

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-Graduação em Neurociências

**EXPOSIÇÃO CRÔNICA MATERNAL A SONS DE 22 kHz ALTERA A  
RESPOSTA DE ESQUIVA INIBITÓRIA SEM AFETAR A FUGA E ALTERA  
PARÂMETROS SEROTONINÉRGICOS CENTRAIS DAS MÃES E DA PROLE  
NA IDADE ADULTA**

Patrícia da Silva Oliveira

Belo Horizonte

2015



Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-Graduação em Neurociências

**EXPOSIÇÃO CRÔNICA MATERNAL A SONS DE 22 kHz ALTERA A  
RESPOSTA DE ESQUIVA INIBITÓRIA SEM AFETAR A FUGA E ALTERA  
PARÂMETROS SEROTONINÉRGICOS CENTRAIS DAS MÃES E DA PROLE  
NA IDADE ADULTA**

Patrícia da Silva Oliveira

Tese de Doutorado submetida ao Programa  
de Pós-Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Minas Gerais,  
como parte dos requisitos necessários para a  
obtenção do título de Doutor em  
Neurociências.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Ângela M. Ribeiro

Co-orientador: Prof. Hani Camille Yehia

Belo Horizonte

**2015**



## *AGRADECIMENTOS*

---

Aos meus pais, João José de Oliveira e Maria Lúcia da Silva Oliveira, meus orientadores de sempre, obrigada pelo ontem, pelo hoje e pelo amanhã. Vocês são minha certeza, meu porto seguro.

Aos meus filhos, Ângelo e Vitória, pela força e estímulo de seguir em frente. Sempre.

A todos em minha enorme família, pela torcida.

A minhas tias Marlene, Terezinha e às minhas avós Alice e Rita. Meus exemplos de força e superação.

A minhas tias Elinete e Marly, presenças constantes em todos os momentos.

Aos amigos do laboratório, pelo apoio dentro e fora dele. Agradeço principalmente por terem me ensinado a ter fé (Polliana), a dizer não (Karina), a ouvir (Valéria), a ser bom e amigo (Daniel), a ter persistência (Paulo Renato), a colaborar (Cida) e a ser companheiro em todas as horas (Igor, *mi cuatacho*).

A “Rubitcha”, Marcos, Ana Raquel (Queridona), Letícia, Daniele Marra, Ieda, Raquel, Thatiane, Isabela, Fábio, Rafael, Eduardo, Lucas, .... e todos que fizeram parte dessa história.

Aos amigos de todas as horas Letícia, Roger, Igor (de novo?), Paulo Fernandes, Leonor.

Ao queridíssimo amigo Jefferson. Por todas as vidas.

A minha orientadora, Angela Maria Ribeiro, pelo apoio em todas as horas e pela relação pendular.

*“Educação é aquilo que fica depois que você esquece o que a escola ensinou.”*

*Albert Einstein*



## SUMÁRIO

---

AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
INTRODUÇÃO.....	1
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS E JUSTIFICATIVAS.....	1
2. O RUÍDO E A GESTAÇÃO.....	3
3. SISTEMA AUDITIVO.....	4
4. VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA DE 22 kHz EM RATOS.....	6
5. RUÍDO E SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	8
5.1Amídala.....	10
5.2Hipocampo.....	11
5.3Córtex Pré-Frontal.....	12
5.4Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP).....	13
5.5Tálamo.....	13
6. ANSIEDADE E MEDO.....	14
7. GESTAÇÃO E ESTADO EMOCIONAL.....	15
8. SISTEMA SEROTONINÉRGICO.....	16
OBJETIVOS.....	20
1. OBJETIVO GERAL.....	20
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
MÉTODOS.....	22
1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	22
1.1Obtenção dos animais.....	22
1.2Determinação do ciclo estral das fêmeas.....	22
1.3Grupos experimentais.....	25
2. EXPOSIÇÃO A SONS DE 22 kHz.....	28

3. ESTUDOS COMPORTAMENTAIS.....	29
3.1 Equipamento - Labirinto em T-Elevado (LTE) .....	29
3.2 Esquiva Inibitória e Fuga.....	30
3.3 Procedimentos.....	30
4. ESTUDOS BIOQUÍMICOS .....	31
4.1 Obtenção das amostras biológicas .....	31
4.2 Determinação das concentrações de serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) .....	32
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5.1 Análise dos resultados das fêmeas:.....	34
5.2 Análise dos resultados da prole.....	34
RESULTADOS .....	36
1. TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA .....	36
1.1 Fêmeas.....	36
1.2 Prole.....	37
2. TAREFA DE FUGA .....	38
2.1 Fêmeas.....	38
2.2 Prole.....	39
3. MEMÓRIA DAS TAREFAS DE ESQUIVA INIBITÓRIA E FUGA .....	40
3.1 Fêmeas.....	40
3.2 Prole.....	41
4. CONCENTRAÇÕES DE 5-HT .....	43
4.1 Fêmeas.....	43
4.2 Prole.....	44
5. CONCENTRAÇÕES DE 5-HIAA.....	46
5.1 Fêmeas.....	46
5.2 Prole.....	47
6. TAXA DE RENOVAÇÃO DE SEROTONINA.....	49
6.1 Fêmeas.....	49



6.2Prole.....	50
DISCUSSÃO .....	52
CONCLUSÕES.....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
ANEXOS .....	80
1. APROVAÇÃO JUNTO AO CEUA .....	80
2. ARTIGO.....	81
3. DADOS BRUTOS .....	96
3.1Dados das fêmeas.....	96
3.2Dados da prole.....	97



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

---

Figura 1 – Desenho esquemático da estrutura auricular de mamíferos.....	5
Figura 3 – Representações do perfil de vocalizações ultrassônicas (VUs) emitidas por ratos em três diferentes contextos. ....	8
Figura 4 - Esquema do sistema serotoninérgico no SNC.....	18
Figura 5– Representação do esfregaço vaginal.....	24
Figura 6 – Cronograma dos experimentos:.....	27
Figura 7 – Gráfico representando a vocalização de 22k Hz emitida por ratos em situações aversivas	28
Figura 8 – Foto do interior da caixa de isolamento acústico, contendo alto-falante e câmera de vídeo. ....	29
Figura 9 – Fotos do Labirinto em T Elevado, em duas perspectivas; .....	31
Figura 10 – Painel A: Foto do suporte de acrílico utilizado para separação da substância cinzenta periaquedutal. Painel B: Fotos das fatias transversais de cérebro, com 1mm de espessura cada, indicando os locais de onde foram removidos a amígdala e hipocampo. Detalhes sobre as coordenadas dos cortes transversais estão descritos no item Material e Métodos. ....	32
Figura 11 – Perfil cromatográfico de separação da 5-HT e do 5-HIAA.....	33
Figura 12 – Desempenho de fêmeas Wistar na tarefa de esquiava inibitória no LTE. ....	36
Figura 13 – Desempenho da prole na tarefa de esquiava inibitória no LTE. ....	37
Figura 14 – Desempenho das fêmeas Wistar na Tarefa de Fuga no LTE. ....	38
Figura 15 – Desempenho da prole na tarefa de fuga no LTE. ....	39
Figura 16 – Desempenho das fêmeas no teste de memória.....	41
Figura 17 – Desempenho da prole no teste de memória .....	42
Tabela 1 – Valores de F e p obtidos a partir da ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: gestação e exposição a sons de 22 kHz) sobre as concentrações de serotonina. ....	44
Tabela 2 – Valores de F e p obtidos a partir da ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: exposição crônica intrauterina e exposição aguda na idade adulta a sons de 22 kHz) sobre as concentrações de 5-HT em regiões cerebrais. ....	45
Tabela 3 – Valores de F e p obtidos a partir da ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: gestação e exposição a sons de 22 kHz) sobre as concentrações de 5-HIAA em regiões cerebrais.....	47
Tabela 4 – Valores de F e p obtidos a partir da ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: gestação e exposição crônica ou aguda a sons de 22 kHz nos fases intrauterina e adulta, respectivamente) sobre as concentrações de 5-HIAA em regiões cerebrais da prole. ....	48
Tabela 5 – Valores de F e p obtidos a partir da ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: gestação e exposição a sons de 22 kHz) sobre a taxa de renovação da serotonina.....	50
Tabela 6 - Valores de F e p obtidos a partir da ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: gestação e exposição a sons de 22 kHz) sobre a concentração de 5-HIAA.....	51



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

μL – microlitros

°C – graus Celsius

5-HIAA – sigla do termo em inglês para Ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT – 5-hidroxitriptamina ou serotonina

5-HT1A – Receptor 1A para 5-hidroxitriptamina

ACTH – sigla do termo em inglês para Adrenocorticotrofina

ANOVA – Análise de Variância

CA1 – *Cornu ammonis1*

CA3 – *Cornuammonis3*

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cm – centímetro

CPF – Córtex Pré-frontal

CRH – sigla do termo em inglês para Hormônio Liberador de Corticotrofina

DA – Dopamina

dB – decibel

EDTA –sigla do termo em inglês para Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

g – grama

HPA – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

HPLC – sigla do termo em inglês para Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

Hz – Hertz

kHz – kiloHertz

LTE – Labirinto em T Elevado

LTP – sigla do termo em inglês para Potencial de Longa Duração

M – Molar

MAO – Monoamina Oxidase

mM – milimolar

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

NE – Norepinefrina

ng – nanograma

NGM – Nucleo Genuculado Medial

NPV – nucleio paraventricular

SCP – sigla do termo em inglês para Substância Cinzenta Periaquedutal

PFC – sigla em inglês para o termo Córtex Pré-Frontal

pg – picograma

s – segundo

SNC – Sistema Nervoso Central

VUs – Vocalizações ultrassônicas

WHO – sigla em inglês para Organização Mundial de saúde





No presente estudo foram avaliados os efeitos da exposição crônica a sons de 22 kHz durante a gravidez sobre parâmetros serotoninérgicos em regiões do sistema nervoso central (SNC) e aspectos do comportamento de ratas Wistar, após o período de amamentação. Essas avaliações foram também realizadas nos ratos machos da prole. Além disso, avaliaram-se os efeitos de uma exposição aguda ao som de 22 kHz sobre aspectos emocionais e parâmetros serotoninérgicos, na prole adulta previamente submetida ao som de 22 kHz durante a fase intrauterina. A hipótese principal é de que a exposição crônica a estímulos de 22 kHz durante um estágio inicial do desenvolvimento iria interferir com parâmetros serotoninérgicos centrais e, mais tarde, com as respostas defensivas dos filhotes re-expostos a estímulos aversivos durante a fase adulta. Uma segunda questão abordada foi se os efeitos da exposição ao som de 22 kHz sobre a esQUIVA INIBITÓRIA seriam diferentes dos efeitos sobre a resposta de fuga. Portanto, trata-se de um estudo fatorial 2x2, onde os fatores foram: (i) para as fêmeas – a exposição crônica a sons de 22 kHz e gestação e, (ii) para a prole – a exposição crônica durante a fase intrauterina e a exposição aguda durante a fase adulta a sons de 22 kHz. Trinta e duas fêmeas de ratos Wistar foram divididas em quatro grupos (n=8, cada): controle não-grávidas; exposição crônica não-grávidas; controle grávida; e exposição crônica grávida. Quarenta e oito filhotes machos - seleção aleatória de três ratos provenientes de cada rata grávida - foram divididos em quatro grupos (n=12, cada): exposição crônica intrauterina; exposição aguda na idade adulta; exposição crônica durante a fase intrauterina e exposição aguda na fase adulta; e nenhuma exposição (controle). Memória e os estados de ansiedade e medo foram avaliados medindo-se o desempenho dos animais nas tarefas de esQUIVA INIBITÓRIA e fuga, respectivamente, usando o labirinto em T-elevado (LTE). Parâmetros serotoninérgicos (níveis de 5-HT e 5- HIAA) foram determinados no hipocampo, amídala, substância cinzenta periaquedutal e córtex pré-frontal. A exposição sonora crônica diminuiu a latência de esQUIVA INIBITÓRIA sem afetar a resposta de fuga e afetou parâmetros serotoninérgicos em ratas de ambos os grupos, fêmeas grávidas e não grávidas. Na prole, houve uma interação entre os efeitos dos fatores – exposição crônica intrauterina e exposição aguda na fase adulta - sobre o desempenho na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA, sem efeito de nenhum dos dois tratamentos, isolados ou associados, sobre a resposta de fuga. Cada um dos tratamentos separados promoveu diminuição das concentrações de 5-HIAA no hipocampo da prole. Uma interação entre os tratamentos também foi encontrada para os níveis de 5-HIAA no hipocampo e

amídala da prole. Houve efeito significativo da exposição no período intrauterino sobre a taxa de recuperação de 5-HT no CPF e amídala da prole. Estes resultados indicam que a exposição ao som de 22 kHz em fases iniciais do desenvolvimento promove alterações no sistema serotoninérgico central e alterações no comportamento emocional que podem persistir em períodos posteriores da vida. Além disto, os efeitos distintos sobre a esquiva inibitória e resposta de fuga, tanto nas fêmeas como na prole, indicam a existência de substratos neurobiológicos diferentes para cada uma dessas duas respostas defensivas.

## ABSTRACT

---

*In the present study we evaluated the effects of chronic exposure to sounds at 22 kHz during pregnancy on the central serotonergic and behavioral parameters in Wistar rat dams after the suckling period and on their male rat offspring. In addition, we also assessed the effects of an acute 22 kHz sound, associated with the chronic intrauterine exposure, on the emotional responses of adult offspring. The primary hypothesis was that experiencing 22 kHz stimuli during an early stage of development would interfere with brain serotonergic parameters and, later, with the adult rat's defensive responses. The corollary question was whether a 22 kHz sound exposure would differentially affect inhibitory avoidance and escape responses and central serotonergic parameters. In this 2x2 study the factors were: (i) for dams - a chronic sound exposure and pregnant state per se, (ii) for offspring - a chronic intrauterine sound exposure and an acute 22 kHz sound exposure in adulthood. Thirty-two female Wistar rats were divided into four groups of eight: non-pregnant control; non-pregnant chronic exposure; pregnant control; and pregnant chronic exposure. Forty-eight male offspring were divided into four groups of twelve: chronic intrauterine sound exposure; acute sound exposure in adulthood; chronic intrauterine exposure with acute exposure in adulthood; and no exposure treatment (control). Learning, memory, anxiety and fear states were assessed through inhibitory avoidance and escape tasks, using an Elevated T-Maze. Serotonergic parameters (5-HT and 5-HIAA levels) were determined in the hippocampus, amygdala, periaqueductal grey area and prefrontal cortex (PFC). Chronic sound exposure affected inhibitory avoidance and serotonergic parameters in female rats. For offspring, there was an interaction between the factors (chronic and acute sound exposures) on inhibitory avoidance response but not on escape response. Both treatments decreased 5-HIAA concentrations in the hippocampus. An interaction between the treatments was also found for 5-HIAA levels in the hippocampus and amygdala. There were significant effects of intrauterine and acute 22 kHz exposure on 5-HT turnover rate in PFC and amygdala of the offspring rats. These results illuminate the potential of an early acoustic sound exposure for causing central serotonergic and emotional behavioral changes that can persist into later periods of life. Besides, the present data also show that the 22 kHz sound exposure represents a useful tool for understanding the mechanism of a specific defensive behavior. That is, as the 22 kHz sound exposure affects inhibitory avoidance but not escape behavior, it might be relevant for clarifying physiological and molecular aspects of emotion.*



### 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS E JUSTIFICATIVAS

Os fenômenos abordados no presente estudo são a gestação e a exposição a sons de 22kiloHertz (kHz). Todos os seres vivos são expostos, a curto ou longo prazo, a eventos estressantes durante a vida. Os efeitos destas experiências na cognição e na emoção e a persistência destes efeitos em fases posteriores da vida dependem de características inerentes ao indivíduo e da natureza do estímulo estressor (Bowman, 2005). Os diferentes sons ao nosso redor podem apresentar um caráter aversivo ou não, dependendo de certas características, como intensidade, frequência e amplitude do som, além da sensibilidade auditiva do ouvinte, que varia entre as espécies (Heffner e Heffner, 2010). Em ratos, várias pesquisas têm associado vocalização ultrassônica com o comportamento emocional destes animais. Ultrassons de 22 kHz são emitidos em situações de antecipação da punição e em comportamentos de esquiva, indicando a presença de um componente aversivo (Knutson *et al.*, 2002) e, além disso, a exposição do animal a esta frequência aumenta a frequência de comportamentos defensivos (Beckett *et al.*, 1996).

A primeira hipótese desse trabalho é que a experiência da exposição a sons de 22 kHz durante estágios iniciais do desenvolvimento poderia interferir em parâmetros serotoninérgicos em regiões do SNC da prole e, posteriormente, com as respostas defensivas desses animais durante a fase adulta.

O processo biológico onde o desenvolvimento do indivíduo é influenciado pelo ambiente materno é denominado *programming* (Schlotz e Phillips, 2009). De acordo com esta teoria, as experiências iniciais da vida desempenham um papel crucial no desenvolvimento do perfil psicológico do indivíduo adulto (Lucas, 1991; Heim *et al.*, 2010). Dados obtidos utilizando paradigmas experimentais de manipulação neonatal (Pryce *et al.*, 2005), separação materna (Plotsky e Meaney, 1993), e aumento ou diminuição do cuidado maternal (Meaney, 2001; Menard e Hakvoort, 2007; ChamSCPne, 2008) documentaram que as primeiras experiências têm efeitos duradouros, influenciando o funcionamento do cérebro adulto e o comportamento. Diferentes condições ambientais, incluindo estresse maternal (Lesage *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2009) induzem o fenômeno denominado *programming*. O mecanismo envolvido no *programming* perinatal inclui alterações na expressão gênica, proliferação celular e mudanças

epigenéticas (Lucas, 1994). Em ratos, por exemplo, a exposição ao ruído durante a gestação influencia a neurogênese e tamanho do córtex cerebral da prole (Kim *et al.*, 2013). Além disso, durante a gestação, estímulos sonoros aversivos podem levar a modificações neurobiológicas, tais como um aumento nos níveis de glicocorticóides (cortisol em humanos, corticosterona em ratos) tanto na mãe, quanto no feto (Fowden *et al.*, 2006; Weinstock, 2008). Contudo, mais pesquisas são necessárias para compreender os efeitos neurobiológicos de estímulos aversivos durante as diferentes fases do desenvolvimento e como eles afetam o comportamento da mãe e sua prole.

Como o comportamento individual é determinado pelo *pool* genético e pelas experiências prévias do indivíduo, a estratégia de enfrentamento, afetada pela interpretação individual de eventos passados, pode determinar o comportamento de adaptação a estímulos aversivos (Yim *et al.*, 2012). Por outro lado, alguns autores sugerem que a exposição crônica a um estímulo pode reduzir a capacidade do indivíduo em se adaptar psicologicamente ou fisiologicamente a outro estímulo ou até mesmo aumentar a vulnerabilidade a um estímulo subsequente (Wallenius, 2004). Desta forma, levantamos uma segunda hipótese de que uma segunda exposição ao som de 22 kHz, animal na idade adulta (2 meses de idade), teria efeitos distintos entre os animais que foram expostos previamente na fase intrauterina e aqueles cuja primeira exposição estaria ocorrendo na idade adulta.

As alterações biológicas (p.ex. hormonais) e comportamentais (p.ex. alterações no humor) que ocorrem durante o processo gestacional podem interferir aumentando ou diminuindo a susceptibilidade aos estímulos ambientais. Dessa forma, estas alterações poderiam afetar tanto a gestante (Camacho *et al.*, 2006) quanto o desenvolvimento do feto (Huang *et al.*, 2012). As alterações metabólicas decorrentes do processo gestacional caracterizam um estado homeostático no qual os efeitos de estímulos ambientais podem gerar respostas diferentes, quando comparados àqueles que ocorrem em mulheres não grávidas. Assim levantamos outra hipótese - a susceptibilidade de ratas grávidas e não grávidas frente à exposição crônica de ao som de 22 kHz seria diferente.

Além disto, dados da literatura indicam que estímulos ambientais durante a gestação afetam o sistema serotoninérgico da prole (Van Den Hove *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2012) e que estas alterações podem estar correlacionadas ao comportamento emocional (Mosienko *et al.*, 2012; Tsoory *et al.*, 2012). Assim, outra hipótese levantada neste trabalho é a de que as alterações

metabólicas que ocorrem durante o processo gestacional e durante a exposição a sons de 22 kHz afetariam o sistema serotoninérgico das fêmeas e da prole, tendo consequências no comportamento de esquiva e na resposta de fuga.

## **2. O RUÍDO E A GESTAÇÃO**

O ruído é uma das fontes mais comuns de estresse ambiental (Campbell, 1983). Existem evidências de que o ruído excessivo pode prejudicar seriamente a saúde dos seres vivos, sendo considerado atualmente um dos principais problemas ambientais dos grandes centros urbanos e, eminentemente, uma questão relacionada à saúde pública (Who, 2012).

Os efeitos do ruído sobre o organismo dependem de fatores inerentes ao som como a intensidade e a frequência; e de fatores relativos ao ouvinte, como a sensibilidade auditiva (Heffner e Heffner, 2010), o processo de interpretação cognitiva (Job e Hatfield, 1998) e a capacidade para lidar com situações concorrentes ou subsequentes (Wallenius, 2004). Dependendo da intensidade e da duração, os ruídos podem promover prejuízos na execução de tarefas cognitivas, como memória de longo prazo, atividade aritmética e tarefas visuais (Manikandan *et al.*, 2006; Rabat *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2009), além de diminuir a capacidade de concentração e de comunicação, alterando o processamento da fala e o controle da atenção (Kujala e Brattico, 2009). Foi relatado que a exposição aguda, subaguda e crônica a ruído branco com a intensidade de 100dB induz aumento da concentração plasmática de corticosterona em ratos (Manikandan *et al.*, 2006; Samson *et al.*, 2007), promovendo efeitos negativos sobre a aprendizagem e a memória (Manikandan *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2009).

Os efeitos do ruído sobre o organismo dependem também do estágio de desenvolvimento do indivíduo. Quando a exposição ocorre durante o processo gestacional, poderá levar a consequências na neurobiologia e no comportamento tanto da mãe, quanto do feto. Os efeitos na prole foram associados, por alguns autores, a alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) fetal induzida de forma indireta, via hormônios maternos (Weinstock, 1997). A corticosterona, catecolaminas, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e  $\beta$ -endorfina, são exemplos de hormônios secretados no organismo materno, que atravessam a barreira placentária e chegam ao cérebro fetal (Zarrow *et al.*, 1970; Guillemin *et al.*, 1977; Sandman e Kastin, 1981; Falconer *et al.*, 1988), de forma que os estímulos sonoros aversivos podem

atuar aumentando a atividade do eixo HPA da gestante, induzindo um aumento nos níveis de glicocorticoides também do feto (Fowden *et al.*, 2006; Weinstock, 2008).

Apesar de alguns autores relatarem que diferentes estímulos do ambiente promovem alterações em parâmetros biológicos maternos e que as flutuações em hormônios gonadais durante a gravidez e pós-parto, alteram a neurobiologia da mãe, como, por exemplo, interferindo na atividade do eixo HPA (Brummelte e Galea, 2010), não encontramos na literatura trabalhos que avaliem os efeitos da exposição ao ruído, na mãe. Existem indícios de que hormônios relacionados com a gravidez, tais como a ocitocina e a prolactina podem alterar a susceptibilidade da fêmea a diferentes estímulos (Abou-Saleh *et al.*, 1999; Lightman *et al.*, 2001; Torner *et al.*, 2002; Yim *et al.*, 2009).

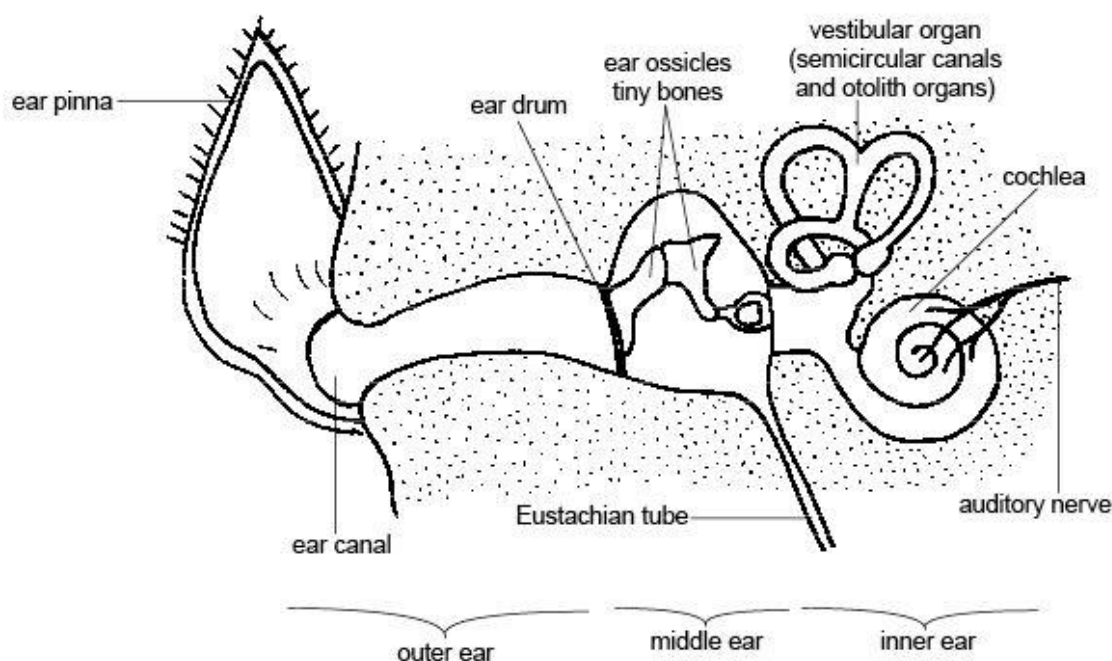
### **3. SISTEMA AUDITIVO**

O sistema auditivo de mamíferos é formado pelas estruturas do ouvido e por componentes neuronais nos sistemas nervoso periférico e central. O ouvido é dividido em três partes - ouvido externo, médio e ouvido interno (**Figura 1**). O ouvido externo é formado pelo pavilhão auricular (ou a orelha) e o canal auditivo. O pavilhão auricular dirige os sons (ondas de pressão) que viajam através do ar no canal do ouvido até a membrana timpânica (ou o tímpano) da orelha média. O ouvido médio contém a membrana timpânica, que transmite vibrações sonoras do exterior para o ouvido médio, uma cavidade que abriga os ossículos que amplificam o sinal para o ouvido interno. O ouvido interno é responsável pelo sentido de equilíbrio e pela capacidade de posicionamento no espaço, através do sistema vestibular. Além disso, o ouvido interno é considerado o órgão da audição, que permite a interação com o meio ambiente e é um componente importante do sistema de comunicações (Lawson, 2011).

A faixa de frequência sonora ouvida por cada espécie depende de características físicas da membrana basilar, como espessura e tamanho, e da amplificação do estímulo mecânico pelas células ciliadas da cóclea. Existe na cóclea de cada espécie uma zona em que a amplitude dos movimentos é maior. Nessa zona os cílios serão mais excitados, dando uma indicação ao cérebro do conteúdo da frequência do som escutado (Robles e Ruggero, 2001; Fettiplace, 2006).

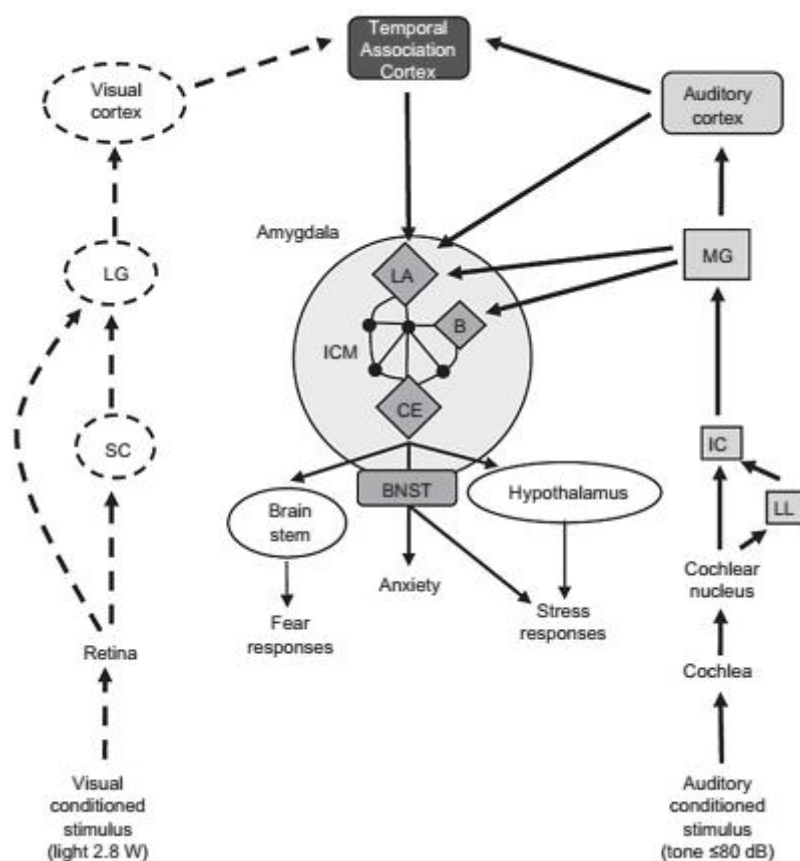


Os cílios presentes na membrana captam as vibrações enviando o sinal auditivo às fibras nervosas auditivas aferentes. As informações das ondas sonoras são levadas através das fibras do nervo auditivo, ao núcleo coclear, seguindo para o complexo olivar superior e segue, via lemnisco lateral, até o colículo inferior no mesencéfalo. As ondas sonoras captadas promovem aumento da atividade no núcleo geniculado medial do tálamo, e, eventualmente, os sinais atingem o córtex auditivo primário (Ping *et al.*, 2007).



**Figura 1** – Desenho esquemático da estrutura auricular de mamíferos. Disponível em [http://en.wikibooks.org/wiki/Anatomy\\_and\\_Physiology\\_of\\_Animals/The\\_Senses#mediaviewer/File:Anatomy\\_and\\_physiology\\_of\\_animals\\_The\\_ear.jpg](http://en.wikibooks.org/wiki/Anatomy_and_Physiology_of_Animals/The_Senses#mediaviewer/File:Anatomy_and_physiology_of_animals_The_ear.jpg)

O processamento emocional do estímulo auditivo de ratos têm ligações diretas com a amígdala (**Figura 2**). Estímulos auditivos condicionados, por exemplo, são captados pela membrana basilar localizada no núcleo coclear, que envia projeções para o lemnisco lateral e para o colículo inferior. A partir do colículo inferior, sinais eferentes são enviados para o núcleo geniculado medial e para o córtex auditivo, onde, por sua vez o núcleo geniculado medial emite projeções glutamatérgicas aos núcleos amigdaloides laterais e basais. A via direta do núcleo geniculado medial para a amígdala lateral e basal também são ativadas por tons acima de 80 dB (Dagnino-Subiabre, 2013).



**Figura 2** - Principal via neuronal ascendente envolvido no processamento emocional do sistema auditivo, em ratos (Dagnino-Sugriare, 2013).

Figura 3

#### 4. VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA DE 22 kHz EM RATOS

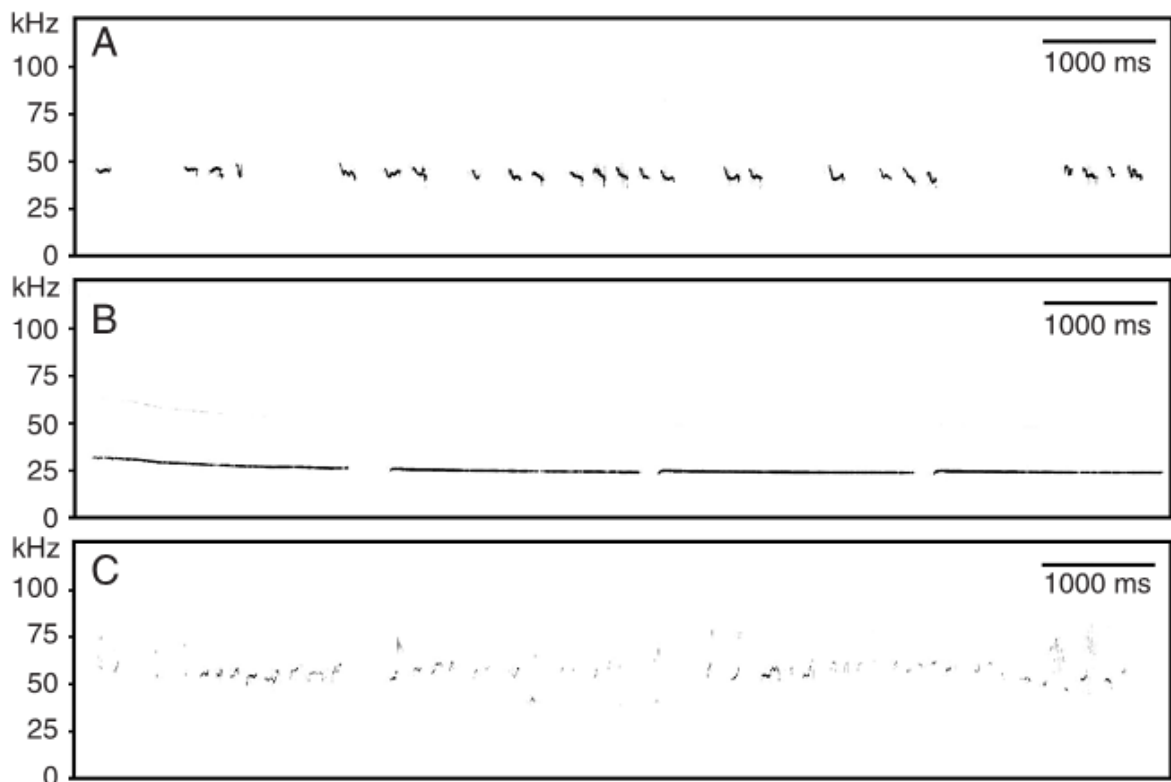
Como citado anteriormente, os efeitos da exposição ao ruído dependem da sensibilidade auditiva do ouvinte. Ratos de laboratório (*Lister*, *Long-Evans*, *Sprague-Dawley* e *Wistar*) e selvagens (*R. Norvegicus*) escutam e vocalizam em uma faixa sônica ampla, que vai de 200 Hz a 80 kHz (Anderson, 1954; Fay, 1988). Dentro desta faixa, se incluem os harmônicos de três classes: 40, 22 e 50 kHz (Brudzynski *et al.*, 1993) (Figura 4, painéis A, B e C, respectivamente). Embora estas VUs tenham sido descritas como subprodutos da atividade locomotora ou sinais sociais, evidências sugerem que também podem indicar antecipação de estados afetivos (Knutson *et al.*, 2002) e ter finalidade de comunicação entre os animais (Seffer *et al.*, 2014; Willadsen *et al.*, 2014).

