopaminergic drugs. **Brain Research**, [s. l.], v. 830, n. 2, p. 237–245, 1999.

CHO, Seongeun; NEFF, Norton H.; HADJICONSTANTINO, Maria. Regulation of tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase by dopaminergic drugs. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 323, n. 2–3, p. 149–157, 1997.

CHOI, Eun Young; DING, Song-Lin; HABER, Suzanne N. Combinatorial Inputs to the Ventral Striatum from the Temporal Cortex, Frontal Cortex, and Amygdala: Implications for Segmenting the Striatum. **Eneuro**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. ENEURO.0392-17.2017, 2017. Disponível em: <<http://eneuro.sfn.org/lookup/doi/10.1523/ENEURO.0392-17.2017>>

CLANCY, B.; DARLINGTON, R. B.; FINLAY, B. L. Translating developmental time across mammalian species. **Neuroscience**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 7–17, 2001.

CULVER, Kirsten E.; ROSENFELD, Jacob M.; SZECHTMAN, Henry. A switch mechanism between locomotion and mouthing implicated in sensitization to quinpirole in rats. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 151, n. 2–3, p. 202–210, 2000.

DAFRE, Alcir Luiz et al. Perturbations in the thiol homeostasis following

neonatal cerebral hypoxia-ischemia in rats. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 345, n. 1, p. 65–68, 2003.

DAVIDSON, Joanne O. et al. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy - Where to from here? **Frontiers in Neurology**, 2015.

DE OLIVEIRA, Amanda Ribeiro; REIMER, Adriano Edgar; BRANDÃO, Marcus Lira. Dopamine D2 receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 102–111, 2006.

DIAZ, Ramiro. **Efeitos do Enriquecimento Ambiental em Ratos Jovens Submetidos à Hipóxia-Isquemia Encefálica Neonatal**. 2012. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2012.

DREHER, Jakub K.; JACKSON, David M. Role of D1 and D2 dopamine receptors in mediating locomotor activity elicited from the nucleus accumbens of rats. **Brain Res.**, [s. l.], v. 487, n. 1989, p. 267–277, 1989.

DUGAN, J. M. et al. Automation and integration of components for generalized semantic markup of electronic medical texts. **Proceedings / AMIA ... Annual Symposium. AMIA Symposium**, [s. l.], p. 736–40, 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2232691&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

DVORKIN, Anna et al. Features of compulsive checking behavior mediated by nucleus accumbens and orbital frontal cortex. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 1552–1563, 2010.

EAGLE, Dawn M. et al. The dopamine D2/D3 receptor agonist quinpirole increases checking-like behaviour in an operant observing response task with uncertain reinforcement: A novel possible model of OCD. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 264, p. 207–229, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.12.040>>

EGASHIRA, Nobuaki et al. Aripiprazole inhibits marble-burying behavior via 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A} receptor-independent mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 592, n. 1–3, p. 103–108, 2008.

EILAM, David et al. Rituals, stereotypy and compulsive behavior in animals and humans. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 456–471,

2006.

EILAM, David; SZECHTMAN, Henry. Biphasic effect of D-2 agonist quinpirole on locomotion and movements. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 161, n. 2–3, p. 151–157, 1989.

FAN, Lir W. et al. Minocycline attenuates hypoxia-ischemia-induced neurological dysfunction and brain injury in the juvenile rat. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 341–350, 2006.

FATHALI, Nancy et al. Splenic Immune Cells in Experimental Neonatal Hypoxia-Ischemia. **Translational Stroke Research**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 208–219, 2013.

FEDOTOVA, Iu O. [D2-type dopaminergic receptors and anxiety-depression-like behavior in female rats]. **Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologija**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 3–6, 2012.

FILLOUX, F. M.; ADAIR, J.; NARANG, N. The temporal evolution of striatal dopamine receptor binding and mRNA expression following hypoxia-ischemia in the neonatal rat. **Brain Res Dev Brain Res**, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 81–91, 1996. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/0165380696000533/1-s2.0-0165380696000533-main.pdf?_tid=9643abe0-61ad-11e3-b470-00000aacb362&acdnat=1386688573_7f5f6b7b6bb7444fed97661f89539902

FOX, D. A.; SILLMAN, A. J. Dopamine Auto- and Postsynaptic Receptors: Electrophysiological Evidence for Differential Sensitivity to Dopamine Agonists. **Science**, [s. l.], v. 206, p. 80–82, 1979.

