



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**APLICABILIDADE DA MUSICOTERAPIA NAS COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS
DECORRENTES DA HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA, INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE POR NITRITO DE SÓDIO.**

MARA CLAUDIA RIBEIRO

BRASÍLIA-DF

2017

MARA CLAUDIA RIBEIRO

**APLICABILIDADE DA MUSICOTERAPIA NAS COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS
DECORRENTES DA HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA, INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE POR NITRITO DE SÓDIO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Aplicadas à Saúde.

Orientadora: **Profa. Dra. Vania Maria Moraes Ferreira**

BRASÍLIA-DF

2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

RM298a RIBEIRO, MARA CLAUDIA
APLICABILIDADE DA MUSICOTERAPIA EM COMPLICAÇÕES
NEUROLÓGICAS DECORRENTES DA HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA
INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR NITRITO DE SÓDIO / MARA
CLAUDIA RIBEIRO; orientador VANIA MARIA MORAES FERREIRA. --
Brasília, 2017.
174 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2017.

1. Musicoterapia. 2. Ansiedade. 3. Depressão. 4.
Hipocampo. 5. Hipóxia Isquêmica. I. MORAES FERREIRA, VANIA
MARIA, orient. II. Título.

MARA CLAUDIA RIBEIRO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Aplicadas em Saúde.

Aprovada em 07 de dezembro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vania Moraes Ferreira
(Presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro
(Membro Interno)
Universidade de Brasília

Prof Dr Hugo Alves de Souza
(Membro Externo)
Universidade de Brasília

Profa Dra Leonora Maciel de Souza Vianna
(Membro Externo)
Universidade de Brasília

Profa Dra Luciana Ramalho de Farias
(Membro Suplente)
Centro Universitário de Brasília

Dedico esta Tese de Doutorado a minha mãe que sempre me incentivou a estudar cada vez mais.

AGRADECIMENTOS

- ✓ A minha Orientadora Profa. Dra Vânia Ferreira pela competência e pela oportunidade que me foi dada de aprimorar meus conhecimentos.
- ✓ Ao meu esposo, Thiago dos Santos Bezerra, pelo apoio incondicional, pela compreensão da necessidade de dedicação que eu precisava para a construção deste trabalho e por toda ajuda que foi primordial para a elaboração deste trabalho.
- ✓ A Dra. Leonora Vianna, pelo incansável apoio nas análises histológicas que foi muito importante na fase final do trabalho. Agradeço também pela paciência e a tranquilidade de compartilhar conhecimentos.
- ✓ Ao Prof. Hugo Alves por toda ajuda e companheirismo neste projeto e em tantos outros.
- ✓ Ao Laboratório de Patologia, em especial à Profa. Fabiana Pirani, que não limitou espaços físicos para que nossas pesquisas pudessem ser realizadas.

"As raízes do estudo são amargas, mas seus frutos são doces."

Aristóteles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de conexões anatômicas	36
Figura 2 – Partitura da Sonata de Mozart para dois pianos em Ré Maior (K.448)...	47
Figura 3 – Organograma das etapas da Hipóxia Isquêmica Encefálica.....	53
Figura 4 – Etapas da apoptose	54
Figura 5 – Imagem histológica do hipocampo de rata Wistar	73
Figura 6 – Quadro com a distribuição da amostra do estudo.....	79
Figura 7 – Disposição do aparelho de som e das caixas dos animais para o protocolo de musicoterapia	81
Figura 8 – Campo aberto dividido em 9 quadrantes para avaliar atividade locomotora dos ratos.....	83
Figura 9 – Labirinto em Cruz Elevado utilizado para avaliar o comportamento de ansiedade/estresse dos ratos	84
Figura 10 – Aparato usado no teste de nado forçado para avaliação de comportamento sugestivo de depressão	85
Figura 11 – Rata Wistar do grupo hipóxia anestesiada.....	86
Figura 12 – Fluxograma com as principais etapas do experimento de GC.....	87
Figura 13 – Fluxograma com as principais etapas do experimento de GH.....	88
Figura 14 – Fluxograma com as principais etapas do experimento de GMa	89
Figura 15 – Fluxograma com as principais etapas do experimento de GHMa.....	90
Figura 16 – Fluxograma com as principais etapas do experimento de GMc	91

Figura 17 – Fluxograma com as principais etapas do experimento de GHMc.....	92
Figura 18 – Craniotomia	93
Figura 19 – Pesagem do encéfalo de uma rata Wistar em balança de precisão	94
Figura 20 – Armazenamento do encéfalo de rata Wistar em solução de formalina 10%	94
Figura 21 – Imagem de lâmina histológica digitalizada.....	95
Figura 22 – Imagem histológica com a metodologia empregada para a seleção das áreas do cerebelo.....	96
Figura 23 – Imagens histológicas com a metodologia empregada para a seleção das áreas do hipocampo.....	97
Figura 24 – Imagens histológicas de um corte do cerebelo de rata Wistar que sofreram hipóxia isquêmica induzida por nitrito de sódio (60 mg/kg)	98
Figura 25 – Imagens histológicas de um corte do hipocampo, região CA1 de rata Wistar do GC.....	98
Figura 26 – Corte histológico do hipocampo, região CA4, de rata Wistar com 4 meses de idade expostas à intoxicação por nitrito de sódio (60 mg/Kg)	99
Figura 27 – Box-Plot dos dados de contagem dos neurônios das áreas CA1, CA2, CA3, CA4 e GD do hipocampo no grupo controle nas quatro áreas segundo o tipo de neurônio	111
Figura 28 – Box-Plot dos dados de contagem dos neurônios das áreas CA1, CA2, CA3, CA4 e GD do hipocampo no grupo hipóxia nas quatro áreas segundo o tipo de neurônio	112
Figura 29 – Box-Plot dos dados de contagem dos neurônios das áreas CA1, CA2, CA3, CA4 e GD do hipocampo no grupo GMa nas quatro áreas segundo o tipo de neurônio	113

Figura 30 – Box-Plot dos dados de contagem dos neurônios das áreas CA1, CA2, CA3, CA4 e GD do hipocampo no grupo GHMa nas quatro áreas segundo o tipo de neurônio	114
Figura 31 – Box-Plot dos dados de contagem dos neurônios das áreas CA1, CA2, CA3, CA4 e GD do hipocampo no grupo GMc nas quatro áreas segundo o tipo de neurônio	115
Figura 32 – Box-Plot dos dados de contagem dos neurônios das áreas CA1, CA2, CA3, CA4 e GD do hipocampo no grupo GHMc nas quatro áreas segundo o tipo de neurônio	115
Figura 33 – Box-Plot dos dados do hipocampo, segundo grupo e tipo de neurônio, na área CA1	116
Figura 34 – Box-Plot dos dados do hipocampo, segundo grupo e tipo de neurônio, na área CA2	117
Figura 35 – Box-Plot dos dados do hipocampo, segundo grupo e tipo de neurônio, na área CA3	117
Figura 36 – Box-Plot dos dados do hipocampo, segundo grupo e tipo de neurônio, na área CA4	118
Figura 37 – Box-Plot dos dados do hipocampo, segundo grupo e tipo de neurônio, na área GD	119
Figura 38 – Imagem histológica da área CA1 do hipocampo	124
Figura 39 – Imagem histológica da área CA2 do hipocampo.....	125
Figura 40 – Imagem histológica da área CA3 do hipocampo.....	126
Figura 41 – Imagem histológica da área CA4 do hipocampo.....	127
Figura 42 – Imagem histológica da área GD do hipocampo	128
Figura 43 – Imagem histológica do cerebelo	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso dos encéfalos dos grupos GC; GH; GMa; GHMa; GMc; GHMc ..	102
Tabela 2 – Peso dos encéfalos com comparação intergrupos GC x GH; GMa x GHMa; GMc x GHMc	103
Tabela 3 – Dados Comportamentais – Locomoção Espontânea, Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado, comparação intragrupos.....	104
Tabela 4 – Dados Comportamentais – Locomoção Espontânea, Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado e bioquímicos, comparação intergrupos GC x GH.....	105
Tabela 5 – Dados Comportamentais – Locomoção Espontânea, Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado e bioquímicos, comparação intergrupos GMa x GHMa..	106
Tabela 6 – Dados Comportamentais – Locomoção Espontânea, Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado e bioquímicos, comparação intergrupos GMc x GHMc..	107
Tabela 7 – Dados Comportamentais – Locomoção Espontânea, Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado e bioquímicos, comparação intergrupos GC x GMa x GMc	108
Tabela 8 – Dados Comportamentais – Locomoção Espontânea, Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado e bioquímicos, comparação intergrupos GH x GMc x GHMc	109
Tabela 9 – Cerebelo: Neurônios sadios, lesionados e total, segundo o grupo (controle e experimental).....	110
Tabela 10 – Número de neurônios lesionados e saudáveis nas diferentes áreas do hipocampo intergrupos	120
Tabela 11 – Número de neurônios lesionados e saudáveis nas diferentes áreas - hipocampo: áreas CA1, CA2, CA3; CA4 e GD nos grupos GC x GH.....	121
Tabela 12 – Número de neurônios lesionados e saudáveis nas diferentes áreas - hipocampo: áreas CA1, CA2, CA3; CA4 e GD nos grupos GMc x GHMc.....	122

Tabela 13 – Número de neurônios lesionados e saudáveis nas diferentes áreas - hipocampo: áreas CA1, CA2, CA3; CA4 e GD nos grupos GC x GMa x GMc 122

Tabela 14 – Número de neurônios lesionados e saudáveis nas diferentes áreas - hipocampo: áreas CA1, CA2, CA3; CA4 e GD nos grupos GH x GHMa x GHMc.. 123

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH.....	Hormônio adrenocorticotrófico
AI.....	Ínsula Anterior
AM (BL).....	Amígdala Basolateral
AM (CM)	Amígdala Corticomedia
ANOVA.....	Análise de Variância
ATP.....	Adenosina Trifosfato
BDNF.....	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BRDU.....	Bromodesoxiuridina
CA.....	Corno de Amon
CA1.....	Subregião 1 do Corno de Amon
CA2.....	Subregião 2 do Corno de Amon
CA3.....	Subregião 3 do Corno de Amon
CA4.....	Subregião 4 do Corno de Amon
CCA.....	Córtex Cingulado Anterior
CEUA.....	Comitê de Ética no Uso Animal
CER 1.....	Cerebelo 1
CER 2.....	Cerebelo 2
CER 3.....	Cerebelo 3
COF.....	Córtex orbitofrontal
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
EROS.....	Espécies Reativas de Oxigênio – Radicais Livres
GC.....	Grupo Controle
GD.....	Giro Denteado
GH.....	Grupo Hipóxia

GHMa.....	Grupo Hipóxia + Música Aguda
GHMc.....	Grupo Hipóxia + Música Crônica
GMc.....	Grupo Hipóxia
GMa.....	Grupo Hipóxia
GPH.....	Giro parahipocampal
HE.....	Hematoxilina e Eosina
HIE	Hipóxia Isquêmica Encefálica
HPA.....	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HIP.....	Hipocampo
LABOCIEN-UNICEUB.....	Laboratório de Ciências Naturais do Centro Universitário de Brasília
MetHe.....	Metahemoglobina
MT.....	Protocolo de musicoterapia
Nac.....	Núcleo Accumbens
NaNO2.....	Nitrito de Sódio
O2.....	Oxigênio
PT.....	Pólo Temporal
SNC.....	Sistema Nervoso Central

RESUMO

Introdução: Anualmente, milhares de pessoas sofrem hipóxia cerebral, apresentando o dobro de chance de desenvolver alterações cognitivo-comportamentais relacionadas à ansiedade e à depressão. Como forma de tratamento não farmacológico para tais condições pode-se utilizar a musicoterapia.

Objetivo: Analisar as alterações histológicas hipocâmpais e cerebelares e possíveis repercussões comportamentais e bioquímicas provocadas pela Sonata de Mozart em animais sem e com hipóxia isquêmica encefálica induzida experimentalmente por Nitrito de Sódio. **Metodologia:** Foi realizado um estudo experimental com 36 ratas Wistar distribuídas em grupos que sofreram hipóxia e que ouviram música em protocolos de aplicações agudas e crônicas. A hipóxia foi induzida experimentalmente por Nitrito de Sódio na dosagem de 60mg/kg durante 15 dias. Foram analisadas variáveis comportamentais no Campo aberto, Labirinto em Cruz Elevado (comportamento sugestivo de ansiedade) e o Nado Forçado (comportamento sugestivo de depressão). Análises bioquímicas verificaram o estresse agudo e crônico por meio dos níveis de cortisol, glicose, colesterol e lactato. Foram coletadas e analisadas amostras histológicas do hipocampo, regiões CA1, CA2, CA3, CA4 e Giro Denteado e do córtex cerebelar. **Resultados:** Os animais que sofreram a lesão encefálica e não receberam o protocolo de música apresentaram o pior desempenho nos testes de ansiedade e de depressão, demonstrando claramente o efeito ansiogênico da lesão encefálica. O efeito ansiogênico também foi verificado no grupo que sofreu hipóxia e recebeu música crônica. Já os grupos que receberam música aguda e crônica (sem lesão) e o grupo que recebeu música aguda após lesão apresentaram características de efeito ansiolítico. Destacou-se também efeito antidepressivo da música aguda e crônica em todos os grupos. Em relação as análises bioquímicas, o cortisol foi a variável que apresentou destaque, com níveis elevados no grupo que sofreu hipóxia e também no grupo que recebeu o protocolo de música crônica. Em relação aos aspectos histológicos, a região CA1 foi a área menos atingida pela hipóxia. Os animais que apenas receberam música, seja no protocolo agudo ou crônico, não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) na contagem de neurônios saudáveis em relação ao grupo controle. Já os animais que receberam o protocolo de música aguda após a lesão encefálica apresentaram melhores contagens de neurônios saudáveis nas áreas CA1, CA3, CA4 e Giro Denteado que os demais grupos com hipóxia. O cerebelo não apresentou alterações significativas nos animais que receberam música, apenas nos que sofreram hipóxia foi possível observar a lesão. **Conclusões:** A hipóxia isquêmica encefálica pode provocar danos estruturais e comportamentais, sendo que os animais que apenas sofreram hipóxia apresentaram menor peso encefálico, comportamento similar a depressão e a ansiedade, maior nível de cortisol e menor contagem de neurônios saudáveis em todas as áreas, exceto CA1. A música aguda e crônica em animais saudáveis, demonstraram efeitos antidepressivos e ansiolíticos, porém, o estresse acompanhou o grupo que ouviu música crônica. Embora estes grupos tenham apresentado maior número de neurônios saudáveis que lesionados em todas as áreas, não houve melhor contagem que no grupo controle. O destaque da atual pesquisa se deu no grupo de animais que sofreu lesão e recebeu o protocolo de música aguda devido ao elevado peso do encéfalo, assim como o efeito ansiolítico e efeitos antidepressivos, e mais os valores de cortisol que também foram menores que no grupo hipóxia. Este grupo apresentou o maior número de neurônios saudáveis em quase todas as áreas do hipocampo, exceto a área CA2. Já os animais que

sofreram lesão e receberam o protocolo de música crônica apresentaram respostas ansiogênicas e sinais de estresses, possivelmente relacionados com os efeitos da lesão somado ao da música crônica. Destaca-se negativamente o fato de que estes animais apresentaram desempenho semelhante ao grupo que apenas sofreu hipóxia, no que tange a contagem de neurônios, de forma que, para a região hipocampal, a música aguda após a lesão por hipóxia, foi aquela que promoveu os melhores estímulos. Ao se projetar estes achados em humanos, é provável que possa haver repercussões positivas sobre aspectos comportamentais e histológicos e, conseqüentemente, na qualidade de vida de pessoas com lesões encefálicas decorrentes de hipóxia.

Palavras-chave: **Musicoterapia, Ansiedade, Depressão, Hipocampo, Cerebelo, Hipóxia isquêmica.**

ABSTRACT

Introduction: Every year thousands of people suffer from cerebral hypoxia, which has a double chance of developing cognitive-behavioral changes related to anxiety and depression. As a form of non-pharmacological treatment for such conditions music therapy may be used. **Objective:** To analyze hippocampal and cerebellar histological changes and possible behavioral and biochemical repercussions caused by Mozart's Sonata in animals without and with ischemic hypoxia experimentally induced by Sodium Nitrite. **Methods:** An experimental study was performed with 36 Wistar rats distributed in groups that had hypoxia and who had heard music in protocols for acute and chronic applications. Hypoxia was experimentally induced by Sodium Nitrite at a dose of 60 mg/kg for 15 days. Behavioral variables were analyzed in Open Field, Elevated Plus Maze (anxiety like-behavior) and Forced Swimming (depression like- behavior). Biochemical analyzes verified acute and chronic stress through the levels of cortisol, glucose, cholesterol and lactate. Histological samples from the hippocampus, CA1, CA2, CA3, CA4, and Dentate Gyrus and cerebellar cortex regions were collected and analyzed. **Results:** Animals that suffered brain damage and did not receive the music protocol presented the worst performance in the tests of anxiety and depression, clearly demonstrating the anxiogenic effect of the brain injury. The anxiogenic effect was also verified in the group that suffered hypoxia and received chronic music. The groups that received acute and chronic music (without injury) and the group that received acute music after injury showed characteristics of anxiolytic effect. The anti-depressive effect of acute and chronic music was also highlighted in all groups. Regarding the biochemical analyzes, cortisol was the variable that presented prominence, with high levels in the group that suffered hypoxia and also in the group that received the chronic music protocol. Regarding the histological aspects, the CA1 region was the area less affected by hypoxia. Animals that only received music, whether in the acute or chronic protocol, did not present significant difference ($p \leq 0.05$) in the healthy neuron count in relation to the control group. The animals that received the acute music protocol after the brain injury presented better scores of healthy neurons in the CA1, CA3, CA4 and Dentate Gyrus areas than the other groups with hypoxia. The cerebellum did not show significant changes in the animals that received music, only in those who suffered hypoxia was it possible to observe the lesion. **Conclusions:** Brain ischemic hypoxia can promote structural and behavioral damage, animals that only suffered hypoxia presented lower brain weight, depression and anxiety like- behavior, higher level of cortisol and lower number of healthy neurons in all areas except CA1. Acute and chronic music in healthy animals created anti-depressant and anxiolytic effects. However, stress accompanied the group who heard chronic music. And although these groups had more healthy neurons than lesions in all areas, there was no better counting than in the control group. In the present research the group of animals that suffered injury and received the protocol of acute music due to the high weight of the encephalon, as well as the anxiolytic effect and anti-depressive effects, and, cortisol values were also lower than in the hypoxia group. As well as, this group had the highest number of healthy neurons in almost all areas of the hippocampus, except the CA2 area. The animals that suffered injury and received the chronic music protocol presented anxiogenic effects and signs of stress, possibly related to the

effects of the injury added to that of chronic music. Thus, for the hippocampal region, the acute music, after the hypoxia lesion, was the one that promoted the best stimulus. When projecting these findings in humans, it is probable that there may be positive repercussions, on behavioral and histological aspects, and consequently on the quality of life of people with encephalic lesions due to hypoxia.

Keywords: Music Therapy, Anxiety, Depression, Hippocampus, Cerebellum, Ischaemic hypoxia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 A MÚSICA ENQUANTO TERAPIA	25
1.1.1 Musicoterapia: histórico e definições	27
1.1.2 O uso da música em animais	30
1.1.3 Musicoterapia em diferentes fases de desenvolvimento neural	33
1.1.4 Áreas encefálicas e circuitos neurais influenciados pela aplicação da música	35
1.1.4.1 Recompensa, Motivação e Prazer	37
1.1.4.2 Estresse e excitação	38
1.1.4.3 Reações Imunológicas	39
1.1.4.4 Comportamento social	40
1.1.5 Efeitos orgânicos da musicoterapia	40
1.1.6 Potencial efeito da musicoterapia sobre os aspectos comportamentais.	42
1.1.7 Alterações morfofuncionais promovidas pela musicoterapia	44
1.1.8 Efeito Mozart	45
1.2 HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA	48
1.2.1 Fisiopatologia da hipóxia isquêmica encefálica	50
1.2.1.1 Apoptose	54
1.2.1.2 Necrose	56
1.2.2 Estresse oxidativo	57
1.2.3 Modelo experimental de hipóxia isquêmica encefálica	58
1.2.3.1 Nitrito de Sódio.....	58
1.2.3.2 Efeitos da intoxicação por NaNO ₂	59
1.2.4 Alterações comportamentais da hipóxia isquêmica encefálica	60
1.2.4.1 Aspectos Bioquímicos	62

1.2.4.1.1 <i>Estresse</i>	62
1.2.4.1.2 <i>Aspectos comportamentais (Ansiedade e Depressão)</i>	68
1.3 FORMAÇÃO HIPOCAMPAL	72
1.3.1 Anatomia e histologia	72
1.3.2 Aspectos fisiológicos gerais	74
1.3.3 Neurogênese no hipocampo	75
1.3.4 Lesões hipocampais: etiologia e repercussões	76
2 OBJETIVOS	78
2.1 GERAIS	78
2.2 ESPECÍFICOS	78
3 METODOLOGIA	79
3.1 AMOSTRA	79
3.2 PROTOCOLO DE MUSICOTERAPIA	80
3.3 EXPOSIÇÃO AO NITRITO DE SÓDIO	81
3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	82
3.5 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS E COGNITIVAS	82
3.5.1 Atividade locomotora espontânea	82
3.5.2 Labirinto Em Cruz Elevado (LCE)	83
3.5.3 Teste Do Nado Forçado	84
3.6 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	85
3.7 AVALIAÇÕES SANGUÍNEAS	93
3.8 PREPARAÇÃO TECIDUAL	93
3.9 METODOLOGIA PARA A CONTAGEM DOS NEURÔNIOS	96
3.10 MORFOMETRIA HISTOLÓGICA	99
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	100
4 RESULTADOS	102
5 DISCUSSÃO	130
5.1 DADOS BIOMÉTRICOS	132
5.2 VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS	133
5.3 VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS	141

5.4 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	144
6 CONCLUSÕES.....	151
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
Anexo	178

1 INTRODUÇÃO

Representando a terceira causa de morte e a principal etiologia de incapacidades no mundo, a isquemia encefálica atinge milhares de pessoas (BAKY et al., 2010; GABRYEL et al., 2014). Este evento é representado pela diminuição do aporte sanguíneo rico em oxigênio e glicose para o encéfalo (RAGLIO et al., 2015). Anualmente, cerca de 10 milhões de pessoas sobrevivem às lesões neurológicas relacionadas à hipóxia isquêmica encefálica, porém muitas delas apresentam sequelas físicas e psíquicas (DOYLE et al., 2015, LI et al., 2013; ZHOU et al., 2013).

O déficit na vascularização encefálica que ocorre como consequência da hipóxia promove uma série de alterações de nutrição e oxigenação do tecido cerebral (GABRYEL et al., 2014). O principal conjunto de alterações metabólicas descritas na literatura são: mudança do metabolismo aeróbico para anaeróbico, formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), alteração do equilíbrio ácido-base, inibição de neurotransmissores excitatórios e alteração da homeostase do cálcio (BAKY et al., 2010; MAITI; SINGH; ILAVAZHAGAN, 2008). Os pacientes que sobrevivem aos primeiros estágios do infarto cerebral, muitas vezes sofrem com sequelas decorrentes do comprometimento neurológico. Tal condição está associada à alta incidência de déficits das funções sensório-motoras e também de habilidades comportamentais (LI et al., 2013; ZHOU et al., 2013).

No entanto, ainda mais relevante é o fato de que as pessoas que sobrevivem ao quadro de hipóxia cerebral têm o dobro de chance de desenvolverem alterações cognitivo-comportamentais relacionadas à ansiedade e ao comportamento sugestivo de depressão, quando comparadas aos indivíduos que nunca sofreram tal condição (DOYLE et al., 2015). Apesar de existir diferentes formas de tratamento para as várias consequências relacionadas ao evento isquêmico, a literatura é escassa no que concerne a terapia não-farmacológica (FRANÇOIS et al., 2015).

Diante de tal realidade é interessante observar que na última década foram feitos avanços importantes nos campos das ciências cognitivas, psicológica e da neurociência o que contribuíram em muito para melhorar o nosso conhecimento do cérebro. Mais recentemente, vem se destacando a linha de pesquisa que

utiliza a música como ferramenta alternativa para impulsionar habilidades perceptivas, motoras, cognitivas e emocionais em pessoas que tenham sofrido dano neurológico (FRANÇOIS et al., 2015; JÄRVINEM-LEPISTÖ, BURGER, ALARUONA, 2014). No entanto, poucos são os estudos que abordam essas interferências em relação às alterações em áreas cerebrais que podem estar afetadas pela isquemia cerebral, em especial o cerebelo e hipocampo.

Por definição a musicoterapia é a utilização profissional da música e seus elementos, para a intervenção em ambientes médicos, educacionais e cotidiano com indivíduos, grupos, famílias ou comunidades que procuram otimizar a sua qualidade de vida e melhorar suas condições físicas, sociais, comunicativas, emocionais, intelectuais, espirituais e de saúde e bem estar (SILVA, 2017).

Diversas observações clínicas tem sido relatadas na literatura científica a cerca dos benefícios que a aplicação terapêutica da música pode ter sobre os organismos vivos. Trata-se de diversos estudos nas mais diferentes áreas de atuação clínica, que analisam desde efeitos psicoterapêuticos (BRINGMAN et al., 2009; CHOI; LEE; LIN, 2008; KRUMHANSL, 1997; KULKARNI et al., 2012, O'KELLY et al., 2013) e psiquiátricos (BOSO et al., 2007; FACHNER; GOLD; ERKKILÄ, 2013; GOLD et al., 2009), até efeitos fisiológicos (NELSON et al., 2008) como a diminuição da pressão arterial (SUTOO; AKIYAMA, 2004) e sobre a imunidade (LU et al., 2010).

Embora existam diferentes protocolos para a utilização da musicoterapia, Mozart foi um dos compositores singulares que soube selecionar os ritmos, as cadências e as frequências musicais que entravam em harmonia com o sistema nervoso (LIN et al., 2011). Em especial, a Sonata de Mozart para dois pianos (K. 448) tem sido alvo de estudo com achados promissores sobre a ansiedade (CRUZ et al., 2015), na epilepsia (LIN et al., 2011) e sobre o sistema imune (LU et al., 2010), dentre outros. Esta melodia tem apresentado efeito modulatório em muitos aspectos relacionados às consequências decorrentes da hipóxia encefálicas (LIN et al., 2011).

Existem diversas formas experimentais de simular os eventos relativos a hipóxia isquêmica encefálica, dentre elas, uma das mais simples e facilmente replicável é o uso do Nitrito de sódio (NaNO₂). Este composto é um sal inorgânico

utilizado na fabricação de corantes e no tratamento de produtos têxteis (GONCHAR; MANKOVSKAYA; KLYUCHKO, 2006). Ao atingir a corrente sanguínea, ele é altamente reativo com a hemoglobina e induz a formação de metahemoglobina (MetHb), reduzindo a capacidade da hemoglobina em transportar o oxigênio (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; GLUHCHEVAA et al., 2012; KOHN et al., 2002). Outro efeito observado pela intoxicação por NaNO₂ é a formação de ERO, que são potencialmente lesivas às células neuronais (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; DELLAVALLE et al., 2013; GLUHCHEVAA et al., 2012).

O Sistema Nervoso Central (SNC) é altamente sensível aos efeitos da hipóxia e também dos radicais livres, de forma que, a intoxicação por NaNO₂ pode provocar extenso dano neuronal em regiões encefálicas (BAKY et al., 2010; KOHN et al., 2002). Como em qualquer outro evento danoso ao tecido nervoso, a depender das áreas lesionadas, repercussões comportamentais poderão surgir, tais como, ansiedade e depressão (SCORZA et al., 2005).

Dentre as regiões anatômica particularmente suscetíveis a hipóxia, destaca-se o hipocampo e as células de Purkinje do cerebelo. O hipocampo compõe o sistema límbico e, juntamente com outras áreas encefálicas, atua no controle de várias funções comportamentais e cognitivas. Por tratar-se de uma estrutura com formato anatômico peculiar e por ser facilmente identificável, torna-se o elemento de escolha para muitos estudos envolvendo análises histológicas (EL FALOUGY; BENUSKA, 2006; SCORZA et al., 2005).

Fisiologicamente, a formação hipocampal apresenta duas áreas distintas, o hipocampo dorsal, representado pela área do Corno de Amon 1 (CA1); e o hipocampo ventral, representada por Corno de Amon 3 (CA3) e giro denteado. A região dorsal são atribuídas as funções de aprendizagem e memória, enquanto a parte ventral regula o estresse, emoção, afeto e intermedia reações de ansiedade e de depressão (ENGIN et al., 2016; FANSELOW; DONG, 2010; GRIGORYAN; SEGAL, 2016; LI et al., 2014; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015).

A formação hipocampal pode ser acometida por diversas formas diferentes de doenças e disfunções, assim como pelo processo de envelhecimento fisiológico (BOBINSKI, 1999; MUELLER; WEINER, 2009; SMALL et al., 2011). Embora a etiologia das lesões hipocampais possa ser bem diversa, o estresse

crônico (ONO; KOIZUMI; ONOZUKA, 2015) e a hipóxia isquêmica encefálica (HUANG et al., 2015) parecem influir em modificações de propriedades elétricas neuronais no hipocampo, de forma a prejudicar a memória e também influenciar comportamento ansiogênico (ONO; KOIZUMI; ONOZUKA, 2015). O cerebelo também é uma região muito sensível à diminuição da oferta de oxigênio, isto porque, em sua região cortical, predomina substância cinzenta, especialmente representada pelas células de Purkinje (BARKHUIZEN et al., 2017).

Atualmente, muitas pesquisas vêm dando atenção diferenciada aos estudos voltados a detalhar com maior precisão os danos induzidos pela hipóxia, de forma independente do comportamento do sujeito investigado. Dessa maneira, muitos pesquisadores acabam deixando passar despercebidos detalhes em informações cruciais para analisar o que, de fato, poderia estar refletindo de forma integrada comportamento *versus* danos produzidos pela hipóxia (RIBEIRO et al., 2017).

Diante do exposto, coube aqui o interesse na investigação do potencial terapêutico da Sonata de Mozart, aplicada em diferentes protocolos, sobre alterações histológicas hipocampais e cerebelares e sobre aspectos comportamentais relativos aos comportamentos sugestivos de ansiedade e de depressão em ratas que sofreram hipóxia isquêmica induzida experimentalmente por NaNO₂.

1.1 A MÚSICA ENQUANTO TERAPIA

A música é uma poderosa forma de comunicação social em diferentes culturas, transmitindo emoções independentemente do conteúdo verbal incorporado (O'KELLY et al., 2013). Pode ser entendida como uma arte que se baseia na liberação e propagação de sons de forma simultânea e sucessiva, prezando pelo ordenamento, equilíbrio e proporcionalidade durante o tempo da melodia (CHANDA; LEVITIN, 2013).

A musicoterapia é uma técnica de tratamento que utiliza o som e a música para fins terapêuticos, psicoprofiláticos e de reabilitação, embora utilizada empiricamente desde a antiguidade de diversas maneiras como medida

preventiva, paliativa e, às vezes, até como terapêutica; como ciência, o seu estudo é recente (ESMAEILZADEH; SHARIFI; TAYARANI, 2013; NIETO-ROMERO, 2017; ZANINI et al., 2009). A noção de que ela pode ter ação medicinal tem suas raízes na história da humanidade, tendo sido utilizada em diversos tipos de rituais e processos de cura desde as sociedades tribais (CHANDA; LEVITIN, 2013).

Toda a pessoa tem um ritmo interior, uma identidade sonora que a diferencia das outras. Identificá-lo e equilibrá-lo são procedimentos da musicoterapia (MAMEDE; ESTEVES, 2010), podendo ser empregada por meio do uso controlado de influências musicais, a fim de coordenar a integração psicológica, fisiológica e emocional, durante o tratamento de transtornos e doenças (RAGLIO et al., 2015). A música vem se apresentando como uma excelente ferramenta terapêutica que exige investimentos financeiros reduzidos, de fácil manejo, acessível a diferentes ambientes terapêuticos e acadêmicos e que pode ser empregada como adjuvante em várias entidades nosológicas (NIETO-ROMERO, 2017).

A música tem três elementos principais que interagem em diferentes estruturas do cérebro. O ritmo, por exemplo, tem um efeito no centro vital ou subconsciente, que é formado pelo tronco encefálico e pela substância reticular, que por sua vez é responsável pelo gerenciamento das funções básicas da vida ou vegetativas e fisiológicas; isto é, que o ritmo pode aumentar ou diminuir a taxa respiratória, pode ativar ondas cerebrais ou pode ajudar a diminuir o tônus muscular. Por sua vez, o segundo elemento é a melodia; que está relacionada ao tom musical e tem efeito sobre o corpo caloso e o sistema límbico, podendo assim regular as emoções. Finalmente, o terceiro é harmonia; trata-se de envolver a criação e a composição musical e tem efeito no nível do córtex cerebral e na relação entre os hemisférios, regulando as funções conscientes e o raciocínio (ANTORVEZA, 2017).

Portanto, pode-se compreender que a música tem sido tema em diferentes áreas terapêuticas que investigam a sua influência desde a fisiologia até o comportamento de humanos e animais. De forma que, a música pode alterar significativamente a qualidade de vida dos envolvidos, proporcionando sensações agradáveis de relaxamento, conforto e minimização do estresse. Tais achados

vem sendo objetivamente mensurados a partir da avaliação de parâmetros fisiológicos como frequências cardíaca e respiratória, pressão arterial e mensuração do cortisol, tanto em pessoas idosas e crianças, quanto em diferentes espécies de animais (CALAMITA et al., 2016).

Embora existam diferentes formas de aplicação da musicoterapia, a terapia de música receptiva, na qual o indivíduo irá escutar a música, tem se mostrado como uma forma de tratamento eficaz para os sintomas depressivos da demência (OLAYA; IZQUIERDO, 2017). O histórico, as definições e as diferentes formas de aplicação, bem como as evidências científicas levantadas na literatura serão discutidas nos próximos capítulos.

1.1.1 Musicoterapia: histórico e definições

O desenvolvimento de técnicas de reabilitação inovadoras e eficazes no campo da neuroreabilitação é uma tendência dos tempos atuais. De forma que, nos últimos anos, neurocientistas vêm pesquisando e estudando sobre a percepção e os efeitos da música no cérebro humano. A partir dos resultados obtidos nesses estudos é possível delinear o impacto positivo da música na plasticidade cerebral e esta área da ciência vem sendo cada vez mais explorada e utilizada tanto em ambientes acadêmicos quanto em ambientes terapêuticos (FRANÇOIS et al., 2015).

Há milhares de anos, a música já possuía caráter terapêutico (ESMAEILZADEH; SHARIFI; TAYARANI, 2013). A noção de que a ela pode ter ação medicinal tem suas raízes profundamente plantadas na história da humanidade, tendo sido utilizada em diversos tipos de rituais e processos de cura desde as sociedades tribais e pré-industriais (CHANDA; LEVITIN, 2013).

Ao longo dos séculos, a música tem sido utilizada com a finalidade de agir sobre o espírito das pessoas. O poder da música em provocar o bem-estar físico e mental já era reconhecido na Grécia Antiga. Pitágoras, por exemplo, ficou intrigado com o fato de as pessoas apreciarem as notas musicais. Ele descobriu que a música é capaz de acalmar as pessoas e curar doenças do espírito, do

corpo e da alma. Ele acreditava que a natureza matemática da música influenciava a mente e o corpo e a chamava de "medicina musical". Além disso, ele acreditava que os princípios da harmonia musical tinham o poder de influenciar várias emoções (PAUWELS et al., 2014).

Platão, por sua vez, escreveu que o treinamento musical pode ser um meio terapêutico mais potente do que qualquer outro porque, segundo ele, o ritmo e a harmonia musicais podem alcançar lugares profundos da alma (WHITFIELD, 2010). Já Aristóteles, argumenta que a música tem efeitos catárticos e que a catarse deve ser entendida como uma libertação de emoções prejudiciais (PAUWELS et al., 2014). Ambos foram considerados precursores da Musicoterapia. Platão recomendava a música para a saúde da mente e do corpo, e para vencer as angústias fóbicas. Aristóteles descrevia seus efeitos benéficos nas emoções incontroláveis e para provocar a catarse das emoções. Além dos gregos, os romanos, os árabes e os israelitas também utilizavam no tratamento de doenças, utilizando procedimentos pré-científicos e muitas vezes místicos, tratando as enfermidades como desarmonias ou ainda pestes contra alguma desventura humana (FERREIRA, 2005).

Nos tempos modernos, é considerada uma ciência que estuda as manifestações sonoras acompanhadas de seus elementos e os efeitos decorrentes da interação com o ser humano, suas manifestações (CHANDA; LEVITIN, 2013). No entanto, apenas na década de 1940 que a musicoterapia passou a ser estruturada (PASSARINI, 2013).

Foi durante a II Guerra Mundial que a capacidade terapêutica da música começou a chamar a atenção, enquanto ciência. Nos hospitais repletos de combatentes e civis feridos, os médicos notaram considerável melhoria dos pacientes que tinham acesso, via rádio, à programação musical causando-lhes efeitos benéficos que os afastava da dor e do sofrimento. Os bons resultados despertaram o interesse dos estudiosos e a musicoterapia passou a ser observada cientificamente (MAMEDE; ESTEVES, 2010).

O primeiro curso de musicoterapia foi criado em 1944, na Universidade Estadual de Michigan, nos Estados Unidos da América, sendo estes grandes impulsionadores desta terapia que hoje começa a ser uma disciplina aceita e

respeitada em diferentes partes do mundo (MAMEDE; ESTEVES, 2010). No Brasil, existem relatos que ao proferir a conferência “Terapêutica Musical”, na Associação Paulista de Medicina, em 1937, Mario de Andrade foi um dos primeiros, senão o primeiro a estruturar um registro acadêmico do uso da música enquanto terapia no Brasil. Quase quarenta anos se passaram da conferência até se formar a primeira turma de graduados em musicoterapia no Brasil, mais precisamente no Rio de Janeiro (DE QUEIROZ, 2016).

Então, na segunda metade do século XX, desenvolveu-se de forma importante o estudo da neurobiologia relacionada com o processamento da música, as diferenças e coincidências de circuitos neurais envolvidos com a linguagem e com a música, a participação de cada hemisfério no reconhecimento destes estímulos e os efeitos que a exposição a certas peças musicais específicas possa produzir nas funções cognitivas (TALERO-GUTIÉRREZ; ZARRUK-SERRANO; ESPINOSA-BODE, 2004).

A musicoterapia é uma intervenção sistemática que usa experiências musicais e as relações desenvolvidas para promover a saúde, transmitindo emoções independentemente do conteúdo verbal incorporado (O’KELLY et al., 2013). Trata-se de uma abordagem terapêutica que utiliza a música e os seus elementos (som, ritmo, melodia e harmonia), em trabalho individual ou de grupo, objetivando desenvolver, facilitar e promover a comunicação, o relacionamento e a aprendizagem, contribuindo para a melhoria do estado físico, emocional, mental e social dos ouvintes (ZANINI et al., 2012).

Para melhor compreensão da música enquanto terapia, é interessante conhecer alguns conceitos sobre as partes que compõem a música. São elas, a melodia, que é a combinação dos sons sucessivos, representando a concepção horizontal da música. A harmonia, representada pela combinação dos sons simultâneos, é a concepção vertical da música. Outro elemento é o contraponto, trata-se do conjunto de melodias dispostas em ordem simultânea. E também, têm-se o ritmo, que é a combinação dos valores tempo (TALERO-GUTIÉRREZ; ZARRUK-SERRANO; ESPINOSA-BODE, 2004).

É uma forma de tratamento para ajudar a curar ou controlar algumas doenças, como acontece com muitas outras agora muito divulgadas, tais como, a

aromaterapia, a cromoterapia, a reflexologia e a fitoterapia, formas de medicina alternativa que têm por base práticas milenares da história dos povos (MAMEDE; ESTEVES, 2010; DOS SANTOS; CORONAGO, 2017).

Atualmente, a musicoterapia tem ganhado notoriedade no meio científico e pode ser aplicada em dois métodos: a ativo e a passivo. No primeiro, os pacientes tocam instrumentos ou cantam com o acompanhamento de um terapeuta; enquanto que no segundo, os pacientes somente escutam diferentes músicas (ESMAEILZADEH; SHARIFI; TAYARANI, 2013). O método ativo pode ser utilizado pelos clientes como uma forma de expressar seus sentimentos de maneira segura, estruturada e socialmente aceitável. Já o método passivo pode ser uma ferramenta útil para levantar questionamentos e realizar avaliações terapêuticas de doenças, emoções e memórias (GOLD et al., 2009; ZANINI et al., 2012). Com isso, esta forma de intervenção terapêutica é empregada em vários cenários: escolas, centros de reabilitação, hospitais, centros comunitários e no próprio domicílio (CHOI; LEE; LIM, 2008; ESMAEILZADEH; SHARIFI; TAYARANI et al., 2013; FACHNER; GOLD; ERKKILÄ, 2013).

Produzir e perceber a música envolve uma ampla gama de processos sensoriais, cognitivos e emocionais. As emoções compõem a característica central do gozo da música, com uma grande variedade de estados afetivos consistentemente relatados por pessoas enquanto escuta música, de forma que, um vínculo definitivo pode existir entre a música e a emoção (VUILLEUMIER; TROST 2015). Tal realidade pode ser intuitivamente sentida e também vem sido estabelecida e estudada experimentalmente por diferentes autores (FERREIRA, 2005; GOLDSTEIN, 1980). Desta forma, a música tem um efeito positivo no bem-estar psicológico, favorecendo um maior nível de desempenho (ANTORVEZA, 2017; WHITFIELD, 2010).

1.1.2 O uso da música em animais

A música tem sido estudada principalmente por promover alterações em seres humanos e animais, tais como controle da dor, aumento na sensação de bem-estar, diminuição da fadiga e da ansiedade, dentre outras (CALAMITA et al.,

2016).

Os animais não humanos são seres sencientes que interagem com o ambiente e com os outros seres que fazem parte dele. Com isso, é correto afirmar que são influenciados e que influenciam o local onde permanecem durante suas atividades. Na Medicina Veterinária, a música tem sido cada vez mais estudada e utilizada para minimizar problemas relacionados à depressão, ansiedade e estresse, tanto como forma de enriquecimento ambiental quanto para o incremento da produção (CALAMITA et al., 2016). Vários estudos vêm sendo realizados ao longo dos anos, a fim de verificar possíveis efeitos positivos da musicoterapia em animais, seja em experimentos que procuram estabelecer relação com possíveis efeitos semelhantes em humanos, seja para fins de melhora de produção (BOWMAN et al., 2015; DE JONGE et al., 2008; PAPOUSTSOGLU et al., 2007; RICKARD; TOUKHSATI; FIELD, 2005; ROBBINS; MARGULIS, 2016; SAMPAIO et al., 2017; UETAKE; HURNIK; JOHNSON, 1997).

Sampaio et al. (2017) em uma sequência de testes experimentais efetuados com camundongos, campo aberto (locomoção), labirinto em cruz elevado – LCE (ansiedade), nado forçado (depressão) e esquiva inibitória, expostos à Sonata de Mozart para dois Pianos, observaram que a música clássica foi capaz de afetar de maneira positiva as respostas comportamentais, corroborando outro estudo onde camundongos foram submetidos à música clássica por 24 horas. Os resultados obtidos demonstraram a existência de uma significativa diminuição na imobilidade no nado forçado, aumento na entrada nos braços fechados do labirinto em cruz elevado e diminuição na imobilidade no campo aberto, sugerindo que a música foi capaz de provocar mudanças na atividade motora dos animais, podendo ser utilizada como um recurso de baixo custo para promover enriquecimento ambiental e bem-estar para animais em cativeiro (DA CRUZ; DAL MAGRO; DA CRUZ, 2010).

Em ratos de laboratório, a música clássica reforçou as atividades sociais e o interesse sexual entre os indivíduos, enquanto a música do tipo *rock* provocou intensificação de comportamentos agressivos e diminuição na atividade sexual (RICKARD; TOUKHSATI; FIELD, 2005). Já Bowman et al. (2015) realizaram estudo em centro de resgate de cães onde os animais foram expostos à música

clássica e constataram que, durante a estimulação auditiva, os cães permaneceram a maior parte do tempo deitados ou sentados e em silêncio do que latindo e em pé, sugerindo, assim, uma eficiente técnica de enriquecimento ambiental.

Em frangos de corte, a música clássica propiciou a redução do temor, avaliado pelo aumento do tempo gasto com a alimentação e diminuição da imobilidade tônica (ROBBINS; MARGULIS, 2016). Semelhante efeito foi observado com carpas: elas foram expostas à música clássica de forma subaquática e constatou-se que a música contribuiu de maneira positiva com o bem-estar e o crescimento dos animais estudados (PAPOUSTSOGLU et al., 2007).

De Jonge et al. (2008) observaram que a musicoterapia foi capaz de influenciar o comportamento de leitões no pós-desmame, diminuindo significativamente a incidência de injúrias entre os animais. Uetake; Hurnik; Johnson (1997) observaram que em vacas leiteiras a música *country* foi uma forma de estímulo e associação para que os animais se encaminhassem voluntariamente ao setor de ordenha automática. Na investigação desse estudo, 19 vacas leiteiras passaram a associar o início da ordenha com o som da música *country*, dirigindo-se ao local da ordenha de modo mais eficiente. Constataram também que a associação da ordenha com estímulos auditivos apresentou resultados mais satisfatórios do que quando era oferecido o concentrado como método de associação e reforço positivo.

Conclui-se que os diferentes formas de estímulos sonoros podem funcionar como estímulos desencadeantes para as mais diversas alterações fisiológicas e comportamentais nas diferentes espécies animais, inclusive nos humanos. A musicoterapia pode ser um recurso a ser utilizado de maneira positiva para obtenção de efeitos benéficos na recuperação da saúde dos humanos e dos animais, assim como na melhoria da gestão e produção no campo da veterinária. É preciso salientar que os estudos em que são avaliados os efeitos da musicoterapia em animais ainda são escassos, sendo necessário um maior número de pesquisas que fundamentem ainda mais essas informações (CALAMITA et al., 2016).

1.1.3 Musicoterapia em diferentes fases de desenvolvimento neural

O SNC infantil apresenta um dinamismo evolutivo muito intenso e para entender seu processo de desenvolvimento e amadurecimento, é essencial a correlação entre a estrutura e a função, ou seja, o desenvolvimento de determinada função, depende do amadurecimento de seu substrato neural anatômico correspondente. Tal amadurecimento decorre fundamentalmente de eventos aditivos/progressivos (proliferação e migração neuronal, organização e mielinização) e substrativos/regressivos (morte neuronal/ apoptose, retração axonal e degeneração sináptica) (RODIER, 1995; ZOMIGNANI; ZAMBELLI; ANTONIO, 2009).

De forma mais detalhada, observa-se que o sistema nervoso se origina da porção ectodérmica do disco germinativo. Logo na fase inicial do neurodesenvolvimento a crista neural forma-se na porção mediana do disco ectodérmico, então suas abas se unem para formar o tubo neural, o processo de fechamento do tubo neural ocorre entre 21 a 26 dias após a concepção e se inicia na região cervical, se desenvolvendo no sentido crânio – caudal (ZOMIGNANI; ZAMBELLI; ANTONIO, 2009).

A fase que seguem o fechamento do tubo neural, diz respeito ao desenvolvimento de neurônios e conexões do sistema nervoso. A primeira etapa é a proliferação de células – tronco neurais, a qual ocorre entre 2 a 4 meses de gestação, a formação de tais células estende-se até o primeiro ano de vida. A segunda fase é a de migração, que tem seu pico aos 3 meses de gestação, nesta etapa os neurônios formados dirigem-se a sua posição final no sistema nervoso onde exercerão suas funções ao longo da vida, este fenômeno pode ser observado até vários meses após o parto (ZOMIGNANI; ZAMBELLI; ANTONIO, 2009).

A terceira fase é a sinaptogênese, trata-se do desenvolvimento e fortalecimento de sinapses, mesmo mantendo esta função ao longo da vida, o período gestacional é crítico para o desenvolvimento dos circuitos neuronais básicos. Na etapa seguinte, ocorre morte celular, acredita-se que um número maior do que o necessário de neurônios são formados na etapa um do

desenvolvimento, portanto nesta, ocorre apoptose, deixando o sistema nervoso como o número ótimo de neurônios funcionais. Ainda segue-se a etapa de diferenciação e especialização dos neurônios em relação a seus neurotransmissores e receptores, a etapa de fortalecimento das conexões e de mielinização; estas últimas três etapas ocorrem segundo estímulos internos específicos e permanecem ativas durante toda a vida (RODIER, 1995; ZOMIGNANI; ZAMBELLI; ANTONIO, 2009).

Neste processo de desenvolvimento e maturação, o encéfalo do feto e do recém nascido, sofre influência de fatores ambientais que podem interferir de maneira positiva ou negativa. É de conhecimento científico que genes de células neurais interagem com o ambiente, a fim de modular as fases sucessivas do desenvolvimento ontogenético do sistema nervoso, durante o período pré e pós natal. Especificamente, fatores ambientais externos parecem interferir sobremaneira no desenvolvimento encefálico intrauterino (GRESSENS et al., 2001). Interessante constatar que no adulto o SNC encontra-se bem protegido e pode, inclusive, ser descrito como um dos sistemas mais bem resguardados do corpo humano (RODIER, 1995).

