

INFUSÃO DE DOPAMINA NO HIPOCAMPO REVERTE OS DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS PELA DEPRIVAÇÃO MATERNAL

Gabriel Palermo Del Rosso Barbosa¹

Pamela Billig Mello Carpes²

Ben Hur Souto das Neve³

Resumo:

Cuidados parentais durante o período neonatal são importantes para o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos. Pesquisas sugerem que situações estressoras durante este período, podem alterar a organização das redes neurais, danos estes que podem causar déficits nas memórias de curta e longa duração e parecem estar associados com alterações em estruturas como o córtex pré-frontal e o hipocampo. O hipocampo é importante para a aprendizagem e retenção da memória e é afetado por protocolos de estresse neonatal, recebe aferências dopaminérgicas de áreas como a Área Tegmental Ventral, Substância Nigra e Locus Coeruleus. Embora vários sistemas de neurotransmissores e os danos causados pela Deprivação Materna tenham sido estudados, pouco se sabe do envolvimento do sistema dopaminérgico nos déficits cognitivos observados em ratos submetidos a Deprivação Materna. Nossa hipótese é de que os danos cognitivos associados a DM podem estar relacionados a alterações nos neurônios dopaminérgicos que se projetam ao hipocampo. Ratas prenhas foram obtidas, após o nascimento metade das ninhadas foram submetidas ao protocolo de Deprivação Materna, que consiste na separação da mãe da sua ninhada por 3 horas/dia durante os 10 primeiros dias de vida, após o dia 21 todas as ninhadas são desmamadas e os ratos colocados 5 por caixa moradia, sendo divididos em quatro grupos: (I) Controle, (II) Deprivados, (III) Dopamina e (IV) Deprivados + Dopamina. A cirurgia consiste na colocação de cânulas na área CA1 do Hipocampo para a posterior infusão de solução salina ou dopamina. A tarefa de reconhecimento de objetos consiste em o animal explorar dois objetos (A e B), posteriormente substituindo um deles por um novo objeto (C), visando observar se o animal mantém a memória do objeto familiar. Testes de controle comportamental são feitos para avaliar se os procedimentos não trouxeram déficits de locomoção, exploração ou ansiedade. Ratos de todos os grupos exploraram ambos os objetos (A e B) no treino de forma semelhante, a infusão hipocampal de dopamina logo após o treino de reconhecimento de objetos reverte os déficits de memória relacionados à Deprivação Materna (DM), assim como, a DM e a infusão de Dopamina não alteraram a movimentação, exploração ou causaram ansiedade validando os protocolos e procedimentos não trouxeram déficits aos animais. Foi demonstrado que a infusão de dopamina na região CA1 do hipocampo logo após o aprendizado reverte os déficits de memória causados pela DN, indicando o envolvimento do sistema

dopaminérgico nos déficits causados pela mesma.

Palavras-chave: MEMÓRIA DOPAMINA DEPRIVAÇÃO FISIOLÓGIA HIPOCAMPUS

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

INFUSÃO DE DOPAMINA NO HIPOCAMPUS REVERTE OS DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS PELA DEPRIVAÇÃO MATERNA

¹ Aluno de graduação. gabrieldelrosso@gmail.com. Autor principal

² Docente. pamelacarpes@unipampa.edu.br. Orientador

³ Participante. benhursneves@gmail.com. Co-orientador

INFUSÃO DE DOPAMINA NO HIPOCAMPO REVERTE OS DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS PELA DEPRIVAÇÃO MATERNAL

1 INTRODUÇÃO

Os cuidados parentais durante o período neonatal são importantes para o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos (MONTIROSSO, R. et al, 2017). Pesquisas sugerem que situações estressoras durante este período podem alterar a organização das redes neurais (JUSTER, R. P. et al, 2011) e estudos mostram que modelos que induzem o estresse nos primeiros dias de vida, como por exemplo a Deprivação Maternal (DM) em roedores, podem causar danos às memórias de curta e longa duração; danos estes parecem estar relacionados às alterações em estruturas como o córtex pré-frontal e o hipocampo.(NEVES, B. H. et al, 2015; BENETTI, F. et al, 2012; MARCO, E. M. et al, 2013; BAUDIN, A. et al, 2012).