As VUs de 40 kHz são emitidas por filhotes de ratos. São vocalizações relativamente curtas (cerca de 80-150 ms), com faixa de frequência entre 30 e 65 kHz e emitidas em resposta a situações de separação da mãe (Hofer *et al.*, 2002). As VUs de 50 kHz incluem uma faixa com considerável variabilidade na modulação da frequência (35 a 70 kHz) e são bastantes curtas (cerca de 20 a 100 ms). São emitidas em situações de interações sociais apetitivas, de forma a induzirem/ou manter determinados comportamentos, como durante “brincadeiras” entre si ou com o experimentador (Knutson *et al.*, 1998; Panksepp e Burgdorf, 2000), antes e durante o acasalamento (White e Barfield, 1989, 1990), a alimentação (Burgdorf *et al.*, 2000) e o uso de drogas, especialmente psicoestimulantes (Knutson *et al.*, 1999; Burgdorf *et al.*, 2001). Estes autores descreveram que as VUs de 50 kHz indicam expectativa, comportamento de recompensa e estados emocionais de ativação positiva. Por outro lado, VUs de 22 kHz podem ocorrer durante a antecipação da punição ou comportamento de esquiva, podendo indicar um estado de ativação negativo (Brudzynski *et al.*, 1993; Wöhr *et al.*, 2005; Wöhr e Schwarting, 2013). As VUs de 22 kHz abrangem uma faixa de frequência de 18 a 32 kHz, com duração de 300 a 3000 ms. Têm uma forma comparativamente simples, em relação às outras, uma vez que ocorrem em surtos de 3 a 5 VUs (Schwarting e Wöhr, 2012). Durante a emissão destas VUs, os ratos estão geralmente imóveis, em postura tensa e emitem a vocalização após um período de inspiração curto, em paralelo com aumentos na frequência cardíaca e da pressão arterial (Fryszak e Neafsey, 1991). Estas vocalizações são emitidas em várias situações, a maioria das quais onde existe um componente/estímulo aversivo evidente como: quando são expostos a um predador (Blanchard *et al.*, 1992; Litvin *et al.*, 2007), durante derrotas sociais entre machos (Thomas *et al.*, 1983), durante a aprendizagem e evocação do comportamento de condicionamento do medo (Jelen *et al.*, 2003; Nobre e Brandão, 2004), a aprendizagem de esquiva ativa (Ludwig e Schwarting, 2007), a retirada de drogas, especialmente opiáceos e cocaína (Vivian e Miczek, 1991), quando submetidos a manuseio aversivo (Brudzynski e Ociepa, 1992) ou em condições de isolamento (Tomazini *et al.*, 2006).

Em geral, presume-se que as VUs de 22 kHz refletem ou dependem do estado de ansiedade e que podem ter uma função comunicativa, no sentido de um mecanismo acústico defensivo (Schwarting e Wöhr, 2012). Evidências comportamentais e farmacológicas mostram que a vocalização de 22 kHz está correlacionada com o comportamento de ansiedade e não com o comportamento de medo (Jelen *et al.*, 2003) Com relação à função de comunicação, as VUs de 22 kHz podem servir como sinal de alerta, sinalizando perigo (Blanchard *et al.*, 1991;

Blanchard *et al.*, 1992), podendo desencadear uma inibição comportamental ou fuga dos destinatários (Brudzynski e Chiu, 1995). Acredita-se que os ratos podem associar as VUs de 22 kHz com aversão, por aprendizagem associativa (Endres *et al.*, 2007), onde o indivíduo percebe algo em seu meio pelas sensações e o associa a uma determinada resposta.

Existem evidências que durante o processo de vocalização ocorrem alterações em áreas cerebrais relacionadas à motivação e à emoção (Sadananda *et al.*, 2008; Parsana, Li *et al.*, 2012), tais como a amígdala, o córtex perirrinal e a Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP), concluindo-se que as VUs de 22 kHz são processadas em partes do sistema límbico.



**Figura 4 – Representações do perfil de vocalizações ultrassônicas (VUs) emitidas por ratos em três diferentes contextos. A, VUs de 40-kHz emitido por um rato Wistar de 11 dias de idade, após a separação da mãe. B, VUs de 22 kHz emitida por um rato Wistar de 3 meses de idade durante o condicionamento do medo. C, VUs de 50 kHz emitida por um rato Wistar machos aos 3 meses à procura de indivíduos da mesma espécie (Schwartzing e Wöhr, 2012).**

## 5. RUÍDO E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A experiência auditiva pode produzir alterações estruturais e funcionais no sistema nervoso central (SNC), promovendo modificações não somente em áreas específicas do processamento auditivo como também em áreas não auditivas do cérebro, como por exemplo, regiões do sistema límbico (Illing *et al.*, 2002; Reisch *et al.*, 2007). O controle central do sistema de resposta à exposição ao ruído inclui neurônios do núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo, onde as células estão sob a influência de vários mecanismos intrínsecos e extrínsecos que regulam a resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Aferências diretas ao NPV são provenientes principalmente da via sensorial e incluem o núcleo do trato solitário, o núcleo da rafe, o órgão subfornicial, o núcleo próprio da *stria terminalis*, o tálamo e regiões hipotalâmicas que circundam o NPV. Aferências indiretas vindas do hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal (CPF), septo lateral e tálamo ativam os mesmos neurônios parvocelulares (Herman *et al.*, 2003).

As respostas fisiológicas e comportamentais ao ruído ocorrem, em parte, pela ativação do *locus coeruleus*. O aumento da liberação de CRH no *locus coeruleus* em situações aversivas, prejudica a transferência de informações em vias aferentes dentro do sistema sensorial, que conseqüentemente acarretam na diminuição das respostas talâmicas e corticais (Devlbiss *et al.*, 2012). Além disso, existem evidências de que as alterações no SNC provocadas pelo ruído refletem no sistema nervoso periférico (SNP). Por exemplo, o aumento nos níveis de glicocorticoides na SCP leva a uma hipoalgesia em indivíduos expostos ao ruído crônico (Rhudy e Meagher, 2001).

Além de alterações relacionadas à modulação do eixo HPA, outras como a ativação da amígdala e do hipocampo, por exemplo, ocorrem devido a ligações neuronais, diretas e indiretas, do sistema auditivo central (Ledoux, 2007; Mohedano-Moriano *et al.*, 2008; Munoz-Lopez *et al.*, 2010). A exposição ao ruído durante a execução de tarefas com componentes cognitivos como a memória pode promover uma diminuição do número de respostas corretas associada ao aumento da atividade da amígdala e diminuição da atividade no hipocampo (Hirano *et al.*, 2006). A integração entre a informação cognitiva e a emocional parece ser mediada via CPF (Diorio *et al.*, 1993), pois, alterações pós-traumáticas estão relacionadas a alterações no processamento da informação sensorial, mediada por esta estrutura (Sapolsky, 1996; Rauch *et al.*, 2003; Yamasue *et al.*, 2003).

De acordo com os estudos citados acima, concluímos que a amígdala, o hipocampo, o tálamo, a SCP e o CPF são estruturas importantes envolvidas com possíveis ajustes neuroquímicos necessários à plasticidade, que pode ocorrer após exposição crônica ao ruído.

### 5.1 *Amígdala*

A amígdala é uma pequena estrutura em forma de amêndoa, situada dentro da região anteroinferior do lobo temporal, que se interconecta com o hipocampo, os núcleos septais, a área pré-frontal e o núcleo dorso-medial do tálamo. Esta parte do sistema límbico está associada a várias atividades cognitivas de processamentos emocionais como dos estados de medo e de raiva (Rasia-Filho *et al.*, 2000; Phelps e Ledoux, 2005). Estas atividades de processamento de informações emocionais que perpassam pela amígdala estão relacionadas a várias situações ou condições, tais como reprodução, apetite, ameaça, interpretação de expressões faciais, comportamento social e comunicação (Rasia-Filho *et al.*, 2000; Skuse, 2006; Adolphs, 2010; Decety, 2010).

O núcleo central da amígdala libera neurotransmissores/neuromoduladores (acetilcolina, dopamina, noradrenalina e serotonina), que afetam a atividade na própria amígdala, bem como outras regiões do cérebro. Os neurônios do núcleo central estão relacionados com a regulação de comportamentos como o congelamento e a fuga e, projeções da amígdala basal atuam na modulação da memória, no hipocampo, e em outros aspectos da cognição, no CPF e Córtex associativo (Ledoux, 2007). Existem evidências de que as projeções da amígdala para o hipotálamo regulam o sistema nervoso simpático e o eixo HPA, uma vez que, como mencionado anteriormente, existe uma conexão neuronal direta da amígdala central para a região paraventricular hipotalâmica.

Alguns estudiosos sugerem que o padrão do estímulo em si e não a emoção resultante seja responsável pela ativação da amígdala (Sander *et al.*, 2003). Por outro lado, existem evidências indicando que a amígdala atua atribuindo "significado" emocional ao som: dados de estudos onde ratos observam outros ratos recebendo choque nas patas mostram que a atividade da amígdala, medida através da expressão de c-Fos, é igual à dos animais que receberam o choque (Knapska *et al.*, 2006). Além disso, resultados de estudos em ratos utilizando ruído branco de 100 decibéis (dB) mostraram aumento na expressão de c-Fos tanto na amígdala quanto na região paraventricular do hipotálamo (Amemiya *et al.*, 2010), sugerindo que a amígdala está

envolvida tanto no “significado” emocional do estímulo quanto também parece ser sensível ao estímulo.

## 5.2 *Hipocampo*

O hipocampo é uma estrutura localizada nos lobos temporais, tradicionalmente relacionada a processos cognitivos como aprendizado e memória (Amaral *et al.*, 2007). Com exceção do bulbo olfatório, não há evidências de qualquer ligação direta entre o hipocampo e o córtex sensorial (Mohedano-Moriano *et al.*, 2007). A entrada sensorial auditiva para o hipocampo ocorre via córtex parahipocampal ou córtex perirrinal, ou via prosencéfalo (Mohedano-Moriano *et al.*, 2007; Munoz-Lopez *et al.*, 2010).

O hipocampo está relacionado com a memória explícita ou declarativa (Eichenbaum, 2004; Dickerson e Eichenbaum, 2010), que inclui memória episódica, como em eventos ou experiência pessoal, e semântica, como em informações fatuais. Além disso, a função hipocampal de memória é frequentemente associada com a memória espacial, pois, nesta estrutura existem neurônios piramidais que são ativados durante o processamento da localização do indivíduo no espaço tridimensional funcionando como “células de direção/localização” (O'keefe *et al.*, 1998).

Estudos sugerem que uma função importante do hipocampo está vinculada à formação de memórias auditivas de longo prazo. Pacientes com grave dano hipocampal bilateral apresentam fraco desempenho em teste de reconhecimento auditivo (Squire *et al.*, 2001). Estudos com macacos sugerem que pistas auditivas desempenham um papel na memória espacial (Tamura *et al.*, 1990). A memória auditiva associada ao hipocampo parece ser importante no processo de habituação ao ruído. Quando os estímulos auditivos estão emparelhados, o segundo estímulo promove um potencial evocado menor na região CA3, que durante a exposição ao primeiro estímulo (Bickford-Wimer *et al.*, 1990). Assim, quando estímulos auditivos idênticos são repetidos, a resposta do hipocampo diminui.

Alguns estudos mostram que a plasticidade hipocampal ocorre como um ajuste a estímulos aversivos como o ruído. Os efeitos hormonais, tais como do cortisol no hipocampo sobre a

plasticidade foram originalmente descritos como um U "invertido": em níveis baixos, o cortisol atua facilitando o Potencial de Longa Duração (LTP), enquanto em altos níveis dificultam o LTP (Lynch, 2004; Maggio e Segal, 2010). Outros estudos têm revelado que alguns estímulos aversivos são capazes de melhorar a memória, principalmente em situações emocionalmente carregadas, ao mesmo tempo em que inibe alguns aspectos da cognição, como por exemplo, a recuperação da memória relacionada ao evento emocional (Roosendaal, Mcewen *et al.*, 2009). Além disto, tem sido demonstrado que a exposição a ruído de alta intensidade reduz a neurogênese hipocampal em ratos adultos (Kraus *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010).

Estas alterações comportamentais são promovidas, ao menos em parte, por alterações no sistema neuroquímico hipocampal. Observou-se em ratos expostos ao ruído por 30 dias (80 dB ou 100 dB por 4 h) prejuízo em tarefas de memória associado a redução nos níveis de dopamina (DA), norepinefrina (NE) e 5-hidroxitriptamina (5-HT) do hipocampo, com recuperação após o término da exposição (Chengzhi *et al.*, 2011).

### **5.3 *Córtex Pré-Frontal***

O CPF é uma área associativa que compreende as estruturas anteriores dos lobos frontais, sendo interconectado com numerosas estruturas corticais e subcorticas, tais como o tálamo e o tronco cerebral (Fuster, 2001; Miller e Cohen, 2001). Esta estrutura possui ligações bidirecionais de centros neuromodulatórios do tronco cerebral e prosencéfalo, incluindo neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe (Hajos *et al.*, 1998).

O CPF desempenha um papel central em inúmeros processos cognitivos como os necessários para a realização de tarefas executivas. Está envolvido na aprendizagem (Pasupathy e Miller, 2005; Antzoulatos e Miller, 2011), na memória (Warden e Miller, 2010), categorização (Freedman *et al.*, 2001; Antzoulatos e Miller, 2011), controle inibitório de comportamentos (Dalley *et al.*, 2011), flexibilidade cognitiva (Rygula *et al.*, 2010; Gruber *et al.*, 2011), entre outros.

A área medial do córtex pré-frontal (mCPF) está envolvida na modulação do eixo HPA (Bush *et al.*, 2000). Outros dados mostram que lesões no mCPF não alteram os níveis plasmáticos de ACTH em resposta ao ruído (Crane *et al.*, 2003), mas que este pode gerar alterações



morfológicas nesta região como atrofia dendrítica e diminuição no número de receptores para glicocorticoides. Estas mesmas alterações no CPF são observadas em doenças como o transtorno do estresse pós-traumático (Rauch *et al.*, 2003; Yamasue *et al.*, 2003; Cook e Wellman, 2004).

#### **5.4 Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP)**

A SCP compreende a região do mesencéfalo que rodeia o aqueduto cerebral, da região da comissura anterior até o núcleo tegmentar ventral. Divide-se em dorsal, dorso-lateral, ventro-lateral e medial (Beitz, 1985). Está envolvida em cinco processos fisiológicos principais: processamento da dor e analgesia, vocalização, regulação autonômica, medo e ansiedade, reflexo de lordose e controle cardiovascular (Behbehani, 1995). As partes dorsal e lateral da SCP integram componentes-chave das vias envolvidas no processo de defesa e de coordenação das reações a estímulos com características físicas e psicológicas (Dean, 2011).

A SCP recebe aferências do sistema límbico e está envolvida no controle autonômico e comportamental dos estados emocionais. Estudos utilizando neuroanatomia funcional sugerem que populações de neurônios serotoninérgicos localizados na SCP atuam na modulação do pânico e da depressão (Hale *et al.*, 2012).

Sugere-se que as diferentes estratégias de enfrentamento acionam áreas distintas da SCP. O *coping* (enfretamento) ativo, que é evocado em situações onde o estímulo pode ser controlável ou passível de esquiva, está associado com a ativação da SCP dorso-lateral ou lateral. Por outro lado, durante a estratégia de *coping* passivo, que é evocado quando o estímulo não pode ser evitado, ocorre ativação da região ventro-lateral da SCP (Keay e Bandler, 2001).

Desta forma, considera-se que o ruído promova alterações neurobiológicas na SCP, como alterações no sistema serotoninérgico, podendo levar a mudanças nos comportamentos de enfrentamento e nos comportamentos de medo e ansiedade.

#### **5.5 Tálamo**

O tálamo é um complexo nuclear situado no diencéfalo. Consiste em duas massas ovuladas, pareadas de substância cinzenta, organizada em núcleos, com tratos de substância branca em

seu interior. Em geral, uma conexão de substância cinzenta, chamada massa intermédia (aderência intertalâmica) une as partes direita e esquerda do tálamo (Herrero *et al.*, 2002). Esta estrutura tem sido tradicionalmente considerada como um elo entre o fluxo de informações entre o sistema nervoso periférico e o córtex, transmitindo informações sensoriais (visuais, auditivas e somatossensoriais). Também é um elo entre o cerebelo e corpos mamilares com o córtex transmitindo informações motoras (Sherman, 2007).

O tálamo tem sido relacionado à plasticidade observada durante o processo de habituação ao ruído. Esta habituação parece ser mediada pelo núcleo geniculado medial (NGM) uma vez que esta estrutura é ativada durante a exposição ao ruído e que lesões nesta região podem levar a interrupção desta habituação (Day *et al.*, 2009), que também é observada em resposta a contensões repetidas, sem efeito sobre o estímulo agudo (Bhatnagar *et al.*, 2002). Além disso, outros autores mostraram que após exposição repetida ao ruído observa-se redução nos níveis de *c-fos* no núcleo geniculado medial (NGM) talâmico (Campeau *et al.*, 2002), corroborando a hipótese de que a plasticidade que ocorre durante a habituação pode ser mediada, ao menos em parte, por circuitos talâmicos. Uma das principais áreas de projeção do NGM é o córtex auditivo (Ryugo e Killackey, 1974), porém, lesões no córtex auditivo não alteram a habituação ao ruído (Masini *et al.*, 2012).

## **6. ANSIEDADE E MEDO**

O conceito de estresse é baseado na observação de que diferentes tipos de exigências físicas ou psicológicas sobre o organismo eliciam o mesmo conjunto de mudanças corporais, chamado síndrome de adaptação geral (Selye, 1998). Como uma forma de ajuste aos fatores estressores, os organismos mantêm a homeostase por meio de mudanças de comportamento (Mcewen e Wingfield, 2003).

Ansiedade e medo são emoções desencadeadas em situações de ameaça. O estado de ansiedade é a emoção relacionada ao comportamento de avaliação de risco que pode ser evocado em situações em que o perigo não está necessariamente evidente, ou seja, pode ser apenas uma ameaça potencial. Dessa forma, um contexto novo ou um estímulo de perigo (por exemplo, um predador) que esteve presente no passado pode desencadear um processo de ansiedade (Blanchard e Blanchard, 1988).

Em contraste, o medo está relacionado com estratégias defensivas que ocorrem em resposta ao perigo real que pode estar a certa distância da presa (ameaça distal). Neste caso, o animal ou evita a situação, sempre que uma via de escape está disponível, ou se torna tenso, imóvel (congelamento), quando não há maneira de fugir (Mcnaughton e Gray, 2000; Mcnaughton e Corr, 2004).

A ansiedade e o medo são estados emocionais qualitativamente diferentes, envolvendo mobilizações diferentes dos hormônios. A ansiedade ativa o eixo HPA e o eixo simpático, enquanto o medo ativa de forma acentuada o sistema simpático e tem pouco ou nenhum efeito sobre o eixo HPA (Graeff, 2011).

Instrumentos para estudo dos estados emocionais de ansiedade e medo foram desenvolvidos para investigação pré-clínica com intuito de se obter resultados que se assemelhem com o estado emocional humano. Dentre os instrumentos mais utilizados em modelos experimentais com animais estão os labirintos elevados (labirinto em cruz elevado e labirinto em T elevado - LTE), campo aberto (*open field*) e caixa de claro e escuro (Ramos, 2008). No aparato LTE, avalia-se o estado de ansiedade por meio de tarefas de esquiva inibitória e o estado de medo por meio de tarefas de fuga (Graeff *et al.*, 1993). Dependendo da tarefa, o LTE pode gerar dois tipos de reações defensivas, esquiva ou fuga, que abordam duas emoções diferentes, ansiedade e pânico, respectivamente (Graeff *et al.*, 1993; Viana *et al.*, 1994; Zangrossi e Graeff, 1997; Graeff *et al.*, 1998). Portanto, a ETM tem sido uma importante ferramenta para a compreensão dos mecanismos cerebrais subjacentes a estas duas respostas defensivas.

## **7. GESTAÇÃO E ESTADO EMOCIONAL**

A gravidez e a lactação podem alterar os estados fisiológicos ou fisiopatológicos, podendo levar a alterações na homeostase do organismo (Neumann *et al.*, 1998). Nos eventos de gravidez, parto e lactação podem ocorrer flutuações nos níveis de hormônios esteroides no plasma, alterando a vulnerabilidade a transtornos emocionais (Macbeth e Luine, 2010).

Uma das grandes dificuldades metodológicas para avaliar a ansiedade durante a gravidez, o parto e a lactação está na mensuração da ansiedade materna após estímulos crônicos, pois envolve a reatividade à separação do filhote (Sibolboro Mezzacappa *et al.*, 2003). No entanto, alguns pesquisadores caracterizam a gravidez e a lactação como períodos hiporesponsivos

(Neumann *et al.*, 1998; Wigger *et al.*, 1999; Heinrichs *et al.*, 2002) e/ou de maior vulnerabilidade ao estresse (Darnaudery *et al.*, 2004).

Estresse, aumento da ansiedade e sintomas depressivos durante e após a gravidez podem provocar conseqüências negativas para o filho e para a saúde mental da mãe. Dentre estas, estão as complicações na maturação fetal, ganho de peso inadequado, nascimento prematuro, além de distúrbios cognitivos e emocionais dos filhos durante a infância (Marcus e Heringhausen, 2009; Brummelte e Galea, 2010). Nas mães, o equilíbrio no estado emocional é de grande importância, pois o transtorno mental pode levar a uma falta de cuidado com sua própria saúde (Fischeretal., 2007).

A análise de dados provenientes de estudos sobre a ansiedade e depressão materna mostrou que os níveis de sintomas depressivos podem estar associados com complicações obstétricas (Alder *et al.*, 2007) e que o transtorno depressivo maior durante a gravidez afeta o vínculo materno-fetal sugerindo que essa relação emocional entre mãe e filho tem início na gravidez (Mcfarland *et al.*, 2011).

Além das flutuações em hormônios gonadais durante a gravidez e pós-parto, o eixo HPA também sofre mudanças significativas durante estes períodos (Brummelte e Galea, 2010), pois hormônios relacionados com a gravidez tais como a ocitocina e a prolactina, podem diminuir a reatividade do eixo HPA durante este período (Lightman *et al.*, 2001; Torner *et al.*, 2002). Além disso, há evidências de que os níveis de cortisol, ACTH, CRH e corticosterona são alterados significativamente durante a gravidez e no pós-parto. Os níveis desses hormônios aumentam durante a gravidez, atingem um pico antes do nascimento e caem após o parto (Pawluski *et al.*, 2009), além de serem maiores nestas fases do que em período não-reprodutivos (Abou-Saleh *et al.*, 1999; Yim *et al.*, 2009). Desta forma, pode-se inferir que o período gestacional altera a susceptibilidade da fêmea a estímulos como o ruído.

## **8. SISTEMA SEROTONINÉRGICO**

Existem evidências de que diferentes estruturas cerebrais que recebem fibras serotoninérgicas provenientes do núcleo dorsal da rafe estão envolvidas nos comportamentos de esquiva inibitória e fuga (Zangrossi e Graeff, 2014). A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma monoamina que possui implicações na regulação de numerosos comportamentos,

incluindo sono-vigília, ritmo circadiano, alimentação, memória, humor, cognição, resposta ao abuso de drogas e processamento emocional (Ericsson *et al.*, 1996; Julius, 1998; Buhot *et al.*, 2000; Thase, 2000; Zangrossi e Graeff, 2014), tendo um papel proeminente na evolução da fisiologia de vertebrados e invertebrados (Turlejski, 1996).

Na via de síntese da 5-HT, o triptofano sofre uma hidroxilação pela triptofano hidroxilase, sendo transformado em 5-hidroxitriptofano, o qual é então descarboxilado produzindo 5-HT, que pode atuar em receptores presentes nas células pré e pós-sinápticas (Figura 5). Este neurotransmissor é degradado pela monoamina oxidase (MAO) no seu principal metabólito que é o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) ou é recaptado para dentro do terminal pré-sináptico, por ação de proteínas transportadoras (Cooper, 1996).

Devido a grande diversidade de ramificações neuroanatômicas serotoninérgicas, partindo do mesencéfalo dorsal e núcleos da rafe para praticamente todas as regiões do cérebro (Cools *et al.*, 2008) e ao fato de que suas ações são mediadas por pelo menos 17 receptores distintos, o efeito modulatório da 5-HT sobre o comportamento e a cognição se torna complexo. Não há dúvidas quanto à importância da 5-HT não só em termos de modulação dos sistemas sensorial e motor, mas também de seu papel central na cognição e emoção, tendo implicações importantes em doenças afetivas, tais como ansiedade e depressão (Jacobs e Azmitia, 1992; Cools *et al.*, 2008). Existe a hipótese de que a 5-HT tenha um papel dual no comportamento defensivo: na amígdala, a serotonina facilita a esquila inibitória e na SCP atua inibindo a fuga (Graeff, 2011).

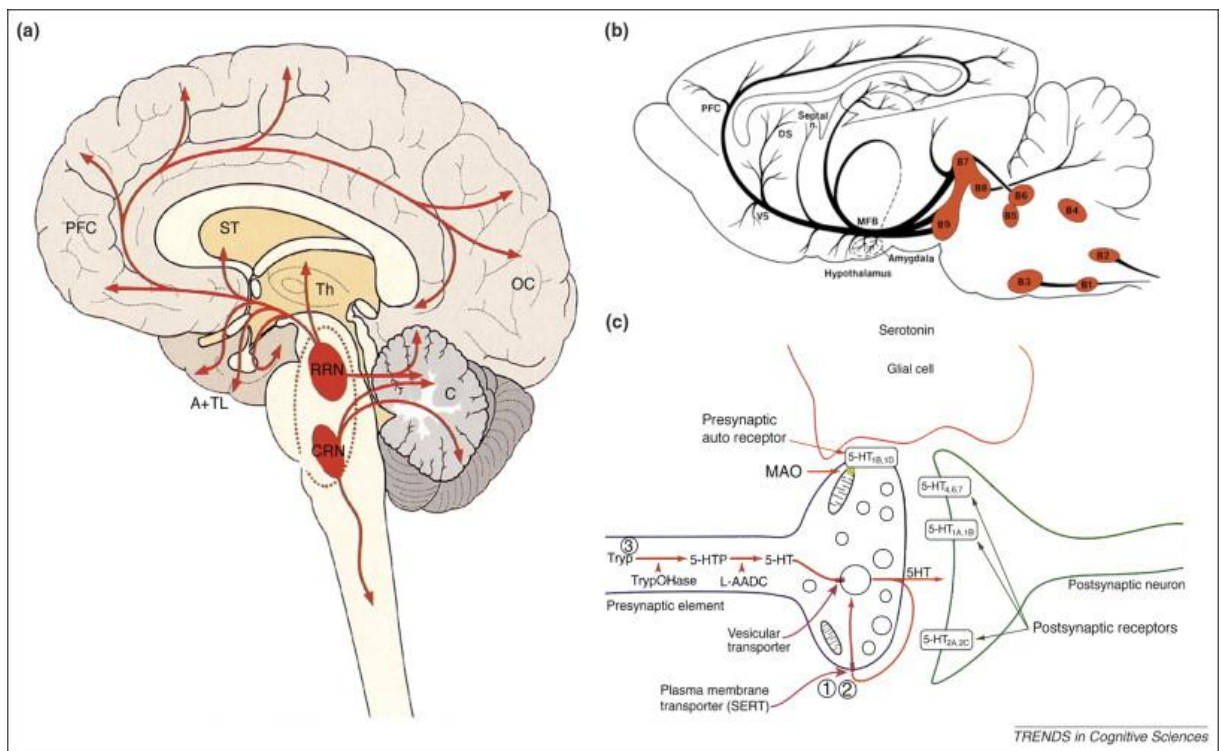
Propõe-se que estímulos aversivos induzam adaptações neuroquímicas, inclusive no sistema monoaminérgico, e que alterações neste sistema possam gerar distúrbios comportamentais (Anisman e Zacharko, 1992). Fatores neuroquímicos como o CRH, podem alterar sistemas monoaminérgicos (dopamina, norepinefrina e serotonina) em várias regiões cerebrais, que poderiam estar relacionados com os comportamentos de ansiedade e depressão (Merali *et al.*, 1998; Maier e Watkins, 2005).

Como discutido anteriormente, durante o processo gestacional os estados de ansiedade e medo são alterados. Dados obtidos em modelo experimental mostram mudanças em parâmetros serotoninérgicos durante o processo gestacional. Os resultados deste estudo mostram que o conteúdo estriatal de 5-HT e de 5-HIAA diminuem significativamente durante a gravidez,

sendo que esta diminuição correlaciona-se negativamente com os níveis plasmáticos de progesterona (Glaser *et al.*, 1990).

A ruptura da sinalização serotoninérgica durante os períodos pré e pós-natal podem promover aumento da ansiedade na idade adulta (Gaspar *et al.*, 2003; Oberlander *et al.*, 2009). Esta hipótese é corroborada por dados de estudos que mostram que o comportamento de ansiedade no adulto pode ser desencadeado utilizando-se ratos *knockdown* para o receptor 5-HT<sub>1A</sub>, (Gross *et al.*, 2002) ou pela exposição a inibidores de recaptação de serotonina (Ansoerge *et al.*, 2004; Ansoerge *et al.*, 2008).

A concentração de 5-HT disponível para os receptores é outro importante parâmetro para o desenvolvimento normal do cérebro. O prosencéfalo fetal seletivamente acumula 5-HT derivado da placenta durante o crescimento axonal inicial (Bonnin *et al.*, 2011). Estes dados sugerem que certos circuitos em desenvolvimento no cérebro fetal são sensíveis a 5-HT placentária durante a sua ontogenia inicial, e que distúrbios genéticos e/ou ambientais poderiam impactar neste fator, aumentando o risco de doenças mentais (Bonnin e Levitt, 2011).



**Figura 5 - Esquema do sistema serotoninérgico no SNC.** Projeções neuroanatômicas (setas vermelhas) dos núcleos da rafe em encéfalos de humanos (a) e ratos (b). (c) Esquema de um neurônio serotoninérgico. Tryp – Triptofano; TrypOHase

– Triptofano Hidroxilase; 5-HTP – 5-hidroxi-triptofano; 5-HT – 5-hidroxitriptamina ou serotonina; L-AADC – L-aminoácido descarboxilase; SERT – transportador de serotonina; MAO, monoamina oxidase; 5-HT1A, 5-HT1B, 5HT2A,C. – receptores pré e pós-sinápticos (Cools *et al.*, 2008).

### 1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição crônica a sons de 22 kHz durante a gestação sobre parâmetros comportamentais e serotoninérgicos centrais de ratas Wistar após o período de amamentação e de sua prole na fase adulta após exposição aguda ao mesmo som.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1) Expor ratas Wistar a sons de 22 kHz durante o período gestacional e avaliar nestas, após o período de amamentação: as respostas de esquiva inibitória e fuga; os estados emocionais de ansiedade e medo, respectivamente;

- i) parâmetros cognitivos, aprendizado e memória, associados ao estado emocional ;
- ii) as concentrações de 5-HT e do 5-HIAA no hipocampo, CPF, tálamo, amígdala e SCP;
- iii) a taxa de renovação da 5-HT, determinada a partir da razão entre as concentrações de 5-HIAA e 5-HT;

2.2) E avaliar na **prole adulta**– exposta ou não ao tratamento crônico com sons de 22 kHz durante o período intrauterino - os parâmetros listados acima após exposição aguda a sons de 22 kHz.