Dessa maneira, há relatos científicos de que diferentes agentes externos podem ser nocivos às etapas do desenvolvimento do SNC, tais como drogas, metais pesados, tabaco, entre outros (RODIER, 1995). Neste contexto, drogas (como o NaNO₂, por exemplo) administradas em altas doses, podem ser utilizadas em modelos animais a fim de simular os efeitos da hipóxia cerebral que ocorre em humanos (BAKY et al., 2010; OZEN, 2014).

A música, portanto, pode ser uma alternativa de estímulo positivo, já que trata-se de uma técnica terapêutica embasada nas artes que tem aplicabilidade em um grande número de alterações psiquiátricas, perfazendo uma opção de tratamento para sujeitos com desordens severas do desenvolvimento do SNC (BOSO et al., 2007). Assim como, é provável que a interpretação da musicoterapia pelo cérebro, responda de forma diferente dependendo da fase da vida, visto que na infância cada bilhão de neurônios no sistema auditivo forma milhões de conexões com outros neurônios, criando uma verdadeira rede neuronal (TRAINOR, 2008).

1.1.4 Áreas encefálicas e circuitos neurais influenciados pela aplicação da música

Estima-se que a musicoterapia facilite a neurogênese, a regeneração e o reparo do tecido neuronal por sua ação de ajuste na secreção de hormônios, levando à plasticidade cerebral e atuando desde o período fetal à fase adulta. A música parece ser capaz de, além de alterar os níveis de cortisol, testosterona e estrogênio, afetar a expressão gênica relacionada aos receptores dessas substâncias (FUKUI; TOYOSHIMA, 2008).

Os seres humanos experimentam reações de intenso prazer a determinados estímulos, tais como a comida, as drogas psicoativas, o dinheiro, e tais reações também podem ser proporcionadas pela música. Este mecanismo de recompensa é mediado pela atividade dopaminérgica no sistema mesolímbico, o qual está envolvido com aspectos de reforço comportamental e motivacional (SALIMPOOR et al., 2011).

A música é capaz de influenciar o sistema de recompensa, motivação e prazer. Em estudos que realizaram mapeamento cerebral com técnicas de imagem, foi verificada ação substancial na região mesolímbica, no núcleo accumbens, no tronco encefálico, assim como no tálamo, cerebelo, insula, córtex cingulado anterior e córtex orbito frontal. Muitas destas áreas são os locais onde tem origem os neurônios dopaminérgicos (CHANDA; LEVITIN, 2013; POLSTON et al., 2011).

Técnicas de imagem, tais como a tomografia por emissão de pósitrons e a ressonância magnética funcional sugerem que diferentes áreas cerebrais são ativadas pela música. As estruturas do sistema límbico tais como, a amígdala e o hipocampo e a região paralímbica por exemplo, o córtex orbito frontal, o giro parahipocampal e os pólos temporais são ativadas quando ouve-se música (PAUWELS et al., 2014). Koelsch (2010) mapeou as áreas evocadas pela música. Especificamente, a amígdala, o núcleo accumbens e o hipocampo são frequentemente mencionados como estruturas ativadas, o que sugere que a

música é capaz de modular a atividade nas principais áreas da emoção, entre outras regiões (Figura 01).

A partir dessas experiências de imagem, fica claro entender que várias estruturas cerebrais podem ser ativadas, o que é atribuído a diferentes regiões que controlam as emoção e também a essa capacidade de ativar diferentes circuitos neuronais (KOELSCH, 2010; MAMEDE; ESTEVES, 2010; PAUWELS et al., 2014).

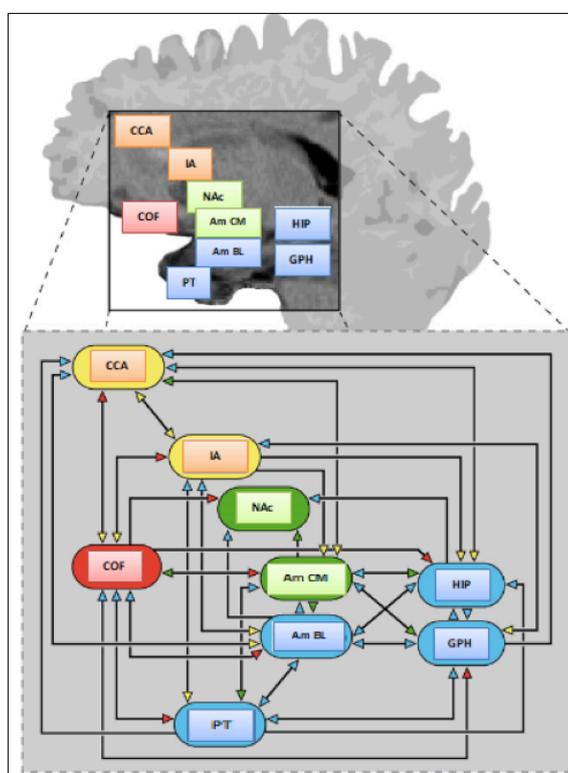


Figura 01: Representação esquemática de conexões anatômicas de algumas estruturas límbicas e para límbicas envolvidas no processamento emocional da música CCA: córtex cingulado anterior; IA: Insula Anterior; Am (BL): amígdala basolateral; Am (CM) amígdala corticomedial (incluindo o núcleo central); HIP: formação do hipocampo; NAc: núcleo accumbens; COF: córtex orbito frontal; GPH: giro parahipocampal; PT: pólo temporal. (Fonte: adaptada de KOELSCH, 2010)

As principais variáveis neuroquímicas estudadas quando investiga-se os efeitos biológicos da música, dizem respeito as seguintes relações entre reações orgânicas e liberação de substâncias neuroquímicas e hormonais: 1 - quando investiga-se os mecanismos de recompensa, motivação e prazer, encontra-se

relação com a secreção de dopamina e opióides endógenos; 2 – ao investigar o estresse e excitação, estão ligados aos níveis de cortisol, hormônio corticotrófico e hormônio adrenocortical, 3 – já as reações imunológicas parecem estar relacionadas à presença de serotonina e de hormônio estimulador de alfa-melanócito e beta-endorfina e 4 – e a fim de verificar as alterações de comportamento social, ligadas a ação da ocitocina (CHANDA e LEVITIN, 2013).

1.1.4.1 Recompensa, motivação e prazer.

A musicoterapia influencia os mecanismos de recompensa, motivação e prazer. Os sentimentos subjetivos ligados a tais mecanismos é mediado pelo sistema mesolímbico, o qual compreende a área tegumentar ventral, no corpo estriado ventral, incluindo o núcleo accumbens, no globo pálido ventral, e também em áreas do córtex pré-frontal que inclui o córtex cingulado anterior e o córtex orbito frontal (CHANDA; LEVITIN, 2013; MAMEDE; ESTEVES, 2010).

A sensação prazerosa ligada à recompensa implica na secreção de dopamina e opióides endógenos nas estruturas do tronco encefálico. A música é capaz de influenciar o sistema de recompensa, motivação e prazer, em estudos que realizaram mapeamento cerebral com técnicas de imagem, foi verificada ação substancial na região mesolímbica, no núcleo accumbens, no tronco encefálico, assim como no tálamo, cerebelo, insula, córtex cingulado anterior e córtex orbito frontal. Muitas destas áreas são os locais onde tem origem os neurônios dopaminérgicos. Estes achados sugerem que os sentimentos de recompensa, motivação e prazer desencadeados pela musicoterapia dependem de transmissão dopaminérgica, envolvendo o sistema mesolímbico (CHANDA; LEVITIN, 2013; POLSTON et al., 2011;).

Salimpoor et al. (2011) realizaram um estudo no qual combinaram testes psicofisiológicos, neuroquímicos e hemodinâmicos a fim de investigar os efeitos de escutar músicas, consideradas prazerosas pelos participantes, em determinadas regiões cerebrais. Foi observada liberação de dopamina endógena no corpo estriado durante o pico de excitação emocional, enquanto os sujeitos escutavam música. Os resultados indicaram que houve uma sensação de intenso

prazer relacionado com o ato de ouvir música, o qual culminou com a liberação de dopamina.

Em estudo realizado por Sutoo; Akiyama (2004) verificou-se a eficácia da musicoterapia na diminuição da pressão arterial de ratos naturalmente hipertensos, observou que o efeito hipotensor da música se deve ao aumento dos níveis circulantes de cálcio periférico. Foi observado que este íon foi transportado por via hematogênica ao cérebro e potencializa a atividade da calmodulina, levando ao aumento da síntese de dopamina pela fosforilação da tirosina hidroxilase em regiões específicas, como o corpo estriado e o núcleo accumbens. Portanto, a musicoterapia foi capaz de promover aumento na síntese de dopamina dependente de cálcio no cérebro. Em decorrência do aumento dos níveis de dopamina centrais, verificou-se redução da pressão arterial por meio ativação da via de receptores dopaminérgicos. Diante destes achados, os autores sugeriram que a aceleração da síntese de dopamina dependente de cálcio deve ser o mecanismo pelo qual a música modifica os valores de pressão arterial e age sobre outras funções encefálicas.

1.1.4.2 Estresse e excitação

A música tem efeito sobre a redução dos níveis circulantes de cortisol (BEAULIEU-BOIRE et al., 2013; NELSON et al., 2008; TASSET et al., 2012; TRAINOR, 2008) e desta forma ocorre, por exemplo, redução subsequente dos efeitos da inflamação sistêmica em pessoas com doenças graves (NELSON et al., 2008). Além disso, pode também controlar a dor e proporcionar relaxamento físico e mental de alguns pacientes (TRAINOR, 2008). O potencial terapêutico da musicoterapia há muito tem sido relacionado com sua capacidade de reduzir o estresse e modular a excitação (CHANDA; LEVITIN, 2013).

Escutar música relaxante já foi relatada como potencial causadora de redução de estresse em indivíduos saudáveis e em diversas condições e patologias (BOSO et al., 2007; BRINGMAN et al., 2009; CHOI; LEE, LIN, 2008; GOLD et al., 2009; KULKARNI et al., 2012; NELSON et al., 2008; O'KELLY et al., 2013). Tais efeitos, em geral, foram atribuídos à capacidade da música em

promover distração ou modular o humor. No entanto, há evidências de que a musicoterapia, na realidade age reduzindo a ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), isto se dá por meio da redução da liberação do cortisol e da beta-endorfina relacionadas a resposta ao estresse (BEAULIEU-BOIRE et al., 2013; CHANDA; LEVITIN, 2013; TASSET et al., 2012).

Outro mecanismo de ação, deste tipo de terapia, diz respeito da ação da música sobre o tronco encefálico, o qual tem a capacidade de controlar o ritmo cardíaco e respiratório, de tal sorte que, ao escutar músicas agradáveis ocorre redução de frequência cardíaca, frequência respiratória e pressão arterial promovendo relaxamento e diminuindo o estresse (CHANDA; LEVITIN, 2013; TASSET et al., 2012;).

Pesquisas recentes têm demonstrado uma relação entre a música e a regulação do eixo HPA, o sistema nervoso simpático e o sistema imunológico. Em ambientes clínicos e hospitalares, a musicoterapia foi capaz de induzir ao relaxamento, diminuindo os níveis de estresse e a ansiedade em seres humanos (YAMASAKI et al., 2012).

1.1.4.3 Reações Imunológicas

As respostas imunológicas visam a proteção do organismo a agressões internas ou externas. O estresse e o envelhecimento, dentre outros fatores, parecem ter efeitos deletérios sobre o sistema imune. Por outro lado, alguns fatores relacionados ao estilo de vida, tais como o otimismo, o bom humor e alegria podem diminuir os efeitos negativos do estresse e do envelhecimento. Uma vez que a música pode modular o humor e reduzir o estresse, é razoável pensar que pode também melhorar a função imunológica (CHANDA; LEVITIN, 2013).

Estudos têm revelado que a música, por exemplo, tem efeitos neuroquímicos que melhoram o sistema imunológico, elevando a produção de Imunoglobulina A e de leucócitos, podendo refletir na capacidade de regular o humor e reduzir a ansiedade (CHANDA; LEVITIN, 2013; CHOI; LEE; LIN, 2008). Em modelos murinos, a musicoterapia mostrou-se capaz de reduzir a

concentração de citocinas associadas a alergias – como a Interleucina 4 – e a corticosterona (LU et al., 2010). A diminuição de Interleucina 4 corrobora com os achados de Tasset et al. (2012). Em estudo de Nelson et al. (2008) houve redução dos níveis de Interleucina 6 em pacientes em estado crítico.

Além disso, a música pode modular a resposta imune, já tendo sido verificado, entre outras coisas, aumento da atividade de células natural killer, linfócitos e interferon- γ , o que é uma característica interessante, pois muitas doenças estão relacionadas instabilidades e alterações no sistema imunológico (PAUWELS et al, 2014).

1.1.4.4 Comportamento Social

Evidências indicam que fatores sociais desempenham importante papel na manutenção da saúde. Atividades coletivas, tais como a música e a dança parecem desempenhar forte papel no estabelecimento de relações sociais. Neste contexto, a ocitocina e a vasopressina, dois neuropeptídeos conhecidos por sua ação sobre o comportamento social, são os possíveis responsáveis por mediar os efeitos sociais da música. Esta ação da ocitocina e especialmente da vasopressina, até o momento foi pouco explorada pela sociedade científica (CHANDA; LEVITIN, 2013).

Poucos estudos relatam resultados, dentre eles Nilsson (2009) afirma que pacientes submetidos a cirurgia cardíaca a céu-aberto que ouviram música durante a fase de recuperação cirúrgica, apresentaram, no primeiro dia de pós-operatório, níveis mais altos de ocitocina comparado ao grupo que não ouviu.

1.1.5 Efeitos orgânicos da musicoterapia

A musicoterapia é uma técnica de tratamento que utiliza o som e a música para fins terapêuticos, psicoprofiláticos e de reabilitação. A música pode oferecer benefícios aos pacientes, pois além dos efeitos orgânicos que serão relatados neste texto, ainda pode desviar sua atenção de experiências

desagradáveis, tais como futuras intervenções. De forma que, um dos efeitos de ouvir música pode ser diminuir ou tirar pensamentos desagradáveis dos pacientes. Nesse sentido, a musicoterapia tem sido reconhecida como uma intervenção clínica com benefícios baseados em evidências. E já foi estudada em diferentes contextos e em várias condições clínicas importantes, como distúrbios cardiovasculares, dor de câncer, epilepsia, depressão e demência (PAUWELS et al., 2014).

Sobre a fisiologia, entende-se que as respostas fisiológicas no organismo dependem principalmente da complexidade do estímulo musical e da percepção e experiência musical que cada indivíduo tem. Os mais frequentemente observados são: aumento ou diminuição da frequência cardíaca, aumento ou diminuição da frequência respiratória, maior ou menor ativação das ondas cerebrais, aumento ou diminuição da atividade muscular e estimulação do sistema imunológico (ANTORVEZA, 2017; BENENZON, 1988; CHOI; LEE; LIM, 2008; TASSET et al., 2012; ZANINI et al., 2009).

Também há efeitos relatados em nível emocional. Todos podem sentirem-se afetados por alguma música que traz memórias, ou que evoca situações familiares, emocionais ou espirituais. Da mesma forma, utiliza-se a música para se comunicar com alguém. Assim, a terapia musical facilita a comunicação de forma não verbal, modifica o humor e ajuda a evocar sentimentos (ANTORVEZA, 2017; NELSON et al., 2008; TASSET et al., 2012)

Em relação a aspectos cognitivos, a musicoterapia pode ajudar a desenvolver habilidades pré-acadêmicas e acadêmicas, pois evoca associações como imagens ou memórias sob a forma de cenas, estimula imaginação e criatividade, ajuda a lembrar informações, facilita o aprendizado, facilita e estimula a linguagem, melhora a capacidade de atenção e a memória recente e de longo prazo (ANTORVEZA, 2017; NUNES RIBEIRO, 2013)

No plano social encontram-se os efeitos mais conhecidos porque a música é uma das primeiras manifestações em diferentes culturas. Favorece a integração social, é claramente um agente socializador que permite a coesão do grupo, estimula a expressão individual diante de um grupo, restaura os

relacionamentos, ao mesmo tempo em que exige coordenação e cooperação (ANTORVEZA, 2017; CALAMITA et al., 2016; NUNES RIBEIRO, 2013)

E quando verifica-se a influencia da musicoterapia sobre a espiritualidade verifica-se que a música é utilizada para que o homem possa se comunicar com o que ele entende como Divino e faz parte de todas as suas cerimônias religiosas. Esses efeitos são difíceis de definir e entender e podem ser entrelaçados de algum modo com efeitos emocionais. Dá paz, serenidade e harmonia. Ela cria uma atmosfera propícia à meditação, facilita a reflexão sobre o significado da vida (ANTORVEZA, 2017; CHOI; LEE; LIM, 2008).

1.1.6 Potencial efeito da musicoterapia sobre os aspectos comportamentais

A musicoterapia pode até ser aplicada como uma forma de psicoterapia, no qual inserem-se processos sistemáticos de intervenção verbal e não verbal nos quais o terapeuta auxilia o paciente a atingir estímulos benéficos para a sua saúde, fazendo uso de experiências musicais e de reações advindas destas relações (FRANÇOIS et al., 2015; GOLD et al., 2009).

Como o desenvolvimento de depressão, de transtornos de ansiedade e déficits cognitivos em geral, são frequentemente associados com diversas patologias. É positivo que existam alternativas não-farmacológicas disponíveis como, por exemplo, a música, que pode ser usada na reabilitação de pacientes com alguns desses tipos de manifestações clínicas (SAMPAIO et al., 2017).

A introdução da musicoterapia no atendimento e reabilitação de pacientes submetidos à internação apresenta-se como meio hábil de efetivo atendimento humanizado, haja vista constituir-se em terapia capaz de afastar sentimentos como ansiedade, depressão, incertezas, dores e angústias, frequentes no ambiente hospitalar e inerentes a internações prolongadas (DE FREITAS et al., 2017).

Dentre os benefícios observados nos pacientes que adotaram a musicoterapia, pode-se salientar a recuperação da auto confiança e da auto

estima, o alívio do estresse, o conforto, a redução da ansiedade e da angústia e a melhora no humor (DE FREITAS et al, 2017).

Além dos benefícios citados, o uso da música tem demonstrado melhorias na atenção, na motivação, no relaxamento e na vocalização do portador de paralisia cerebral (NUNES RIBEIRO, 2007). Há também relatos positivos na redução do estresse, da ansiedade e da depressão. Além disso, com sua capacidade de levar à expressão de sentimentos e interconexões entre experiências diversas, pode auxiliar pacientes com desordens mentais em sua integração nas atividades sociais (ESMAEILZADEH; SHARIFI; TAYARANI, 2013).

Foi estudado, por exemplo, a aplicação de musicoterapia como tratamento coadjuvante de pacientes com distúrbios mentais graves, dentre eles a depressão maior e a esquizofrenia. Os resultados apontam para o fato de que a música associada ao tratamento convencional tem efeito respeitável e significativo sobre o estado geral, a sintomatologia global, os sintomas negativos, a depressão, a ansiedade, a funcionalidade e o engajamento terapêutico. Estes benefícios foram encontrados independentemente do diagnóstico, no entanto dependeram fortemente do número de sessões. Os autores ainda afirmam que sinais de melhora podem ser observados nos pacientes mesmo com poucas sessões de terapia, todavia, o número maior de sessões com frequência regular são necessários para alcançar benefícios adicionais e duradouros (GOLD et al., 2009).

Estudos de imagem, com o uso da tomografia por emissão de pósitrons e a também com a ressonância magnética funcional revelaram que ouvir músicas agradáveis ativa áreas cerebrais corticais e subcorticais onde as emoções são processadas. Esses efeitos neurobiológicos da música sugerem que a estimulação auditiva evoca emoções ligadas à excitação aumentada e resulta em desempenho temporariamente melhorado em muitos domínios cognitivos (PAUWELS et al., 2014).

Ratos expostos a musicoterapia perinatal apresentaram modificações de substâncias ligadas a aprendizagem e memória e desta forma explicando o melhoramento do aprendizado e de funções de memória observados (CHIKAHISA et al., 2006). É possível que o benefício mais comum e mais facilmente percebido desta terapia é a sensação de relaxamento, de bem-estar. Todas as pessoas têm

uma identidade sonora, um ritmo pulsando em seu interior, consequência dos inúmeros sons recebidos por nós. A musicoterapia busca identificar e equilibrar o seu ritmo interno, para possibilitar respostas positivas fisiológicas e comportamentais (MAMEDE; ESTEVES, 2010).

1.1.7 Alterações morfofuncionais promovidas pela musicoterapia

É bem conhecido o fato de que a música exerce alterações fisiológicas no SNC e periférico (NUNES RIBEIRO, 2013; TASSET et al., 2012) e tem sido verificado que pode até acelerar a ativação dos circuitos neurais em várias áreas cerebrais ligadas ao comportamento emocional, como o hipocampo e córtex pré-frontal (BEAULIEU-BOIRE et al., 2013; CHANDA; LEVITIN, 2013; KRUMHANSL, 1997; TASSET et al., 2012).

A musicoterapia parece afetar, inclusive, a produção de neurofinas cerebrais e, conseqüentemente, produzir modificações de comportamento. A exposição de ratos adultos jovens a músicas de ritmo lento por seis horas diárias, ao longo de vinte e um dias levou a um aumento no Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) na região do hipocampo, mas sem evidências de crescimento neural (ANGELUCCI et al., 2007). O mesmo ocorre para ratos em estágio perinatal, sendo adicionalmente constatada uma elevação dos níveis de Receptores B de Tirosina Quinase e de proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítideo-3 no córtex (CHIKAHISA et al., 2006).

A música pode promover a ativação de circuitos neurais e partes do sistema nervoso ligadas ao comportamento emocional, tais como a ínsula, cíngulo, o hipocampo, a amígdala e o córtex pré frontal (TASSET et al., 2012). Em investigações quanto à neuroanatomia funcional da percepção musical – realizadas com o uso da Ressonância Magnética Funcional, percebeu-se que adultos e crianças apresentaram ativação no lobo frontal e na porção anterior do giro temporal superior (KOELSCH et al., 2005). Além disso, a exposição à musicoterapia aperfeiçoou a performance de aprendizado, avaliada pelo teste de esQUIVA passiva em ratos (ANGELUCCI et al., 2007).

Em estudo realizado por Fachner; Gold; Erkkilä (2013) foi verificado que a reflexão verbal e as emoções provocadas pela música podem induzir reorganização neural nas áreas fronto – parientais. Já para Chanda; Levitin (2013) pode ocorrer desativação de áreas como amígdala, hipocampo, giro parahipocampal, e córtex temporal pode ser observada em resposta à audição de música agradável. Como o hipocampo é conhecido por facilitar e inibir comportamentos defensivos em resposta ao estresse, esta desativação pode estar ligada a modulação do cortisol em resposta a este tipo de música.

1.1.8 Efeito Mozart

De acordo com a primeira publicação em 1993 por Rauscher; Shaw; Ky o Efeito Mozart consiste no aprimoramento de habilidades de raciocínio, especialmente na resolução de desafios de localização espacial, em pessoas normais, depois de ouvirem a sonata de piano de Mozart K.448 (Figura 02). Uma avaliação adicional desse efeito levantou a questão de que pode existir uma ligação entre a música, as emoções geradas por ela e em um nível mais alto, o aprimoramento de habilidades cognitivas após ouvir música (PAUWELS et al., 2014).

O Efeito Mozart, que hoje é marca registrada, deu origem a uma verdadeira febre de consumo da música de Mozart e de programas ‘mágicos’ de educação musical, que prometiam desenvolver bebês mais inteligentes e mais aptos a obterem um melhor lugar no mercado de trabalho (MAMEDE; ESTEVES, 2010).

Então, a partir daquele primeiro estudo, uma série de pesquisas foram realizadas com foco na noção de que a música pode tornar o indivíduo mais inteligente (JAUSOVEC; JAUSOVEC; GERLIC, 2006; JONES, 2010; LINTS; GADBOIS, 2003; MCCUTCHEON, 2000; RIDEOUT; LAUBACH, 1996; SCHELLENBERG, 2004; SMITH; WATERS; SUDA et al., 2008).

O efeito sobre a cognição foi replicado por Smith; Waters; Jones (2010) que verificaram melhor desempenho em relação a testes de localização espacial em adultos jovens que ouviram Mozart. Estudos anteriores também confirmaram

que o primeiro movimento da Sonata de Mozart era capaz de aumentar a aprendizagem em tarefas de cunho espacial (BODNER et al., 2001; JAUSOVEC; JAUSOVEC; GERLIC, 2006; RIDEOUT; LAUBACH, 1996). Suda et al. (2008), por sua vez, constataram que esta música melhorou o desempenho cognitivo em testes de inteligência, em comparação com o silêncio ou mediante a música de Beethoven. Todos estes estudos corroboram com o trabalho pioneiro de Schellenberg (2004) que estudou 144 crianças e notou aprimoramento da inteligência naqueles que tomavam lições de música em comparação com aqueles em grupos de controle atribuídos aleatoriamente que recebiam aulas de teatro ou não tinham aulas de arte.

No entanto, nem todas as pesquisas observaram resultados positivos em relação chamado Efeito Mozart. McCutcheon (2000) não encontrou diferenças significativas no desempenho do raciocínio espacial entre os participantes do estudo, mesmo depois de ouvir Mozart, jazz ou de não ouvir nenhum estímulo musical. Já Lints; Gadbois (2003) na tentativa de gerar o efeito de Mozart, demonstraram que o raciocínio espacial aumentado ocorreu seguindo uma variedade de condições e não apenas depois de ouvir Mozart. Depois da revisão da literatura científica relacionada com o tema, concluiu-se que os efeitos da exposição à música de Mozart, “efeito Mozart”, quando se apresentaram, eram restritos a uma habilidade específica que não permaneceu por mais de alguns minutos. A educação musical formal, pelo contrário, mostra efeitos positivos mais permanentes mais atribuíveis à atenção individual que recebe o aluno e ao estímulo em habilidades básicas para as aprendizagens gerais (TALERO-GUTIÉRREZ; ZARRUK-SERRANO; ESPINOSA-BODE, 2004)

Há também linhas de pesquisas voltadas para a aplicação do efeito de Mozart em animais, com relatos, de melhora na produção de leite e ovos, em criadores que implantaram a audição de música clássica para os seus animais. Tendo sido verificado que, a música funcionava como estímulo anti-estresse, promovendo, então, alterações significativas nos resultados da produção (MAMEDE; ESTEVES, 2010).

2 (126)

S O N A T E
für zwei Pianoforte
von
W. A. M O Z A R T.
Köch. Verz. N^o 448.

Mozarts Werke. Serie 19 N^o 8. Compositi 1784 in Wien.

Allegro con spirito.

Pianoforte I.

Pianoforte II.

Bild und Druck von Breitkopf & Härtel in Leipzig. W. A. M. 448. Ausgegeben 1878.

Figura 02 – Partitura da Sonata de Mozart para dois Pianos em Ré Maior (K.448). (Fonte: <http://pt.cantorian.org/music-link/24081/Sonata-for-Two-Pianos>)

1.2 HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA

Conforme comentado previamente, em torno de 10 milhões de pessoas sobrevivem a lesões neurológicas relacionadas a hipóxia isquêmica encefálica (DOYLE et al., 2015; TERRANEO; SAMAJA, 2017) porém, ainda assim, a hipóxia-isquêmica representa a quarta causa de morte, nos Estados Unidos da América com custos em reabilitação e cuidados médico-hospitalares, estimados em aproximadamente, 273 bilhões de dólares anuais (ZHOU et al., 2013). Assim, a hipóxia isquêmica é uma das principais causas de morte e incapacidade de longa duração em adultos no mundo (BAKY et al., 2010; GABRYEL et al., 2014).

A síndrome hipóxico-isquêmica se desenvolve quando há hipoperfusão tecidual significativa e diminuição da oferta de oxigênio (O₂) e glicose, podendo ser decorrente das mais diversas etiologias (PROCIANOY; SILVEIRA, 2001; TERRANEO; SAMAJA, 2017). Este processo patológico acaba por provocar comprometimento da nutrição e oxigenação de regiões cerebrais, uma vez que ocorre a deficiência de aporte sanguíneo encefálico (CHOI; LEE; LIN, 2008). A hipóxia pode provocar apoptose e lesões neuronais difusas (TERRANEO; SAMAJA, 2017), assim como pode induzir a lesão encefálicas secundária (THORNTON et al., 2017).

Os neurônios são células que dependem fundamentalmente do metabolismo aeróbico para que desempenhem adequadamente suas funções metabólicas. Portanto, a diminuição ou a ausência da oferta de oxigênio e glicose acabará por desencadear uma série de eventos moleculares que poderão terminar por provocar sofrimento e até morte neuronal (DE ARAUJO et al., 2008; GABRYEL et al., 2014).

A síndrome hipóxico-isquêmica é uma doença multissistêmica com acometimento generalizado. Sua fisiopatologia tem como ponto de partida a diminuição ou ausência de fluxo sanguíneo adequado, tendo como consequência direta a lesão celular decorrente de falência na produção mitocondrial de energia (Adenosina Trifosfato – ATP), seguida de lesão secundária por acúmulo de substâncias oxidantes (PROCIANOY; SILVEIRA, 2001).

Os neurônios variam amplamente em forma, tamanho, tipo de

neurotransmissores e número de sinapses. Sua característica comum é uma sensibilidade muito alta às mudanças na concentração de oxigênio. A consequência da hipóxia é lançar uma série de reações bioquímicas chamadas cascata isquêmica (LENART, 2017). Portanto, a gravidade dos danos cerebrais poderá ser determinada ou influenciada pelo tempo de duração da hipóxia (PROCIANOY; SILVEIRA, 2001).

Em consequência a diminuição do metabolismo aeróbico, observa-se que ocorrerá glicólise anaeróbica, no entanto este processo é ineficiente para gerar a energia para manter os gradientes iônicos e os processos metabólicos celulares neuronais em níveis aceitáveis (VANNUCCI, 1990). Isto é, alternativamente, a demanda de O^2 reduzida pode ser compensada pelo aumento do recrutamento de mecanismos anaeróbicos, mas no tecido cerebral a troca aeróbica para anaeróbia é de valor limitado devido à sua reduzida capacidade glicolítica, o que prejudica esse tipo de defesa (TERRANEO; SAMAJA, 2017).

Portanto, é pobre a plasticidade cerebral em termos de ajuste metabólico e sua incapacidade de melhorar a eficiência metabólica ao mudar para caminhos de produção de energia anaeróbica (ERECINSKA; SILVER, 2001). De fato, a falta de oxigenação está associada a sinais iniciais de falha representados por quedas marcantes nos níveis de pH e fosfato de creatina tecidual, seguida de disfunção quase imediata de Na^+ / K^+ ATPase que, em última instância, leva a desequilíbrios iônicos (TERRANEO; SAMAJA, 2017).

Vários fatores fisiopatológicos foram implicados na hipóxia-isquemia, incluindo mediadores inflamatórios, excitotoxicidade e estresse oxidativo (ZHAO et al., 2017). O principal conjunto de alterações metabólicas provocadas pela hipóxia, descritas na literatura são: esgotamento rápido intracelular de ATP, mudança do metabolismo aeróbico para anaeróbico (glicólise anaeróbia), disfunção mitocondrial, formação de EROS, alteração do equilíbrio ácido-base, inibição de neurotransmissores excitatórios e ativação de enzimas estimuladas por cálcio (BAKY et al., 2010; LEE et al., 2014; MAITI; SINGH; ILAVAZHAGAN, 2008; VANNUCCI, 1990).

A morte neuronal propriamente dita é consequência da interação de processos complexos, tais como, excitotoxicidade, despolarização, inflamação,

autofagia, necrose e apoptose (BAKY et al., 2010; CERBAI et al., 2012; LEE et al., 2014).

A exposição dos tecidos encefálicos ao estresse ou a outros fatores patológicos induzem um grande número de respostas adaptativas que tem como objetivo reestabelecer a homeostasia celular (BERGHE et al., 2014; GREEN; GALLUZZI; KROEMER, 2014). No entanto, quando o agente causador da lesão é muito intenso ou os sistemas de proteção não são eficientes o suficiente para restabelecer as funções fisiológicas a célula poderá morrer (THORNTON et al., 2017).

Inicialmente a hipóxia isquêmica provoca esgotamento do ATP e da fosfocreatina. Como resposta a esta queda, os mecanismos neuronais reagem e faz com que esses níveis retornem transitoriamente para a linha de base, mas são seguidos por um segundo esgotamento mais prolongado das reservas de energia celular, acompanhado de progressão da lesão cerebral (BERGHE et al., 2014). Esses distúrbios no metabolismo energético desencadeiam uma série de respostas fisiopatológicas que, em última instância, levam à morte celular (GALLUZZI et al., 2015).

Dentre as organelas citoplasmáticas, destacam-se as mitocôndrias, que parecem estar envolvidas em respostas adaptativas e metabólicas a lesões, bem como na maioria das formas de morte celular, incluindo a apoptose e a necrose (BERGHE et al., 1994; THORNTON et al., 2017). Os detalhes metabólicos serão explorados no texto a seguir.

1.2.1 Fisiopatologia da Hipóxia Isquêmica Encefálica

A hipóxia age em nível celular de forma que ocorre um aporte insuficiente de oxigênio. As células neuronais precisam sintetizar continuamente ATP para manter a sua integridade e funcionamentos adequados. A síntese de ATP está na dependência das reações de oxi-redução que acontecem em nível mitocondrial (FLOWERS; ZIMMERMAN, 1998).

De forma que a falta de aporte de oxigênio causa diminuição na síntese do ATP celular. A energia disponível não é mais capaz de manter a bomba de sódio e potássio da membrana celular, que é crítica para a manutenção do gradiente iônico normal. Posteriormente, como reação a este estímulo há a formação excessiva de substâncias oxidantes, alteração de aminoácidos intracelulares, particularmente, tirosina, histidina, fenilalanina, metionina e cisterna, e oxidação de ácidos nucléicos celulares (FLOWERS; ZIMMERMAN, 1998). Quando a lesão se torna irreversível, por falta de energia para manter as bombas ATP dependentes, há a liberação de neurotransmissores, incluindo glutamato (PROCIANOY; SILVEIRA, 2001).

Aminoácidos excitatórios têm sido implicados no dano neuronal e na hipóxia. O ácido glutâmico, maior aminoácido excitatório no cérebro, é citotóxico em células neuronais. Os neurônios que liberam glutamato são ativados durante evento hipóxico pela entrada de cálcio para dentro da célula e pela própria despolarização dessas células. Paralelamente, ocorre redução de ATPase-glutamato dependente na membrana pré-sináptica, contribuindo para a manutenção de concentrações elevadas do glutamato extracelular, mantendo um estímulo prolongado deste receptor. Ao final deste processo, ocorrerá o acúmulo de cálcio no meio intracelular (DELIVORIA-PAPADOPOULOS; MISHRA, 1998; PROCIANOY; SILVEIRA, 2001).

O acúmulo do cálcio citosólico é o principal fator dentre as múltiplas lesões e eventos em cascata que causam a morte celular induzida pela hipóxia-isquêmica. O cálcio ativa enzimas degradativas tais como endonucleases, proteases e fosfolipases (DELIVORIA-PAPADOPOULOS; MISHRA, 1998). De maneira mais detalhada, o cálcio aumentado no espaço intracelular pode iniciar vários eventos bioquímicos com geração de radicais livres: 1 - ativação de fosfolipase A2, causando aumento da geração de radicais livres pelas vias da cicloxigenase e lipoxigenase; 2 - ativação da enzima óxido nítrico sintetase, que promove formação de peroxinitrito e geração de radicais livres; 3 - ativação de proteases, que convertem xantina dehidrogenase em xantina oxidase, gerando radicais livres; 4 - ativação de fosfolipase C, que resulta no aumento dos estoques de cálcio intracelular (DELIVORIA-PAPADOPOULOS; MISHRA, 1998; PROCIANOY; SILVEIRA, 2001).

No cérebro humano e na medula espinhal, os neurônios degeneram após insultos agudos, como por exemplo, nos casos de acidente vascular cerebral, parada cardíaca e trauma, assim como, durante doenças progressivas de aparecimento de adultos tais como, esclerose lateral amiotrófica e doença de Alzheimer. A excitotoxicidade mediada pelo receptor de glutamato tem sido implicada em todas essas condições neurológicas (MARTIN et al., 1998).

Ao final deste processo, a morte da célula nervosa pode desenvolver-se de duas formas morfológicas distintas: a necrose e a apoptose (Figura 03). A depender de vários fatores, tais como, a situação metabólica, o tipo de célula, a natureza do estímulo do estresse, e quais as organelas intracelulares são afetados, a célula sofre apoptose ou necrose (THORNTON et al., 2017). Na necrose há edema, rompimento das membranas celulares e reação inflamatória intensa, determinada por estímulos deletérios intenso e de curta duração. Já na apoptose a célula agoniza, a morte é lenta e progressiva, caracterizada pela redução do núcleo e do citoplasma, condensação da cromatina e fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA). Estímulos de menor potencial lesivo, mas de longa duração causam apoptose. Portanto, a apoptose pode ocorrer nas formas mais leves de dano isquêmico, enquanto a necrose predomina nas formas mais intensas (GALLUZZI et al., 2015; GREEN, GALLUZZI; KROEMER, 2014; PROCIANOY; SILVEIRA, 2001; PULERA et al., 1998).

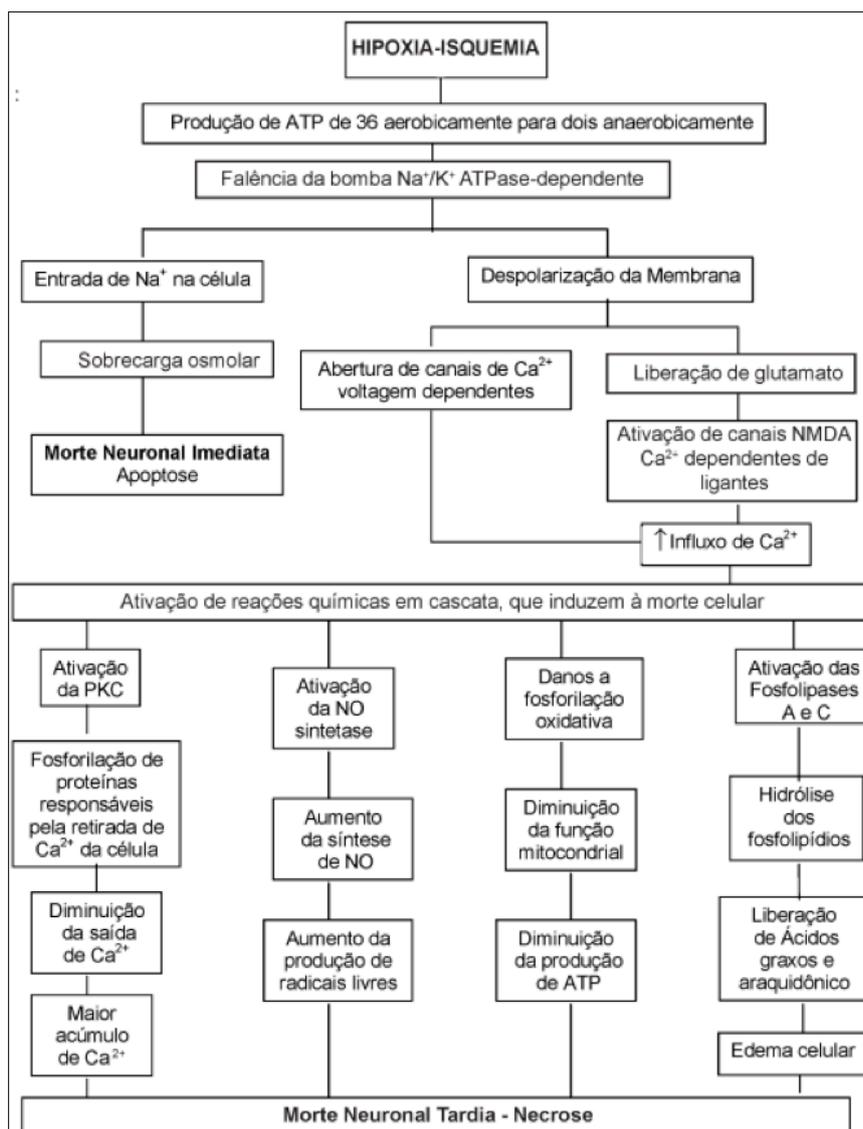


Figura 03: Organograma das etapas da Hipóxia Isquêmica Encefálica. O organograma demonstra como ocorre a morte imediata, por apoptose e a morte tardia por necrose. (Fonte: DE ARAÚJO et al., 2008)

1.2.1.1 Apoptose

A apoptose pode ser desencadeada por estímulos intracelulares (intrínsecos) e extracelulares (extrínsecos) (THORNTON et al., 2017). Devido ao seu baixo potencial regenerativo, a apoptose do neurônio surge como um marcador confiável de lesão cerebral (TERRANEO; SAMAJA, 2017).

No mecanismo de apoptose a mitocôndria é o ponto principal. Nos casos de hipóxia isquêmica encefálica ela tem sua permeabilidade aumentada devido a abertura de poros de transição, liberando múltiplas moléculas proapoptóticas, como o Citocromo C e as Caspases 2 e 3 (ZHU et al., 2004).

FASE PRÉ-MITOCONDRIAL	FASE DE DANO MITOCONDRIAL EFETORA Programação irreversível de morte celular	FASE PÓS MITOCONDRIAL
Membrana plasmática e adjacências	Membrana plasmática – Matriz mitocondrial	Todas as estruturas celulares incluindo núcleo
Estímulos apoptogênicos extracelulares: - mutágenos; - drogas citotóxica; - O ₂ reativo; - anóxia; - glucocorticóides - imunoglobulinas; - radiações ionizantes; - hipertermia-ceramidas (produto dos esfingolipídios); - caspases	- incremento da permeabilidade das membranas; - saída de íons Ca ²⁺ da matriz para o citosol (ativador da caspase); - aumento da produção de radicais livres; - aumento do volume mitocondrial (<i>swelling</i>); - ativação das caspases	- saída dos fatores apoptogênicos para o citosol; - destruição das proteínas DNA, RNA; - ativação das caspases e nucleases citosólicas; - citocromo C+ fator Apaf-1, ATP e caspase 9, formando proteosoma; - citocromo C ativa caspase 3 que ativa endonuclease nuclear; - proteínas intermembrana incluem DNAase que degrada dupla hélice: condensação da cromatina; fragmentação de DNA; degradação maciça de proteínas; nucleólisis; citólisis.

Figura 04: Etapas da Apoptose e suas características de acordo com a evolução dos danos mitocondriais. (Fonte: adaptado de DE ARAÚJO et al., 2008)

A Figura 04 apresenta de maneira sintética as etapas da apoptose neuronal que será descrita na sequência do texto. Muito embora, não ocorram mudanças histopatológicas num curto período de isquemia, a deterioração no

estado energético com mudança metabólica ocorre rapidamente, podendo ser observada nos primeiros cinco minutos pós-isquemia (DE ARAUJO et al., 2008; JOHNSTON et al., 2001). A redução da síntese de ATP prejudica o equilíbrio iônico por meio da membrana celular, invertendo as concentrações dos íons gerando edema cerebral (GAGLIARDI, 2000) e a excitotoxicidade é o processo responsável pelo dano da isquemia (DE ARAUJO et al., 2008).

A cascata de eventos tem início com o neurotransmissor glutamato que atua como aminoácido excitatório promovendo a abertura de canais de Ca^{2+} que, em altas concentrações, promove alterações indesejáveis como ativação das fosfolipases A e C, que leva a hidrólise dos fosfolípidios e gera agressão celular (GAGLIARDI, 2000). Os ácidos graxos e o ácido araquidônico são liberados acarretando edema celular por influxo de Na^+ , Cl^- e OH^- , que resulta em sobrecarga osmolar, ativa mensageiros secundários, fosforilação oxidativa e morte neuronal (DE ARAUJO et al., 2008). Neste quadro de excitotoxicidade a produção de radicais livres ultrapassa a defesa antioxidante, gerando lesão na membrana plasmática e no citoplasma neuronal (JOHNSTON et al., 2001).

Após esse evento osmótico, ocorrem na mitocôndria liberação do citocromo C que, associado a outros ativadores das caspases, modifica o transporte de elétrons, perda do potencial transmembrana, alteração do ciclo metabólico de óxido-redução, produção de radicais livres pela cadeia transportadora de elétrons e depleção de ATP, fatos estes que corroboram para a morte celular (DE ARAUJO et al., 2008).

Esta condição fisiopatológica gera uma retroalimentação positiva, ou o chamado Ciclo de Hodkins Positivo, que gera despolarização da membrana, abertura de canais de membrana pelo glutamato e influxo Ca^{2+} . Esse evento é mediado pela membrana plasmática, pelas Ca^{2+} ATPases do retículo endoplasmático e pelos mecanismos de transporte de Ca^{2+} ao nível da membrana plasmática, por transporte ativo, resultando em gasto de ATP. Enzimas celulares envolvidas em processos auto digestivos são ativadas pelo excesso de Ca^{2+} que estimulam uma sequência de reações enzimáticas tóxicas (JOHNSTON et al., 2001) que podem ser explicadas como: danos a fosforilação oxidativa, diminuem

a função mitocondrial e a produção de energia; ativação de fosfolipases que agem nos fosfolípidios contribui para a destruição da membrana neuronal; ativação de proteases pelo Ca^{2+} com produção de radicais livres que agem na membrana fosfolípídica, quebram a membrana e destroem a célula; ativação da óxido nítrico sintetase que acaba por aumentar os níveis de óxido nítrico que produz radicais livres; ativação da proteína quinase C, produz fosforilação de proteínas responsáveis pelos mecanismos de saída de Ca^{2+} (GAGLIARDI, 2000).

As enzimas caspases, aumentadas pelo óxido nítrico, ativadas pelo Citocromo C, que é liberado imediatamente após o episódio hipóxia isquêmica, iniciam e executam a morte celular programada, apoptose (DE ARAUJO et al, 2008).

Simultaneamente, há também a atuação da cascata inflamatória no processo de excitotoxicidade, que é a maior determinante da morte neuronal que segue a isquemia. Diversas evidências experimentais indicam seu envolvimento na patogênese da lesão isquêmica cerebral. A isquemia do SNC aciona a reação inflamatória, que se caracteriza pelo influxo de leucócitos e monócitos, sugerindo o envolvimento de diversas citocinas, principalmente interleucina 6 e fator de necrose tumoral (PRONCIANOY; SILVEIRA, 2001). Os radicais livres, citados acima, agem desordenadamente e induzem necrose e apoptose (DE ARAUJO et al., 2008).

1.2.1.2 Necrose

A necrose é um processo acidental, passivo, onde a morte celular se produz por um dano direto, irreversível, de todas as estruturas celulares, como na isquemia severa (DE ARAUJO et al., 2008). Pode ser definida como morte celular rápida, acidental ou descontrolada caracterizada por inchaço celular e ruptura da membrana levando a uma resposta inflamatória (LU et al., 2014). Após o estímulo lesivo potencialmente grave, ocorre a depleção inicial de ATP, que interrompe a ação de transportadores de membranas plasmáticas, causando influxo de Na^+ e

Cl⁻ acompanhado de aumentos no Ca²⁺ intracelular e água. O aumento subsequente do intracelular resulta em colapso da membrana plasmática e na liberação de conteúdos celulares no espaço extracelular desencadeando a resposta inflamatória (THORNTON et al., 2017; ZHANG et al. 2016). O processo pode terminar em uma neoformação tecidual, a cicatrização, com uma deformação da arquitetura do tecido (DE ARAUJO et al., 2008).

Concluí-se que a morte celular no SNC após lesão pode coexistir apoptose, necrose e formas híbridas ao longo de um continuum de apoptose-necrose. Essas diferentes formas de morte celular têm contribuições variáveis para a neuropatologia resultante da excitotoxicidade e isquemia cerebral (MARTIN et al., 1998).

1.2.2 Estresse oxidativo

Em particular, a formação de EROS, é especialmente tóxica para os neurônio, uma vez que estes radicais livres terão a capacidade de dar continuidade ao processo de lesão neuronal (BAKY et al., 2010). Diversas regiões encefálicas podem ser afetadas pelos eventos isquêmicos, porém a morte de neurônios é importante em áreas encefálicas consideradas suscetíveis, destacando-se o hipocampo e corpo estriado (LEE et al., 2014).

O estresse oxidativo resulta da transferência de um único elétron para a molécula de oxigênio para formar o aniôn superóxido, o que rapidamente se modifica e acaba por produzir as EROS (TURRENS, 2003). A hipóxia é uma das principais etiologias para a formação de EROS mitocondrial. Os neurônios são altamente vulneráveis aos efeitos deletérios do EROS (TERRANEO; SAMAJA, 2017).