O hipocampo é uma estrutura importante para a aprendizagem e retenção da memória (CARR, D. B. et al, 2000; LOUILOT, A. et al, 1989), pode ser afetado por protocolos de estresse neonatal (BENETTI, F. et al, 2012, 2009; ROCERI, M. et al 2002) e recebe aferências dopaminérgicas da Área Tegmental Ventral, Substância Nigra (SCATTON, B. et al, 1980; GASBARRI, A. et al, 1997) e *Lócus Coeruleus* (TAKEUCHI, H. et al, 2003; KEMPADOO, K. A. et al, 2016). Estudos mostram que a exposição a glicocorticoides durante os períodos pré e pós-natal afetam o desenvolvimento do sistema dopaminérgico (RENTESI, G. et al, 2013). Embora vários sistemas de neurotransmissores e os danos causados pela DM tenham sido estudados nos últimos anos (BENETTI, F. et al, 2012; RENTESI, G. et al, 2013; ROCERI, M. et al, 2002), pouco se sabe sobre o envolvimento do sistema dopaminérgico nos déficits cognitivos observados em ratos submetidos à DM.

Assim, nossa hipótese é de que os danos cognitivos associados à DM podem estar relacionados a alterações nos neurônios dopaminérgicos que se projetam ao hipocampo e neste trabalho objetivamos testar esta hipótese.

2 METODOLOGIA

Animais

Ratas Wistar prenhas foram obtidas do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram mantidos em um ciclo de 12h luz e 12h escuro, com temperatura e umidade controlada. Durante a gestação foi mantida apenas uma rata por caixa, com ração e água repostos diariamente. Após o nascimento, metade das ninhadas foram submetidas ao protocolo de Deprivação Maternal (DM) nos 10 primeiros dias de vida; todas as ninhadas foram submetidas ao desmame aos 21 dias de vida e os ratos machos foram colocados em caixas moradias com até 5 animais por caixa, para o prosseguimento do experimento. As fêmeas foram doadas a outro estudo.

Os ratos machos foram divididos em quatro grupos, sendo eles: (I) Controle: animais não deprivados, submetidos ao teste de reconhecimento de objetos (RO) com infusão hipocampal de salina; (II) Deprivados: Animais submetidos ao protocolo de DM, e ao teste de RO com infusão intrahipocampal de salina; (III) Dopamina: animais não deprivados, submetidos ao teste de RO com infusão intrahipocampal de dopamina; e, (IV) DM + dopamina: Animais submetidos à DM e ao teste de RO com infusão intrahipocampal de dopamina.

Todos os experimentos foram aprovados pelo CEUA (protocolo número 005/2017).

Protocolo de Deprivação Maternal

Os ratos dos grupos II e IV foram submetidos ao protocolo de Deprivação Maternal (DM), no qual a mãe é removida da caixa moradia por 3 horas/dia durante os 10 primeiros

dias de vida. Durante o período de separação o ambiente é aquecido para evitar perda de calor dos filhotes. Após as 3 horas a mãe é devolvida para sua respectiva caixa moradia, no dia 21 de vida todos os animais são desmamados, de acordo com a rotina do laboratório.

Cirurgia e Infusão

Todo os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica aos 90 dias de vida. A cirurgia consiste na implantação de cânulas bilaterais no hipocampo dos ratos, pelas quais posteriormente será infundida a droga. Os ratos são anestesiados com ketamina e xilazina (DOSES???) E as cânulas são implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal, seguindo as coordenadas base do atlas Paxinos e Watson (PAXINOS, G., WATSON, C., 2006).

Para a infusão, agulhas-guia são inseridas através das cânulas colocadas cirurgicamente, e a droga é injetada ao longo de 60 segundos. Após este período a agulha é mantida por 60 segundos adicionais para que a droga seja completamente absorvida/não haja refluxo. Os ratos dos grupos (III) e (IV) receberam 1µl/lado de dopamina (dose 1µg/µL), enquanto os ratos do grupo (I) e (II) receberam 1µl/lado de solução salina.

