



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

GISELY DA SILVA NASCIMENTO

**AVALIAR A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO CRÔNICO COM VITAMINA C EM UM  
MODELO DE ESTRESSE PROVOCADO PELA DOR INFLAMATÓRIA INDUZIDA  
POR ÁCIDO ACÉTICO EM RATOS WISTAR ADOLESCENTES**

BELÉM/PA  
2018

GISELY DA SILVA NASCIMENTO

**AVALIAR A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO CRÔNICO COM VITAMINA C EM UM  
MODELO DE ESTRESSE PROVOCADO PELA DOR INFLAMATÓRIA INDUZIDA  
POR ÁCIDO ACÉTICO EM RATOS WISTAR ADOLESCENTES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Belém, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.  
Sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Gilmara Bastos.

BELÉM/PA  
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

N244a NASCIMENTO, GISELY DA SILVA.  
AVALIAR A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO CRÔNICO COM VITAMINA C EM UM MODELO DE ESTRESSE PROVOCADO PELA DOR INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM RATOS WISTAR ADOLESCENTES / GISELY DA SILVA NASCIMENTO. — 2018.  
46 f. : il. color.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. GILMARA DE NAZARETH TAVARES BASTOS  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

1. estresse, adolescente, comportamento, emocionalidade. I. Título.

CDD 611.8

---

GISELY DA SILVA NASCIMENTO

**AVALIAR A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO CRÔNICO COM VITAMINA C EM UM  
MODELO DE ESTRESSE PROVOCADO PELA DOR INFLAMATÓRIA INDUZIDA  
POR ÁCIDO ACÉTICO EM RATOS WISTAR ADOLESCENTES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Belém, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.  
Sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Gilmara Bastos.

Belém (PA), Dezembro de 2018.

Banca Examinadora:

---

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Gilmara Bastos  
Universidade Federal do Pará- UFPA

---

Avaliadora: Prof. Dr. Carlomagno Bahia  
Universidade Federal do Pará- UFPA

---

Avaliadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leila Sawada

---

Suplente: Prof. Dr. Paulo Avila  
Universidade Superior da Amazônia- Unama

## Resumo

O estresse no período da adolescência pode estar relacionada com consequências que podem persistir ao longo da vida. As injúrias sofridas no cérebro, devido à exposição a fatores ligados ao estresse, contribuem para o desenvolvimento de patologias ligadas ao comportamento e emocionalidade, como a ansiedade e depressão. Essas duas patologias vêm tomando proporções cada vez mais assustadoras nos dias de hoje, principalmente entre adolescentes e jovens, devido à plasticidade cerebral nessa fase. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do tratamento crônico com vitamina C no estresse em animais adolescentes, em um modelo de dor inflamatória induzida por ácido acético. Utilizando o teste de campo aberto, demonstrou-se que a vitamina C reduziu de forma significativa o comportamento relacionado ao estado tipo ansioso. Este tratamento também atenuou de forma satisfatória os déficits de memória e aprendizado no labirinto aquático de Morris. Desta forma, pode-se concluir que o tratamento crônico com vitamina C possui efeitos benéficos sobre a emocionalidade e comportamentos de animais adolescentes submetidos a injeções de ácido acético. Além disso, o modelo de injeção de ácido acético mostrou ser eficiente na indução de um estado tipo ansioso dos animais.

.

**Palavras chave:** estresse, adolescente, comportamento, emocionalidade.

## ABSTRACT

Evaluate the influence of chronic treatment with vitamin C in stress provoked model by the inflammatory pain induced by acetic acid in wistar adolescents rats

Stress in adolescence may be linked to consequences that may persist throughout life. The injuries suffered in the brain, due to exposure to stress factors, contribute to the development of pathologies related to behavior and emotionality, such as anxiety and depression. These two pathologies have been taking on increasingly frightening proportions these days, especially among adolescents and young people, due to brain plasticity in this phase. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of chronic vitamin C treatment on stress in adolescent animals in a model of inflammatory pain induced by acetic acid. Using the open field test, vitamin C was shown to significantly reduce anxiety-related behavior. This chronic treatment also satisfactorily reversed memory and learning deficits in Morris water maze. In conclusion, the chronic treatment with vitamin C has beneficial effects on the emotionality and behaviors of adolescent animals submitted to acetic acid injections. In addition, the acetic acid injection model has been shown to be efficient in inducing an anxious state of the animals.

**Keywords;** stress, adolescent, behavior, emotionality.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
1.1. Fisiologia do Estresse.....	7
1.2. Estresse no período da adolescência e suas consequências a longo prazo.....	8
1.3. Modelos experimentais de dor inflamatória periférica e sua relação com o estresse.....	11
1.4. A vitamina C contra o estresse induzido por dor inflamatória causada por ácido acético.....	12
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1. Geral.....	15
2.2. Específicos.....	15
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1. Animais experimentais.....	16
3.2. Grupos experimentais.....	16
3.3. Testes comportamentais.....	17
3.3.1. Campo aberto.....	17
3.3.2. Teste splash.....	18
3.3.3. Labirinto aquático de Morris (Water Maze).....	19
3.4. Análise estatística.....	20
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
4.1. Saúde geral dos animais.....	21
4.2. Atividade em campo aberto.....	22
4.3. Teste splash.....	25
4.4. Teste labirinto aquático de Morris.....	26
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>38</b>

<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>
----------------------------	-----------



## 1. INTRODUÇÃO

A adolescência é um período de pleno desenvolvimento e transtornos cognitivos e emocionais, podem surgir a partir de consequências de efeitos negativos experimentados nesse período. A exposição a fatores estressantes podem trazer consequências tanto para a estrutura e função do desenvolvimento normal do encéfalo, quanto para o comportamento cognitivo e emocional, e que podem persistir ao longo da vida devido à neuroplasticidade do encéfalo nessa fase, o que o faz suscetível a eventos que podem ser potencialmente deletérios (Bale et al., 2010; Walker et al., 2017).

Os impactos relacionados ao estresse estão ligados a respostas prolongadas e persistentes do sistema que controla os níveis de corticosteróides circulantes, na presença de um agente estressor. As adversidades experimentadas nesse período, podem induzir níveis neurotóxicos de exposição à corticosteróides, que resulta em um sistema de *feedback* negativo falho e que pode ter início no desenvolvimento do sistema nervoso e se prolongar ao longo da vida (Maccari et al., 2003).

O estresse pode ocorrer em diversas fases da vida, e muitas vezes tem impactos profundos e vitalícios na saúde física e psicológica. Sabemos que no período da adolescência a neuroplasticidade é acentuada, o que pode conferir maior probabilidade de consequências permanentes, devido a experiências consideradas estressoras (McCormick et al., 2015). O aumento de taxas de depressão, esquizofrenia, distúrbio bipolar, distúrbios de ansiedade, abuso de álcool e drogas ilícitas, suicídio bem como deficiências cognitivas e relacionadas à memória, são algumas das consequências ligadas aos impactos do estresse na adolescência (Dricks, 2016).

A compreensão das consequências do estresse e suas implicações duradouras na função cerebral, na fase da adolescência são de fundamental importância para as pesquisas em neurociências, pois a partir desse conhecimento poderemos traçar novas estratégias terapêuticas e preventivas, a fim de melhorar as possíveis implicações causadas pelo estresse (Walker et al., 2017).

Diante das possíveis consequências do estresse em diversas fases do ciclo da vida, nosso trabalho tem como objetivo avaliar a resposta da exposição a um agente estressor na emocionalidade e comportamento em animais, no período da

adolescência. Assim como avaliar a influência do tratamento crônico com vitamina C, na possível melhora das implicações dos efeitos do processo estressor.

### 1.1. Fisiologia do Estresse

O estresse é a resposta do corpo a qualquer processo ambiental que exceda a capacidade reguladora de um organismo, e a resposta prolongada e persistente a essa condição pode contribuir com o aparecimento de manifestações patológicas como, consequências negativas sobre funções fisiológicas, cognitivas e comportamentais (Antonelli, 2106; Charmandari et al.,2005).

A resposta fisiológica ao estresse depende de uma série de fatores que levam a ativação dos eixos responsáveis por essa resposta. A intensidade e duração desse evento são fatores chaves para a ativação e regulação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA), e do sistema nervoso simpático que são os sistemas ativados em resposta ao estresse. A ativação do sistema nervoso simpático resulta em uma série de respostas fisiológicas que culminam com a liberação imediata de catecolaminas: noradrenalina (norepinefrina) e adrenalina (epinefrina) nos terminais nervosos simpáticos. Entre outros efeitos essa ativação causa algumas alterações fisiológicas como, glicogenólise hepática, aumento da frequência cardíaca e da pressão do sangue (Belda et al., 2015)

Já na ativação do eixo HPA ocorre a liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo. Esse hormônio irá agir na hipófise anterior estimulando a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez atuará no córtex da glândula adrenal, regulando a produção de glicocorticóides que regularão negativamente a liberação de CRH e ACTH através de um mecanismo de *feedback* negativo clássico, culminando com a resposta ao estresse (Ulrich-Lai&Herman, 2009; Belda et al., 2015).

A resposta exacerbada ao estresse depende não só do tipo de agente estressor, mas também da duração desse processo e do período em que ele ocorre. Pois cada situação acarreta uma complexa rede de respostas em todo o sistema nervoso central, que pode ativar dois tipos de receptores intracelulares (1) receptores mineralocorticóides, localizados no núcleo das células alvos com alta afinidade, ou

seja, são extensivamente ligados a baixos níveis circulantes de glicocorticoides; (2) receptor de glicocorticóides localizados no citoplasma, e está ativo apenas em níveis elevados de glicocorticoides, porém participam ativamente do sistema de retroalimentação negativa do eixo HPA, e respondem pelas alterações fisiológicas desencadeadas pelos níveis elevados de cortisol durante a resposta ao estresse (Joëls&Baram, 2009).

As alterações de glicocorticoides podem induzir diversas consequências nos indivíduos que experimentam uma resposta prolongada e persistente ao estresse. Pois os glicocorticóides são conhecidos como importantes modificadores da neuroplasticidade e importantes mediadores das experiências no início da vida. Por exemplo, no caso da depressão os níveis de glicocorticoides tendem a ser mais elevados, enquanto que no transtorno de estresse pós- traumático (TEPT) os níveis patológico são mais baixos, essas duas condições de déficits de glicocorticoides, estão relacionadas à resposta alterada na eficácia do *feedback*. A alta densidade de receptores de glicocorticoides nas áreas cerebrais, como hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala que são áreas que continuam a se desenvolver durante toda a adolescência, aumentam a vulnerabilidade dessas áreas, na transição biológica ao estresse (McCormick et al., 2015).