### 1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

#### 1.1 *Obtenção dos animais*

Utilizou-se 64 ratos da linhagem Wistar, com aproximadamente três meses de idade, sendo 48 fêmeas e 16 machos, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

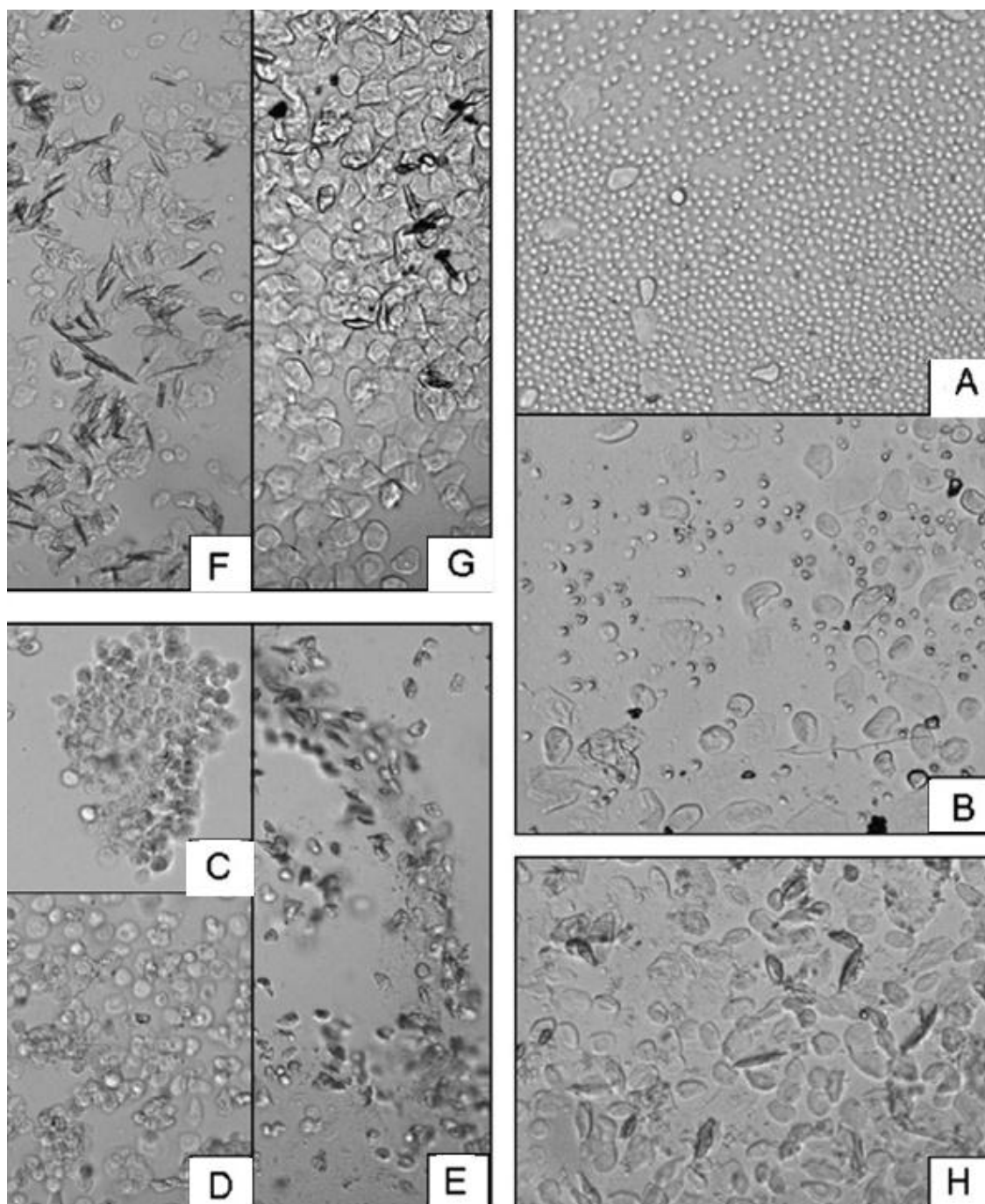
Durante todo o experimento os animais foram mantidos no biotério em ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração *ad libitum*. Os cuidados e o uso dos animais foram de acordo com o *Guide for Care and Use of Laboratory Animal (2011)*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG nº 203/2012).

Considerando dados obtidos em experimentos prévios, realizados em nosso laboratório, de que apenas uma proporção (~50%) das fêmeas engravida, o experimento foi iniciado com 48 fêmeas. O ciclo estral dessas foi monitorado e 32 ratas foram acasaladas com o objetivo de se obter 16 ratas grávidas.

#### 1.2 *Determinação do ciclo estral das fêmeas*

O ciclo estral de ratas se divide em quatro períodos distintos, de acordo com a concentração sanguínea de estrógeno: diestro, proestro, estro e metaestro (Goldman *et al.*, 2007). Durante o diestro a concentração de estrógeno no sangue é baixa e o epitélio vaginal contém uma mistura de tipos celulares com predominância de leucócitos (**Figura 6A, B**). O aumento da concentração de estradiol induz ação proliferativa no epitélio vaginal e predominância de células polinucleadas dispersas ou agrupadas características do proestro, fase em que ocorre a ovulação (**Figura 6C, D e E**). Após a liberação do óvulo, ocorre formação do corpo lúteo e queda do nível plasmático de estradiol levando a uma redução da proliferação do epitélio vaginal e o predomínio de células cornificadas que caracterizam a fase estro (**Figura 6F, G**). O estágio de transição entre estro e diestro, denominado metaestro, contém tanto células cornificadas quanto leucócitos (**Figura 6H**).

O monitoramento diário do ciclo estral das fêmeas foi realizado por esfregaço vaginal com solução salina (cloreto de sódio 0,9%) e visualização das células em microscópio óptico. Esse acompanhamento ocorreu durante 15 dias. Após esse período, as fêmeas foram agrupadas de acordo com o ciclo estral de forma a obter-se um maior número de fêmeas na mesma fase do ciclo. Quando se obteve pelo menos oito fêmeas na fase proestro, estas foram colocadas na presença do macho na proporção de duas fêmeas para um macho. No dia seguinte, a ocorrência de acasalamento foi avaliada pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal e/ou por outras características, como presença de sangramento ou substância escura na região vaginal das ratas. Após a confirmação do acasalamento, essas fêmeas foram classificadas como gestantes (Dia 1 = 1º dia de gestação) e agrupadas em um número de quatro gestantes por gaiola. Após o acasalamento de 32 fêmeas, a gestação foi confirmada em 16 e as demais cujo acasalamento não aconteceu, foram retiradas do experimento, assim como os machos. Outras 16 fêmeas que não tiveram contato com o macho constituíram o grupo de ratas não gestantes (**Figura 7A**).



**Figura 6– Representação do esfregaço vaginal** (Goldman et al., 2007) – Painéis A e B - Diestro: aparecem pequenos leucócitos (A), podendo ou não conter outros tipos celulares (B); C, D e E - Proestro: células em cachos com aparência granular; F e G – Estro: Células irregulares, com aspecto de agulhas; H - Metaestro: período de transição onde se observa a presença de uma combinação de células com aspecto de agulha e alguns leucócitos.

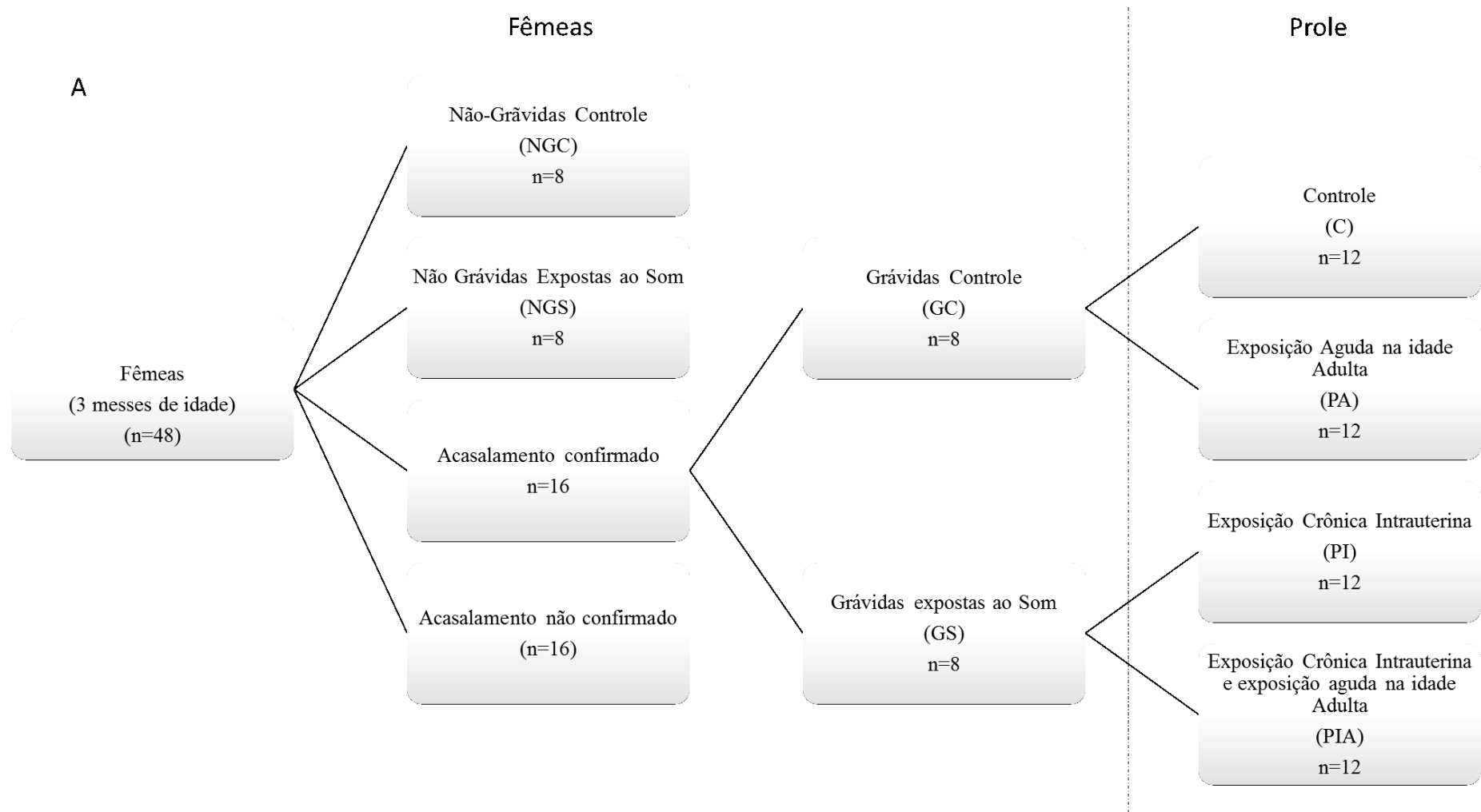
### 1.3 Grupos experimentais

As fêmeas foram divididas em quatro grupos experimentais, de acordo com a **Figura 7A**: I – Não Gestantes Controle (NGC, n = 8); II – Não Gestantes Sons (NGS, n = 8); III – Gestantes Controles (GC, n = 8) e IV – Gestantes Sons (GS, n=8). As ratas dos grupos NGS e GS foram expostas a sons de 22 kHz, dentro de uma caixa de isolamento acústico, uma hora por dia, do 1º ao 19º dia de gestação ou período equivalente, 19 dias, nas ratas do grupo NGS. As ratas controles (NGC e GC) foram colocadas dentro da caixa de isolamento acústico por igual período, porém sem receberem a emissão dos sons.

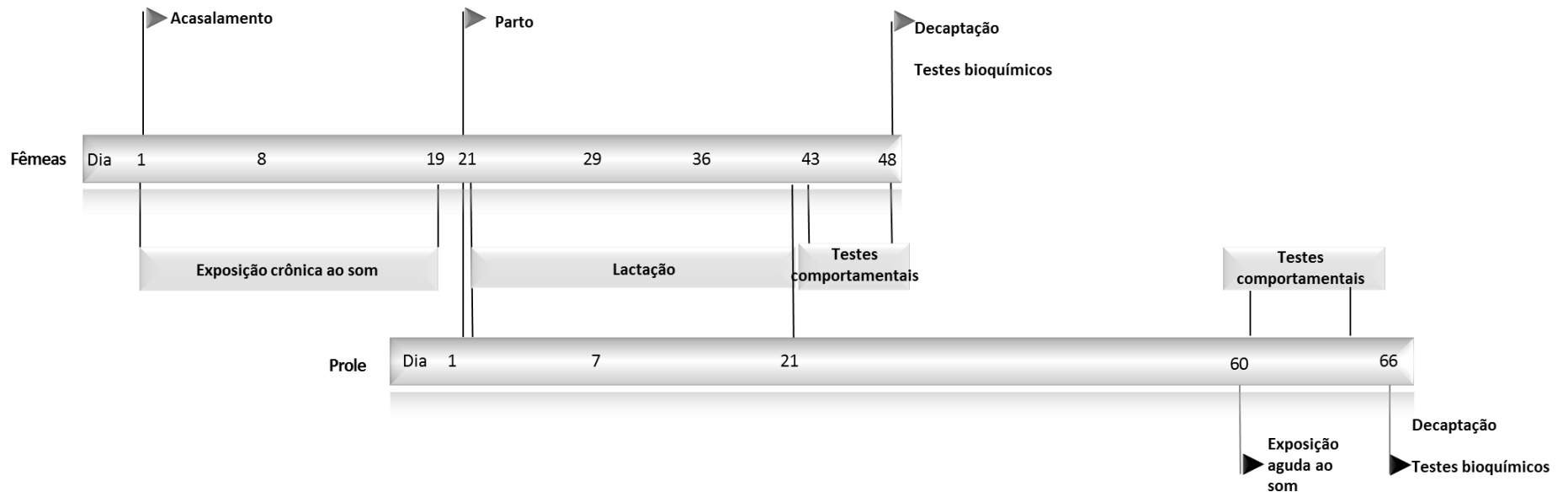
Após os 19 dias as ratas gestantes foram colocadas em gaiolas individuais e o parto ocorreu no 21º dia. Após o desmame, as mães foram recolocadas em grupos de quatro e mantidas assim até a realização dos testes comportamentais. As fêmeas não-gestantes foram mantidas nas mesmas condições, por igual período, de acordo com o cronograma do experimento.

Dois dias depois do parto, a prole foi inspecionada, pesada e somente os machos permaneceram com as mães na proporção de oito filhotes por fêmea até o desmame. De cada fêmea/mãe três filhotes machos foram aleatoriamente separados para os próximos experimentos, resultando amostras de 24 filhotes machos provenientes de cada grupo (GC e GS), em um total de 48 animais. A prole permaneceu no biotério recebendo água e ração *ad libitum* até os dois meses de idade. Aos 60 dias, a prole foi dividida em quatro grupos de acordo com o tratamento: I – Prole Controle; (PC, n=12); II – Prole exposta cronicamente durante a fase Intrauterina a sons de 22 kHz (PI, n=12); III – Prole submetida à exposição aguda a sons de 22 kHz durante a fase Adulta (PA, n=12); e IV – Prole submetida à exposição crônica durante a fase Intrauterina e à exposição aguda na fase Adulta (PIA, n=12).

No dia da primeira sessão de treino (aprendizagem) da tarefa comportamental, a prole aos dois meses de idade, dos grupos PA e PIA, foi exposta, a sons de 22 kHz, durante uma hora dentro da caixa de isolamento acústico. Os animais dos grupos PC e PI foram colocados dentro da caixa de isolamento acústico, por igual período, sem receber a emissão de sons (**Figura 7B**).



**Figura 7A – Grupos experimentais das fêmeas e da prole.** As fêmeas dos grupos NGS e GS foram submetidas à exposição crônica ao som de 22 kHz e os ratos machos da prole, foram expostos durante a fase adulta (grupo PA) e durante a fase intrauterina e adulta (grupo PIA). A exposição intrauterina foi crônica e a exposição na fase adulta foi aguda.



**Figura 6B – Cronograma dos experimentos:** apresentação do desenho experimental, indicando cada uma das etapas ao longo do estudo.

## 2. EXPOSIÇÃO A SONS DE 22 kHz

Sons artificiais de 22 kHz foram criados no *software* Matlab®, de forma a imitar a vocalização emitida pelos ratos, conforme descrito por outros autores (Wohr *et al.*, 2005; Wohr e Schwarting, 2007; Takahashi *et al.*, 2010). Este som é formado por uma sequência de tons com duração de 250 e 500 ms com frequência igual a 22 kHz, com intervalos de 50 ms entre os tons (Figura 8). Cada sequência (tons+ intervalo) foi repetida 29 vezes seguida de um período de silêncio com 40s de duração (tempo total  $\cong$ 80s). Cada sequência adicionada do período de silêncio foi repetida por uma hora. Os sons foram criados a uma taxa de amostragem de 96.000 Hz e emitidos a 69 dB (aferido utilizando um decibelímetro Polimed PM-1900).

Os sons foram emitidos por um alto-falante, tipo *tweeter*, retirado de um repelente eletrônico Repemax REP1000®, capaz de emitir sons de até 80 kHz, colocados dentro de uma caixa de isolamento acústico 58x42x46 (Figura 9). Cada *tweeter* foi acoplado ao computador por uma placa de áudio Asus® modelo Xonar D1. A saída dos sons foi verificada e aferida utilizando-se um microfone da *Binary Acoustic Technology* modelo AR125.

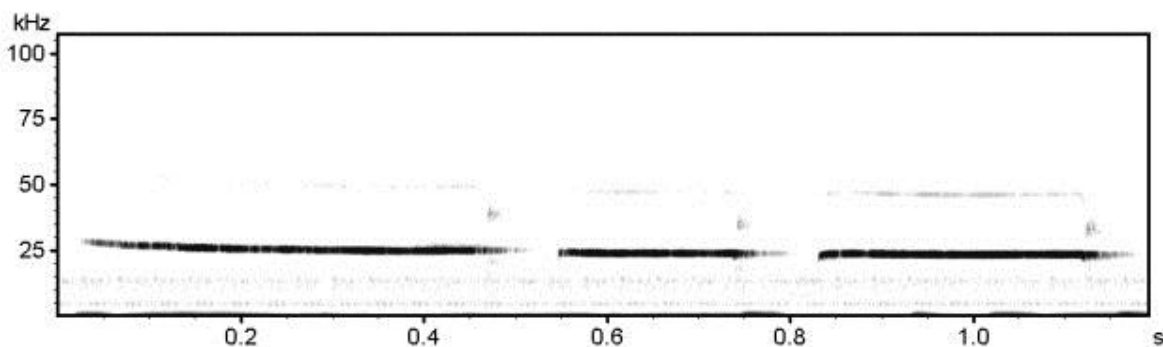


Figura 8 – Gráfico representando a vocalização de 22k Hz emitida por ratos em situações aversivas (Wöhr, 2010).





**Figura 9 – Foto do interior da caixa de isolamento acústico, contendo alto-falante e câmera de vídeo.** Caixa de isolamento acústico 58x42x46 (cm), marca Insight equipamentos. Alto-falante retirado do repelente RP1000 e câmera de vídeo HDL, modelo HM21/2004.

### **3. ESTUDOS COMPORTAMENTAIS**

O estado emocional dos animais foi avaliado utilizando-se o modelo comportamental do LTE desenvolvido e validado por Graeff *et al.* (1993). De acordo com este modelo, os estados de ansiedade e medo são mensurados de acordo com as respostas de esquiva inibitória e fuga, respectivamente. Os detalhes estão descritos abaixo.

#### **3.1 Equipamento - Labirinto em T-Elevado (LTE)**

O labirinto em T elevado (**Figura 10**) possui três braços de iguais dimensões (50 cm x 12 cm), sendo um braço fechado e dois braços abertos. O braço que constitui o tronco do T é fechado por paredes de 40 cm de altura e está perpendicular aos dois braços abertos. Esses braços possuem uma parede de acrílico de 1 cm de altura para evitar a queda do animal. O aparato se encontra elevado a 50 cm do chão. No teto, na direção acima do equipamento, encontra-se uma câmera (marca HDL, modelo HM21/2004) que capta as imagens que são gravadas e posteriormente analisadas.

### 3.2 *Esquiva Inibitória e Fuga*

Os estados de ansiedade e medo foram avaliados no LTE e expressos pela latência, em segundos, medidas conforme especificado abaixo, nas tarefas de esquiva inibitória e fuga, respectivamente (Zangrossi e Graeff, 1997; Zangrossi *et al.*, 2001; De Paula *et al.*, 2011).

### 3.3 *Procedimentos*

A tarefa comportamental foi realizada em quatro dias consecutivos, sempre no mesmo horário:

Dia 01: Os animais foram mantidos em uma caixa de acrílico colocada na sala de testes e manuseados por 5 minutos pelo experimentador.

Dia 02: *Pré-exposição* - os animais foram colocados individualmente na extremidade do braço aberto por 30 min. Durante essa fase o LTE foi modificado, colocando-se placas de madeira na interseção entre os braços abertos e a plataforma central (linha imaginária em vermelho indicada na Figura 6), de modo a impedir a entrada do animal no braço fechado.

Dia 03: *Treino (aprendizado)*: Os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico por 60s, dentro da sala onde o treino foi executado. Em seguida o animal foi colocado na extremidade do braço fechado por três vezes consecutivas, com intervalo de 30s entre as tentativas (Linha de base, Esquiva 1 e Esquiva 2). A cada tentativa foi registrado o tempo (latência em segundos) que o animal leva para ultrapassar com as quatro patas a linha demarcatória (interseção entre o braço fechado e os braços abertos, indicada em verde na **Figura 10**). Caso o animal não ultrapasse a linha demarcatória após 300s, ele é retirado do equipamento.

Após a terceira tentativa (Esquiva 2) do treino nessa tarefa de esquiva inibitória, os animais foram submetidos ao *treino* em tarefas de Fuga. Esse treino também consistiu de 3 tentativas com intervalos intertentativas de 30s, onde o animal é colocado por três vezes consecutivas na extremidade do braço aberto (Fuga 1, 2 e 3). A cada tentativa é registrado o tempo (latência em segundos) que o animal leva para fugir do estímulo aversivo (braço aberto) ultrapassando com as quatro patas a linha demarcatória (interseção entre o braço fechado e os braços abertos, indicado em vermelho na **Figura 10**). Após essa ultrapassagem ou após 30s, o que ocorrer primeiro, o animal é retirado do equipamento e recolocado na caixa de acrílico por 30s.

Dia 04: *Teste de Memória*: Após 72 horas dos treinos, os animais foram submetidos a uma tentativa na tarefa de Esquiva Inibitória (Esquiva 3) e uma tentativa na tarefa de Fuga (Fuga 4). Esses testes seguem o mesmo protocolo que os treinos.



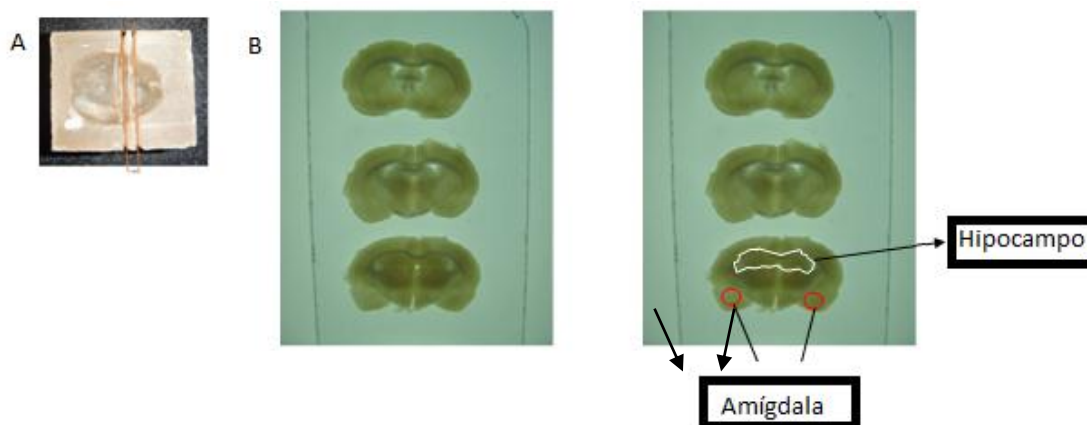
**Figura 10** – Fotos do Labirinto em T Elevado, em duas perspectivas; *Marca vermelha: Limite do braço aberto; Marca Verde: Limite do braço fechado.*

## 4. ESTUDOS BIOQUÍMICOS

### 4.1 *Obtenção das amostras biológicas*

No dia seguinte ao teste comportamental os animais de cada grupo foram mortos por decapitação. Os encéfalos foram rapidamente retirados das cavidades cranianas, pesados e dissecados, de acordo com as coordenadas apresentadas por (Paxinos *et al.*, 1985). Os encéfalos foram posicionados ventralmente sobre um suporte de acrílico (Figura 11 – Painel A) construído para orientar na obtenção das regiões cerebrais. Primeiramente foi retirado um corte coronal, com 1 mm de espessura, da região pósterio-anterior. A SCP foi coletada deste corte, em torno do aqueduto cerebral, com auxílio de uma cânula de 3 mm de diâmetro. Em seguida, o encéfalo foi colocado ventralmente em papel milimetrado e o CPF foi removido por meio de um corte coronal feito a 2 mm na região antero-posterior. Posteriormente um corte sagital foi realizado para a separação dos dois hemisférios e o tálamo foi retirado em ambos, da superfície medial da região diencefálica. O restante do encéfalo foi colado na parte dorsal em papel milimetrado e fatiado em cortes coronais de 1 mm de diâmetro para separação da amígdala e hipocampo (Figura 11 – Painel B) . Todas as amostras foram pesadas

em balança analítica de precisão, etiquetadas no momento da coleta e armazenada a -80° C até o dia dos ensaios bioquímicos. .



**Figura 11 – Painel A: Foto do suporte de acrílico utilizado para separação da substância cinzenta periaquedutal. Painel B: Fotos das fatias transversais de cérebro, com 1mm de espessura cada, indicando os locais de onde foram removidos a amidala e hipocampo.** Detalhes sobre as coordenadas dos cortes transversais estão descritos no item Material e Métodos.

#### **4.2 Determinação das concentrações de serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA)**

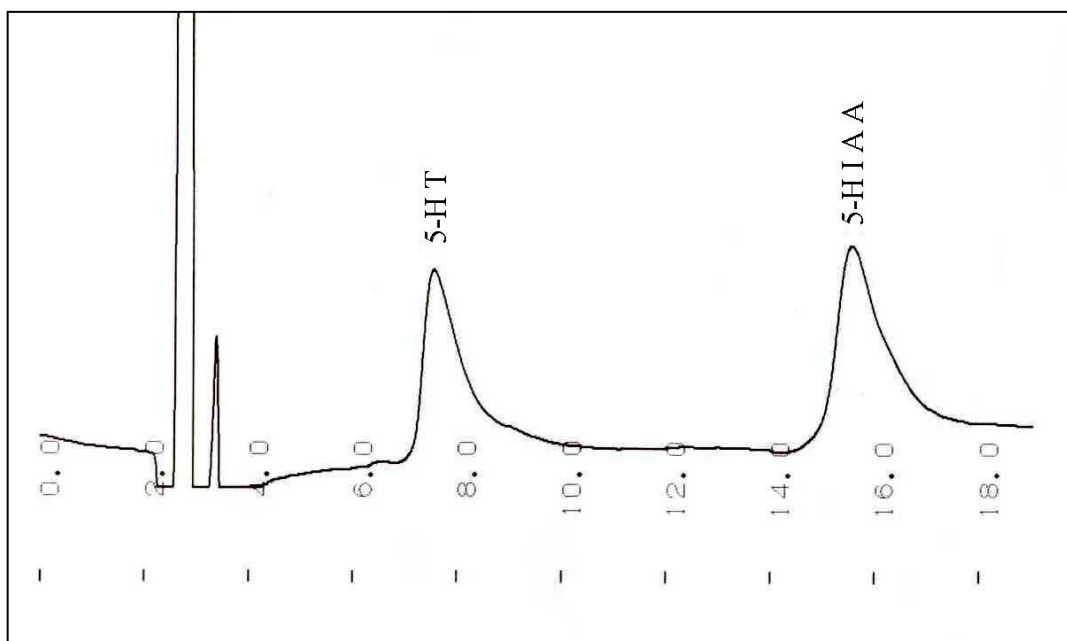
##### **4.2.1 Processamento das amostras:**

As amostras de tecido cerebral foram processadas de acordo com o método descrito por Vigil *et al*, 2010. As amostras de tecido cerebral (CPF; hipocampo; amidala; tálamo; SCP) foram transferidas para tubos, tipo “Potter”, contendo 980µL de ácido perclórico 0,1M; 10µL de metabissulfito de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 0,4mM e 10µL de EDTA 0,1mM, onde foram homogeneizadas por três vezes, mantendo-se o tubo submerso no gelo. Em seguida, a suspensão foi centrifugada (10.000xg por 20 minutos a 4°C), o sobrenadante foi então separado e amostras de 200µL foram aplicadas no cromatógrafo (*High Performance Liquid Chromatography*: HPLC), conforme descrito a seguir.

##### **4.2.2 Dosagem de 5-HT e de 5-HIAA:**

O sistema cromatográfico utilizado no presente trabalho consistiu de uma coluna de fase reversa C18 (Varian®) acoplada a uma pré-coluna C18 (RT 250-4E. Merck, Darmstadt E.R, Germany).

Utilizou-se como fase móvel uma solução tampão de ácido cítrico 0,199M, acetato de sódio 0,243M, EDTA  $2,95 \times 10^{-4}$ M e metanol (91: 9, v/v) com pH ajustado em 4.0. A fase móvel foi sempre filtrada e degaseificada antes do uso. A fase móvel eluiu a uma taxa de fluxo de 1.0mL/min e o volume de amostra aplicado, conforme mencionado acima, foi de 200 $\mu$ L. Utilizou-se um detector eletroquímico de Ag/AgCl (Shimadzu Electrochemical Detector L-ECD-6A-Tokyo, Japan), e o potencial de detecção da célula eletroquímica, mais seletivo para a 5-HT e o 5-HIAA, foi de +850mV. A altura e a área dos picos dos cromatogramas foram medidas, utilizando-se um integrador (Shimadzu C-R7A plus). A Figura 11 mostra um cromatograma típico indicando a separação da 5-HT e de seu metabólito o 5-HIAA.



**Figura 12 – Perfil cromatográfico de separação da 5-HT e do 5-HIAA.** O tempo de retenção para a 5-HT foi dentro de 7 a 8 minutos e para o 5-HIAA entre 15 e 16 minutos.

#### **4.2.3 Curvas padrões e cálculo das concentrações de 5-HT ou 5-HIAA nas amostras:**

As concentrações de 5-HT e do 5-HIAA nas amostras foram calculadas de acordo com suas respectivas curvas padrões. Os padrões e substâncias usadas para interpolar as curvas foram todos de origem Sigma (St. Louis). Foram utilizados cinco padrões para a obtenção da curva padrão, tanto para o 5-HT quanto para o 5-HIAA, nas concentrações de 4 pg/ $\mu$ L; 8 pg/ $\mu$ L; 12 pg/ $\mu$ L; 16 pg/ $\mu$ L; e 20 pg/ $\mu$ L.

Após obtenção das áreas abaixo de cada pico corresponde a cada substância em suas respectivas concentrações, obteve-se a equação da reta, com suas respectivas constantes. Essa foi utilizada para o cálculo das concentrações de 5-HT e 5HIAA nas amostras biológicas. Os resultados foram expressos em ng/g de tecido.

A taxa de renovação da serotonina,  $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ , foi calculada de acordo com o descrito por (Shannon *et al.*, 1986).

## **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os dados foram primeiramente avaliados quanto ao tipo de distribuição, utilizando-se o teste *Kolmogorov-Smirnov*.

Os dados dos testes comportamentais e neuroquímicos foram analisados usando-se o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 17.0. Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  erro-padrão. Diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5 % ( $p < 0,05$ ).

### **5.1 *Análise dos resultados das fêmeas:***

O desempenho nas tarefas de esquiva inibitória e fuga foram avaliados utilizando ANOVA fatorial  $2 \times 2 \times r$ , com medidas repetidas no último elemento. Os fatores foram gestação, exposição crônica aos sons de 22 kHz e tentativas durante o treino. .

Os dados obtidos no teste da memória dessas tarefas, assim como os dados neuroquímicos foram analisados utilizando ANOVA fatorial  $2 \times 2$ , sendo os fatores gestação e exposição aos sons.

### **5.2 *Análise dos resultados da prole***

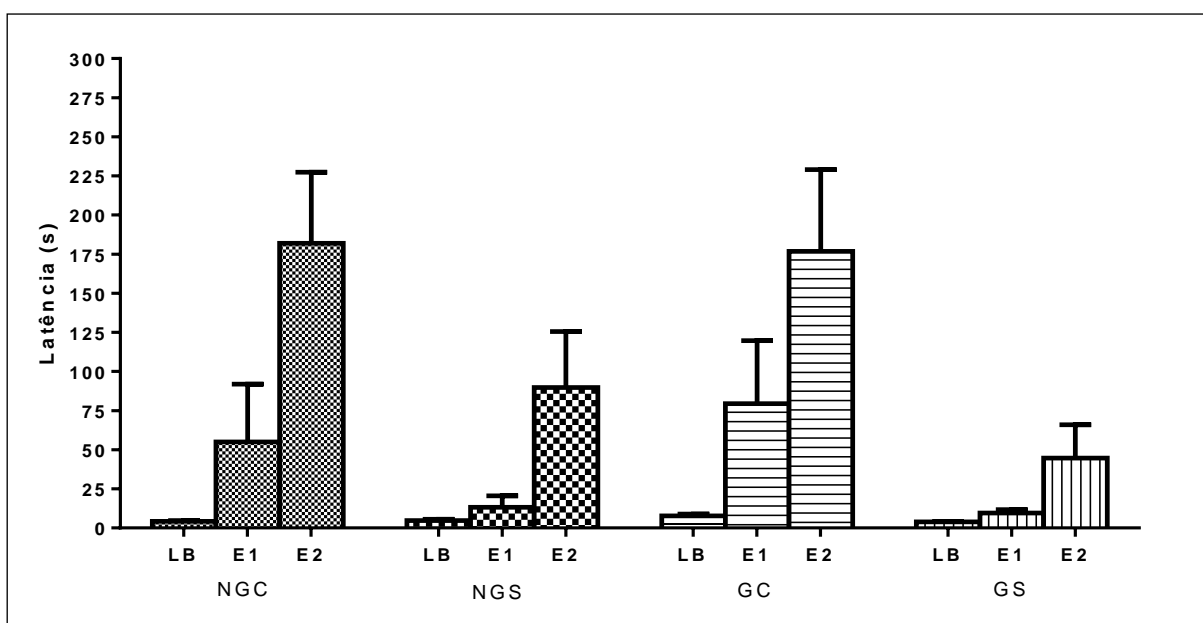
O desempenho nas tarefas de esquiva inibitória e fuga foram avaliados utilizando ANOVA fatorial  $2 \times 2 \times r$ , com medidas repetidas no último elemento. Os fatores foram exposição crônica na fase intrauterina e exposição aguda na fase adulta aos sons de 22 kHz e tentativas durante o treino.