1.2.3 Modelo experimental de hipóxia isquêmica encefálica

1.2.3.1 Nitrito de Sódio (NaNO₂)

O NaNO₂ é um sal inorgânico utilizado na fabricação de corantes, tratamento de produtos têxteis, e a no tratamento e cura de carne (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; GONCHAR; MANKOVSKAYA; KLYUCHKO 2006; KOHN et al., 2002;). Tal composto vem sendo utilizado em larga escala como agrotóxico na agricultura contemporânea, e também é usado na fabricação de compostos nitrosos e produtos químicos de borracha (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015). Outros usos frequentes são verificados na composição de fertilizantes e de produtos de pirotecnia (GLUHCHEVAA et al., 2012). Na indústria farmacêutica, o NaNO₂ pode ser utilizado como um vasodilatador, broncodilatador e como antídoto para o envenenamento por cianeto (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; GLUHCHEVAA et al., 2012). De forma que, verifica-se tanto efeitos saudáveis quanto deletérios em seu uso, uma vez que induz a formação de MetHb e pode provocar um tipo de hipóxia anêmica em humanos e também em animais experimentais, como os ratos (GLUHCHEVAA et al., 2012).

O NaNO₂ é uma substância que pode contaminar alimentos e a água potável. Alguns estudos demonstram que os índices de nitrato-nitrito têm aumentado de forma importante, muito além dos limites aceitáveis (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015). De forma que, a exposição humana ao nitrito tem aumentado acentuadamente nos últimos anos, seja devido ao uso extensivo de adubos nitrogenados na agricultura, devido eliminação inadequada dos resíduos domiciliares e industriais ou até pela poluição do ar (GALLOWAY et al., 2003). Dessa forma, tal utilização indiscriminada representa importante papel na poluição ambiental (GONCHAR; MANKOVSKAYA; KLYUCHKO 2006).

1.2.3.2 Efeitos da Intoxicação por NaNO₂

O NaNO₂ quando atinge a corrente sanguínea, tem uma afinidade muito grande com a hemoglobina, causando hipoxemia e afetando a hematopoiese. Assim, ele tende a se agrupar com a hemoglobina, formando a metahemoglobina. Esta condição pode desencadear uma condição clínica conhecida como metahemoglobinemia, na qual há redução na capacidade da hemoglobina em transportar o O₂. A toxicidade do NaNO₂, portanto, se torna uma das principais preocupações médicas voltadas para o paciente nessa condição (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; GLUHCHEVAA et al., 2012; KOHN et al., 2002).

A metahemoglobinemia gerada por doses elevadas de NaNO₂ é importante causador de liberação de EROS. De maneira mais detalhada, entende-se que os nitritos podem estimular a oxidação de íons ferrosos em oxihemoglobina para formar radicais MetHb e superóxido-ânions. Este subproduto será uma fonte de óxido nítrico, que reage rapidamente com superóxidos para formar peroxinitrito, que são altamente reativos. Os metabólitos de EROS podem iniciar uma grande variedade de reações oxidativas tóxicas, acabando por desencadear danos celulares irreversíveis (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; GONCHAR; MANKOVSKAYA; KLYUCHKO, 2006; GLUHCHEVAA et al., 2012).

Estes processos incluem a modificação oxidativa de proteínas, a inibição direta das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, a inativação da atividade dos transportadores de íons sódio e potássio na membrana, aumenta a peroxidação lipídica e distúrbios no sistema de defesa antioxidante (GONCHAR; MANKOVSKAYA; KLYUCHKO, 2006; OZEN et al., 2014).

A hipóxia, capacidade reduzida da hemoglobina em transportar o O₂, induzida por NaNO₂ pode resultar em quadros de cianose. Além disso, pode até colocar o organismo em risco de morte ou até precipitar o aparecimento de outras doenças (ANSARI; ALI; MAHMOOD, 2015; GONCHAR; MANKOVSKAYA; KLYUCHKO, 2006; KOHN et al., 2002).

Entretanto, vale aqui o registro de que existe um efeito vasodilatador do NaNO₂ que pode ter benefício no tratamento da hipertensão pulmonar,

vasoespasma cerebral pós-hemorrágico e pós infarto do miocárdio (GLUHCHEVAA et al., 2012) desde que administrado em doses terapêuticas.

Como o SNC é particularmente suscetível aos efeitos tanto da hipóxia, quanto dos radicais livres, a intoxicação por NaNO₂ pode ser especialmente danosa a este sistema, provocando o quadro de hipóxia isquêmica encefálica (BAKY et al., 2010; KOHN et al., 2002). É possível, que este quadro também cause alterações comportamentais e orgânicas relacionadas ao estresse que o organismo foi submetido, e que repercute com alterações de ansiedade e de depressão (KOHN et al., 2002).

Portanto, o NaNO₂ pode ser aplicado experimentalmente para causar alterações na oxigenação sanguínea e, conseqüentemente, induzir estados de hipóxia anêmica, condição na qual haverá carência de oferta de oxigênio para vários órgãos e tecidos. Particularmente, o SNC poderá ser afetado por esta intoxicação, visto que, seu metabolismo aeróbico exige altos índices de suprimento vascular arterial (BAKY et al., 2010; KOHN et al., 2002).

O excesso de óxido nítrico reage com o superóxido para formar o peroxonitrito, o qual ataca a membrana celular, em sua camada lipídica resultando num processo de lipoperoxidação da membrana e em potenciais danos. Quando este processo ocorre na mitocôndria favorece ainda mais a liberação de mais moléculas de radicais livres (MAITI; SINGH; ILAVAZHAGAN, 2008).

1.2.4 Alterações comportamentais da hipóxia isquêmica encefálica

Como visto anteriormente, os organismos vivos, humanos ou animais reagirão de maneiras diferentes aos quadro de hipóxia isquêmica encefálica, dentre as diferentes formas de reação, decidiu-se investigar, no presente estudo, a influência da música sobre possíveis alterações em variáveis bioquímicas e comportamentais.

A oferta adequada de oxigênio aos tecidos é fundamental para que as células mantenham o metabolismo aeróbico e as funções vitais. Quando a

pressão de perfusão é insuficiente para suportar as necessidades mínimas de oxigênio, há a mudança do metabolismo aeróbico para anaeróbico, com consequentes disfunções orgânicas (PROCIANOY; SILVEIRA, 2001).

Em estudo, com modelo animal, foi realizada a oclusão da artéria cerebral média durante 20 minutos o que produziu alterações em parâmetros de Ressonância Nuclear Magnética, em aspectos histológicos do tecido que sofreu hipóxia, em padrões comportamentais investigados tanto agudamente quanto cronicamente. Até mesmo achados normais no exame de ressonância após a hipóxia isquêmica pode não indicar que o tecido, histologicamente, esteja normal, assim como anomalias comportamentais permanecem. Pode ser observado que disfunções comportamentais persistindo por muito tempo, mesmo quando houve melhora dos padrões das imagens, estavam relacionados com danos histológicos sutis. Juntos, estes resultados podem ajudar a explicar os déficits neurológicos persistentes em pacientes acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório com resultados de exames de imagem normais. Inferindo que os anos macroscópicos podem não corresponder as alterações microscópicas no tecido encefálico (SICARD et al., 2006).

Em outro estudo com modelo animal de oclusão transitória da artéria cerebral média, foi verificada perda progressiva da percepção espacial e memória, assim como redução no potencial de longo prazo do hipocampo. Ainda foi observado aumento da inibição relacionada com neurotransmissores GABA e decréscimo de quinases reguladas por sinais extracelulares no hipocampo. Tais alterações na região hipocampal seriam a justificativa para as perdas cognitivas após hipóxia isquêmica induzida experimentalmente (LI et al., 2013).

As pessoas que sobrevivem aos primeiros estágios do infarto cerebral podem sofrer com sequelas decorrentes do comprometimento neurológico. Isto está associado com alta incidência de déficits das funções sensório-motores e também de habilidades cognitivas (LI et al., 2013; ZHOU et al., 2013). Como consequência destes processos, muitos pacientes com lesão encefálica apresentam alterações comportamentais, tais como transtornos de humor, síndromes depressivas e perdas de memória, com taxa de prevalência variando entre 20 a 50% dos casos (RAGLIO et al., 2015). O transtorno comportamental pode ter impacto negativo na recuperação do indivíduo que sofreu lesão

encefálica por hipóxia isquêmica, influenciando, sobretudo, em sua qualidade de vida e, por vezes, repercutindo negativamente na evolução clínica desses pacientes e impactando em sua qualidade de vida (CHOI; LEE; LIN, 2008).

Alguns déficits cognitivos podem ser observados a curto prazo, logo após a hipóxia ter ocorrido, entretanto, pode-se observar o desenvolvimento de diferentes tipos de demências mesmo após decorridos muitos anos do quadro inicial (LI et al., 2013). Mais relevante é o fato de que, as pessoas que sobrevivem ao quadro de hipóxia cerebral tem o dobro de chance de desenvolver alguma forma de demência, quando comparadas a indivíduos que nunca sofreram tal condição (DOYLE et al., 2015).

A apoptose destaca-se como uma das principais vias que conduzem à morte das células na lesão de isquemia cerebral e quando atinge o hipocampo, por exemplo, é um dos principais agentes promotores de alterações de memória (BAKY et al., 2010; CERBAI et al., 2012; LEE et al., 2014).

Por haver tantos mecanismos de lesão para o insulto isquêmico, até a atualidade não existe um tratamento eficaz para impedir a instalação da hipóxia isquêmica encefálica. Portanto, diversos estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de buscar este tratamento (DE ARAUJO et al., 2008).

1.2.4.1 Aspectos Bioquímicos

1.2.4.1.1 *Estresse*

O estresse pode ser definido, em linhas gerais, como a ruptura real ou antecipada da homeostase de um organismo vivo ou até como a ameaça ao bem-estar de um indivíduo (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). A adaptação ou resposta face ao estresse é ação prioritária para todos os seres vivos. A partir da influência do agente estressor, é ativada a chamada resposta fisiológica ao estresse, que envolve um conjunto eficiente e altamente coordenados de sistemas interligados que visam manter a integridade fisiológica, mesmo diante de circunstâncias desafiadoras e potencialmente perigosas. Esta medida tem por objetivo conservar

a equilíbrio orgânico e aumentar a preservação da espécie diante dos estímulos ambientais (JOËLS; KRUGERS, 2007; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Desta forma, observa-se que a sobrevivência e o bem-estar das espécies requerem respostas fisiológicas apropriadas aos desafios ambientais e homeostáticos. O restabelecimento e manutenção da homeostase implica a ativação coordenada e controlada de sistemas neuroendócrinos e de estímulos autônomos. As respostas ao estresse são mediadas por circuitos neuronais sobrepostos e grande parte dos eventos se desenvolvem no sistema límbico, no hipotálamo e no tronco encefálico e por ativação do sistema nervoso autônomo. A contribuição dos sistemas neuroendócrinos e autonômicos serão desencadeadas de acordo com a modalidade e a intensidade do agente estressor. Além disso, as regiões límbicas que são responsáveis pela regulação das respostas ao estresse se conectam com circuitos responsáveis pela mediação do sistema de recompensa e da formação da memória. Desta forma, proporcionando meio para adaptar a resposta ao estresse em relação à experiência anterior (HERMAN et al., 2003; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

A hipóxia isquêmica encefálica, assim como todas as consequências que podem surgir da intoxicação por NaNO_2 , podem potencialmente, representar um agente estressor para o organismo. E quando submetido a um estímulo estressor, o organismo vivo deflagra a resposta ao estresse, desencadeada pela ativação do eixo HPA. Tal eixo é formado por três estruturas principais: o núcleo para ventricular do hipotálamo, o lobo anterior da glândula pituitária, e a glândula suprarrenal (HERMAN et al., 2003; KOOB, 2008). Em animais humanos ou não, as principais moléculas envolvidas na resposta ao estresse são a adrenalina e os glicocorticóides (ROTLLANT; TORT, 1997; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Três etapas distintas são identificadas na resposta ao estresse. Inicialmente ocorre a produção de catecolaminas, a adrenalina e a noradrenalina (GUEST et al., 2013). Tais moléculas são liberadas da porção medular da glândula adrenal, para a corrente sanguínea, via estímulo desencadeado pelo sistema nervoso autônomo e desencadeiam diferentes respostas no corpo. Como exemplo, pode-se observar que a liberação de adrenalina e noradrenalina provoca aumento na frequência cardíaca e dilatação dos brônquios. De maneira complementar a esta atividade, a secreção de insulina é inibida e a glicogenólise

é estimulada nos músculos e fígado, levando a maior concentração de glicose na corrente sanguínea (DELAUNAY et al., 1997).

Na segunda etapa, por volta de 20 minutos após a resposta inicial, ocorre a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise anterior diretamente na corrente sanguínea, estimulado pela secreção do fator liberador de corticotrofina do núcleo para ventricular do hipotálamo no sistema portal e na eminência mediana do hipotálamo. O ACTH, por sua vez, atinge as glândulas adrenais, estimulando a liberação de glicocorticóides tais como o cortisol do córtex da adrenal. Também há a liberação de vasopressina pelos neurônios parvocelulares do núcleo para ventricular, que produz efeitos sinérgicos sobre a liberação de ACTH que são mediadas pela vasopressina (GUEST et al., 2013; KOOB, 2008; VAN RAALTE et al., 2009).

Ao final, completando o terceiro momento, os glicocorticóides produzem respostas que promovem aumento da gliconeogênese e da lipólise, levando a maiores volumes de glicerol e ácidos graxos na corrente sanguínea (DELAUNAY et al., 1997; GUEST et al., 2013; VAN RAALTE et al., 2009).

O eixo HPA é ainda ligado via feedback negativo dos glicocorticóides circulantes que atuam em duas áreas encefálicas, a saber, o núcleo paraventricular do hipotálamo e o hipocampo. Os neurônios hipofisiotrópicos do núcleo para ventricular são, por sua vez, inervados por inúmeras projeções aferentes, que surgem a partir do tronco encefálico, dos núcleos do hipotálamo e de estruturas límbicas localizadas no córtex frontal e pré-frontal (DELAUNAY et al., 1997; KOOB, 2008).

Portanto, de maneira genérica, compreende-se que as respostas ao estresse agrupam-se em três categorias: primária, secundária e terciária. As respostas primárias são as hormonais, as secundárias são mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos e as terciárias dizem respeito a efeitos que comprometem o desempenho físico e cognitivo da pessoa, provocam alterações comportamentais e acabam por aumentar a suscetibilidade a doenças (BRANDÃO; CARVALHO GOMES; CHAGAS, 2006).

O cortisol, por exemplo, pode ser importante como indicador para a detecção de estresse primário. E os resultados obtidos em testes de laboratório,

com este indicador, podem ser comparados em diferentes espécies animais, visto que, existe ampla literatura a seu respeito. Já para as respostas secundárias, os níveis de glicose e de colesterol sanguíneos podem ser averiguados com facilidade. O lactato também é um bom indicador de estresse, e indica o acúmulo de ácido láctico decorrente do aumento do exercício físico à medida que os animais são expostos a um estressor (BRANDÃO; CARVALHO GOMES; CHAGAS, 2006; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). E quando consideram-se as respostas terciárias poderão ser avaliadas e mensuradas por escalas específicas e testes comportamentais (DRYSDALE et al., 2017).

Assim, fica estabelecido o papel do cortisol (hidrocortisona), como o principal glicocorticóide produzido pelo córtex da glândula suprarrenal (10-20 mg diários), e que está diretamente relacionado a resposta ao estresse, aumento da pressão arterial e da glicose do sangue (devido a liberação de glucagon que provoca), além de, deprimir o sistema imune. Após a síntese, o cortisol passa para a corrente sanguínea onde a maior parte (mais de 60%) encontra-se ligada a proteínas, especialmente a globulina ligante de cortisol e a albumina. O restante encontra-se livre no plasma, que representa a sua forma ativa (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Os glicocorticóides servem para preparar o organismo para desafios fisiológicos ou ambientais e são importantes para a consolidação da resposta ao estresse. A persistência e a intensidade exagerada do estresse, bem como a incapacidade do organismo em terminar sua apresentação, podem tornar o eixo hiperreativo, com prejuízos potenciais ao organismo (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003)

A concentração sanguínea de cortisol não permanece constante durante todo o dia e sua meia vida encontra-se entre 80 a 100 minutos. De forma que, a manutenção da concentração sérica de cortisol depende de síntese permanente. Adicionalmente, o cortisol, como mencionado anteriormente, também estimula a liberação de glucagon que, quando em concentração considerável, eleva os níveis plasmáticos de glicose, antagonizando as ações da insulina, por oposição de vias intracelulares (DELAUNAY et al., 1997).

As alterações bioquímicas mediadas pelo estresse e pelo cortisol podem afetar diferentes órgãos e promover diversas repercussões orgânicas. No que tange o SNC, regiões específicas encefálicas parecem ser afetadas de maneira mais significativa pelo estresse, tanto a nível macroscópico quanto microscópico. Dentre as regiões mais afetadas, incluem-se o hipocampo, a amígdala, o corpo caloso, o córtex encefálico, o cerebelo e o hipotálamo. Também, é possível estabelecer, na literatura, que mudanças morfológicas em muitas das regiões acima relatadas têm sido ligadas ao desenvolvimento de distúrbios psicológicos e comportamentais. De forma que, é possível inferir que, o estresse possa afetar o desempenho funcional dessas áreas, terminando por repercutir em aspectos psicossociais do indivíduo (GUEST et al., 2013; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Tanto os estímulos psicogênicos quanto os sistêmicos são processados em múltiplas estruturas do sistema límbico, incluindo amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal. Essas regiões recebem informações associativas de áreas subcorticais e corticais que estão envolvidas no processamento sensorial de informações superiores e de memória, bem como, informações aferentes ascendentes são processadas, vindo de regiões envolvidas com a atenção e a excitação. De forma que, tais porções do sistema límbico trabalham em paralelo para influenciar a ativação do eixo HPA, e provavelmente desempenham funções semelhantes nas respostas autonômicas ao estresse (HERMAN et al., 2003; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

A amígdala é estruturalmente complexa, com inúmeros alvos a jusante que modulam as respostas de estresse autonômico e neuroendócrino. O núcleo central da amígdala recebeu atenção considerável como um ponto chave para a integração do estresse, dado seu envolvimento na regulação autonômica e sua associação com comportamentos relacionados ao estresse especificamente, respostas ao medo (DAYAS; BULLER; DAY, 1999; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

O hipocampo, que é o tema do presente estudo, é uma região importante envolvida com a regulação de aspectos comportamentais desempenhados pelo eixo HPA. Já foi verificado que, alterações no hipocampo acompanham a hiperatividade do eixo HPA em pessoas e em modelos animais que apresentam disfunções afetivas. E o impacto da subregulação dos receptores para

glicocorticoides no hipocampo parece ser um fator fundamental para a hiperatividade do eixo HPA (CHEN et al., 2015). A estimulação do hipocampo diminui a secreção de glicocorticóides em ratos e seres humanos, ao passo que o dano do hipocampo aumenta induzido pelo estresse e, em alguns casos, secreção basal de glicocorticóides (HERMAN et al., 2003). Notavelmente, os efeitos da lesão são mais pronunciado durante a fase de recuperação da secreção de glicocorticóides induzida pelo estresse, implicando o hipocampo na regulação do término de respostas HPA iniciadas pelo estresse. O hipocampo também influencia o sistema nervoso autonômico. A estimulação do vinda do hipocampo diminui a frequência cardíaca, a pressão arterial e a frequência respiratória em ratos acordados, tais efeitos, são bloqueados por lesões do córtex pré-frontal medial. De forma que, como o hipocampo não possui grandes projeções diretas para o tronco encefálico, suas ações podem ser mediadas por aferências destinadas ao córtex pré-frontal medial (JACOBSON; SAPOLSKY, 1991; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

O córtex pré-frontal medial também é complexo, com diferentes sub-regiões contribuindo para diferentes aspectos das eferências relacionadas ao estresse. O córtex pré-frontal medial pré-límbico inibe preferencialmente as respostas do eixo HPA aos estressores psicogênicos e, como o hipocampo, regula a duração, mas não os níveis máximos de secreção de glicocorticóides, sugerindo envolvimento no término da resposta. Em contraste, o córtex pré-frontal infra límbico está envolvido no início de respostas autônomas e HPA a estímulos psicogênicos. Coletivamente, os dados indicam que os córtices pré-límbicos e infra límbicos têm papéis diferentes na coordenação das respostas ao estresse, com saída do córtex pré-frontal medial dorsal e do córtex pré-límbico que confere a inibição e do córtex infra límbico que confere estimulação. Em virtude de suas interconexões com o hipocampo e a amígdala, o córtex pré-frontal está posicionado no topo da hierarquia de iniciação da resposta e pode ser um coordenador principal, mas não único, límbico de reatividade fisiológica (RESSTEL et al., 2006; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

De forma que parece ser possível, então, com base na literatura, estabelecer uma relação entre estresse, alterações comportamentais e repercussões morfológicas no hipocampo (DAYAS; BULLER; DAY, 1999;

HERMAN et al., 2003; JACOBSON; SAPOLSKY, 1991; RESSTEL et al., 2006; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

1.2.4.1.2 Aspectos Comportamentais (Ansiedade e Depressão)

Define-se ansiedade como o estado emocional transitório e flutuante no tempo, caracterizado por sentimentos subjetivos conscientemente percebidos, tensão, apreensão e pensamentos negativos. Geralmente, é acompanhada por vários sintomas físicos, tais como: ataques ou tremores, tensão muscular, dores de cabeça, sudação, boca seca, dificuldade em engolir, dor abdominal (pode ser o único sintoma de estresse, especialmente em uma criança). Às vezes, outros sintomas como tonturas, taquicardia, taquipnea, diarreia ou necessidade frequente de urinar, fadiga, irritabilidade, diminuição da capacidade de concentração, entre outros (OLAZARÁN-RODRÍGUEZ; AGUERA-ORTIZ; MUÑIZ-SCHWOCHERT, 2012; NIETO-ROMERO, 2017).

A ansiedade, portanto, é um estado psicológico complexo, que pode até apresentar efeitos benéficos em algumas situações. Assim, os transtornos de ansiedade são caracterizados por presença de sentimento desproporcional de medo e de preocupação em resposta a estímulos ambientais ou internos (BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015; ENGIN et al., 2016), e representam uma das desordens mentais mais comuns na sociedade contemporânea (AGETA et al., 2008; JACOBSON; NEWMAN, 2017). A ansiedade pode ser relacionada ao estresse e até pode ser considerada como resposta emocional normal e adequada ao estresse agudo. No entanto, um estilo de vida estressante pode levar ao comportamento ansiogênico patológico que acaba por desestruturar as relações sociais e a saúde das pessoas que sofrem este processo (ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015).

Diferentes denominações são encontradas na literatura sobre pontos importantes relativos a ansiedade. De forma que há distinção entre o traço e o estado de ansiedade. O traço de ansiedade representa uma característica emocional constante que pode se tornar patológica, já o estado de ansiedade pode ser considerada não patológica, representando uma consequência

momentânea a estímulos ansiogênicos. O traço de ansiedade pode ser modulado pela intensidade e frequência dos episódios de estados de ansiedade, de formas que uma predisposição individual poderá desencadear alterações psíquicas importantes, caso haja muitos eventos ansiogênicos repetitivos. De forma que, quando esses sentimentos são exagerados, a pessoa pode não conseguir moderar tais sentimentos, e eles podem interromper o funcionamento normal da vida do indivíduo. Nessa situação, eles poderão ser classificados como transtornos de ansiedade (MEDEIROS et al., 2013).

Os transtornos de ansiedade representam, atualmente, o distúrbio psiquiátrico mais comum na população americana. Entendendo-se, então, que quando muito exacerbada, a ansiedade torna-se um estado patológico no qual ocorrerá reações exacerbadas e respostas desproporcionais a certas situações. Diferentes regiões do encéfalo, especialmente do sistema límbico, estão envolvidas na modulação da expressão do comportamento ansioso (BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015).

Dentre as regiões do sistema límbico que mantém estreita relação com o controle da ansiedade ou com o desenvolvimento de comportamento ansiogênico, destacam-se a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal (BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015; JACOBSON; NEWMAN, 2017; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015). Mais detalhadamente, o giro denteado e a área CA3 do hipocampo, o complexo amigdalóide e a porção medial do córtex pré-frontal (ENGIN et al., 2016). Cada uma dessas regiões compõe a base de neurocircuito que modulam a ansiedade. Há vários mecanismos e neurotransmissores envolvidos na regulação da ansiedade. Porém, o sistema dopaminérgico parece ter um papel central no comportamento ansiogênico (ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015).

A depressão, por sua vez, é uma doença grave que é um dos maiores problemas de saúde do mundo (DOOSTI; AHMADI; FASIHI-RAMANDI, 2017). Trata-se da alteração grave do humor, que pode acompanhar ou aparecer em qualquer fase da vida (FERREIRA et al., 2016). Os sintomas depressivos se manifestam, em seres humanos, com sentimentos de tristeza, de sobrecarga ou de desesperança (SÁNCHEZ, 2014). No entanto, há muita dificuldade semântica de se conceituar a depressão, já que o termo é aplicado para designar um

determinado sentimento ou sintoma; para especificar um complexo de sintomas ou para designar uma entidade nosológica definida (BECK; ALFORD, 2016).

Como outros distúrbios neuropsiquiátricos, a depressão não é uma doença unitária, mas sim uma síndrome heterogênea que abrange sintomas variados que ocorrem concomitantemente e que apresentam respostas divergentes ao tratamento. Trata-se de uma síndrome clínica heterogênea que envolve várias centenas de combinações únicas de mudanças no humor, de apetite, do sono, da energia, da cognição e até da atividade motora (DRYSDALE et al., 2017).

Existe forte relação, sobreposição e coincidência entre as características e mecanismos que ocorrem tanto na ansiedade quanto na depressão. De forma que, a depressão aparece como relato recorrente em indivíduos que sofrem de transtornos de ansiedade e o contrário também é observado (AGETA et al., 2008; JACOBSON; NEWMAN, 2017). Isso ocorre até mesmo porque as áreas corticais que são críticas para a fisiopatologia da depressão são praticamente as mesmas que modera as reações de ansiedade. Inclusive, estruturalmente, a diminuição do volume hipocampal parece estar relacionada com episódios de depressão (BERNASCONI et al., 2015; BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015). Alterações semelhantes foram encontrados no giro cingulado anterior, amígdala e córtex pré-frontal (BERNASCONI et al., 2015).

Depressão e lesão encefálica são experiências partilhadas por muitos pacientes e, em geral, geradoras de dificuldades, especialmente para a qualidade de vida dos que as vivenciam, também para a efetivação da compreensão diagnóstica e, conseqüentemente, de propostas de tratamento e de reabilitação (DONATTI et al., 2017). Já o comportamento sugestivo de depressão e de ansiedade, em ratos, podem ser verificados experimentalmente por meio do teste de nado forçado (DOOSTI; AHMADI; FASIHI-RAMANDI, 2017) e do labirinto em cruz elevado (DONATTI et al., 2017), respectivamente.

O estresse parece ser um dos principais fatores ambientais que predisõem um indivíduo à depressão. Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, principalmente de origem psicossocial. Além disso, a conhecida influência de fatores genéticos no desenvolvimento da depressão poderia ser decorrente de um

aumento da sensibilidade a eventos estressantes (DOOSTI; AHMADI; FASIHI-RAMANDI, 2017).

Em pacientes deprimidos, o controle inibitório da atividade do eixo HPA parece estar comprometido. Eles podem apresentar níveis basais elevados de cortisol e não responderem ao teste de supressão com o corticosteroide sintético dexametasona. O envolvimento do eixo HPA na neurobiologia da depressão é apoiado, ainda, pela observação de que indivíduos com síndrome de Cushing apresentam déficits cognitivos e alterações na estrutura e função hipocampais, semelhantes às encontradas em pacientes deprimidos (BERNASCONI et al., 2015; BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015).

A maior parte dos modelos animais de depressão, como o nado forçado e o desamparo aprendido, avalia o desenvolvimento de alterações comportamentais e fisiológicas em resposta à pré-exposição a evento estressante inescapável (BERNASCONI et al., 2015; JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003)

Estes dados indicam que eventos estressantes teriam um efeito neurotóxico sobre o hipocampo, provavelmente mediado pelo aumento de glicocorticóides, predispondo ao desenvolvimento da depressão (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003)

Finalmente, resta o desafio de entender como os novos neurônios gerados melhorariam o quadro depressivo e, numa perspectiva maior, como as funções do hipocampo se relacionariam com a depressão (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003)

A exposição a fatores estressantes tem papel importante, por exemplo, no desenvolvimento de transtornos depressivos. Os mecanismos envolvidos nesta relação, no entanto, ainda são pouco conhecidos, mas algumas evidências sugerem a participação da formação hipocampal: 1. o estresse pode causar alterações plásticas no hipocampo, que incluem remodelação dendrítica e inibição de neurogênese. Drogas antidepressivas impendem estes efeitos, possivelmente por aumentarem a expressão de fatores neurotróficos; 2. a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica no hipocampo atenua consequências comportamentais do estresse e produz efeitos antidepressivos em modelos animais; 3. o antagonismo do principal neurotransmissor excitatório no

hipocampo, o glutamato, produz efeitos semelhantes; 4. o hipocampo parece estar “hiperativo” em animais mais sensíveis em modelos de depressão e em humanos resistentes à antidepressivos; 5. o hipocampo, em conjunto com o complexo amigdalóide, parece ter papel fundamental na consolidação e evocação de memórias aversivas. Não obstante estas evidências, o desafio futuro será o de tentar integrar os resultados destes diferentes campos (farmacológico, molecular, eletrofisiológico, clínico) em uma teoria unificadora sobre o papel do hipocampo na regulação do humor e seus transtornos bem como nos efeitos de tratamentos antidepressivos (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003)

1.3 FORMAÇÃO HIPOCAMPAL

1.3.1 Anatomia e Histologia

O hipocampo é uma das estruturas que compõem o sistema límbico e é vital para a função cognitiva e de humor (SAMUELS; HEN, 2011). Além do hipocampo, são componentes do sistema límbico os giros para-hipocampais, o giro denteado, o giro cingulado, o complexo amigdalóide, os núcleos anteriores do tálamo, o hipotálamo e o giro para-terminal. Esta formação complexa encefálica, atua regulando as principais atividades cognitivas e emocionais dos animais (HATTIANGADY; SHETTY, 2012).

Dentre todas estas estruturas, a formação hipocampal destaca-se pode ser anatomicamente fácil de ser identificado, ou seja, apresenta estrutura macroscópica e microscópica singular, de forma que em estudos e análises histológicas ele frequentemente é selecionado para a pesquisa (EL FALOUGY; BENUSKA, 2006; SCORZA et al., 2005).

Essa denominação, hipocampo, tem origem na semelhança desta estrutura com um cavalo marinho (hipocampo, em grego), quando visualizado na porção inferior do corno dos ventrículos laterais. Está localizado na porção ventral profunda do lobo temporal. Na formação hipocampal são identificadas seis diferentes estruturas, a saber, o hipocampo propriamente dito, o giro denteado, o complexo subicular (subiculum propriamente dito, pré-subiculum e

parasubiculum) e o córtex entorrinal (AGSTER; BURWELL, 2013; EL FALOUGY; BENUSKA, 2006).

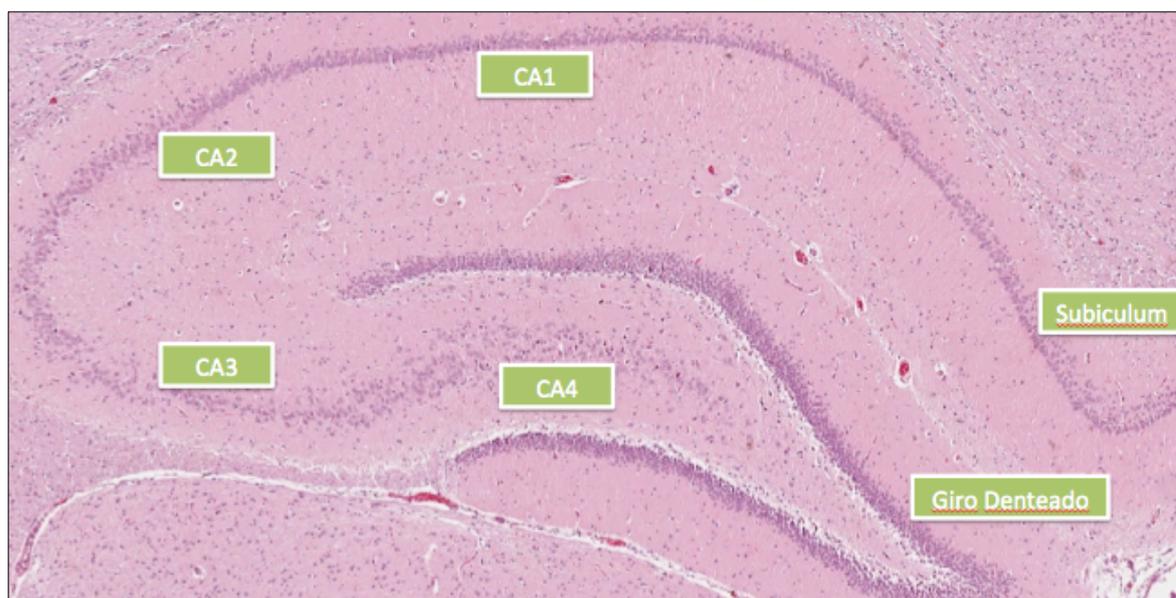


Figura 05 – Imagem histológica das principais áreas identificáveis da formação hipocampal de ratos Wistar. Destacam-se o Corno de Amon com suas regiões CA1 a CA4, o Subiculum e o Giro Denteado. Corno de Amon 1 a 4 (CA1; CA2; CA3; CA4) (Fonte: RIBEIRO et al., 2017).

Em relação a estrutura histológica, o hipocampo é formado por três camadas de células (alocórtex) em forma de U, que vertem umas sobre as outras. De forma que, como pode ser visualizado na Figura 05, anatomicamente, destacam-se duas regiões, o Corno de Amon (CA) e o giro denteado (BOCCARA et al., 2015). O Corno de Amon, também denominado de hipocampo propriamente dito é subdividido em 4 regiões, nomeadas de CA1 a CA4 (EL FALOUGY; BENUSKA, 2006; O'MARA et al., 2001). Já o giro dentado é dividido em três camadas: a camada molecular, a camada de células granulares e a camada polimórfica (BOCCARA et al., 2015; SCORZA et al., 2005).

A região CA1 é a continuação do natural do subiculum, sendo os corpos celulares de seus neurônios piramidais relativamente pequenos. Por sua vez, CA2 possui neurônios densamente agrupados que são grandes e ovóides. Já na região de CA3 os corpos dos neurônios piramidais são semelhantes aos de CA2, mas a densidade é menor; se estendendo ao longo da região curvada do Corno de Amon até inserir-se na concavidade do giro denteado. E, finalmente, CA4 encontra-se inserido dentro da concavidade do giro denteado, seus corpos

neuronalis são ovóides, grandes, pouco numerosos e espalhados entre as fibras musgosas e grandes fibras mielínicas características dessa região (BOCCARA et al., 2015; EL FALOUGY e BENUSKA, 2006; O`MARA et al., 2001).

O giro denteado (GD) surge no meio da estrutura do hipocampo propriamente dito como uma delgada lâmina, e sua concavidade voltada para a região dorsal (ou superior). Como citado anteriormente, a curvatura côncava do GD envolve a região CA4 do Corno de Amon. E está separado dos setores CA1, CA2 e CA3 pelo sulco hipocampal e por formações arteriais e venosas que frequentemente seguem a rota original do sulco hipocampal (AGSTER; BURWELL, 2013; DUVERNOY, 1988).

Em relação as demais partes que compõem o hipocampo, verifica-se que na porção distal do estrato radiado de CA1 é encontrado o limite entre o Corno de Amon e o subículum. O subículum é dividido em quatro sub-regiões, a saber, pró-subículo, que é a continuidade de CA1; subiculum propriamente dito, que pode parecer parcialmente encoberto pelo giro denteado; pré-subiculum, caracterizado por pequenos neurônios piramidais superficiais agrupados; parasubículo, que contorna a margem do giro parahipocampal para a área entorrinal. Já a área do córtex entorrinal é mal delimitada, podendo ser localizado entre o uncus e região anterior do giro parahipocampal (BEZERRA, 2017; O`MARA et al., 2001).

1.3.2 Aspectos Fisiológicos Gerais

As diferentes esferas cognitivas, emocionais e comportamentais dos seres humanos e dos animais são mediadas por estruturas do sistema límbico, do córtex pré-frontal e de suas vias subcorticais (BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015). Pertencente ao sistema límbico, ao hipocampo são classicamente atribuídas as funções de aprendizagem e de memória. Há ainda relatos científicos de que a formação hipocampal pode influenciar em comportamentos relativos ao apetite e a saciedade e também participa do controle das emoções (DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2017; EL FALOUGY; BENUSKA, 2006).

Embora tradicionalmente relacionado a processos cognitivos como aprendizado e memória, o hipocampo está envolvido com a resposta ao estresse.

Ele é ativado por diferentes estressores e participa do processamento de informações sobre eventos ameaçadores. O hipocampo possui grande densidade de receptores para glicocorticóides que, quando ativados, inibem a atividade do eixo HPA, limitando a resposta ao estresse. Além disso, ele também pode se tornar um alvo para os efeitos deletérios do estresse (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003).

Já o setor CA2, que é bastante proeminente e distinto no hipocampo humano, tem papel ainda não muito bem definido, mas é provável que desempenhe funções importantes, uma vez que possui alta celularidade e vascularização (DUVERNOY, 1988; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015).

Tanto a região do hipocampo ventral quanto a do dorsal, estabelecem diversas aferências e eferências, com distintas estruturas encefálicas, assim como, cada qual apresenta receptores específicos em sua formação, que respondem há diferentes neurotransmissores e que conseqüentemente desempenham, funções determinadas (GRIGORYAN; SEGAL, 2016). De tal forma que, pode-se compreender a formação hipocampal como uma região chave na mediação de respostas de estresse e ansiedade. Esta capacidade é possível devido a intrincadas conexões recíprocas estabelecidas com a amígdala e com o córtex pré-frontal (ONO; KOIZUMI; ONOZUKA, 2015). Mais profundamente, verifica-se que o hipocampo desempenha papel relevante na mediação da ansiedade e do medo, havendo, inclusive, áreas bem específicas e distintas responsáveis por respostas relacionadas a eles (ENGIN et al., 2016).

1.3.3 Neurogênese no Hipocampo

Os estudos sobre as células e suas funções foram se desenvolvendo com o passar dos anos com a evolução tecnológica. Durante muitos anos, foi predominante e quase pétrea a ideia de que o sistema nervoso de indivíduos adultos era imutável, sem a possibilidade de que houvesse o nascimento de novos neurônios. No entanto, com o surgimento de novas técnicas de microscopia, foi possível verificar que ocorre neurogênese na fase adulta. Portanto, depois de mais de um século de estudos e muita resistência quanto à

existência do fenômeno, hoje a neurogênese em encéfalos adultos é um fato amplamente aceito pelos neurocientistas (DA SILVA, 2009).

O hipocampo é uma área do cérebro conhecida por apresentar plasticidade e capacidade de neurogênese (SAMUELS; HEN, 2011). De forma que trata-se de uma região onde é possível verificar neurogênese, mesmo em estágios avançados da vida do indivíduo. Tal capacidade é descrita como vital para funções como humor e memória (SAMUELS; HEN, 2011; SNYDER et al., 2011).

Fatores neurais, endócrinos e ambientais podem interferir nos processos de neurogênese, agindo no sentido de aumentar ou diminuir a produção de novos neurônios em pessoas adultas (GOLD et al., 2009). Certas condições, por exemplo, propiciam a produção de novas células no hipocampo. Tanapat et al., 1999 mostraram que ratas submetidas ao procedimento de ovariectomia, visando eliminar a produção de estrógenos, apresentam menor número de células em proliferação marcadas com Bromodesoxiuridina (BRDU).

Já a elevação nos níveis de glicocorticóides, hormônios que têm seus níveis alterados em virtude de experiências estressantes como a exposição ao odor de um predador natural, pode diminuir a taxa de proliferação de células granulares do giro denteado do hipocampo de ratos, possivelmente por meio de um mecanismo que envolve a liberação e o acúmulo de glutamato no hipocampo (GOLD et al., 2009).

Dessa forma, a neurogênese no hipocampo, regulada por diferentes variáveis ambientais, reforça a ideia de que a produção de novos neurônios não faz parte de vestígios dos estágios iniciais de desenvolvimento do sistema nervoso, mas constituem um recurso neural notadamente flexível e adaptativo também na idade adulta (DA SILVA, 2009).

1.3.4 Lesões Hipocampais: Etiologia e Repercussões

Lesões hipocampais associada à neurodegeneração podem advir de múltiplas causas, incluindo lesão na cabeça, isquemia, convulsões agudas e estresse grave (HUH; WIDING; RAGHUPATHI, 2011) bem como pelo processo fisiológico de envelhecimento (BOBINSKI, 1999; MUELLER; WEINER, 2009;

SMALL et al., 2011). A atrofia hipocampal, por exemplo, tem sido relacionada a ocorrência de diversas doenças, sendo a mais expressiva a doença de Alzheimer. Mas também, pode aparecer, na esquizofrenia, na síndrome de estresse pós-traumático, na depressão e no transtorno bipolar, dentre outras (CZÉH et al., 2015).

Embora a etiologia das lesões na formação hipocampal possam ser bem diversa, o estresse crônico parece induzir mudanças em propriedades elétricas neuronais no hipocampo, de forma a prejudicar a memória e também influenciando em comportamento ansiogênico (ONO; KOIZUMI; ONOZUKA, 2015). Outra condição que pode afetar a função hipocampal é a hipóxia isquêmica encefálica (HUANG et al., 2015). As consequências da diminuição da oferta de oxigênio e glicose, decorrentes deste processo desencadeiam estresse metabólico celular, processo inflamatório local e pode levar até a degeneração celular (BARRETO et al., 2011).

A formação hipocampal e as células de Purkinje do cerebelo são exemplos de células altamente sensível a hipóxia (HUANG et al., 2015). O hipocampo pode ser atingido por situações de hipóxia isquêmica encefálica, tanto agudas quanto crônicas (LEE et al., 2014; ZHANNING et al., 2016). E as sequelas de tais lesões podem provocar alterações de memória e de comportamento (HUANG et al., 2015; ZHANNING et al., 2016).

A exposição a estressores significantes induz remodelamento dendrítico em células piramidais hipocampais e diminuição da neurogênese no giro denteado do hipocampo de animais de laboratório, incluindo primatas (GOULD et al., 1999; TAPANAT et al., 2009). Estas alterações parecem ser mediadas pelo aumento de corticosteroides que acompanha os eventos de estresse, já que a remoção das adrenais previne a inibição da neurogênese induzida pelo estresse (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003)

Em humanos, níveis elevados de cortisol durante a vida predizem atrofia hipocampal e têm sido relacionados à diminuição hipocampal e aos déficits cognitivos observados em pacientes deprimidos. Drogas antidepressivas poderiam prevenir a atrofia hipocampal nesses indivíduos (GOULD et al., 1999; JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar as alterações histológicas hipocampais e cerebelares e possíveis repercussões comportamentais e bioquímicas provocadas pela Sonata de Mozart em animais sem e com hipóxia isquêmica encefálica induzida experimentalmente por NaNO₂.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da Sonata de Mozart no comportamento de locomoção espontânea, ansiedade e depressão de animais sem e com hipóxia isquêmica encefálica induzida por NaNO₂.
- Analisar variações biométricas relativas ao peso dos encéfalos dos animais com e sem o protocolo de musicoterapia e a hipóxia isquêmica encefálica.
- Observar os possíveis efeitos bioquímicos estressores promovidos pela lesão encefálica por meio da análise dos níveis de cortisol, glicose, colesterol e lactato de ratos, após terem recebido o NaNO₂ e o protocolo de musicoterapia.
- Analisar os aspectos histológicos, por meio da contagem de células saudáveis e de células com sinais de lesão do hipocampo e do cerebelo nas condições experimentais previamente mencionadas.

3 METODOLOGIA

O estudo experimental foi realizado no Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília (UnB). Todos os procedimentos obedeceram aos critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, de acordo com o protocolo UnBDoc n° 67736/2014 (ANEXO).

3.1 AMOSTRA

Ratas Wistar (n=36), *Rattus norvegicus*, fêmeas, foram fornecidas pelo Laboratório de Ciências Naturais do Centro Universitário de Brasília (LABOCIEN – UniCEUB). Os animais tinham um mês no início do experimento, pesando em entre 60-80 gramas, e foram submetidas ao processo experimental por três meses. Os animais foram alojados em grupos de no máximo 6 ratas por caixa (gaiolas de polipropileno 41 x 34 x 16 cm), mantidas em ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração adequada para esses tipos de roedores, marca Purina® e água de torneira *ad libitum*, exceto no período das sessões de teste, período entre 8:00-10:00 e 16:00-18:00 horas. E em condições controladas de temperatura (23°C) e umidade (55 %). A amostra foi dividida em seis grupos com seis animais em cada. A distribuição dos animais encontram-se na Figura 06.

Grupo	Número de animais (n)	Protocolo de experimento aplicado ao grupo
Controle (GC)	6	Animais controle, sem hipóxia isquêmica encefálica (HIE) e sem musicoterapia (MT).
Hipóxia (GH)	6	Animais que sofreram HIE.
Música Aguda (GMa)	6	Animais que receberam MT aguda.
Hipóxia + Música Aguda (GHMa)	6	Animais que sofreram HIE e receberam MT aguda.
Música Crônica (GMc)	6	Animais que receberam MT crônica.
Hipóxia + Música Crônica (GHMc)	6	Animais que sofreram HIE e receberam MT crônica.

Figura 06: Apresenta a distribuição da amostra composta por 36 Ratas Wistar nos grupos do experimento. GC: grupo controle; GH: grupo hipóxia; GMa: grupo protocolo de música aguda; GHMa: grupo hipóxia + protocolo de música aguda; GMc: grupo protocolo de música crônica; GHMc: grupo hipóxia + protocolo de música crônica; HIE: hipóxia isquêmica encefálica; MT: protocolo de musicoterapia. (Fonte: a autora)

3.2 PROTOCOLO DE MUSICOTERAPIA

Uma sala foi padronizada para tocar a Sonata de Mozart para dois Pianos (K. 448), em intensidade uniformizada do som com decibelímetro em nível sonoro médio de 65 db. O aparelho de som era mantido em uma posição, de tal forma que todas as caixas ficavam a uma mesma distância (aproximadamente 50 cm de distância, conforme demonstrado abaixo na Figura 07) a fim de garantir a mesma intensidade de som para todos os sujeitos experimentais. A Sonata está escrita em três movimentos: *Allegro con spirito*; *Andante* e *Molto Allegro* e apresentada na tonalidade de Ré Maior.

O arquivo da Sonata de Mozart para dois pianos (K. 448) esteve no formato MP3, e a duração do arquivo original que era de 22 minutos e 3 segundos, foi adaptado para ter duração de 2 horas, o que necessitou ser repetido 5 vezes e meia, no mesmo arquivo. O arquivo foi salvo em um Pen Drive, para ser adaptado em um aparelho emissor de som com entrada USB.

Para o protocolo de musicoterapia a Sonata era tocada por 4h alternadas, 2h no período da manhã e 2h no período da tarde (intervalo de 12h), separada nos três movimentos que compõem a Sonata (TASSET et al., 2012). O tratamento musical foi realizado nos animais com 1 mês e repetidos ao completarem 2, 3 e 4 meses, durante 4 dias consecutivos após completarem cada idade (tratamento agudo) ou diariamente durante 4 meses (tratamento crônico). Os testes experimentais eram realizados quando os animais completavam cada idade. Os animais controles do estudo não receberam a musicoterapia.



Figura 07: Disposição do aparelho de som e caixas dos animais que receberiam a Sonata de Mozart em uma intensidade de 65 db. (Fonte: a autora)

3.3 EXPOSIÇÃO AO NITRITO DE SÓDIO

A indução da hipóxia foi realizada com a aplicação de NaNO_2 , com o objetivo de reduzir a capacidade do oxigênio de ser carregado para o sangue, pela mudança normal da hemoglobina em MetHb. Ele foi administrado por via intraperitoneal, na dose de 60 mg/Kg, administrada aos 3 meses de idade, durante 15 dias consecutivos (BAKY et al., 2010; RIBEIRO et al., 2017). Animais na mesma idade, que não receberam a injeção de NaNO_2 , serviram de controles para as nossas investigações.

3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Durante os experimentos foram realizados testes comportamentais e coletados dados biométricos, amostras bioquímicas e histológicas. Os testes comportamentais foram realizados em dois momentos, em todos os grupos: o primeiro quando os animais tinham três meses de idade e repetidos após um mês (segundo momento) quando os animais já haviam sofrido a hipóxia isquêmica encefálica e recebido musicoterapia, de acordo com o grupo ao qual pertencesse. Ao final dos experimentos comportamentais, foram coletados os encéfalos e as amostras sanguíneas para avaliações bioquímicas e histológicas.