Tarefa de Reconhecimento de Objetos

Roedores são animais exploratórios por natureza. Eles costumam explorar mais objetos novos do que aqueles já conhecidos quando estão em um ambiente já familiar. No teste de RO, os animais passam por um período de habituação ao aparato antes de serem treinados na tarefa. A habituação consiste em permitir que os animais explorem o aparato por 20 minutos/dia ao longo de 4 dias. No quinto dia, que corresponde ao treino no RO, são colocados dois objetos no aparato (A e B) e os animais são permitidos explorar os mesmos ao longo de 5 minutos. O teste da memória de longa duração é realizado 24h após o treino, quando é mantido um dos objetos já conhecidos e outro é substituído por um novo (C). (MELLO-CARPES, P. B., et al, 2013) O tempo de exploração de cada objeto é cronometrado.

Testes de Controle Comportamental

Para avaliar se os protocolos e procedimentos utilizados não produziram nenhum déficit de locomoção ou exploração é utilizado o Campo Aberto (CA), teste no qual os ratos são colocados em uma caixa com quadrantes de mesmo tamanho no assoalho e são contabiliza os seus cruzamentos (movimentação) e elevações (exploração) na caixa durante 5 minutos (BENETTI, F. et al, 2009).

Para avaliar ansiedade, os animais foram testados no Labirinto em Cruz Elevado (LCE), o qual possui dois braços abertos e dois braços fechados, os animais realizam este teste por 5 minutos, ao longo dos quais o tempo gasto em cada região do labirinto é cronometrado (PELLOW, S. et al, 1985).

Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados o tempo de exploração em cada objeto foi convertido em percentual do tempo total de exploração e foi utilizado teste-t de uma amostra, considerando uma média teórica de 50%. Para análise dos resultados dos testes de Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto foi utilizado uma ANOVA de uma via. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão, sendo considerados significantes valores de $P < 0,05$.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1. A infusão hipocampal de dopamina reverte os déficits de memória relacionados à Deprivação Materna (DM).

Observa-se na **Figura 1** que os ratos de todos os grupos exploraram os objetos A e B durante a seção de treinamento por tempos semelhantes, sendo aproximadamente 50% cada. Durante o teste os ratos do grupo Controle (I) exploraram mais que 50% do tempo total de exploração o novo objeto (C), tendo permanecido a memória. Os ratos que foram submetidos ao protocolo de Deprivação Materna (II) exploraram o objeto familiar (A) e o novo objeto (C) por aproximadamente 50% do tempo total de exploração cada, o que indica déficit de memória. A infusão de dopamina intra Hipocampal ajudou os ratos do grupo Dopamina (III) a manter a memória de reconhecimento de objetos e reverteu os déficits de memória do grupo Deprivação + Dopamina (IV), que explorou de forma significativamente maior que 50% do tempo total de exploração o novo objeto (C).