Diante das possíveis consequências da exposição ao estresse, estudar esses efeitos no início da vida, se torna essencial. Pois a resposta prolongada a essa condição, desencadeia inúmeros eventos que podem ocasionar consequências em longo prazo, tanto para a estrutura e função do desenvolvimento normal do encéfalo, quanto para o comportamento cognitivo e emocional (Bale et al., 2010, Walker et al., 2017).

## 1.2. Estresse no período da adolescência e suas consequências em longo prazo

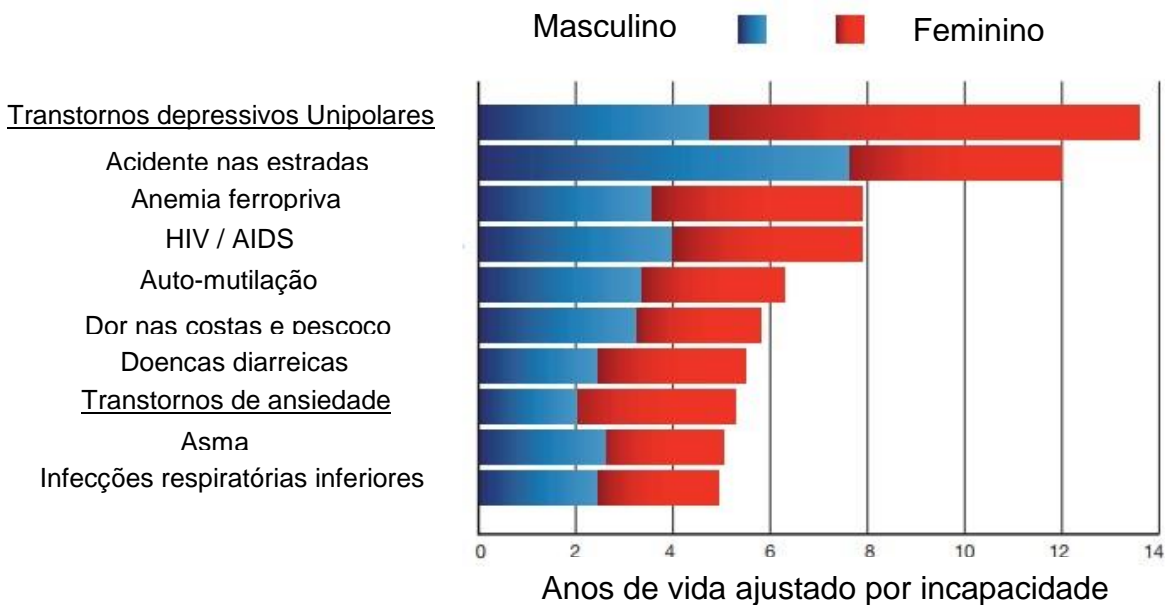
A fase da adolescência gera várias mudanças psicológicas e sociais que podem ser nociva tanto para adolescentes humanos como para não humanos. A vulnerabilidade aos efeitos e perturbações ambientais e estressoras é intensificada nesse período, o que acaba por provocar efeitos que podem perdurar pelo resto da vida adulta. Em comparação ao período inicial do desenvolvimento a adolescência é o

período que conta com mais eventos estressantes, e também é o período em que a percepção de resposta ao estresse é maior (Stylianakis et al.,2018).

Quando comparamos ao período adulto a liberação de corticosterona (ratos) e cortisol (humanos) tende a ser maior ou prolongada na fase da adolescência do que na fase adulta, o que leva o encéfalo nessa fase a ser altamente sensível a perturbações no eixo HPA devido à maturação contínua nesse período (Rith-Najarian et al.,2015).

O encéfalo é particularmente sensível às influências ambientais, e o desenvolvimento do sistema nervoso no período da adolescência conta com um processo complexo, caracterizado por vários eventos bem programados e regulados que são essenciais para garantir a estrutura e funções cerebrais normais (Andersen, 2003). A alta exposição ao estresse nessa fase frequentemente é associada ao alto risco de desenvolvimento de psicopatologias, no comportamento emocional e social nos adolescentes (McCormick et al., 2010; Horovitz et al.,2012).

Segundo o relatório da Organização Mundial de Saúde de 2014; *Saúde Para o Adolescente do mundo: Uma segunda chance na segunda década*, a saúde mental dos adolescentes passou a ser prioridade da saúde pública, pois muitas vezes os distúrbios mentais nessa fase não são reconhecidos e tratados, o que gera graves consequências mentais ao longo da vida adulta. Foi a primeira vez que a OMS dedicou um relatório inteiro voltado à saúde do adolescente devido, a grande incidência de distúrbios de depressão e ansiedade (figura1) que levam a incapacidade, e em casos mais graves a morte por suicídio. Segundo o relatório eventos que acontecem durante os primeiros anos de vida afetam a saúde e o desenvolvimento durante a adolescência, e por vez eventos na adolescência afetam a saúde na idade adulta. Dessa forma a adolescência é uma oportunidade para corrigir problemas que podem surgir na primeira década (OMS, 2014).



**Figura 1-** Distribuição global de doenças e incapacidade entre os adolescentes. A depressão e a principal causa de incapacidade e o transtorno de ansiedade aparece na oitava causa. A metade dessas doenças e incapacidade tem início aos 14 anos de idade. **Fonte:** OMS, 2014.

A diferença na resposta ao estresse em adolescentes e adulto provavelmente estão relacionadas com as diferenças de substratos neurais, o que leva a fase da adolescência ser um período de grande importância, para se avaliar os efeitos não só a longo prazo, mas também a curto prazo e para compreender como a emocionalidade e o comportamento, nesse período são afetadas devido a exposição ao estresse (McCormick et al., 2015).

A maioria dos adolescentes consegue passar com sucesso por essa fase sem nenhum prejuízo sócio emocional, no entanto estudos epidemiológicos recentes, associaram o período da adolescência com uma maior incidência de transtornos psiquiátricos, devido à vulnerabilidade do cérebro nesse período. As evidências que experiências negativas no período crucial de maturação, de diversas regiões cerebrais têm íntima ligação com o surgimento de alterações neurobiológicas, como as encontradas na ansiedade e depressão, sugere que a exposição ao estresse na fase juvenil, pode levar a funcionalidade alterada de diferentes áreas do hipocampo, possivelmente pelas injúrias apresentada no processo de maturação desse sistema (Horovitz et al., 2012).

A compreensão desse processo é fundamental para ajudar o adolescente a lidar com este período, de forma que os distúrbios relacionados com as alterações neurobiológicas possam ser atenuados, para evitar as consequências que podem surgir ao longo da vida (Fairchild, 2011).

### 1.3. Dor inflamatória periférica e sua relação com o estresse

A dor é uma experiência desagradável que o organismo usa para alertar que algo não está certo pode ser dividida em duas categorias: Dor fisiológica e a Dor patológica. A dor patológica ainda pode ser dividida em: Dor inflamatória, que está relacionada a lesões e Dor neuropática associada principalmente a dano ou trauma no Sistema Nervoso Periférico (SNP) e Sistema Nervoso Central (SNC).

A sensibilização periférica nos terminais nociceptivos aferentes é o primeiro local a ser sensibilizada na dor inflamatória, devido a liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, prostaglandinas, histamina ou proteases. Os mecanismos que levam a sensibilização prolongada é resultado de mudanças duradouras na expressão gênica que afeta a expressão de receptores ligados à excitabilidade do neurônio, pois a sensibilização é resultado da ativação tanto da proteína G acoplada a receptores, como através das sinalizações por segundos mensageiros que podem ativar canais iônicos (Cálcio, Sódio, Potássio), capazes de produzir potenciais de ação que são transmitidos ao SNC (Johnson & Meerveld, 2014).

A sensibilização do SNC no processo de dor inflamatória causa uma resposta mais amplificada e duradoura a estímulos nocivos e inócuos, levando a uma transmissão sináptica aumentada e diminuindo assim o limiar de dor. Existem várias etapas principais para a sensibilização central, dentre elas as principais alterações neuronais envolvem, o recrutamento de receptores N-metil-D-aspartato (NMDARs) e sua ativação no corno dorsal da raiz espinhal levando a liberação de Glutamato, Substância P, neuropeptídeo de calcitonina (CGRP) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que desempenham um papel fundamental em uma parte dessa sensibilização (Mifflin&Kerr, 2014)

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e desempenha um papel fundamental na memória e aprendizado, ligando-se tanto a receptores ionotrópicos ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

(AMPARs), NMDARs e a receptores de glutamato (mGluRs) que quando ativados funcionam abrindo canais seletivos para  $\text{Ca}^+$  e  $\text{Na}^+$ , que levam a um aumento da excitabilidade do SNC (Johnson & Meerveld, 2014; Meyerson et al., 2015).

A dor persistente causa a liberação excessiva de Glutamato que desencadeia a entrada exagerada de  $\text{Ca}^+$  através dos receptores NMDA, ativando diversos processos dependentes desse íon podendo resultar em morte neuronal seja por necrose ou apoptose. Dentre esses processos destacam-se: alteração da fosforilação oxidativa, ativação da fosfolipase e ativação de proteases importantes para a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Giuffrè et al., 2015).

Dados recentes têm associado os mecanismos da dor inflamatória como um fator importante em doenças neuropsiquiátricas, incluindo a depressão. Vários estudos indicam que marcadores inflamatórios são mais elevados em pacientes deprimidos, o que pode significar uma desregulação no sistema imune que poderia ocasionar perturbações importantes no eixo HPA. Os receptores de glicocorticoides estão amplamente distribuídos em células do sistema imunológico e nos neurônios permitindo assim um importante “*feedback*” entre os sistemas endócrinos e imunológicos. Com isso a ativação desse eixo tem um papel protetor fundamental para o organismo, no entanto quando essa ativação é prolongada e persistente essas consequências se tornam prejudiciais ao encéfalo (Vogelzangs et al., 2016).

Dessa forma o controle efetivo do processo inflamatório não é apenas importante para reduzir os marcadores agudos do estresse, mas também é importante entender os efeitos em longo prazo que podem ter um impacto permanente no desenvolvimento do sistema neurológico (Kesavan, 2015).

#### 1.4. A vitamina C contra o estresse induzido por dor inflamatória causada por ácido acético

A vitamina C ou ácido ascórbico é um dos mais importantes nutrientes essenciais para dieta, seu baixo peso molecular confere a essa substância propriedades importantes para o funcionamento normal do corpo (Portugal et al., 2017; Oyarce et al., 2016). Esse nutriente é fundamental para a biossíntese de colágeno, L-carnitina e participa como cofator na conversão de dopamina em norepinefrina entre outras funções essenciais. Embora a maioria dos animais sejam capazes de sintetizar grandes quantidades de vitamina C, os seres humanos perderam essa capacidade

devido a uma série de mutações que inativaram o gene que codifica a Gulonolactona oxidase (GULO) que é a enzima chave para a biossíntese da vitamina C, por isso precisamos de fontes externas desse nutriente (Grosso et al., 2013).

A vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil e sua deficiência pode levar ao escorbuto, que é uma condição patológica que leva a fragilidade dos vasos sanguíneos, dano ao tecido conjuntivo, fadiga e conseqüentemente a morte. Por recomendação a dose diária dessa substância é de 100 mg, e pode ser encontrada na natureza em duas formas: Reduzida ou Oxidada (ácido deidroascórbico-DHA), as duas igualmente ativas. Sua absorção e distribuição no SNC ocorre através de transportadores dependentes de sódio 1e 2 (SVCT1 e SVCT2) em sua forma reduzida e por difusão facilitada na forma oxidada, através da absorção pelos membros da família GLUT (GLUT1, GLUT3 e GLUT4) (Covarrubias-Pinto et al., 2015).

Os transportadores SVCT1 e SVCT2 são expressos em vários tipos de células o SVCT1 é expresso no pulmão, fígado, rim e pele e é responsável pela manutenção de níveis de ácido ascórbico em todo o corpo. Já o SVCT2 é exclusivamente expresso em neurônios hipotalâmicos, células da Glia e células do plexo coroide e são mais sensíveis a alterações nos níveis de ascorbato, o que pode ajudar na regulação da homeostase do ácido ascórbico dentro dessas células (Grosso et al., 2013; Covarrubias-Pinto et al., 2015).

O transporte da forma oxidada (DHA) de ácido ascórbico ocorre através da difusão facilitada mediada por transportadores de membranas específicos (GLUT), que possuem várias isoformas (1, 2, 3 e 4). Dentre essas isoformas o GLUT1 e GLUT3, são os principais membros responsáveis pelo influxo de DHA, esses transportadores se encontram distribuídos principalmente nos osteoblastos, músculo e células da retina. O GLUT1 também é expresso no endotélio das células na barreira hematoencefálica e, pode ser parcialmente responsável pela presença de vitamina C no cérebro. Esse mecanismo de transporte pelo GLUT foi implicado na proteção contra danos oxidativos, e devido a esses danos serem fatores chaves nas doenças degenerativas relacionadas à idade estes achados podem contribuir para alternativas terapêuticas, que tenham como alvo os transportadores GLUTs (Yi Li & Schellhorn, 2007).

Diante das propriedades e benefícios da vitamina C, se fazem necessários estudos que possam desvendar e utilizar na melhora em animais, submetidos a um período de estresse pelo processo doloroso prolongado.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Avaliar a influência do tratamento crônico com vitamina C no estresse induzido por ácido acético em um modelo de dor inflamatória em modelo murinho, no período da adolescência.

### **2.2. Específicos**

- Avaliar a influência do protocolo empregado na saúde geral dos animais.
- Analisar a atividade exploratória e o estado ansioso dos animais e as consequências no comportamento e emocionalidade empregando o teste de campo aberto
- Avaliar o estado de anedonia dos animais, sugestivo de estado tipo ansioso empregando o teste Splash.
- Avaliar os possíveis déficits de aprendizagem e memória dos animais, através do teste do labirinto aquático de Morris (Water Maze).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais experimentais

Utilizamos Ratos Wistar adolescentes (P7 a P28 pré-adolescência e P29 a P37 adolescência) em ninhagem mista (machos e fêmeas) da espécie *Rattus norvegicus*. Os animais foram oriundos do biotério central da UFPA.

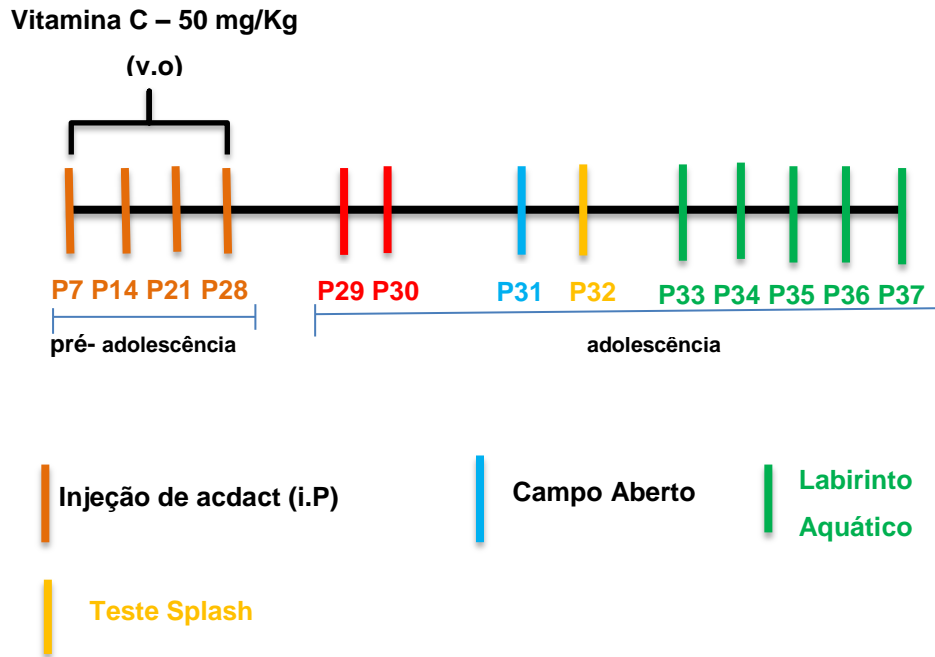
Os animais foram alojados em gaiolas de plástico (30 x 20 x 13 cm) com temperatura ambiente e água e comida *ad libitum* em ciclo claro/escuro de 12 horas. Por motivos experimentais os animais foram mantidos com as mães até o desmame (21 dias).

O presente trabalho foi previamente analisado e aprovado pelo comitê de ética em uso de animais do instituto de ciências biológicas da Universidade Federal do Pará, com parecer de número: BIO0146-13, e todos os procedimentos realizados durante o período experimental, foram conduzidos baseados nas Diretrizes Brasileiras Para o cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos- DBCA.

#### 3.2. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos, foram utilizados 4 linhagens para 4 grupos diferentes. Consideramos os seguintes grupos: Grupo sham (sem intervenção) (n=4); Grupo tratado com Ácido Acético (act) (0,06%) (n=4); Grupo tratado com vitamina C (vit C) (50 mg/Kg) (n=4) e Grupo tratado com act mais vit C (0,06%; 50 mg/kg) (n=4).

Os grupos tratados com act, foram submetidos a injeções intraperitoneais (i.p) de 7 em 7 dias durante 28 dias. O grupo que foi tratado com act mais vit C, além das injeções intraperitoneais recebeu também o tratamento crônico via oral, desse nutriente em uma dose de 50mg/kg todos os dias, e o grupo de vit C, recebeu apenas essa substância durante os 28 dias de tratamento. Nos dias da aplicação do act, a vit C foi administrada uma hora antes do estímulo doloroso (Figura 2).



**Figura 2:** Fluxograma do período de tratamento dos grupos. O período total de tratamento foi de 28 dias, tendo início em P7 (P: dias pós-natal) com a injeção de ácido acético. Durante o período de tratamento os animais foram pesados 4 vezes em P7, P14, P21 e P28. Os animais descansaram por 2 dias, antes do início dos testes comportamentais. O teste de campo aberto foi realizado em P31. O teste de splash em P32. O teste do labirinto aquático de Morris, foi realizado em 5 dias diferentes P33, P34, P35, P36 e P37. Em P38 os animais foram perfundidos.

### 3.3. Avaliação da saúde geral dos animais

Para avaliar a saúde geral dos animais durante o tratamento, o ganho de peso dos animais foi avaliado em quatro dias diferentes (P7, P14, P21 e P28). Além do ganho de peso avaliamos também o local da injeção de acid act, afim de observar possíveis alterações, causadas por essa substância.

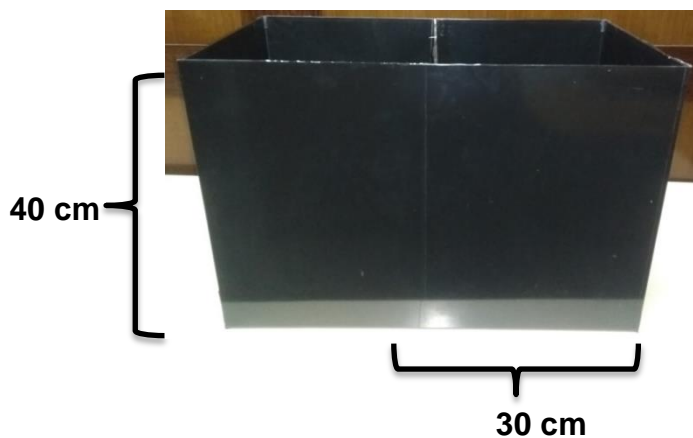
### 3.4. Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram todos filmados e analisados através do software ANY-maze Video Tracking System e através das filmagens realizadas pelo experimentador que realizou os testes. Os testes foram realizados entre 8h e 14h (horas) na mesma sala de testes comportamentais e a ambientação dos animais ocorreu 60 minutos antes do início dos testes.

### 3.4.1. Campo aberto

O teste foi realizado após o período de tratamento dos grupos (P32) em um aparato com forma quadrangular (30 x 30 x 40) de material acrílico todo em preto fosco, onde havia dois espaços o que permitiu a realização de dois testes de maneira simultânea.

A atividade exploratória foi avaliada através do tempo total que o animal esteve em movimento no aparato. Ao final de cada teste o aparato foi limpo com solução álcool etílico a 10% para que as pistas olfatórias deixadas pelos animais anteriores não interferissem nos resultados posteriores. Analisamos os parâmetros de atividade exploratória, tempo total imóvel, assim como a contagem do número de bolos fecais (Figura 3).

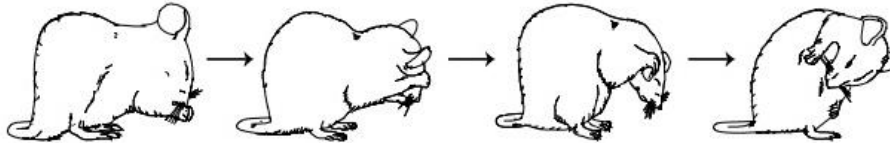


**Figura 3:** Foto do aparato utilizado no teste de campo aberto. Vista frontal do aparato usando no teste de campo aberto. O aparato foi todo revestido em preto opaco, incluindo sua base. Possuindo dois quadrantes que permitem a realização de dois testes simultâneos.