A memória nestas tarefas, assim como os dados neuroquímicos foram analisados utilizando ANOVA fatorial 2x2, sendo os fatores, exposição crônica na fase intrauterina e exposição aguda na fase adulta aos sons de 22 kHz.

## 1. TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA

### 1.1 Fêmeas

Os dados do desempenho das fêmeas na tarefa de esQUIVA inibitória, expresso em latência (tempo gasto pelo animal para sair com as quatro patas do braço fechado, em segundos), estão mostrados na Figura 12. O ANOVA fatorial 2x2x3, com medidas repetidas no último elemento (fatores: gestação, exposição ao som, sessões de treino) mostrou efeito significativo do estímulo sonoro de 22 kHz no desempenho das fêmeas nesta tarefa ( $F_{(1,23)}=7,447$ ;  $p=0,012$ ). De acordo com o teste estatístico a exposição crônica a sons de 22 kHz, diminuiu de forma significativa a latência nas tentativas durante a tarefa de esQUIVA no LTE. Não houve efeito da gestação ( $F_{(1,23)}=0,048$ ;  $p=0,829$ ) e não houve interação entre os fatores gravidez e exposição ao som ( $F_{(1,23)}=0,339$ ;  $p=0,566$ ).

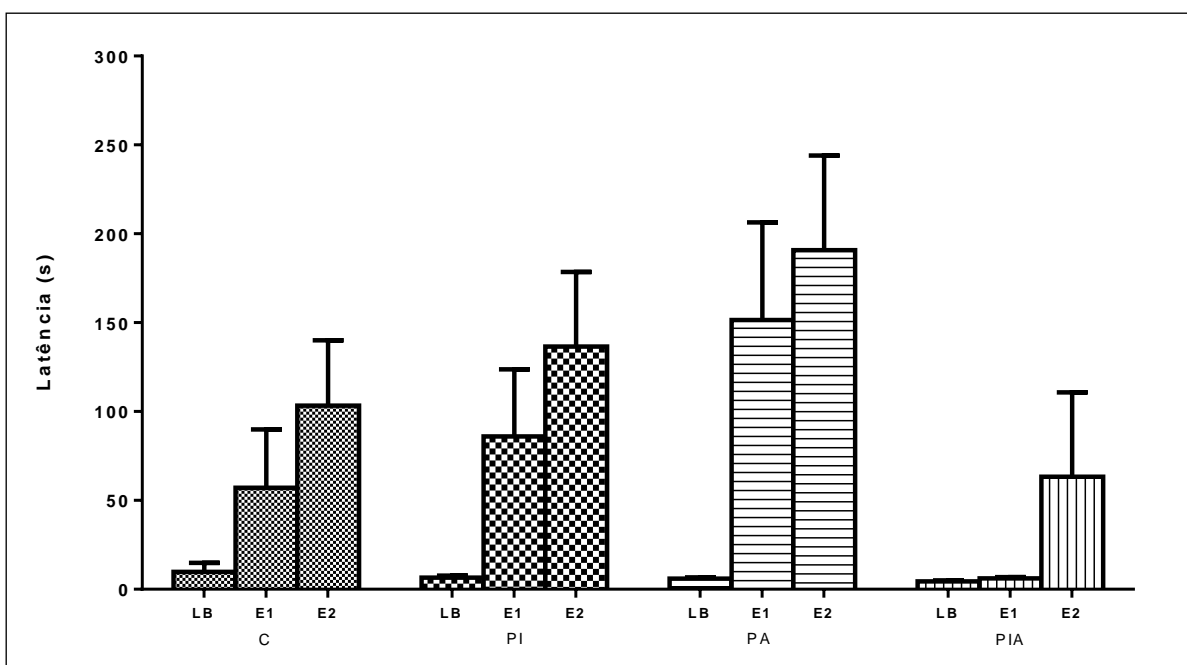


**Figura 13 – Desempenho de fêmeas Wistar na tarefa de esQUIVA inibitória no LTE. Média  $\pm$  Erro padrão.** NGC = Não Gestantes Controle; NGS = Não Gestantes expostas a Sons de 22 kHz; GC = Gestantes Controles; GS = Gestantes expostas a Sons de 22 kHz. LB = linha de base (latência na primeira tentativa da tarefa de esQUIVA); E1 = latência na segunda tentativa; E2 = latência na terceira tentativa. Houve efeito significativo do estímulo no desempenho das fêmeas ( $p=0,012$ ). Não houve efeito significativo da gestação ou interação entre os fatores. Detalhes no texto.



## 1.2 Prole

Os resultados do desempenho da prole na tarefa de esQUIVA inibitória, expresso em latência(s) estão mostrados na Figura 13. ANOVA fatorial 2x2x3, com medidas repetidas no último elemento (fatores: exposição crônica intrauterina a sons de 22 kHz, exposição aguda aos sons de 22 kHz na fase adulta, tentativas na tarefa de esQUIVA inibitória) não mostrou efeito da exposição crônica intrauterina ao som ( $F_{(3,46)}=2,815$ ,  $p=0,100$ ), nem da exposição aguda na fase adulta aos sons ( $F_{(3,46)}=0,032$ ,  $p=0,859$ ), porém houve interação significativa entre os fatores exposição crônica durante o período intrauterino e exposição aguda na fase adulta ( $F_{(3,46)}=6,725$ ,  $p=0,013$ ).

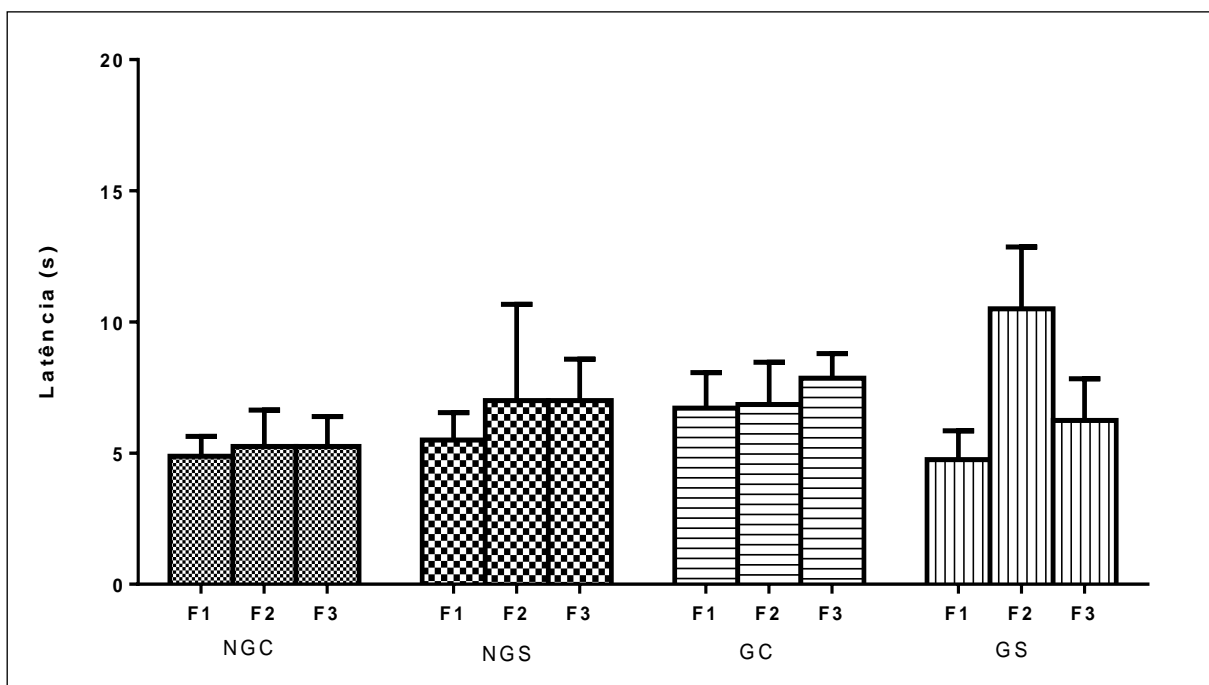


**Figura 14 – Desempenho da prole na tarefa de esQUIVA inibitória no LTE. Média  $\pm$  erro padrão. LB=Linha de Base (latência na primeira tentativa da tarefa de esQUIVA inibitória); E1=latência(s) na segunda tentativa; E2=latência(s) na terceira tentativa. PC=Prole Controle; PI=Prole exposta cronicamente intraútero; PIA=Prole exposta aos Sons de 22 kHz durante a fase intrauterina e durante a fase adulta. Houve interação entre os fatores exposição crônica intrauterina e exposição aguda na fase adulta ( $p=0,013$ ). Não houve efeito significativo dos demais fatores sobre os parâmetros avaliados. Detalhes no texto.**

## 2. TAREFA DE FUGA

### 2.1 Fêmeas

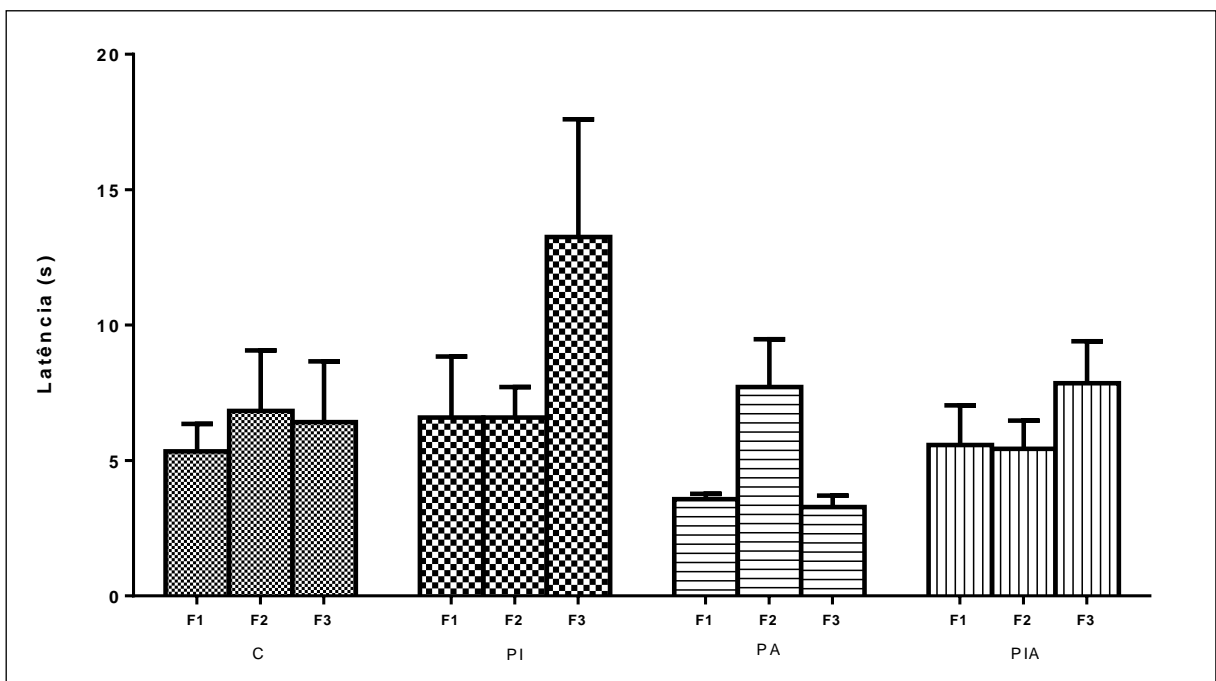
Os dados do desempenho das fêmeas na tarefa de fuga estão mostrados na Figura 14. Não houve efeito significativo da exposição ao som ( $F_{(1,23)}=0,455$ ,  $p=0,507$ ), da gestação ( $F_{(1,23)}=1,676$ ,  $p=0,208$ ) e nem interação entre estes fatores ( $F_{(1,23)}=0,425$ ;  $p=0,521$ ), após avaliação pelo ANOVA fatorial  $2 \times 2 \times 3$ , com medidas repetidas no último elemento (fatores: gestação, exposição ao som; tentativas durante o treino ).



**Figura 15 – Desempenho das fêmeas Wistar na Tarefa de Fuga no LTE.**NGC=Não Gestantes Controle; NGS=Não Gestantes expostas a Sons de 22 kHz; GC=Gestantes Controles; GS=Gestantes expostas a Sons de 22 kHz. F1=latência na primeira tentativa da tarefa de fuga; F2=latência na segunda tentativa; F3=latência na terceira tentativa. Não houve efeito significativo de nenhum fator sobre os parâmetros avaliados. Detalhes no texto.

## 2.2 Prole

Os dados do desempenho da prole na tarefa de fuga estão ilustrados na Figura 15. ANOVA fatorial 2x2x3, com medidas repetidas no ultimo elemento (fatores: exposição crônica intrauterina, exposição aguda na fase adulta, tentativas durante o treino) não mostrou efeito da exposição crônica ao som no período intrauterino ( $F_{(3,46)}=1,824$ ,  $p=0,183$ ), nem da exposição aguda na fase adulta ( $F_{(3,46)}=2,950$ ,  $p=0,093$ ). Também não houve interação entre os fatores ( $F_{(3,46)}=0,460$ ,  $p=0,501$ ).



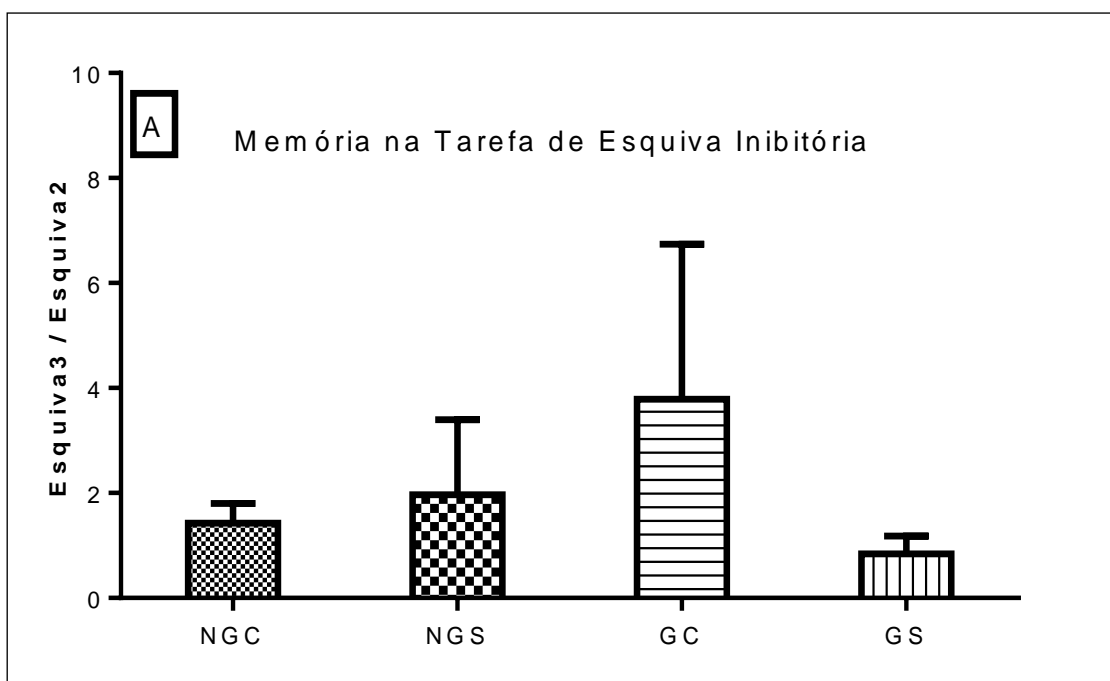
**Figura 16 – Desempenho da prole na tarefa de fuga no LTE. Média + erro padrão.** PC=Prole Controle; PI=Prole Exposta Cronicamente intra-útero; PA=Prole submetida a exposição aguda na fase Adulta; PIA=Prole exposta a Sons de 22k Hz durante a fase intrauterina e na fase adulta. F1= latência na primeira tentativa da tarefa de fuga; F2= latência na segunda tentativa ; F3= latência na terceira tentativa . Não houve efeito significativo dos fatores gestação e exposições aos sons de 22 kHz sobre os parâmetros avaliados. Detalhes no texto.

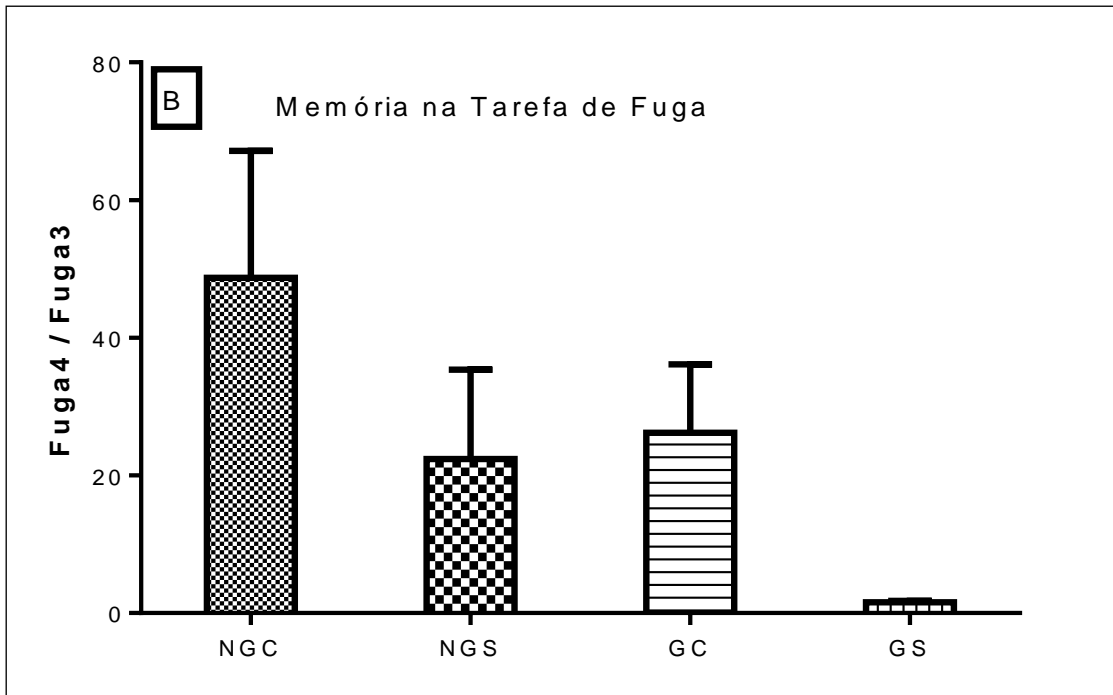
### 3. MEMÓRIA DAS TAREFAS DE ESQUIVA INIBITÓRIA E FUGA

#### 3.1 Fêmeas

A memória das fêmeas da tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA, determinada pela relação entre o desempenho na tentativa na tarefa de esQUIVA 72 horas após o treino e a última tentativa na tarefa de esQUIVA no treino (EsQUIVA3/EsQUIVA2) está apresentada na Figura 16, painel A. ANOVA fatorial 2x2 (fatores gestação e exposição crônica ao som) não mostrou efeito significativo da exposição ao som ( $F_{(3,22)}=0,616$ ,  $p=0,441$ ) e nem efeito da gestação ( $F_{(3,22)}=0,071$ ,  $p=0,792$ ) na memória da tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA. Não houve interação entre os fatores exposição ao som e gestação ( $F_{(3,22)}=1,205$ ,  $p=0,284$ ).

A memória da tarefa de fuga, determinada pela relação entre o desempenho na tentativa de fuga 72 horas após o treino (Fuga 4) e o desempenho na tentativa na tarefa de fuga no último dia do treino (Fuga 3) está mostrada na Figura 16, painel B. ANOVA fatorial 2x2 (fatores gestação e exposição ao som) mostrou uma tendência de efeito da exposição ao som ( $F_{(3,22)}=3,449$ ,  $p=0,077$ ), com melhora no desempenho dos animais submetidos à exposição crônica. Não houve efeito da gestação na memória desta tarefa ( $F_{(3,22)}=2,493$ ,  $p=0,129$ ) e não houve interação entre os fatores exposição ao som e gestação ( $F_{(3,22)}=0,003$ ,  $p=0,954$ ).

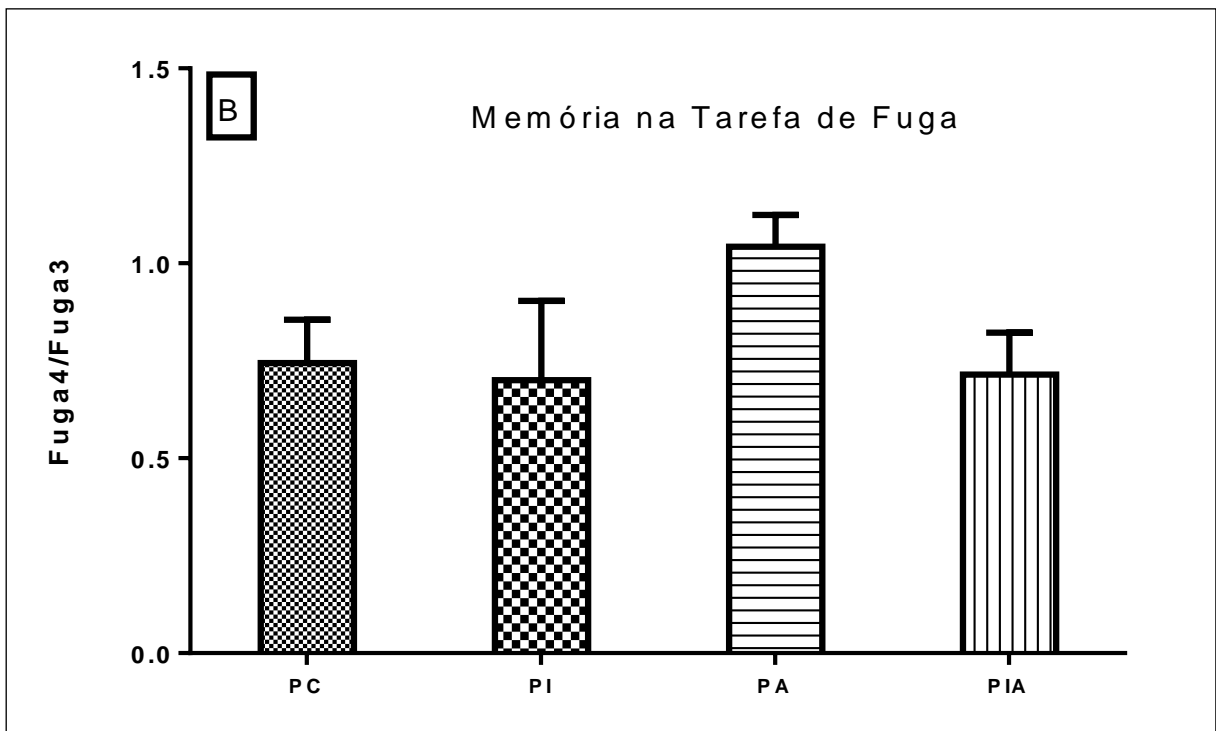
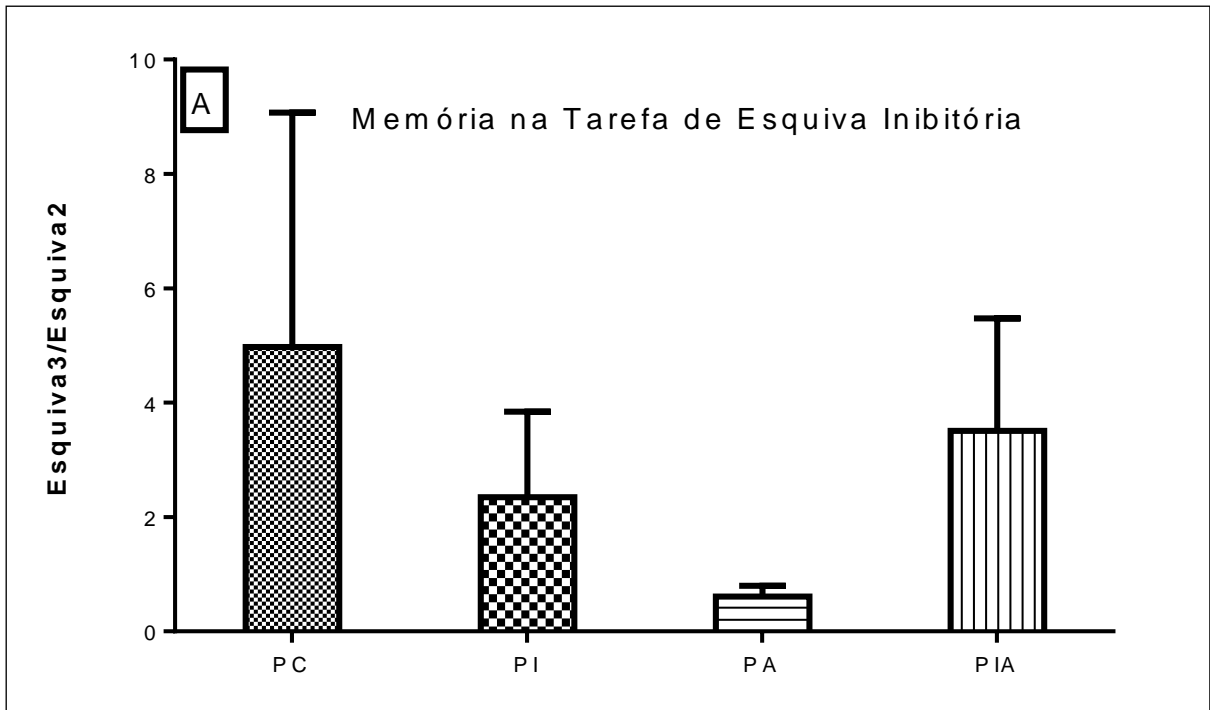




**Figura 17 – Desempenho das fêmeas no teste de memória** expressos como índice de memória conforme indicado nos eixos das ordenadas (média  $\pm$  erro padrão). Painel A: Na tarefa de esquiva inibitória. Painel B: Na tarefa de fuga. NGC=Não Gestantes Controle; NGS=Não Gestantes expostas a Sons de 22 kHz; GC=Gestantes Controles; GS=Gestantes expostas a Sons de 22 kHz. Houve uma tendência de efeito da exposição ao som na memória da tarefa de fuga ( $p=0,077$ ) e não houve efeito sobre dos demais fatores sobre os demais parâmetros avaliados. Detalhes no texto.

### 3.2 Prole

Os desempenhos nos testes de memória da prole das tarefas de esquiva inibitória e fuga estão mostrados Figura 17, painéis A e B, respectivamente. ANOVA fatorial 2x2 não mostrou efeito significativo da exposição crônica durante a fase intrauterina nas memórias das tarefas de esquiva inibitória ( $F_{(3,46)}=0,04$ ,  $p=0,951$ ) e fuga ( $F_{(3,46)}=2,010$ ,  $p=0,163$ ), nem efeito da exposição aguda na fase adulta nestas tarefas ( $F_{(3,46)}=0,536$ ,  $p=0,468$ ;  $F_{(3,46)}=1,914$ ,  $p=0,173$ , respectivamente). Também não houve interações entre os fatores nas memórias das tarefas de esquiva inibitória ( $F_{(3,46)}=1,592$ ,  $p=0,213$ ) e de fuga ( $F_{(3,46)}=1,117$ ,  $p=0,296$ ).



**Figura 18 – Desempenho da prole no teste de memória expressos como índice de memória conforme indicado nos eixos das ordenadas (média  $\pm$  erro padrão). Painel A: Na tarefa de esquiva inibitória. Painel B: Na tarefa de fuga. PC=Prole Controle; PI= Prole exposta cronicamente ao som, durante a fase Intrauterina; PA=Prole submetida à exposição aguda ao som na fase Adulta; PIA=Prole submetida à exposição crônica intrauterina e exposição aguda na fase adulta. Não houve efeito significativo dos fatores em nenhum dos parâmetros avaliados. Detalhes no texto.**

## 4. CONCENTRAÇÕES DE 5-HT

### 4.1 Fêmeas

As concentrações de serotonina no hipocampo, tálamo, amígdala, SCP e CPF, expressas em ng/g de tecido estão apresentadas na Figura 18. ANOVA 2x2 (fatores gestação e exposição crônica a sons de 22 kHz) não mostrou efeito significativo da exposição a sons de 22 kHz e nem da gestação sobre as concentrações de serotonina nas estruturas avaliadas. Houve efeito de interação entre os fatores na concentração de serotonina na amígdala ( $F_{(3,10)}=5,807$ ,  $p=0,037$ ) (Dados detalhados na Tabela 1) .

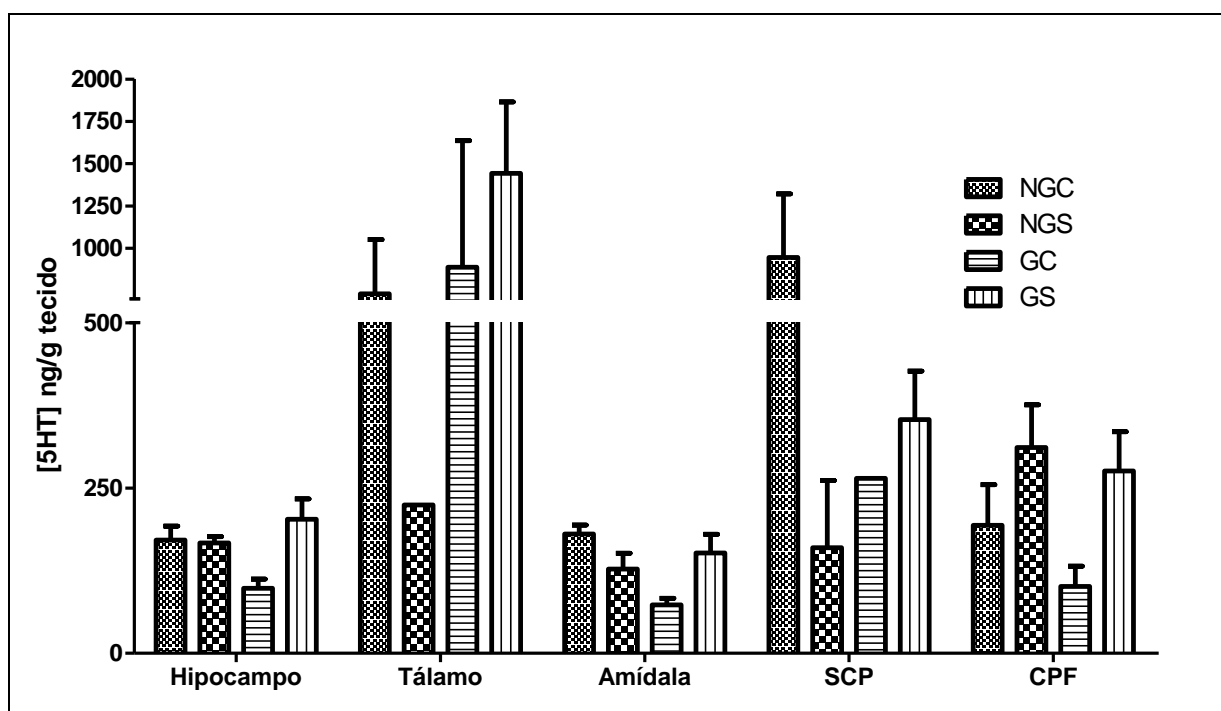


Figura 19 – Concentrações de 5-HT no Hipocampo, Tálamo, Amígdala, Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) e Córtex Pré-Frontal (CPF) em fêmeas da linhagem Wistar. Média  $\pm$  erro padrão. NGC=Não Gestantes Controle; NGS=Não Gestantes expostas a Sons de 22 kHz; GC=Gestantes Controles; GS=Gestantes expostas a Sons de 22 kHz. Houve interação significativa entre os fatores sobre a [5-HT] na amígdala ( $p=0,037$ ). Não houve efeito significativo dos fatores sobre os demais parâmetros avaliados (Detalhes na Tabela 1).