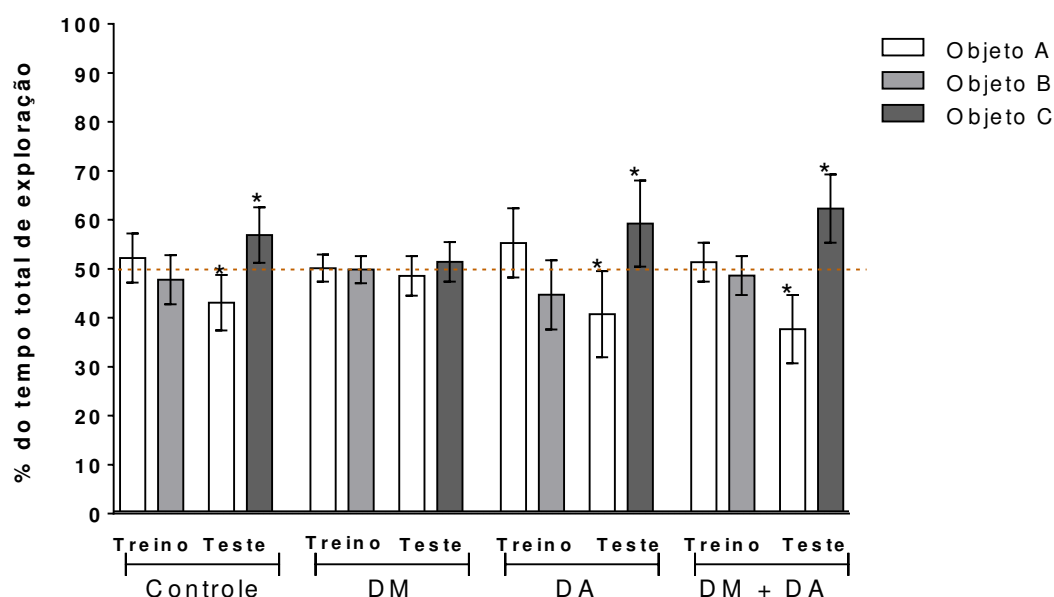


Figura 1. Quando submetidos à Deprivação Materna os animais apresentam um déficit na memória de reconhecimento de objetos, a infusão de dopamina intra Hipocampal mostra-se capaz de reverter o déficit. * quando estatisticamente significante.

3.2. A DM e a infusão de Dopamina não alteraram a movimentação, exploração ou causaram ansiedade.

Pode-se observar na **Tabela 1** que a infusão de Dopamina ou Salina não afetou o número de cruzamentos e elevações no teste comportamental de Campo Aberto. Também não apresentou diferenças no tempo gasto nos braços aberto, fechado e tempo de permanência no teste comportamental de Labirinto em Cruz Elevado.

	Controle	MD	DA	MD + DA
<i>Campo Aberto</i>				
Cruzamentos (n)	84,38 ± 23,31	81,50 ± 54,59	63,22 ± 23,06	64,70 ± 35,08
Elevações (n)	35,50 ± 12,22	36,70 ± 27,82	29,56 ± 10,64	30,80 ± 17,63
<i>Labirinto em Cruz Elevado</i>				
Entradas nos braços abertos (n)	6,12 ± 1,35	5,70 ± 2,35	5,33 ± 1,65	5,10 ± 2,18
Entradas nos braços fechados (n)	5,87 ± 1,126	5,50 ± 2,014	5,55 ± 2,007	5,10 ± 2,378
Tempo nos braços abertos (s)	121,0 ± 37,84	129,1 ± 51,32	99,78 ± 51,45	121,8 ± 57,14
Tempo nos braços fechados (s)	179,0 ± 37,84	170,9 ± 51,32	200,2 ± 51,45	178,2 ± 57,14

Tabela 1. Nenhum dos procedimentos alterou o comportamento locomotor, exploratório ou causou ansiedade.

Nossos resultados demonstram que a infusão de dopamina pode reverter os déficits causados pela Deprivação Materna. Situações estressoras durante o período neonatal levam a mudanças no desenvolvimento cerebral, sendo uma das causas os altos níveis de glicocorticoides. (MEANEY, M. J. et al, 1996; TILDERS, F. J. et al, 1993; VAZQUEZ, D. M. et al, 2003) O Hipocampo é uma estrutura fundamental para a formação e consolidação da memória, tendo grande número de receptores de glicocorticoides. (REUL, J. M. et al, 1985) O aumento dos níveis de glicocorticoides durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central pode alterar o funcionamento do hipocampo. (GONZALEZ, A. S. et al, 1990; PIERETTI, S. et al, 1991) A Deprivação Materna afeta o comportamento dos animais quando adultos, apresentando déficit nas memórias de curta e longa duração em tarefas cognitivas, déficits causados pela mudança dos parâmetros oxidativos no Hipocampo, antioxidantes podem ajudar a proteger desses efeitos. (MENEZES, J. et al, 2017; NEVES, B. H. et al, 2015)

A infusão de Dopamina reverte os déficits de memória, mostrando o envolvimento do Sistema Dopaminérgico nos déficits causados pela Deprivação Materna. Porém deixando de lado a infusão de Dopamina, não foi encontrada diferença nos níveis de Dopamina no Hipocampo dos animais Controle e Deprivados. Resultado o qual podemos atribuir ao estudo fazer a análise *post mortem* enquanto o ideal seria a análise *in vivo*. Outra hipótese seria que as mudanças não fossem nos neurotransmissores e sim nos receptores dopaminérgicos. (MAJCHER-MAŚLANKA, I. et al, 2017; AMIRI, S. et al, 2016)

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados demonstraram que a infusão de dopamina na região CA1 do hipocampo logo após o aprendizado na tarefa de reconhecimento de objetos reverte os déficits de memória causados pela deprivação maternal, indicando o envolvimento do sistema dopaminérgico nos déficits causados pela mesma.