### 3.4.2. Teste Splash

O teste consiste em borrifar uma solução de sacarose a 10% na parte dorsal do animal que foram colocados individualmente em campo aberto (30 x 30 x 40). Devido a sua viscosidade a solução de sacarose suja a pele do animal, que inicia o comportamento de autolimpeza (Figura 4). Após a aplicação da solução de sacarose o

comportamento de autolimpeza foi registrado manualmente por um período de 5 minutos como um índice de autocuidado e comportamento motivacional. Após a sessão de cada animal, as caixas foram limpas com uma solução de álcool etílico a 10% para eliminar os vestígios de outro animal.

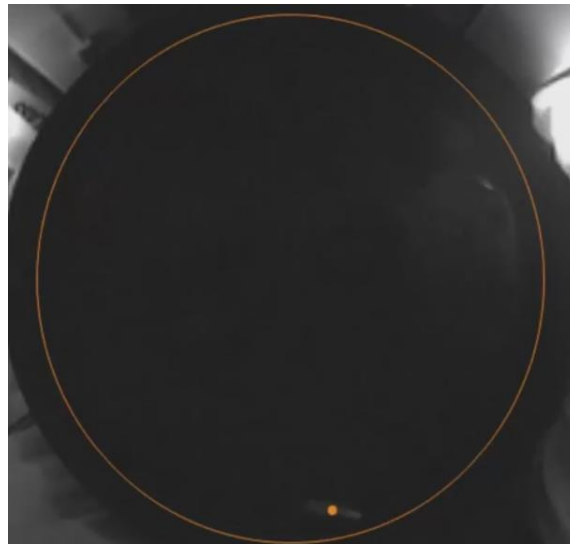


**Figura 4:** Movimento de Grooming. Da esquerda para a direita observamos os movimentos que serão analisados no teste. Os movimentos simétricos em forma de elipse ao redor do nariz; movimentos unilaterais envolvendo uma pata, que alcançam as vibrissas; movimentos amplos bilaterais, feitos simultaneamente; e movimentos de "lambidas" prolongadas no corpo. O teste tem duração de 5 minutos, que foram gravados para a análise posterior (**Fonte:** Berridge et al., 2005).

### 3.4.3. Labirinto aquático de Morris (Water Maze)

O teste foi realizado em 5 cinco dias consecutivos. Nos 4 quatro primeiros dias o animal foi exposto a uma piscina cilíndrica (80 cm de diâmetro) que estava preenchida com água a uma altura de 23 cm, encobrendo uma plataforma com base cilíndrica de 30cm de diâmetro toda em preto. Esta plataforma ficou invisível nos 4 quatro primeiros dias de teste para isso a água foi tingida com um corante preto não tóxico.

A piscina foi dividida em quatro quadrantes imaginários para a realização do teste, em um dos quadrantes a plataforma ficou fixa durante os 4 quatro primeiros dias de teste. Os animais foram expostos ao aparato quatro vezes (quatro ensaios) e cada vez de uma posição diferente e com a cabeça virada para as bordas. O teste foi realizado em uma sala de comportamento com o experimentador sempre no mesmo lugar durante todos os dias do teste. A posição do experimentador assim como todos os objetos na sala, são usados pelos animais como forma de pista, dessa forma é de suma importância que tudo se mantenha constante nos dias de teste (Figura 5).



**Figura 5: Foto do software ANY MAZE.** Imagem de como o software se dispõe na análise do teste de labirinto aquático de Morris, na imagem podemos observar o aparato usado como piscina é a forma de análise do teste, onde o animal que aparece em branco, e marcado para que o software possa realizar análise de vários parâmetros do teste.

Cada ensaio nos 4 quatro primeiros dias de teste duraram 60 segundos, nesse tempo o animal precisava encontrar a plataforma de escape sozinho. Caso ele a encontre-se era permitido que ele permanecesse na mesma por 5 segundos. Após esse tempo o animal era retirado da piscina e permaneceu por 30 segundos fora do aparato, que condiz com o intervalo entre os 4 ensaios nos 4 primeiros dias de teste.

Caso o animal não conseguisse encontrar a plataforma sozinha, ele era gentilmente encaminhado até a mesma e lá permanecia por 10 segundos. No 5º e último dia de teste a plataforma era retirada do quadrante em que se encontrava e o animal nadou livremente por 60 segundos em quatro ensaios com intervalos de 30 segundos entre os ensaios.

Para os quatro primeiros dias de testes foi analisado o parâmetro de tempo de escape para a plataforma e para o ultimo dia de teste, foram analisados a memória de retenção, velocidade média, tempo na periferia e distancia total percorrida.

### 3.5. Análise estatística

As análises de todos os parâmetros coletados durante os testes comportamentais, foram analisados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism 5, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, e o pós teste de comparações múltiplas Bonferroni, e as diferenças foram consideradas significativa quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Saúde geral dos animais

Durante os dias de tratamento dos animais analisamos algumas características corporais e de comportamento entre os grupos. Dentre essas características a piloereção foi comum nos animais do grupo tratado com acd act, além de apresentarem uma lesão com características inflamatórias no local da administração desse agente. O que não foi observado no grupo tratado com acd act mais vit C que não apresentaram a lesão citada (Figura 6).



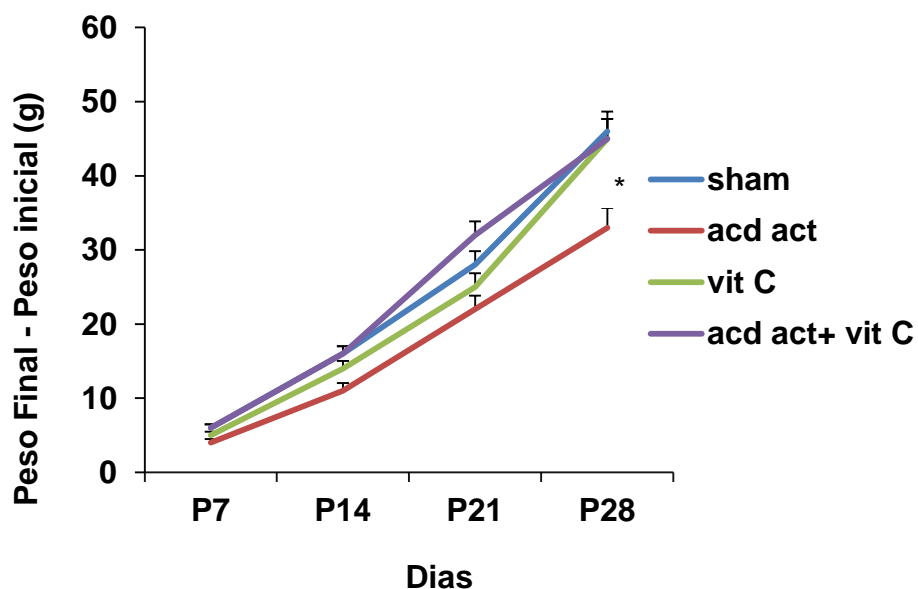
**Figura 06:** Lesão induzida no grupo tratado com acd act. Na figura 6a; observamos o local da injeção de acd act onde podemos notar uma lesão com características inflamatórias. Na figura 6b; observamos a estrutura do peritônio dos animais desse grupo, onde temos a presença de hiperemia e vasodilatação que são características do processo inflamatório.

A diferença de tamanho corporal entre os animais tratados com acd act e os demais grupos também foi observada durante os dias de tratamento. Os animais tratados com acd act se apresentavam sempre menores que os demais grupos. Essas observações foram todas notadas e documentadas através de anotações do experimentador não sendo documentadas através de fotos ou vídeos no período de tratamento para não ocasionar interferências nos resultados dos finais.

Para acompanhar a saúde geral dos animais o ganho de peso foi avaliado em quatro dias diferentes (P7, P14, P21 e P28). Baseado no Gráfico 01, o grupo de acd act demonstrou um menor ganho de peso, onde seu ganho foi de 34%, 32%, 22% e 26% nos dias P7, P14, P21 e P28 respectivamente quando comparado ao grupo sham. Por outro lado a vit C demonstrou um maior ganho de peso onde seu ganho foi de 49%, 36%, 56% e 45%, nos dias P7, P14, P21 e P28 respectivamente quando comparado ao grupo de acd act. Quando comparamos o grupo acd act com o grupo tratado com acd act mais a vit C observamos que houve um aumento no ganho de peso de 66%, 68%, 92% e 71% em P7, P14, P21 e P28 respectivamente.

No gráfico abaixo temos as médias do ganho de peso dos animais nos dias de tratamento onde o grupo tratado com acd act demonstrou menor ganho de peso em relação ao sham ( $p < 0,05$ ).

**Peso dos animais durante o período de tratamento**





**Gráfico 01- Massa corpórea ganha dos animais durante o tratamento.** No gráfico a medição de ganho de peso dos animais no decorrer do tratamento. A análise foi feita através da subtração do peso final (P28) pelo peso inicial (P0) e respectivos desvio padrões, resultando no ganho de peso real dos animais em quatro dias diferentes P7, P14, P21 e P28. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 5, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, e pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \* $p < 0,05$  entre o grupo sham e acd act.

#### 4.2. Campo Aberto

O teste de campo aberto tem como objetivo analisar alguns parâmetros que podem refletir o estado emocional dos animais, frente a um ambiente novo. Como por exemplo, a reatividade emocional onde o número de bolos fecais é analisado, a atividade exploratória, o tempo em movimento e o tempo imóvel descrevem o estado tipo ansioso desses animais (Hall, 1934).

O padrão de reatividade emocional foi realizado após o período de tratamento dos animais (P32), como visto na tabela 1. O grupo sham, obteve uma média de aproximadamente 1 bolo fecal entre os animais desse grupo, enquanto que o grupo de acd act, demonstrou uma maior atividade desse padrão em números absolutos, em que a média apresentada foi de 4 bolos fecais, aproximadamente. A diferença significativa entre esses dois grupo foi de  $p < 0,001$ .

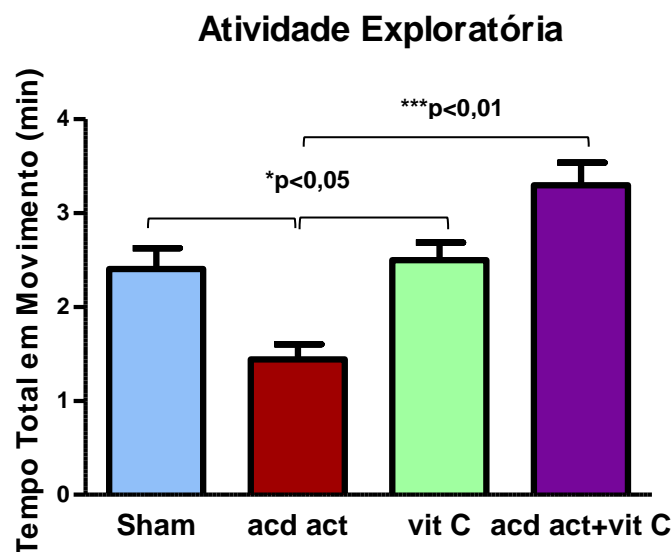
Quando comparamos os grupos vit C e acd act mais vit C ao grupo acd act, observamos uma menor reatividade emocional, dos animais desses dois grupos, onde a média de bolos fecais foi de zero, o que se assemelhou ao grupo sham, onde a diferença significativa foi de  $p < 0,001$ .