GELLER, Daniel A. Obsessive-Compulsive and Spectrum Disorders in Children and Adolescents. **Psychiatric Clinics of North America**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 353–370, 2006.

GELLER, Daniel A. et al. Perinatal factors affecting expression of obsessive compulsive disorder in children and adolescents. **Journal of child and adolescent psychopharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 373–9, 2008. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2935829&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

GERSTNER, Bettina et al. 17Beta-Estradiol Protects Against Hypoxic/Ischemic White Matter Damage in the Neonatal Rat Brain. **Journal of neuroscience research**,

[s. l.], v. 87, n. 9, p. 2078–86, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2770176&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

GRASSI, Giacomo et al. Think twice: Impulsivity and decision making in obsessive–compulsive disorder. **Journal of Behavioral Addictions**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 263–272, 2015. Disponível em: <<http://www.akademai.com/doi/abs/10.1556/2006.4.2015.039>>

GULINELLO, Maria. Behavioral Core Protocols and Training Rotarod. **Behavioral Core Facility**, [s. l.], p. 2–5, 2004. Disponível em: <<http://www.biobserve.com/behavioralresearch/wp-content/uploads/sites/2/2016/05/Rodent-Estrous-Cycle.pdf>>

HASSELL, K.Jane et al. **New horizons for newborn brain protection: Enhancing endogenous neuroprotectionArchives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, 2015.

HOFFMAN, Kurt Leroy; CANO-RAMÍREZ, Hugo. Lost in translation? A critical look at the role that animal models of obsessive compulsive disorder play in current drug discovery strategies. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 211–220, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17460441.2018.1417379>>

HOGG, Sandy. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 21–30, 1996.

HORVITZ, Jon C.; WILLIAMS, Gavin; JOY, Recka. Time-dependent actions of D2 family agonist quinpirole on spontaneous behavior in the rat: Dissociation between sniffing and locomotion. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 154, n. 4, p. 350–355, 2001.

HOSSMANN, Konstantin Alexander. Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 257–270, 2008.

HUANG, Jian Jia et al. Effects of dopamine D2 agonist quinpirole on neuronal activity of anterior cingulate cortex and striatum in rats. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 227, n. 3, p. 459–466, 2013.

HUANG, Zhiheng et al. Long-term cognitive impairment and myelination

deficiency in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. **Brain Research**, [s. l.], v. 1301, p. 100–109, 2009.

IKEDA, T. et al. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 118, n. 1, p. 17–25, 2001.

ISOLAN, Luciano. Princípios e prática em transtornos do espectro obsessivo-compulsivo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 409–409, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462008000400025&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 9 jul. 2018.

JANSEN, Elizabeth M.; LOW, Walter C. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 189–194, 1996.

JIN, Yuxuan; SILVERMAN, Ann J.; VANNUCCI, Susan J. Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 3107–3112, 2009.

JOHNSON, Michel et al. Effect of neonatal hypoxia-ischemia on nigro-striatal dopamine receptors and on striatal neuropeptide Y, dynorphin A and substance P concentrations in rats. **Developmental Brain Research**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 109–118, 1994.

JOHNSTON, Michael V. Neurotransmitter alterations in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 511–518, 1983.

JOHNSTON, Michael V et al. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. **Pediatric research**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 735–41, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1203/00006450-200106000-00003%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11385130>>

JUNG, Eun-Yee; SHIM, Insop. Differential DAergic Control of D1 and D2 Receptor Agonist Over Locomotor Activity and GABA Level in the Striatum. **Experimental neurobiology**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 153–7, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110374%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3214772>>

KALUEFF, Allan V. et al. Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 2, n. 10, p. 2538–2544, 2007.

KALUEFF, Allan V. et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, 2016.