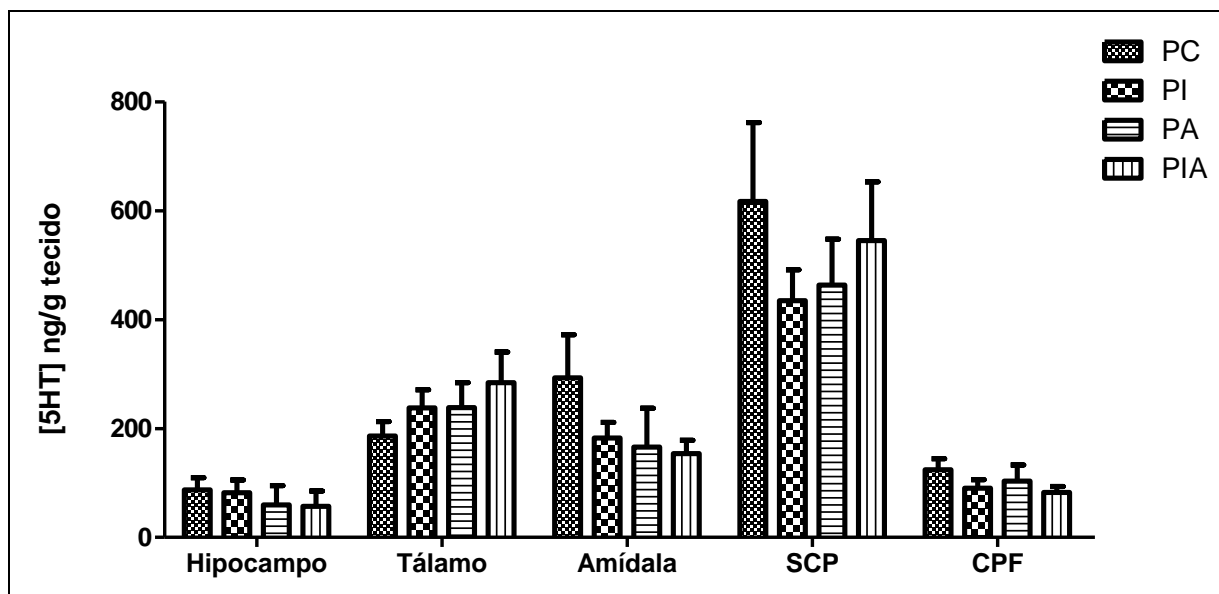
	Variável dependente [5-HT]	F	Sig.
Gestação	Hipocampo	$F_{(3,11)}=0,433$	0,524
	Tálamo	$F_{(3,8)}=1,462$	0,261
	Amidala	$F_{(3,10)}=2,309$	0,160
	SCP	$F_{(3,9)}=0,669$	0,435
	CPF	$F_{(3,10)}=0,887$	0,369
Exposição crônica a sons de 22 kHz	Hipocampo	$F_{(3,11)}=3,140$	0,104
	Tálamo	$F_{(3,8)}=0,002$	0,966
	Amidala	$F_{(3,10)}=0,209$	0,658
	SCP	$F_{(3,9)}=4,481$	0,063
	CPF	$F_{(3,10)}=4,601$	0,058
Interação entre os fatores	Hipocampo	$F_{(3,11)}=3,698$	0,081
	Tálamo	$F_{(3,8)}=0,868$	0,379
	<b>Amidala</b>	<b><math>F_{(3,10)}=5,807</math></b>	<b>0,037</b>
	SCP	$F_{(3,9)}=0,332$	0,578
	CPF	$F_{(3,10)}=0,175$	0,685

**Tabela 1 – Valores de F e p obtidos a partir da ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: gestação e exposição a sons de 22 kHz) sobre as concentrações de serotonina. CPF=córtex pré-frontal; SCP=substância cinzenta periaquedutal.**

#### 4.2 Prole

As concentrações de serotonina em regiões cerebrais da prole estão mostradas na Figura 19. ANOVA fatorial 2x2 (fatores exposição crônica na fase intrauterina e exposição aguda na idade adulta) não mostrou efeito significativo da exposição crônica intrauterina e nem da exposição aguda na idade adulta sobre as concentrações de serotonina nas estruturas avaliadas. Também não foi observado interação entre os fatores. Detalhes na Tabela 2.





**Figura 20** – Média  $\pm$  erro padrão das concentrações de Serotonina no Hipocampo, Tálamo, Córtex Pré-Frontal (CPF), Amídala e Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) da prole. PC=Prole Controle; PI=Prole exposta cronicamente a sons 22 kHz durante a fase Intrauterina; PA=Prole exposta a 22 kHz agudo na fase adulta; PIA=Prole exposta a Sons de 22 kHz durante as fases Intrauterina e Adulta. Não houve efeito significativo dos fatores sobre os parâmetros avaliados. Detalhes na Tabela 2.

	Variável dependente [5-HT]	F	Sig.
Exposição crônica intrauterina	Hipocampo	$F_{(3,40)}=0,001$	0,975
	Tálamo	$F_{(3,44)}=3,506$	0,068
	Amídala	$F_{(3,43)}=1,695$	0,200
	SCP	$F_{(3,40)}=0,779$	0,383
	CPF	$F_{(3,42)}=2,357$	0,132
Exposição aguda na idade adulta	Hipocampo	$F_{(3,40)}=0,681$	0,414
	Tálamo	$F_{(3,44)}=3,533$	0,067
	Amídala	$F_{(3,43)}=2,642$	0,111
	SCP	$F_{(3,40)}=0,780$	0,382
	CPF	$F_{(3,42)}=0,731$	0,397
Interação entre os fatores	Hipocampo	$F_{(3,40)}=0,054$	0,817
	Tálamo	$F_{(3,44)}=0,092$	0,764
	Amídala	$F_{(3,43)}=0,824$	0,369
	SCP	$F_{(3,40)}=0,559$	0,459
	CPF	$F_{(3,42)}=0,058$	0,811

**Tabela 2** – Valores de F e p obtidos a partir da ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: exposição crônica intrauterina e exposição aguda na idade adulta a sons de 22 kHz) sobre as concentrações de 5-HT em regiões cerebrais. CPF=córtex pré-frontal; SCP=substância cinzenta periaquedutal.

## 5. CONCENTRAÇÕES DE 5-HIAA

### 5.1 Fêmeas

As concentrações de 5-HIAA no hipocampo, tálamo, amígdala, SCP e CPF estão representadas na Figura 20. ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: exposição a sons de 22 kHz e gestação) não mostrou efeito significativo da exposição ao som ou da gestação nas concentrações de 5-HIAA no hipocampo, tálamo, amígdala, SCP e CPF, nem interação entre os fatores. Detalhes na Tabela 3.

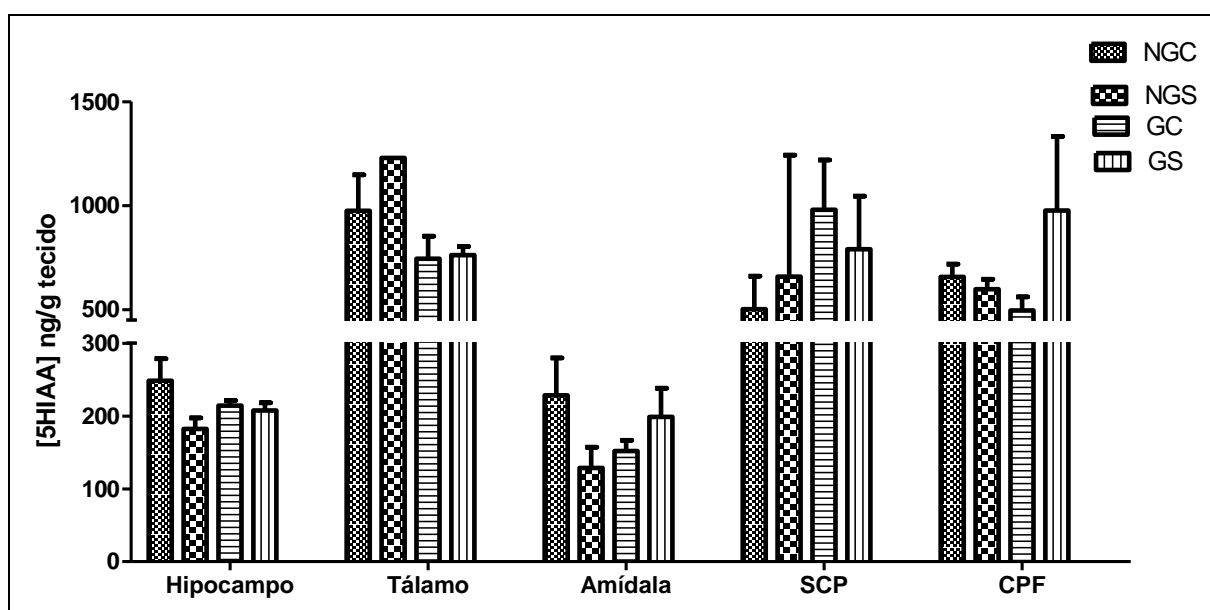


Figura 21 – Média  $\pm$  erro padrão das concentrações de Ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) no hipocampo, tálamo, amígdala, substância cinzenta periaquedutal (SCP) e córtex pré-frontal (CPF) de fêmeas Wistar. NGC = Não Gestantes Controle; NGS = Não Gestantes expostas a Sons de 22 kHz; GC = Gestantes Controles; GS = Gestantes expostas a Sons de 22 kHz. Não houve efeito significativo dos fatores em nenhum dos parâmetros avaliados. Detalhes na Tabela 3.

	Variável dependente [5-HIAA]	F	Sig.
Gestação	Hipocampo	$F_{(3,11)}=0,028$	0,869
	Tálamo	$F_{(3,8)}=0,550$	0,480
	Amidala	$F_{(3,10)}=0,003$	0,954
	SCP	$F_{(3,10)}=1,110$	0,320
	CPF	$F_{(3,10)}=0,225$	0,645
Exposição a sons de 22 kHz	Hipocampo	$F_{(3,11)}=2,102$	0,175
	Tálamo	$F_{(3,8)}=0,112$	0,746
	Amidala	$F_{(3,10)}=0,231$	0,641
	SCP	$F_{(3,10)}=0,003$	0,955
	CPF	$F_{(3,10)}=0,847$	0,379
Interação entre os fatores	Hipocampo	$F_{(3,11)}=1,398$	0,262
	Tálamo	$F_{(3,8)}=0,122$	0,735
	Amidala	$F_{(3,10)}=1,760$	0,214
	SCP	$F_{(3,10)}=0,355$	0,566
	CPF	$F_{(3,10)}=1,389$	0,266

**Tabela 3 – Valores de F e p obtidos a partir da ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: gestação e exposição a sons de 22 kHz) sobre as concentrações de 5-HIAA em regiões cerebrais. CPF= córtex pré-frontal; SCP = substância cinzenta periaquedutal.**

## 5.2 Prole

As concentrações do ácido 5-hidroxi-indolacético em regiões cerebrais da prole estão mostradas na Figura 21. ANOVA fatorial 2x2 (fatores: exposição crônica intrauterina e exposição aguda na idade adulta a sons de 22 kHz) mostrou efeito significativo da exposição crônica intrauterina ( $F_{(3,40)}=7,165$ ,  $p=0,011$ ) e da exposição aguda na idade adulta ( $F_{(3,40)}=5,249$ ,  $p=0,027$ ), evidenciando-se um aumento na concentração de 5-HIAA do hipocampo. Não houve efeito significativo destes fatores sobre a concentração de 5-HIAA das demais estruturas. Houve interação entre os fatores na concentração de 5-HIAA do hipocampo ( $F_{(3,40)}=8,045$ ,  $p=0,007$ ) e da amidala ( $F_{(3,43)}=10,753$ ,  $p=0,002$ ). Não houve interação entre os dois fatores sobre as concentrações de 5-HIAA nas demais estruturas avaliadas. Detalhes na Tabela 4.

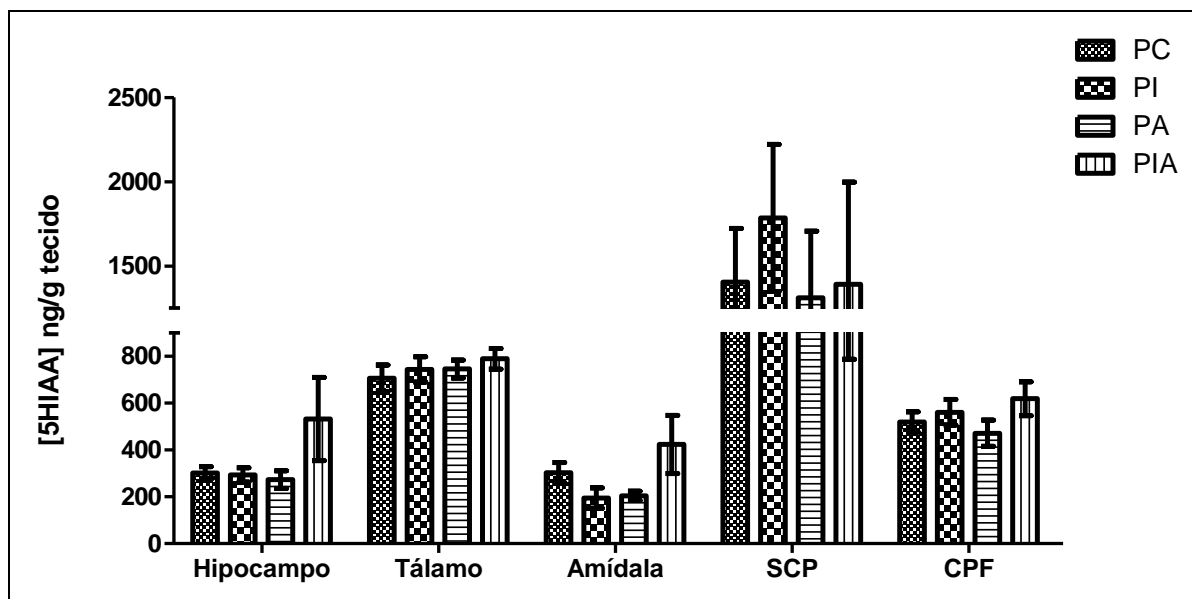


Figura 22 - Média  $\pm$  erro padrão das concentrações do Ácido 5-Hidroxi-indolacético no Hipocampo, Tálamo, Córtex Pré-Frontal (CPF), Amígdala e Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) da prole de ratos Wistar. PC=Prole Controle; PI=Prole exposta cronicamente durante a fase Intrauterina; PA=Prole exposta na idade Adulta a sons de 22 kHz; PIA=Prole exposta durante as fases Intrauterina e Adulta a sons de 22 kHz. Houve efeito significativo da exposição crônica intraútero ( $p=0,011$ ) e da exposição aguda na idade adulta sobre a concentração de 5-HIAA no hipocampo ( $p=0,027$ ). Houve interação entre os efeitos dos fatores sobre as concentrações de 5-HIAA no hipocampo ( $p=0,007$ ) e na amígdala ( $p=0,002$ ). Não houve efeito significativo dos fatores sobre os demais parâmetros avaliados. Detalhes na Tabela 4.

	Variável dependente [5-HIAA]	F	Sig.
Exposição crônica durante a fase intrauterina	<b>Hipocampo</b>	<b>F<sub>(3,40)</sub>=7,165</b>	<b>0,011</b>
	Tálamo	F <sub>(3,44)</sub> =1,867	0,179
	Amígdala	F <sub>(3,43)</sub> =1,491	0,229
	SCP	F <sub>(3,40)</sub> =1,369	0,249
	CPF	F <sub>(3,42)</sub> =2,489	0,122
Exposição aguda na fase adulta	<b>Hipocampo</b>	<b>F<sub>(3,40)</sub>=5,249</b>	<b>0,027</b>
	Tálamo	F <sub>(3,44)</sub> =1,993	0,165
	Amígdala	F <sub>(3,43)</sub> =1,958	0,169
	SCP	F <sub>(3,40)</sub> =0,003	0,955
	CPF	F <sub>(3,42)</sub> =0,088	0,768
Interação entre os fatores	<b>Hipocampo</b>	<b>F<sub>(3,40)</sub>=8,045</b>	<b>0,007</b>
	Tálamo	F <sub>(3,44)</sub> =0,236	0,629
	<b>Amígdala</b>	<b>F<sub>(3,43)</sub>=10,753</b>	<b>0,002</b>
	SCP	F <sub>(3,40)</sub> =0,033	0,856
	CPF	F <sub>(3,42)</sub> =0,512	0,478

Tabela 4 – Valores de F e p obtidos a partir da ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: gestação e exposição crônica ou aguda a sons de 22 kHz nos fases intrauterina e adulta, respectivamente) sobre as concentrações de 5-HIAA em regiões cerebrais da prole. CPF= córtex pré-frontal; SCP = substância cinzenta periaquedutal.

## 6. TAXA DE RENOVAÇÃO DE SEROTONINA

### 6.1 Fêmeas

As taxas de renovação da serotonina, calculada pela relação entre as concentrações de 5-HIAA e 5-HT, estão representadas na Figura 22. ANOVA fatorial 2x2 (fatores: exposição crônica aos sons de 22 kHz e gestação) não mostrou efeito significativo da gestação sobre a taxa de renovação da serotonina. A exposição a sons de 22 kHz teve efeito significativo sobre a taxa de renovação de serotonina, redução, no hipocampo ( $F_{(3,11)}=8,545$ ,  $p=0,014$ ) e no CPF ( $F_{(3,10)}=6,321$ ,  $p=0,031$ ). Não houve efeito significativo da exposição a sons de 22 kHz nas taxas de 5-HT nas demais estruturas e nem houve interação entre os fatores (Detalhes na Tabela 5).

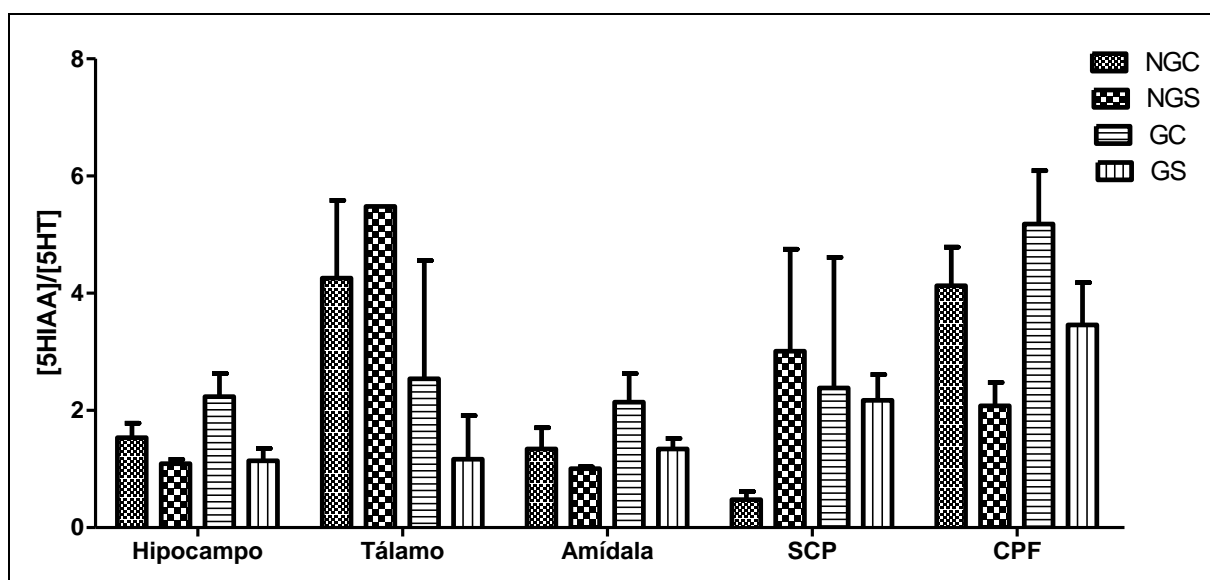


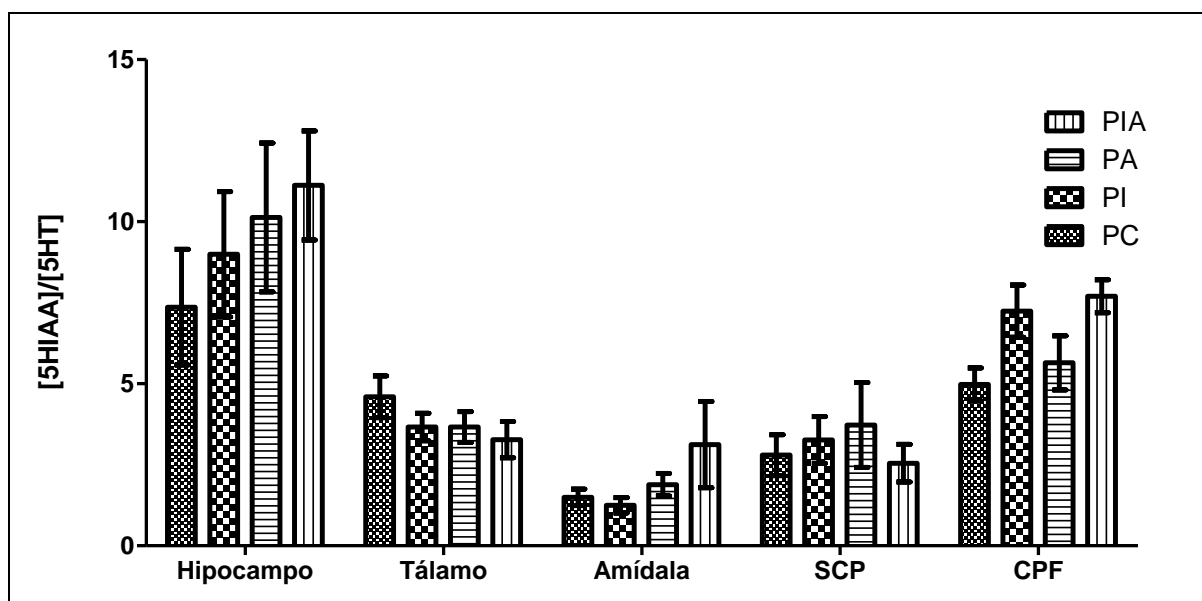
Figura 23 – Taxa de renovação da serotonina no hipocampo, tálamo, amígdala, Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) e Córtex Pré-Frontal (CPF) de fêmeas Wistar. Média  $\pm$  erro padrão. NGC=Não Gestantes Controle; NGS=Não Gestantes expostas a Sons de 22 kHz; GC=Gestantes Controles; GS=Gestantes expostas a Sons de 22 kHz. Houve efeito significativo da exposição aos sons na taxa de renovação de serotonina no hipocampo ( $p=0,014$ ) e no CPF ( $p=0,031$ ). Não houve efeito significativo sobre a taxa de renovação nas outras regiões avaliadas. Detalhes na Tabela 5.

	Variável dependente	F	P
<b>Taxa de Renovação da serotonina</b>			
Efeito da Gestação	Hipocampo	$F_{(3,11)}=2,019$	0,183
	Tálamo	$F_{(3,12)}=2,990$	0,122
	Amidala	$F_{(3,10)}=2,460$	0,148
	SCP	$F_{(3,9)}=0,382$	0,552
	CPF	$F_{(3,10)}=2,629$	0,136
Efeito da Exposição crônica a sons de 22 kHz	<b>Hipocampo</b>	<b><math>F_{(3,11)}=8,545</math></b>	<b>0,014</b>
	Tálamo	$F_{(3,12)}=0,02$	0,967
	Amidala	$F_{(3,10)}=2,443$	0,149
	SCP	$F_{(3,9)}=1,791$	0,214
	<b>CPF</b>	<b><math>F_{(3,10)}=6,321</math></b>	<b>0,031</b>
Interação entre os fatores Gestação e Exposição a sons de 22 kHz	Hipocampo	$F_{(3,11)}=1,516$	0,244
	Tálamo	$F_{(3,12)}=0,552$	0,479
	Amidala	$F_{(3,10)}=0,401$	0,541
	SCP	$F_{(3,9)}=2,507$	0,148
	CPF	$F_{(3,10)}=0,049$	0,829

**Tabela 5 – Valores de F e p obtidos a partir da ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: gestação e exposição a sons de 22 kHz) sobre a taxa de renovação da serotonina.** CPF= *córtex pré-frontal*; SCP = *substância cinzenta periaquedutal*.

## 6.2 Prole

As taxas de renovação da serotonina nas estruturas avaliadas estão representadas na Figura 23. ANOVA fatorial 2x2 (fatores: exposição crônica durante a fase intrauterina e exposição aguda na fase adulta ao som de 22 kHz) mostrou efeito significativo da exposição crônica intrauterina sobre a taxa de renovação da serotonina do córtex pré-frontal ( $F_{(3,42)}= 11,279$ ,  $p= 0,002$ ), onde verifica-se aumento desta concentração. Houve efeito significativo da exposição aguda na fase adulta a sons de 22 kHz na taxa de renovação da serotonina da amidala ( $F_{(3,43)}=6,409$ ,  $p=0,015$ ). Não houve efeito significativo dos fatores sobre a taxa de renovação da serotonina nas demais estruturas avaliadas. Não houve interação significativa entre os fatores. Detalhes na Tabela 6.



**Figura 24 – Média ± erro padrão das Taxas de Renovação da Serotonina no Hipocampo, Tálamo, Córtex Pré-Frontal (CPF), Amídala e Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) da prole de ratos Wistar.** *PC=Prole Controle; PI=Prole submetida à exposição crônica na fase intrauterina; PA=Prole submetida à exposição aguda na fase adulta; PIA=Prole exposta a Sons de 22 kHz durante as fases intrauterina e adulta. Houve efeito significativo da exposição intrauterina na taxa de renovação da serotonina no córtex pré-frontal ( $p=0,002$ ) e efeito da exposição aguda na fase adulta na taxa de renovação da serotonina na amídala ( $p=0,015$ ). Não houve efeito significativo ou interação entre os fatores na taxa de renovação da serotonina nas demais estruturas. Detalhes na Tabela 6.*

	Variável dependente Taxa de renovação da serotonina	F	Sig.
Exposição crônica durante a fase intrauterina	Hipocampo	$F_{(3,40)}=0,092$	0,764
	Tálamo	$F_{(3,44)}=2,364$	0,131
	Amídala	$F_{(3,43)}=1,601$	0,213
	SCP	$F_{(3,40)}=0,252$	0,619
	<b>CPF</b>	<b><math>F_{(3,42)}=11,279</math></b>	<b>0,002</b>
Exposição aguda na fase adulta	Hipocampo	$F_{(3,40)}=0,834$	0,367
	Tálamo	$F_{(3,44)}=2,359$	0,132
	<b>Amídala</b>	<b><math>F_{(3,43)}=6,409</math></b>	<b>0,015</b>
	SCP	$F_{(3,40)}=0,014$	0,906
	CPF	$F_{(3,42)}=0,733$	0,397
Interação entre os fatores	Hipocampo	$F_{(3,40)}=0,331$	0,568
	Tálamo	$F_{(3,44)}=0,196$	0,660
	Amídala	$F_{(3,43)}=3,078$	0,086
	SCP	$F_{(3,40)}=1,273$	0,266
	CPF	$F_{(3,42)}=0,035$	0,853

**Tabela 6 - Valores de F e p obtidos a partir da ANOVA fatorial 2x2 (Fatores: gestação e exposição a sons de 22 kHz) sobre a concentração de 5-HIAA.** *CPF = córtex pré-frontal; SCP = substância cinzenta periaquedutal.*

Os dados do presente estudo mostram pela primeira vez que a resposta de esquiva inibitória de ratas Wistar é afetada, sem efeito sobre a resposta de fuga, pela exposição crônica ao som de 22 kHz. Além disto, observamos que a exposição crônica intrauterina pode também interferir com a resposta de esquiva inibitória, mas não com a resposta de fuga, da prole na fase adulta, confrontada com a exposição aguda ao som de 22 kHz. Ou seja, a experiência prévia a exposição intrauterina ao som de 22 kHz interfere com a resposta comportamental em fases posteriores do desenvolvimento. Existem evidências obtidas por outros autores (Beckett *et al.*, 1996) de que a frequência de 22 kHz induz comportamento defensivo em ratos. Entretanto, o método comportamental utilizado por esses autores não discriminou os dois tipos de respostas defensivas, esquiva inibitória e fuga. Essas duas reações foram avaliadas no presente estudo, utilizando o paradigma do LTE, que permite discriminar essas duas respostas em um mesmo equipamento (Graeff *et al.*, 1993).

Até o momento, a maioria dos dados de estudos envolvendo sons de 22 kHz foi obtida a partir de gravações da vocalização de animais após exposição a algum tipo de tratamento, tais como exposição a predador (Blanchard *et al.*, 1991; Litvin *et al.*, 2007) e choque nas patas (Portavella *et al.*, 1993; Parsana, Moran *et al.*, 2012). Outros estudos tiveram como objetivo avaliar a atividade de sistemas como o serotoninérgico (Sanchez, 1993) ou colinérgico (Brudzynski *et al.*, 2011), atividade de determinadas regiões cerebrais no momento em que os animais vocalizam ou a atividade de fármacos sobre a vocalização (Bardin *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Prus *et al.*, 2014). Porém, existem poucos trabalhos sobre os efeitos da exposição dos animais a sons de 22 kHz. Alguns autores gravaram a vocalização de 22 kHz emitida pelos ratos e mostraram que a exposição a esses sons induziram comportamento de *freezing* (Parsana, Moran *et al.*, 2012), transmissão social do medo (Kim *et al.*, 2010) e inibiram o comportamento de aproximação (Wohr e Schwarting, 2007).

A maioria dos trabalhos citados anteriormente foi desenvolvida utilizando equipamentos para fazer a gravação e a emissão de vocalizações ultrassônicas de roedores que, além de onerosos, não têm equivalentes no Brasil. Dessa forma, estabelecemos e validamos no LaNeC, em parceria com um grupo da Escola de Engenharia da UFMG, um equipamento de baixo custo capaz de criar, gravar e emitir os ultrassons, conforme detalhado na seção de “Métodos”.



Conforme mencionado acima, os dados obtidos no presente estudo mostraram pela primeira vez que o estado emocional de ratas Wistar fêmeas é afetado pela exposição crônica a sons de 22 kHz, e no caso da exposição ocorrer no período da gravidez, essa também interfere no comportamento emocional da prole, na idade adulta. As fêmeas – grávidas ou não - que foram previamente expostas a esse estímulo apresentaram um comportamento menos ansioso, quando colocadas frente a um segundo estímulo aversivo – modelo de ansiedade no labirinto em T elevado. Esse dado indica que a experiência prévia frente ao estímulo de 22 kHz interferiu na resposta das fêmeas frente a uma exposição posterior a um ambiente aversivo, sugerindo a ocorrência de um tipo de adaptação. Essa sugestão de uma possível adaptação em caso de experiência prévia, está de acordo com Yim et al (2012). Por outro lado, a prole submetida a esse estímulo durante a fase intrauterina, não apresentou alteração no estado de ansiedade frente à tarefa no LTE. No entanto, observou-se que a exposição prévia durante a fase intrauterina interfere com a resposta quando esses animais – prole - sofreram uma segunda exposição aguda durante a fase adulta. Ou seja, existe uma interação entre a exposição crônica durante a fase intrauterina e a exposição aguda a sons de 22 kHz, na idade adulta. A associação entre esses dois estímulos (crônico e agudo) causa uma redução no estado de ansiedade. De forma similar ao observado para as fêmeas, a experiência prévia parece minimizar a resposta de esquiva frente a exposições subseqüentes. Vale destacar que nesse contexto o estímulo prévio foi crônico o que remete a uma possível habituação. Ou seja, uma hipótese a ser considerada para explicar o efeito ansiolítico é que as fêmeas e a prole podem ter aprendido, como resultado da exposição repetitiva, que o som de 22 kHz não é um sinal de ameaça. Isto poderia explicar a observação que, ao longo do tempo a resposta de esquiva inibitória foi menor comparada com os ratos controles. Essa hipótese é corroborada por outros autores que mostraram que exposições repetitivas a sons podem induzir habituação (Grissom e Bhatnagar, 2009; Masini *et al.*, 2012).

Entretanto, enquanto alguns estudos mostraram que a exposição crônica a ruído branco reduz o estado de ansiedade em ratas grávidas (Nishio *et al.*, 2001), outros mostram que a exposição crônica a ruído branco aumenta comportamentos indicativos de maior ansiedade como *sniffing*, *grooming* e *crawling* em ratos machos (Weyers *et al.*, 1994). Esses resultados aparentemente contraditórios enfatizam a importância de considerar efeitos hormonais na modulação e na regulação do estado emocional (Chikahisa *et al.*, 2007). Além disso, características do som, como intensidade, frequência e duração e o modelo animal utilizado também irão influenciar o estado de ansiedade observado. Por exemplo, a exposição a ultrassons (20-45 kHz) induz

sinais depressivos observados em ratos submetidos ao teste de nado forçado (Morozova *et al.*, 2013), enquanto a exposição a ruído branco tem efeitos ansiogênicos (File, 1994; Rex *et al.*, 2005; Naqvi *et al.*, 2012; Escribano *et al.*, 2013). Além disso, alguns autores não encontraram efeitos da exposição crônica a ruído branco no estado de ansiedade (Nishio *et al.*, 2006; Uygur e Arslan, 2011) ou encontraram diminuição desse estado (Nishio *et al.*, 2001; Uran *et al.*, 2010). Isto também sinaliza sobre uma possível flexibilidade da resposta emocional que depende de vários fatores. Isto nos remete ao fato de que não apenas estímulos aversivos de alta intensidade, como acontecem em eventos traumáticos, são codificados e recuperados por estímulos similares no futuro, mas também estímulos não traumáticos. O entendimento das bases neurobiológicas desses sistemas de codificação e recuperação de informações com conteúdo emocional pode ser relevante não apenas para o entendimento do mecanismo fisiológico dessas interações entre efeitos de estímulos aversivos ambientais, mas também contribuir para o esclarecimento de disfunções, como acontece na ansiedade pós-traumática.