3.5 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS E COGNITIVAS

3.5.1 Atividade Locomotora Espontânea

Para este teste, foi utilizada uma arena em madeira (60x60x35 cm), onde o chão encontrava-se dividido em 9 quadrantes de 20x20 cm (Figura 08). Cada animal era posicionado inicialmente no quadrante central da arena, sendo considerada atividade locomotora quando ele colocava as quatro patas em um novo quadrante. A atividade locomotora foi mensurada durante 5 minutos, de acordo com o número de quadrantes percorridos pelo animal (ENGIN, 2016; BEZERRA, 2017).

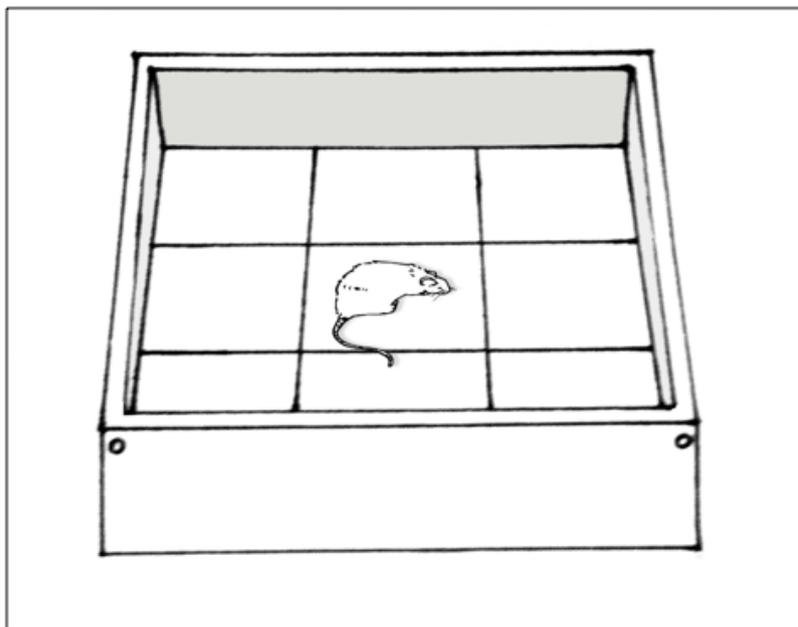


Figura 08 – Arena para teste do Campo Aberto 9 (Open Field) dividida em 9 quadrantes para avaliar a atividade locomotora dos ratos. O animal era posicionado no centro da arena para posteriormente explorá-la por 5 minutos (Fonte: Bezerra, 2017).

3.5.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Este é um teste validado para se investigar ansiedade, no que concerne o comportamento ansiolítico ou ansiogênico (ENGIN, 2016; DONATTI et al., 2017). O LCE (Figura 09) é um equipamento em madeira, na forma de cruz, elevado 50 cm do chão, com dois braços fechados (50x10x40 cm) e dois abertos (50x10 cm), opostos entre si (HANDLEY; MITHANI, 1984). Uma proteção de acrílico transparente de 1 cm de altura, circundava os braços abertos para impedir a queda dos animais do LCE. O animal foi colocado no centro do labirinto, individualmente, com a face voltada para um dos braços fechados sendo, em seguida, avaliado o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados durante cinco minutos. Cada entrada foi computada quando o animal deslocava com as quatro patas para a direção de um dos braços, o efeito ansiogênico era caracterizado por uma frequência ou tempo de permanência aumentada nos braços fechados, enquanto o efeito ansiolítico é caracterizado pela frequência ou tempo de permanência maior nos braços abertos (PELLOW et al., 1985; SCHEIDT, 2015; BEZERRA, 2017). Após a avaliação de cada animal na

arena e no LCE os aparatos eram limpos com álcool 10%, com o objetivo de minimizar o odor do rato previamente testado (RIBEIRO et al., 2017).

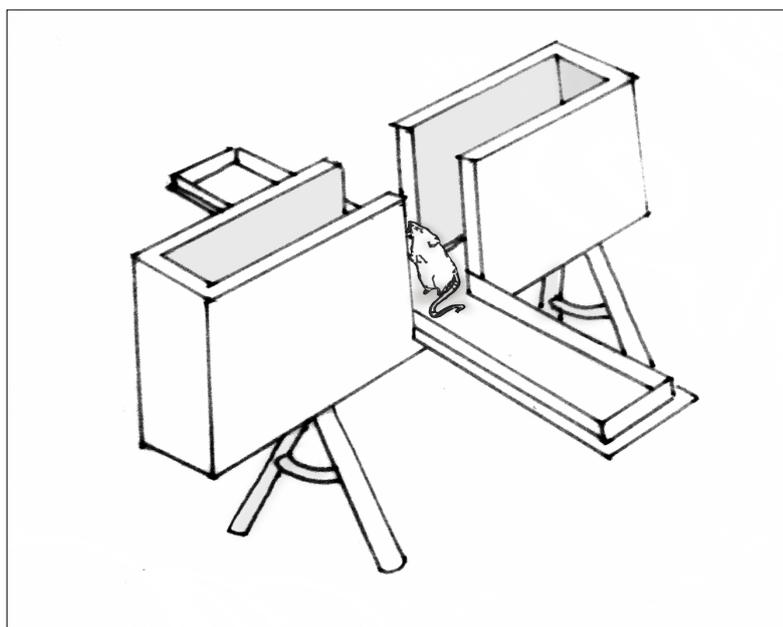


Figura 09 – Teste do Labirinto em Cruz Elevado utilizado para avaliar o comportamento de ansiedade/estresse dos ratos. O primeiro passo era colocar o animal no centro do labirinto para poder escolher percorrer pelos braços abertos ou fechados durante um período de 5 minutos (Fonte: Bezerra, 2017).

3.5.3 Teste do Nado Forçado

Este teste busca por evidências de comportamento sugestivo de depressão (DEEP et al., 2016; DOOSTI; AHMADI; FASIHI-RAMANDI, 2017). O aumento do tempo de imobilidade é um sinal típico de comportamento depressivo (CHEN et al., 2015; ONO; KOIZUMI; ONOZUKA, 2015). Os animais foram colocados em um cilindro Plexiglass, com 50 cm de água (Figura 10) à temperatura de aproximadamente $22 \pm 1^\circ\text{C}$, onde seus comportamentos foram observados durante cinco minutos (O'CONNOR et al., 2009). Eles podiam exibir dois tipos de comportamentos em um tempo de cinco minutos: fuga, normalmente verificada nos dois primeiros minutos, tempo necessário para habituação ao teste; imobilidade, nos três últimos minutos restantes, quando o animal permanecia flutuando, com somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água. Um declínio no tempo de imobilidade é uma demonstração das propriedades antidepressivas (DOOSTI; AHMADI; FASIHI-RAMANDI, 2017).

Após este período os animais foram retirados da água, secos com uma toalha e devolvidos para suas gaiolas (ONO; KOIZUMI; ONOZUKA, 2015; RIBEIRO et al., 2017).

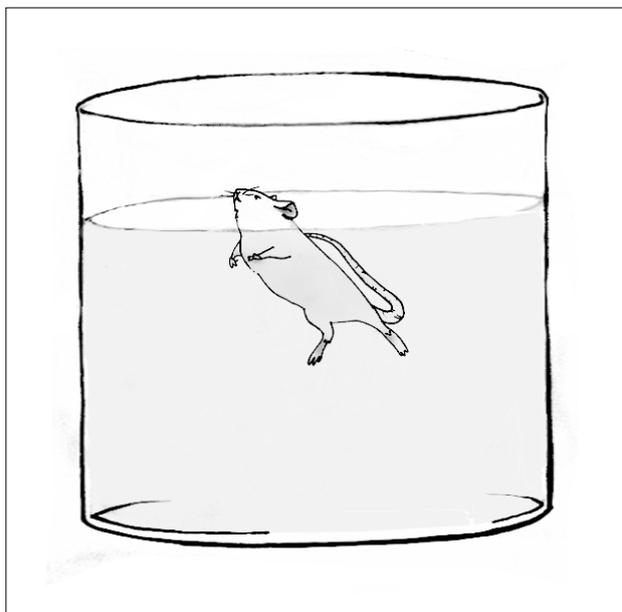


Figura 10 -Teste do Nado forçado, onde os animais permanecem dentro do tanque por um tempo total de 5 minutos, onde os 2 primeiros minutos eram para habituação (Fonte: Bezerra, 2017).

Todos os experimentos foram conduzidos entre 8:00 e 12:00 horas, com o objetivo de evitar as variações circadianas que poderiam interferir com os resultados experimentais. Os testes foram considerados cegos, pois foram realizados por avaliador previamente treinado, que desconhecia a que grupo pertencia o animal.

3.6 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Ao final das análises comportamentais, os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg) + xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal (FIGURA 11), e tiveram as amostras sanguíneas coletadas por punção cardíaca e, em seguida, eles foram decapitados em guilhotina. Em seguida, foi realizada a craniotomia para a remoção do encéfalo. Com a ajuda de uma pinça, os ossos parietais foram afastados a partir da sutura sagital e o encéfalo foi então removido

utilizando-se uma espátula curva. Este procedimento não ultrapassou 3 minutos para que o mesmo não sofresse hipóxia/isquemia indesejada.



Figura 11: Imagem de rata Wistar anestesiado após 2º ciclo de testes comportamentais. (Fonte: a autora)

As principais etapas do experimento de cada grupo são apresentadas nas Figuras 12 a 17, mostrando, de maneira esquemática, os procedimentos comportamentais, a coleta de amostras biológicas sanguíneas até a coleta do encéfalo dos animais.

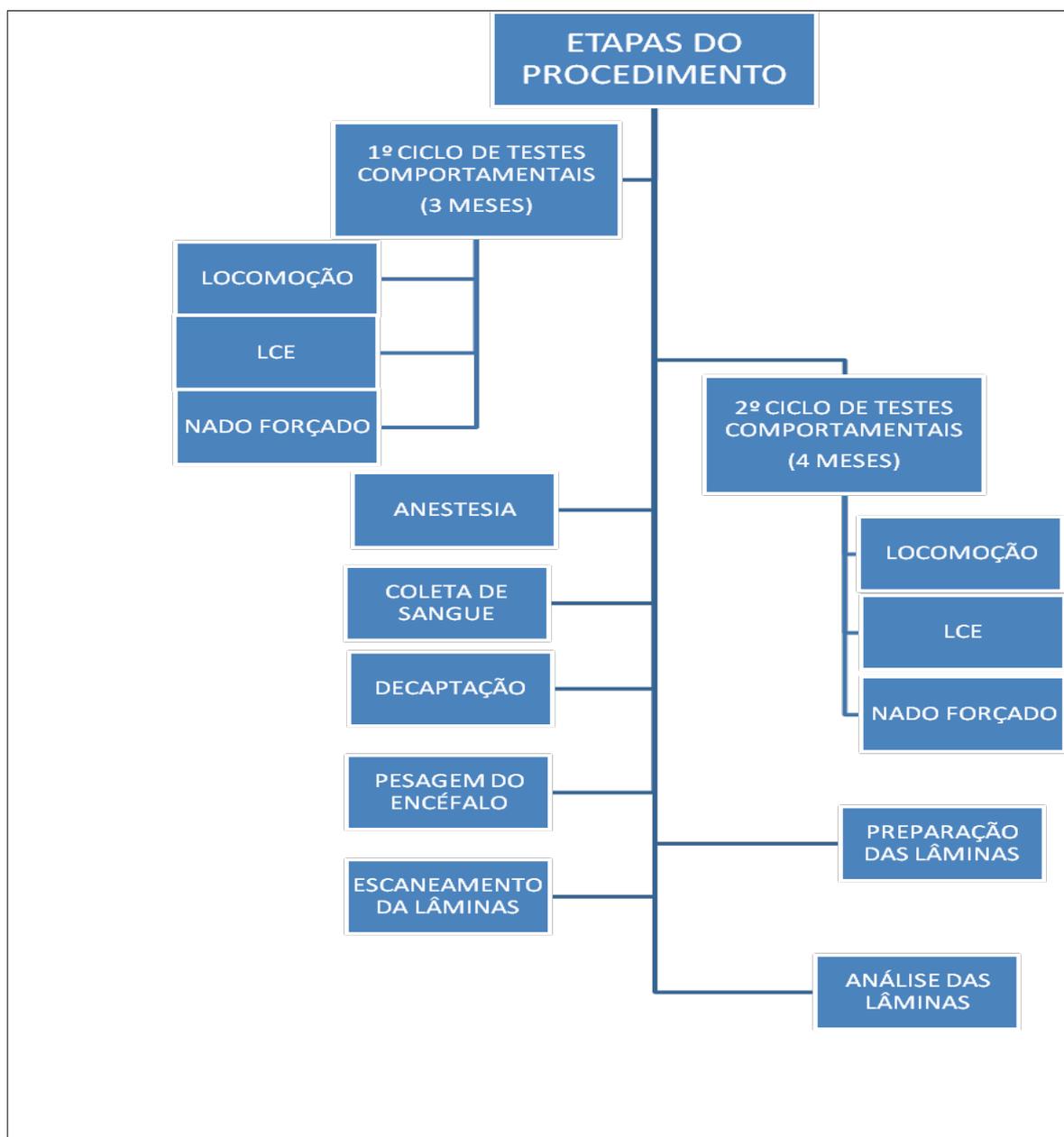


Figura 12 – Fluxograma que sintetiza as principais etapas do experimento do grupo controle (GC), desde o momento pré hipóxia até a preparação das lâminas histológicas. (Fonte: a autora)

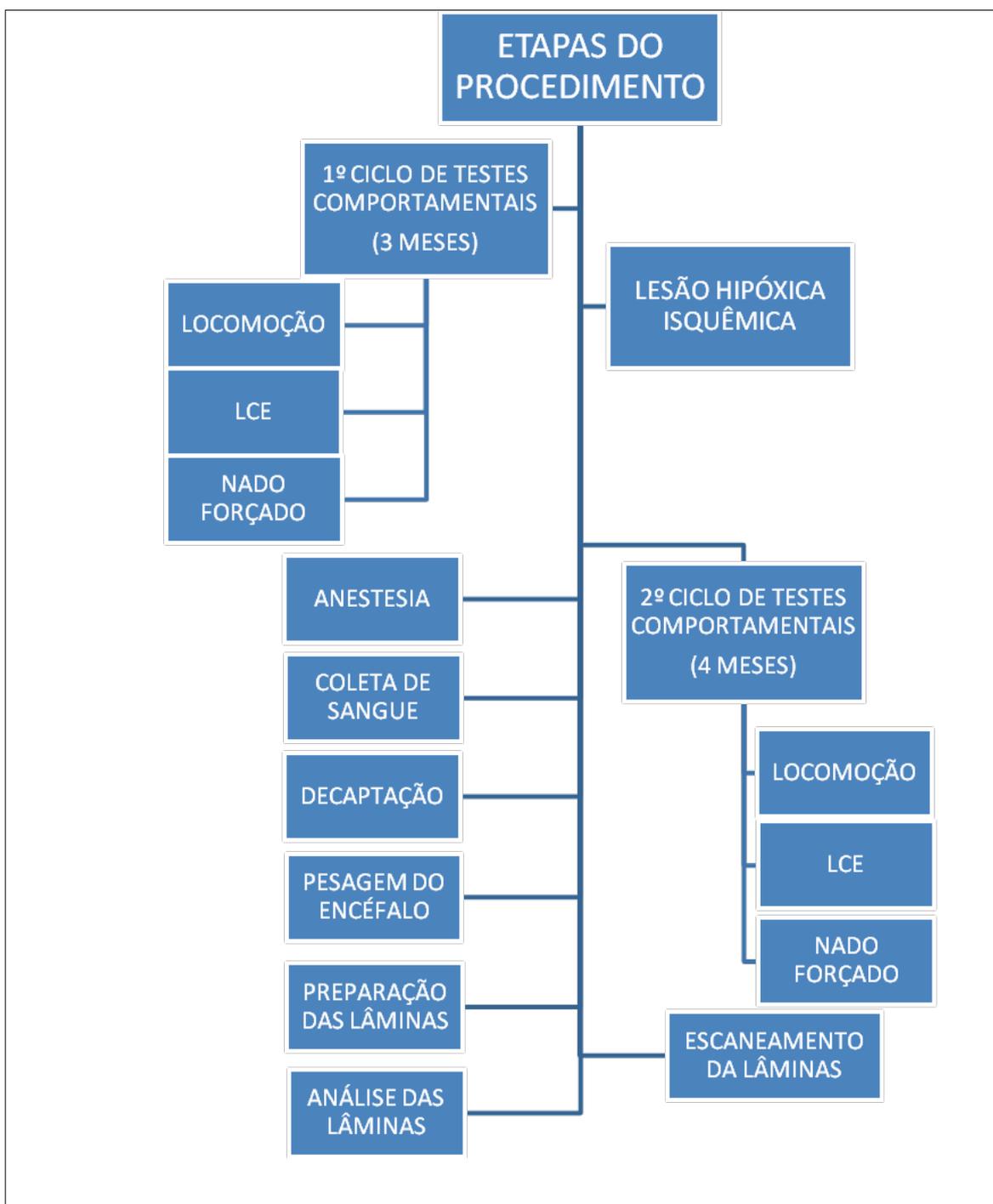


Figura 13 – Fluxograma que sintetiza as principais etapas do experimento do grupo que sofreu hipóxia isquêmica encefálica induzida experimentalmente pelo NaNO₂ (60 mg/Kg) (GH), desde o momento pré hipóxia até a preparação das lâminas histológicas. (Fonte: a autora)

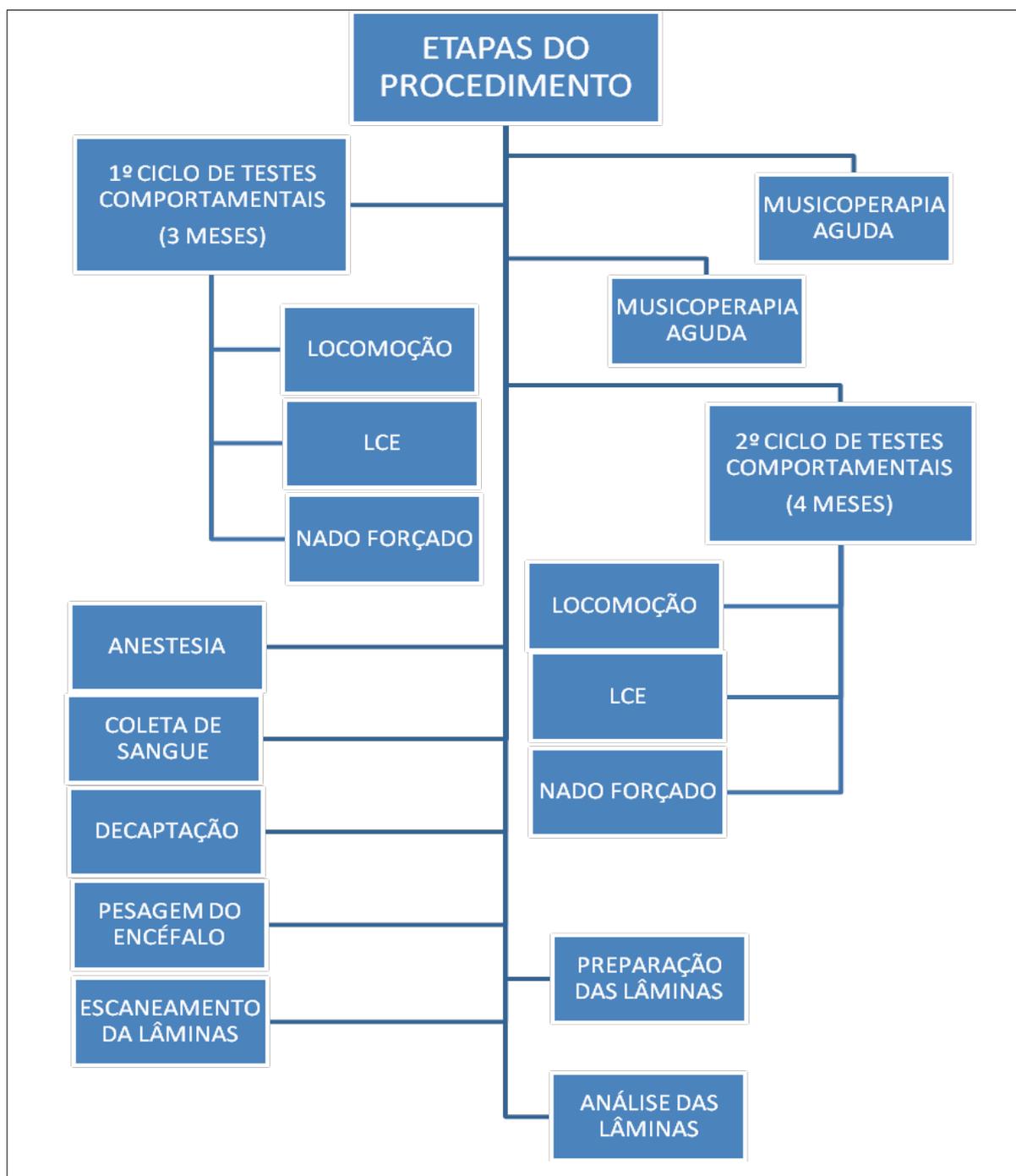


Figura 14 – Fluxograma que sintetiza as principais etapas do experimento do grupo que recebeu o protocolo de Música Aguda (GMa), desde o momento pré hipóxia até a preparação das lâminas histológicas. (Fonte: a autora)

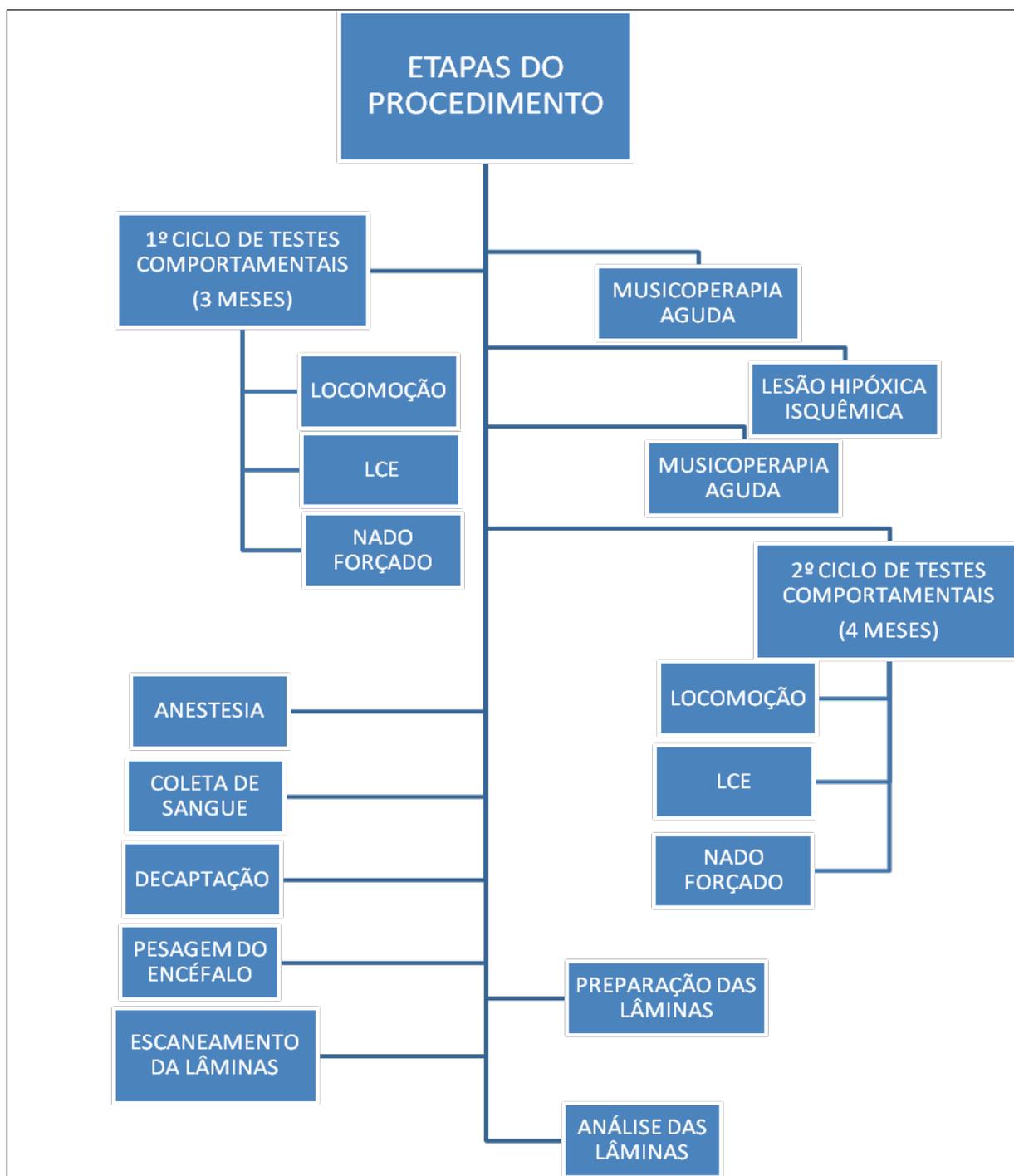


Figura 15 – Fluxograma que sintetiza as principais etapas do experimento do grupo que sofreu a hipóxia isquêmica encefálica induzida experimentalmente pelo NaNO₂ (60 mg/Kg) e também recebeu o protocolo de Música Aguda (GHMa), desde o momento pré hipóxia até a preparação das lâminas histológicas. (Fonte: a autora)

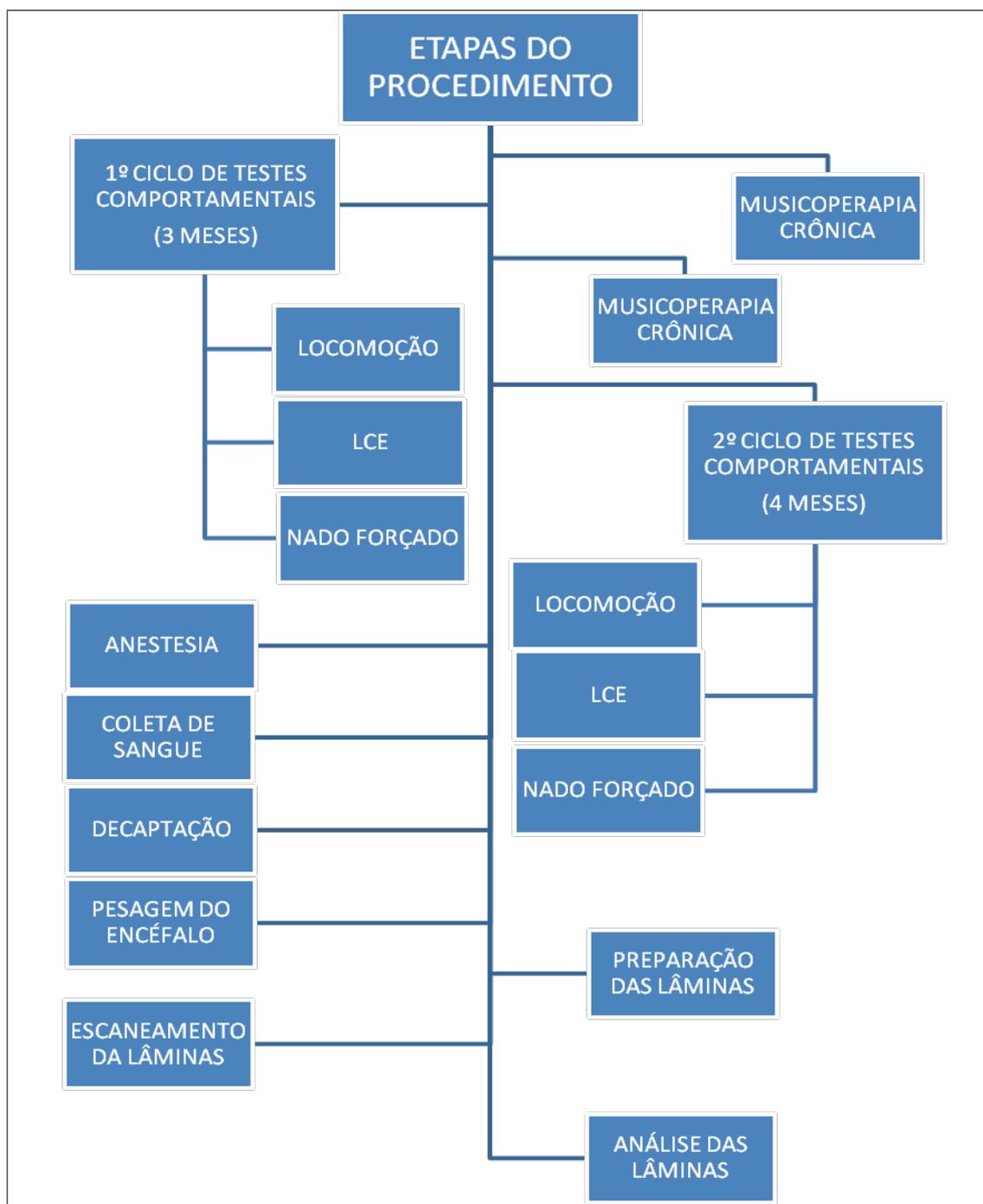


Figura 16 – Fluxograma que sintetiza as principais etapas do experimento do grupo que recebeu o protocolo de Música Crônica (GMc), desde o momento pré hipóxia até a preparação das lâminas histológicas. (Fonte: a autora)

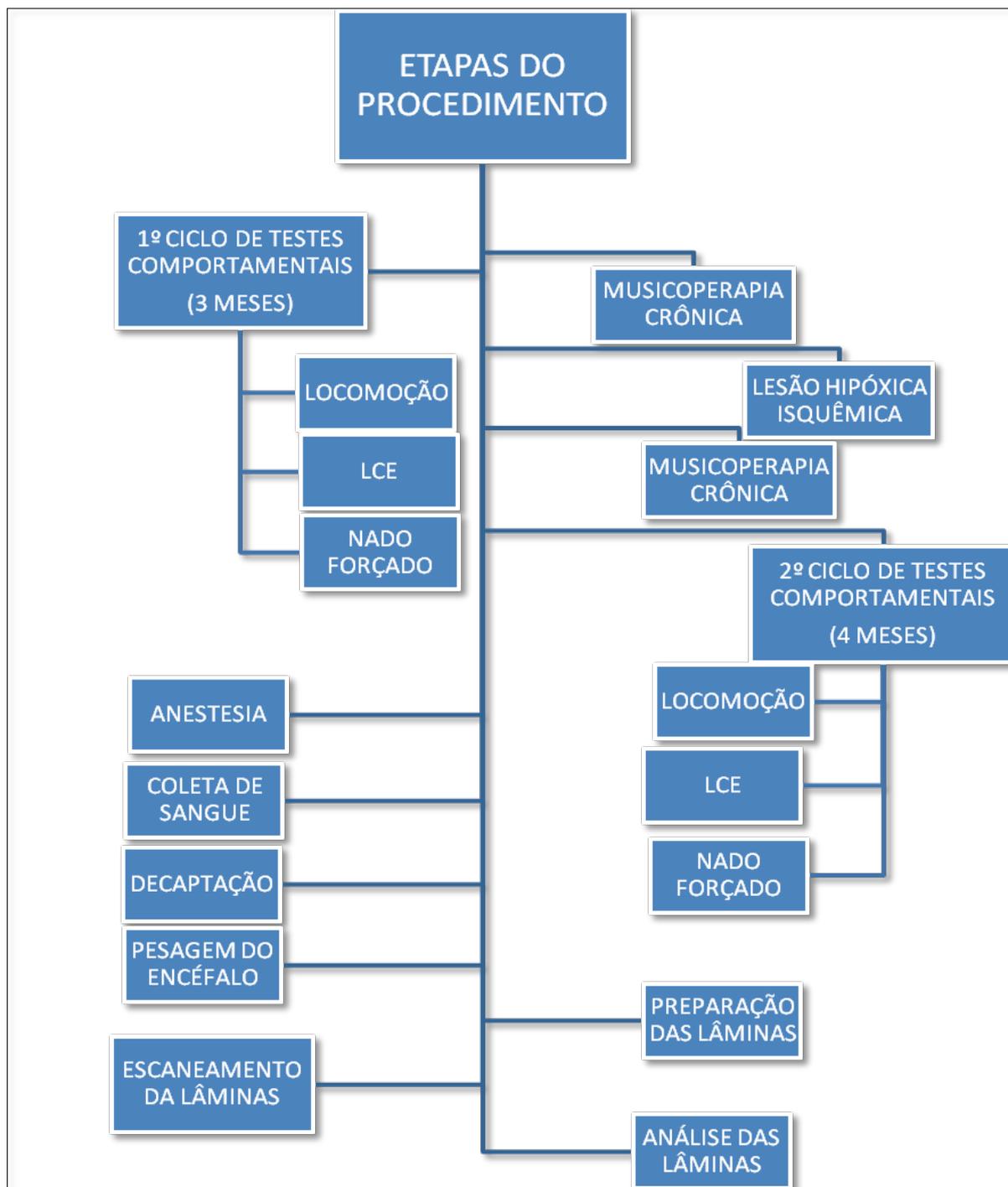


Figura 17 – Fluxograma que sintetiza as principais etapas do experimento do grupo que sofreu hipóxia isquêmica encefálica induzida experimentalmente por NaNO₂ (60 mg/Kg) e recebeu o protocolo de Música Crônica (GHMc), desde o momento pré hipóxia até a preparação das lâminas histológicas. (Fonte: a autora)

3.7 AVALIAÇÕES SANGUÍNEAS

As amostras sanguíneas foram coletadas por punção cardíaca e o sangue alocado em tubos de exames específicos para o teste fim, previamente identificados e encaminhados para laboratório especializado. Posteriormente, o conteúdo sanguíneo foi centrifugado, e especificamente o plasma sanguíneo foi processado e analisado com técnicas e kits específicos para as dosagens de cortisol, glicose, colesterol e lactato. Procurou-se realizar esta coleta logo no início da manhã, por volta de 7:00, a fim de evitar interferências do ciclo circadiano.

3.8 PREPARAÇÃO TECIDUAL

Foi realizada a decapitação do animal e a craniotomia (Figura 18) para a retirada do encéfalo. Após a remoção dos encéfalos, os mesmos foram lavados em solução fisiológica a 0,9%, levemente enxutos e então pesados em balança de precisão MARTE AY220 (Figura 19). Em seguida, eles foram imersos em solução de formalina 10% (Figura 20) e após fixação por um período de 40h o material foi clivado, sendo realizados cortes coronais no encéfalo com retirada de fragmentos correspondentes a região do córtex cerebelar e do hipocampo.



Figura 18: Imagem da craniotomia, para exposição e posterior remoção do encéfalo de uma rato Wistar com 4 meses de idade, pós decapitação. (Fonte: a autora)



Figura 19: Imagem da pesagem do encéfalo, em balança de precisão, do encéfalo de uma rata wistar, com 4 meses de idade. (Fonte: a autora)



Figura 20: Imagem da colocação do encéfalo, depois da pesagem, em solução de formalina 10%. (Fonte: a autora)

Os tecidos foram então processados, onde foi feita a desidratação e liofilização dos mesmos, sendo posteriormente embebidos e emblocados em parafina (URAN et al., 2012). Os blocos de parafina foram cortados com 2-5 μm

de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE). No córtex cerebelar foram avaliados o quantitativo de células de Purkinje sadias e lesionadas, por se tratarem de células altamente sensíveis às lesões por hipóxia induzida por drogas. Já no hipocampo analisou-se também, de maneira quantitativa, especificamente as regiões dos Cornos de Amon (CA1 – CA4). Para isso, procurou-se embasamentos em trabalhos prévios (CACERES et al., 2010; PAWLUSKI et al., 2010; URAN et al., 2012).

As lâminas foram escaneadas no aparelho Aperio Digital Pathology Slide Scanners: Leica Biosystems, pertencente ao Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina, da UnB. Posteriormente, elas foram analisadas por meio do Software ImageScope (Figura 21), no qual as imagens foram ampliadas e medidas.

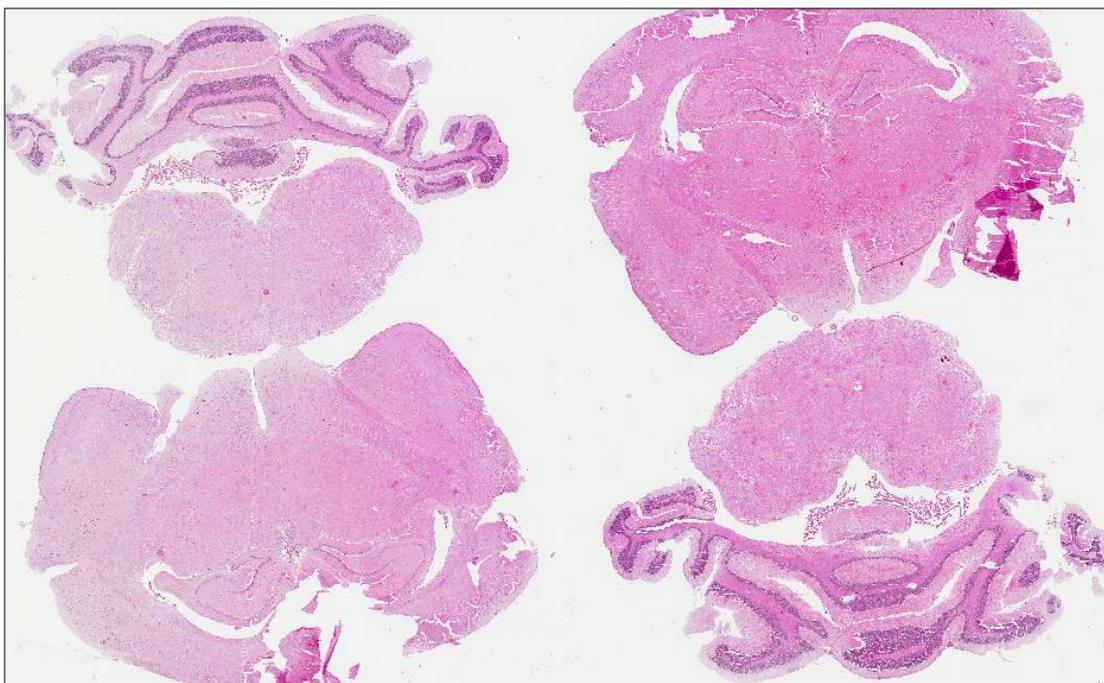


Figura 21 – Imagem de uma lâmina com cortes histológicos do hipocampo e do cerebelo de uma rata wistar, pertencente ao grupo controle (GC), com 4 meses de idade. A mesma foi escaneada Aperio Digital Pathology Slide Scanners: Leica Biosystems. E digitalizada no Software ImageScope. (Fonte: a autora)

3.9 METODOLOGIA PARA A CONTAGEM DOS NEURÔNIOS

Foi adotada a metodologia de contagem de neurônios desenvolvida por Ribeiro et al., 2017, que será exposta e explicada no texto a seguir. As imagens do Cerebelo receberam o aumento inicial de 1,5 vezes para seleção de 3 regiões aleatórias de, aproximadamente, 1.000 μm , nas quais os neurônios seriam contados. Posteriormente, aplicou-se o aumento de 3,0 vezes na imagem para a marcação das áreas. Para proceder a contagem, optou-se pelo aumento de 9,0 vezes (Figura 22).

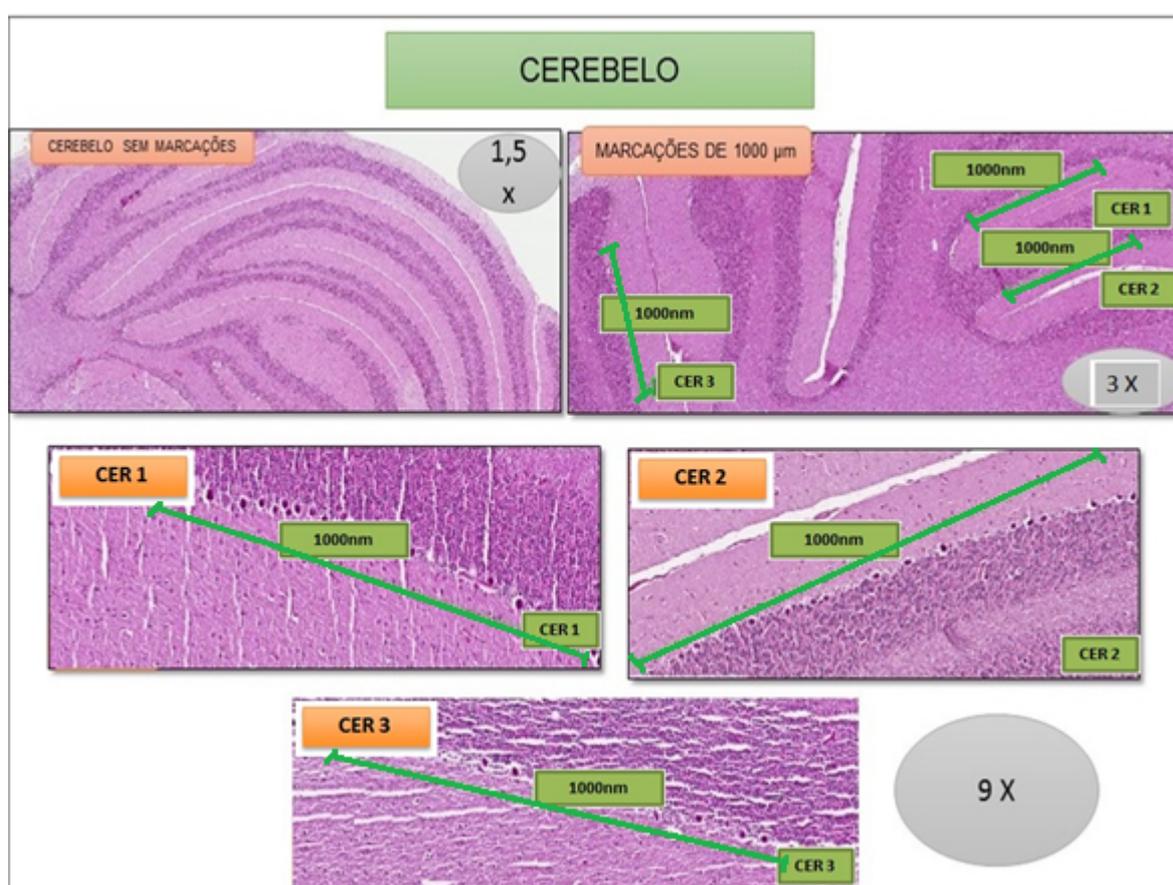


Figura 22 – Imagem histológica com a metodologia empregada para a seleção das áreas do cerebelo. O aumento de 1,5 x (vezes) aplicada para a marcação inicial para a área e o posterior aumento de 9,0 x (vezes) para a contagem dos neurônios. As áreas de cerebelo 1 (CER 1), cerebelo 2 (CER 2) e cerebelo 3 (CER 3) foram medidas em 1000 μm . (Fonte: Ribeiro et al., 2017)

Para análise do hipocampo, procedeu-se inicialmente aumento de 3,6 vezes na imagem, para visualização e seleção das áreas CA1, CA2, CA3, CA4 e Giro Denteado. Em cada área foi feita a marcação em aproximadamente 400 μm , nas quais os neurônios seriam contados (URAN et al., 2012). Para a contagem,

optou-se pelo aumento de 16,6 vezes que possibilitava melhor visualização (Figura 23).

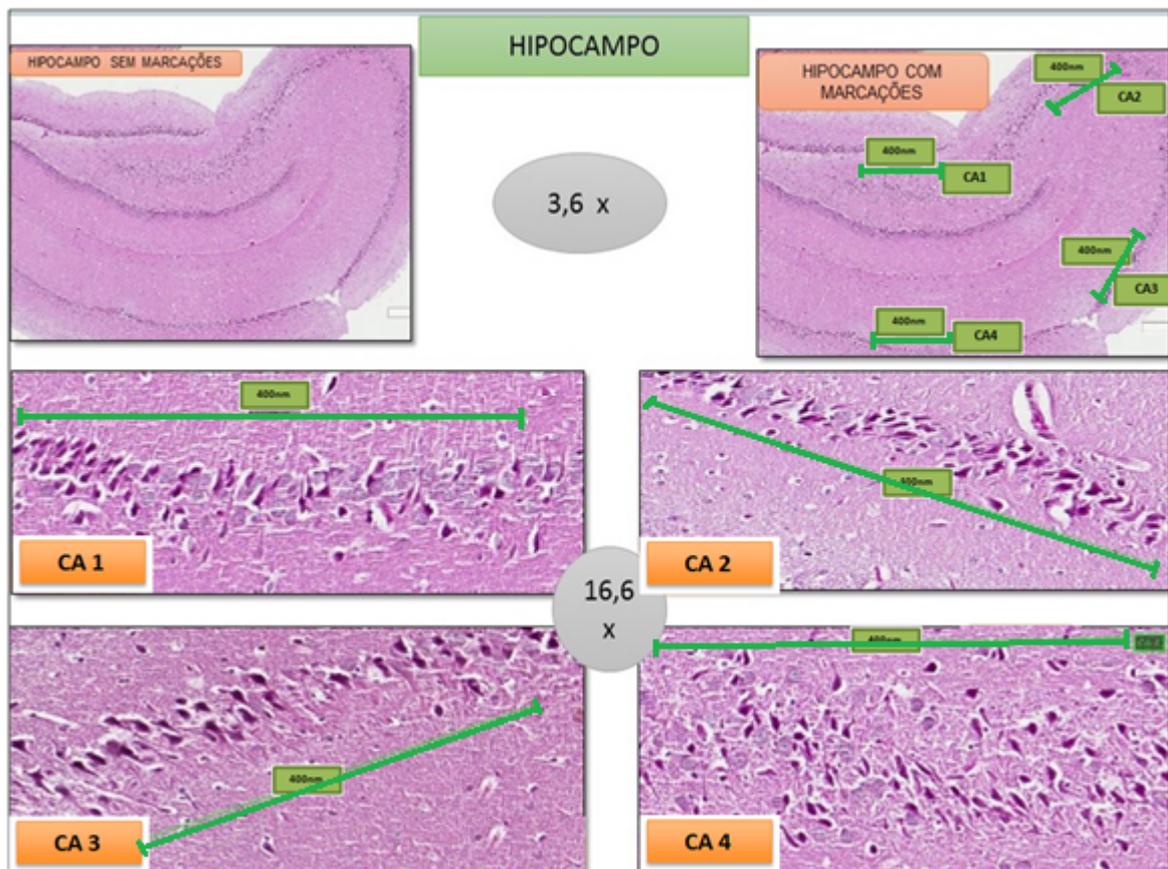


Figura 23 – Imagens histológicas com a metodologia empregada para a seleção das áreas do hipocampo. O aumento de 3,6 x (vezes) foi aplicado para a marcação inicial para a área e o posterior aumento de 16,6 x (vezes) para a contagem dos neurônios. As áreas de Corno de Amon 1 (CA1); Corno e Amon 2 (CA2); Corno de Amon 3 (CA3) e Corno de Amon 4 (CA4) foram medidas em aproximadamente 400 µm. (Fonte: Ribeiro et al., 2017)

Depois de marcada, as imagens foram então selecionadas e transportadas para o programa Paint do Pacote Microsoft, versão Windows Vista 2008, para que pudessem ser marcados de cores diferentes os neurônios saudáveis e os neurônios que apresentavam sinais de lesão. Após este procedimento, as células pintadas com cores diferentes foram contadas por 2 examinadores que não conheciam o significado de cada cor. Adotou-se o mesmo procedimento descrito acima, na contagem das células de Purkinje do cerebelo (Figura 24). A média da contagem dos dois examinadores compôs os dados que serão apresentados nos resultados. Procedimento semelhante foi adotado para a análise das imagens do hipocampo, tendo sido verificadas as áreas CA1 (Figura 25), CA2, CA3, CA4 e GD de animais de todos os grupos que passaram pelo experimento.