KALUEFF, Allan V.; TUOHIMAA, Pentti. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. **Brain Research Protocols**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 151–158, 2004.

KESSLER, Ronald C. et al. Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of. **Arch Gen Psychiatry**, [s. l.], v. 62, n. June, p. 593–602, 2005. Disponível em: <<http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpsyc.62.6.593>>

KIHARA, Takeshi et al. Protective effect of dopamine D2 agonists in cortical neurons via the phosphatidylinositol 3 kinase cascade. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 274–282, 2002.

KIMMEL, H. L. et al. Dopamine D1 and D2 receptors influence dopamine transporter synthesis and degradation in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 298, n. 1, p. 129–140, 2001.

KIMMEL, H. L.; CARROLL, F. I.; KUCHAR, M. J. Dopamine transporter synthesis and degradation rate in rat striatum and nucleus accumbens using RTI-76. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 578–585, 2000.

KONUK, N. et al. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in obsessive compulsive disorder. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2007, 2007.

KOSTIC, Vladimir S. et al. Effect of unilateral perinatal hypoxic-ischemic brain injury on striatal dopamine uptake sites and. **Neuroscience**, [s. l.], v. 129, p. 197–200, 1991.

KURINCZUK, Jennifer J.; WHITE-KONING, Melanie; BADAWI, Nadia. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. **Early Human Development**, [s. l.], v. 86, n. 6, p. 329–338, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010>>

KYZAR, Evan J.; STEWART, Adam Michael; KALUEFF, Allan V. Effects of LSD on grooming behavior in serotonin transporter heterozygous (Sert+/-) mice. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 296, p. 47–52, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.018>>

LÁZARO, Luisa et al. Brain changes in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder before and after treatment: A voxel-based morphometric MRI study. **Psychiatry Research - Neuroimaging**, [s. l.], v. 172, n. 2, p. 140–146, 2009.

LEE, Samuel P. et al. Mechanisms of Signal Transduction : Dopamine D1 and D2 Receptor Co-activation Generates a Novel Phospholipase C-mediated Calcium Signal Dopamine D1 and D2 Receptor Co-activation Generates a Novel Phospholipase C-mediated Calcium Signal *. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], n. 416, 2004.

LEVINE, Seymour. Anoxic-Ischemic Encephalopathy in Rats. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1–17, 1960.

LI, S. J. et al. The role of TNF-alpha, IL-6, IL-10, and GDNF in neuronal apoptosis in neonatal rat with hypoxic-ischemic encephalopathy. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 905–909, 2014.

LI, Yong; GONZALEZ, Pablo; ZHANG, Lubo. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: Mechanisms and possible interventions. **Progress in Neurobiology**, 2012.

LINDGREN, Niklas et al. Dopamine D₂ receptors regulate tyrosine hydroxylase activity and phosphorylation at Ser40 in rat striatum. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 773–780, 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.0953-816x.2000.01443.x>>

LITTLETON, J. Receptor regulation as a unitary mechanism for drug tolerance and physical dependence - Not quite as simple as it seemed! **Addiction**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 87–101, 2001.

LIU, Fudong; MCCULLOUGH, Louise D. Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2013.

LIU, Li et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. **The Lancet**, [s. l.], v. 388, n. 10063, p. 3027–3035, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31593-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31593-8)>

LOW, James A. et al. The prediction and prevention of intrapartum fetal

asphyxia in term pregnancies. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 184, n. 4, p. 724–730, 2001.

MACRAE, D. J. The Council for International Organizations and Medical Sciences (CIOMS) Guidelines on Ethics of Clinical Trials. **Proceedings of the American Thoracic Society**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 176–179, 2007. Disponível em: <<http://pats.atsjournals.org/cgi/doi/10.1513/pats.200701-011GC>>

MAIO, Taimon P. et al. Animal Models of Obsessive-Compulsive Disorder: Strain Differences. **World Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 240–246, 2014. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=46856&#abstract>>

MARCELINO, Thiago Beltram et al. Behavioral benefits of maternal swimming are counteracted by neonatal hypoxia-ischemia in the offspring. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 312, p. 30–38, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.009>>

MARCONDES, E. **Pediatria Básica**, 9ª ed. São Paulo: Savier, 2002-2004. Vol.3.