<b>Grupos</b>	<b>Bolos Fecais Média <math>\pm</math> desvio padrão</b>
<b>sham</b>	1.25 $\pm$ 0,71
<b>acd act</b>	4.5 $\pm$ 0,87
<b>vit C</b>	0 $\pm$ 0 ***
<b>acdact + vit C</b>	0 $\pm$ 0 ***

**Tabela 1- Reatividade emocional dos animais** após o período de tratamento em atividade do campo aberto. Na tabela, observa-se a representação dos valores absolutos do número de bolos fecais dos animais, em P32. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 5, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido de post-teste Bonferroni, onde \*\*\*  $P < 0,001$ .

No gráfico 02, que representa a média de tempo da atividade exploratória dos grupos, observamos que o grupo sham obteve uma média de aproximadamente 2 minutos e 40 segundos nessa atividade, enquanto que o grupo ácido acético apresentou um menor tempo dessa atividade, de mais ou menos 1 minutos e 30 segundos, onde a diferença entre esses dois grupos foi de 1 minuto e 20 segundos demonstrando uma diferença significativa de  $p < 0,05$  entre os dois grupos. Já o grupo tratado com vitamina C apresentou média de 2 minutos e 50 segundos demonstrando um diferença de 1 minuto e 20 segundos quando comparamos ao grupo acidact, demonstrando uma diferença estatística de  $p < 0,05$ .

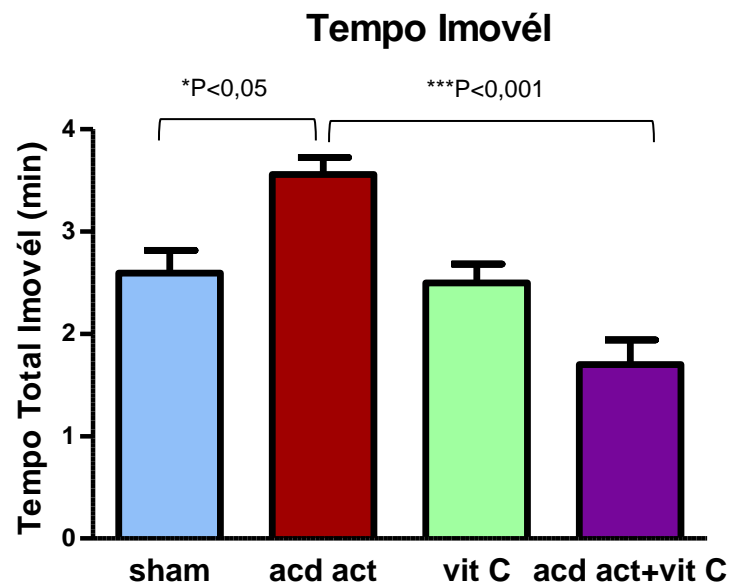
O grupo tratado com ácido acético mais vitamina C, demonstrou uma melhora significativa nesse padrão, em que a média dos animais desse grupo foi de 3 minutos e 30 segundos, demonstrando uma diferença de 2 minutos quando comprando ao acid act,



**Gráfico 02 - Atividade exploratória dos animais no teste de campo aberto.** Acima, representação das médias e respectivos valores de desvio padrão da atividade exploratória dos animais em minutos em P32. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 5, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*\*\*  $P < 0,01$  referente a diferença significativa entre os grupos acd act e acd act mais vit c e \* $P < 0,05$  entre os grupos sham e acd act e acd act e vit c.

O tempo imóvel dos animais (gráfico 03) durante o teste de campo aberto também foi avaliado como parâmetro relacionado ao estado ansioso dos animais. O grupo sham obteve uma média de 2 minutos e 60 segundos nesse padrão, enquanto que o grupo acdact uma média de 3 minutos e 56 segundos, demonstrando um aumento nessa atividade de 37%, onde a diferença significativa entre esses grupos foi de  $p < 0,05$ .

Quando comparamos o grupo tratado com acdact e vitC mais acdact, notamos que o último grupo obteve uma melhora significativa nesse padrão, em que a diferença entre as médias desses grupos foi de aproximadamente 2 minutos, demonstrando uma diferença entre esses dois grupos de  $p < 0,001$ .



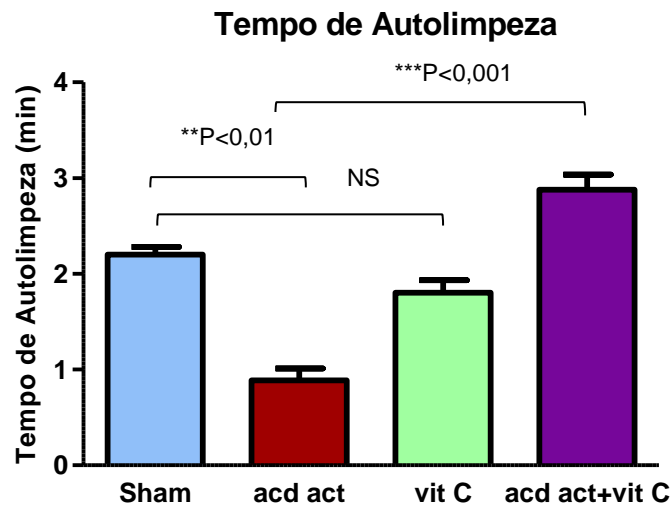
**Gráfico 03- Tempo imóvel no teste de campo aberto.** No gráfico acima, apresentação das medias de tempo total imóvel dos animais, em minutos em P32. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 5, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \* $p < 0,05$  entre os grupos sham e acd act \*\*\* $p < 0,001$  entre o grupo de ácido acético e ácido acético mais vitamina C.

### 4.3. Splash

O teste Splash foi realizado em P33 onde avaliamos o comportamento anedônico (capacidade de sentir prazer) dos animais, observamos no gráfico 04 que o grupo Sham obteve uma média de aproximadamente 2:20 minutos de autolimpeza, enquanto que o grupo ácido acético apresentou uma média de 0:89 minutos nessa atividade, apresentando uma diferença significativa de  $p < 0,001$  entre esses dois grupos.

Ao comparamos os grupos acdact e acdact mais vitC, observamos que houve uma diferença de 2 minutos e 11 segundos entre esses dois grupos, demonstrando uma melhora no grupo tratado com vitC, onde  $p < 0,001$ .

Não observamos diferença estatística entre o grupo sham e vitC, onde  $p > 0,05$ .

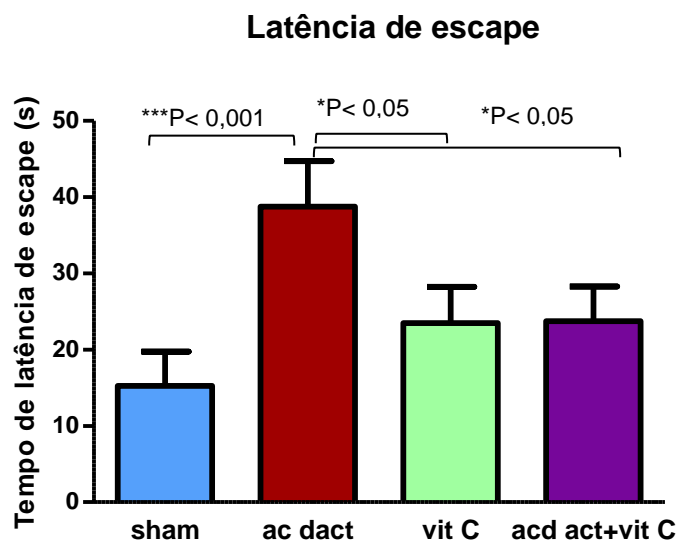


**Gráfico 04- Atividade de autolimpeza observada no teste splash.** No gráfico acima, apresentação das medias do tempo total de autolimpeza dos animais em minutos, em P33. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 5, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni.  $**P < 0,01$  entre os grupos sham e acd act e  $***p < 0,001$  entre os grupos acd act e acd act mais vit c. NS, não significativo entre os grupos sham e vit c.

#### 4.4. Labirinto Aquático de Morris

O labirinto aquático de Morris foi realizado a fim de avaliar a aprendizagem e memória dos animais. Através das médias do tempo de latência de escape para a plataforma (gráfico 05), podemos observar que o grupo sham apresentou uma menor média de latência de escape, onde a média foi de 15,5s em um total de 4 dias consecutivos de teste. Já o grupo acd act também apresentou diminuição nessa atividade, no entanto a média foi de 38,6s maior que a do grupo sham, demonstrando uma diferença estatística de  $p < 0,001$ , entre esses dois grupos.

Os grupos tratados com vit C e acd act mais vit C, não demonstraram diferença quando comparamos ao sham, no entanto ao comparamos esses grupos com o grupo de acd act, observamos que houve uma diferença de aproximadamente 15s entre esses grupos, onde  $p < 0,05$ .

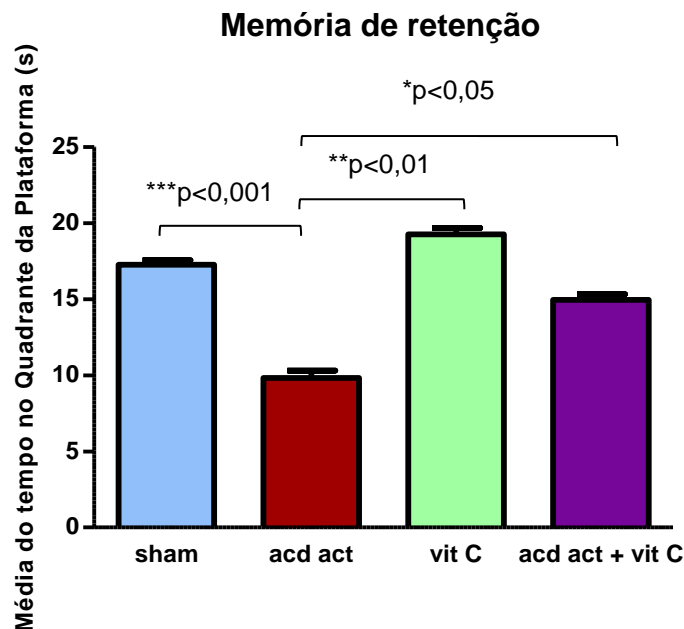


**Gráfico 05-** Tempo de latência de escape no teste do labirinto aquático de Morris. No gráfico acima apresentação das médias do tempo de escape, para a plataforma dos animais em segundos (P33). Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 5, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \* $p < 0,05$  entre os grupos acd act e vit C e acd act e acd act mais vit C. \*\*\* $p < 0,001$  entre os grupos sham e acd act. Os grupos vit C e acd act mais vit C, não apresentaram diferenças significativas com grupo sham.