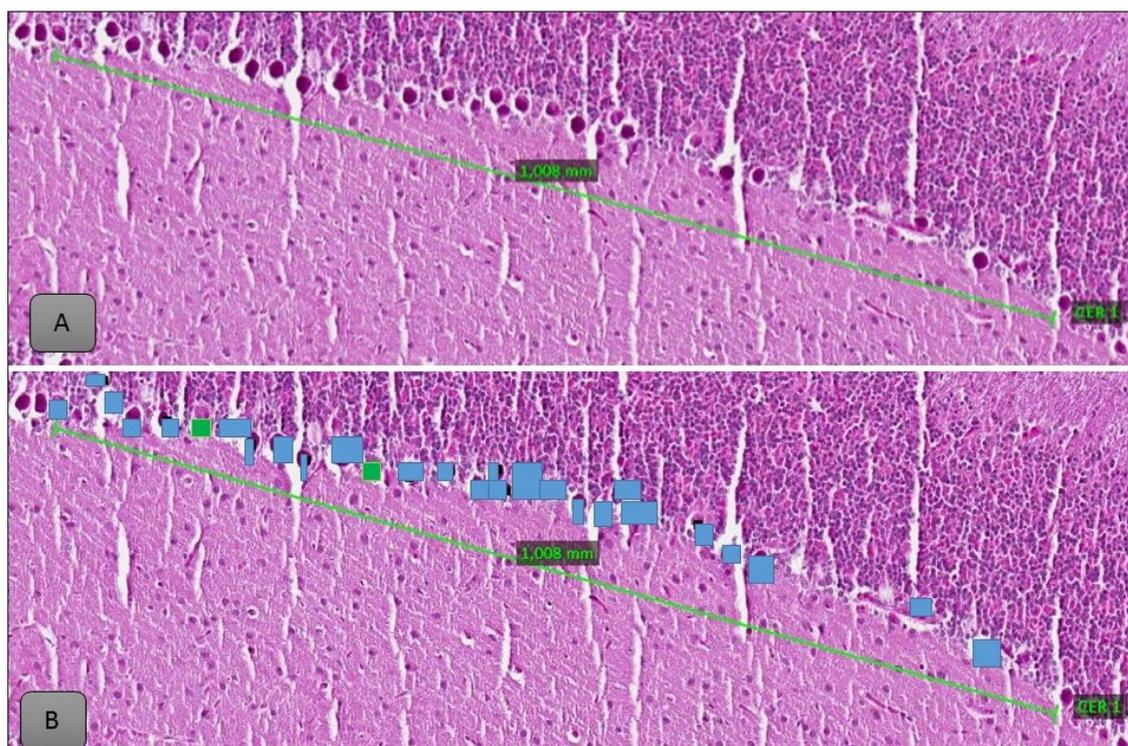


Figura 24 – Imagens histológicas de um corte do cerebelo de ratas Wistar que sofreram hipóxia isquêmica induzida por NaNO₂ (60 mg/Kg). A imagem A apresenta o corte com a marcação de 1008 μ m. A figura B apresenta as marcações que foram feitas no programa Windows Paint, em cores distintas para neurônios considerados viáveis (em verde) e neurônios com lesão (em azul). (Fonte: Ribeiro et al., 2017)

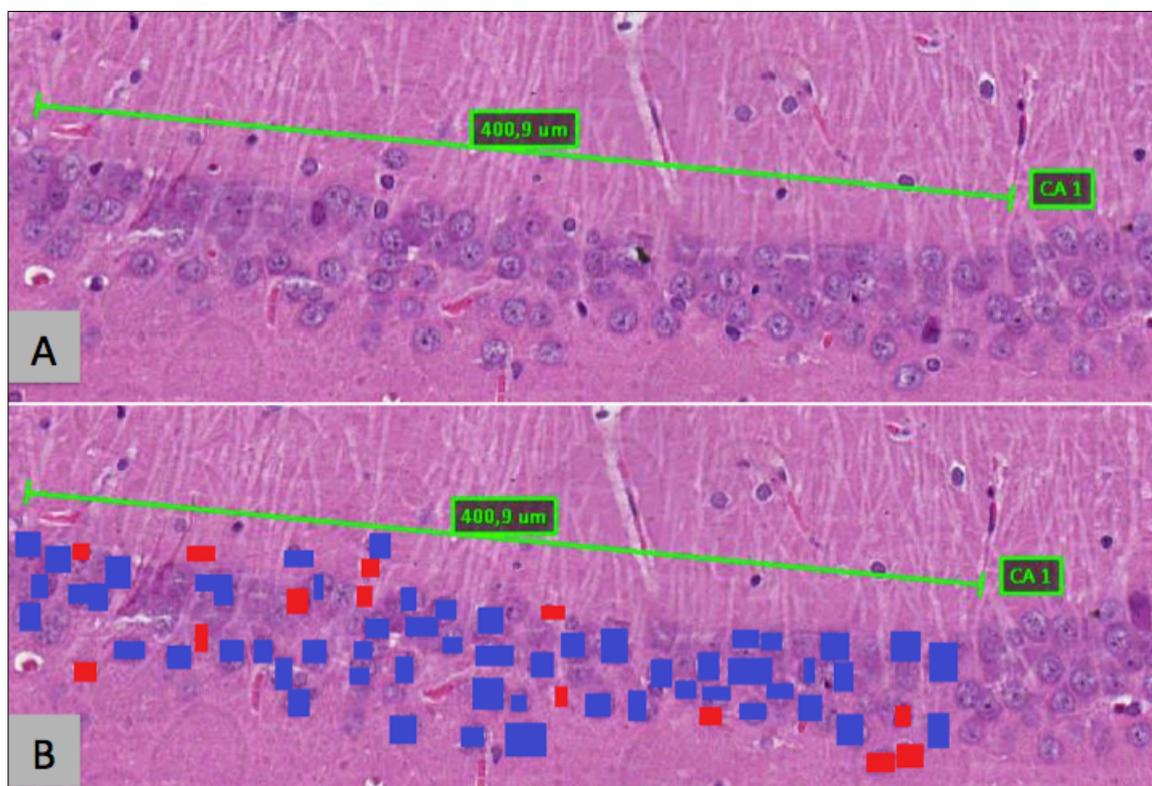


Figura 25 – Imagens histológicas de um corte do hipocampo, região CA1 de ratas Wistar que do grupo controle. A imagem A apresenta o corte com a marcação de 400,9 μ m. A figura B apresenta as marcações que foram feitas no programa Windows Paint, em cores distintas para neurônios considerados viáveis (em azul) e neurônios com lesão (em vermelho). (Fonte: a autora)

3.10 MORFOMETRIA HISTOLÓGICA

A Figura 26 apresenta imagem que ilustra os critérios adotados para determinar dano ou morte celular que são descritos abaixo (CACERES et al., 2010; PAWLUSKI et al., 2010; RIBEIRO et al., 2017; URAN et al., 2012):

1 - Tumefação celular: aumento do volume celular, com alteração da proporção citoplasma/núcleo (quando comparado às células adjacentes); e vacuolização citoplasmática que aumenta de volume, frequência e intensidade de acordo com o estágio da lesão.

2 – Células com Necrose: não apresentavam núcleo ou nas quais não se distinguia a morfologia celular normal.

3 – Células apoptóicas: se apresentavam com manchas escuras e envoltório escurecido.

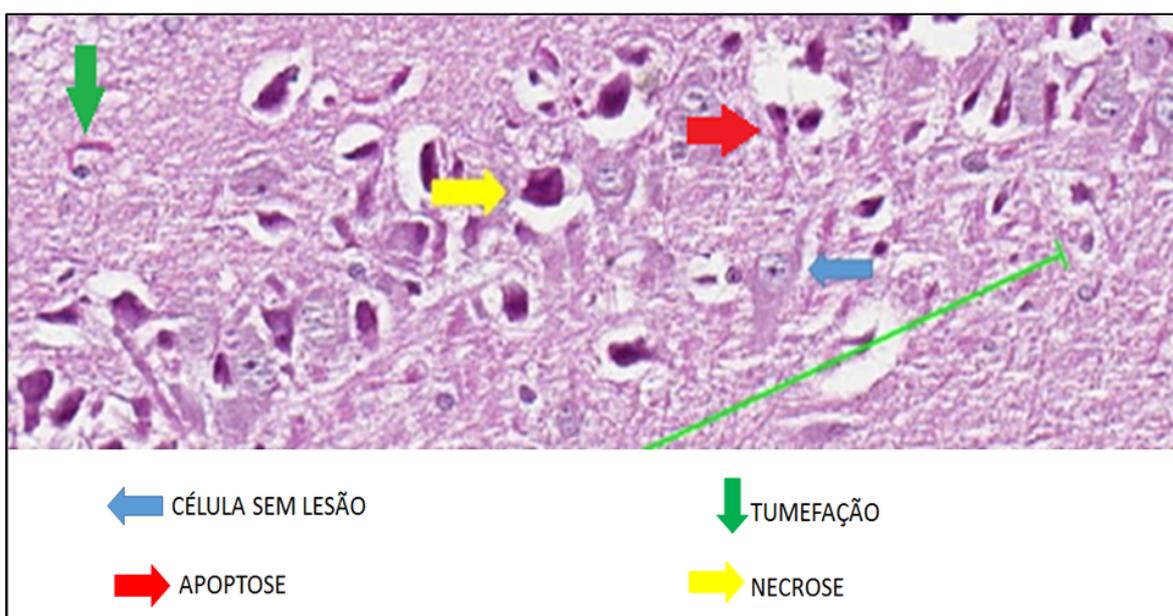


Figura 26 - Corte histológico do hipocampo, região CA4, de rata Wistar com 4 meses de idade expostos a intoxicação por NaNO₂ (60 mg/Kg). Pode ser verificada na seta azul uma célula sem lesão, na seta verde presença de tumefação, na seta vermelha a presença de apoptose e na seta amarela células com característica de necrose. (Fonte: Ribeiro et al., 2017)

Para a análise dos resultados, identificou-se a quantidade de neurônios saudios e a quantidade de neurônios que apresentavam os sinais de lesão apresentados acima, não tendo sido diferenciado o tipo de lesão, apenas foram contados os neurônios lesionados.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O trabalho consiste na aplicação de testes estatísticos paramétricos e não paramétricos, a fim de verificar possíveis diferenças estatísticas. Primeiramente, foi empregado o teste de Kolmogorov Smirnov ($p\text{-valor}>0,05$), para averiguar a normalidade dos dados. Todas as análises foram realizadas com o nível de confiança de 95% e erro de significância de 5%, logo valores abaixo desse erro são estatisticamente significativos. Os dados foram digitados no programa Excel 2010 e analisados no SPSS (Statistical Package of Social Sciences) versão 22.0.

O objetivo deste trabalho e a análise exploratória dos dados, bem como o uso de técnicas de inferência, foram estabelecidos a fim de comprovar possíveis diferenças estatísticas entre os grupos. Com o intuito de averiguar a normalidade dos dados, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado. Esse teste demonstrou que as variáveis apresentaram distribuição de probabilidade normal. Sendo assim, foi utilizada Análise de Variância (ANOVA), seguida do *post hoc* de ajuste para comparações múltiplas de Bonferroni, com nível de significância de $p\leq 0,05$. Para a construção desses testes o nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p\leq 0,05$) indicava diferença estatística significativa. Os dados foram digitados no programa Excel 2010 e analisados no SPSS (Statistical Package of Social Sciences) versão 22.0.

O teste de comparação de médias pareadas foi utilizado, com o objetivo de observar diferenças estatísticas entre os pares das variáveis comportamento do terceiro mês, em relação ao quarto mês. Para os dados normais foi utilizado o T-Student pareado, caso contrário o teste utilizado foi o Wilcoxon. As diferenças estatisticamente significativas correspondem aos valores de p menores que 0,05, conforme tabelas abaixo.

Os cruzamentos com duas variáveis foram realizados com o teste paramétrico T-Student e o não paramétrico Mann Whitney, conforme normalidade entre os dados. Já para os cruzamentos com três variáveis a técnica utilizado foi a Análise de Variância comumente conhecida como ANOVA, bem como seu teste não paramétrico similar: Kruskal Wallis.

Neste tópico será analisado a diferença estatística entre lesionados e sadios em cada um dos grupos estudados. Para esse objetivo, o teste não

pareado paramétrico e não-paramétrico, conforme normalidade dos dados, foram aplicados.

O teste de kolmogorov Smirnov apresentado abaixo indica as variáveis não normais, por conseguinte essas serão analisadas por testes não paramétricos. Neste teste os dados não normais apresentam p-valor $>0,05$. Novamente, a ANOVA foi utilizada nas análises com três variáveis, caso haja normalidade entre os dados, caso contrário o Kruskal Wallis foi realizado.

Quando foi necessária a análise de comparação entre dois grupos independentes foi realizada pelo teste t-student para os dados normais e para aqueles que não seguem normalidade o teste não-paramétrico de Mann Whitney, conforme tabelas apresentadas abaixo.

4 RESULTADOS

Dados biométricos relativos ao peso do encéfalo foram coletados e analisados em todos os grupos. Foi evidenciado que houve diferença estatisticamente significativa (p -valor = 0,00*) entre os grupos, onde a média em gramas no grupo controle e naqueles que receberam música foi maior do que a média dos animais que apenas sofreram hipóxia. Todos os dados são apresentados na Tabela 01.

Tabela 01 – Dados referentes ao Peso do Encéfalo dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc e GHMc. Os encéfalos foram coletados e pesados em 36 ratas Wistar no momento pró experimento (animais com 4 meses).

Variável	Grupo	Média (gramas)	Erro-Padrão	P-Valor
PESO DO ENCÉFALO	GC	2,10	0,05	0,00*
	GH	1,68	0,01	
	GMa	1,73	0,26	
	GHMa	1,81	0,02	
	GMc	1,81	0,03	
	GHMc	1,82	0,05	

GC= grupo controle, GH= grupo hipóxia; GMa= grupo música aguda; GHMa= grupo hipóxia + música aguda; GMc= grupo música crônica; GHMc= grupo hipóxia + música crônica. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Ainda em relação ao peso do encéfalo, foi feita a análise intergrupos controle e experimento GC x GH; GMa x GHMa; GMc x GHMc. E também entre os grupos com e sem hipóxia GC x GMa x GMc e GH x GHMa x GHMc. Os cruzamentos com duas variáveis foram realizados com o teste paramétrico T-Student e o não paramétrico Mann Whitney, conforme normalidade entre os dados. Já para os cruzamentos com três variáveis a técnica utilizado foi a Análise de Variância conhecida como ANOVA, bem como seu teste não paramétrico similar: Kruskal Wallis. Os cruzamentos estatisticamente significativos foram apresentados com valores de p ($p \leq 0,05$) cujos valores são representados por asteriscos sobescritos.

Tabela 02 – Dados referentes ao Peso do Encéfalo intergrupos controle e experimento GC x GH, GMa x GHMa, GMc x GHMc. E também entre os grupos sem e com hipóxia GC x GMa x GMc e GH x GHMa x GHMc. Os encéfalos foram coletados e pesados em 36 (n= 6 por grupo) ratas Wistar no momento pró experimento (animais com 4 meses).

Variável	Grupo	Média (gramas)	Erro-Padrão	P-Valor
PESO DO ENCÉFALO – Intergrupos controle e experimento	GC	2,10	0,02	0,00*
	GH	1,68	0,01	
	GMa	1,73	0,05	0,02*
	GHMa	1,81	0,03	
	GMc	1,81	0,03	0,04*
	GHMc	1,82	0,05	
PESO DO ENCÉFALO – Intergrupos sem e com hipóxia	GC	2,10	0,02	0,00*
	GMa	1,73	0,01	
	GMc	1,81	0,03	
	GH	1,68	0,03	0,03*
	GHMa	1,81	0,01	
	GHMc	1,82	0,03	

GC= grupo controle, GH= grupo hipóxia; GMa= grupo música aguda; GHMa= grupo hipóxia + música aguda; GMc= grupo música crônica; GHMc= grupo hipóxia + música crônica. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Por meio das análises dos dados comportamentais disponibilizados na Tabela 03 é possível perceber diferença estatística intragrupo apenas nas variáveis Locomoção Espontânea, grupo GMa e GHMa; Frequência de entradas nos braços Fechados no grupo GHMa e na Imobilidade, nos grupos GH, GHMa e GHMc. Conforme o teste de Kolmogorov e Smirnov as variáveis GC Frequência no Fechado, GH Frequência no Aberto e no Fechado, GH Imobilidade e GMa Tempo no Aberto obtiveram valores abaixo de 0,05, o que indica não normalidade dos dados.

O teste de comparação de médias pareados foi utilizada, com o fito de observar diferenças estatísticas entre os pares das variáveis comportamento do terceiro mês, em relação ao quarto mês. Para os dados normais foi utilizado o T-Student pareado, caso contrário o teste utilizado foi o Wilcoxon. As diferenças estatisticamente significativas correspondem aos valores de p menores que 0,05.

Na variável Frequência Fechado o grupo música aguda (GMa) apresentou diferença estatisticamente significativa (p -valor=0,03) para os meses analisados, o que demonstra que para essa variável o efeito do grupo música aguda muda, conforme o mês (terceiro e quarto mês).

Já na variável Imobilidade três valores estatisticamente significativos foram encontrados: GH, GHMa e GHMc. Na variável Locomoção Espontânea os valores que apresentaram diferenças entre as médias foram: GMa e GHMa. Na variável

Tempo no Aberto, foi observado valor significativo em GH, GMa, GHMa, GMc (Tabela 03).

Tabela 03 – Dados referentes aos testes no Campo Aberto (Locomoção), no Labirinto em Cruz Elevado (Frequência aberto, Tempo Aberto e Frequência Fechado) e no Nado forçado (Imobilidade) dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc, GHMc. Os testes foram realizados com 36 (n=6 por grupo) ratas Wistar no momento pré-hipóxia/música (animais com 3 meses) e no momento pós-hipóxia/música (animais com 4 meses).

Variáveis de Comportamento	Grupo	3 Meses (Média / Erro- Padrão)	4 Meses (Média / Erro- Padrão)	P-Valor
Locomoção Espontânea (número de quadrantes)	GC	59,83 (±3,72)	43,67 (±7,48)	0,11
	GH	66,83 (±1,48)	71,83 (±5,72)	0,46
	GMa	38,50 (±2,3)	83,33 (±4,42)	0,00*
	GHMa	48,50 (±2,92)	27,17 (±5,54)	0,00*
	GMc	69,50 (±3,30)	76,17 (±9,45)	0,13
	GHMc	73,83 (±2,17)	51,67 (±9,00)	0,36
Frequência aberto (número de entradas)	GC	29,77 (±4,57)	28,29 (±4,20)	0,81
	GH	28,04 (±2,21)	31,33 (±4,04)	0,00*
	GMa	34,07 (±4,27)	38,02 (±4,74)	0,72
	GHMa	27,91 (±4,81)	29,65 (±3,54)	0,45
	GMc	31,37 (±5,36)	33,28 (±5,25)	0,08
	GHMc	28,65 (± 3,57)	16,14 (±4,40)	0,19
Tempo Aberto (tempo em segundos)	GC	6,42 (±0,13)	16,27 (±4,28)	0,98
	GH	17,99 (±0,85)	5,62 (±1,03)	0,05*
	GMa	23,50 (±7,51)	34,77 (±6,03)	0,03*
	GHMa	27,38 (±5,42)	33,59 (±7,75)	0,05*
	GMc	20,07 (±8,71)	30,71 (±6,68)	0,05*
	GHMc	26,94 (± 7,07)	14,82 (±2,07)	0,36
Frequência Fechado (número de entradas)	GC	8,33 (±0,82)	5,17 (±0,86)	0,05*
	GH	10,50 (±1,35)	9,00 (±0,88)	0,01*
	GMa	3,67 (±0,93)	7,83 (±0,66)	0,03*
	GHMa	8,67 (±1,16)	5,33 (±1,32)	0,03*
	GMc	6,67 (±0,33)	9,50 (±0,60)	0,17
	GHMc	9,00 (±0,80)	7,50 (±0,76)	0,19
Imobilidade (tempo em segundos)	GC	76,83 (±3,09)	61,83 (± 12,65)	0,36
	GH	95,83 (±9,08)	126,50 (±10,21)	0,05*
	GMa	48,67 (±6,23)	88,17 (±14,83)	0,19
	GHMa	88,00 (±12,30)	83,00 (±7,28)	0,01*
	GMc	64,50 (± 17,50)	93,00 (±14,40)	0,07
	GHMc	71,33 (±16,36)	42,33 (±2,65)	0,00*

GC= grupo controle, GH= grupo hipóxia; GMa= grupo música aguda; GHMa= grupo hipóxia + música aguda; GMc= grupo música crônica; GHMc= grupo hipóxia + música crônica. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Para os dados comportamentais e bioquímicos, procedeu-se também a análise pareada dos grupos. Tendo sido realizadas duas categorias de comparações diferentes. Na primeira, verificou-se a diferença nos testes entre os grupos GC x GH; GMa x GHMa e GMc x GHMc (Tabelas 04, 05 e 06). De acordo com a análise dos dados apresentados abaixo as seguintes variáveis não seguem distribuição de probabilidade normal: Colesterol GHMc, Imobilismo GH e Lactato GC (p -valor > 0,05).

Na Tabela 04 é possível observar que houve diferença estatística entre os grupos controle e hipóxia nas variáveis Frequência no Aberto, Tempo no Aberto e Frequência no Fechado, não havendo diferença na Locomoção Espontânea. De forma que o GH apresenta característica de comportamento similar a ansiedade, devido ao pequeno tempo de permanência nos braços abertos, associado a elevado número de entradas. É possível também observar elevado tempo de imobilismo para o grupo que sofreu hipóxia, indicando que estes animais apresentavam comportamento sugestivo de depressão. Quanto as variáveis bioquímicas há diferença estatística no cortisol e no colesterol, com grupo controle com níveis mais baixos.

Tabela 04 – Dados referentes aos testes comportamentais: Campo Aberto (Locomoção), Labirinto em Cruz Elevado (Frequência aberto, Tempo Aberto e Frequência Fechado) e Nado forçado (Imobilidade) e aos testes bioquímicos: cortisol, glicose, colesterol e lactato dos grupos GC e GH. Os testes foram realizados com 12 (n=6 por grupo) ratas Wistar no momento pós-hipóxia (animais com 4 meses). E o p-valor intergrupo.

Variáveis de Comportamento	Grupo	Média	Erro-Padrão	P-Valor
Locomoção Espontânea (número de quadrantes)	GC	43,67	7,48	0,70
	GH	71,83	5,72	
Frequência aberto (número de entradas)	GC	28,29	4,20	0,01*
	GH	31,33	4,04	
Tempo Aberto (tempo em segundos)	GC	16,27	4,28	0,00*
	GH	5,62	1,03	
Frequência Fechado (número de entradas)	GC	5,17	0,86	0,00*
	GH	9,00	0,88	
Imobilidade (tempo em segundos)	GC	61,83	12,65	0,00*
	GH	126,50	10,21	
Cortisol (µg/dL)	GC	2,80	0,33	0,01*
	GH	5,88	0,56	
Glicose (mg/dL)	GC	206,40	7,76	0,30
	GH	133,60	4,51	
Colesterol (mg/dL)	GC	51,20	6,13	0,05*
	GH	65,60	0,95	
Lactato (mg/dL)	GC	5,88	0,78	0,10
	GH	4,38	0,32	

GC= grupo controle, GH= grupo hipóxia. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 05 verifica-se os dados comparativos entre os grupos que receberam o protocolo de música aguda, com e sem hipóxia. Havendo diferença estatística apenas na variável Frequência no Fechado, indicando que os dois grupos apresentaram resultados bastantes similares. De forma que, a lesão por hipóxia pode ter sido compensada pela aplicação do protocolo de música aguda

Tabela 05 – Dados referentes aos testes comportamentais: Campo Aberto (Locomoção), Labirinto em Cruz Elevado (Frequência aberto, Tempo Aberto e Frequência Fechado) e Nado forçado (Imobilidade) e aos testes bioquímicos: cortisol, glicose, colesterol e lactato dos grupos GMa e GHMa. Os testes foram realizados com 12 (n=6 por grupo) ratas Wistar no momento pós-hipóxia (animais com 4 meses). E o p-valor intergrupo

Variáveis de Comportamento	Grupo	Média	Erro-Padrão	P-Valor
Locomoção Espontânea (número de quadrantes)	GMa	83,33	4,42	0,60
	GHMa	27,17	5,54	
Frequência aberto (número de entradas)	GMa	38,02	4,74	0,37
	GHMa	29,65	3,58	
Tempo Aberto (tempo em segundos)	GMa	34,77	6,03	0,65
	GHMa	33,59	7,75	
Frequência Fechado (número de entradas)	GMa	7,83	0,66	0,04*
	GHMa	5,33	1,32	
Imobilidade (tempo em segundos)	GMa	88,17	14,83	0,17
	GHMa	83,00	7,28	
Cortisol (µg/dL)	GMa	3,26	0,83	0,82
	GHMa	4,05	0,89	
Glicose (mg/dL)	GMa	149,00	12,36	0,31
	GHMa	162,80	7,24	
Colesterol (mg/dL)	GMa	62,00	1,12	0,18
	GHMa	51,20	3,75	
Lactato (mg/dL)	GMa	7,06	1,08	0,46
	GHMa	4,74	0,75	

GMa= grupo música aguda; GHMa= grupo hipóxia + música aguda. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Já na Tabela 06 verifica-se os dados comparativos entre os grupos que receberam o protocolo de música crônica, com e sem hipóxia. E houve diferença estatística nas variáveis Imobilidade e Cortisol. No teste de Nado Forçado, o grupo que sofreu a hipóxia e ouviu o protocolo de música crônica apresentou os índices mais baixos de imobilismo, reforçando a ideia de efeito antidepressivo da música. Já quando verifica-se os valores de cortisol, este mesmo grupo, GHMc, apresentou valores altos. Permitindo inferir que a soma da lesão encefálica com a música crônica teve um efeito estressor sobre estes animais.

Tabela 06 – Dados referentes aos testes comportamentais: Campo Aberto (Locomoção), Labirinto em Cruz Elevado (Frequência aberto, Tempo Aberto e Frequência Fechado) e Nado forçado (Imobilidade) e aos testes bioquímicos: cortisol, glicose, colesterol e lactato dos grupos GMc e GHMc. Os testes foram realizados com 12 (n=6 por grupo) ratas Wistar no momento pós-hipóxia (animais com 4 meses). E o p-valor intergrupo

Variáveis de Comportamento	Grupo	Média	Erro-Padrão	P-Valor
Locomoção Espontânea (número de quadrantes)	GMc	76,17	9,45	0,72
	GHMc	51,67	9,00	
Frequência aberto (número de entradas)	GMc	33,28	5,25	0,94
	GHMc	16,14	4,40	
Tempo Aberto (tempo em segundos)	GMc	30,71	6,68	0,94
	GHMc	14,82	2,07	
Frequência Fechado (número de entradas)	GMc	9,50	0,60	0,29
	GHMc	7,50	0,76	
Imobilidade (tempo em segundos)	GMc	93,00	14,40	0,00*
	GHMc	42,33	2,65	
Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	GMc	3,85	1,42	0,03*
	GHMc	5,85	0,72	
Glicose (mg/dL)	GMc	159,80	11,40	0,36
	GHMc	162,80	14,41	
Colesterol (mg/dL)	GMc	58,00	1,42	0,15
	GHMc	54,40	6,25	
Lactato (mg/dL)	GMc	7,04	0,63	0,76
	GHMc	4,62	0,68	

GMc= grupo música crônica; GHMc= grupo hipóxia + música crônica. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Os cruzamentos com dois grupos foram realizados com o teste paramétrico T-Student e o não paramétrico Mann Whitney, conforme normalidade entre os dados. Já para os cruzamentos com três grupos a técnica utilizado foi a Análise de Variância conhecida como ANOVA, bem como seu teste não paramétrico similar: Kruskal Wallis. Os cruzamentos estatisticamente significativos foram apresentados com valores de p cujos valores são representados por asteriscos sobescritos.

De forma que comparou-se também os resultados entre os grupos GC x GMa x GMc e GH x GHMa x GHMc (Tabelas 07 e 08). No intuito de analisar o impacto da hipóxia e da música, de maneira mas detalhada, sobre o desempenho dos grupos. Na tabela 07 é possível verificar que houve diferença estatística nas variáveis, Locomoção Espontânea, Tempo no Aberto, Frequência no Fechado e Glicose. O grupo GMa apresentou os melhores resultados na Locomoção Espontânea e no Tempo no Aberto, que associado aos demais achados no LCE torna possível caracterizar efeito ansiolítico da música aguda.

Tabela 07 – Dados referentes aos testes comportamentais: Campo Aberto (Locomoção), Labirinto em Cruz Elevado (Frequência aberto, Tempo Aberto e Frequência Fechado) e Nado forçado (Imobilidade) e aos testes bioquímicos: cortisol, glicose, colesterol e lactato dos grupos GC, GMa e GMc. Os testes foram realizados com 18 (n=6 por grupo) ratas Wistar no momento pós-hipóxia (animais com 4 meses). E o p-valor intergrupo

Variáveis de Comportamento	Grupo	Média	Erro-Padrão	P-Valor
Locomoção Espontânea (número de quadrantes)	GC	43,67	7,48	0,00*
	GMa	83,33	4,42	
	GMc	76,17	9,45	
Frequência aberto (número de entradas)	GC	28,29	4,20	0,25
	GMa	38,02	4,74	
	GMc	33,28	5,25	
Tempo Aberto (tempo em segundos)	GC	16,27	4,28	0,03*
	GMa	34,77	6,03	
	GMc	30,71	6,68	
Frequência Fechado (número de entradas)	GC	5,17	0,86	0,00*
	GMa	7,83	0,66	
	GMc	9,50	0,60	
Imobilidade (tempo em segundos)	GC	61,83	12,65	0,19
	GMa	88,17	14,83	
	GMc	93,00	14,40	
Cortisol (µg/dL)	GC	2,80	0,33	0,12
	GMa	3,26	0,83	
	GMc	3,85	1,42	
Glicose (mg/dL)	GC	206,40	7,75	0,00*
	GMa	149,00	12,36	
	GMc	159,80	11,40	
Colesterol (mg/dL)	GC	51,20	6,13	0,08
	GMa	62,00	1,12	
	GMc	58,00	1,42	
Lactato (mg/dL)	GC	5,88	0,78	0,13
	GMa	7,06	1,08	
	GMc	7,04	0,63	

GC= grupo controle; GMa= grupo música aguda; GMc= grupo música crônica. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Já na Tabela 08 encontram-se os dados relativos aos grupos hipóxia e música aguda e crônica pós-lesão. Pode-se observar que o GH obteve os resultados menos favoráveis, em quase todas as variáveis, exceto nos níveis de Glicose e Lactato. Evidenciando que em todas as variáveis com diferença significativa, o pior desempenho foi observado no grupo que sofreu hipóxia, exceto na Locomoção Espontânea.

Quando analisados os resultados do desempenho do GH no LCE é possível verificar que há característica de ansiedade no comportamento destes animais, assim como, devido ao elevado tempo de imobilidade, verifica-se comportamento sugestivo de depressão. O grupo de música aguda, GHMa, tem característica de efeito ansiolítico da música, mais claro e mais impactante que o

grupo de música crônica, porém, vale ressaltar, que o GHMc apresentou melhor desempenho, ou seja, menor ansiedade, que o GH.

Já quando verifica-se os dados relativos a depressão, o GHMc foi o que apresentou efeito mais pronunciado, com os níveis mais baixos de imobilidade. Destacou-se também os valores menores de cortisol e colesterol no grupo de música aguda, pós-hipóxia, o que pode indicar que este grupo estava sob menor efeito do estresse.

Tabela 08 – Dados referentes aos testes comportamentais: Campo Aberto (Locomoção), Labirinto em Cruz Elevado (Frequência aberto, Tempo Aberto e Frequência Fechado) e Nado forçado (Imobilidade) e aos testes bioquímicos: cortisol, glicose, colesterol e lactato dos grupos GC, GHMa e GHMc. Os testes foram realizados com 18 (n=6 por grupo) ratas Wistar no momento pós-hipóxia (animais com 4 meses). E o p-valor intergrupo

Variáveis de Comportamento	Grupo	Média	Erro-Padrão	P-Valor
Locomoção Espontânea (número de quadrantes)	GH	71,83	5,72	0,00*
	GHMa	27,17	5,54	
	GHMc	51,67	9,00	
Frequência aberto (número de entradas)	GH	31,33	4,04	0,01*
	GHMa	29,65	3,54	
	GHMc	16,14	4,40	
Tempo Aberto (tempo em segundos)	GH	5,62	1,03	0,00*
	GHMa	33,59	7,75	
	GHMc	14,82	2,07	
Frequência Fechado (número de entradas)	GH	9,00	0,88	0,02*
	GHMa	5,33	1,32	
	GHMc	7,50	0,76	
Imobilidade (tempo em segundos)	GH	126,50	10,21	0,00*
	GHMa	83,00	7,28	
	GHMc	42,33	2,65	
Cortisol (µg/dL)	GH	5,88	0,56	0,03*
	GHMa	4,05	0,89	
	GHMc	5,85	0,72	
Glicose (mg/dL)	GH	133,60	14,57	0,05
	GHMa	162,80	7,24	
	GHMc	162,80	14,41	
Colesterol (mg/dL)	GH	65,60	0,95	0,04*
	GHMa	51,20	3,75	
	GHMc	54,40	6,25	
Lactato (mg/dL)	GH	4,38	0,32	0,88
	GHMa	4,74	0,75	
	GHMc	4,62	0,68	

GH= grupo hipóxia; GHMa= grupo hipóxia + música aguda; GHMc= grupo hipóxia + música crônica. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% (p≤0,05).

Quando se procedeu a análise dos neurônios do cerebelo dos animais, foi possível verificar que havia diferenças estatísticas entre os neurônios lesionados e sadios em todos os grupos, exceto no GHMa tendo o valor de p=0,00. Neste tópico será analisado a diferença estatística entre lesionados e sadios em cada

um dos grupos estudados. Para esse objetivo, o teste não pareado paramétrico e não-paramétrico, conforme normalidade dos dados, foram aplicados.

Os dados completos, em relação ao número de neurônios sadios e o número de neurônios lesionados do cerebelo são apresentados na Tabela 09. Na qual é possível verificar que os grupos controle e música aguda e crônica apresentam maior número de neurônios sadios que lesionados. Já os grupos que sofreram a hipóxia induzida experimentalmente por NaNO₂ apresentam número maior de neurônios lesionados que sadios. Tal fato indica que houve hipóxia nos animais que foram intoxicados com NaNO₂, comprometendo as células de Purkinje.

Tabela 09 – Número de Neurônios (Células de Purkinje) do cerebelo de 36 ratas Wistar no momento pós-hipóxia/música (animais com 4 meses), dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc, GHMc.

Número de Neurônios	Grupo	Média	Erro-Padrão	P-Valor
Sadio	GC	23,20	1,48	0,00*
	GH	3,11	1,15	0,00*
	GMa	19,06	1,60	0,81
	GHMa	6,50	0,70	0,00*
	GMc	17,17	1,03	0,00*
	GHMc	3,83	0,75	0,00*
Lesionado	GC	2,93	0,63	0,00*
	GH	19,06	1,15	0,00*
	GMa	6,67	1,10	0,81
	GHMa	12,56	0,84	0,00*
	GMc	5,06	1,16	0,00*
	GHMc	19,00	1,18	0,00

GC= grupo controle, GH= grupo hipóxia; GMa= grupo música aguda; GHMa= grupo hipóxia + música aguda; GMc= grupo música crônica; GHMc= grupo hipóxia + música crônica. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Já em relação ao hipocampo, é possível observar nas Figuras 27 a 32 os dados relativos a contagem de neurônios sadios e lesionados nas quatro áreas do Corno de Amon e no GD. O teste de kolmogorov Smirnov foi aplicado a fim de verificar as variáveis não normais, por conseguinte essas serão analisadas por testes não paramétricos. Nas Figuras 27 a 32 os valores sobescritos com asteriscos correspondem aos pares que apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

A figura 27 apresenta os resultados do GC que apresentou diferença expressiva entre o número de neurônios saudáveis e lesionados nas quatro áreas (CA1-CA4) e no GD, sempre prevalecendo os neurônios saudáveis.

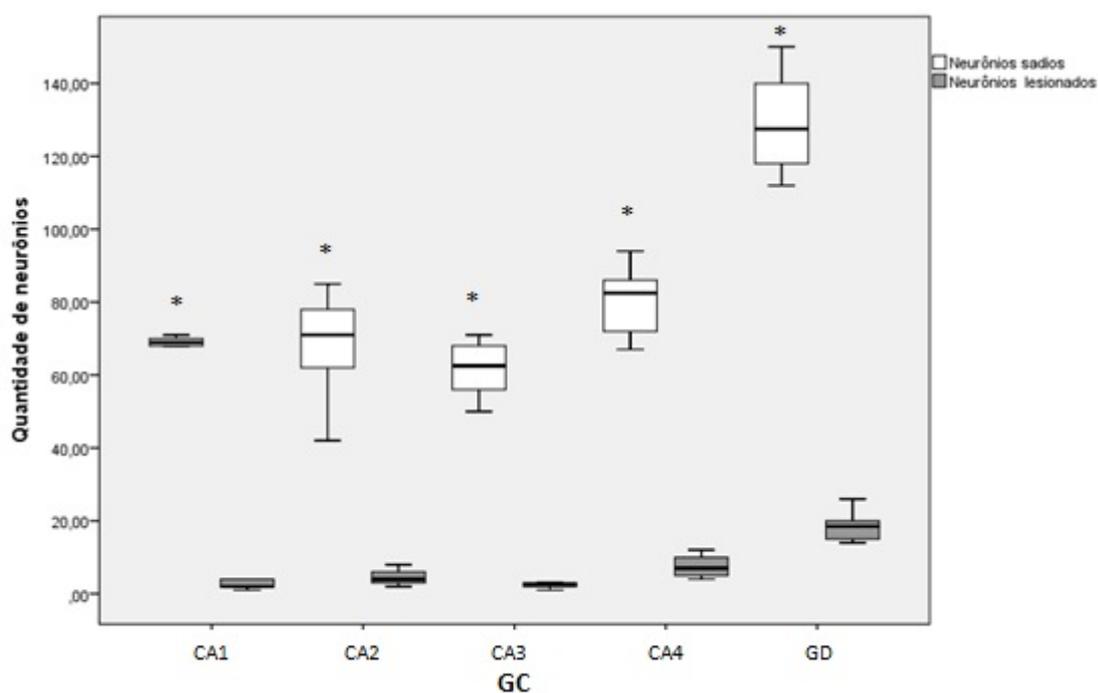


Figura 27 – Box-Plot da contagem do número de neurônios das quatro regiões do Hipocampo (CA1-CA4) de 6 ratas Wistar do GC, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em branco é apresentada a média de neurônios saudáveis nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. Em cinza encontram-se as médias de neurônios com lesão nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. O * indica a diferença estatisticamente significativa entre o número de neurônios saudáveis e lesionados ($p \leq 0,05$) (Fonte: a autora).

Na figura 28, aparece a análise da contagem de neurônios do GH, na qual é possível verificar diferença significativa, prevalecendo os neurônios lesionados nas áreas CA2, CA3 e CA4 e GD. Em contraste com a área CA1, na qual predominam neurônios saudáveis.

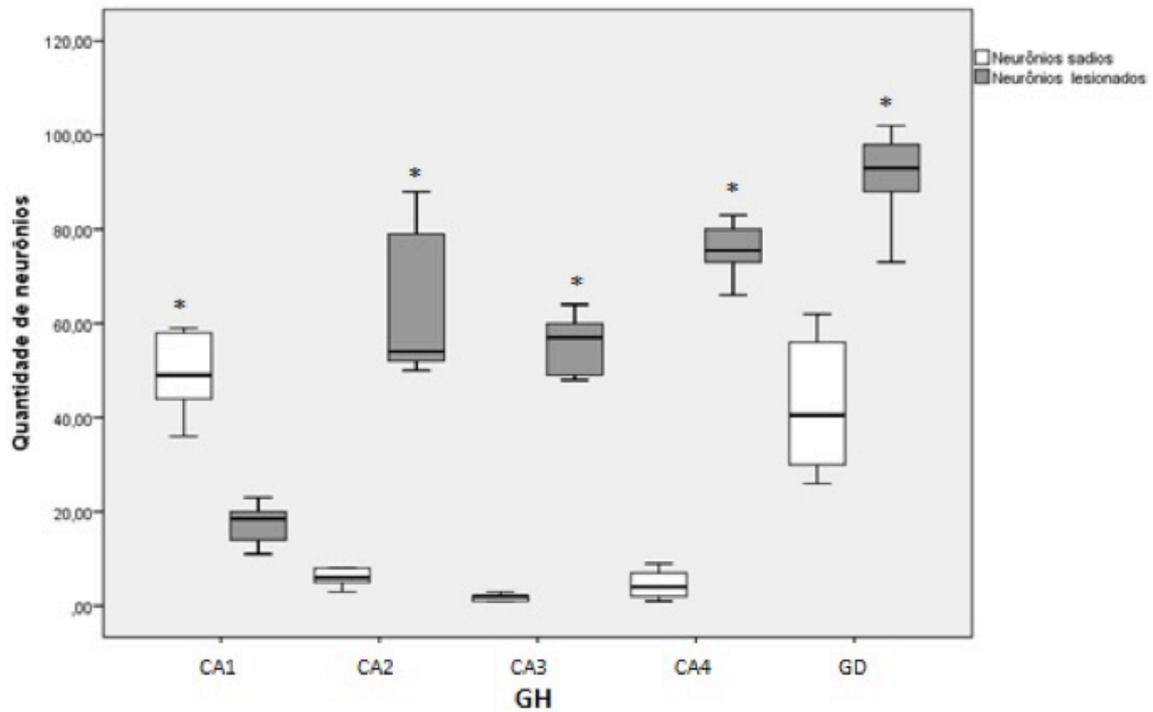


Figura 28 – Box-Plot da contagem do número de neurônios das quatro regiões do Hipocampo (CA1-CA4) de 6 ratas Wistar do GH, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em branco é apresentada a média de neurônios saudáveis nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. Em cinza encontram-se as médias de neurônios com lesão nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. O * indica a diferença estatisticamente significativa entre o número de neurônios saudáveis e lesionados ($p \leq 0,05$) (Fonte: a autora).

Na figura 29, observa-se a contagem de neurônios do GMa, na qual é possível verificar diferença significativa, prevalecendo os neurônios saudáveis em todas as áreas.

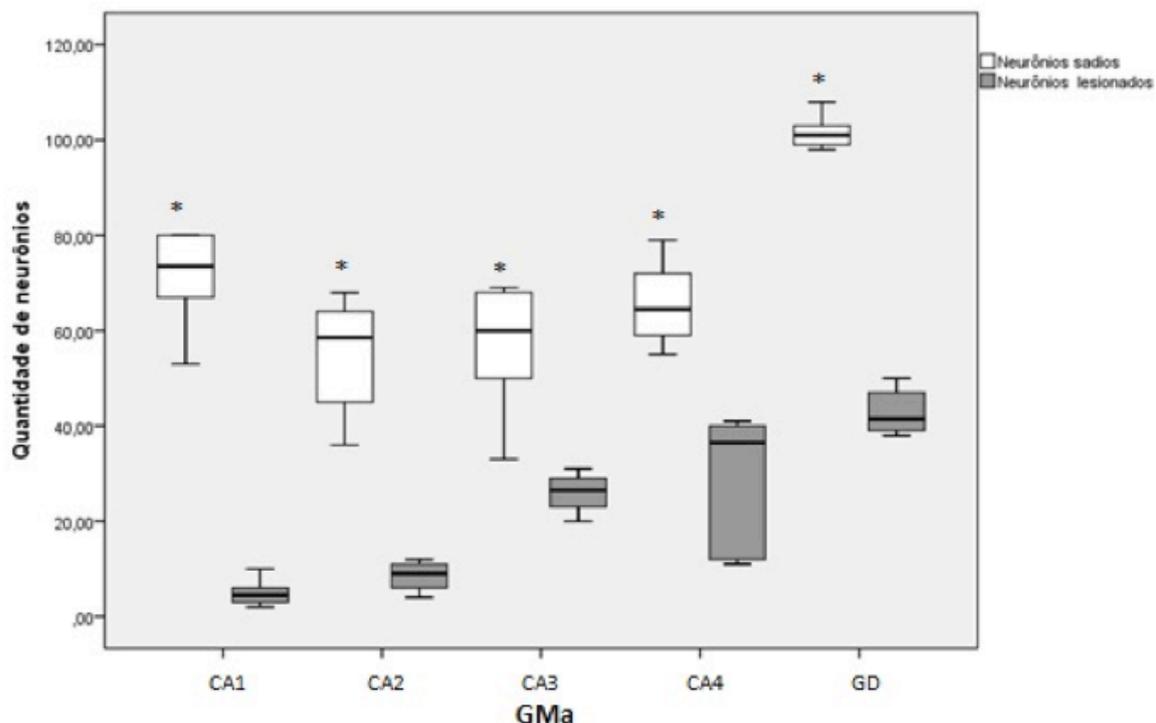


Figura 29 – Box-Plot da contagem do número de neurônios das quatro regiões do Hipocampo (CA1-CA4) de 6 ratas Wistar do GMa, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em branco é apresentada a média de neurônios saudáveis nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. Em cinza encontram-se as médias de neurônios com lesão nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. O * indica a diferença estatisticamente significativa entre o número de neurônios saudáveis e lesionados ($p \leq 0,05$) (Fonte: a autora).

Na figura 30, aparecem os dados de contagem de neurônios do GHMa. Neste grupo observou-se que nas áreas CA1, CA4 e GD predominaram os neurônios saudáveis, com diferença estatisticamente significativa para o número de neurônios lesionados. Na área CA3 predominaram os neurônios saudáveis, sem diferença estatística. Já nas áreas CA2 predominaram os neurônios lesionados.

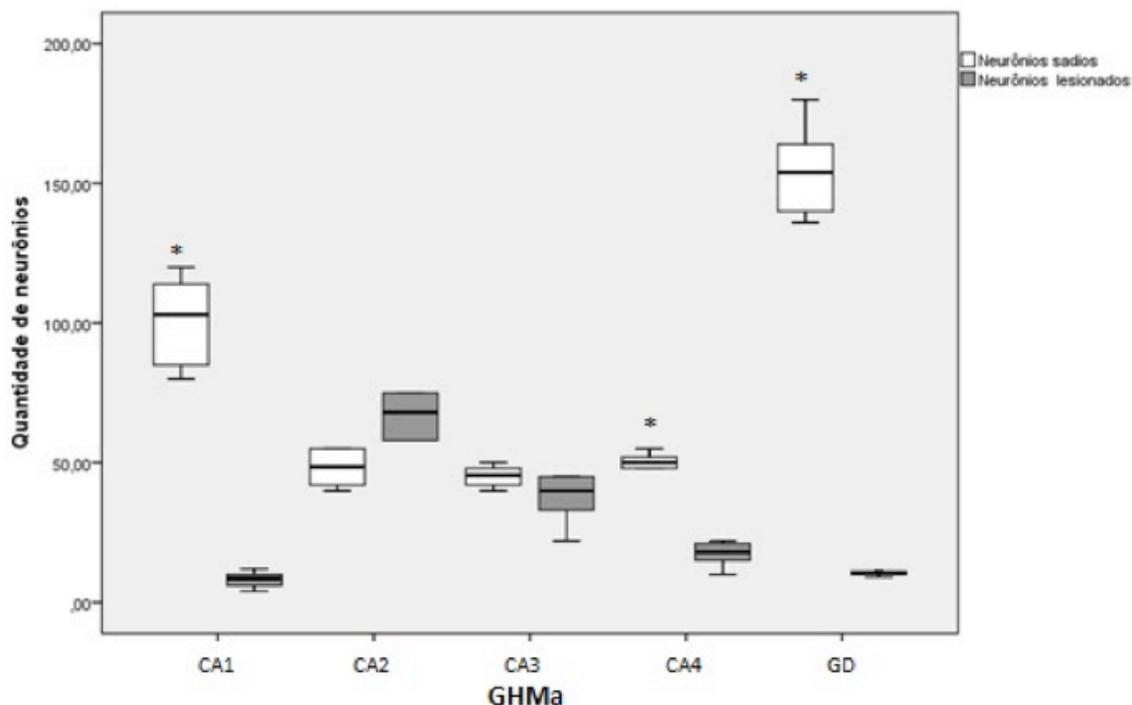


Figura 30 – Box-Plot da contagem do número de neurônios das quatro regiões do Hipocampo (CA1-CA4) de 6 ratas Wistar do GHMa, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em branco é apresentada a média de neurônios saudáveis nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. Em cinza encontram-se as médias de neurônios com lesão nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. O * indica a diferença estatisticamente significativa entre o número de neurônios saudáveis e lesionados ($p \leq 0,05$) (Fonte: a autora).

Na figura 31, observa-se a contagem de neurônios do GMc, na qual é possível verificar diferença significativa, prevalecendo os neurônios saudáveis em todas as áreas. Podendo ser verificada a mesma característica no GHMc (Figura 32).