MARSDEN, Charles A. Dopamine: The rewarding years. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 147, n. SUPPL. 1, p. 136–144, 2006.

MARTIN, Lee J. et al. Primary sensory and forebrain motor systems in the newborn brain are preferentially damaged by hypoxia-ischemia. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 377, n. 2, p. 262–285, 1997.

MCLEAN, Claire; FERRIERO, Donna. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. **Seminars in Perinatology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 425–432, 2004.

MEISER, Johannes; WEINDL, Daniel; HILLER, Karsten. Complexity of dopamine metabolism. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–18, 2013.

MELLER, Emanuel; EORDI, Fabio; BOHMAKER, Karen. Enhancement by the D1 Dopamine Agonist SKF 38393 of specific components of stereotypy elicited by the D2 agonists LY 171555 and RU 24213. **Life Sciences**, [s. l.], v. 42, n. c, p. 2561–2567, 1988.

MENEZES, Silvânia M. P. Neves Jorge Mancini Filho Elizabete Wenzel De.

Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ / USP. **Usp**, [s. l.], p. 234 p., 2013.

MESTRINER, Régis Gemerasca et al. Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 244, p. 82–89, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.001>>

MIGUEL, Patricia Maidana et al. Neonatal Hypoxia-Ischemia Induces Attention-Deficit Hyperactivity Disorder-Like Behavior in Rats J _ L. **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 129, n. 3, p. 309–320, 2015.

MORRIS, Laurel S. et al. Fronto-striatal organization: Defining functional and microstructural substrates of behavioural flexibility. **Cortex**, [s. l.], v. 74, p. 118–133, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cortex.2015.11.004>>

NICOLA, F. C. et al. Human dental pulp stem cells transplantation combined with treadmill training in rats after traumatic spinal cord injury. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 1–11, 2016.

NJUNG'E, Kung'u; HANDLEY, Sheila L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 63–67, 1991.

O'HARA, C. M. et al. Inhibition of dopamine synthesis by dopamine D2 and D3 but not D4 receptors. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [s. l.], v. 277, n. 1, p. 186–192, 1996.

ODORCYK, Felipe Kawa et al. Experimental neonatal hypoxia ischemia causes long lasting changes of oxidative stress parameters in the hippocampus and the spleen. **Journal of Perinatal Medicine**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 433–439, 2018.

OHSHIMA, Makiko et al. Cerebral blood flow during reperfusion predicts later brain damage in a mouse and a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 233, n. 1, p. 481–489, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.025>>

ONALI, Pierluigi; OLIANAS, Maria C.; BUNSE, Bert. Evidence that adenosine A2and dopamine autoreceptors antagonistically regulate tyrosine hydroxylase activity in rat striatal synaptosomes. **Brain Research**, [s. l.], v. 456, n. 2, p. 302–309, 1988.

PAGNUSSAT, Aline de Souza et al. Skilled forelimb reaching in Wistar rats: Evaluation by means of Montoya staircase test. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 177, n. 1, p. 115–121, 2009.

PAOLO, T. H. I. R. E. D. I.; POYET, Patrick; LABRIE, Fernand. Effects of Chronic Estradiol and Haloperidol Treatment in Striatal Dopamine Receptors. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 73, p. 105–106, 1981.

PAULS, David L. et al. Obsessive-compulsive disorder: An integrative genetic and neurobiological perspective. **Nature Reviews Neuroscience**, 2014.

PELOSI, Assunta; GIRAULT, Jean Antoine; HERVÉ, Denis. Unilateral lesion of dopamine neurons induces grooming asymmetry in the mouse. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1–15, 2015.

PEREIRA, Lenir Orlandi et al. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 101–108, 2007.

PEREIRA, Lenir Orlandi et al. Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia. **Brain Research**, [s. l.], v. 1218, p. 257–266, 2008.