A interação significativa entre a exposição crônica intrauterina e a exposição aguda ao som de 22 kHz na fase adulta, encontrada no presente estudo poderia ser explicada com base nas teorias da plasticidade neuronal e *programming* (O'donnell *et al.*, 2013; Sasaki *et al.*, 2013; Sominsky *et al.*, 2013; Cottrell *et al.*, 2014). Se estes ajustes acontecem em virtude de estímulos recebidos em fases precoces do desenvolvimento, poderíamos considerar a possibilidade dessas alterações interferirem na resposta a estímulos recebidos em fases posteriores da vida. Sabe-se que a exposição crônica a um estressor pode reduzir a habilidade de adaptação e/ou aumentar a susceptibilidade a um estressor subsequente (Wallenius, 2004). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo indicam o oposto, ou seja, parece ter ocorrido uma adaptação e não um aumento na susceptibilidade. Uma possível explicação poderia ser que o estímulo de 22 kHz apesar de aversivo, quando aplicado cronicamente não funcionou como um estressor. Essa hipótese poderá ser testada em estudo futuro dosando-se os níveis sanguíneos de corticosterona. De qualquer forma, pode-se concluir que as consequências no SNC e no comportamento da exposição ao som de 22 kHz em indivíduos pré-expostos a esse estímulo em fases precoces do desenvolvimento são diferentes quando comparadas aos efeitos em indivíduos que não foram previamente expostos. Podem-se levantar algumas hipóteses para explicar o(s) mecanismo(s) responsável(is) pela alteração na rede neural e no comportamento da prole exposta ao estímulo de 22 kHz nas duas diferentes fases do desenvolvimento: (i) um efeito direto da primeira exposição na prole, supondo que os fetos poderiam “ouvir” ou “perceber” o som do ambiente, induzindo uma alteração na rede neural e

provocando uma resposta a esse mesmo som de forma diferente, comparado a indivíduos não previamente expostos, em fases posteriores da vida ou (ii) um efeito indireto da primeira exposição na prole, por meio de um efeito primário na neurobiologia da mãe, o que por sua vez, levaria a modificações na neurobiologia e comportamento da prole ou (iii) os dois mecanismos anteriores acontecendo simultaneamente. Nesse sentido, a resposta distinta em uma exposição posterior poderia acontecer porque a rede neural – durante experiências prévias diretas ou indiretas - se tornou diferente em termos do funcionamento de componentes que estão envolvidos nesse tipo de resposta.

Com relação à primeira hipótese, alguns autores afirmam que fetos de ovelhas e seres humanos são capazes de ouvir os sons do ambiente (Abrams *et al.*, 1998; Antonelli *et al.*, 2002), porém ratos podem ouvir sons apenas cerca de 14 dias após o nascimento (Geal-Dor *et al.*, 1993; Saliu, 2011). Por outro lado, evidências obtidas em diferentes espécies indicam que, dependendo da intensidade e frequência, o som emitido pode atravessar as barreiras teciduais da mãe, atingindo o feto (Barnett *et al.*, 1997).

Com relação à segunda hipótese colocada acima, “um efeito indireto do som no feto, através da mãe”, alguns dados da literatura a corroboram como apresentado a seguir. A exposição a estímulos sonoros aversivos podem levar ao estresse crônico por ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) da gestante, produzindo um aumento nos níveis de glicocorticoides na mãe e, esses passam para o feto (Fowden *et al.*, 2006; Weinstock, 2008). Sabe-se que a exposição a ruído branco eleva os níveis de corticosteroides e alteram o sistema serotoninérgico no hipocampo (Hu *et al.*, 2014), sugerindo que os mesmos estão envolvidos em processos de codificação de informações (Lanfumeey *et al.*, 2008). Portanto, também seria viável considerar que efeitos na mãe, da exposição crônica a sons de 22 kHz, podem alterar a neurobiologia e o comportamento da prole.

Apesar de alguns autores mostrarem que sons de 22 kHz induzem comportamento defensivo no rato (Beckett *et al.*, 1996), não encontramos efeito da exposição crônica a este som no comportamento de fuga das fêmeas ou da prole. O resultado do presente estudo com relação à presença de efeito sobre o comportamento de esquiva inibitória e ausência de efeito sobre a fuga, sugere que os mecanismos neurobiológicos relacionados aos estados de ansiedade e medo são distintos, ou pelo menos parcialmente distintos. De acordo com alguns autores, alterações no eixo HPA não alteram a resposta de fuga (Graeff, 2011), tendo influência apenas no comportamento de ansiedade. Alguns estudos sugerem que a condição materna, por si só,

pode reduzir o valor negativo de estímulos ameaçadores, sendo que a gestação e a lactação diminuem a resposta do eixo HPA ao estresse e aumentam a exploração em teste de campo aberto, sugerindo que a condição materna permite que as fêmeas apresentem melhores condições fisiológicas para assumir riscos para cuidar de seus filhotes (Agrati *et al.*, 2008).

Apesar de alguns autores mostrarem que inibidores da recaptação de serotonina diminuem o número de vocalizações ultrassônicas de 22 kHz (Sanchez *et al.*, 2003), não existem até o momento trabalhos onde foram avaliados os efeitos da exposição a esses sons sobre o sistema serotoninérgico. O sistema serotoninérgico tem um importante papel na modulação do estado de ansiedade (Zangrossi e Graeff, 2014). O presente estudo mostra que a exposição crônica (durante a gestação) a sons de 22 kHz: i) não modifica os níveis de 5-HT nas estruturas encefálicas avaliadas, nem das fêmeas nem da prole; ii) diminui as concentrações de 5-HIAA no hipocampo da prole e induz um aumento por efeito de interação com o som agudo e iii) diminui a taxa de renovação de serotonina no hipocampo e CPF das fêmeas e, aumenta a taxa no CPF da prole. Não sabemos explicar as causas desse efeito oposto da exposição crônica aos sons de 22 kHz sobre a atividade serotoninérgica no CPF da fêmea e da prole. De forma similar a exposição crônica, a exposição aguda (prole na fase adulta): i) não modifica os níveis de 5-HT nas estruturas encefálicas avaliadas; ii) diminui as concentrações de 5-HIAA no hipocampo e, além disto, (iii) aumenta a taxa de renovação de 5-HT da amígdala. Em resumo, esses achados sugerem que a exposição crônica a sons de 22 kHz induz a uma diminuição da atividade serotoninérgica no hipocampo (fêmea e prole) e no CPF (fêmea) e um aumento no CPF da prole. Por outro lado, a exposição aguda na idade adulta, aumenta a taxa de renovação na amígdala. Esses dados sugerem também o envolvimento de estruturas do sistema límbico como componentes neurobiológicos no processamento – aprendizado emocional - dessas informações.

Os resultados relativos à ausência de efeito dos estímulos sonoros, utilizados no presente estudo, sobre os níveis de 5-HT estão de acordo com outros autores, que utilizando ruído branco como estímulo aversivo aplicado durante o período gestacional, não observaram alteração na liberação de 5-HT no hipocampo da prole (Rex *et al.*, 2005). Dados obtidos em outro estudo mostraram que, com exceção de um aumento nos níveis de 5-HT no córtex frontal, também não existe efeito da exposição a ruído branco na concentração de 5-HT no córtex parieto-occipital, amígdala, estriado, tálamo, hipotálamo e medula oblonga (Midzyanovskaya *et al.*, 2006). Outros modelos experimentais como a indução de deficiência

de tiamina em ratos também mostram alterações na concentração de 5-HIAA, sem efeito na concentração de 5-HT (Vigil *et al.*, 2010), sugerindo que o metabólito da serotonina pode estar associado com componentes cognitivos, tais como memória espacial.

Existem evidências sobre a importância do hipocampo e do sistema serotoninérgico no processo de plasticidade observada após habituação ao ruído (Bickford-Wimer *et al.*, 1990). De acordo com estes autores, a recaptação de 5-HT é lenta e não ocorre imediatamente após a exposição ao som. Essas evidências sugerem que, após algum tempo, ocorra um ajuste neuroquímico, fazendo com que as concentrações de serotonina e de seu metabólito voltem ao estado basal. Experimentos utilizando sons similares aos de locais próximos a aeroportos e que avaliaram parâmetros serotoninérgicos centrais em ratos, mostraram alterações na concentração de 5-HT no hipocampo durante o período de exposição, com recuperação após 30 dias (Chengzhi *et al.*, 2011).

A amígdala é uma estrutura cerebral considerada componente chave do circuito de controle da emoção, em diferentes espécies (Ledoux, 2007). Tanto o estresse agudo quanto o estresse crônico modulam a reatividade da amígdala, alterando respostas cognitivas (atenção, formação de memória, consolidação e recuperação) e fisiológicas (neuroendócrinas e neuroquímicas) (Berretta, 2005; Van Marle *et al.*, 2009; Shin e Liberzon, 2010). A plasticidade na amígdala é observada depois da exposição aguda e da exposição crônica a estressores (Roosendaal, McCreynolds *et al.*, 2009; Nietzer *et al.*, 2011; Leuner e Shors, 2012; Mahan e Ressler, 2012; McEwen *et al.*, 2012). Em outras palavras, essas alterações parecem essenciais no processo adaptativo contra um ambiente hostil (Compan, 2007).

No presente estudo a exposição crônica intrauterina ao som de 22 kHz afetou a taxa de renovação de serotonina no hipocampo das fêmeas e da prole. Nas fêmeas, este efeito foi também observado no CPF. Para a prole, a exposição aguda aumentou a taxa de renovação de serotonina na amígdala. É importante enfatizar que não houve efeitos significativos nos parâmetros serotoninérgicos na SCP e tálamo. A exposição crônica e aguda a sons de 22 kHz afeta a resposta de esquiva inibitória, mas não a de fuga, envolvendo vias serotoninérgicas distintas que originam do núcleo da rafe e continua em áreas do prosencéfalo e mesencéfalo. Graeff e Zangrossi (2014) mostraram que a ativação de neurônios serotoninérgicos prosencefálicos (p. ex. amígdala) altera a tarefa de esquiva inibitória, enquanto na SCP a ativação de neurônios mesencefálicos altera a resposta na tarefa de fuga.

Os dados obtidos no presente estudo, utilizando o estímulo sonoro de 22 kHz, confirmam evidências de que experiências emocionais prévias codificadas na rede neural podem interferir na resposta a estímulos similares confrontados mais tarde pelo indivíduo. Além disto, acrescentam a noção de que no caso de um estímulo sonoro aversivo recebido durante fases iniciais do desenvolvimento (intraútero), esses promovem alterações que persistem e alteram a resposta a estímulo similar mesmo quando o indivíduo atinge a idade adulta.



Os resultados deste estudo estão de acordo com o pressuposto de que a ansiedade e o pânico são emoções qualitativamente diferentes, com mecanismos moduladores e estratégias defensivas diferentes, respectivamente: reação à ameaça potencial e reação à ameaça proximal. A exposição ao som de 22 kHz em fases iniciais do desenvolvimento promove alterações no sistema serotoninérgico central e alterações no comportamento emocional, que podem persistir em períodos posteriores da vida. Dessa forma, o presente trabalho mostra que a exposição de ratos Wistar a essa frequência sonora representa uma ferramenta útil para compreensão de um mecanismo defensivo específico. Ou seja, como a exposição ao som de 22 kHz afeta a esquiva inibitória, mas não o comportamento de fuga, sua utilização pode ser relevante para o esclarecimento de aspectos fisiológicos e moleculares da emoção. Pode também ser usado como ferramenta para o desenvolvimento de abordagens farmacológicas para tratamentos mais específicos da ansiedade.





## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

---

Muitas questões podem ser levantadas a partir dos dados obtidos no presente estudo. A exposição aguda e a exposição crônica a sons de 22 kHz promovem alterações no eixo HPA da mãe e do feto? Quais seriam os efeitos de uma exposição aguda a sons de 22 kHz durante a gestação sobre os parâmetros serotoninérgicos e comportamentais da mãe e da prole? Quais seriam os efeitos observados da exposição ao som de 22 kHz, se os parâmetros serotoninérgicos e comportamentais da fêmea fossem avaliados durante a gestação? Diferentes tipos de estímulos aversivos, como o ruído branco, teriam efeitos distintos sobre os comportamentos defensivos e serotoninérgicos? Outras categorias de estímulos aversivos teriam os mesmos efeitos dos encontrados no presente estudo para o som de 22 kHz? Estímulos não aversivos teriam efeitos distintos sobre os comportamentos defensivos e parâmetros serotoninérgicos?

Uma das hipóteses apresentadas nesse trabalho é a de que ratas em processo gestacional teriam uma susceptibilidade diferente ao estresse crônico quando comparadas a ratas não grávidas. Não verificamos efeito da gestação sobre os estados de ansiedade e medo. Porém, verificou-se que na amígdala e no hipocampo, ocorre uma interação de efeitos entre a exposição ao som e a gestação sobre a concentração de serotonina, mostrando que as mudanças neuroendócrinas do processo gestacional afetam a susceptibilidade à exposição ao som, pelo menos em relação aos efeitos sobre parâmetros serotoninérgicos em determinadas regiões do SNC. Além disso, nossos dados indicam que em ratas que passaram pelo processo gestacional a serotonina poderia ter um papel no comportamento emocional regulado pela SCP que não existe nas ratas não gestantes.

Como o período pré-natal é considerado um período crítico do desenvolvimento, outra questão levantada foi se a exposição a sons de 22 kHz durante todo o período gestacional afetaria o comportamento emocional e a neurobiologia da prole, em um estágio posterior do desenvolvimento. Nossos dados mostram que a exposição ao som na fase pré-natal a princípio não altera o comportamento emocional avaliado, uma vez que não houve efeito da exposição durante a fase intrauterina ou da exposição na idade adulta. Com relação a efeitos na neurobiologia da prole, verificamos que houve mudanças significativas nos parâmetros serotoninérgicos centrais no CPF, hipocampo e amígdala.

Levantamos também a hipótese de que uma segunda exposição aguda ao som de 22 kHz, desta vez quando o animal atinge a idade adulta (2 meses de idade) teria efeitos distintos entre os animais cuja primeira exposição ocorreu na fase intrauterina comparado àqueles que não foram expostos. Esta hipótese foi confirmada pela observação da interação entre os efeitos da exposição crônica durante a fase intrauterina e da exposição aguda na idade adulta, no estado de ansiedade. Esse dado mostra, juntamente com a observação da interação de efeitos observada sobre os níveis de 5-HIAA do hipocampo e da amígdala, que experiências iniciais podem ser gravadas e mantidas na rede neuronal e modificar a reação do indivíduo a uma segunda exposição, em fases posteriores da vida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABOU-SALEH, M. T. et al. The role of pterins and related factors in the biology of early postpartum depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 9, n. 4, p. 295-300, Jun 1999.

ABRAMS, R.; GERHARDT, K.; ANTONELLI, P. Fetal hearing. **Dev Psychobiol**, v. 33, n. 1, p. 1-3, Jul 1998.

ADOLPHS, R. What does the amygdala contribute to social cognition? **Ann N Y Acad Sci**, v. 1191, p. 42-61, Mar 2010.

AGRATI, D. et al. Maternal condition reduces fear behaviors but not the endocrine response to an emotional threat in virgin female rats. **Horm Behav**, v. 53, n. 1, p. 232-40, Jan 2008.

ALDER, J. et al. Depression and anxiety during pregnancy: a risk factor for obstetric, fetal and neonatal outcome? A critical review of the literature. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 20, n. 3, p. 189-209, Mar 2007.

AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Prog Brain Res**, v. 163, p. 3-22, 2007.

AMEMIYA, S. et al. Differential effects of background noise of various intensities on neuronal activation associated with arousal and stress response in a maze task. **Physiol Behav**, v. 99, n. 4, p. 521-8, Mar 30 2010.

ANDERSON, J. W. The production of ultrasonic sounds by laboratory rats and other mammals. **Science**, v. 119, n. 3101, p. 808-9, Jun 4 1954.

ANISMAN, H.; ZACHARKO, R. M. Depression as a consequence of inadequate neurochemical adaptation in response to stressors. **Br J Psychiatry Suppl**, n. 15, p. 36-43, Feb 1992.

ANSORGE, M. S.; MORELLI, E.; GINGRICH, J. A. Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. **J Neurosci**, v. 28, n. 1, p. 199-207, Jan 2 2008.

ANSORGE, M. S. et al. Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. **Science**, v. 306, n. 5697, p. 879-81, Oct 29 2004.

ANTONELLI, P. J. et al. Fetal central auditory system metabolic response to cochlear implant stimulation. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 127, n. 3, p. 131-7, Sep 2002.

ANTZOULATOS, E. G.; MILLER, E. K. Differences between neural activity in prefrontal cortex and striatum during learning of novel abstract categories. **Neuron**, v. 71, n. 2, p. 243-9, Jul 28 2011.

- BARDIN, L. et al. Comparison of milnacipran, duloxetine and pregabalin in the formalin pain test and in a model of stress-induced ultrasonic vocalizations in rats. **Neurosci Res**, v. 66, n. 2, p. 135-40, Feb 2010.
- BARNETT, S. B. et al. The sensitivity of biological tissue to ultrasound. **Ultrasound Med Biol**, v. 23, n. 6, p. 805-12, 1997.
- BECKETT, S. R. et al. Pharmacological manipulation of ultrasound induced defence behaviour in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 127, n. 4, p. 384-90, Oct 1996.
- BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol**, v. 46, n. 6, p. 575-605, Aug 1995.
- BEITZ, A. J. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. **J Comp Neurol**, v. 237, n. 4, p. 445-59, Jul 22 1985.
- BERRETTA, S. Cortico-amygdala circuits: role in the conditioned stress response. **Stress**, v. 8, n. 4, p. 221-32, Dec 2005.
- BHATNAGAR, S. et al. Lesions of the posterior paraventricular thalamus block habituation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to repeated restraint. **J Neuroendocrinol**, v. 14, n. 5, p. 403-10, May 2002.
- BICKFORD-WIMER, P. C. et al. Auditory sensory gating in hippocampal neurons: a model system in the rat. **Biol Psychiatry**, v. 27, n. 2, p. 183-92, Jan 15 1990.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol**, v. 39, p. 43-68, 1988.
- BLANCHARD, R. J. et al. Sex differences in the incidence and sonographic characteristics of antipredator ultrasonic cries in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). **J Comp Psychol**, v. 106, n. 3, p. 270-7, Sep 1992.
- \_\_\_\_\_. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. **Physiol Behav**, v. 50, n. 5, p. 967-72, Nov 1991.
- BONNIN, A. et al. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. **Nature**, v. 472, n. 7343, p. 347-50, Apr 21 2011.
- BONNIN, A.; LEVITT, P. Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. **Neuroscience**, v. 197, p. 1-7, Dec 1 2011.
- BOWMAN, R. E. Stress-induced changes in spatial memory are sexually differentiated and vary across the lifespan. **J Neuroendocrinol**, v. 17, n. 8, p. 526-35, Aug 2005.
- BRUDZYNSKI, S. M. et al. Analysis of 22 kHz ultrasonic vocalization in laboratory rats: long and short calls. **Physiol Behav**, v. 54, n. 2, p. 215-21, Aug 1993.

BRUDZYNSKI, S. M.; CHIU, E. M. Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. **Physiol Behav**, v. 57, n. 6, p. 1039-44, Jun 1995.

BRUDZYNSKI, S. M.; IKU, A.; HARNESS NEE SAVOY, A. Activity of cholinergic neurons in the laterodorsal tegmental nucleus during emission of 22 kHz vocalization in rats. **Behav Brain Res**, v. 225, n. 1, p. 276-83, Nov 20 2011.

BRUDZYNSKI, S. M.; OCIEPA, D. Ultrasonic vocalization of laboratory rats in response to handling and touch. **Physiol Behav**, v. 52, n. 4, p. 655-60, Oct 1992.

BRUMMELTE, S.; GALEA, L. A. Depression during pregnancy and postpartum: contribution of stress and ovarian hormones. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 766-76, Jun 30 2010.

BUHOT, M. C.; MARTIN, S.; SEGU, L. Role of serotonin in memory impairment. **Ann Med**, v. 32, n. 3, p. 210-21, Apr 2000.

BURGDORF, J.; KNUTSON, B.; PANKSEPP, J. Anticipation of rewarding electrical brain stimulation evokes ultrasonic vocalization in rats. **Behav Neurosci**, v. 114, n. 2, p. 320-7, Apr 2000.

BURGDORF, J. et al. Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. **Behav Neurosci**, v. 115, n. 4, p. 940-4, Aug 2001.

BUSH, G.; LUU, P.; POSNER, M. I. Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. **Trends Cogn Sci**, v. 4, n. 6, p. 215-222, Jun 2000.

CAMACHO, R. S. et al. Transtornos psiquiátricos na gestação e no puerpério: classificação, diagnóstico e tratamento. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, n. 2, p. 92-102, 2006.

CAMPBELL, J. M. Ambient Stressors. **Environment and Behaviour**, v. 15, n. 3, p. 355-380, 1983.

CAMPEAU, S. et al. c-fos mRNA induction in acute and chronic audiogenic stress: possible role of the orbitofrontal cortex in habituation. **Stress**, v. 5, n. 2, p. 121-30, Jun 2002.

CHAMSCPNE, F. A. Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. **Front Neuroendocrinol**, v. 29, n. 3, p. 386-97, Jun 2008.

CHENGZHI, C. et al. Recovery of chronic noise exposure induced spatial learning and memory deficits in young male Sprague-Dawley rats. **J Occup Health**, v. 53, n. 3, p. 157-63, 2011.

CHIKAHISA, S. et al. Anxiolytic effect of music depends on ovarian steroid in female mice. **Behav Brain Res**, v. 179, n. 1, p. 50-9, Apr 16 2007.

COMPAN, V. Do Limits of Neuronal Plasticity Represent an Opportunity for Mental Diseases, Such as Addiction to Food and Illegal Drugs? Use and Utilities of Serotonin Receptor Knock-Out Mice. 2007.

COOK, S. C.; WELLMAN, C. L. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. **J Neurobiol**, v. 60, n. 2, p. 236-48, Aug 2004.

COOLS, R.; ROBERTS, A. C.; ROBBINS, T. W. Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. **Trends Cogn Sci**, v. 12, n. 1, p. 31-40, Jan 2008.

COOPER, S. J. Cholecystokinin modulation of serotonergic control of feeding behavior. **Ann N Y Acad Sci**, v. 780, p. 213-22, Mar 22 1996.

COTTRELL, E. C. et al. Foetal and placental 11beta-HSD2: a hub for developmental programming. **Acta Physiol (Oxf)**, Oct 28 2014.

CRANE, J. W.; EBNER, K.; DAY, T. A. Medial prefrontal cortex suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to a physical stressor, systemic delivery of interleukin-1beta. **Eur J Neurosci**, v. 17, n. 7, p. 1473-81, Apr 2003.

CUI, B.; WU, M.; SHE, X. Effects of chronic noise exposure on spatial learning and memory of rats in relation to neurotransmitters and NMDAR2B alteration in the hippocampus. **J Occup Health**, v. 51, n. 2, p. 152-8, 2009.

DAGNINO-SUBIABRE, A. Effects of chronic stress on the auditory system and fear learning: an evolutionary approach. **Rev Neurosci**, v. 24, n. 2, p. 227-37, 2013.

DALLEY, J. W.; EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Impulsivity, compulsivity, and top-down cognitive control. **Neuron**, v. 69, n. 4, p. 680-94, Feb 24 2011.

DARNAUDERY, M. et al. Stress during gestation induces lasting effects on emotional reactivity of the dam rat. **Behav Brain Res**, v. 153, n. 1, p. 211-6, Aug 12 2004.

DAY, H. E.; MASINI, C. V.; CAMPEAU, S. Reversible inactivation of the auditory thalamus disrupts HPA axis habituation to repeated loud noise stress exposures. **Brain Res**, v. 1276, p. 123-30, Jun 18 2009.

DE PAULA, D. C. et al. 5-HT(2A) receptor activation in the dorsolateral septum facilitates inhibitory avoidance in the elevated T-maze. **Behav Brain Res**, v. 226, n. 1, p. 50-5, Jan 1 2011.

DEAN, C. Endocannabinoid modulation of sympathetic and cardiovascular responses to acute stress in the periaqueductal gray of the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 3, p. R771-9, Mar 2011.

DECETY, J. The neurodevelopment of empathy in humans. **Dev Neurosci**, v. 32, n. 4, p. 257-67, 2010.

DEVILBISS, D. M. et al. Corticotropin-Releasing Factor Acting at the Locus Coeruleus Disrupts Thalamic and Cortical Sensory-Evoked Responses. **Neuropsychopharmacology**, Apr 18 2012.

DICKERSON, B. C.; EICHENBAUM, H. The episodic memory system: neurocircuitry and disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 86-104, Jan 2010.

DIORIO, D.; VIAU, V.; MEANEY, M. J. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **J Neurosci**, v. 13, n. 9, p. 3839-47, Sep 1993.

EICHENBAUM, H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 109-20, Sep 30 2004.

ENDRES, T.; WIDMANN, K.; FENDT, M. Are rats predisposed to learn 22 kHz calls as danger-predicting signals? **Behav Brain Res**, v. 185, n. 2, p. 69-75, Dec 28 2007.

ERICSSON, M.; POSTON, W. S., 2ND; FOREYT, J. P. Common biological pathways in eating disorders and obesity. **Addict Behav**, v. 21, n. 6, p. 733-43, Nov-Dec 1996

ESCRIBANO, B. et al. **Role of noise and music as anxiety modulators: Relationship with ovarian hormones in the rat.** Applied Animal Behaviour Science. in press 2013.

FALCONER, J. et al. Secretion of beta-endorphin into the maternal circulation by uteroplacental tissues in response to hypoglycaemic stress. **J Endocrinol**, v. 118, n. 2, p. R5-8, Aug 1988.

FAY, R. R. Comparative psychoacoustics. **Hear Res**, v. 34, n. 3, p. 295-305, Aug 1988.

FETTIPLACE, R. Active hair bundle movements in auditory hair cells. **J Physiol**, v. 576, n. Pt 1, p. 29-36, Oct 1 2006.

FILE, S. E. Chronic exposure to noise modifies the anxiogenic response, but not the hypoactivity, detected on withdrawal from chronic ethanol treatment. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 116, n. 3, p. 369-72, Nov 1994.

FOWDEN, A. L.; GIUSSANI, D. A.; FORHEAD, A. J. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 29-37, Feb 2006.

FREEDMAN, D. J. et al. Categorical representation of visual stimuli in the primate prefrontal cortex. **Science**, v. 291, n. 5502, p. 312-6, Jan 12 2001.

FRYSZTAK, R. J.; NEAFSEY, E. J. The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, "freezing," and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. **Cereb Cortex**, v. 1, n. 5, p. 418-25, Sep-Oct 1991.

FUSTER, J. M. The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. **Neuron**, v. 30, n. 2, p. 319-33, May 2001.

GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 12, p. 1002-12, Dec 2003.



- GEAL-DOR, M. et al. Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. **Hear Res**, v. 69, n. 1-2, p. 236-42, Sep 1993.
- GLASER, J. et al. Rat brain monoamine and Serotonin S2 receptor changes during pregnancy. **Neurochem Res**, v. 15, n. 10, p. 949-56, Oct 1990.
- GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 80, n. 2, p. 84-97, Apr 2007.
- GRAEFF, F. G. Defense-related emotions in humans. **Psychology and Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 183-189, 2011.
- GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI, H., JR. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 2, p. 237-46, 1998.
- GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, n. 1, p. 67-70, 1993.
- GRISSOM, N.; BHATNAGAR, S. Habituation to repeated stress: get used to it. **Neurobiol Learn Mem**, v. 92, n. 2, p. 215-24, Sep 2009.
- GROSS, C. et al. Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. **Nature**, v. 416, n. 6879, p. 396-400, Mar 28 2002.
- GRUBER, A. J. et al. More is less: a disinhibited prefrontal cortex impairs cognitive flexibility. **J Neurosci**, v. 30, n. 50, p. 17102-10, Dec 15 2011.
- GUILLEMIN, R. et al. beta-Endorphin and adrenocorticotropin are selected concomitantly by the pituitary gland. **Science**, v. 197, n. 4311, p. 1367-9, Sep 30 1977.
- HAJOS, M. et al. An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. **Neuroscience**, v. 87, n. 1, p. 95-108, Nov 1998.
- HALE, M. W.; SHEKHAR, A.; LOWRY, C. A. Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. **Cell Mol Neurobiol**, v. 32, n. 5, p. 695-708, Jul 2012.
- HEFFNER, R.; HEFFNER, H. Explaining high-frequency hearing. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 293, n. 12, p. 2080-2, Dec 2010.
- HEIM, C. et al. Neurobiological and psychiatric consequences of child abuse and neglect. **Dev Psychobiol**, v. 52, n. 7, p. 671-90, Nov 2010.
- HEINRICHS, M.; NEUMANN, I.; EHLERT, U. Lactation and stress: protective effects of breast-feeding in humans. **Stress**, v. 5, n. 3, p. 195-203, Sep 2002.

- HERMAN, J. P. et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. **Front Neuroendocrinol**, v. 24, n. 3, p. 151-80, Jul 2003.
- HERRERO, M. T.; BARCIA, C.; NAVARRO, J. M. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. **Childs Nerv Syst**, v. 18, n. 8, p. 386-404, Aug 2002.
- HIRANO, Y. et al. Effect of unpleasant loud noise on hippocampal activities during picture encoding: an fMRI study. **Brain Cogn**, v. 61, n. 3, p. 280-5, Aug 2006.
- HOFER, M. A.; SHAIR, H. N.; BRUNELLI, S. A. Ultrasonic vocalizations in rat and mouse pups. **Curr Protoc Neurosci**, v. Chapter 8, p. Unit 8 14, Feb 2002.
- HU, L. et al. A new stress model, a scream sound, alters learning and monoamine levels in rat brain. **Physiol Behav**, v. 123, p. 105-13, Jan 17 2014.
- HUANG, Y. et al. Pre-gestational stress reduces the ratio of 5-HIAA to 5-HT and the expression of 5-HT1A receptor and serotonin transporter in the brain of foetal rat. **BMC Neurosci**, v. 13, p. 22, 2012.
- ILLING, R. B. et al. Transcription factor modulation and expression in the rat auditory brainstem following electrical intracochlear stimulation. **Exp Neurol**, v. 175, n. 1, p. 226-44, May 2002.
- JACOBS, B. L.; AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiol Rev**, v. 72, n. 1, p. 165-229, Jan 1992.
- JELLEN, P.; SOLTYSIK, S.; ZAGRODZKA, J. 22-kHz ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: behavioral and pharmacological modulation of affective state. **Behav Brain Res**, v. 141, n. 1, p. 63-72, Apr 17 2003.
- JOB, R. F. S.; HATFIELD, J. COMMUNITY REACTION TO NOISE. **Acoustic Australia**, v. 26, p. 2-35, 1998.
- JULIUS, D. Serotonin receptor knockouts: a moody subject. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 26, p. 15153-4, Dec 22 1998.
- KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 669-78, Dec 2001.
- KIM, C. H. et al. Exposure to music and noise during pregnancy influences neurogenesis and thickness in motor and somatosensory cortex of rat pups. **Int Neurobiol J**, v. 17, n. 3, p. 107-13, Sep 2013.
- KIM, E. J. et al. Social transmission of fear in rats: the role of 22-kHz ultrasonic distress vocalization. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15077, 2010.
- KNAPSKA, E. et al. Between-subject transfer of emotional information evokes specific pattern of amygdala activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 10, p. 3858-62, Mar 7 2006.

KNUTSON, B.; BURGDORF, J.; PANKSEPP, J. Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. **J Comp Psychol**, v. 112, n. 1, p. 65-73, Mar 1998.

\_\_\_\_\_. High-frequency ultrasonic vocalizations index conditioned pharmacological reward in rats. **Physiol Behav**, v. 66, n. 4, p. 639-43, Jun 1999.

\_\_\_\_\_. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. **Psychol Bull**, v. 128, n. 6, p. 961-77, Nov 2002.

KRAUS, K. S. et al. Noise trauma impairs neurogenesis in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 167, n. 4, p. 1216-26, Jun 2 2010.

KUJALA, T.; BRATTICO, E. Detrimental noise effects on brain's speech functions. **Biol Psychol**, v. 81, n. 3, p. 135-43, Jul 2009.

LANFUMEY, L. et al. Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, n. 6, p. 1174-84, Aug 2008.

LAWSON, L. R. The Senses. In: (Ed.). **Anatomy and Physiology of Animals**, 2011.

LEDOUX, J. The amygdala. **Curr Biol**, v. 17, n. 20, p. R868-74, Oct 23 2007.

LESAGE, J. et al. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. **J Endocrinol**, v. 181, n. 2, p. 291-6, May 2004.

LEUNER, B.; SHORS, T. J. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? **Neuroscience**, v. 251, p. 108-19, Oct 22 2012.

LIGHTMAN, S. L. et al. Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Prog Brain Res**, v. 133, p. 111-29, 2001.

LITVIN, Y.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. **Behav Brain Res**, v. 182, n. 2, p. 166-72, Sep 4 2007.

LIU, X. et al. Intermediate levels of hippocampal activity appear optimal for associative memory formation. **PLoS One**, v. 5, n. 10, 2010.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, v. 156, p. 38-50; discussion 50-5, 1991.