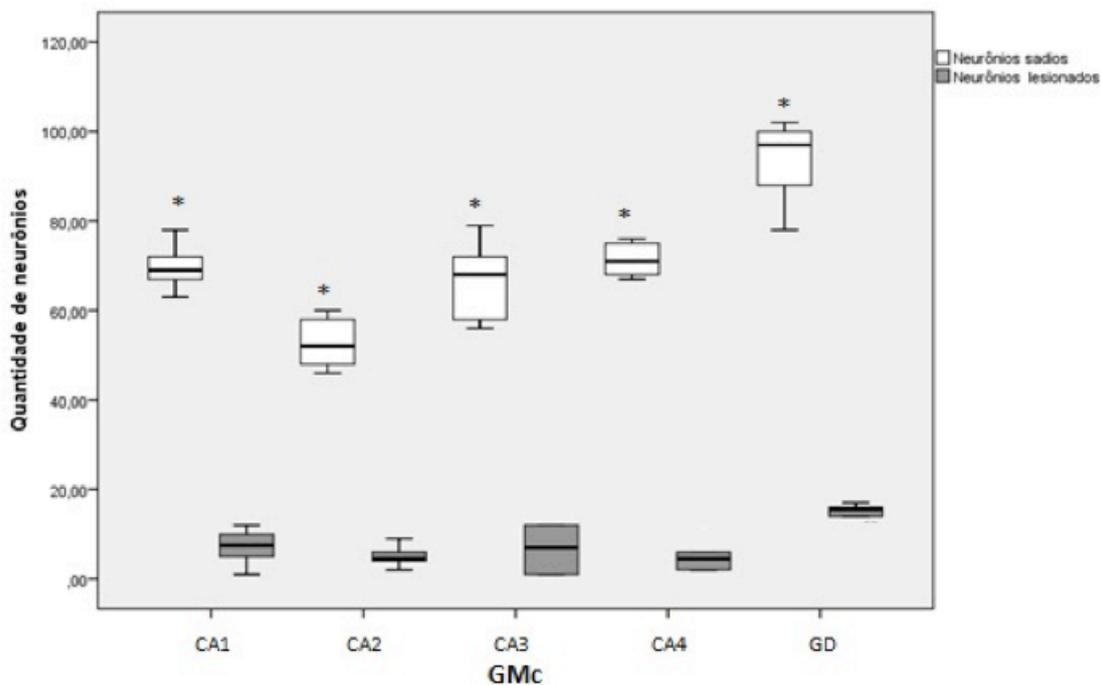


Figura 31 – Box-Plot da contagem do número de neurônios das quatro regiões do Hipocampo (CA1-CA4) de 6 ratos Wistar do GMC, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em branco é apresentada a média de neurônios saudios nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. Em cinza encontram-se as médias de neurônios com lesão nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. O * indica a diferença estatisticamente significativa entre o número de neurônios saudios e lesionados ($p \leq 0,05$) (Fonte: a autora).

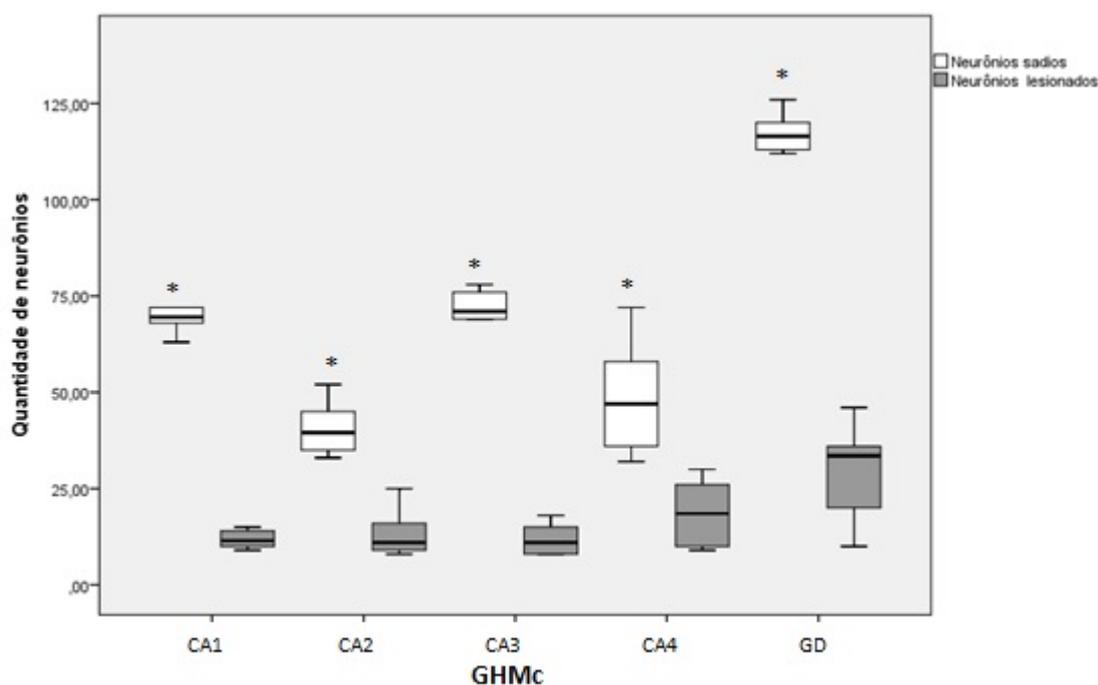


Figura 32 – Box-Plot da contagem do número de neurônios das quatro regiões do Hipocampo (CA1-CA4) de 6 ratos Wistar do GHMc, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em branco é apresentada a média de neurônios saudios nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. Em cinza encontram-se as médias de neurônios com lesão nas áreas CA1, CA2, CA3 e CA4. O * indica a diferença estatisticamente significativa entre o número de neurônios saudios e lesionados ($p \leq 0,05$) (Fonte: a autora).

A Figura 33 traz o Box-Plot da área CA1, com a contagem de neurônios saudios e lesionados dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc, GHMc. Sendo possível observar que nesta área, em todos os grupos, prevalece o número de neurônios saudios maior do que lesionados.

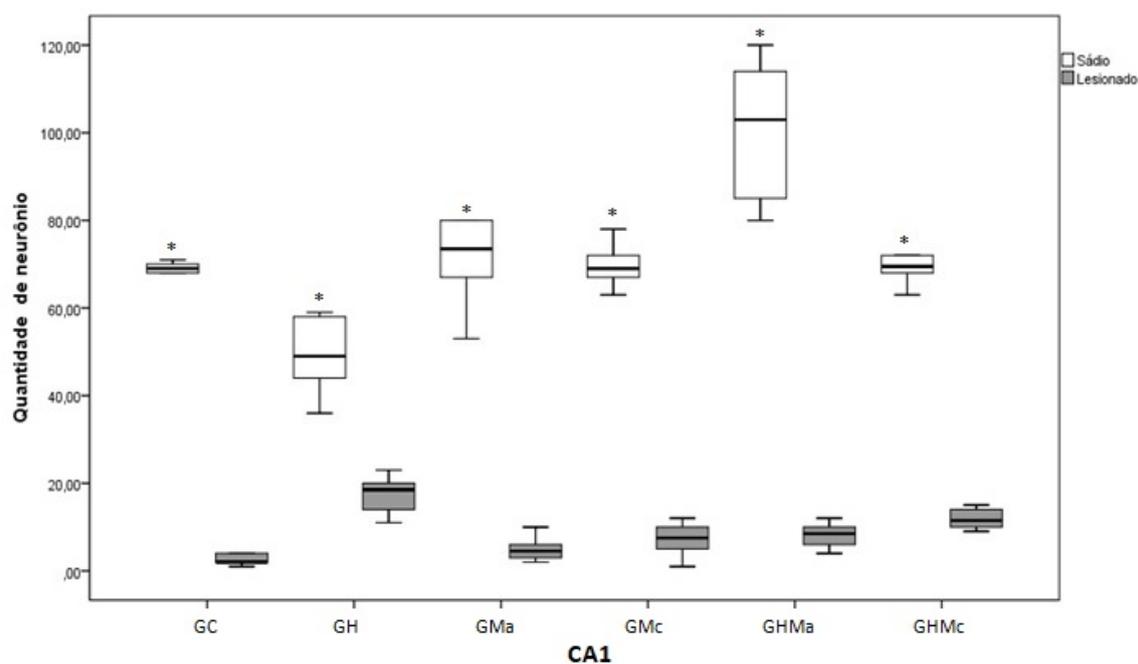


Figura 33 – Box-Plot da contagem do número de neurônios da região CA1 do Hipocampo, em separado, por área, de 36 ratas Wistar (n= 6 animais por grupo), dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc, GHMc, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em branco é apresentada a média de neurônios saudios na área CA1. Em cinza encontram-se as médias de neurônios com lesão na área CA1 (Fonte: a autora).

A Figura 34 apresenta o Box-Plot da área CA2, com a contagem de neurônios saudios e lesionados dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc, GHMc. Sendo possível verificar que apenas nos grupos GH e GHMa prevalecem o número maior de neurônios lesionados em relação aos saudios.

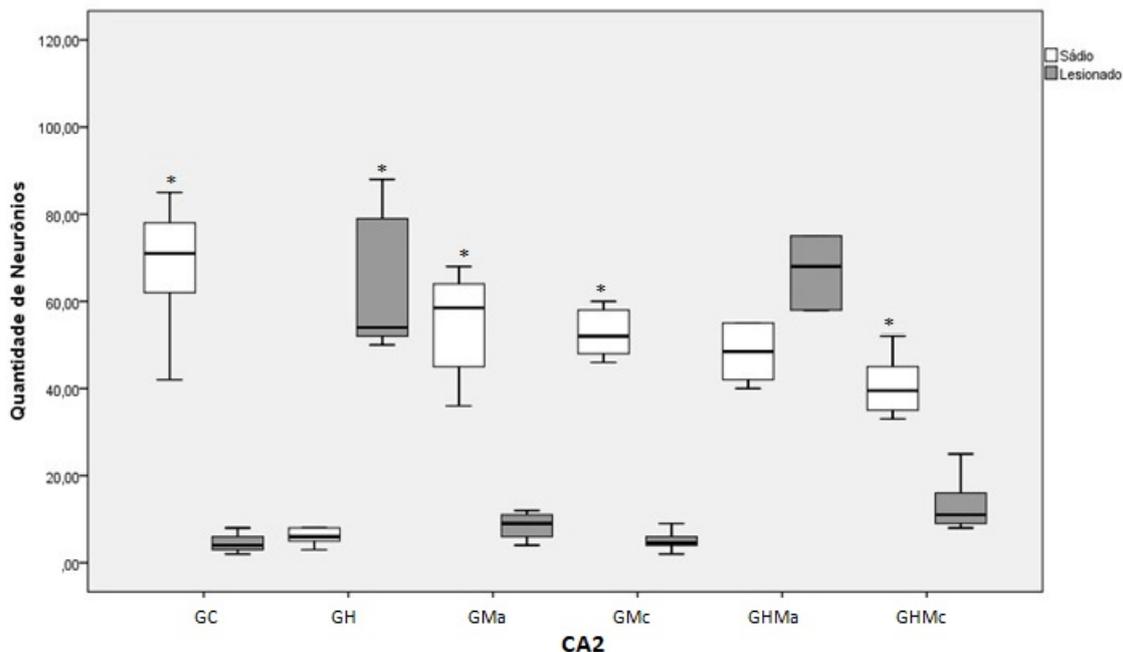


Figura 34 – Box-Plot da contagem do número de neurônios da região CA2 do Hipocampo, em separado, por área, de 36 ratos Wistar (n= 6 animais por grupo), dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc, GHMc, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em branco é apresentada a média de neurônios saudios na área CA2. Em cinza encontram-se as médias de neurônios com lesão na área CA2 (Fonte: a autora).

A Figura 35 apresenta o Box-Plot da área CA3, com a contagem de neurônios saudios e lesionados dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc, GHMc. Sendo possível observar que só houve predomínio de neurônios lesionados no grupo GH, para esta área.

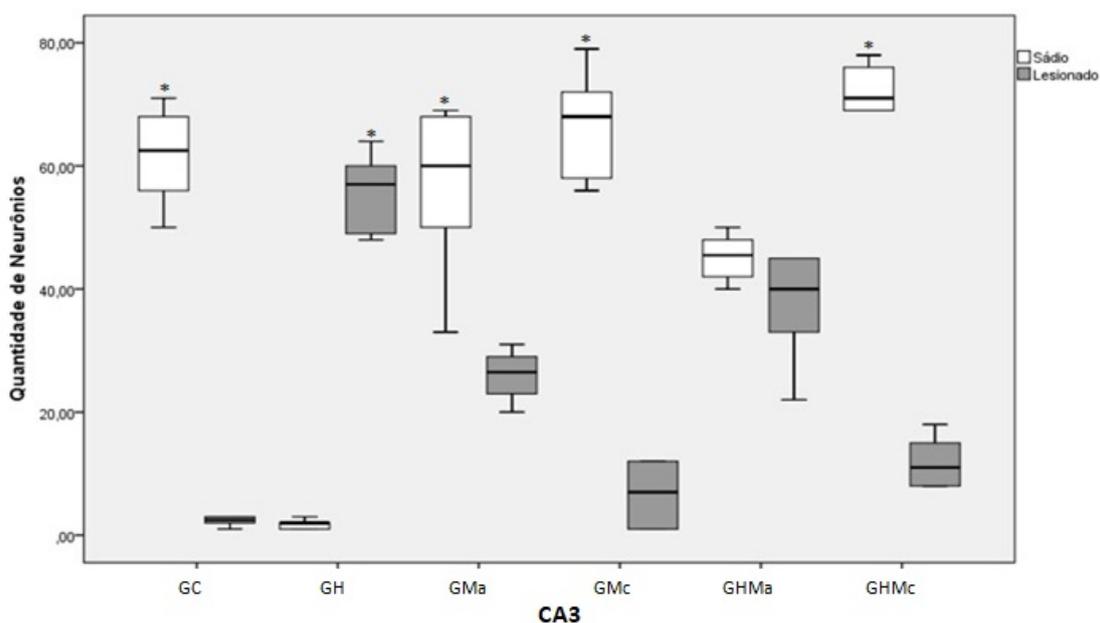


Figura 35 – Box-Plot da contagem do número de neurônios da região CA3 do Hipocampo, em separado, por área, de 36 ratos Wistar (n= 6 animais por grupo), dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc, GHMc, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em branco é apresentada a média de neurônios saudios na área CA3. Em cinza encontram-se as médias de neurônios com lesão na área CA3 (Fonte: a autora).

A Figura 36 tem-se o Box-Plot da área CA4, com a contagem de neurônios sadios e lesionados dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc, GHMc. Sendo possível observar que só houve predomínio de neurônios lesionados no grupo GH, nesta região.

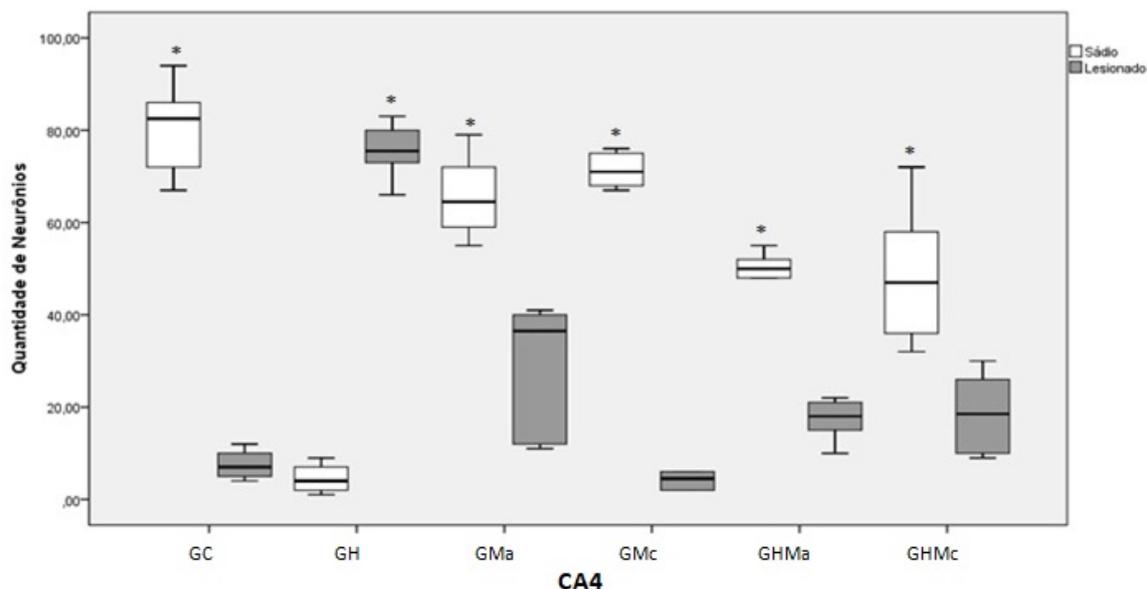


Figura 36 – Box-Plot da contagem do número de neurônios da região CA4 do Hipocampo, em separado, por área, de 36 ratos Wistar (n= 6 animais por grupo), dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc, GHMc, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em branco é apresentada a média de neurônios sadios na área CA4. Em cinza encontram-se as médias de neurônios com lesão na área CA4 (Fonte: a autora).

A Figura 37 apresenta o Box-Plot do giro denteado, com a contagem de neurônios sadios e lesionados dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc, GHMc. Sendo possível observar que só houve predomínio de neurônios lesionados no grupo GH, para esta área.

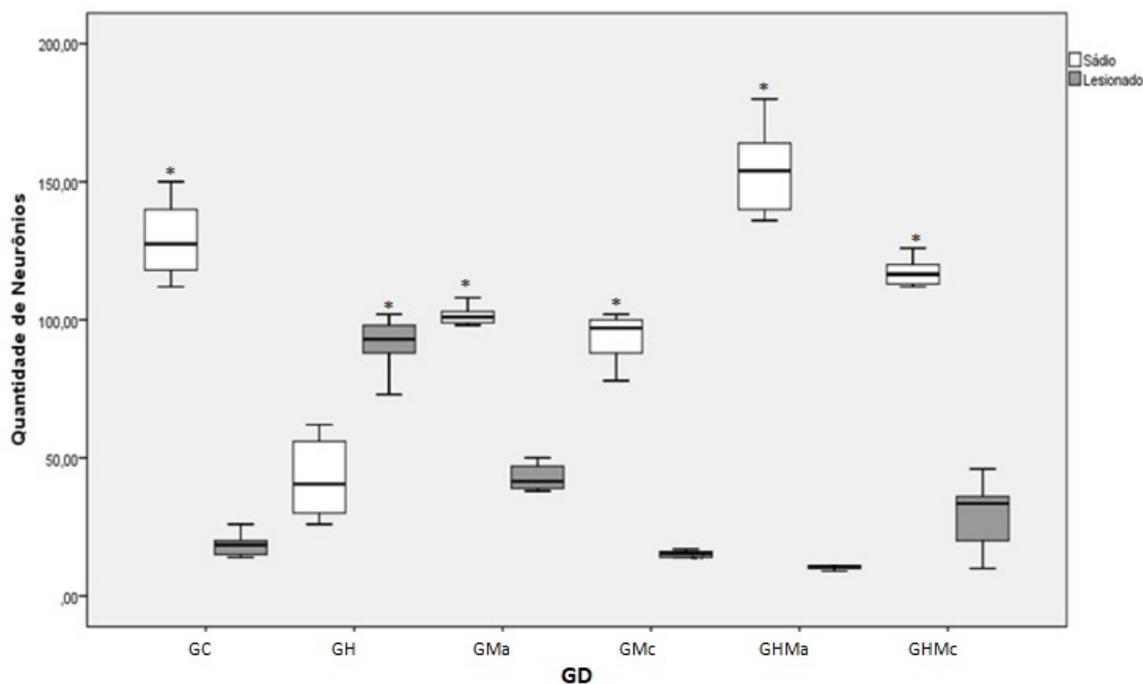


Figura 37 – Box-Plot da contagem do número de neurônios da região GD do Hipocampo, em separado, por área, de 36 ratas Wistar ($n=6$ animais por grupo), dos grupos GC, GH, GMa, GHMa, GMc, GHMc, os animais encontravam-se com 4 meses de idade. Em branco é apresentada a média de neurônios sadios na área GD. Em cinza encontram-se as médias de neurônios com lesão na área GD (Fonte: a autora).

Também foi realizada a análise da comparação dos dados do hipocampo intergrupo. Tendo sido realizadas duas categorias de comparações diferentes. Na primeira, verificou-se a diferença nos testes entre os grupos GC x GH; GMa x GHMa e GMc x GHMc (Tabelas 10, 11 e 12, respectivamente). E também, comparou-se os resultados entre os grupos GC x GMa x GMc e GH x GHMa x GHMc (Tabelas 13 e 14). No intuito de analisar o impacto da hipóxia e da música, de maneira mais detalhada, sobre o desempenho dos grupos. De acordo com os dados apresentados existe diferença significativa intergrupo nas cinco áreas do hipocampo entre o número de neurônios sadios e o número de lesionados ($p \leq 0,05$). Neste tópico a análise de comparação entre dois grupos independentes foi realizada pelo teste t-Student para os dados normais e para aqueles que não seguem normalidade o teste não-paramétrico de Mann Whitney, conforme tabelas apresentadas abaixo.

Na Tabela 10 verifica-se a contagem de neurônios sadios e lesionados destacando-se a comparação entre os grupos controle e hipóxia. É possível verificar que com exceção da área CA1, na qual predominam neurônios sadios

em ambos os grupos, as demais áreas apresentam-se com muitos neurônios lesionados no grupo que sofreu a lesão encefálica, com destaque para as áreas CA2 e CA3 na qual há diferença estatística entre os grupos.

Tabela 10 – Dados referentes o Número de Neurônios de cinco áreas do Hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4 e GD) de 12 ratos Wistar no momento pós – hipóxia do grupos GH, os animais estavam com 4 meses. E o p-valor intergrupo.

Grupo		GC		GH		P-Valor
Área		Média	Erro-Padrão	Média	Erro-Padrão	
CA1	Sadio	67,83	1,64	49,17	3,27	0,00*
	Lesionado	2,50	3,85	17,50	1,89	0,00*
CA2	Sadio	68,17	0,50	6,00	0,85	0,03*
	Lesionado	4,50	3,26	62,83	4,97	0,00*
CA3	Sadio	61,67	9,36	1,83	3,98	0,00*
	Lesionado	3,00	2,15	55,83	2,11	0,00*
CA4	Sadio	80,67	0,92	4,50	1,25	0,07
	Lesionado	7,50	5,55	75,50	3,77	0,21
GD	Sadio	129,17	7,03	42,50	8,42	0,81
	Lesionado	18,67	2,16	91,17	5,13	0,13

GC= grupo controle, GH= grupo hipóxia. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 11 verifica-se a diferença de contagem de neurônios entre os grupos que receberam o protocolo de música aguda, com e sem lesão. De formas que, destaca-se no GHMa as áreas CA1 e GD que apresentam, número maior de neurônios sadios em comparação com o grupo GMa. É possível verificar também que, com a exceção da área CA2, em todas as demais áreas, o grupo GHMa apresenta número maior de neurônios sadios que lesionados. Podendo indicar um potencial reparador da música aguda sobre estes neurônios, pós lesão encefálica.

Tabela 11 – Dados referentes o Número de Neurônios de cinco áreas do Hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4 e GD) de 12 ratas Wistar no momento pós – hipóxia / música dos grupos GMa e GHMa, os animais estavam com 4 meses. E o p-valor intergrupo.

Grupo Área		GMa		GHMa		P-Valor
		Média	Erro- Padrão	Média	Erro- Padrão	
CA1	Sadio	75,50	8,23	100,83	8,17	0,70
	Lesionado	5,00	1,42	8,17	1,43	0,87
CA2	Sadio	55,00	6,13	51,67	7,25	0,94
	Lesionado	8,50	1,54	63,50	15,09	0,08
CA3	Sadio	56,67	6,45	45,17	1,53	0,05
	Lesionado	26,00	2,00	37,50	4,57	0,08
CA4	Sadio	65,67	4,36	47,83	4,05	0,00*
	Lesionado	29,50	7,05	17,33	2,23	0,00*
GD	Sadio	101,67	1,35	154,67	8,14	0,02*
	Lesionado	42,83	2,42	10,67	0,76	0,02*

GMa= grupo música aguda; GHMa= grupo hipóxia + música aguda. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 12 é apresentado o resultado da contagem de neurônios nos grupos que ouviram música crônica, com e sem lesão encefálica. Sendo possível observar que o GHMc apresenta maior número de neurônios sadios, que o GMc nas regiões CA1, CA3 e GD. Sendo possível também verificar que em todas as áreas, há mais neurônios saudáveis que lesionados, neste grupo. Havendo indicação que a música crônica também pode agir no sentido de reverter os efeitos da hipóxia.

Tabela 12– Dados referentes o Número de Neurônios de cinco áreas do Hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4 e GD) de 12 ratas Wistar no momento pós – hipóxia / música dos grupos GMc e GHMc, os animais estavam com 4 meses. E o p-valor intergrupo.

Grupo		GMc		GHMc		P-Valor
		Média	Erro-Padrão	Média	Erro-Padrão	
CA1	Sadio	69,67	3,25	70,17	2,68	0,93
	Lesionado	7,17	1,42	11,83	1,16	0,37
CA2	Sadio	52,67	3,33	40,67	3,48	0,90
	Lesionado	5,00	1,17	13,33	3,16	0,08
CA3	Sadio	66,83	4,33	69,67	4,44	0,74
	Lesionado	6,67	2,59	11,83	2,01	0,32
CA4	Sadio	71,33	1,91	48,67	7,36	0,05
	Lesionado	5,33	2,04	18,67	4,16	0,14
GD	Sadio	93,67	4,53	117,33	2,69	0,19
	Lesionado	14,33	1,64	29,83	6,40	0,02*

GMc= grupo música crônica; GHMc= grupo hipóxia + música crônica. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Quando estabeleceu-se a comparação entre os grupos controle e os que receberam música, fica evidente que o primeiro apresentou melhores números de neurônios saudáveis nas áreas CA2, CA4 e GD, de forma que, é possível gerar a hipótese de que, para animais saudáveis, a música não teve o efeito neurogênico pensado. Na área CA1, os grupos que receberam música apresentaram melhor contagem e na área CA3 o destaque deu-se no grupo música crônica.

Tabela 13 – Dados referentes o Número de Neurônios de cinco áreas do Hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4 e GD) de 18 ratas Wistar no momento pós – hipóxia / música dos grupos GC, GMa e GMc, os animais estavam com 4 meses. E o p-valor intergrupo.

Grupos		GC		GMa		GMc		P-Valor
		Média	Erro-Padrão	Média	Erro-Padrão	Média	Erro-Padrão	
CA1	Sadio	67,83	1,64	75,50	8,23	69,67	3,25	0,50
	Lesionado	2,50	3,85	5,00	1,42	7,17	1,42	0,06
CA2	Sadio	68,17	0,50	55,00	6,13	52,67	3,33	0,08
	Lesionado	4,50	3,26	8,50	1,54	5,00	1,17	0,04*
CA3	Sadio	61,67	9,36	56,67	6,45	66,83	4,33	0,27
	Lesionado	3,00	2,15	26,00	2,00	6,67	2,59	0,00*
CA4	Sadio	80,67	0,92	65,67	4,36	71,33	1,91	0,02*
	Lesionado	7,50	5,55	29,50	7,05	5,33	2,04	0,01*
GD	Sadio	129,17	7,03	101,67	1,35	93,67	4,53	0,00*
	Lesionado	18,67	2,16	42,83	2,42	14,33	1,64	0,00*

GC= grupo controle; GMa= grupo música aguda; GMc= grupo música crônica. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

E os dados de comparação entre os grupos que sofreram a intoxicação por NaNO₂ são apresentados na Tabela 14. Na qual verifica-se que o grupo que recebeu música aguda apresentou contagem de neurônios saudáveis mais importante e significativa que o grupo que apenas sofreu a hipóxia e música crônica. Especialmente nas áreas, CA1, CA3, CA4 e GD, o grupo GHMa apresentou número maior de neurônios saudáveis que lesionados. De forma que, sugere-se que a música aguda pode agir de maneira positiva sobre os aspectos de recuperação das regiões do hipocampo após lesão encefálica. Já o grupo GHMc apresentou sempre maior número de neurônios lesionados, incluindo a área CA1.

Tabela 14 – Dados referentes o Número de Neurônios de cinco áreas do Hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4 e GD) de 18 ratos Wistar no momento pós – hipóxia / música dos grupos GH, GHMa e GHMc, os animais estavam com 4 meses. E o p-valor intergrupo.

Grupo		GH		GHMa		GHMc		P-Valor
		Média	Erro-Padrão	Média	Erro-Padrão	Média	Erro-Padrão	
CA1	Sadio	49,17	3,27	100,83	8,17	11,83	2,68	0,00*
	Lesionado	17,50	1,89	8,17	1,43	70,17	1,16	0,00*
CA2	Sadio	6,00	0,85	51,67	7,25	13,33	3,48	0,00*
	Lesionado	62,83	4,97	63,50	15,09	40,67	3,16	0,00*
CA3	Sadio	1,83	3,98	45,17	1,53	11,83	4,44	0,00*
	Lesionado	55,83	2,11	37,50	4,57	69,67	2,01	0,00*
CA4	Sadio	4,50	1,25	47,83	4,05	18,67	7,36	0,00*
	Lesionado	75,50	3,77	17,33	2,23	48,67	4,16	0,00*
GD	Sadio	42,50	8,42	154,67	8,14	29,83	2,60	0,00*
	Lesionado	91,17	5,13	10,67	0,76	117,33	6,40	0,00*

GH= grupo hipóxia; GHMa= grupo hipóxia + música aguda; GHMc= grupo hipóxia + música crônica. Nível de confiança adotado foi 95% e erro de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

As Figuras 38, 39, 40, 41 e 42, por sua vez, são apresentadas as imagens histológicas comparativas entre as características das áreas CA1, CA2, CA3, CA4 e GD respectivamente, do hipocampo de um animal do GC (A), de um animal do GH (B), de uma animal do grupo música aguda (C), de um animal do grupo hipóxia + música aguda (GHMa), de um animal do grupo música crônica (GMc) e de um animal do grupo hipóxia + música crônica (GHMc). Sendo possível verificar as áreas de preservação e de lesão que apareceram em cada grupo. E a figura 43 apresenta as imagens de um corte de cerebelo, de cada grupo.

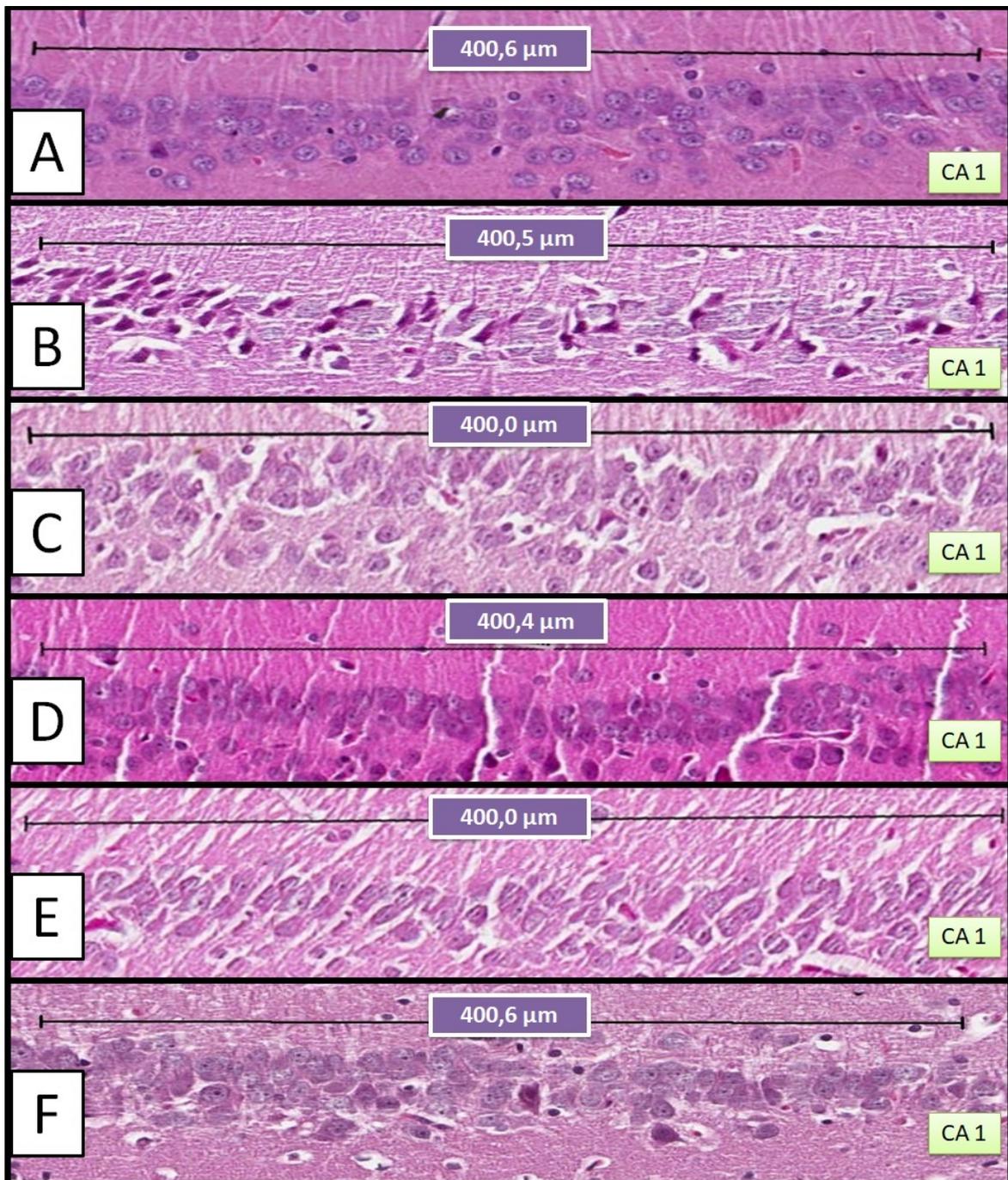


Figura 38 – Imagens histológicas da área CA1 do hipocampo. No campo A encontra-se a área CA1 de um animal do GC, na B do GH, na C do GMa, na D do GHMa, no E do GMc e no F do GHMc. O aumento de 16,6 x. A medida realizada em aproximadamente 400 μm. Observa-se que as lâminas do GH apresentam mais células lesionadas que saudáveis. Nos demais grupos é possível observar que há mais células saudáveis que células lesionadas, porém é possível detectar algumas células com núcleo hiper cromático retraído com citoplasma eosinofílico evoluindo para morte celular em todos os grupos, com maior ocorrência nos grupos que sofreram hipóxia (Fonte: a autora).

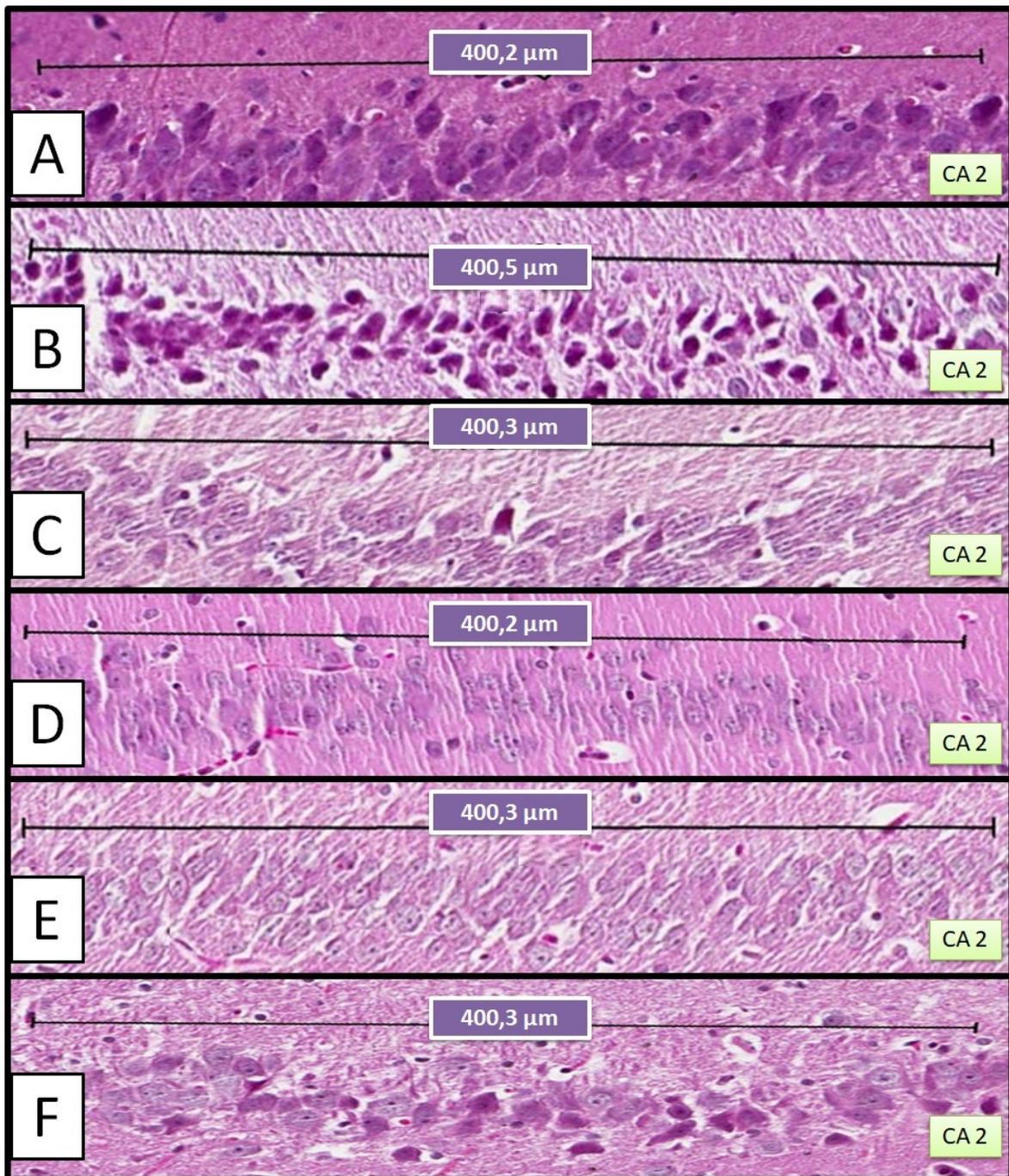


Figura 39 – Imagens histológicas da área CA2 do hipocampo. No campo A encontra-se a área CA2 de um animal do GC, na B do GH, na C do GMa, na D do GHMa, no E do GMc e no F do GHMc. O aumento de 16,6 x. A medida realizada em aproximadamente 400 μm. Observa-se que as lâminas do GH apresentam mais células lesionadas que sadias. Nos demais grupos é possível observar que há mais células sadias que células lesionadas, porém é possível detectar algumas células com núcleo hiper cromático retraído com citoplasma eosinofílico evoluindo para morte celular em todos os grupos, com maior ocorrência nos grupos que sofreram hipóxia (Fonte: a autora).

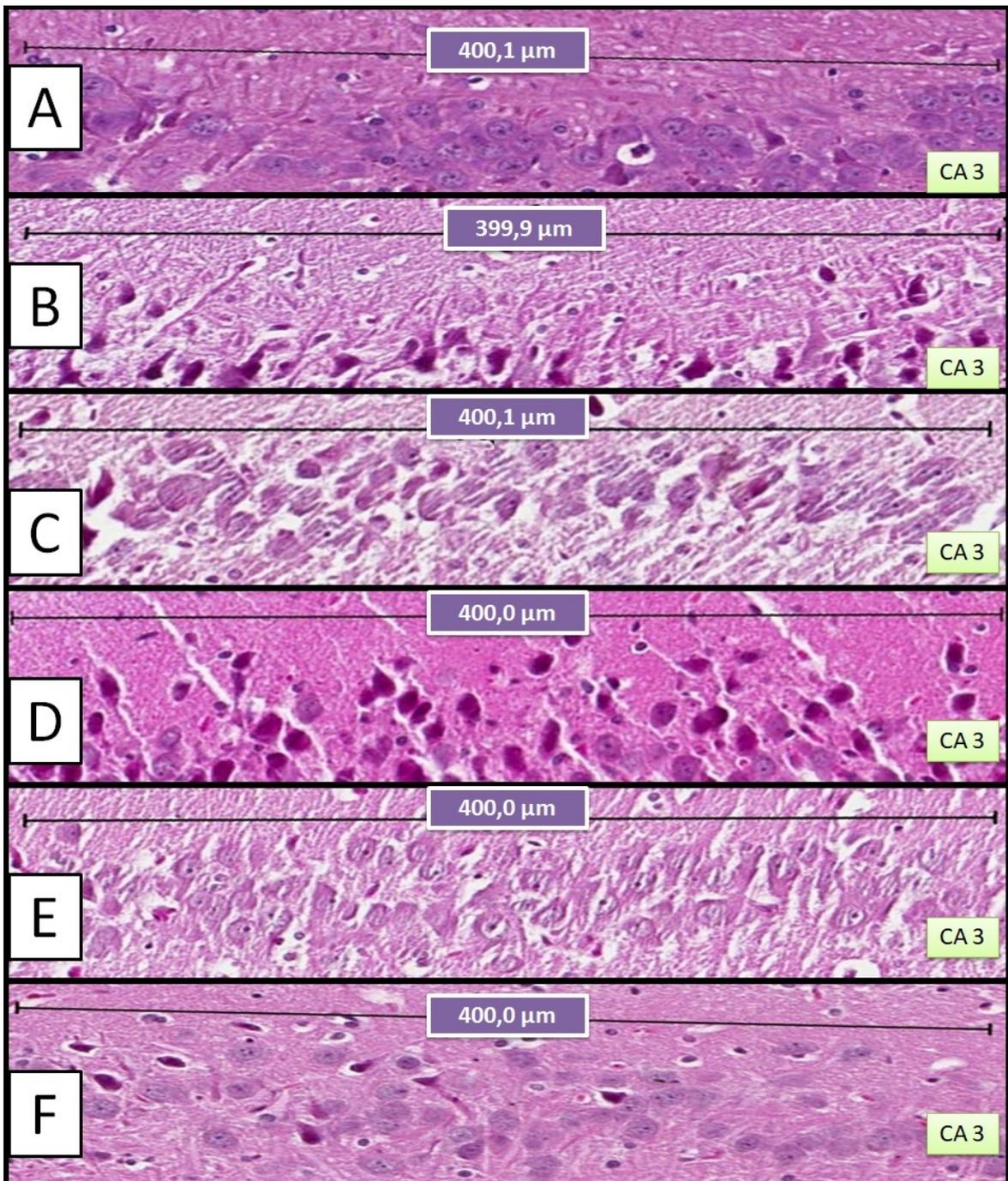


Figura 40 – Imagens histológicas da área CA3 do hipocampo. No campo A encontra-se a área CA3 de um animal do GC, na B do GH, na C do GMa, na D do GHMa, no E do GMc e no F do GHMc. O aumento de 16,6 x. A medida realizada em aproximadamente 400 μm . Observa-se que as lâminas do GH apresentam mais células lesionadas que saudáveis. Nos demais grupos é possível observar que há mais células saudáveis que células lesionadas, porém é possível detectar algumas células com núcleo hiper cromático retraído com citoplasma eosinofílico evoluindo para morte celular em todos os grupos, com maior ocorrência nos grupos que sofreram hipóxia (Fonte: a autora).

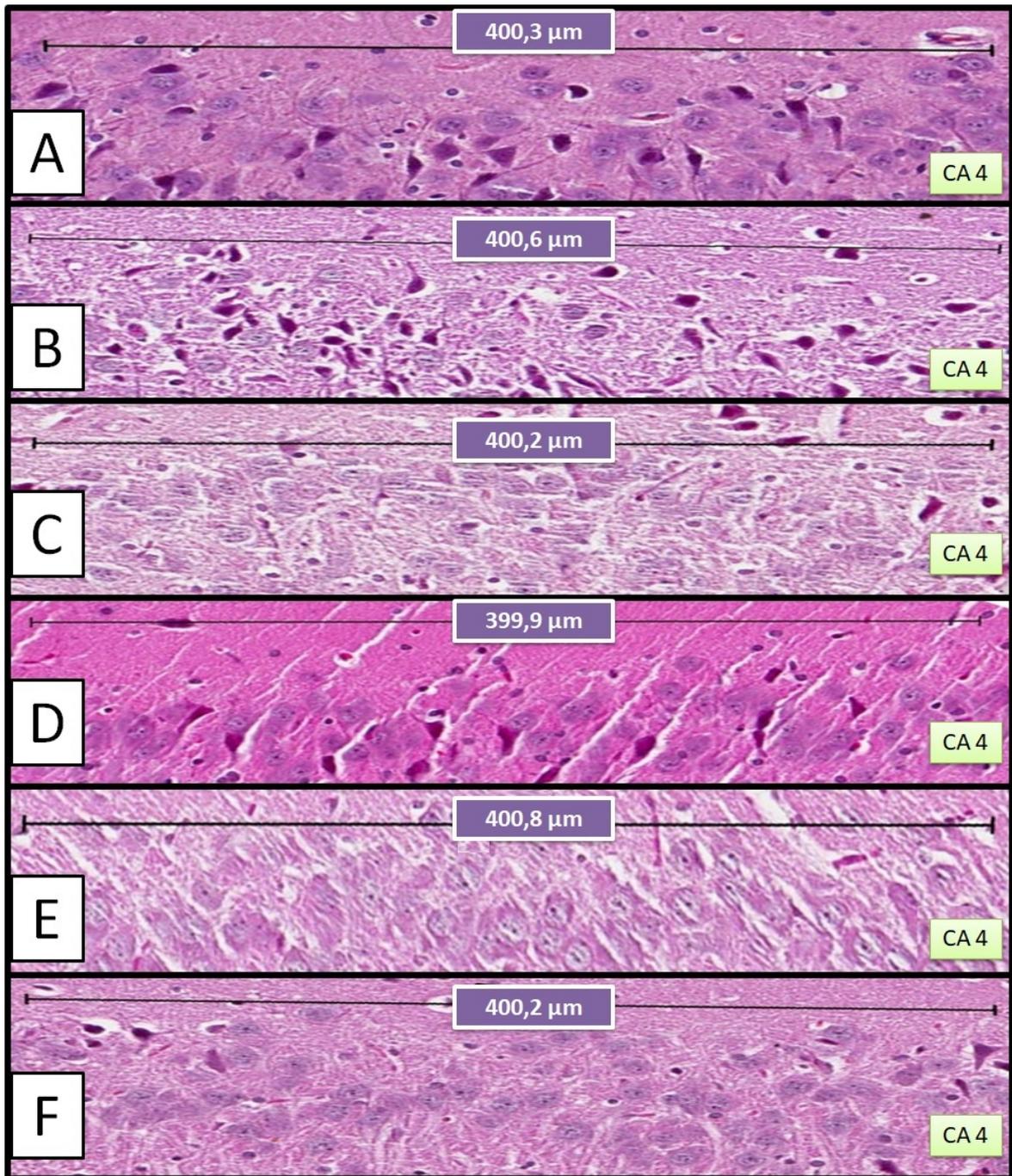


Figura 41 – Imagens histológicas da área CA4 do hipocampo. No campo A encontra-se a área CA4 de um animal do GC, na B do GH, na C do GMa, na D do GHMa, no E do GMc e no F do GHMc. O aumento de 16,6 x. A medida realizada em aproximadamente 400 μm. Observa-se que as lâminas do GH apresentam mais células lesionadas que saudáveis. Nos demais grupos é possível observar que há mais células saudáveis que células lesionadas, porém é possível detectar algumas células com núcleo hiper cromático retraído com citoplasma eosinofílico evoluindo para morte celular em todos os grupos, com maior ocorrência nos grupos que sofreram hipóxia (Fonte: a autora).

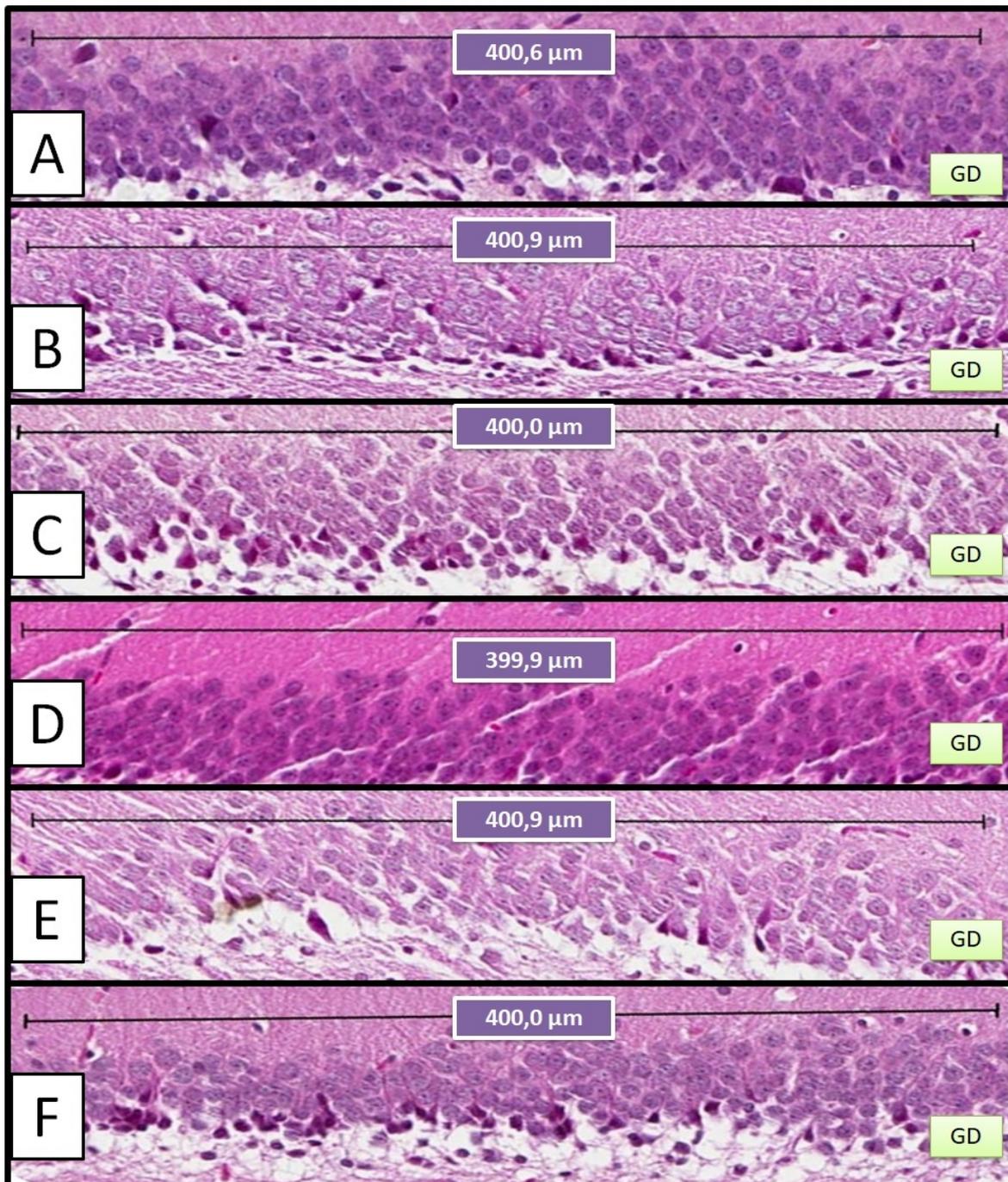


Figura 42 – Imagens histológicas da área GD do hipocampo. No campo A encontra-se a área GD de um animal do GC, na B do GH, na C do GMa, na D do GHMa, no E do GMc e no F do GHMc. O aumento de 16,6 x. A medida realizada em aproximadamente 400 μm . Observa-se que as lâminas do GH apresentam mais células lesionadas que saudáveis. Nos demais grupos é possível observar que há mais células saudáveis que células lesionadas, porém é possível detectar algumas células com núcleo hiper cromático retraído com citoplasma eosinofílico evoluindo para morte celular em todos os grupos, com maior ocorrência nos grupos que sofreram hipóxia (Fonte: a autora).