PEREIRA, Lenir Orlandi et al. Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia-ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex. **Brain Research**, [s. l.], v. 1247, p. 188–195, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.10.017>>

POLING, Alan; CLEARY, James; MONAGHAN, Michael. Burying by Rats in Response to Aversive and Nonaversive Stimuli. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, [s. l.], v. 35, n. 1 (January), p. 31–34, 1981.

PORTERA-CAILLIAU, C.; PRICE, D. L.; MARTIN, L. J. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. **The Journal of comparative neurology**, [s. l.], v. 378, n. 1, p. 70–87, 1997.

PRZEDBORSKI, Serge et al. Effect of Unilateral Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury in the Rat on Dopamine D1 and D2 Receptors and Uptake Sites: A Quantitative Autoradiographic Study. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 57, n. 6, p. 1951–1961, 1991.

PUJOL, Jesús et al. Mapping structural brain alterations in obsessive-compulsive disorder. **Archives of General Psychiatry**, [s. l.], v. 61, n. 7, p. 720–730, 2004.

QUINZAÑOS-FRESNEDO, Jimena et al. Efectos neurológicos de la ligadura de la carótida común izquierda e hipoxia inducida en ratas neonatas. **Cirugía y Cirujanos**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 119–125, 2008.

RAUCH, Scott L.; SAVAGE, Cary R. NEUROIMAGING AND NEUROPSYCHOLOGY OF THE STRIATUM: Bridging Basic Science and Clinical Practice. **Psychiatric Clinics of North America**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 741–768, 1997. Disponible en: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0193953X05703439%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0193953X05703439/pdf?md5=407a94071fe71bfff2af7b48b8085da8&pid=1-s2.0-S0193953X05703439-main.pdf>>

REIMER, Adriano Edgar et al. Rats with differential self-grooming expression in the elevated plus-maze do not differ in anxiety-related behaviors. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 292, p. 370–380, 2015. Disponible en: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.036>>

REY, Evelyne; COUTURIER, André. The prognosis of pregnancy in women with chronic hypertension. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 171, n. 2, p. 410–416, 1994.

RICE, J. E.; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Ann Neurol**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 131–141, 1981. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/ana.410090206/asset/410090206_ft.pdf?v=1&t=ht5vugtt&s=579aa6f1b9a188aa6a364da33462ed37118a782b>

RICHARDS, Toni L.; PAZDERNIK, Thomas L.; LEVANT, Beth. Altered quinpirole-induced local cerebral glucose utilization in anterior cortical regions in rats after sensitization to quinpirole. **Brain Research**, [s. l.], v. 1042, n. 1, p. 53–61, 2005.

ROBBINS, Trevor W. et al. Neurocognitive endophenotypes of impulsivity and compulsivity: Towards dimensional psychiatry. **Trends in Cognitive Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 81–91, 2012.

RODGERS, R. J.; NIKULINA, E. M.; COLE, J. C. Dopamine D1 and D2 receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 985–995, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305794902534>>

ROLAND, E. H.; HILL, A. Clinical aspects of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. **Seminars in pediatric neurology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 57–71, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9422234>>

ROSSITER, J. P. et al. Caspase-3 activation and caspase-like proteolytic activity in human perinatal hypoxic-ischemic brain injury. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 66–73, 2002.

RUMAJOGEE, Prakasham et al. Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: A systematic review. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 7, n. APR, 2016.

SALMI, Peter et al. Dopamine D2 receptor ribozyme inhibits quinpirole-induced stereotypy in rats. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 388, n. 1, p. 1–2, 2000.

SAMPAIO, Aline S. et al. Perinatal risk factors and obsessive-compulsive spectrum disorders in patients with rheumatic fever. **General Hospital Psychiatry**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 288–291, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2008.08.003>>

SANCHES, E. F. et al. Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-ischemia in P3 and P7 rats. **Neuroscience**, [s. l.], v. 290, p. 581–593, 2015.