\_\_\_\_\_. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. **Arch Dis Child**, v. 71, n. 4, p. 288-90, Oct 1994.

LUDWIG, V.; SCHWARTING, R. K. Neurochemical and behavioral consequences of striatal injection of 5,7-dihydroxytryptamine. **J Neurosci Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 108-18, May 15 2007.

LYNCH, M. A. Long-term potentiation and memory. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 87-136, Jan 2004.

MACBETH, A. H.; LUINE, V. N. Changes in anxiety and cognition due to reproductive experience: a review of data from rodent and human mothers. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 34, n. 3, p. 452-67, Mar 2010.

MAGGIO, N.; SEGAL, M. Cellular basis of a rapid effect of mineralocorticosteroid receptors activation on LTP in ventral hippocampal slices. **Hippocampus**, v. 22, n. 2, p. 267-75, Feb 2010.

MAHAN, A. L.; RESSLER, K. J. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. **Trends Neurosci**, v. 35, n. 1, p. 24-35, Jan 2012.

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 829-41, 2005.

MANIKANDAN, S. et al. Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration and free radical-imbalance in hippocampus and medial prefrontal cortex. **Neurosci Lett**, v. 399, n. 1-2, p. 17-22, May 15 2006.

MARCUS, S. M.; HERINGHAUSEN, J. E. Depression in childbearing women: when depression complicates pregnancy. **Prim Care**, v. 36, n. 1, p. 151-65, ix, Mar 2009.

MASINI, C. V. et al. Auditory cortex lesions do not disrupt habituation of HPA axis responses to repeated noise stress. **Brain Res**, v. 1443, p. 18-26, Mar 14 2012.

MATSUMOTO, M.; YOSHIOKA, M.; TOGASHI, H. Early postnatal stress and neural circuit underlying emotional regulation. **Int Rev Neurobiol**, v. 85, p. 95-107, 2009.

MCEWEN, B. S. et al. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 3-12, Jan 2012.

MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Horm Behav**, v. 43, n. 1, p. 2-15, Jan 2003.

MCFARLAND, J. et al. Major depressive disorder during pregnancy and emotional attachment to the fetus. **Arch Womens Ment Health**, v. 14, n. 5, p. 425-34, Oct 2011.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 3, p. 285-305, May 2004.

MCNAUGHTON, N.; GRAY, J. A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **J Affect Disord**, v. 61, n. 3, p. 161-76, Dec 2000.

MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 1161-92, 2001.

MENARD, J. L.; HAKVOORT, R. M. Variations of maternal care alter offspring levels of behavioural defensiveness in adulthood: evidence for a threshold model. **Behav Brain Res**, v. 176, n. 2, p. 302-13, Jan 25 2007.

MERALI, Z. et al. Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. **J Neurosci**, v. 18, n. 12, p. 4758-66, Jun 15 1998.

MIDZYANOVSKAYA, I. S. et al. The brain 5HTergic response to an acute sound stress in rats with generalized (absence and audiogenic) epilepsy. **Brain Res Bull**, v. 69, n. 6, p. 631-8, May 31 2006.

MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An integrative theory of prefrontal cortex function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 167-202, 2001.

MOHEDANO-MORIANO, A. et al. Convergence of unimodal and polymodal sensory input to the entorhinal cortex in the fascicularis monkey. **Neuroscience**, v. 151, n. 1, p. 255-71, Jan 2 2008.

\_\_\_\_\_. Topographical and laminar distribution of cortical input to the monkey entorhinal cortex. **J Anat**, v. 211, n. 2, p. 250-60, Aug 2007.

MOROZOVA, A. Y. et al. Effect of ultrasonic irradiation on the development of symptoms of depression and anxiety in rats. **Bull Exp Biol Med**, v. 154, n. 6, p. 740-3, Apr 2013.

MOSIENKO, V. et al. Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. e122, 2012.

MUNOZ-LOPEZ, M. M.; MOHEDANO-MORIANO, A.; INSAUSTI, R. Anatomical pathways for auditory memory in primates. **Front Neuroanat**, v. 4, p. 129, 2010.

NAQVI, F. et al. Sub-chronic exposure to noise affects locomotor activity and produces anxiogenic and depressive like behavior in rats. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 1, p. 64-9, Jan 2012.

NEUMANN, I. D. et al. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adeno-hypophysial changes. **J Physiol**, v. 508 (Pt 1), p. 289-300, Apr 1 1998.

NIETZER, S. L. et al. Serotonin transporter knockout and repeated social defeat stress: impact on neuronal morphology and plasticity in limbic brain areas. **Behav Brain Res**, v. 220, n. 1, p. 42-54, Jun 20 2011.

NISHIO, H. et al. Prenatal stress and postnatal development of neonatal rats--sex-dependent effects on emotional behavior and learning ability of neonatal rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 19, n. 1, p. 37-45, Feb 2001.

NISHIO, H.; TOKUMO, K.; HIRAI, T. Effects of perinatal stress on the anxiety-related behavior of the adolescence mouse. **Int J Dev Neurosci**, v. 24, n. 4, p. 263-8, Jun 2006.

- NOBRE, M. J.; BRANDAO, M. L. Analysis of freezing behavior and ultrasonic vocalization in response to foot-shocks, ultrasound signals and GABAergic inhibition in the inferior colliculus: effects of muscimol and midazolam. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 14, n. 1, p. 45-52, Jan 2004.
- O'DONNELL, K. J. et al. Prenatal maternal mood is associated with altered diurnal cortisol in adolescence. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 9, p. 1630-8, Sep 2013.
- O'KEEFE, J. et al. Place cells, navigational accuracy, and the human hippocampus. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 353, n. 1373, p. 1333-40, Aug 29 1998.
- OBERLANDER, T. F.; GINGRICH, J. A.; ANSORGE, M. S. Sustained neurobehavioral effects of exposure to SSRI antidepressants during development: molecular to clinical evidence. **Clin Pharmacol Ther**, v. 86, n. 6, p. 672-7, Dec 2009.
- PANKSEPP, J.; BURGDORF, J. 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. **Behav Brain Res**, v. 115, n. 1, p. 25-38, Oct 2000.
- PARSANA, A. J.; LI, N.; BROWN, T. H. Positive and negative ultrasonic social signals elicit opposing firing patterns in rat amygdala. **Behav Brain Res**, v. 226, n. 1, p. 77-86, Jan 1 2012.
- PARSANA, A. J.; MORAN, E. E.; BROWN, T. H. Rats learn to freeze to 22-kHz ultrasonic vocalizations through autoconditioning. **Behav Brain Res**, v. 232, n. 2, p. 395-9, Jul 1 2012.
- PASUPATHY, A.; MILLER, E. K. Different time courses of learning-related activity in the prefrontal cortex and striatum. **Nature**, v. 433, n. 7028, p. 873-6, Feb 24 2005.
- PAXINOS, G. et al. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. **J Neurosci Methods**, v. 13, n. 2, p. 139-43, Apr 1985.
- PAWLUSKI, J. L. et al. Reproductive experience alters corticosterone and CBG levels in the rat dam. **Physiol Behav**, v. 96, n. 1, p. 108-14, Jan 8 2009.
- PHELPS, E. A.; LEDOUX, J. E. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. **Neuron**, v. 48, n. 2, p. 175-87, Oct 20 2005.
- PING, J. et al. Auditory evoked responses in the rat: transverse mastoid needle electrodes register before cochlear nucleus and do not reflect later inferior colliculus activity. **J Neurosci Methods**, v. 161, n. 1, p. 11-6, Mar 30 2007.
- PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 18, n. 3, p. 195-200, May 1993.
- PORTAVELLA, M.; DEPAULIS, A.; VERGNES, M. 22-28 kHz ultrasonic vocalizations associated with defensive reactions in male rats do not result from fear or aversion. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 111, n. 2, p. 190-4, 1993.

PRUS, A. J.; HILLHOUSE, T. M.; LACROSSE, A. L. Acute, but not repeated, administration of the neurotensin NTS1 receptor agonist PD149163 decreases conditioned footshock-induced ultrasonic vocalizations in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 49, p. 78-84, Mar 3 2014.

PRYCE, C. R. et al. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 649-74, 2005.

RABAT, A. et al. Chronic exposure of rats to noise: relationship between long-term memory deficits and slow wave sleep disturbances. **Behav Brain Res**, v. 171, n. 2, p. 303-12, Aug 10 2006.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends Pharmacol Sci**, v. 29, n. 10, p. 493-8, Oct 2008.

RASIA-FILHO, A. A.; LONDERO, R. G.; ACHAVAL, M. Functional activities of the amygdala: an overview. **J Psychiatry Neurosci**, v. 25, n. 1, p. 14-23, Jan 2000.

RAUCH, S. L. et al. Selectively reduced regional cortical volumes in post-traumatic stress disorder. **Neuroreport**, v. 14, n. 7, p. 913-6, May 23 2003.

REISCH, A.; ILLING, R. B.; LASZIG, R. Immediate early gene expression invoked by electrical intracochlear stimulation in some but not all types of neurons in the rat auditory brainstem. **Exp Neurol**, v. 208, n. 2, p. 193-206, Dec 2007.

REX, A.; VOIGT, J. P.; FINK, H. Anxiety but not arousal increases 5-hydroxytryptamine release in the rat ventral hippocampus in vivo. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 5, p. 1185-9, Sep 2005.

RHUDY, J. L.; MEAGHER, M. W. Noise stress and human pain thresholds: divergent effects in men and women. **J Pain**, v. 2, n. 1, p. 57-64, Feb 2001.

ROBLES, L.; RUGGERO, M. A. Mechanics of the mammalian cochlea. **Physiol Rev**, v. 81, n. 3, p. 1305-52, Jul 2001.

ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 423-33, Jun 2009.

ROOZENDAAL, B. et al. Glucocorticoid effects on memory consolidation depend on functional interactions between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. **J Neurosci**, v. 29, n. 45, p. 14299-308, Nov 11 2009.

RYGULA, R. et al. Differential contributions of the primate ventrolateral prefrontal and orbitofrontal cortex to serial reversal learning. **J Neurosci**, v. 30, n. 43, p. 14552-9, Oct 27 2010.

RYUGO, D. K.; KILLACKY, H. P. Differential telencephalic projections of the medial and ventral divisions of the medial geniculate body of the rat. **Brain Res**, v. 82, n. 1, p. 173-7, Dec 20 1974.

SADANANDA, M.; WOHR, M.; SCHWARTING, R. K. Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. **Neurosci Lett**, v. 435, n. 1, p. 17-23, Apr 11 2008.

SALIU, A. **The development of Hearing in Rats: Reliability of wave 1 as a determinant of auditory maturation and contributions of peripheral structure progression**. 2011. 33 (MASTERS). CITY COLLEGE OF NEW YORK, NEW YORK.

SAMSON, J. et al. Stress response in rat brain after different durations of noise exposure. **Neurosci Res**, v. 57, n. 1, p. 143-7, Jan 2007.

SANCHEZ, C. Effect of serotonergic drugs on footshock-induced ultrasonic vocalization in adult male rats. **Behav Pharmacol**, v. 4, n. 3, p. 269-277, Jun 1993. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11224195](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11224195)>.

SANCHEZ, C.; GRUCA, P.; PAPP, M. R-citalopram counteracts the antidepressant-like effect of escitalopram in a rat chronic mild stress model. **Behav Pharmacol**, v. 14, n. 5-6, p. 465-70, Sep 2003.

SANDER, K.; BRECHMANN, A.; SCHEICH, H. Audition of laughing and crying leads to right amygdala activation in a low-noise fMRI setting. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 11, n. 2, p. 81-91, May 2003.

SANDMAN, C. A.; KASTIN, A. J. The influence of fragments of the LPH chains on learning, memory and attention in animals and man. **Pharmacol Ther**, v. 13, n. 1, p. 39-60, 1981. SAPOLSKY, R. M. Why stress is bad for your brain. **Science**, v. 273, n. 5276, p. 749-50, Aug 9 1996.

SHANNON, N. J.; GUNNET, J. W.; MOORE, K. E. A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. **J Neurochem**, v. 47, n. 3, p. 958-65, Sep 1986.

SASAKI, A. et al. Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. **Neuroscience**, v. 240, p. 1-12, Jun 14 2013.

SCHLOTZ, W.; PHILLIPS, D. I. Fetal origins of mental health: evidence and mechanisms. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 7, p. 905-16, Oct 2009.

SCHWARTING, R. K.; WOHR, M. On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 4, p. 337-48, Apr 2012.

SEFFER, D.; SCHWARTING, R. K.; WOHR, M. Pro-social ultrasonic communication in rats: insights from playback studies. **J Neurosci Methods**, v. 234, p. 73-81, Aug 30 2014.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 10, n. 2, p. 230-1, Spring 1998.

SHERMAN, S. M. The thalamus is more than just a relay. **Curr Opin Neurobiol**, v. 17, n. 4, p. 417-22, Aug 2007.



SHIN, L. M.; LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 169-91, Jan 2010.

SIBOLBORO MEZZACAPPA, E.; TU, A. Y.; MYERS, M. M. Lactation and weaning effects on physiological and behavioral response to stressors. **Physiol Behav**, v. 78, n. 1, p. 1-9, Jan 2003.

SKUSE, D. Genetic influences on the neural basis of social cognition. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 361, n. 1476, p. 2129-41, Dec 29 2006.

SOMINSKY, L. et al. Functional programming of the autonomic nervous system by early life immune exposure: implications for anxiety. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e57700, 2013.

SQUIRE, L. R.; SCHMOLCK, H.; STARK, S. M. Impaired auditory recognition memory in amnesic patients with medial temporal lobe lesions. **Learn Mem**, v. 8, n. 5, p. 252-6, Sep-Oct 2001.

SUN, T. et al. Anxiolytic-like property of risperidone and olanzapine as examined in multiple measures of fear in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 95, n. 3, p. 298-307, May 2010.

TAKAHASHI, N.; KASHINO, M.; HIRONAKA, N. Structure of rat ultrasonic vocalizations and its relevance to behavior. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e14115, 2010.

TAMURA, R. et al. Recognition of egocentric and allocentric visual and auditory space by neurons in the hippocampus of monkeys. **Neurosci Lett**, v. 109, n. 3, p. 293-8, Feb 16 1990.

THASE, M. E. Treatment issues related to sleep and depression. **J Clin Psychiatry**, v. 61 Suppl 11, p. 46-50, 2000.

THOMAS, D. A.; TAKAHASHI, L. K.; BARFIELD, R. J. Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by intruders during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). **J Comp Psychol**, v. 97, n. 3, p. 201-6, Sep 1983.

TOMAZINI, F. M. et al. Opposite effects of short- and long-duration isolation on ultrasonic vocalization, startle and prepulse inhibition in rats. **J Neurosci Methods**, v. 153, n. 1, p. 114-20, May 15 2006.

TORNER, L. et al. Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. **Eur J Neurosci**, v. 15, n. 8, p. 1381-9, Apr 2002.

TSOORY, M. M.; YODIM, M. B.; SCHUSTER, R. Social-cooperation differs from individual behavior in hypothalamic and striatal monoamine function: Evidence from a laboratory rat model. **Behav Brain Res**, v. 232, n. 1, p. 252-63, Jun 15 2012. Disponível em:

TURLEJSKI, K. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 56, n. 2, p. 619-36, 1996.

- URAN, S. L.; CACERES, L. G.; GUELMAN, L. R. Effects of loud noise on hippocampal and cerebellar-related behaviors. Role of oxidative state. **Brain Res**, v. 1361, p. 102-14, Nov 18 2010.
- UYGUR, E. E.; ARSLAN, M. Effects of chronic stress on cognitive functions and anxiety related behaviors in rats. **Acta Physiol Hung**, v. 97, n. 3, p. 297-306, Sep 2011.
- VAN DEN HOVE, D. L. et al. Prenatal stress in the rat alters 5-HT1A receptor binding in the ventral hippocampus. **Brain Res**, v. 1090, n. 1, p. 29-34, May 23 2006.
- VAN MARLE, H. J. et al. From specificity to sensitivity: how acute stress affects amygdala processing of biologically salient stimuli. **Biol Psychiatry**, v. 66, n. 7, p. 649-55, Oct 1 2009.
- VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 3, p. 549-54, Nov 1994.
- VIGIL, F. A. et al. Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats. **Behav Brain Res**, v. 210, n. 1, p. 140-2, Jun 26 2010.
- VIVIAN, J. A.; MICZEK, K. A. Ultrasounds during morphine withdrawal in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 104, n. 2, p. 187-93, 1991.
- WALLENIOUS, M. A. The interaction of noise stress and personal project stress on subjective health. **Journal of Environmental Psychology**, v. 24, p. 167-177, 2004.
- WARDEN, M. R.; MILLER, E. K. Task-dependent changes in short-term memory in the prefrontal cortex. **J Neurosci**, v. 30, n. 47, p. 15801-10, Nov 24 2010.
- WEINSTOCK, M. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, n. 1, p. 1-10, Jan 1997.
- \_\_\_\_\_. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, n. 6, p. 1073-86, Aug 2008.
- WEYERS, P. et al. Social and non-social open field behaviour of rats under light and noise stimulation. **Behavioural Processes**, v. 31, p. 257-268, 1994.
- WHITE, N. R.; BARFIELD, R. J. Playback of female rat ultrasonic vocalizations during sexual behavior. **Physiol Behav**, v. 45, n. 2, p. 229-33, Feb 1989.
- \_\_\_\_\_. Effects of male pre-ejaculatory vocalizations on female receptive behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). **J Comp Psychol**, v. 104, n. 2, p. 140-6, Jun 1990.
- WHO. Noise. 2012 2012.
- WIGGER, A. et al. Nonresponsiveness of the rat hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis to parturition-related events: inhibitory action of endogenous opioids. **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2843-9, Jun 1999.

WILLADSEN, M. et al. Rodent ultrasonic communication: Male prosocial 50-kHz ultrasonic vocalizations elicit social approach behavior in female rats (*Rattus norvegicus*). **J Comp Psychol**, v. 128, n. 1, p. 56-64, Feb 2014.

WOHR, M.; BORTA, A.; SCHWARTING, R. K. Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose-response study in the rat. **Neurobiol Learn Mem**, v. 84, n. 3, p. 228-40, Nov 2005.

WOHR, M.; SCHWARTING, R. K. Ultrasonic communication in rats: can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? **PLoS One**, v. 2, n. 12, p. e1365, 2007.

\_\_\_\_\_. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell Tissue Res**, v. 354, n. 1, p. 81-97, Oct 2013.

WÖHR, M. A. S., R.K.W. Ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation in rodents. Marburg, 23/12/2010 2010.

YAMASUE, H. et al. Voxel-based analysis of MRI reveals anterior cingulate gray-matter volume reduction in posttraumatic stress disorder due to terrorism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 15, p. 9039-43, Jul 22 2003.

YIM, I. S. et al. Risk of postpartum depressive symptoms with elevated corticotropin-releasing hormone in human pregnancy. **Arch Gen Psychiatry**, v. 66, n. 2, p. 162-9, Feb 2009.

YIM, Y. S. et al. Hippocampal mGluR5 predicts an occurrence of helplessness behavior after repetitive exposure to uncontrollable stress. **Neurosci Lett**, v. 519, n. 1, p. 62-6, Jun 21 2012.

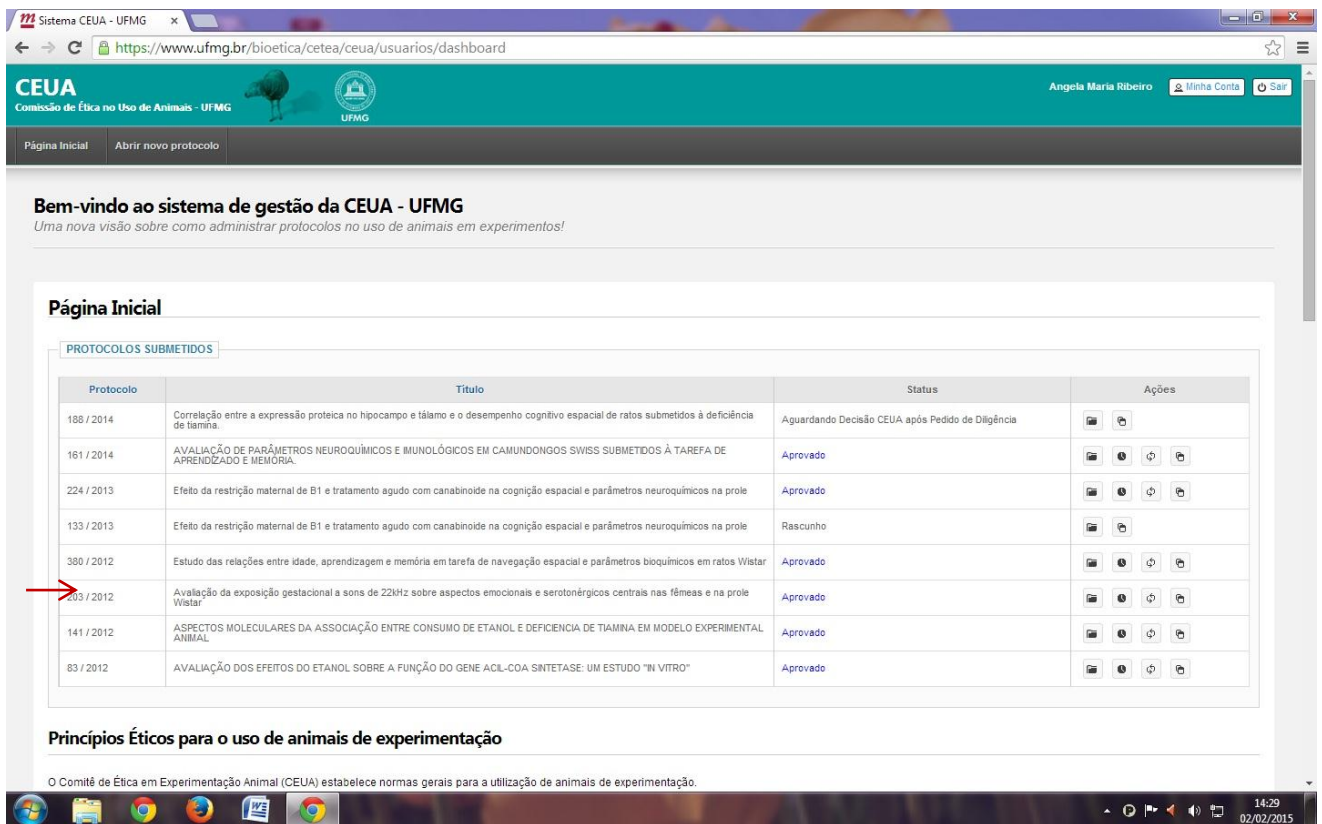
ZANGROSSI, H., JR.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Res Bull**, v. 44, n. 1, p. 1-5, 1997.

\_\_\_\_\_. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, Mar 21 2014.

ZANGROSSI, H., JR. et al. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 637-45, Dec 2001.

ZARROW, M. X.; PHILPOTT, J. E.; DENENBERG, V. H. Passage of <sup>14</sup>C-4-corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. **Nature**, v. 226, n. 5250, p. 1058-9, Jun 13 1970.

## 1. APROVAÇÃO JUNTO AO CEUA



Sistema CEUA - UFMG

https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/usuarios/dashboard

**CEUA**  
Comissão de Ética no Uso de Animais - UFMG





























Angela Maria Ribeiro Minha Conta Sair

Página Inicial Abrir novo protocolo

**Bem-vindo ao sistema de gestão da CEUA - UFMG**  
*Uma nova visão sobre como administrar protocolos no uso de animais em experimentos!*

**Página Inicial**

PROTÓCOLOS SUBMETIDOS

Protocolo	Título	Status	Ações
188 / 2014	Correlação entre a expressão proteica no hipocampo e lâmino e o desempenho cognitivo espacial de ratos submetidos à deficiência de tamna.	Aguardando Decisão CEUA após Pedido de Diligência	 
161 / 2014	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E MUNOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS SWISS SUBMETIDOS À TAREFA DE APRENDIZADO E MEMÓRIA.	Aprovado	   
224 / 2013	Efeito da restrição maternal de B1 e tratamento agudo com canabinoide na cognição espacial e parâmetros neuroquímicos na prole	Aprovado	   
133 / 2013	Efeito da restrição maternal de B1 e tratamento agudo com canabinoide na cognição espacial e parâmetros neuroquímicos na prole	Rascunho	 
380 / 2012	Estudo das relações entre idade, aprendizagem e memória em tarefa de navegação espacial e parâmetros bioquímicos em ratos Wistar	Aprovado	   
203 / 2012	Avaliação da exposição gestacional a sons de 22kHz sobre aspectos emocionais e serotoninérgicos centrais nas fêmeas e na prole Wistar	Aprovado	   
141 / 2012	ASPECTOS MOLECULARES DA ASSOCIAÇÃO ENTRE CONSUMO DE ETANOL E DEFICIÊNCIA DE TIAMINA EM MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL	Aprovado	   
83 / 2012	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ETANOL SOBRE A FUNÇÃO DO GENE ACL-COA SINTETASE: UM ESTUDO "IN VITRO"	Aprovado	   

**Princípios Éticos para o uso de animais de experimentação**

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) estabelece normas gerais para a utilização de animais de experimentação.

14:29  
02/02/2015

## 2. ARTIGO

Journal of Behavioral and Brain Science, 2015, 5, 25-39  
Published Online February 2015 in SciRes. <http://www.scirp.org/journal/ibbs>  
<http://dx.doi.org/10.4236/ibbs.2015.52003>



# Intrauterine Exposure to Chronic 22 kHz Sound Affects Inhibitory Avoidance and Serotonergic Parameters in Forebrain Areas of Dams and Rat Offspring

Patrícia da Silva Oliveira<sup>1</sup>, Ariomester Nascimento Daniel<sup>1</sup>, Polliana Toledo Nunes<sup>1</sup>, Karina Abdo Costa<sup>1</sup>, Hani Camille Yehia<sup>1,2</sup>, Angela Maria Ribeiro<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular, LaNeC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia Eletrônica, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB and Departamento de Psicologia, FaFiCH, Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular, LaNeC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Email: \*[angelamr@icb.ufmg.br](mailto:angelamr@icb.ufmg.br)

Received 4 January 2015; accepted 11 February 2015; published 13 February 2015

Academic Editor: Ana Adan, University of Barcelona, Spain

Copyright © 2015 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

In the present study we evaluated the effects of chronic exposure to sounds at 22 kHz during pregnancy on the central serotonergic and behavioral parameters in Wistar rat dams after the suckling period and on their male rat offspring. In addition, we also assessed the effects of an acute 22 kHz sound, associated with the chronic intrauterine exposure, on the emotional responses of adult offspring. The primary hypothesis was that experiencing 22 kHz stimuli during an early stage of development would interfere with brain serotonergic parameters and, later, with the adult rat's defensive responses. The corollary question was whether a 22 kHz sound exposure would differentially affect inhibitory avoidance and escape responses and central serotonergic parameters. Female rats were divided into four groups: non-pregnant control; non-pregnant chronic exposure; pregnant control; and pregnant chronic exposure. Male offspring were divided into four groups: chronic intrauterine sound exposure; acute sound exposure in adulthood; chronic intrauterine exposure with acute exposure in adulthood; and no exposure. Chronic sound exposure af-

\*Corresponding author.

**How to cite this paper:** da Silva Oliveira, P., et al. (2015) Intrauterine Exposure to Chronic 22 kHz Sound Affects Inhibitory Avoidance and Serotonergic Parameters in Forebrain Areas of Dams and Rat Offspring. *Journal of Behavioral and Brain Science*, 5, 25-39. <http://dx.doi.org/10.4236/ibbs.2015.52003>



affected inhibitory avoidance and serotonergic parameters in female rats. For offspring, there was an interaction between chronic and acute sound exposure effects on inhibitory avoidance response but not on escape response. There were significant effects of chronic intrauterine exposure on serotonin turnover in the hippocampus and PFC of females. For offspring, the turnover was increased by chronic exposure only in PFC, and in amygdala it was increased by acute exposure. These results illuminate the potential of an early acoustic sound exposure for causing central serotonergic and emotional behavioral changes that can persist into later periods of life.

## Keywords

**Intrauterine, 22 kHz Sound Exposure, Defensive Responses, Serotonergic Parameters, Adult Offspring**

---

## 1. Introduction

Rats can vocalize in the sonic and ultrasonic wide range. Their ultrasonic vocalizations (USV) range from 20 to about 100 kHz [1]. They are also able to detect such ultrasonic signals. Within this wide range, the 22 kHz call seems to be related to aversion occurring in response to immediate and potential environmental threats [2]-[4]. These vocalizations are carried out in many situations in which an evident aversive component is present, for example, exposure to a predator [5] or a social fight between males [6]. Some authors [7] [8] demonstrated that 22 kHz USVs induce activation in brain areas related to motivation and emotion (e.g., amygdala). Freezing behavior in response to 22 kHz USV is paralleled by increased neuronal activity in brain areas regulating fear and anxiety, such as the amygdala and periaqueductal gray [4]. Although the terms anxiety and fear are often used interchangeably; there is evidence that they can be differentiated. For instance, there are data that suggest that USV was found useful for differentiating fear and anxiety in rats [9]. Using behavioral and pharmacological approaches the authors showed evidence that rat 22 kHz USV can be considered to be a correlate of anxiety rather than of fear. Accordingly, 22 kHz exposure might be an interesting tool for studying behavioral and neurobiological aspects of emotion, such as the defensive responses related to anxiety and fear.

The primary hypothesis was that experiencing 22 kHz stimuli during an early stage of development would interfere with brain serotonergic parameters and, later, with the adult rat's defensive responses. The corollary question was whether a 22 kHz sound exposure would differentially affect inhibitory avoidance and escape responses and central serotonergic parameters. The rationale of this idea is that a biological phenomenon known as programming can be triggered when an animal, e.g., a human [10] or a rodent [11], is exposed to a stimulus in a critical period of development. This promotes anatomical, physiological, metabolic and neuropsychological adaptive changes that can persist into later periods of life [11] [12].

Certain environmental conditions experienced during an early period of animal development induce programming. Maternal stress [13]-[17] is one such condition. In addition, it is known that exposure to noise during pregnancy influences neurogenesis and thickness in the brain cortex of rat pups [18]. However, to date there is no study on the effects of intrauterine 22 kHz sound exposure on dam and on adult offspring emotional and brain neurochemical aspects, when the individuals are confronted with a situation of threat which might induce defensive behaviors, such as inhibitory avoidance and escape.

Some authors [19] developed an animal model that allowed the same rat to perform an inhibitory avoidance task followed by a one-way escape task in one experimental session. The apparatus was named the Elevated T-maze (ETM), which is derived from the elevated plus-maze, a widely used animal model for studying anxiety [20]. Depending on the task, the ETM generates one of the two kinds of defensive reactions, inhibitory avoidance or escape, which address two different emotions, anxiety and panic, respectively [19] [21]-[23]. Therefore, the ETM has been an important tool for the understanding of brain mechanisms underlying these two defensive responses [21] [24].

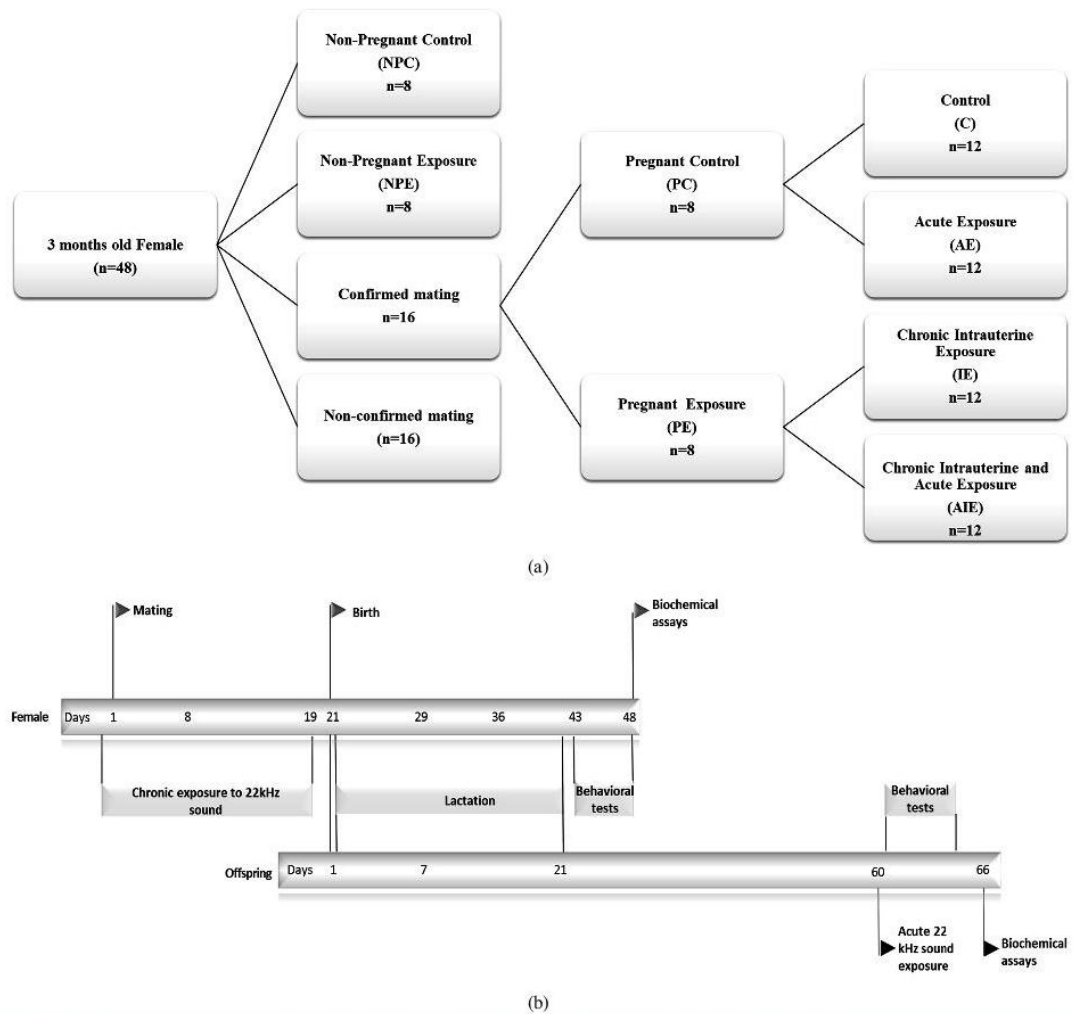
For instance, there is evidence that distinct brain structures and serotonin (5-HT) nerve fibers coming from the dorsal raphe nucleus (DRN) are involved in inhibitory avoidance and escape [25]-[27]. Specifically, these authors showed that, while serotonin released in the amygdala facilitates inhibitory avoidance, the same neuro-

transmitter inhibits escape in dorsal periaqueductal gray (dPAG). These data indicate that the neurobiological substrates, including serotonergic circuit activity, involved in these two defensive behaviors seem to be distinct. In the present study, the effects of a chronic intrauterine 22 kHz sound associated with an acute 22 kHz sound in adult offspring on serotonergic parameters were assessed in brain areas considered to have a potential role in inhibitory avoidance and escape response. These neurochemical measurements were carried out after the rats—dams and adult offspring—were submitted to the ETM paradigms used to assess anxiety and fear.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Animals

**Figure 1** shows a schematic of the experimental groups (Panel a) and experimental design (Panel b). During experiments, all rats, dams and offspring, received chow and water *ad libitum* and were housed in an aerated room with controlled 12 h diurnal daylight/night cycles and temperature of  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . All experimental procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (CETEA/UFMG 203/2012).