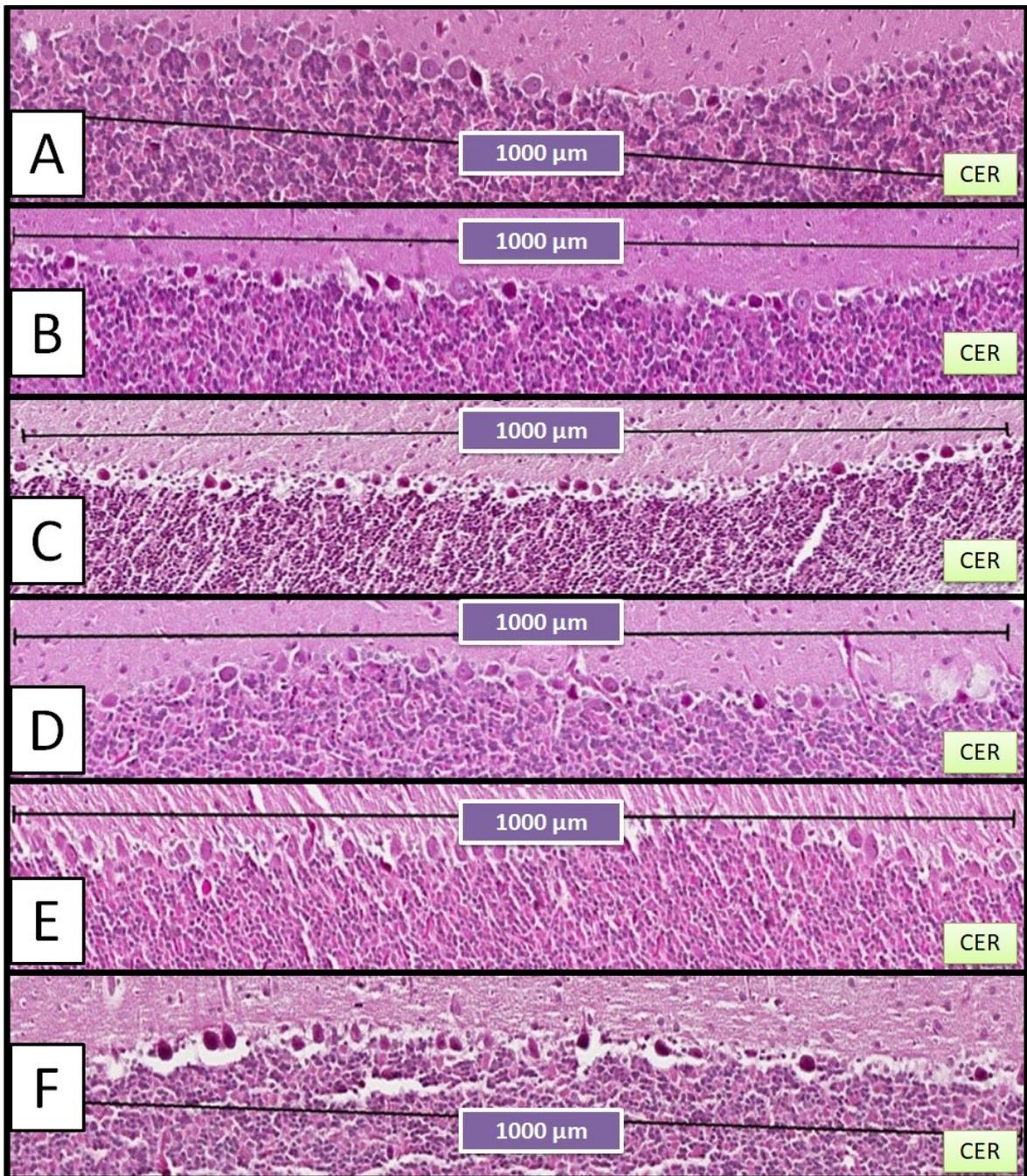


Figura 43 – Imagens histológicas do o Cerebelo. No campo A encontra-se a área do cerebelo de um animal do GC, na B do GH, na C do GMa, na D do GHMa, no E do GMc e no F do GHMc. O aumento de 9 x. A medida realizada em aproximadamente 1000 µm. Observa-se que as lâminas do GH apresentam mais células lesionadas que saudáveis. Nos demais grupos é possível observar que há mais células saudáveis que células lesionadas, porém é possível detectar algumas células com núcleo hiper cromático retraído com citoplasma eosinofílico evoluindo para morte celular especialmente no grupo F (Fonte: a autora)

5 DISCUSSÃO

Após a análise dos dados do experimento, foi possível verificar que houve diferença nos dados biométricos, nas variáveis relativas aos comportamentos sugestivos de ansiedade e de depressão e também nas imagens histológicas do cerebelo e do hipocampo entre os grupos.

De maneira genérica, constatou-se que os grupos que sofreram hipóxia tiveram desempenho comportamental pior em relação a ansiedade e a depressão e também imagens histológicas com maior número de neurônios com sinais de lesões quando comparados aos grupos controles, ou seja, que não sofreram hipóxia. Porém, os animais que sofreram hipóxia e receberam os protocolos de música seja aguda, seja crônica apresentaram melhores resultados, tanto comportamentais quanto histológicos e bioquímicos, desta maneira, pode-se entender que a musicoterapia deve ter agido de forma a melhorar os achados encontrado nestes grupos.

A hipóxia isquêmica encefálica é capaz de promover uma série de alterações estruturais e bioquímicas sobre os neurônios, prejudicando o seu funcionamento habitual. Como consequência do evento isquêmico ocorrem reações em duas fases. Na primeira fase, a morte celular acontece por necrose logo após o estímulo lesivo. Podendo, acontecer, morte imediata tanto de neurônios quanto de células da glia, decorrentes de estímulos severos. Já na segunda fase, a morte celular ocorre por apoptose, ao longo de horas ou dias depois do evento causador da hipóxia e tanto a sobrecarga de cálcio quanto a de neurotransmissores excitotóxicos podem desencadear a apoptose. A morte neuronal tardia e a morte neuronal mais imediata parecem estar no mesmo contínuo de eventos celulares (KHAN, 2015; ROSENBLUM, 1997). No presente estudo, verificou-se, por meio da análise das lâminas histológicas que houve tanto lesão neuronal por necrose, quanto por apoptose. Portanto, a dose de Nitrito aplicada no protocolo de pesquisa foi adequada e efetiva para promover os danos necessários para o desenvolvimento do estudo, corroborando com os achados de Ribeiro et al. (2017).

Além dos efeitos da necrose e da apoptose é possível que haja a influencia das EROS, no desenvolvimento das lesões verificadas no hipocampo e no córtex cerebelar das ratas estudadas. Embora na atual pesquisa este evento não tenha sido investigado, Huang et al. (2015) realizaram um experimento provocando a hipóxia isquêmica em câmara de CO₂, e propuseram verificar a ação protetora da melatonina. Os autores concluíram que, a hipóxia induziu o aumento de EROS no tecido encefálico, especialmente no hipocampo, e que a melatonina foi efetiva em diminuir tais danos.

O estudo dos efeitos da hipóxia experimental no encéfalo e a aplicação de diferentes formas de tratamento, medicamentosos ou não, já foi realizado por diferentes autores ao longo do tempo, representando um importante ramo da ciência que busca explorar, especialmente, novos conhecimentos e diferentes formas de tratamento a serem empregadas nas lesões isquêmicas. Isto porque, este tipo de estudo permite explorar áreas e técnicas que não seriam possíveis em humanos, e ainda permitem estabelecer inferências e relações com possíveis alterações semelhantes que ocorram em pessoas (HUANG et al., 2015; KHAN, 2015; LI et al., 2013; ZHOU et al., 2013).

Neste contexto, o potencial da aplicação da musicoterapia nas lesões por hipóxia, é imenso. Uma vez que, a música pode agir de diferentes formas nos processos fisiológicos, mentais, emocionais e físicos. De forma que a terapia com música, como método terapêutico, tem atingido diferentes vias de interpretação cortical, sendo possível ser associada ao tratamento medicamento tradicional, como adjuvante em diferentes doenças e alterações, especialmente as comportamentais (ANTORVEZA, 2017).

Diante do potencial da música enquanto terapia e da extensão dos dados encontrados no presente estudo, decidiu-se por dividir a discussão em tópicos, que serão apresentados na sequência, a saber, análise e interpretação dos dados biométricos, análise e interpretação das variáveis comportamentais, análise e discussão dos achados bioquímicos e por fim, análise e interpretação dos achados histológicos.

5.1 DADOS BIOMÉTRICOS

Quando analisados o peso dos encéfalos dos animais que participaram do estudo foi possível notar diferença estatística entre os grupos, o grupo que apenas teve hipóxia foi aquele que apresentou piores valores, quando comparados ao grupo controle e aos grupos que receberam música. Sendo possível relacionar este achado com o fato de que quando ocorre o processo de morte e degeneração neuronal é comum que o número de neurônios seja reduzido e que, conseqüentemente, o encéfalo passe por transformações morfométricas (MEHRABI et al., 2016).

Quando, especificamente, comparado o peso do encéfalo entre grupos controle e hipóxia verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre o peso encontrado. O GH apresentou os menores valores, possibilitando a inferência de que a hipóxia sofrida pelos animais pode ter sido suficiente para promover perda neuronal importante. Estes achados corroboram com estudo que observou que, após a hipóxia isquêmica provocada por clampeamento da artéria carótida direita, o cérebro dos animais apresentaram diminuição de proporção e de peso, assim como a densidade neuronal na região do tálamo e do hemisfério cerebral direito (XU et al., 2016).

Quando comparado o peso do encéfalo entre o grupo controle e os grupos que receberam música (GMA e GMc). O grupo controle apresentou valores mais elevados, indo contra a hipótese inicial, de que os grupos que receberiam música apresentariam valores mais elevado. A música possui potencial neurogênico (FUKUI; TOYOSHIMA, 2008), no entanto, embora no presente estudo, tenha sido identificadas alterações histológicas, o peso do encéfalo dos animais que receberam música não foi alterado de maneira significativa.

Os grupos que sofreram hipóxia e receberam música (GHMa e GHMc) apresentaram peso do encéfalo maior, com diferença estatística para os grupos que apenas receberam música. Podendo indicar, que embora tendo havido a lesão, comprovada pelas imagens histológicas, é possível supor que tenha havido

um estímulo importante para a neogênese neuronal. O estresse e a hipóxia, por si só, podem ser fatores que podem induzir a plasticidade neural (THORNTON et al., 2017). De forma que, é possível inferir que a combinação da música com o estímulo desencadeado pela hipóxia tenha sido importante para este resultado.

Quando considera-se as alterações morfométricas verificadas e inicia-se a investigação dos resultados relativos ao comportamento similar a ansiedade e a depressão dos animais do presente estudo, pode-se iniciar a associação destes eventos. Para Broshek; de Marco; Freeman (2015) existe relação positiva entre volume hipocampal e alterações comportamentais relacionadas a ansiedade. Tais autores sugeriram que qualquer alteração no volume, na estrutura ou na função do hipocampo podem agir como gatilho para o desenvolvimento de comportamentos ansiogênicos. De forma que, tais afirmações vão de encontro com a pesquisa atual que também verificou a lesão das estruturas do hipocampo e a ocorrência de alterações comportamentais, com característica de comportamentos sugestivos de depressão e ansiogênicos nos animais que sofreram intoxicação por NaNO₂.

5.2 VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS

Por meio da análise das variáveis comportamentais estudadas, foi possível verificar que a lesão encefálica provocada pela hipóxia, desencadeou comportamento ansiogênico nos animais. A fim de estabelecer uma relação entre os achados verificados na presente pesquisa e seres humanos, alterações mentais e comportamentais podem surgir como consequência de diversos tipos de doenças encefálicas, tais como o acidente vascular encefálico, a doença de Parkinson e a epilepsia (RAGLIO et al., 2015). De forma que, é possível que a alteração comportamental observada sobretudo no GH, pôde ter sido provocada pela hipóxia isquêmica encefálica induzida experimentalmente por meio da aplicação de NaNO₂.

Diversas análises puderam ser realizadas a partir dos dados coletados, a fim de facilitar e otimizar o entendimento dos resultados, dividiu-se a análise em algumas vertentes. Foram analisados o comportamento sugestivo de ansiedade e

similar a depressão. A princípio, a discussão ocorrerá entre os dados intragrupo e posteriormente estabelecer-se-á as relações intergrupos. Tendo sido enfatizada as relações entre grupos diretos, ou seja GC com GH, GMa com GHMa e GMc com GHMc.

Inicialmente, em relação ao comportamento sugestivo de ansiedade. Verificou-se o a tendência ao comportamento similar a ansiedade, por meio do LEC. A análise do efeito ansiolítico ou ansiogênico tem como princípio o estudo da proporção entre as entradas nos braços abertos e nos braços fechados do aparelho, assim como no tempo de permanência do animal nos braços abertos. O comportamento de animais que encontram-se extremamente agitados, com muita variação entre as entradas e saídas dos braços abertos e fechados, associado com tempo de permanência reduzido nos braços abertos, indicam comportamento sugestivo de ansiedade. (CACERES, 2010; MOGHADAS, 2016; RIBEIRO et al., 2017; SCHEIDT, 2015). A título de comparação, em humanos, a ansiedade é representa o estado emocional perturbador que pode ser deflagrado por diferentes estímulos, tais como, a possibilidade de que algo não identificado ocorra ou ameaças obscuras, que muitas vezes só existem no imaginário do indivíduo que a apresenta (BROSHEK, DE MARCO; FREEMAN, 2015; ENGIN et al., 2016).

Quando procedeu-se a análise dos dados intragrupos, ou seja quando comparados os dados comportamentais que foram coletados aos 3 e aos 4 meses, pré e pós intervenções com o NaNO₂ ou com a música. Foi possível observar que os animais que apenas sofreram hipóxia, apresentaram comportamento ansiogênico, demonstrado pelo aumento, estatisticamente significativo, de entradas nos braços abertos e fechados do LCE, juntamente com a diminuição do tempo de permanência nos braços abertos. De forma que, a atual pesquisa corrobora com as afirmações de Chen et al. (2015) ao relatarem que, em seu estudo, a exposição de animais a agentes nocivos pode ser uma causa ambiental para o desenvolvimento de padrões de comportamento de ansiedade e de depressão.

Reforçando este padrão de comportamento, o mesmo GH, quando procedeu-se a análise intergrupos, apresentou comportamento similar a ansiedade e sugestivo de depressão quando comparado ao GC. Estes dados

corroboram com os achados de Ribeiro et al., 2017, ao verificarem que os animais com lesão encefálica apresentaram comportamento ansiogênico, uma vez que houve redução no tempo de permanência nos braços abertos, quando comparados a animais saudáveis. E também estão de acordo com Deep et al. (2016) que afirmam que a hipóxia pode exercer influência importante no estado de humor e precipitar manifestações de ansiedade e de comportamento sugestivo de depressão.

Os animais que ouviram música tanto no protocolo de música aguda quanto no de crônica, apresentaram comportamento sugestivo de efeito ansiolítico promovido pela música, visto que, apresentaram aumento significativo no tempo de permanência nos braços abertos do LCE, sem alterar significativamente a frequência de entrada nos braços abertos e fechados, na análise intragrupo. A terapia musical é uma intervenção não farmacológica que tem se revelado útil nos distúrbios psicológicos e comportamentais em humanos, tais como, em situações de agitação, de agressão, de ansiedade ou de depressão (GUETIN, et al., 2013). E tais características puderam ser verificadas nos animais saudáveis que ouviram a Sonata de Mozart.

Alguns achados na literatura científica suportam o resultado encontrado, no estudo de Trappe (2012) pacientes que ouviram música clássica durante três dias de internação relataram níveis significativamente mais baixos de ansiedade do que aqueles que não tiveram essa experiência musical. Bringman et al. (2009) realizaram um estudo randomizado acerca de métodos utilizados para diminuir a ansiedade de pacientes no período que antecede sua submissão a um procedimento cirúrgico. 177 pacientes receberam musicoterapia e 150 receberam midazolam. Foi aplicado um teste de ansiedade antes da cirurgia. Encontrou-se que a música reduziu a ansiedade em uma extensão bem maior do que a ingestão de midazolam.

Assim como, Kulkarni et al. (2012) aplicaram um protocolo de musicoterapia em indivíduos enquanto realizavam radioterapia e foi avaliada a necessidade de drogas para a ansiedade, drogas para analgesia entre indivíduos que receberam e que não receberam o protocolo musical. A necessidade de sedação foi significativamente menor no grupo de pessoas que ouviram música durante a radioterapia. Efeito semelhante foi encontrado no estudo de Beaulieu-

Boire et al. (2013) no qual houve menor necessidade de sedação na população que recebeu tratamento com música.

Tais efeitos podem ser explicados por De Freitas et al. (2017) quando este autor afirma que a música tem o potencial de relaxamento corpóreo, a partir da estimulação de áreas cerebrais, o que, em determinadas situações, contribui para influência direta no ritmo respiratório, batimentos cardíacos e secreções glandulares e hormonais. A consequência preponderante é um indivíduo mais sereno, com um sistema imunológico fortalecido e com mais bem estar psíquico, um dos fatores primordiais do conceito de saúde. De forma que, embora a atual pesquisa tenha sido realizada com animais, esta talvez seja uma das explicações o comportamento livre de ansiedade verificado nos animais que escutaram música.

Os benefícios observados nos animais do presente estudo podem ter advindo também da melhora do mecanismo de recompensa, visto que a musicoterapia pode influenciar na secreção de opióides endógenos, tais como a dopamina e a serotonina. Em estudo sobre a aplicação de musicoterapia em pacientes em estado crítico, Nelson et al. (2008) sugeriram que a melhor hipótese para explicar como a música age sobre o SNC está relacionada com a ativação de vias dopaminérgicas provocada pela música. Em um estudo com ratos Wistar foi observado que após a aplicação da Sonata de Mozart, houve aumento dos níveis de dopamina nas regiões do córtex pré-frontal, núcleo estriado e mesencéfalo. E ainda, houve diminuição dos níveis de prolactina. Este estudo infere que os mecanismo dopaminérgicos estão relacionados com os efeitos fisiológicos e neurobiológicos da musicoterapia (TASSET et al., 2012).

Tais afirmações corroboram ainda com as conclusões de Chanda; Levitin (2013) e Menon; Levitin (2005) ao afirmarem que os mecanismos de recompensa, motivação e prazer estão envolvidos nos efeitos benéficos da musicoterapia e acreditam que as vias dopaminérgicas são responsáveis pelas reações orgânicas e comportamentais a estas variáveis. E acrescentam que, o prazer subjetivo promovido pela busca e resolução do processo de recompensa é mediado por opióides endógenos. Assim, um desempenho melhorado pode ser mediado pelo sistema dopaminérgico (DANG; O'NEIL; JAGUST, 2010; SALIMPOOR et al., 2011). Muito embora as variáveis relatadas não tenham sido alvo de estudo, na

pesquisa atual, podemos associar estes achados prévios e também inferir que eles podem ter sido importantes para os resultados encontrados nas ratas wistar que ouviram música. Assim como, este pode ser um dos mecanismos que subsidia a aplicação música a fim de promover efeitos sobre aspectos da ansiedade.

Ao analisar os resultados dos animais que sofreram hipóxia e receberam música, foi possível notar que não houve similaridade em relação aos achados relativos ao comportamento sugestivo de ansiedade. Os animais que receberam música aguda pós-lesão, apresentaram efeito ansiolítico, já os animais que receberam música crônica pós-lesão apresentaram efeito ansiogênico. De forma que, o efeito ansiolítico da musicoterapia era o padrão esperado para os animais que receberam música pós-lesão. Porém, apenas o grupo que recebeu o protocolo de música aguda efetivamente apresentou este comportamento. Outros estudos, também relataram melhora nos sintomas de ansiedade com intervenção musical (RAGLIO et al., 2015; UEDA et al., 2013; VINK; BRUINSMA; SCHOLTEN, 2003).

Talvez, a dosagem de música utilizada no protocolo de música crônica pode ter sido excessiva para estes animais. Há muita controvérsia na literatura quanto a dosagem de aplicação de música e os seus potenciais efeitos. Gold et al. (2009) em estudo de metanálise sobre a utilização da música como tratamento coadjuvante de pacientes com distúrbios mentais graves, dentre eles depressão maior e esquizofrenia, por exemplo, verificaram que a musicoterapia, quando associada ao tratamento convencional tem efeito respeitável e significativo sobre o estado geral, sintomatologia associada, sobre a depressão, sobre a ansiedade e também na funcionalidade dos participantes do estudo. Estes benefícios independeram do diagnóstico, mas estiveram fortemente relacionados com o número de sessões de musicoterapia.

Os autores ainda afirmam que sinais de melhora podem ser observadas nos pacientes mesmo com poucas sessões de terapia, todavia, o número maior de sessões com frequência regular são necessários para alcançar benefícios adicionais e duradouros. Portanto, a dosagem da música, para aqueles autores, parece ser um fator importante para que se observe os resultados (GOLD et al. 2009). Estes achados contradizem parcialmente o que foi encontrado na pesquisa

atual, uma vez que, para o efeito ansiolítico, a menor dosagem de música foi mais efetiva.

No entanto, quando foi analisado o comportamento sugestivo de depressão dos animais, verificou-se que os melhores resultados foram o do grupo que recebeu o protocolo de música crônica pós-hipóxia, gerando portanto, uma dissociação entre o potencial efeito da música crônica, pós-lesão, sobre a ansiedade e sobre a depressão.

Neste momento, será abordado o comportamento similar a depressão. Nesta variável apenas o GH apresentou tempo de imobilidade elevado. Indicando que a lesão encefálica pode provocar este comportamento nos animais estudados. Traçando um paralelo, a depressão é um quadro frequente em humanos. A estimativa é de que uma em quatro mulheres e um em cada seis homens já experimentou sintomas dessa doença durante a sua vida, sendo que até 65% dos indivíduos têm episódios recorrentes dela (SLAVICH; IRWIM, 2014). E é estimado que após lesão encefálica, em torno de 12-44% dos indivíduos experimentem algum sintoma de depressão, especialmente durante os 3 primeiros meses após a instalação do quadro (BROSHEK; DE MARCO; FREEMAN, 2015).

Indo de encontro a este achado, em estudo sobre a intoxicação com Bisfenol-A, substância presente em utensílios plásticos, verificou-se que houve sinais de comportamento ansiogênico e também aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado em animais exposto a tal substância (CHEN et al., 2015). Tal achado corrobora com os que foram encontrados na atual pesquisa, permitindo que seja feita uma relação interessante entre a intoxicação, a qual os seres humanos estão expostos no seu dia a dia, e a ocorrência de transtornos de comportamento, como a ansiedade e sintomas semelhantes a depressão.

A depressão é uma doença generalizada e incapacitante e, embora a psicoterapia e a farmacoterapia possam ser efetivas, observa-se que os métodos farmacológicos convencionais podem resultar em dependência e comprometimento do funcionamento psicomotor e cognitivo (CHAN; CHAN; MOK, 2010). Neste contexto, várias pesquisas experimentais e metanálises verificaram

respostas clínicas positivas em pacientes que ouviam música combinada ou não com terapia padrão (GOLD et al., 2009; LIN, et al., 2011; MARATOS et al., 2008).

De forma que, vários ensaios clínicos controlados e randomizados estudaram o efeito da música como monoterapia (CHAN et al., 2012) e como adição à terapia padrão (FACHNER; GOLD; ERKKILA, 2013) em indivíduos deprimidos. Sem exceção, esses estudos mostram que a música ou a produção de música reduzem a depressão. A importância da música como um evento social e prazeroso foi salientada por Maratos et al. (2008) que mencionaram que a terapia musical pode resultar em altos níveis de envolvimento em grupos de pacientes que são difíceis de se envolver.

Chu et al. (2014) realizaram um estudo prospectivo controlado no qual observaram que a terapia musical reduziu a depressão, e o efeito que ocorreu imediatamente após o início da terapia. Interessante, que no estudo relatado, os níveis de cortisol, não foram significativamente diminuídos após a terapia. Corroborando com os achados do grupo que recebeu música crônica, pois embora tenha havido comportamento considerado bom no teste de nado forçado, não houve redução dos níveis de cortisol.

No estudo de Olaya e Izquierdo (2017) verificou-se melhora dos sintomas depressivos após intervenção com musicoterapia quando comparados com a avaliação inicial. Esses resultados são consistentes com os relatos na literatura sobre o aprimoramento do humor após a intervenção musical (GUETIN, et al., 2013; RAGLIO et al., 2015; UEDA et al., 2013; VINK; BRUINSMA; SCHOLTEN, 2003;). Assim como, outras variáveis, tais como sensação de tensão, dificuldade de concentração, pensamentos pessimistas e pensamentos suicidas, apresentaram melhora estatisticamente significativas (OLAYA; IZQUIERDO, 2017).

Na presente pesquisa, não foram todos os grupos que apresentaram efeitos benéficos sobre a ansiedade e sobre a depressão. Discordando, em parte, de Guetin et al. (2009) que observaram que a música foi capaz de alterar diferentes sintomas de pacientes com demência, reduzindo significativamente a ansiedade, a depressão e a agressividade na amostra estudada. E também de Fachner; Gold; Erkkilä (2013) que encontraram, em seu estudo, que a terapia

musical promoveu redução significativa dos sintomas de depressão e ansiedade na população estudada. Já Choi; Lee; Lim (2008) ao realizarem uma pesquisa com 26 pacientes psiquiátricos que receberam terapia com música, tanto de maneira ativa quanto passiva, observaram melhora dos sintomas psiquiátricos na amostra estudada, refletindo em redução da depressão, da ansiedade e melhora do humor.

Há também, na literatura, relato de efeitos benéficos da musicoterapia sobre outras esferas comportamentais. O uso da música tem demonstrado melhorias na atenção, na motivação, no relaxamento e na vocalização do portador de paralisia cerebral (NUNES RIBEIRO, 2007). Há também relatos positivos na redução do estresse, da ansiedade e da depressão. Além disso, com sua capacidade de levar à expressão de sentimentos e interconexões entre experiências diversas, pode auxiliar pacientes com desordens mentais em sua integração nas atividades sociais (ESMAEILZADEH; SHARIFI; TAYARANI, 2013).

Ainda em se tratando dos aspectos comportamentais da presente pesquisa, no que se refere ao teste campo aberto, este foi utilizado para que os animais tivessem uma experiência locomotora prévia do LCE e que permitisse a maior exploração nesse aparato. Para Ribeiro et al. (2017), em estudo sobre o potencial neurotóxico do NaNO₂ e as repercussões comportamentais que pode provocar, muito embora não fosse o objetivo analisar comportamento ansiolítico ou ansiogênico com este teste, foi possível notar que a locomoção espontânea foi maior nos animais que sofreram hipóxia, permitindo inferir que provavelmente áreas ou eventos ligados ao estresse poderiam estar sendo ativados. Estes achados corroboram parcialmente com os achados da atual pesquisa, pois, muito embora os animais que tenham sofrido hipóxia também tenham apresentado valores maiores de locomoção, os animais que apenas receberam música também apresentaram.

Há também relatos na literatura da ação da música em relação a regulação do eixo HPA, podendo a música agir sobre a secreção hormonais e ajudar a regular a liberação de glicocorticóides (BEAULIEU-BOIRE et al., 2013; CHANDA; LEVITIN, 2013; TASSET et al., 2012). Estas relações serão exploradas de maneira mais detalhada a frente. No entanto, já pode-se adiantar que em revisão da literatura realizada por De Freitas et al. (2017) o resultado prioritário da

avaliação dos artigos demonstrou que a musicoterapia apresenta-se não somente como meio eficaz de concretização do atendimento humanizado, mas também meio de restauração de funções fisiológicas.

5.3 VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS

O eixo HPA desempenha um papel crítico na regulação de comportamentos afetivos e emocionais, tanto que, disfunções no referido eixo são consideradas como a base neurobiológica de desordens afetivas, tais como, ansiedade, depressão maior, depressão psicóticas e transtornos bipolares (CHEN et al., 2015). Aumento nos níveis de corticoesteróides podem indicar a hiperatividade do eixo HPA. Essa alteração é comumente identificada em indivíduos com depressão maior e também naqueles com transtornos de ansiedade (CHEN et al., 2015). Resultados que corroboram com os achados do presente estudo que verificou, por meio da análise das variáveis bioquímicas que, em relação ao cortisol, em todas as comparações, o GH apresentou os piores resultados, ou seja, os animais apresentaram os maiores índices de cortisol circulante.

Concordando também com os achados da presente pesquisa, especialmente no que tange o GH, diversos estudos têm conseguido estabelecer a relação entre estresse e alterações comportamentais (GRIGORYAN; SEGAL, 2016). Animais submetidos ao estresse demonstraram que as respostas para vários estímulos estressores estão relacionadas com a liberação de cortisol e outros indicadores metabólicos, tais como a glicose e o lactato (ROTLLANT; TORT, 1997). Estes autores ainda relatam que o cortisol é liberado em quantidades semelhantes após estresse agudo e crônico, independentemente de exposição prévia ao estresse crônico.

Por outro lado, os menores índices de cortisol, quando comparados ao GC foi do grupo que recebeu o protocolo de música aguda. O que pode indicar que a música aguda pode agir como um agente redutor do estresse. A música tem ação na redução dos níveis circulantes de cortisol (BEAULIEU-BOIRE et al., 2013; NELSON et al., 2008; TASSET et al., 2012; TRAINOR, 2008) e desta forma pode

também auxiliar no controle a dor e proporcionar relaxamento físico e mental em alguns pacientes (TRAINOR, 2008). Escutar música relaxante já foi relatada como potencial causadora de redução de estresse em indivíduos saudáveis e em diversas condições e patologias (BOSO et al., 2007; BRINGMAN et al., 2009; CHOI; LEE; LIN, 2008; GOLD et al., 2009; KULKARNI et al., 2012; NELSON et al., 2008; O'KELLY et al., 2013).

Neste contexto, é plausível que a terapia musical possa afetar o sistema nervoso autônomo e diminuir o estresse e os problemas de saúde relacionados ao estresse (PEREIRA; BARBOSA, 2013). Bradt; Dileo; Potvin (2013) em sua revisão sistemática, descreveram como os pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio reduziram sua frequência de respiração, pulsações e pressão arterial depois de ouvir música durante vinte minutos, mesmo uma hora depois continuou com os efeitos benéficos da sessão de musicoterapia. Corroborando com outro estudo, cujos autores afirmam que a terapia musical não só induz respostas afetivas por parte do paciente, como também atua diretamente no sistema nervoso simpático, pois reduz sua atividade. Como resultado, o paciente não só experimenta benefícios psicológicos, mas também fisiológicos, como diminuição da pressão arterial, frequência cardíaca e frequência respiratória (HATEM; LIRA; MATTOS, 2006; NIETO-ROMERO, 2017).

Os grupos que sofreram hipóxia e receberam música, aguda e crônica apresentaram níveis mas baixos de cortisol apenas em relação ao grupo que sofreu hipóxia. Porém, não conseguiram atingir o mesmo patamar de seus controles diretos. Aliás, grupo GHMc não apresentou valores de cortisol muito próximo do GH. Diante disso, pode-se inferir, que para este grupo, a dose de música elevada pode ter sido um fator precursor de estresse.

Animais submetidos a estresse demonstraram que as respostas para vários os estímulos estressores estão relacionadas com a liberação de cortisol e outros indicadores metabólicos, tais como a glicose e o lactato. O cortisol é liberado em quantidades semelhantes após estresse agudo e crônico enquanto que os níveis de glicose aumentam logo após o stress agudo, porém decaem significativamente entre uma e duas horas após o evento estressor (ROTLLANT e TORT, 1997).

Os dados de glicose demonstraram que o GC teve os níveis mais elevados de glicose circulante, enquanto o GH apresentou os níveis mais baixos. E os grupos que receberam música, com e sem hipóxia, apresentaram valores intermediários entre os mais altos e mais baixos, e muito próximos entre si, sem diferença significativa. De forma que, no presente estudo, os animais submetidos co hipóxia, no qual acreditava-se que estavam submetidos a estresse crônico não apresentaram aumento do nível de glicose plasmática (ROTLLANT; TORT, 1997). Distúrbios metabólicos após hipóxia já foram relatados na literatura, inicialmente há uma hiperglicemia por aumento na liberação de catecolaminas e cortisol, seguida de hipoglicemia causada pelo consumo excessivo dos depósitos de glicogênio hepático e, em alguns casos, por hiperinsulinismo tardio (PROCIANOY; SILVEIRA, 2001). De forma que, pode-se também inferir, mesmo que de maneira contraditória, que os animais submetidos a hipóxia poderiam estar passando por eventos de estresse crônico. Mas a música, pelos resultados observados, não foi capaz de agir de forma a reverter esse estado.

Quanto ao colesterol que no presente estudo, foi analisado a fim de indicar um efeito de estresse crônico, visto que a hiperatividade do eixo HPA favorece a lipólise, promovendo aumento índices de glicerol e ácidos graxos na corrente sanguínea (DELAUNAY et al., 1997; GUEST et al., 2013; VAN RAALTE et al., 2009). Neste contexto, o GH apresentou os valores mais elevados de colesterol circulante e o GC os valores mais baixos. De forma que confirma a hipótese inicial, de que os valores de colesterol estariam mais elevados nos animais submetidos a estresse crônico. Porém, por outro lado, observou-se que os grupos que apenas receberam música tiveram valores mais elevados em relação que os grupos música + hipóxia. De forma que contradiz o possível efeito relaxante e amenizador do estresse que a música pode representar.

Já o lactato pode ser um indicativo de lesão ativa. Os resultados encontrados neste estudo vão contra a hipótese inicial, de que os animais GH seriam apresentariam os piores resultados. No entanto, o lactato também pode indicar lesão muscular e fadiga, como os animais realizaram o teste de nado forçado na véspera da coleta sanguínea, este teste, talvez possa ter influenciado nos resultados. Ainda mais que, os animais que tiveram menores valores de

imobilismo, ou seja aqueles que nadaram mais e conseqüentemente tiveram maior desgaste muscular apresentaram os maiores valores de lactato.

Em síntese, na presente pesquisa foi possível estabelecer relações mais fortes dos efeitos da música em relação aos níveis de cortisol circulantes. Porém cabe ressaltar que, para os animais que sofreram hipóxia, a música não foi impactante o suficiente para retornar os níveis de cortisol ao mesmo patamar dos animais controle.

5.4 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS

No presente estudo foi possível verificar áreas de lesão histológica no hipocampo e no cerebelo de animais que sofreram hipóxia. De forma bem marcante, aqueles animais que passaram pelo protocolo de intoxicação por NaNO₂ apresentaram grande número de células de Purkinje com sinais de lesão. Confirmando a hipótese inicial de que a dosagem escolhida de NaNO₂ foi suficiente para provocar o dano desejado.

Já na análise do hipocampo, quando procedeu-se a análise comparativa das imagens histológicas e da contagem de neurônios saudáveis e lesionados dos grupos controle e hipóxia, foi possível ratificar este achado, que com exceção da área CA1, na qual predominaram neurônios saudáveis em ambos os grupos. As demais áreas hipocâmpais continham um grande número de neurônios lesionados no GH. De forma que, o GH foi o grupo que destacou-se negativamente neste aspecto. Confirmando o potencial do NaNO₂ como promotor de lesão hipocâmpal.

Então, como citado anteriormente, foi observado que a área CA1 do hipocampo foi a região menos suscetível a hipóxia, tendo em vista que, em todos quase os grupos, exceto o grupo de hipóxia e música crônica, esta região foi que apresentou sempre, mais neurônios saudáveis que neurônios lesionados. Este achado corrobora com o estudo de Ribeiro et al. (2017) que também utilizou o NaNO₂ como o fator causador de hipóxia e serviu como base para esta pesquisa.

No entanto, este achado contradiz diversos estudos que afirmam, por exemplo, que há a suscetibilidade difere entre as regiões do hipocampo a depender do agente causador de lesão, com os neurônios de CA1 degenerando preferencialmente após a isquemia global e os neurônios CA3 após convulsões límbicas (MEDVEDEVA et al., 2017).

Os neurônios piramidais do hipocampo dos domínios CA1 e CA3 são altamente vulneráveis a lesões em condições patológicas de convulsões prolongadas ou após isquemia cerebral. No entanto, seus padrões de vulnerabilidade diferem, provavelmente refletindo diferenças nos eventos que levam à sua degeneração. Para diversos autores, a degeneração seletiva dos neurônios CA1 é notável após isquemia transitória em seres humanos (ZOLA-MORGAN; SQUIRE; AMARAL, 1986) e roedores (MEDVEDEVA et al., 2017; SCHMIDT-KASTNER, 2015; SUGAWARA et al., 1999; ZHAO et al., 2017). O que difere do encontrado na pesquisa atual.

Justificando este achado contraditório, para Rosenblum (1997) a vulnerabilidade seletiva do setor CA1 no hipocampo é apenas relativa. Não ocorrendo de maneira unânime em todas as formas de isquemia. De forma que, esta afirmação está de acordo com o achado na presente pesquisa.

Foi observado, na atual pesquisa, que os animais do GH apresentaram lesão mais intensa no hipocampo ventral, notadamente demonstrada pelo número de neurônios lesionados na área CA3 e no giro denteado. O hipocampo ventral está mais relacionado com o controle da ansiedade e da depressão (ENGIN et al., 2016; FANSELOW; DONG, 2010; GRIGORYAN; SEGAL, 2016; LI et al., 2014; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015;). Este fato possibilita a compreensão de que lesões nesta região possam alterar tais comportamentos. Como verificado na amostra estudada. Grigoryan; Segal (2016) relacionaram comportamento ansiogênico às alterações no hipocampo ventral, corroborando com os achados da presente pesquisa e com os achados das pesquisas realizadas por McHugh et al. (2004); Morris et al. (1982) e Ribeiro et al. (2017).

Destacou-se o fato de que o grupo que recebeu música aguda após a lesão, não apresentaram melhora efetiva das imagens histológicas do cerebelo, porém, apresentaram melhor contagem de neurônios saudáveis no hipocampo. De

forma que, pode-se inferir que um fator que deve ser levado em consideração, para a compreensão destes resultados e está relacionado com a neurogênese que ocorre no hipocampo, mesmo em animais adultos.

A neurogênese na fase adulta é a produção de novos neurônios em áreas de cérebro adulto. As regiões onde mais se observa este processo são a zona subventricular e zona subgranular do hipocampo. Esta formação de novos neurônios desempenha vários papéis fisiológicos incluindo renovação de neurônios danificados, formação de memória e modulação da resposta ao estresse (AGETA et al., 2008).

Uma série de estudos recentes apoiam a ideia de que a neurogênese do hipocampo ocorre e desempenha papel crucial na manutenção de memórias de reconhecimento espacial e de objetos, por exemplo (AHLENIUS et al. 2009; IMAYOSHI et al., 2008; JESSBERGER et al., 2009; SAHAY et al., 2011). Pouco se fala na literatura sobre a importância da neurogênese sobre os comportamentos de ansiedade de depressão (HATTIANGADY; SHETTY, 2012). De forma que, a atual pesquisa destaca-se ao estabelecer relação entre as adaptações histológicas hipocampais e o comportamento sugestivo de ansiedade e de depressão apresentado pelos animais.

De maneira bem significativa, observou-se que os animais que receberam o protocolo de música aguda, após a lesão por hipóxia, foram o que apresentaram os melhores resultados em relação aos testes comportamentais, aos níveis de cortisol e também em relação as imagens histológicas, destacando a contagem de células saudáveis nas regiões CA1, CA3, CA4 e GD.

Hattiangady; Shetty (2012) foram pesquisadores que conseguiram evidenciar, após uma lesão, que o tratamento por meio do implante de células tronco na região do hipocampo, foi altamente eficaz para prevenir alterações de humor e de memória. De forma que, os efeitos benéficos do enxerto foram associados com melhor sobrevivência e migração generalizada de células derivadas de enxerto em diferentes regiões do hipocampo. Assim, para estes autores, estímulo à região hipocampal pode ser uma abordagem útil para aliviar transtornos de humor e também disfunções de memória, em distúrbios neurológicos associados a lesões ou danos do hipocampo (HATTIANGADY;

SHETTY, 2012). Corroborando e reforçando muitos dos aspectos observados na presente pesquisa, especialmente relacionados com o grupo de música aguda pós-lesão.

Então, embora a musicoterapia possa agir de maneira mais discreta e indireta, a presente pesquisa permitiu a observação de que ela pode também agir de maneira benéfica sobre a região hipocampal. Este fato se deve as características histológicas que foram verificadas nos grupos estudados. As pressões cotidianas exigem que mecanismos neurais diferenciados sejam desenvolvidos, permitindo a sobrevivência dos animais, pois os mesmos não nascem com um repertório comportamental completo. Neste sentido, a plasticidade do sistema nervoso tem papel fundamental na adaptação às contingências ambientais (DA SILVA, 2009).

Outro fator que pode estar relacionado com as boas características histológicas verificadas dizem respeito ao ambiente em que os animais estavam e aos estímulos recebidos. Ambientes que fornecem uma combinação variada de estímulos também podem aumentar a neurogênese. Roedores adultos que são mantidos em gaiolas que contém objetos diferentes, tais como pequenos brinquedos, túneis, rodas de atividade física e obstáculos, exibem significativo aumento no número de células no giro denteado do hipocampo (KEMPERMANN et al., 1997). Ou seja, parece que o aumento da atividade exploratória e novas experiências sensoriais proporcionadas por estímulos diversos do ambiente enriquecido estimulam a aprendizagem, fazendo com que esses animais aumentem a sua capacidade de desempenhar tarefas cognitivas, diferentemente daqueles que vivem em gaiolas comuns de laboratório (DA SILVA, 2009). Neste contexto, infere-se que a musicoterapia, especificamente no protocolo agudo, pode ter representado um estímulo positivo.

Kim; Wigram; Gold (2008) avaliaram crianças autistas na fase pré-escolar, no estudo, um dos grupos foi exposto às atividades musicais e o outro tinha acesso aos brinquedos na terapia. O resultado da pesquisa demonstrou que o grupo exposto à terapia musical apresentou melhor interação sociais, mais momentos de atenção, contato visual mais prolongado com os terapeutas e melhor interação com objetos e durante as atividade.

Outra observação que merece destaque na presente pesquisa foi o fato dos grupos que receberam música, não apresentarem melhor contagem de neurônios em relação ao grupo controle. Entendendo-se que, a música não teve efeito positivo imaginado sobre os animais sem lesão. Desta forma, foi possível inferir, que para o estímulo neurogênico, a lesão foi um fator importante. Sugerindo que, indivíduos com lesão se beneficiarão de maneira mais efetiva dos efeitos da musicoterapia com a Sonata de Mozart do que indivíduos saudáveis. Para Hattiangady et al. (2007) o giro denteado do hipocampo, em particular, é uma das áreas que melhor responde ao estímulo musical. Este achado não foi verificado no presente estudo.

E por fim, foi observado que o grupo que recebeu o protocolo de música crônica, após a lesão encefálica, não apresentou melhora das imagens histológicas, quando comparado ao GH. Este grupo também apresentou comportamento ansiogênico e índices elevados de cortisol. Situações de estresse poderiam, por inibir a neurogênese, prejudicar a aquisição e consolidação de respostas adaptativas que facilitarão o desempenho frente a estressores subsequentes (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003). De forma que, foi possível sugerir que para este grupo, o estímulo musical pode ter sido excessivo e não tão benéfico e efetivo quanto o estímulo de música aguda.

Papadopoulou et al. (2015) que por sua vez, relacionaram a ocorrência de estresse agudo e crônico com o desenvolvimento de comportamento depressivo e estabeleceu correlação positiva entre estes eventos, verificando também a presença de lesões hipocámpais importantes. O hipocampo é vital para funções como humor e memória. A lesão do hipocampo geralmente leva a alterações de humor e memória associadas a neurogênese reduzida e aberrante no giro dentado (HATTIANGADY; SHETTY, 2012). De forma que os estímulos que atuam sobre o hipocampo no sentido de provocarem novas experiências facilita a neurogênese enquanto seu bloqueio prejudica o aprendizado em tarefas que dependem do hipocampo (GOULD et al., 1999).

Há também a possibilidade de que este bloqueio da neurogênese cause impacto na regulação do eixo, assim como, distúrbios nos mecanismos de neurogênese de ratos adultos têm sido vistos como promovedores de efeitos ansiogênicos (AGETA et al., 2008). Neste contexto, podemos inferir que a

intoxicação por NaNO₂ pode promover impacto semelhante. De forma que o nitrito pode agir de duas formas, provocando lesão e também bloqueando a neurogênese e interferindo negativamente na recuperação.

Por exemplo, um estudo recente demonstra que a deficiência de neurogênese induzida resulta em um aumento do comportamento depressivo (SNYDER et al., 2011). Além disso, outro estudo demonstrou que a recuperação da disfunção do humor através de medicamentos antidepressivos é intermediada pela neurogênese do hipocampo melhorada (HATTIANGADY; SHETTY, 2012). De forma que sugere-se na presente pesquisa que o estímulo crônico da Sonata de Mozart, após lesão encefálica, pode alterar negativamente os mecanismos de plasticidade neural.

As limitações encontradas na presente pesquisa dizem respeito as peculiaridades em realizar estudos experimentais com animais, que vão desde a dificuldade em obter o número de animais necessários, com a mesma idade até a realização dos procedimentos de aplicação dos protocolos e da coleta do dados estudados. A análise dos resultados também nos permitiu verificar que não há uma uniformidade de respostas para as hipóteses levantadas, abrindo espaço para uma ampla discussão sobre o papel da musicoterapia antes e após a lesão encefálica.

Como aspectos passivos sobre o conhecimento gerado pela atual pesquisa e concordando com Ribeiro et al. (2017), foi possível entender que conhecer os processos microscópicos envolvidos nas doenças orgânicas é um importante passo para aprimorar o entendimento da fisiopatologia envolvida nas lesões cerebrais e suas possíveis consequências e repercussões nas diferentes esferas do ser humano.

Ao compreender melhor a ocorrência e o predomínio de danos internos celulares, em diferentes regiões encefálicas, pode-se visualizar com maior clareza as possíveis alterações que determinarão o desenvolvimento de quadros psicossociais e de comportamentos ansiogênicos e depressivos. Estes, muitas vezes, como verificado no atual estudo, associados a diferentes casos de hipóxia isquêmica neuronal. Desta forma, tendo um conhecimento mais global e abrangente do processo patológico, o profissional de saúde terá condições

otimizadas de análise dos casos clínicos e também, melhor entendimento de seus pacientes como seres completos e complexos. Como consequência, tal profissional pode atuar de maneira mais específica e significativa em busca do melhor tratamento e da maior recuperação funcional e psíquica de seus pacientes.

Neste contexto, foi gratificante poder observar que um recurso tão simples, de fácil aplicação, de baixo custo e com efeitos adversos mínimos, como a música puderam provocar mudanças efetivas no comportamento de animais e também modificaram a reação orgânica destes com a intoxicação pelo NaNO_2 e com o evento hipóxico-isquêmico. De forma que, é possível inferir e projetar que a musicoterapia, em particular a Sonata de Mozart, pode ser empregada a fim de promover reações benéficas sobre aspectos da ansiedade e da depressão em pessoas que sofreram lesões isquêmicas.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu verificar alterações nas variáveis biométricas entre os grupos estudados, assim como foi possível analisar diferentes comportamentos relativos aos aspectos sugestivos de ansiedade e de depressão nestes animais. Além disso, possibilitou a observação de variações dos níveis de glicose, colesterol, lactato e cortisol, complementados também pelas alterações histológicas na contagem de neurônios saudáveis e lesionados na região do hipocampo e do cerebelo dos animais, que passaram pelos procedimentos de hipóxia-isquêmica e que também foram submetidos ao protocolo de musicoterapia aguda e crônica.