SANCHES, Eduardo Farias et al. Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. **Brain Research**, [s. l.], v. 1438, p. 85–92, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.024>>

SANO, Yasuko et al. Incidence and risk factors of severe lacerations during forceps delivery in a single teaching hospital where simulation training is held annually. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, [s. l.], p. 1–9, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jog.13558>>

SANTANGELO, SUSAN L. et al. Tourette's Syndrome: What Are the Influences

of Gender and Comorbid Obsessive-Compulsive Disorder? **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 795–804, 1994. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1097/00004583-199407000-00004>>

SAWADA, Hideyuki et al. Dopamine D2-type agonists protect mesencephalic neurons from glutamate neurotoxicity: Mechanisms of neuroprotective treatment against oxidative stress. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 110–119, 1998.

SAXENA, S. et al. Neuroimaging and frontal-subcortical circuitry in obsessive-compulsive disorder. **British Journal of Psychiatry**, 1998.

SAXENA, Sanjaya; RAUCH, Scott L. Functional neuroimaging and the neuroanatomy of obsessive-compulsive disorder. **Psychiatric Clinics of North America**, 2000.

SCHUCH, Clarissa Pedrini et al. Early environmental enrichment affects neurobehavioral development and prevents brain damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 617, p. 101–107, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.015>>

SEIBENHENER, Michael L.; WOOTEN, Michael C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 96, p. 1–6, 2015. Disponível em: <<http://www.jove.com/video/52434/use-open-field-maze-to-measure-locomotor-anxiety-like-behavior>>

SIBAI, Baha; DEKKER, Gus; KUPFERMINC, Michael. Pre-eclampsia. **The Lancet**, [s. l.], v. 365, n. 9461, p. 785–799, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673605179872>>
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673605179872>>

SIDDIQUI, Mohammad Aleem et al. Prevalence of Obsessive-Compulsive Spectrum Disorders in Obsessive-Compulsive Disorder. **Indian journal of psychological medicine**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 225–231, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29875529>>. Acesso em: 9 jul. 2018.

SIEMITKOWSKI, M. et al. The effects of dopamine D₂ receptor ligands on novelty-induced behavior in the rat open field test. **Neuroscience Research Communications**, [s. l.], v. 27, n. 3, 2000.

SIMPSON, Joy; KELLY, John P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats-Behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 222, n. 1, p. 246–264, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.002>>

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 825–852, 1992. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1992.72.3.825>>

SULLIVAN, R. M. et al. Effects of quinpirole on central dopamine systems in sensitized and non-sensitized rats. **Neuroscience**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 781–789, 1998.

SZECHTMAN, H. et al. Compulsive checking behavior of quinpirole-sensitized rats as an animal model of Obsessive-Compulsive Disorder (OCD): from and control. **BMC Neuroscience**, [s. l.], v. 2, n. 4, 2001.

SZECHTMAN, Henry et al. Dynamics of behavioral sensitization induced by the dopamine agonist quinpirole and a proposed central energy control mechanism. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 115, n. 1–2, p. 95–104, 1994.

SZECHTMAN, Henry; SULIS, William; EILAM, David. Quinpirole induces compulsive checking behavior in rats: A potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 112, n. 6, p. 1475–1485, 1998.

SZUMLINSKI, Karen K. et al. Locomotor sensitization to quinpirole: Environment-modulated increase in efficacy and context-dependent increase in potency. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 134, n. 2, p. 193–200, 1997.

TEN, Vadim S. et al. Late measures of brain injury after neonatal hypoxia-ischemia in mice. **Stroke**, [s. l.], v. 35, n. 9, p. 2183–2188, 2004.

THOMAS, Alexia et al. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 204, n. 2, p. 361–373, 2009.

TOHMI, Manavu et al. Perinatal inflammatory cytokine challenge results in distinct neurobehavioral alterations in rats: Implication in psychiatric disorders of developmental origin. **Neuroscience Research**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 67–75, 2004.

TORRES, Albina R. et al. Obsessive-compulsive disorder: Prevalence,

Comorbidity, impact, and help-seeking in the British National Psychiatric Morbidity Survey of 2000. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 163, n. 11, p. 1978–1985, 2006.

VALENTE, Antonio A. et al. Regional gray matter abnormalities in obsessive-compulsive disorder: A voxel-based morphometry study. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 479–487, 2005.

VAN HARTESVELDT, Carol. Temporal and environmental effects on quinpirole-induced biphasic locomotion in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 955–960, 1997.