A análise de retenção de memória avaliada no 5º dia de teste (gráfico 06) através do tempo gasto pelo animal no quadrante da plataforma, demonstra que o grupo

sham apresentou um tempo de 17,3s no quadrante em que se encontrava a plataforma, no entanto o grupo acd act apresentou uma diminuição nesse tempo que foi de 9,8s, uma média menor que a do grupo sham, ocasionando uma diferença estatística de  $p < 0,001$  entre os dois grupos.

Por outro lado quando comparamos o grupo acd act aos grupos vit C e acd act mais vit C notamos que houve uma diferença entre esses grupos, em que a diferença entre as médias de tempo gasto no quadrante que se encontrava a plataforma foi de 10,3s e 5,9s respectivamente demonstrando uma diferença de  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ .

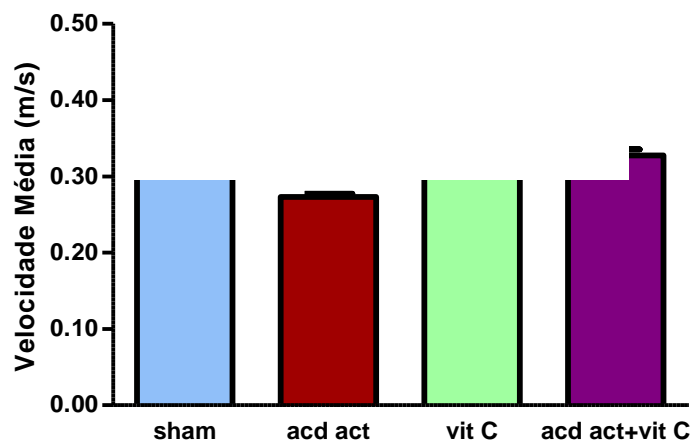


**Gráfico 06. Memória de retenção no labirinto de Morris.** Representação das médias e respectivos valores de desvio padrão do tempo gasto pelos animais, no quadrante da plataforma no quinto dia de teste, em segundos. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 5, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$  entre os grupos sham e acd act. \*\* $p < 0,01$  entre acd act e vit C e \* $p < 0,05$  entre acd act e acd act mais vit C. os grupos vit C e acd act mais vit C não apresentaram diferença quando comparados ao grupo sham

Quando avaliamos a velocidade média dos grupos também no 5º dia de teste, podemos observar através do Gráfico 07 que o grupo sham apresentou uma média de 0,41 m/s nesse parâmetro, enquanto o grupo acd act apresentou uma média de 0,27 m/s no mesmo parâmetro demonstrando uma diferença entre esses dois grupos de  $p <$

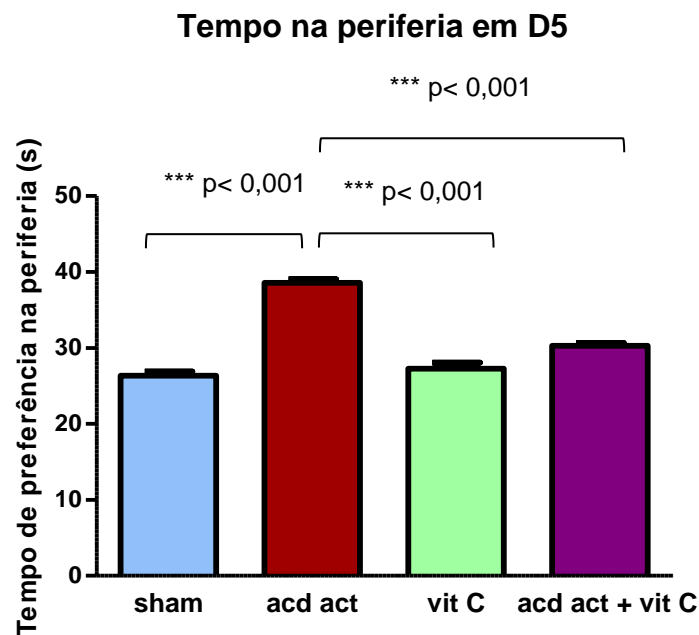
0,001. Por outro lado os grupos vit C e acd act mais vit C demonstraram uma diferença quando comparados ao grupo acd act em que a diferença das médias foi de 0,10 m/s e de 0,05m/s o que estatisticamente apresenta diferença de  $p < 0,001$ .

### Velocidade média em D5



**Gráfico- 07. Velocidade média dos animais no 5 dia de teste do labirinto de Morris.** Representação da média e respectivos valores de desvio padrão da velocidade média com a qual os animais exploraram o aparato no 5 dia, representação em metros por segundo. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 5, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  entre sham e acd act e entre vit c e acd act mais vit c com o grupo acd act. Não houve diferença entre os grupos sham e vit c e sham e acd act mais vit c.

No Gráfico 08 avaliamos o tempo gasto na periferia pelos animais no 5º dia de teste. Podemos observar que o grupo Sham gastou 26,35s na periferia dos 60s totais de teste, enquanto que o grupo acd act gastou em torno de 38,58s demonstrando gastar maior tempo na periferia que o grupo Sham. Em contrapartida os demais grupos não apresentaram diferença estatística ao grupo sham  $p > 0,05$ , porém ao serem comparados ao grupo acd act a diferença das médias foi de 11,29s e 8,31s, o que apresentou diferença estatística entre esses grupos e o grupo acd act de  $p < 0,001$ .



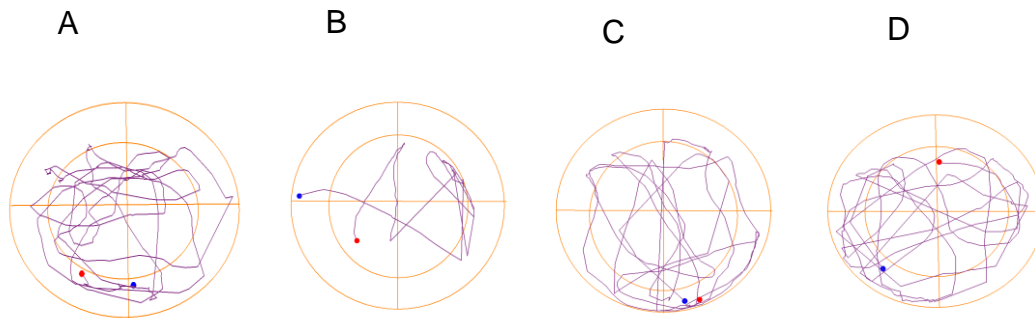
**Gráfico 08. Tempo gasto na periferia no 5 dia de teste no labirinto de Morris.** Representação da média e respectivos valores de desvio padrão do tempo gasto na periferia. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 5, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$  entre os grupos sham e acd act e acd act e vit c e acd act mais vitamina c. Não houve diferença estatística entre os grupos sham e vit c e sham e acd act mais vit c.

Por fim analisamos as estratégias usadas pelos animais através da análise no 5º dia de teste (figura 5). Através das imagens podemos observar como os animais se dispuseram no aparato durante o tempo de teste. Levando em consideração que o ponto azul é o início do teste e que o ponto vermelho o fim. Analisando as estratégias, podemos notar que os animais do grupo sham percorrem uma maior área no aparato que o grupo acd act. O grupo Vit C e ac act mais vitC percorreram uma área semelhante ao grupo sham.

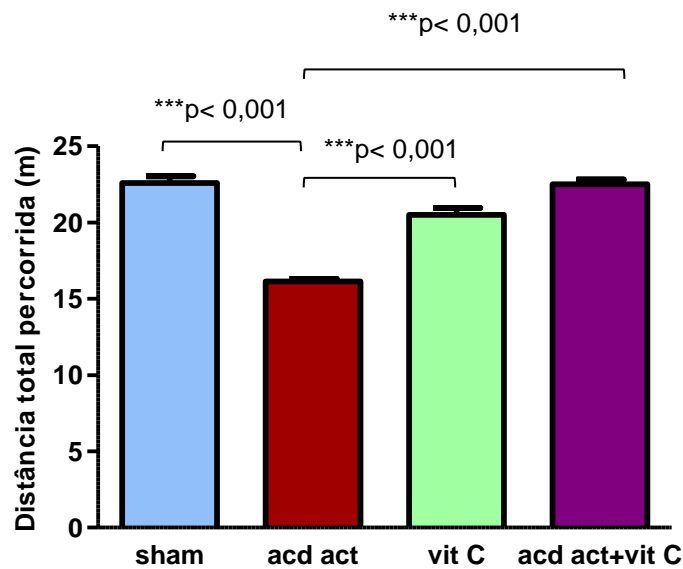
Podemos confirmar essa afirmação pelas médias da distância total percorrida pelos animais por grupo, demonstrados pelo Gráfico 09. Onde o grupo sham percorreu uma média de 22,58m em um tempo de 60s, enquanto o grupo tratado com acd act uma média de 16,14m o que levou uma diferença estatística entre esses dois grupos de  $p < 0,001$ .



Ao analisarmos os grupos vit C e acd act mais vit C observamos que esses dois grupos apresentaram uma diferença com o grupo acd act, onde a diferença entre as médias foi de 2,49m e 2,51m levando a uma diferença estatística de  $p < 0,001$ .



**Figura 5. Estratégias dos animais no 5º dia de teste no labirinto de Morris.** Imagens da estratégia usada pelos animais no 5 dia teste. As imagens acima demonstram o melhor desempenho, dos animais por grupo. Em A o grupo Sham; B. ácido acético; C Vitamina C e em D. ácido acético mais vitamina C.



**Gráfico 09. Distância total percorrida no 5 dia de teste.** Acima as médias das distâncias totais percorridas pelos animais em metros. . Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 5, através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$  entre acd act e sham e entre acd e acd act mais vit c e acd act mais vit c. Não houve diferença estatística entre os grupos sham e vit c e sham e acd act mais vit c.

## 5. DISCUSSÃO

Entender a estreita relação entre a qualidade de vida e o estresse em um período crítico do desenvolvimento e as consequências que podem surgir devido a mudanças drásticas no desenvolvimento mental, comprometendo a cognição, humor e comportamento se tornam cada vez mais importante devido aos efeitos do estresse no sistema nervoso. Dessa forma o presente estudo investigou a influência de um modelo de dor inflamatória no estresse e as mudanças comportamentais e emocionais em animais ocasionadas por esse modelo, além de utilizarmos a vitamina C como uma alternativa que possa atenuar os efeitos causados pelo estresse devido as suas diversas propriedades e benefícios que podem colaborar para do nosso trabalho.