- Em relação ao estudo das variáveis biométricas, verificou-se que o peso do encéfalo dos animais controle foi significativamente maior, já o dos animais que sofreram hipóxia foi notadamente menor. Entre os animais que receberam música, aqueles que a receberam após a lesão apresentaram valores maiores que os animais que apenas receberam música aguda. Sendo possível levantar a hipótese de que o estímulo da lesão somado ao estímulo da música pode ter sido importante para esta variável.
- Em relação a locomoção espontânea, este teste foi utilizado de forma a possibilitar a melhor ambientação e desempenho do animal no teste do LCE, que foi realizado na sequência, de forma que seus resultados não influenciaram na análise de dados do estudo.
- Em relação ao comportamento sugestivo de ansiedade, foi possível verificar que os animais que sofreram a hipóxia foram os que apresentaram o pior desempenho, demonstrando claramente o efeito ansiogênico da lesão encefálica. Aspecto ansiogênico também foi verificado no grupo que sofreu hipóxia e recebeu música crônica. Já os grupos que receberam música aguda e crônica (sem lesão) e o grupo que recebeu música aguda após lesão apresentaram características de menor comportamento sugestivo de ansiedade, levantando a inferência de que a aplicação aguda e crônica de música em indivíduos saudáveis pode levar a efeitos ansiolíticos.

- Em relação ao comportamento similar à depressão, foi possível verificar que, novamente, os animais que sofreram lesão encefálica foram os que apresentaram os maiores valores de imobilidade, de forma a sugerir que a lesão tenha sido capaz de provocar comportamento similar a depressão. Já os animais que receberam tanto a música aguda quanto a crônica, tendo tido lesão ou não, apresentaram tempo menor de imobilidade, fator que indica comportamento antidepressivo. Destacou-se nesta variável, o grupo que recebeu música crônica após a lesão encefálica indicando, desta forma, que a música pode ter potencial antidepressivo após este tipo de lesão.
- Em relação as análises bioquímicas, o cortisol foi a variável que apresentou destaque, uma vez que foi notadamente mais elevado no grupo que sofreu hipóxia e também no grupo que recebeu o protocolo de música crônica. Sendo o cortisol um hormônio que pode predizer sobre o estado de estresse do animal, foi possível inferir que estes animais encontravam-se em estado de estresse, provocados pela lesão e pela aplicação constante de música. As demais variáveis não apresentaram destaques que pudessem promover inferências.

Diante desse contexto, foi possível entender que:

- Os animais que apenas sofreram hipóxia apresentaram as características consideradas de pior desempenho com menor peso encefálico, comportamento similar a depressão e a ansiedade e maior valor de cortisol.
- Já os animais que receberam música aguda também apresentaram peso encefálico baixo, porém tiveram desempenho nos testes que demonstraram efeitos antidepressivos e ansiolíticos da música aguda, assim como apresentaram valores reduzidos de cortisol.
- Os animais que ouviram o protocolo de música crônica, por sua vez, apresentaram peso do encéfalo com valor elevado, e nos testes comportamentais mostraram-se com características de efeitos antidepressivos e ansiolíticos induzidos pela música crônica. No entanto,

estes animais apresentaram níveis elevados de cortisol, indicando que, provavelmente, o excesso de Sonata de Mozart, pode provocar estresse.

- No grupo de animais que sofreram lesão e receberam o protocolo de música aguda destacou-se o elevado peso do encéfalo, quando comparado aos animais que apenas sofreram a lesão encefálica e não receberam o protocolo de música. Neste grupo, destacou-se também o efeito ansiolítico, visto que estes animais tiveram desempenho notadamente melhor no teste do LCE, sendo possível verificar também efeitos antidepressivos. Já os valores de cortisol foram menores que no grupo hipóxia.
- Já no grupo de animais que sofreram lesão e receberam o protocolo de música crônica, destacou-se o peso do encéfalo maior que no grupo que apenas sofreu hipóxia. Estes animais, entretanto, apresentaram efeitos ansiogênicos e sinais de estresses, possivelmente relacionados com os efeitos da lesão somados ao da música crônica, e manteve o efeito antidepressivo.

Quando realizada a análise das imagens histológicas, verificou-se que:

- O grupo hipóxia apresentou as piores imagens histológicas, com a presença de muitos neurônios com sinais extensos de lesões, com exceção da região CA1 do hipocampo. Nesta área, a contagem de neurônios saudáveis foi maior que a de neurônios lesionados, de forma que foi possível verificar uma preservação desta área nestes animais.
- Em relação a área CA1, esta característica manteve-se nos demais grupos, exceto no grupo que recebeu música crônica após lesão, indicando que no presente estudo, esta área foi mais resistente a hipóxia, exceto no grupo citado.
- O grupo que recebeu o protocolo de música aguda e música crônica apresentou maior número de neurônios saudáveis que lesionados em todas as áreas. Porém, não teve melhores resultados que o grupo controle.
- Já o grupo que recebeu música aguda após lesão encefálica apresentou o maior número de neurônios saudáveis em quase todas as áreas do hipocampo, exceto a área CA2, de forma que este grupo destacou-se em

relação ao grupo hipóxia e ao grupo hipóxia + música crônica. Isso indica que, para a região hipocampal, a música aguda, após a lesão por hipóxia, foi aquela que rendeu os melhores estímulos.

- Os animais que receberam o protocolo de música crônica após a lesão, por sua vez, não apresentaram contagem de neurônios saudáveis tão proeminente quanto ao grupo de música aguda. Na realidade, no que tange a contagem de neurônios, este grupo apresentou desempenho semelhante ao grupo que apenas sofreu hipóxia,.

Ao relacionar os resultados comportamentais com os achados histológicos, foi possível verificar que o grupo que mais se beneficiou dos efeitos da Sonata de Mozart, foi o que recebeu o protocolo de música aguda após a lesão encefálica, tanto no que tange o efeito ansiolítico, antidepressivo, quanto na contagem de neurônios. O estudo permitiu compreender que a aplicação da Sonata de Mozart tem potencial para melhorar aspectos de comportamento sugestivo de ansiedade e de depressão ligados a hipóxia encefálica em animais. Ao se projetar estes achados em humanos, é provável que possa haver repercussões positivas, sobre aspectos comportamentais e, conseqüentemente, na qualidade de vida de pessoas com lesões encefálicas decorrentes de hipóxia.

Uma vez que todos os animais receberam as mesmas condições de alojamento, alimentação e para os grupos com hipóxia, a mesma dose de NaNO₂, o fator diferencial entre os grupos foi a música, indicando que a música tem potencial neuroprotetor ou neurogênico sobre o hipocampo. O cerebelo não apresentou alterações significativas nos animais que receberam música, apenas nos que sofreram hipóxia é que foi possível observar a lesão.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ageta, H., Murayama, A., Migishima, R., Kida, S., Tsuchida, K., Yokoyama, M., & Inokuchi, K. (2008). Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. *PloS One*, 3(4), e1869.

Agster, K. L., & Burwell, R. D. (2013). Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Behavioural Brain Research*, 254, 50-64.

Ahlenius, H., Visan, V., Kokaia, M., Lindvall, O., & Kokaia, Z. (2009). Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *Journal of Neuroscience*, 29(14), 4408-4419.

Angelucci, F., Ricci, E., Padua, L., Sabino, A., & Tonali, P. A. (2007). Music exposure differentially alters the levels of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in the mouse hypothalamus. *Neuroscience Letters*, 429(2), 152-155.

Ansari, F. A., Ali, S. N., & Mahmood, R. (2015). Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 29(7), 1878-1886.

Antorveza, I. G. (2017). ESTÁ DE MODA LA MUSICOTERAPIA. *Revista Universidad de La Salle*, (34), 113-126.

Baky, N. A. A., Zaidi, Z. F., Fatani, A. J., Sayed-Ahmed, M. M., & Yaqub, H. (2010). Nitric oxide pros and cons: The role of L-arginine, a nitric oxide precursor, and idebenone, a coenzyme-Q analogue in ameliorating cerebral hypoxia in rat. *Brain Research Bulletin*, 83(1), 49-56.

Baltes, F. R., Avram, J., Miclea, M., & Miu, A. C. (2011). Emotions induced by operatic music: Psychophysiological effects of music, plot, and acting: A scientist's tribute to Maria Callas. *Brain and Cognition*, 76(1), 146-157.

Barkhuizen, M., Van de Berg, W. D. J., De Vente, J., Blanco, C. E., Gavilanes, A. W. D., & Steinbusch, H. W. M. (2017). Nitric Oxide Production in the Striatum and Cerebellum of a Rat Model of Preterm Global Perinatal Asphyxia. *Neurotoxicity Research*, 1-10.

Barreto, G., E White, R., Ouyang, Y., Xu, L., & Giffard, R. (2011). Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 11(2), 164-173.

Beaulieu-Boire, G., Bourque, S., Chagnon, F., Chouinard, L., Gallo-Payet, N., & Lesur, O. (2013). Music and biological stress dampening in mechanically-ventilated patients at the intensive care unit ward—a prospective interventional randomized crossover trial. *Journal of Critical Care*, 28(4), 442-450.

Beck, A. T., & Alford, B. A. (2016). *Depressão: causas e tratamento*. Artmed Editora.

Ben-Ari, Y., Tremblay, E., & Ottersen, O. P. (1980). Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience*, 5(3), 515-528.

Benenson R. Teoria da Musicoterapia: Contribuição ao conhecimento do contexto não-verbal. Summus Editorial; São Paulo, 1988.182p.

Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhuet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(2), 135.

Bernasconi, R., Smieskova, R., Schmidt, A., Harrisberger, F., Raschle, N. M., Lenz, C., & Lang, U. E. (2015). Hippocampal volume correlates with attenuated negative psychotic symptoms irrespective of antidepressant medication. *NeuroImage: Clinical*, 8, 230-237.

Bezerra, T. S., Complicações neurológicas decorrentes da hipóxia isquêmica encefálica induzida experimentalmente por nitrito de sódio. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília. Brasília, 2017.

Bobinski, M., De Leon, M. J., Wegiel, J., Desanti, S., Convit, A., Saint Louis, L. A., & Wisniewski, H. M. (1999). The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging-determined hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *95*(3), 721-725.

Boccaro, C. N., Kjonigsen, L. J., Hammer, I. M., Bjaalie, J. G., Leergaard, T. B., & Witter, M. P. (2015). A three-plane architectonic atlas of the rat hippocampal region. *Hippocampus*, *25*(7), 838-857

Bodner, M., Muftuler, L. T., Nalcioglu, O., & Shaw, G. L. (2001). fMRI study relevant to the Mozart effect: brain areas involved in spatial-temporal reasoning. *Neurological Research*, *23*(7), 683-690.

Boso, M., Emanuele, E., Minazzi, V., Abbamonte, M., & Politi, P. (2007). Effect of long-term interactive music therapy on behavior profile and musical skills in young adults with severe autism. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, *13*(7), 709-712.

Bowman, A., Scottish, S. P. C. A., Dowell, F. J., & Evans, N. P. (2015). 'Four Seasons' in an animal rescue centre; classical music reduces environmental stress in kennelled dogs. *Physiology & Behavior*, *143*, 70-82.

Bradt, J., Dileo, C., & Potvin, N. (2013). Music for stress and anxiety reduction in coronary heart disease patients. *The Cochrane Library*, *12*, 21-25.

Brandão, F. R., de Carvalho Gomes, L., & Chagas, E. C. (2006). Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*, *36*(3), 349.

Bringman, H., Giesecke, K., Thörne, A., & Bringman, S. (2009). Relaxing music as pre-medication before surgery: a randomised controlled trial. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, *53*(6), 759-764.

Broshek, D. K., De Marco, A. P., & Freeman, J. R. (2015). A review of post-concussion syndrome and psychological factors associated with concussion. *Brain Injury*, *29*(2), 228-237.

Caceres, L. G., Bertolino, L. A., Saraceno, G. E., Zubilete, M. A. Z., Uran, S. L., Capani, F., & Guelman, L. R. (2010). Hippocampal-related memory deficits and histological damage induced by neonatal ionizing radiation exposure. Role of oxidative status. *Brain Research*, *1312*, 67-78.

Calamita, S. C., da Silva, L. P., de Carvalho, M. D., & de Lima Costa, A. B. (2016). A música e seus diversos impactos sobre a saúde e o bem-estar dos animais. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, *14*(3), 6-11.

Cerbai, F., Lana, D., Nosi, D., Petkova-Kirova, P., Zecchi, S., Brothers, H. M., & Giovannini, M. G. (2012). The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. *PLoS One*, *7*(9), e45250.

Chan, M. F., Chan, E. A., & Mok, E. (2010). Effects of music on depression and sleep quality in elderly people: A randomised controlled trial. *Complementary Therapies in Medicine*, *18*(3), 150-159.

Chan, M. F., Wong, Z. Y., Onishi, H., & Thayala, N. V. (2012). Effects of music on depression in older people: a randomised controlled trial. *Journal of Clinical Nursing*, *21*(5-6), 776-783.

Chanda, M. L., & Levitin, D. J. (2013). The neurochemistry of music. *Trends in Cognitive Sciences*, *17*(4), 179-193.

Chen, F., Zhou, L., Bai, Y., Zhou, R., & Chen, L. (2015). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity accounts for anxiety-and depression-like behaviors in rats perinatally exposed to bisphenol A. *Journal of Biomedical Research*, *29*(3), 250.

Chikahisa, S., Sei, H., Morishima, M., Sano, A., Kitaoka, K., Nakaya, Y., & Morita, Y. (2006). Exposure to music in the perinatal period enhances learning performance and alters BDNF/TrkB signaling in mice as adults. *Behavioural Brain Research*, *169*(2), 312-319.

Choi, A. N., Lee, M. S., & Lim, H. J. (2008). Effects of group music intervention on depression, anxiety, and relationships in psychiatric patients: a pilot study. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 14(5), 567-570.

Chu, H., Yang, C. Y., Lin, Y., Ou, K. L., Lee, T. Y., O'Brien, A. P., & Chou, K. R. (2014). The impact of group music therapy on depression and cognition in elderly persons with dementia: a randomized controlled study. *Biological Research for Nursing*, 16(2), 209-217.

Cruz, J. N., Lima, D. D., Dal Margo, D. D., & Cruz, J. G. P. (2015). # 7 Anxiolytic effect of Mozart music over short and long photoperiods as part of environmental enrichment in captive *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae). *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences*, 41, 1-7.

Czéh, B., Varga, Z. K. K., Henningsen, K., Kovács, G. L., Miseta, A., & Wiborg, O. (2015). Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences. *Hippocampus*, 25(3), 393-405.

da Cruz, J. G. P., Dal Magro, D. D., & da Cruz, J. N. (2011). Efeitos da música clássica como elemento de enriquecimento ambiental em *Mus musculus* em cativeiro (Rodentia: Muridae). *Biotemas*, 23(2), 191-197.

da Silva, I. S. (2009). Neurogênese no sistema nervoso adulto de mamíferos. *Revista da Biologia*, 3, 1-14.

Dang, L. C., O'Neil, J. P., & Jagust, W. J. (2012). Dopamine supports coupling of attention-related networks. *Journal of Neuroscience*, 32(28), 9582-9587.

Dayas, C. V., Buller, K. M., & Day, T. A. (1999). Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 11(7), 2312-2322.

de Araujo, A. S., Pacheco, S. S., de Oliveira, A. G., Imaizumi, C., & de Abreu, L. C. (2008). A hipotermia como estratégia protetora de encefalopatia hipóxico-isquêmica em recém-nascidos com asfixia perinatal. *Journal of Human Growth and Development*, 18(3), 346-357.

de Freitas, L. R., Oliveira, M. M., Guimarães, C. S., Ustch, P. R. C., Soares, G. L. F., & Neto, C. M. (2017). Musicoterapia: Alicerce à terapêutica e estratégia de atendimento humanizado. *Revista de Saúde*, 8(1 S1), 116-117.

de Jonge, F. H., Boleij, H., Baars, A. M., Dudink, S., & Spruijt, B. M. (2008). Music during play-time: Using context conditioning as a tool to improve welfare in piglets. *Applied Animal Behaviour Science*, 115(3), 138-148.

de Queiroz, G. J. P. (2016). Mário de Andrade e a musicoterapia. *Revista Brasileira de Musicoterapia*, 21, 73-92.

de Quervain, D., Schwabe, L., & Roozendaal, B. (2017). Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(1), 7-19

Deep, S. N., Baitharu, I., Sharma, A., Gurjar, A. K. S., Prasad, D., & Singh, S. B. (2016). Neuroprotective Role of LN G-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) against Chronic Hypobaric Hypoxia with Crowding Stress (CHC) Induced Depression-Like Behaviour. *PloS One*, 11(4), e0153371.

Delaunay, F., Khan, A., Cintra, A., Davani, B., Ling, Z. C., Andersson, A., & Okret, S. (1997). Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *Journal of Clinical Investigation*, 100(8), 2094.

Delivoria-Papadopoulos, M., & Mishra, O. P. (1998). Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *The Journal of Pediatrics*, 132(3), S30-S34.

Dellavalle, C. T., Daniel, C. R., Aschebrook-Kilfoy, B., Hollenbeck, A. R., Cross, A. J., Sinha, R., & Ward, M. H. (2013). Dietary intake of nitrate and nitrite and risk of renal cell carcinoma in the NIH-AARP Diet and Health Study. *British Journal of Cancer*, 108(1), 205-212.

Donatti, A. F., Soriano, R. N., Leite-Panissi, C. R. A., Branco, L. G., & de Souza, A. S. (2017). Anxiolytic-like effect of hydrogen sulfide (H₂S) in rats exposed and re-exposed to the elevated plus-maze and open field tests. *Neuroscience Letters*, 642, 77-85.

Doosti, M. H., Ahmadi, K., & Fasihi-Ramandi, M. (2017). The effect of ethanolic extract of *Thymus kotschyanus* on cancer cell growth in vitro and depression-like behavior in the mouse. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 13, 1-6.

dos Santos, F. R., & Coronago, V. M. M. O. (2017). Uso da Musicoterapia como Terapia Alternativa no Tratamento da Doença de Parkinson. *Id on Line Revista de Psicologia*, 11(35), 341-360.

Doyle, K. P., Quach, L. N., Solé, M., Axtell, R. C., Nguyen, T. V. V., Soler-Llavina, G. J., & Schneider, J. A. (2015). B-lymphocyte-mediated delayed cognitive impairment following stroke. *Journal of Neuroscience*, 35(5), 2133-2145.

Drysdale, A. T., Grosenick, L., Downar, J., Dunlop, K., Mansouri, F., Meng, Y., Fetcho, R. N., Zebley, B., Oathes, D. J., Etkin, A., Sudheimer, K., Keller, J., Mayberg, H., Gunning, F. M., Alexopoulos, G. S., Fox, M. D., Pacual-Leone, A., Voss, H. U., Casey, B. J., Dubin, M. J. Liston, C. & Schatzberg, A. F. (2017). Resting-state connectivity biomarkers define neurophysiological subtypes of depression. *Nature Medicine*, 23(1), 28.

Duvernoy, H. M. (1988). Anatomy of the Hippocampus. In *The Human Hippocampus* (25-43). JF Bergmann-Verlag.

El Falougy, H., & Benuska, J. (2006). History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. *Bratislavské Lekárske Listy*, 107(4), 103.

Engin, E., Smith, K. S., Gao, Y., Nagy, D., Foster, R. A., Tsvetkov, E., & Hajos, M. (2016). Modulation of anxiety and fear via distinct intrahippocampal circuits. *Elife*, 5, e14120.

Erecinska, M.; Silver, I.A. (2001). Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respiratory Physiology*, 128, 263–276.

Esmailzadeh, S. M., Sharifi, S., & Niknezhad, H. T. (2013). Auditory-Verbal Music Play Therapy: An Integrated Approach (AVMPT). *Iranian Journal of Otorhinolaryngology*, 25(73), 197.

- Fachner, J., Gold, C., & Erkkilä, J. (2013). Music therapy modulates fronto-temporal activity in rest-EEG in depressed clients. *Brain Topography*, 26(2), 338-354.
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron*, 65(1), 7-19.
- Ferreira, R. A., Rosa, W. D. A. G., Silva, V. L. Q., & de Almeida, D. A. (2016). Depressão: Ponto de vista e conhecimento de enfermeiros do Programa Saúde da Família de São Sebastião do Paraíso. *Revista de Iniciação Científica da Libertas*, 5(2), 34-41.
- Flowers, F., & Zimmerman, J. J. (1998). Reactive oxygen species in the cellular pathophysiology of shock. *New horizons (Baltimore, Md.)*, 6(2), 169-180.
- François, C., Grau-Sánchez, J., Duarte, E., & Rodriguez-Fornells, A. (2015). Musical training as an alternative and effective method for neuro-education and neuro-rehabilitation. *Frontiers in Psychology*, 6, 1-15.
- Fukui, H., & Toyoshima, K. (2008). Music facilitate the neurogenesis, regeneration and repair of neurons. *Medical Hypotheses*, 71(5), 765-769.
- Gabryel, B., Kasprowska, D., Kost, A., Łabuzek, K., & Urbanek, T. (2014). Astrocytes in ischemic stroke-a potential target for neuroprotective strategies. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczonej (Online)*, 69, 384-397.
- Gagliardi, R. J. (2000). Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 58(2B), 583-588.
- Galloway, J. N., Aber, J. D., Erisman, J. W., Seitzinger, S. P., Howarth, R. W., Cowling, E. B., & Cosby, B. J. (2003). The nitrogen cascade. *Bioscience*, 53(4), 341-356.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., & Baehrecke, E. H. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, 22(1), 58.

Gluhchevaa, Y., Ivanovb, I., Petrovaa, E., Pavlovaa, E., & Vladova, I. (2012). Sodium nitrite-induced hematological and hemorheological changes in rats. *Series on Biomechanic*, 27, 53-58.

Gold, C., Solli, H. P., Krüger, V., & Lie, S. A. (2009). Dose–response relationship in music therapy for people with serious mental disorders: Systematic review and meta-analysis. *Clinical Psychology Review*, 29(3), 193-207.

Goldstein, A. (1980). Thrills in response to music and other stimuli. *Physiological Psychology*, 8(1), 126-129.

Gonchar, O., Mankovskaya, I., & Klyuchko, E. (2006). Role of complex nucleosides in the reversal of oxidative stress and metabolic disorders induced by acute nitrite poisoning. *Indian Journal of Pharmacology*, 38(6), 414.

Gould, E., Tanapat, P., Hastings, N. B., & Shors, T. J. (1999). Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends in Cognitive Sciences*, 3(5), 186-192.

Green, D. R., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2014). Metabolic control of cell death. *Science*, 345(6203), 1250256.

Greene, C. M., Bahri, P., & Soto, D. (2010). Interplay between affect and arousal in recognition memory. *PLoS One*, 5(7), e11739.

Gressens, P., Mesples, B., Sahir, N., Marret, S., & Sola, A. (2001). Environmental factors and disturbances of brain development. In *Seminars in neonatology* (Vol. 6, No. 2, pp. 185-194).

Grigoryan, G., & Segal, M. (2016). Lasting differential effects on plasticity induced by prenatal stress in dorsal and ventral hippocampus. *Neural Plasticity*, 2016.

Guest, F. L., Martins-de-Souza, D., Rahmoune, H., Bahn, S., & Guest, P. C. (2013). Os efeitos do estresse na função do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal em indivíduos com esquizofrenia. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 20-27.

Guetin, S., Charras, K., Berard, A., Arbus, C., Berthelon, P., Blanc, F., Blayac, J. P., Bonte, F., Bouceffa, J. P., Clement, S., Gzil, F., Laeng, N., Lecourt, E., Ledoux,

S., Platel, H., Thomas-Anterion, C., Touchon, J. Vrait, F. X., Leger, J. M., & Ducourneau, G. (2013). An overview of the use of music therapy in the context of Alzheimer's disease: A report of a French expert group. *Dementia*, 12(5), 619-634.

Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327(1), 1-5.

Hatem, T. P., Lira, P. I., & Mattos, S. S. (2006). Efeito terapêutico da música em crianças em pós-operatório de cirurgia cardíaca. *Jornal de Pediatria*, 82(3).

Hattiangady, B., & Shetty, A. K. (2012). Neural Stem Cell Grafting Counteracts Hippocampal Injury-Mediated Impairments in Mood, Memory, and Neurogenesis. *Stem cells Translational Medicine*, 1(9), 696-708.

Hattiangady, B., Shuai, B., Cai, J., Coksaygan, T., Rao, M. S., & Shetty, A. K. (2007). Increased dentate neurogenesis after grafting of glial restricted progenitors or neural stem cells in the aging hippocampus. *Stem Cells*, 25(8), 2104-2117.

Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., & Cullinan, W. E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24(3), 151-180.

<http://pt.cantorion.org/music-link/24081/Sonata-for-Two-Pianos>. Acessado em 07 de novembro de 2017, as 16h.

Huang, C. C., Lai, C. J., Tsai, M. H., Wu, Y. C., Chen, K. T., Jou, M. J., & Wei, I. H. (2015). Effects of melatonin on the nitric oxide system and protein nitration in the hypobaric hypoxic rat hippocampus. *BMC Neuroscience*, 16(1), 61.

Huh, J. W., Widing, A. G., & Raghupathi, R. (2011). Differential effects of injury severity on cognition and cellular pathology after contusive brain trauma in the immature rat. *Journal of Neurotrauma*, 28(2), 245-257.

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., & Kageyama, R. (2008). Roles of continuous

neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 11(10), 1153-1161.

Jacobson, L., & Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Reviews*, 12(2), 118-134.

Jacobson, N. C., & Newman, M. G. (2017). Anxiety and Depression as Bidirectional Risk Factors for One Another: A Meta-Analysis of Longitudinal Studies. *Psychological Bulletin*, 111, 155-157.

Jain, N. S., Kannamwar, U., & Verma, L. (2017). Ethanol induced antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test: modulation by serotonergic system. *Psychopharmacology*, 234(3), 447-459.

Jausovec, N., Jausovec, K., & Gerlic, I. (2006). The influence of Mozart's music on brain activity in the process of learning. *Clinical Neurophysiology*, 117(12), 2703-2714.

Jessberger, S., Clark, R. E., Broadbent, N. J., Clemenson, G. D., Consiglio, A., Lie, D. C., Squire, L. R., & Gage, F. H. (2009). Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learning & Memory*, 16(2), 147-154.

Joca, S. R. L., Padovan, C. M., & Guimarães, F. S. (2003). Estresse, depressão e hipocampo Stress, depression and the hippocampus. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 25(Supl II), 46-51.

Joëls, M., Karst, H., Krugers, H. J., & Lucassen, P. J. (2007). Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 28(2), 72-96.

Johnston, M. V., Trescher, W. H., Ishida, A., & Nakajima, W. (2001). Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatric Research*, 49(6), 735-741.

Kempermann, G. (2002). Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 22(3), 635-638.

Khan, A. A., Ramli, N. B., & Ismail, Z. M. (2015). Efectos de la Progesterona en Lesiones por Hipoxia Isquémica en la Región Cornu Ammonis (CA) del Hipocampo en Ratas Neonatas. *International Journal of Morphology*, 33(3), 962-970.

Kim, J., Wigram, T., & Gold, C. (2008). The effects of improvisational music therapy on joint attention behaviors in autistic children: a randomized controlled study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 38(9), 1758.

Koelsch, S. (2010). Towards a neural basis of music-evoked emotions. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(3), 131-137.

Kohn, M. C., Melnick, R. L., Ye, F., & Portier, C. J. (2002). Pharmacokinetics of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(6), 676-683.

Koob, G. F. (2008). A role for brain stress systems in addiction. *Neurons*, 59(1), 11-34.

Krumhansl, C. L. (1997). An exploratory study of musical emotions and psychophysiology. *Canadian Journal of Experimental Psychology/Revue Canadienne de Psychologie Expérimentale*, 51(4), 336.

Kulkarni, S., Johnson, P. C. D., Kettles, S., & Kasthuri, R. S. (2012). Music during interventional radiological procedures, effect on sedation, pain and anxiety: a randomised controlled trial. *The British Journal of Radiology*, 85(1016), 1059-1063.

Lee, J. Y., Lee, H. E., Kang, S. R., Choi, H. Y., Ryu, J. H., & Yune, T. Y. (2014). Fluoxetine inhibits transient global ischemia-induced hippocampal neuronal death and memory impairment by preventing blood-brain barrier disruption. *Neuropharmacology*, 79, 161-171.

- Lenart, J. (2017). Mitochondria w niedotlenieniu mózgu. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 71, 118-128.
- Li, W., Huang, R., Shetty, R. A., Thangthaeng, N., Liu, R., Chen, Z., & Forster, M. J. (2013). Transient focal cerebral ischemia induces long-term cognitive function deficit in an experimental ischemic stroke model. *Neurobiology of Disease*, 59, 18-25.
- Li, X., Huo, X., Zhang, C., Ma, X., Han, F., & Wang, G. (2014). Role of continuous high thoracic epidural anesthesia in hippocampal apoptosis after global cerebral ischemia in rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(4), 1227-1240.
- Lin, S. T., Yang, P., Lai, C. Y., Su, Y. Y., Yeh, Y. C., Huang, M. F., & Chen, C. C. (2011). Mental health implications of music: insight from neuroscientific and clinical studies. *Harvard Review of Psychiatry*, 19(1), 34-46.
- Lints, A., & Gadbois, S. (2003). Is listening to Mozart the only way to enhance spatial reasoning?. *Perceptual and Motor Skills*, 97 (3_suppl), 1163-1174.
- Lipska, B. K., & Weinberger, D. R. (2000). To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*, 23(3), 223-239.
- Lu, Y., Liu, M., Shi, S., Jiang, H., Yang, L., Liu, X., Zhang, P., & Pan, F. (2010). Effects of stress in early life on immune functions in rats with asthma and the effects of music therapy. *Journal of Asthma*, 47(5), 526-531.
- Maiti, P., Singh, S. B., & Ilavazhagan, G. (2010). Nitric oxide system is involved in hypobaric hypoxia-induced oxidative stress in rat brain. *Acta Histochemica*, 112(3), 222-232.
- Mamede, A. S., & Esteves, M. L. (2010). MUSICOTERAPIA. *International Journal of Developmental and Educational Psychology*, 4(1), 315-321.
- Maratos, A., Gold, C., Wang, X., & Crawford, M. (2008). Music therapy for depression. *The Cochrane Library*, 199(2), 92-97.

Martin, L. J., Al-Abdulla, N. A., Brambrink, A. M., Kirsch, J. R., Sieber, F. E., & Portera-Cailliau, C. (1998). Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Research Bulletin*, *46*(4), 281-309.

McCutcheon, L. E. (2000). Another failure to generalize the Mozart effect. *Psychological Reports*, *87*(1), 325-330.

McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Rawlins, J. N. P., & Bannerman, D. M. (2004). Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behavioral Neuroscience*, *118*(1), 63.

Medeiros, G. F., Pereira, E., Granzotto, N., & Ramos, A. (2013). Low-Anxiety Rat Phenotypes Can Be Further Reduced through Genetic Intervention. *PLoS One*, *8*(12), e83666.

Medvedeva, Y. V., Ji, S. G., Yin, H. Z., & Weiss, J. H. (2017). Differential Vulnerability of CA1 versus CA3 pyramidal neurons after ischemia: possible relationship to sources of Zn²⁺ accumulation and its entry into and prolonged effects on mitochondria. *Journal of Neuroscience*, *37*(3), 726-737.

Mehrabi, N. F., Waldvogel, H. J., Tippett, L. J., Hogg, V. M., Synek, B. J., & Faull, R. L. (2016). Symptom heterogeneity in Huntington's disease correlates with neuronal degeneration in the cerebral cortex. *Neurobiology of Disease*, *96*, 67-74.

Menon, V., & Levitin, D. J. (2005). The rewards of music listening: response and physiological connectivity of the mesolimbic system. *Neuroimage*, *28*(1), 175-184.

Moghadas, M., Edalatmanesh, M. A., & Robati, R. (2016). Histopathological Analysis from Gallic Acid Administration on Hippocampal Cell Density, Depression, and Anxiety Related Behaviors in A Trimethyltin Intoxication Model. *Cell Journal*, *17*(4), 659.

Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, *297*(5868), 681-683.

Mueller, S. G., & Weiner, M. W. (2009). Selective effect of age, Apo e4, and Alzheimer's disease on hippocampal subfields. *Hippocampus*, 19(6), 558-564.

Naik, S. R., Pilgaonkar, V. W., & Panda, V. S. (2006). Evaluation of antioxidant activity of Ginkgo biloba phytosomes in rat brain. *Phytotherapy Research*, 20(11), 1013-1016.

Nelson, A., Hartl, W., Jauch, K. W., Fricchione, G. L., Benson, H., Warshaw, A. L., & Conrad, C. (2008). The impact of music on hypermetabolism in critical illness. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11(6), 790-794.

Nieto-Romero, R. M. (2017). Efectos de la musicoterapia sobre el nivel de ansiedad del adulto cardiópata sometido a resonancia magnética. *Enfermería Universitaria*, 14(2), 88-96.

Nilsson, U. (2009). Soothing music can increase oxytocin levels during bed rest after open-heart surgery: a randomised control trial. *Journal of Clinical Nursing*, 18(15), 2153-2161

Nunes Ribeiro, EA. A importância da Musicoterapia na paralisia cerebral: percepção da equipe multiprofissional. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Educação João de Deus. Lisboa, 104: 104, 2007.

O'Kelly, J., James, L., Palaniappan, R., Taborin, J., Fachner, J., & Magee, W. L. (2013). Neurophysiological and behavioral responses to music therapy in vegetative and minimally conscious states. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7, 43-52.

O'Connor, J. C., Lawson, M. A., Andre, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., & Dantzer, R. (2009). Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase activation in mice. *Molecular Psychiatry*, 14(5), 511-522.

Olaya, M. S., & Izquierdo, M. T. (2017). Efecto de la musicoterapia receptiva individual en los síntomas depresivos y de ansiedad en la demencia. *Informaciones Psiquiátricas*. 228.

Olazarán-Rodríguez, J., Agüera-Ortiz, L. F., & Muñiz-Schwochert, R. (2012). Síntomas psicológicos y conductuales de la demencia: prevención, diagnóstico y tratamiento. *Revista de Neurología*, 55(10), 598-608.

O'Mara, S. M., Commins, S., Anderson, M., & Gigg, J. (2001). The subiculum: a review of form, physiology and function. *Progress in Neurobiology*, 64(2), 129-155.

Ono, Y., Koizumi, S., & Onozuka, M. (2015). Chewing prevents stress-induced hippocampal LTD formation and anxiety-related behaviors: a possible role of the dopaminergic system. *BioMed Research International*, 2015.

Özen, H., Kamber, U., Karaman, M., Gül, S., Atakişi, E., Özcan, K., & Atakişi, O. (2014). Histopathologic, biochemical and genotoxic investigations on chronic sodium nitrite toxicity in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 66(8), 367-375.

Papadopoulou, A., Siamatras, T., Delgado-Morales, R., Amin, N. D., Shukla, V., Zheng, Y. L., & Kino, T. (2015). Acute and chronic stress differentially regulate cyclin-dependent kinase 5 in mouse brain: implications to glucocorticoid actions and major depression. *Translational Psychiatry*, 5(6), e578.

Papoutsoglou, S. E., Karakatsouli, N., Louizos, E., Chadio, S., Kalogiannis, D., Dalla, C., Polissidis, A., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2007). Effect of Mozart's music (Romanze-Andante of "Eine Kleine Nacht Musik", sol major, K525) stimulus on common carp (*Cyprinus carpio* L.) physiology under different light conditions. *Aquacultural Engineering*, 36(1), 61-72.

Pauwels, E. K., Volterrani, D., Mariani, G., & Kostkiewics, M. (2014). Mozart, music and medicine. *Medical Principles and Practice*, 23(5), 403-412.

Pawluski, J. L., Barakauskas, V. E., & Galea, L. (2010). Pregnancy decreases oestrogen receptor α expression and pyknosis, but not cell proliferation or survival, in the hippocampus. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(4), 248-257.

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149-167.

Pereira, M. A. D., & Barbosa, M. A. (2013). Teaching strategies for coping with stress—the perceptions of medical students. *BMC Medical Education*, 13(1), 50.

Pitychoutis, P. M., Sanoudou, D., Papandreou, M., Nasias, D., Kouskou, M., Tomlinson, C. R., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2014). Forced swim test induces divergent global transcriptomic alterations in the hippocampus of high versus low novelty-seeker rats. *Human Genomics*, 8(1), 4.

Polston, J. E., Rubbinaccio, H. Y., Morra, J. T., Sell, E. M., & Glick, S. D. (2011). Music and methamphetamine: conditioned cue-induced increases in locomotor activity and dopamine release in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 98(1), 54-61.

Procianoy, R. S., & Silveira, R. D. C. (2001). Síndrome hipóxico-isquêmica. *J Pediatr (Rio J)*, 77(Supl 1), S63-70.

Pulera, M. R., Adams, L. M., Liu, H., Santos, D. G., Nishimura, R. N., Yang, F., Cole, G., & Wasterlain, C. G. (1998). Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke*, 29(12), 2622-2630.

Raglio, A., Attardo, L., Gontero, G., Rollino, S., Groppo, E., & Granieri, E. (2015). Effects of music and music therapy on mood in neurological patients. *World Journal of Psychiatry*, 5(1), 68.

Rauscher, F. H., Shaw, G. L., & Ky, C. N. (1993). Music and spatial task performance. *Nature*, 365(6447), 611-611.

Resstel, L. B. M., Joca, S. R. L., Guimaraes, F. G., & Correa, F. M. A. (2006). Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience*, 143(2), 377-385.

Ribeiro, M. C., Bezerra, T. S., Soares, A. C., Ramos, R.B., Carneiro, F. P., Vianna, L. S., Faro, L.R., Silva, M. V., Vieira, M. P., Monteiro, I. O., & Ferreira, V. M. (2017). Hippocampal and cerebellar histological changes and their behavioural repercussions caused by brain ischaemic hypoxia experimentally induced by sodium nitrite. *Behavioural Brain Research*, 332, 223-232.

Rickard, N. S., Toukhsati, S. R., & Field, S. E. (2005). The effect of music on cognitive performance: Insight from neurobiological and animal studies. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, 4(4), 235-261.

Rideout, B. E., & Laubach, C. M. (1996). EEG correlates of enhanced spatial performance following exposure to music. *Perceptual and Motor Skills*, 82(2), 427-432.

Robbins, L., & Margulis, S. W. (2016). Music for the birds: effects of auditory enrichment on captive bird species. *Zoo Biology*, 35(1), 29-34.

Rodier, P. M. (1995). Developing brain as a target of toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 103(Suppl 6), 73.

Rosenblum, W. I. (1997). Histopathologic clues to the pathways of neuronal death following ischemia/hypoxia. *Journal of Neurotrauma*, 14(5), 313-326.

Rotllant, J., & Tort, L. (1997). Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *Journal of Fish Biology*, 51(1), 21-28.

Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., Fenton, A. A., Dranovsky, A., & Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472(7344), 466-470.

Sakamoto, M., Ando, H., & Tsutou, A. (2013). Comparing the effects of different individualized music interventions for elderly individuals with severe dementia. *International Psychogeriatrics*, 25(5), 775-784.

Salimpoor, V. N., Benovoy, M., Larcher, K., Dagher, A., & Zatorre, R. J. (2011). Anatomically distinct dopamine release during anticipation and experience of peak emotion to music. *Nature Neuroscience*, 14(2), 257-262.

Sampaio, W. C. M., Ribeiro, M. C., Costa, L. F., Souza, W. C. D., Castilho, G. M. D., Assis, M. S. D., Carneiro, M., S., Marchiori, F. P., Lima, D., Cavalcanti, N. T.,

Ferreira P. P., & Ferreira, V. M. (2017). Effect of music therapy on the developing central nervous system of rats. *Psychology & Neuroscience*, 10(2), 176.

Samuels, B. A., & Hen, R. (2011). Neurogenesis and affective disorders. *European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1152-1159.

Sánchez Pérez M. . 2a ed. (2014). Trastornos afectivos. En: Sánchez M, Agüera L, Martín M, Azpiazu P, Olivera J, Mateos R (eds.). Guía esencial de psicogeriatría Madrid: Editorial Médica Panamericana; 181-226

Scheidt, L., Fries, G. R., Stertz, L., Cabral, J. C. C., Kapczinski, F., & Almeida, R. M. M. D. (2015). Ethanol during adolescence decreased the BDNF levels in the hippocampus in adult male Wistar rats, but did not alter aggressive and anxiety-like behaviors. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*, 37(3), 143-151.

Schellenberg, E. G. (2004). Music lessons enhance IQ. *Psychological Science*, 15(8), 511-514.

Schmidt-Kastner, R. (2015). Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia–hypoxia. *Neuroscience*, 309, 259-279.

Scorza, F. A., Arida, R. M., Cysneiros, R. M., Scorza, C. A., Albuquerque, M. D., & Cavalheiro, A. (2005). Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 63(2-A), 283-288.

Sicard, K. M., Henninger, N., Fisher, M., Duong, T. Q., & Ferris, C. F. (2006). Long-term changes of functional MRI–based brain function, behavioral status, and histopathology after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 37(10), 2593-2600.

Slavich, G. M., & Irwin, M. R. (2014). From stress to inflammation and major depressive disorder: A social signal transduction theory of depression. *Psychological Bulletin*, 140(3), 774.

Small, S. A., Schobel, S. A., Buxton, R. B., Witter, M. P., & Barnes, C. A. (2011). A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(10), 585-601.

Smith, A., Waters, B., & Jones, H. (2010). Effects of prior exposure to office noise and music on aspects of working memory. *Noise and Health, 12*(49), 235.

Snyder, J. S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., & Cameron, H. A. (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature, 476*(7361), 458-461.

Suda, M., Morimoto, K., Obata, A., Koizumi, H., & Maki, A. (2008). Cortical responses to Mozart's sonata enhance spatial-reasoning ability. *Neurological Research, 30*(9), 885-888.

Sugawara, T., Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Kawase, M., & Chan, P. H. (1999). Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience, 19*, RC39-1.

Sutoo, D. E., & Akiyama, K. (2004). Music improves dopaminergic neurotransmission: demonstration based on the effect of music on blood pressure regulation. *Brain Research, 1016*(2), 255-262.

Talero-Gutiérrez, C., Zarruk-Serrano, J. G., & Espinosa-Bode, A. (2004). Percepción musical y funciones cognitivas. ¿ Existe el efecto Mozart?. *Revista de Neurología, 39*(12), 1167-73.

Tanaka, S., Kondo, S., Tanaka, T., & Yonemasu, Y. (1988). Long-term observation of rats after unilateral intra-amygdaloid injection of kainic acid. *Brain Research, 463*(1), 163-167.

Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, A. J., & Gould, E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *Journal of Neuroscience, 19*(14), 5792-5801.

Tasset, I., Quero, I., García-Mayórgaz, Á. D., Del Río, M. C., Túnez, I., & Montilla, P. (2012). Changes caused by haloperidol are blocked by music in Wistar rat. *Journal of Physiology and Biochemistry, 68*(2), 175-179.

- Terraneo, L., & Samaja, M. (2017). Comparative Response of Brain to Chronic Hypoxia and Hyperoxia. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1914.
- Thoma, M. V., La Marca, R., Brönnimann, R., Finkel, L., Ehlert, U., & Nater, U. M. (2013). The effect of music on the human stress response. *PloS One*, 8(8), e70156.
- Thornton, C., Leaw, B., Mallard, C., Nair, S., Jinnai, M., & Hagberg, H. (2017). Cell Death in the Developing Brain after Hypoxia-Ischemia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11.
- Trainor, L. (2008). Science & music: the neural roots of music. *Nature*, 453(7195), 598-599.
- Trappe, H. J. (2012). Role of music in intensive care medicine. *International Journal of Critical Illness and Injury Science*, 2(1), 27.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(2), 335-344.
- Ueda, T., Suzukamo, Y., Sato, M., & Izumi, S. I. (2013). Effects of music therapy on behavioral and psychological symptoms of dementia: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews*, 12(2), 628-641.
- Uetake, K., Hurnik, J. F., & Johnson, L. (1997). Effect of music on voluntary approach of dairy cows to an automatic milking system. *Applied Animal Behaviour Science*, 53(3), 175-182.
- Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(6), 397.
- Uran, S. L., Aon-Bertolino, M. L., Caceres, L. G., Capani, F., & Guelman, L. R. (2012). Rat hippocampal alterations could underlie behavioral abnormalities induced by exposure to moderate noise levels. *Brain Research*, 1471, 1-12.
- Van Raalte, D. H., Ouwens, D. M., & Diamant, M. (2009). Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options?. *European Journal of Clinical Investigation*, 39(2), 81-93.

Vannucci, R. C. (1990). Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatric Research*, 27(4), 317-326.

Vink, A. C., Bruinsma, M. S., & Scholten, R. J. (2003). Music therapy for people with dementia. *The Cochrane Library*. 245, 268-272.

Vuilleumier, P., & Trost, W. (2015). Music and emotions: from enchantment to entrainment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1337(1), 212-222.

Wang, X. Q., Zhong, X. L., Li, Z. B., Wang, H. T., Zhang, J., Li, F., & Li, Z. Y. (2015). Differential roles of hippocampal glutamatergic receptors in neuropathic anxiety-like behavior after partial sciatic nerve ligation in rats. *BMC Neuroscience*, 16(1), 14.

Whitfield, S. (2010). Music: its expressive power and moral significance. *Musical Offerings*, 1(1), 2.

Xing, Y., Chen, W., Wang, Y., Jing, W., Gao, S., Guo, D., Xia, Y., & Yao, D. (2016). Music exposure improves spatial cognition by enhancing the BDNF level of dorsal hippocampal subregions in the developing rats. *Brain Research Bulletin*, 121, 131-137.

Xu, B., Xiao, A. J., Chen, W., Turlova, E., Liu, R., Barszczyk, A., & Sun, H. S. (2016). Neuroprotective effects of a PSD-95 inhibitor in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Molecular Neurobiology*, 53(9), 5962-5970.

Yamasaki, A., Booker, A., Kapur, V., Tilt, A., Niess, H., Lillemoe, K. D., Warshaw, L., & Conrad, C. (2012). The impact of music on metabolism. *Nutrition*, 28(11), 1075-1080.

Zanini, C. R. O., Jardim, P. C. B. V., Salgado, C. M., Nunes, M.C, Urzêda F. L. D., Carvalho, M. V. C., Pereira, D. A., Souza, W. K., & Veiga Jardim, B. D. S. (2009). O efeito da musicoterapia na qualidade de vida e na pressão arterial do paciente hipertenso. *Arq. Bras. Cardiol.*; 93(5); 534-540.

Zarrindast, M. R., & Khakpai, F. (2015). The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Archives of Iranian Medicine (AIM)*, 18(9).

Zhang, X., Huang, X., Fang, C., Li, Q., Cui, J., Sun, J., & Li, L. (2016). miR-124 Regulates the Expression of BACE1 in the Hippocampus Under Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Molecular neurobiology*, 1-9.

Zhao, D. A., Bi, L. Y., Huang, Q., Zhang, F. M., & Han, Z. M. (2016). Isoflurano fornece neuroproteção em lesão cerebral hipóxico-isquêmica neonatal por inibição da apoptose. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, 66(6), 613-621.

Zhou, J., Zhuang, J., Li, J., Ooi, E., Bloom, J., Poon, C., & Barone, F. C. (2013). Long-term post-stroke changes include myelin loss, specific deficits in sensory and motor behaviors and complex cognitive impairment detected using active place avoidance. *PloS One*, 8(3), e57503.

Zhu, C., Wang, X., Cheng, X., Qiu, L., Xu, F., Simbruner, G., & Blomgren, K. (2004). Post-ischemic hypothermia-induced tissue protection and diminished apoptosis after neonatal cerebral hypoxia–ischemia. *Brain Research*, 996(1), 67-75.

Zola-Morgan, S., Squire, L. R., & Amaral, D. G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 6(10), 2950-2967.

Zomignani, A. P., Zambelli, H. J. L., & Antonio, M. Â. R. (2009). Desenvolvimento cerebral em recém-nascidos prematuros. *Revista Paulista de Pediatria*, 27(2), 198-203.

ANEXO

Comprovantes CEUA



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 08 de novembro de 2013.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"INFLUÊNCIA DA MUSICOTERAPIA NO SISTEMA NERVOSO EM DESENVOLVIMENTO: UMA AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL"**, UnBDOC n.º 80243/2013, sob responsabilidade da Professora Vânia Moraes Ferreira foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Fernando Pacheco Rodrigues
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 10 de julho de 2014.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"APLICABILIDADE DA MUSICOTERAPIA NAS COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS DECORRENTES DA HIPÓXIA ISQUÊMICA ENCEFÁLICA"**, UnBDoC n.º 67736/2014, sob responsabilidade da Professora Vânia Ferreira foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.