VAN STEENWINCKEL, Juliette et al. Brain damage of the preterm infant: new insights into the role of inflammation. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 557–563, 2014. Disponível em: <<http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST20130284>>

VANNUCCI, R. C.; PERLMAN, J. M. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. **Pediatrics**, [s. l.], v. 100, n. 6, p. 1004–14, 1997.

VASCONCELOS, Marcos Salem et al. Prenatal, Perinatal, and Postnatal Risk Factors in Obsessive-Compulsive Disorder. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 301–307, 2007.

VELOSO, André Wilson Nazareth et al. Modulation of grooming behavior in rats by different test situations. **Psychology and Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 91–104, 2016.

VIEIRA, Larissa Fernanda de A. et al. Anxiolytic-like effect of the extract from *Bowdichia virgilioides* in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 680–686, 2013.

VOLPE, Joseph J. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. **The Lancet Neurology**, 2009.

VORHEES, Charles V. et al. Developmental treatment with the dopamine D2/3 agonist quinpirole selectively impairs spatial learning in the Morris water maze. **Neurotoxicology and Teratology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 1–10, 2009.

WALTERS, Judith R. et al. D1 Dopamine Receptor Activation Required for Postsynaptic Expression of D2 Agonist Effects. **American Association for the**

Advancement of Science Stable, [s. l.], v. 236, n. 4802, p. 719–722, 2016. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1699253> D1 Dopam>

WANG, Yuan et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plasma levels in drug-naïve OCD patients are lower than those in healthy people, but are not lower than those in drug-treated OCD patients. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 133, n. 1–2, p. 305–310, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2011.04.002>>

WATSON, Charles; PAXINOS, George. **Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Fourth Edition**. [s.l: s.n.].

WEIS, Simone N. et al. Early biochemical effects after unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 115–120, 2011.

WEIS, Simone N. et al. Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. **Mitochondrion**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 271–279, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2011.10.002>>

WHITAKER, N. G. G.; LINDSTROM, T. D. Disposition and Biotransformation of Quinpirole, a new D-2 Dopamine Agonist AntiHypertensive Agent, in Mice, Rats, Dogs, and Monkeys. **Drug Metabolism and Disposition**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 107–113, 1987.

YAGER, J. Y.; ASHWAL, S. Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. **Pediatr Neurol**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 156–167, 2009. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0887899408005973/1-s2.0-S0887899408005973-main.pdf?_tid=6c9e3220-44d2-11e4-8cdc-00000aacb361&acdnat=1411663308_6ca4c3ae22ced7caa314a4f16238c6bf>

YAGER, Jerome Y. Animal Models of Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Newborn. **Seminars in Pediatric Neurology**, 2004.

YOEST, Katie E.; CUMMINGS, Jennifer A.; BECKER, Jill B. Estradiol, Dopamine and Motivation. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem. Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 83–89, 2014.

ZAHNISER, Nancy R.; SORKIN, Alexander. Rapid regulation of the dopamine transporter: Role in stimulant addiction? **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 47, n. SUPPL. 1, p. 80–91, 2004.

ZHANG, Mingqiang et al. Environmental Enrichment Prevent the Juvenile

Hypoxia-Induced Developmental Loss of Parvalbumin-Immunoreactive Cells in the Prefrontal Cortex and Neurobehavioral Alterations Through Inhibition of NADPH Oxidase-2-Derived Oxidative Stress. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 53, n. 10, p. 7341–7350, 2016.

ZHAO, Jing et al. **Effect of intrauterine infection on brain development and injury** **International Journal of Developmental Neuroscience**, 2013.

ZHU, Meng-yang et al. Regulation of aromatic L-amino acid decarboxylase in rat striatal synaptosomes : effects of dopamine receptor agonists and antagonists. **Br. J. Pharmacol.**, [s. l.], p. 23–30, 1994.

ZHU, Meng Yang et al. Regulation of striatal aromatic L-amino acid decarboxylase: Effects of blockade or activation of dopamine receptors. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 238, n. 2–3, p. 157–164, 1993.