5 REFERÊNCIAS

- MONTIROSSO, R. et al. **Developmental care, neonatal behavior and postnatal maternal depressive symptomatology predict internalizing problems at 18 months for very preterm children.** J Perinatol. 2017.
- JUSTER, R. P. et al. **A transdisciplinary perspective of chronic stress in relation to psychopathology throughout life span development.** Dev Psychopathol. 2011.
- NEVES, B. H. et al. **Physical exercise prevents short and long-term deficits on aversive and recognition memory and attenuates brain oxidative damage induced by maternal deprivation.** Physiol Behav. 2015,152:99-105.
- BENETTI, F. et al. **Histamine reverses a memory deficit induced in rats by early postnatal maternal deprivation.** Neurobiol Learn Mem. 2012.
- MARCO, E. M. et al. **Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats.** Neuropharmacology. 2013.
- BAUDIN, A. et al. **Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex.** Neurobiology of learning and memory. 2012.
- CARR, D. B., SESACK, S. R. **Projections from the Rat Prefrontal Cortex to the Ventral Tegmental Area: Target Specificity in the Synaptic Associations with Mesoaccumbens and Mesocortical Neurons.** The Journal of Neuroscience. 2000.
- LOUILOT, A., LE MOAL, M., SIMON, H. **Opposite influences of dopaminergic pathways to the prefrontal cortex or the septum on the dopaminergic transmission in the nucleus accumbens. An in vivo voltammetric study.** Neuroscience. 1989.

BENETTI, F. et al. **Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine.** *Int J Dev Neurosci.* 2009.

ROCERI, M. et al. **Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus.** *Mol Psychiatry.* 2002.

SCATTON, B. et al. **Origin of dopaminergic innervation of the rat hippocampal formation.** *Neuroscience letters.* 1980.

GASBARRI, A., SULLI, A., PACKARD, M. G. **The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1997.

Takeuchi, H. et al. **Childhood parental separation experiences and depressive symptomatology in acute major depression.** *Psychiatry Clin Neurosci.* 2003.

Kempadoo, K. A. et al. **Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2016.

Rentesi, G. et al. **Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats.** *Behav Brain Res.* 2013.

Pellow, S. et al. **Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.** *J Neurosci Methods.* 1985.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition.** Elsevier Science; 2006.

Meaney, M. J. et al. **Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress.** *Dev Neurosci.* 1996.

TILDERS, F. J., SCHMIDT, E. D., DE GOEIJ, D. C. **Phenotypic plasticity of CRF neurons during stress.** *Ann N Y Acad Sci.* 1993.

Vazquez, D. M. et al. **Impact of maternal deprivation on brain corticotropin-releasing hormone circuits: prevention of CRH receptor-2 mRNA changes by desipramine treatment.** *Neuropsychopharmacology.* 2003.

REUL, J. M., DE KLOET, E. R. **Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation.** *Endocrinology.* 1985.

Gonzalez, A. S. et al. **Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses.** *Physiol Behav.* 1990.

PIERETTI, S., D'AMORE, A., LOIZZO, A. **Long-term changes induced by developmental handling on pain threshold: effects of morphine and naloxone.** *Behav Neurosci.* 1991.

Menezes, J. et al. **Green tea protects against memory deficits related to maternal deprivation.** *Physiol Behav.* 2017.

Neves, B. H. et al. **Physical exercise prevents short and long-term deficits on aversive and recognition memory and attenuates brain oxidative damage induced by maternal deprivation.** *Physiol Behav.* 2015.

Majcher-Maślanka, I. et al. **The effects of early-life stress on dopamine system function in adolescent female rats.** *International Journal of Developmental Neuroscience.* 2017.

Amiri, S. et al. **Involvement of D1 and D2 dopamine receptors in the antidepressant-like effects of selegiline in maternal separation model of mouse.** *Physiology & Behavior.* 2016.