A adolescência é um momento de intensas mudanças e com uma crescente incidência de distúrbios psiquiátricos e de comportamento, que cada vez mais são entendidos como decorrentes de mudanças na maturação do encéfalo (Giedd et al., 2008). Para investigar as mudanças no comportamento e emocionalidade frente ao estresse persistente e para avaliar as possíveis interferências nesses aspectos, usamos de um modelo animal que visa a fase da pré-adolescência (até P21) e adolescência (até P40). Nossa escolha nessa fase se deu justamente pela grande incidência de problemas psiquiátricos e emocionais, que são decorrentes de alterações neurobiológicas que ocorrem durante a adolescência, e tem relação com o surgimento de psicopatologias, como esquizofrenia, depressão e ansiedade (Spear, 2000; Giedd et al., 2008).

Diante disso, usamos de um modelo de indução de estresse a partir da dor inflamatória, que foi induzido pela injeção de ácido acético. Dessa forma o modelo usado causou uma inflamação no local da aplicação, o que poderá ocasionar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, provocando assim uma série de alterações biológicas, que irão ocasionar o desequilíbrio da homeostase do organismo e alterações no sistema de regulação do estresse, provocando o modelo do nosso interesse (Antonelli, 2106; Charmandari et al.,2005).

Já se sabe hoje que a inflamação, seja devido a uma infecção, estressor ambiental ou outras causas, pode ser vista como tendo uma ação protetora em alterações agudas, mas se torna prejudicial sobre a saúde física e mental quando se torna crônica. Nosso modelo tem foco na exposição repetida e prolongada ao estresse,

o que é chamado de carga alostática que leva ao acúmulo de respostas agudas, que em suma se tornam prejudiciais ao indivíduo (Leonard, 2015; Anne Albrecht et al., 2017)

Os modelos animais conseguem fornecer uma abordagem valiosa para o estudo e investigação de patologias relacionadas com o estresse persistente, semelhante ao ser humano. O repertório comportamental de roedores adolescentes e diferente dos recém-nascidos, pré- desmamados e adultos, pois nessa fase acontecem várias transições biológicas, que podem ocasionar maior vulnerabilidade de resposta ao estresse (McCormick et al., 2010).

Diante disso, avaliamos diversos parâmetros relacionados com a resposta a consequências que podem surgir devido ao estresse persistente e prolongado, dentre essas, avaliamos primeiramente a saúde geral dos animais, através da medição de massa corpórea em diferentes dias de tratamento (P7, P14, P21, P28). Como observado no gráfico 01 os grupos Sham, vitamina C e Ácido Acético mais Vitamina C demonstraram maior ganho de peso quando comparado ao o grupo Ácido acético, que apresentou um menor ganho de peso quando comparado aos demais grupos. Apesar de vários trabalhos relacionarem o estresse com o ganho de peso, nossos resultados não colaboram com esses achados. Segundo Ying-Hua Liu et al., 2015 a indução do processo inflamatório por LPS pode ocasionar a superprodução e liberação de mediadores inflamatórios que acabam por levar a perda de peso, falência dos órgãos ou morte, o que colabora com os nossos achados, pois o processo inflamatório provocado no local da injeção por ácido acético pode está liberando esses mediadores inflamatórios, ocasionando assim a perda de peso dos animais desse grupo.

Com o intuito de avaliar a presença de padrões comportamentais ligados a um estado tipo ansioso dos animais, que pode estar relacionado à inflamação provocada pela injeção de ácido acético, usamos alguns parâmetros do teste de campo aberto para essa finalidade. Foram realizados quatro análises no campo aberto para avaliar o estado emocional dos animais.

A primeira delas avaliou a reatividade emocional, pela contagem do número de bolos fecais. Segundo Hall, 1934 a alta defecação dos animais está relacionada com estado emocional dos mesmos, onde a defecação durante períodos de estresse emocional é comum, o que vem a colaborar com nossos achados, já que os animais do grupo tratado com injeção de ácido acético demonstraram uma reatividade emocional

maior que os demais grupos, apresentado uma diferença significativa de  $p < 0,001$  como podemos observar na tabela 1.

Os outros parâmetros avaliados a fim de avaliar o estado emocional dos animais foram a atividade exploratória e tempo imóvel. Segundo Gould e colaboradores, 2009 a maioria dos animais expostos ao campo aberto tende a explorar o aparato de forma “curiosa”, no entanto animais que exibem “medo” ao serem expostos a esse ambiente, apresentam um estado emocional considerado tipo ansioso.

Nossos resultados demonstram que os animais tratados com somente com ácido acético, apresentaram uma atividade exploratória menor que os demais grupos, como visto no gráfico 02, o que confirma o que Hall, 1934 sugeriu, onde a alta defecação e a baixa atividade exploratória indicariam um estado emocional tipo ansioso dos animais.

A análise dos parâmetros do campo aberto nos leva a sugerir, que os animais apresentam um comportamento tipo ansioso no grupo tratado somente com ácido acético. A indução da inflamação e suas implicações podem estar relacionadas com as alterações comportamentais, apresentadas por esse grupo. A relação entre a inflamação e o comportamento ansioso em animais já é bem descrita. Estudos que utilizam a administração periférica da endotoxina LPS demonstram que os níveis de expressão de citocinas pró- inflamatórias como a IL-1 são aumentados no sistema nervoso central (Krishna et al, 2016). Diante disso, animais tratados com LPS quando submetidos a testes comportamentais, apresentam comportamentos semelhantes ao estado ansioso. Existem forte evidências, que as vias do sistema imunológico, influenciam a regulação do sistema nervoso central, no metabolismo de neurotransmissores, função neuroendócrina, plasticidade sinápticas e circuitos neurais reguladores de humor, esse desequilíbrio no sistema imunológico acaba afetando o SNC e pode levar a ocorrência de transtornos de ansiedade e depressão (Salim et al., 2012).

Por outro lado o grupo tratado com ácido acético mais vitamina C mostrou um comportamento semelhante ao grupo Sham, demonstrando uma melhora nos parâmetros analisados no campo aberto observados no gráfico 2 e 3, o que pode estar ligado com a suposta propriedade ansiolítica da vitamina C. Segundo Fraga et al., 2018 a vitamina C apresentou propriedades semelhantes aos ansiolíticos em diferentes paradigmas o que contribui com nossos resultados, visto que os animais apresentaram uma melhora em seu estado emocional com o uso dessa substância. Segundo Moretti e colaboradores, 2012 a vitamina C também exibiu propriedades antidepressivas,

semelhante a um antidepressivo padrão em animais submetidos a um protocolo de estresse imprevisível crônico. Os efeitos ansiolíticos e antidepressivos demonstrados pela vitamina C podem estar relacionados com suas diversas propriedades, como a sua ação antioxidante e sua participação na neuromodulação no SNC. Sua alta concentração no SNC, particularmente nos neurônios facilita a liberação de alguns neurotransmissores e inibe a ligação de alguns neurotransmissores a receptores, incluindo respostas mediadas pelo sistema glutamatérgico, que é proposto ter um papel fundamental na fisiopatologia da ansiedade e depressão (Moretti et al., 2012). Dessa forma, as propriedades da vitamina C apresentadas podem estar contribuindo para a melhora dos animais tratados com essa substância em nossos estudos.

Além do campo aberto para avaliar o estado emocional dos animais, analisamos também o comportamento anedônico no teste Splash. Segundo a literatura, animais que apresentam comportamento tipo ansioso e depressivo, tendem a diminuir o autocuidado e o comportamento motivacional nesse teste (Isingrini et al., 2010).

Segundo Lieberknecht et al, 2016 um comportamento semelhante a depressão pode ser observado em modelos inflamatórios em animais. A injeção de LPS em uma dose relativamente baixa (~ 0,1 mg / kg, i.p) provoca alterações no estado emocional dos animais, o que leva a uma diminuição na latência para o autocuidado no teste de splash, o que caracteriza um estado emocional tipo depressivo/ansioso. O que vem a corroborar com nosso resultado, pois os animais que foram submetidos à injeção de ácido acético, demonstraram uma diminuição significativa no autocuidado, como observado no gráfico 4. Em contrapartida os animais que receberam tratamento crônico de vitamina C, demonstraram melhora nesse parâmetro em comparação ao grupo ácido acético o que pode estar relacionada com a provável propriedade anti-inflamatória da vitamina C. Segundo estudos a vitamina C diminuiu consideravelmente o número de marcadores inflamatórios induzidos por LPS, provocados pela liberação desses mediadores (Huang et al., 2014).

Existem fortes evidências que as citocinas geradas durante a inflamação, ativam uma resposta inflamatória secundária no cérebro, que é caracterizado pela ativação da micróglia e produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF), IL -1 e IL-6, que tem efeitos profundos na transmissão e plasticidade sináptica, que podem prejudicar fatores intimamente relacionados às funções hipocâmpais como a formação de potenciais de longa duração e o fortalecimento sináptico. Tais prejuízos podem se refletir sobre desempenho de funções hipocâmpais, como a memória e

aprendizado espacial (Riazi et al., 2015). Desta forma, investigamos o desempenho dos animais em um teste comportamental relacionado a esta função.

Para avaliar essa função, utilizamos o labirinto aquático de Morris que foi realizado em duas etapas. Nos quatro primeiros dias avaliamos o aprendizado dos animais, através de uma sequência de testes, e no quinto dia avaliamos a memória espacial. Os resultados ilustrados no gráfico 05 demonstram que o tratamento com ácido acético reduziu de forma significativa a aprendizagem dos animais, nos primeiros dias de testes. Da mesma forma, a memória de retenção analisada no gráfico 06, demonstra que o tratamento com ácido acético também prejudicou de forma significativa a memória de retenção. Observamos também que os animais tratados cronicamente com vitamina C demonstraram uma melhora nos dois desempenhos testados no labirinto.

O desempenho no labirinto aquático vem sendo associado à formação de potencial de longa duração (LTP) e à função do receptor NMDA, tornando-se uma técnica fundamental na investigação das funções do hipocampo, visto que alterações nessa estrutura refletem diretamente no desempenho nesse teste (Vorhees & Williams, 2006).

A LTP é considerada um dos principais mecanismos celulares envolvidos na aprendizagem e memória. Estudos anteriores associaram o estresse crônico, com uma inibição significativa da plasticidade sináptica bem como a memória espacial. Segundo dados da literatura, o estresse induz uma resposta inflamatória em várias regiões do cérebro, o que potencializa a expressão de fatores pró-inflamatórios e que pode gerar déficits cognitivos e prejuízo a memória espacial (Liu et al., 2015).

Segundo um estudo recente, o tratamento com LPS aumenta a expressão de citocinas pró- inflamatórias no hipocampo, através da ativação da micróglia como IL-1B e TNF $\alpha$ , que pode inibir a fosforilação de receptores de Glutamato 1 (GluR1). Acredita-se que esse receptor participa da LTP no hipocampo, o que está diretamente relacionado com os mecanismos de aprendizado e memória. Dessa forma o comprometimento da LTP, pode estar levando a disfunções cognitivas relacionadas à memória e aprendizado (Li et al., 2017; Liu et al., 2015 ).

Outra condição que pode ser afetada pela ativação da micróglia no hipocampo é a neurogênese. A neurogênese pode ocorrer em varias áreas do cérebro, as células progenitoras neuronais (NPC) produzem neurônios principalmente em duas regiões específicas; na zona Subventricular (SVZ) e na zona subgranular (SVG), do giro denteado do hipocampo. As NPCs expressam constitutivamente receptores para

citocinas pró-inflamatórias. No entanto altos níveis de citocinas induzem a apoptose de neurônios e também desencadeiam o estresse oxidativo, que afeta diretamente neurônios em desenvolvimento. Com isso interromper a neurogênese pode prejudicar tanto a memória como o aprendizado. Acredita-se que a geração de novos neurônios desempenha um papel importante na formação da memória, aprendizado espacial e flexibilidade cognitiva (Chesnokova et al., 2016).

Em nossos resultados o tratamento crônico com vitamina C no grupo que também foi tratado com ácido acético, mostrou melhorar o desempenho dos animais da tarefa do labirinto. Isso ocorreu provavelmente pela participação da vitamina C na modulação das citocinas pró- inflamatórias através dos efeitos na regulação de genes. Segundo Portugal e colaboradores, 2017 a redução dos receptores SVCT na micróglia foi suficiente para ativá-las e que a superexpressão desses receptores impediu a ativação da micróglia, indicando um fenótipo anti-inflamatório da vitamina C (Carr et al., 2017; Portugal et al., 2017).

Em resumo nosso modelo de dor inflamatória mostrou ser eficiente em provocar um estado sugestivo de ansiedade nos animais. Além disso, vitamina C demonstrou ser eficiente na melhora desse estado, atenuando as consequências que foram provocadas em nosso modelo. Com isso podemos concluir que nosso modelo pode ser utilizado como protocolo de ansiedade e que a vitamina C parece ter um papel fundamental contra o estado tipo ansioso. No entanto novos testes comportamentais, assim como a análise mais profunda devem ser realizados.



## 6. CONCLUSÃO

- O tratamento com ácido acético parece ocasionar um menor ganho de peso dos animais, por outro lado o tratamento crônico com vitamina C pareceu ajudar no ganho maior de peso.
- O tratamento crônico com vitamina C conseguiu atenuar os efeitos do tratamento com ácido acético na atividade exploratória no teste de campo aberto.
- O tratamento crônico com vitamina C reduz o comportamento sugestivo de estado ansioso e depressivo em animais submetidos ao modelo de ácido acético.
- O tratamento crônico com vitamina C reverte déficits de aprendizado apresentados por animais submetidos ao modelo de ácido acético.
- O tratamento crônico com vitamina C reverte déficits de memória espacial em animais submetidos ao modelo de ácido acético.
- O tratamento com ácido acético foi capaz de induzir um comportamento sugestivo de estado ansioso e depressivo nos animais.

## 7. REFERÊNCIAS

- American academy of pediatrics. Prevention and management of procedural pain in the neonate: An Update. **From the American Academy of Pediatrics** Jan 2016
- Anacker, Christoph. Et al. Glucocorticoid-Related Molecular Signaling Pathways Regulating Hippocampal Neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**. 2013
- Andersen, S.L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? **Neurosci. Biobehav.** 2003
- Anne Albrecht. Et al. Neurobiological consequences of juvenile stress: a GABAergic perspective on risk and resilience. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. 2017
- Antonelli, Marta C. et al. Long-term consequences of prenatal stress and neurotoxicants exposure on neurodevelopment. **Progress in Neurobiology**. 2016
- Bale. Tracy L. et al. Early Life Programming and Neurodevelopmental Disorders. 2010
- Belda Xavier et al. Stress-induced sensitization: the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and beyond. **Stress**. 2015
- Carr, Anitra C. and Maggini Silvia. Vitamin C and Immune Function. **Nutrients**. 2017.
- Charmandari. Evangelia. Et al. Endocrinology of the stress response. **Rev. Physiol.** 2005
- Chesnokov, Vera. Et al. Chronic Peripheral Inflammation, Hippocampal Neurogenesis, and Behavior. **Brain Behav Immun**. 2016
- Covarrubias-Pinto, Adriana. Et al. Old Things New View: Ascorbic Acid Protects the Brain in Neurodegenerative Disorders. **Int. J. Mol. Sci**. 2015
- Dricks, Sally. Effects of neonatal stress on gamma oscillations in hippocampus. **Nature**. 2016

- Duarte, J. O., Cruz, F. C., Leão, R. M., Planeta, C. S., & Crestani, C. C. Stress Vulnerability During Adolescence. **Psychosomatic Medicine**. 2015
- Fraga, D. B. et al. Anxiolytic effects of ascorbic acid and ketamine in mice. **Journal of Psychiatric Research**. 2018
- Furukawa. M. et al. Neonatal maternal separation delays the GABA excitatory-to-inhibitory functional switch by inhibiting KCC2 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2017
- Giedd, Jay N. et al. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence?. **Nat Rev Neurosci**. 2008
- Giuffrè, Mario. Et al. Oxidative stress markers at birth: Analyses of a neonatal population. **Acta Histochemica**. 2015
- Griffis, Charles A. et al. Acute Painful Stress and Inflammatory Mediator Production. **Neuroimmunomodulation**. 2013
- Grosso Giuseppe. Et al. Effects of Vitamin C on health: a review of evidence. **Frontiers in Bioscience**. 2013
- Hall,calvin s. Defecation and urination as measures of individual.Differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**.1934
- Horovitz et al. Post-Weaning to Pre-Pubertal ('Juvenile') Stress: A Model of Induced Predisposition to Stress-Related Disorders. **Neuroendocrinology** 2012
- Huang Y-N. et al. L-Ascorbate Attenuates the Endotoxin-Induced Production of Inflammatory Mediators by Inhibiting MAPK Activation and NF-kB Translocation in Cortical Neurons/Glia Cocultures. **PLoS ONE**. 2014

Isingrini, E. Et al. Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. **PLoS ONE**. 2010

Joëls, Marian; Baram, Tallie Z. The neuro-symphony of stress. **Nat Rev Neurosci**. 2009

Johnson , Anthony C. Van Meerveld, Beverley Greenwood Stress-Induced Pain: A Target for the Development of Novel Therapeutics. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**. 2014

Kesavan, Kalpashri. Neurodevelopmental Implications of Neonatal Pain and Morphine Exposure. **Pediatric annals**. 2015

Krishna,Saritha. Et al. Behavioral and monoamine perturbations in adult male mice with chronic inflammation induced by repeated peripheral lipopolysaccharide administration. **Behav Brain Res**. 2016

Kumamoto, Haruko. Et al. Repeated fluvoxamine treatment recovers early postnatal stress-induced hypersociability-like behavior in adult rats. **Journal of Pharmacological Sciences**. 2017

Leonard. Brian E. Pain, Depression and Inflammation: Are Interconnected Causative Factors Involved?. Pain in Psychiatric Disorders. **Mod Trends Pharmacopsychiatry**. 2015

Li, Mengmeng. Et al. Lentivirus-mediated interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) knock-down in the hippocampus alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficits and anxiety- and depression-like behaviors in mice. **Journal of Neuroinflammation**. 2017

Lieberknecht, Vicente. Et al. Antidepressantlike effect of pramipexole in an inflammatory model of depression. **Behavioural Brain Research**. 2016

Liu, M. et al Microglia activation regulates GluR1 phosphorylation in chronic unpredictable stress-induced cognitive dysfunction. **Stress**. 2015

Liu, Y.-H. et al . Omega-3 Fatty Acid Intervention Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Weight Loss in Mice. **Marine Drugs**. 2015

Maccari. S. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. **Neuroscience and biobehavioral reviews**. 2003

Matar, eman m, Arabiat, Diana h. Oral glucose efficacy on neonate's pain responses at the NICU: A quasi experimental trial of wo clinical procedures. **Applied Nursing research**. 2016

McCormick et al. Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. **Brain and Cognition**.2010

McCormick, heryl M. et al. Peer pressures: Social instability stress in adolescence andsocial deficits in adulthood in a rodent model. **Developmental Cognitive Neuroscience**. 2015

Meyerson et al. Structural mechanism of glutamate receptor activation and desensitization. **Nature**. 2015

Mifflin ,K. A. Kerr, B. J. The transition from acute to chronic pain: understanding how different biological systems Interact. **Can J Anesth/J Can Anesth**. 2014

Morag, IRIS. et al. Cumulative Pain-Related Stress and Developmental Outcomes among Low-Risk Preterm Infants at One Year Corrected Age. **Early Human Development**. 2017

Nummenmaa, Lauri and Tuominen, Lauri. Opioid system and human emotions. **Opioids and emotions**. 2017

Pavao-de-Souza, Gabriela F. et al. Acetic acid- and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI<sub>3</sub>K and microglia in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 2012

Pinheiro, B. et al. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **J. Ethnopharmacol.** 2011

Provenzi, Livio. Et al. Preterm behavioral epigenetics: A systematic review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** 2018

Riazi, XKiarash. Et al. Microglia-Dependent Alteration of Glutamatergic Synaptic Transmission and Plasticity in the Hippocampus during Peripheral Inflammation. **The Journal of Neuroscience.** 2015

Rith-Najarian et al. The biopsychosocial model of stress in adolescence: selfawareness of performance versus stress reactivity. **Stress.** 2014

Salim, Samina. Et al. Inflammation in Anxiety. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology.** Volume 88. 2012

T.D. Gould. Et al. The Open Field Test. **Neuromethods.** 2009

Ulrich-Lai YM, Herman J. Neural regulation of endocrine and autonomic stress response. **Nature Reviews – Neuroscience.** 2009

Vogelzangs, N. et al. Cytokine production capacity in depression and anxiety. **Nature.** 2016

Vorhees, Charles V and Williams, Michael T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nat Protoc.** 2006

Walker, Claire-Dominique. Chronic early life stress induced by limited bedding and nesting (LBN) material in rodents: critical considerations of methodology, outcomes and translational potential, **Stress.** 2017

Walker, Claire-Dominique. et al. Chronic early life stress induced by limited bedding and nesting (LBN) material in rodents: critical considerations of methodology, outcomes and

translational potential, **Stress: The International Journal on the Biology of Stress**.  
2017

Yi Li and Herb E. Schellhorn. New Developments and Novel Therapeutic Perspectives  
for Vitamin C. **The Journal of Nutrition**.2017