**Figure 1.** Schematic showing the experimental groups (Panel a) and experimental design (Panel b).



Forty-eight 3-month-old female Wistar rats were acquired from the vivarium of the Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais. Sixteen of them were separated into two groups ( $n = 8$ , each): Non-Pregnant Control (NPC) and Non-Pregnant chronic Exposure to 22 kHz sound (NPE). According to data obtained in previous experiments performed in our laboratory [28], about 50% of females became pregnant. The remaining 32 female rats were mated, as described below, with the purpose of obtaining at least 16 pregnant rats, which were randomly assigned into two groups ( $n = 8$ , for each), Pregnant Control (PC) and Pregnant Exposure to a chronic 22 kHz sound (PE). The other sixteen female rats were removed from the experiment. The estrous cycle of females from the four groups was determined by daily vaginal smears [29], and in the proestrus stage dams from groups PC and PE were co-housed with a male. Those rats whose smears tested sperm-positive were assumed to have conceived and the developing embryos were designated to be at Day 0 of gestation.

The female pregnant rats were placed in an acoustical isolation box and exposed to a 22 kHz sound 1 hour/day from the 1st to the 19th day of gestation (PE group). The rats from NPE group received the same treatment as rats from PE group, that is, they were also exposed to a 22 kHz sound during the same period. All rats from the control groups (NPC and PC) were also placed in the acoustical box, as the same period as the treated rats, except that they were not exposed to the chronic 22 kHz sound. Upon removal from the acoustical isolation box, the female rats from each of the four groups were placed in individual cages. All rats from the PC and PE groups gave birth on the 21st day.

Offspring were inspected and only male pups remained with their mothers in the proportion of 6 - 8 per dam. After the 21-day lactation period, forty-eight offspring male rats (three from each litter) were randomly divided into four groups ( $n = 12$ , each): Control pups (C), Intrauterine Chronic Exposure pups (IE), Adult Acute Exposure pups (AE), Chronic Intrauterine and Acute Adult Exposure pups (IAE). The remaining rat offspring were removed from the present experiments. The rats from the four subgroups (total  $n = 48$ ) were maintained in the animal house vivarium receiving water and food *ad libitum* for two months. AE and IAE groups were placed inside the acoustical isolation box and exposed to a 22 kHz sound for 1 hour. Rats from C and IE groups were placed into the acoustical isolation box for the same period of time as rats from AE and IAE groups but were not exposed to the acute 22 kHz sound. After the acute 22 kHz treatment the rats were submitted to the ETM tasks as described below. The dams were also submitted to this behavioral test two days after the lactation period.

## 2.2. Exposure to 22 kHz Sounds

Artificial tones of 22 kHz frequency were produced using the Matlab<sup>®</sup> software [30]. A continuous 22 kHz tone [10 ms rise time, 12 s duration, 65 db sound pressure level] was emitted in sequence during one hour. Auditory stimuli were presented in an acoustical isolation box (58 × 42 × 46 cm) with a speaker taken from an electronic repellent RepemaxREP1000<sup>®</sup>, capable of emitting sounds up to 80 kHz. Each tweeter was coupled to a computer with an Asus XonarD1<sup>®</sup> model sound card. The output of sound was detected and measured using a microphone Binary Acoustic Technology model AR 125. The sounds were produced at a sampling rate of 96,000 Hz and emitted at 65 dB (adjusted using a decibel meter Polimed AM-1900).

## 2.3. Behavioral Studies

Defensive responses, inhibitory avoidance and escape related with anxiety and fear, were evaluated using the ETM behavioral model [19]. The ETM apparatus consists of three arms of equal dimension (50 × 12 cm) elevated 50 cm from the floor. One of these arms is enclosed by lateral walls (40 cm high) and stands perpendicular to the two opposite open arms. Procedure: before starting the behavioral tests an acclimation session was conducted, in which the rats were placed in and allowed to explore the open arm for 30 minutes. After 24 hours, inhibitory avoidance and escape tasks were started. Each training session included three trials. Inhibitory avoidance training session: in each of the three trials the rat was placed at the distal end of the enclosed arm facing the intersection of the arms and was allowed to explore the enclosed arm. The trial ended when the rat entered one of the open arms by placing all four paws into the open arm or remained in the enclosed arm for a maximum of 300 s. The time in which the animal remained in the enclosed arm was recorded for each trial and expressed in seconds as avoidance latency. A 30 s inter-trial interval was adopted. Escape session: Following the inhibitory avoidance task, each rat was placed at the distal end of the open arm facing the intersection of the arms. The trial ended when the rat entered inside the closed arms or remained in the open arm for a maximum of 300 s. The time in which the animal remained in the open arm was recorded for each trial and expressed in seconds as escape latency.



*Memory test:* after 72 hours of the training sessions, the rats were submitted to one more trial of inhibitory avoidance and one more trial of escape. For both tests, the ratio between the rat's performances on the last session of training and the test 72 hours later was used as an index of memory performance.

All behavioral experiments were performed in a dimly lit and quiet room between 1 pm and 5 pm. The apparatus was cleaned with 20% ethanol solution between sessions.

## 2.4. Biochemical Studies

The rats were decapitated 1 day after the end of behavioral tests. The brain was quickly removed and kept on ice. The thalamus, PFC, amygdala, PAG and hippocampus from hemispheres were immediately dissected according to the stereotaxic atlas [31]. These areas are limbic system components and play important role in modulation of emotion [32]. 5-HT and 5-HIAA contents were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) [33], and the concentrations of each component were calculated by interpolation of their respective standard curves. Obtained values are expressed as ng/g of tissue. The [5-HIAA]/[5-HT] ratio was used as an index of serotonergic system activity [34].

## 2.5. Statistical Analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the Gaussian assumption for the variables under study at a 0.05 significance level. The distribution for all variables was normal.

For both female and offspring rats, the performance on inhibitory avoidance and escape training tasks data were analyzed using ANOVA with repeated measures in the last element ( $2 \times 2 \times 3$  factorial method). For females, the factors were pregnancy, chronic exposure to 22 kHz sound and trials (time), while for rat offspring the factors were chronic intrauterine 22 kHz exposure, acute adult 22 kHz exposure and trials (time). For both female and offspring, memory performance and biochemical data were analyzed using two-way ANOVA. All values are expressed as mean  $\pm$  standard error (S.E.M.). Significance level was established at 5% for all tests.

## 3. Results

### 3.1. Inhibitory Avoidance Task

#### 3.1.1. Female Performance Data

*Acquisition:* **Figure 2, Panel a**, shows the performance of female rats in the inhibitory avoidance training sessions. For female performance in the inhibitory avoidance task there was a significant latency decrease effect of chronic exposure to 22 kHz sound [ $F_{(1,24)} = 7.13$ ;  $P = 0.01$ ] and also a trial effect [ $F_{(1,24)} = 13.63$ ,  $P < 0.01$ ]. There were neither effects of pregnancy nor interactions between factors.

*Memory performance:* There were no significant effects of chronic 22 kHz exposure or pregnancy on female memory performance, tested in the inhibitory avoidance task, 72 hours after the training session (data not shown). There also was no interaction between these factors.

#### 3.1.2. Offspring Performance Data

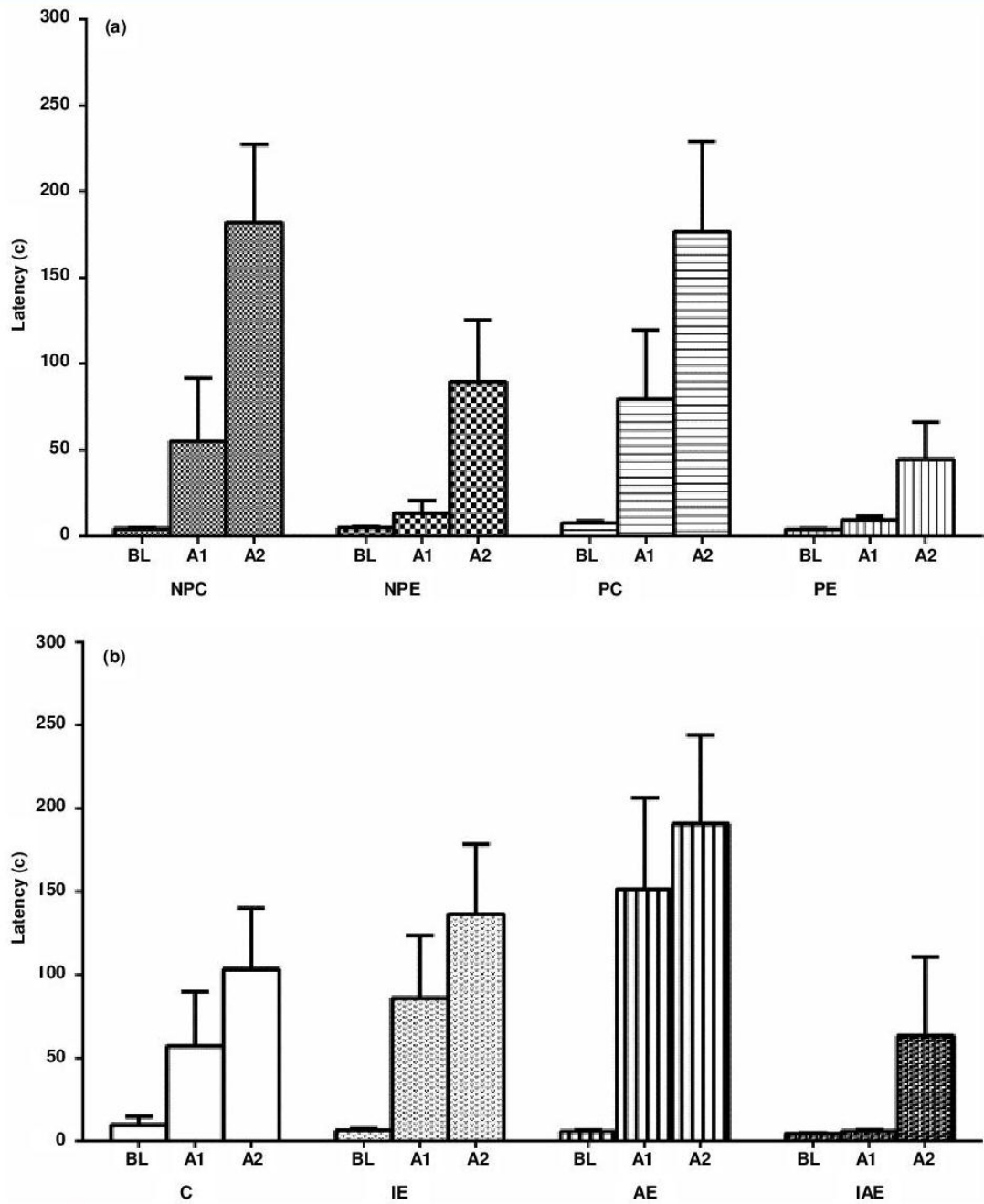
*Acquisition:* **Figure 2, Panel b**, shows the performance of rat offspring in the inhibitory avoidance training session. Although there were no significant effects of chronic intrauterine and acute adult 22 kHz exposures, a significant effect of trials [ $F_{(1,45)} = 19.36$ ,  $P < 0.01$ ] and interaction between intrauterine and acute adult 22 kHz exposures [ $F_{(1,45)} = 6.73$ ,  $P = 0.01$ ] were observed. There were no significant interactions between the other factors (trials  $\times$  chronic exposure or trials  $\times$  acute exposure). The Bonferroni *post hoc* test showed significant difference between AE and IAE groups [ $P = 0.02$ ] in inhibitory avoidance acquisition.

*Memory performance* (data not shown): There were no significant effects for chronic intrauterine or for acute adult 22 kHz exposure on offspring memory performance, tested in the inhibitory avoidance task, 72 hours after the training session. There also was no interaction between these factors.

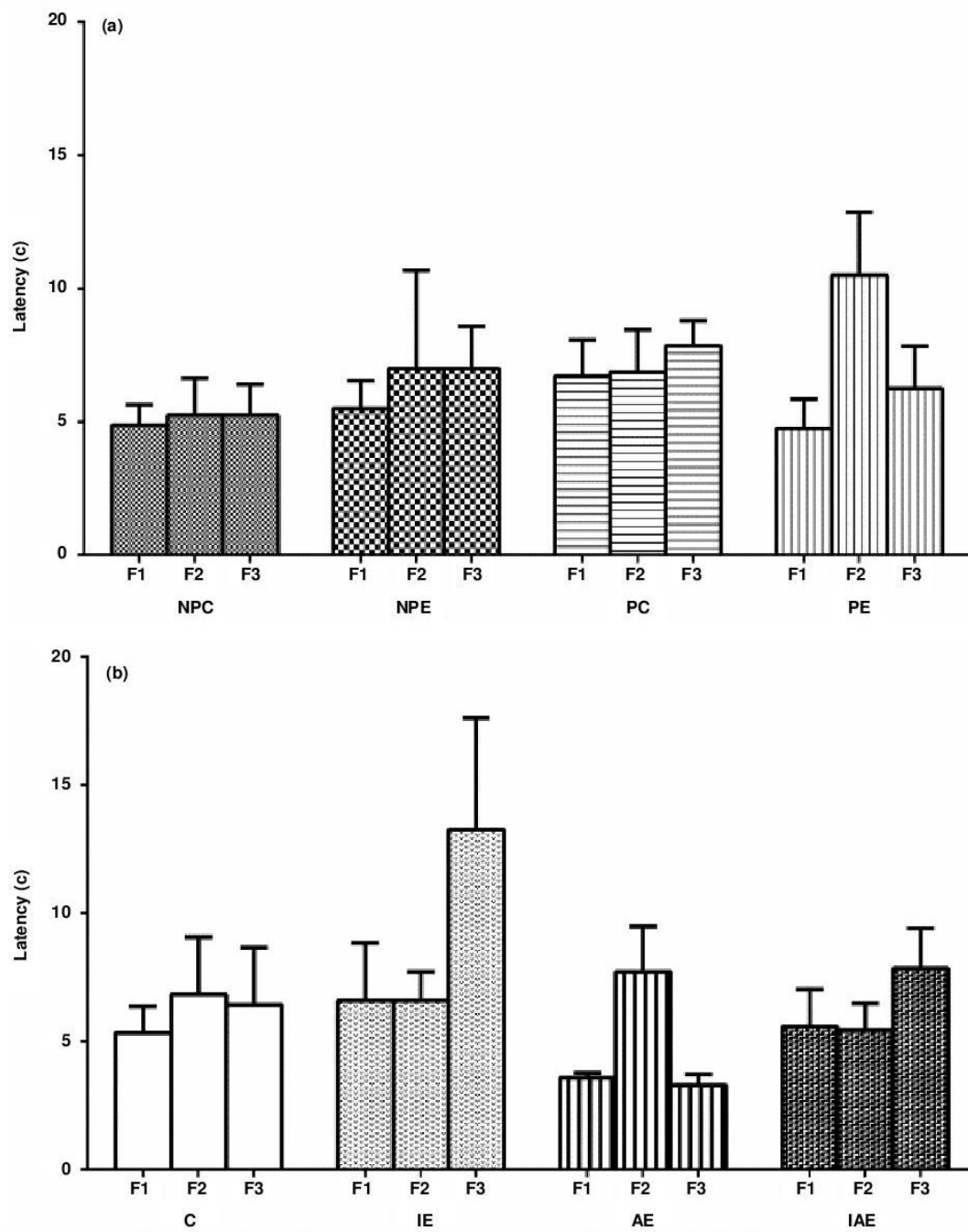
### 3.2. Escape Task

#### 3.2.1. Female Performance Data

*Acquisition:* **Figure 3, Panel a**, shows the performance of female rats in the escape task during the training session.



**Figure 2.** Rats performance in ETM inhibitory avoidance task expressed as latency (s). BL—Baseline; A1—Avoidance 1; A2—Avoidance 2. **Panel a:** Mean  $\pm$  S.E.M. of female rat's performance. NPC—Non-Pregnant Control; NPE—Non-Pregnant Exposure to 22 kHz sound; PC—Pregnant Control; PE—Pregnant Exposure to 22 kHz sound. There were effects of trials [ $F_{(1,23)} = 35.31, P < 0.01$ ] and 22 kHz exposure [ $F_{(1,23)} = 7.45; P = 0.01$ ]. There was no significant effect of pregnancy or interaction between the factors. **Panel b:** Mean  $\pm$  S.E.M. of adult offspring performance. C—Control; IE—Intrauterine Exposure; AE—Adult Acute Exposure; IAE—Intrauterine and Acute Adult Exposure. There were significant effects of trials [ $F_{(3,46)} = 39.41, P < 0.01$ ]. There were no significant effects of intrauterine and adult exposures. There was a significant interaction between the factors [ $F_{(3,46)} = 6.73, P = 0.01$ ].



**Figure 3.** Rat's performance in ETM escape task, expressed as latency (s). T1, T2 and T3: first, second and third trials, respectively. **Panel a:** Mean  $\pm$  S.E.M. of female rat's performance. NPC: Non-Pregnant Control; NPE: Non-Pregnant Exposure to 22 kHz sound; PC: Pregnant Control; PE: Pregnant Exposure to 22 kHz sound. There were no effects of trials, pregnancy, 22 kHz sound exposure and also no significant interaction between the factors. **Panel b:** Mean  $\pm$  S.E.M. offspring performance. There were no effects of trials, intrauterine exposure, and adult acute exposure and also no significant interaction between the factors.



There were no significant effects of any of the treatments, chronic 22 kHz exposure, pregnancy or trials. There also were no significant interactions between the factors.

*Memory performance* (data not shown): There were no significant effects of factors (chronic 22 kHz exposure, pregnancy and trials) or interactions between them.

### 3.2.2. Offspring Performance Data

*Acquisition:* **Figure 3, Panel b**, shows the performance of rat offspring in the escape task during the training session. There was a significant effect of trials [ $F_{(1,45)} = 3.22, P = 0.05$ ] and interaction between trials (time) and chronic 22 kHz exposure [ $F_{(1,45)} = 5.01, P = 0.01$ ]. There were no significant effects of the other treatments (chronic or acute exposures) or interactions between them (chronic  $\times$  acute exposures or trials  $\times$  acute exposure).

*Memory performance* (data not shown): There were no significant effects of treatments either chronic intra-uterine treatments or adult 22 kHz sound exposures on offspring memory performance tested in the escape task, 72 hours after the training session. There also was no interaction between these factors.

### 3.3. Serotonergic Parameters

**Table 1** shows biochemical data concerning 5-HT and 5-HIAA levels and serotonergic system activity ([5-HIAA]/[5-HT]) evaluated in the following rat brain areas: hippocampus, thalamus, amygdala, PAG and PFC.

#### 3.3.1. Female

Although there were no significant effects of chronic 22 kHz exposure and pregnancy on 5-HT levels in any of the five brain areas evaluated, there was a significant interaction between them in the amygdala ( $F_{(3,10)} = 5.81, P = 0.04$ ). There were no significant interactions between factors on 5-HT levels in the other four regions evaluated (hippocampus, thalamus, PFC and PAG).

Neither chronic 22 kHz exposure nor pregnancy showed significant effects on 5-HIAA concentrations in any of the female brain areas analyzed. There also was no interaction between these factors.

Pregnancy had no effect on the 5-HT turnover ([5-HIAA]/[5-HT]) in any of the studied brain areas. There also was no effect of chronic 22 kHz exposure on 5-HT turnover in thalamus, amygdala and PAG. However, there were significant effects on 5-HT turnover in two areas, hippocampus [ $F_{(3,11)} = 8.55, P = 0.01$ ] and PFC [ $F_{(3,10)} = 6.32, P = 0.03$ ]. In addition, there were no interactions between the treatments on 5-HT turnover in any of the brain areas.

#### 3.3.2. Offspring

There were no significant effects of intrauterine exposure or acute adult exposure on 5-HT concentrations in any of the brain regions (hippocampus, thalamus, amygdala, PFC and PAD). In addition, there was no interaction between the two treatments.

Chronic intrauterine decrease and acute adult exposures increased the 5-HIAA concentrations in hippocampus. In this brain area there were significant effects of intrauterine 22 kHz exposure [ $F_{(3,40)} = 7.17, P = 0.01$ ] and acute adult exposure [ $F_{(3,40)} = 5.25, P = 0.03$ ] on 5-HIAA levels.

There also were significant interactions between treatments (chronic and acute exposure) on 5-HIAA concentration in hippocampus [ $F_{(3,40)} = 8.05, P = 0.01$ ] and amygdala [ $F_{(3,43)} = 10.75, P < 0.01$ ]. There were no effects of factors or interactions between them in the other evaluated regions.

Chronic exposure to 22 kHz sound increase 5-HT turnover in offspring PFC [ $F_{(3,42)} = 11.28, P < 0.01$ ], but there were no effects on any of the other brain areas. Acute adult exposure increase 5-HT turnover in amygdala [ $F_{(3,43)} = 6.41, P = 0.01$ ]. However, there was no effect of this treatment on 5-HT turnover in any the other studied brain regions. There also was no interaction between the factors for 5-HT turnover in any of the assessed brain areas.

## 4. Discussion

The data of the present study show for the first time that the inhibitory avoidance response of female Wistar rats is affected by chronic exposure to a 22 kHz sound. Such results were not found in the escape response. In addition, this study demonstrates that chronic intrauterine exposure can also interfere with the inhibitory avoidance

Table 1. Serotonergic parameters.

	[5-HT]							
	Female				Offspring			
	NPC	NPE	PC	PE	C	IE	AE	IAE
Hippocampus	171.23 ± 18.82	166.96 ± 9.51	98.25 ± 14.18	202.75 ± 30.60	81.85 ± 23.65	81.85 ± 23.65	59.76 ± 26.94	57.05 ± 16.13
Amygdala	180.59 ± 13.41	151.35 ± 19.67	73.28 ± 9.84	151.57 ± 28.60	293.14 ± 75.56	182.35 ± 29.09	166.14 ± 54.12	154.07 ± 17.17
PFC	180.59 ± 13.41	311.31 ± 64.60	101.19 ± 30.42	275.65 ± 59.55	124.08 ± 20.40	90.40 ± 15.57	103.29 ± 22.86	82.66 ± 7.12
PAG	944.77 ± 37.60	159.69 ± 83.12	319.88 ± 55.13	353.58 ± 73.42	617.09 ± 14.46	434.57 ± 54.33	463.38 ± 59.63	544.91 ± 62.37
Thalamus	729.68 ± 32.15	224.54 ± 0.28	887.63 ± 74.82	1443.02 ± 42.16	186.25 ± 26.40	237.96 ± 33.19	238.21 ± 35.06	284.09 ± 39.82
	[5-HIAA]							
	Female				Offspring			
	NPC	NPE	PC	PE	C	IE	AE	IAE
Hippocampus	248.26 ± 30.61	182.26 ± 11.64	214.39 ± 7.05	207.68 ± 10.59	301.79 ± 27.23	293.44 ± 30.99	273.28 ± 28.92	532.13 ± 10.25
Amygdala	228.31 ± 51.53	128.83 ± 18.01	152.05 ± 14.79	179.95 ± 40.37	303.50 ± 41.38	194.53 ± 43.38	203.95 ± 15.46	423.68 ± 87.92
PFC	657.39 ± 62.29	598.35 ± 36.96	496.4 ± 65.18	976.31 ± 31.93	519.99 ± 43.09	561.14 ± 54.78	471.71 ± 42.57	618.97 ± 46.64
PAG	502.80 ± 15.85	658.38 ± 58.49	980.51 ± 23.96	842.13 ± 273.94	1403.81 ± 31.95	1785.30 ± 43.67	1311.33 ± 27.98	1392.11 ± 34.93
Thalamus	975.57 ± 15.41	1264.79 ± 22.27	745.03 ± 10.85	762.88 ± 36.53	706.06 ± 56.32	744.10 ± 54.43	746.06 ± 29.19	789.42 ± 31.54
	[5-HIAA]/[5-HT]							
	Female				Offspring			
	NPC	NPE	PC	PE	C	IE	AE	IAE
Hippocampus	1.54 ± 0.25	1.09 ± 0.07	2.24 ± 0.40	1.14 ± 0.21	7.36 ± 1.78	9.00 ± 1.93	10.13 ± 2.48	11.12 ± 1.37
Amygdala	1.34 ± 0.36	5.24 ± 0.20	2.14 ± 0.49	1.34 ± 0.18	1.49 ± 0.24	1.25 ± 0.24	1.89 ± 0.38	3.13 ± 1.33
PFC	4.13 ± 0.66	2.07 ± 0.40	5.18 ± 0.91	3.46 ± 0.64	4.98 ± 0.51	7.24 ± 0.80	5.64 ± 0.90	7.70 ± 0.46
PAG	0.48 ± 0.14	3.01 ± 1.42	2.39 ± 0.22	2.17 ± 0.39	2.80 ± 0.63	3.27 ± 0.72	3.73 ± 1.31	2.55 ± 0.53
Thalamus	4.26 ± 1.32	2.07 ± 0.40	2.54 ± 0.02	1.17 ± 0.67	4.60 ± 0.64	3.67 ± 0.43	3.67 ± 0.51	3.28 ± 0.56

Mean ± S.E.M. (ng/g of tissue) of serotonergic parameter levels in the brain areas; PFC: Prefrontal Cortex; PAG: Periaqueductal Gray; NPC: Non-Pregnant Control; NPE: Non-Pregnant Sound Exposure; PC: Pregnant Control; PE: Pregnant Sound Exposure; C: Control; IE: Intrauterine Sound Exposure; AE: Adult Sound Exposure; IAE: Intrauterine Adult Exposure; Females: There was a significant interaction between pregnancy and chronic 22 kHz sound exposure on 5-HT concentration in amygdala [ $F_{(3,10)} = 5.81, P = 0.05$ ]. There were also significant effects on 5-HT turnover in hippocampus [ $F_{(3,11)} = 8.55, P = 0.01$ ] and PFC [ $F_{(3,10)} = 6.32, P = 0.03$ ]. Offspring: There were significant effects of intrauterine 22 kHz exposure [ $F_{(3,40)} = 7.17, P < 0.01$ ] and acute adult exposure [ $F_{(3,40)} = 5.25, P = 0.03$ ] on 5-HIAA levels. There were also significant interactions between treatments on 5-HIAA concentrations in hippocampus [ $F_{(3,40)} = 8.05, P < 0.01$ ] and amygdala [ $F_{(3,43)} = 10.75, P < 0.01$ ]. There was a significant effect of chronic intrauterine exposure on 5-HT turnover in PFC [ $F_{(3,42)} = 11.28, P < 0.01$ ]. The other factors did not have significant effects.

(but not with escape) response of offspring rats confronted with an acute 22 kHz sound when they are adults. So, the previous chronic intrauterine experience interferes with the behavioral response to an acute 22 kHz exposure later in life. There is evidence that sounds in the range of 22 kHz frequency induce rat defensive behavior [35]. However, the behavioral method used by these authors did not discriminate the two kinds of defensive responses, inhibitory avoidance and escape. These two reactions were assessed in the present study using the ETM paradigm, where they are related to inhibitory avoidance and escape, respectively [19].



The pregnant and non-pregnant female rats that were previously exposed to the chronic 22 kHz sound exhibited decreased anxious behavior when tested in the ETM apparatus (decreased inhibitory avoidance latency). On the other hand, offspring submitted to a chronic 22 kHz sound during the intrauterine period did not show any defensive response change when assessed in the ETM. However, previous chronic intrauterine 22 kHz exposures followed by an acute 22 kHz exposure during adulthood also decrease inhibitory avoidance latency in ETM task. Similarly to dam performance, offspring escape response was not changed by 22 kHz sound applied in any of the experimental conditions used in the present study. These results agree with those obtained by other authors who, using pharmacological approaches, showed that 22 kHz USV in rats is an index of anxiety but not fear [9]. These authors showed that in situations that induce anxiety, the rats sustain the 22 kHz vocalization, while fear situations produce immediate inhibition of 22 kHz vocalization. On the other hand, it appears not to agree with others, who found an anxiogenic effect of acoustic sound exposure. It is important to mention, however, that the effects of acoustic stimuli on the state of anxiety depend on different variables, such as the characteristics of the sound and the experimental animal model used. Absence of effect and both increase and decrease of state of anxiety are described in the literature. For instance, in non-pregnant females, a 65 dB white noise increase the state of anxiety [36] and no effect was shown in pregnant females subjected to a 77 dB noise of 800 Hz [37]. In addition, white noise exposure increased anxiety behavior in adult male rats [38] and decreased it in fifteen-day-old male pups [39]. Also, 20 - 45 kHz sound exposure decreased anxiety in adult male rats [40], a result that agrees with the present findings.

As the sound exposure used here was chronic, another hypothesis to be considered to explain the 22 kHz anxiolytic effects is that the dams and offspring could have learned, as a result of the repetitive exposures that the 22 kHz was not a sign of threat. This would explain the observation that over time their ETM inhibitory avoidance responses were lower compared with control rats. This hypothesis is supported by other authors who showed that repetitive sound exposure can induce habituation [41] [42]. The data obtained with offspring also agree with this hypothesis, considering that there is an interaction of effects when subjects are faced twice with a 22 kHz sound in the intrauterine and adulthood periods of development. This significant interaction could possibly be explained by the occurrence of adjustment in the neuronal net after intrauterine exposure. These potential changes induced by chronic 22 kHz sound exposure could interfere with the effects of later exposure to a similar stimulus. This hypothesis is supported by the programming neuronal plasticity theory, which states that a stimulus or an insult received in a critical period of animal development can promote anatomical, physiological, metabolic and neuropsychological adaptive changes that persist into later periods of life [12]. It is known that chronic exposure to a stressor can decrease the adjustment ability or increase the susceptibility to a subsequent stressor [43]. So, it is reasonable to consider that individuals previously exposed to 22 kHz sound in an early period of life, compared to a non-exposed individual, would be distinctly affected in terms of central nervous system and/or behavioral aspects.

Three alternative hypotheses could be proposed for explaining the neurobiological and behavioral changes caused by two sequential 22 kHz stimuli applied in different periods of offspring development: 1) a direct effect of the first exposure on the offspring neuronal net, depending on the fact that the fetus would be able to "hear" or "perceive" the environmental sound. Compared to the effects on individuals not previously exposed, a second stimulus could produce a distinct response; 2) an indirect effect of the first exposure on the offspring neuronal net, as a result of a primary effect on the dams; or 3) both effects, direct and indirect, occurring simultaneously. Thus, a distinct response to a second 22 kHz sound exposure could take place because it changes specific components of the neuronal net, which would make part of the neurobiological mechanism responsible for the behavioral response to a specific kind of environmental stimulus. In other words, a specific change caused by preceding experiences—chronic intrauterine 22 kHz sound exposure—would affect the inhibitory avoidance to a subsequent similar stimulus—acute 22 kHz—faced by the individuals in later periods of life.

With regard to the first hypothesis about a direct effect of sound on offspring, some authors stated that fetuses of sheep are able to hear environmental sounds [44] [45]. Sound is one of the first stimuli from the external environment to reach and be perceived by a nineteen-week-old human fetus [46]. However, there is evidence that rats cannot hear until two weeks after birth [47] [48]. Nevertheless, it is important to consider the possibility of other kinds of ultrasound mechanism acting on the nervous system, which could be independent of the hearing process. Data obtained from studies using individuals of different species, including laboratory mammals, indicated that, depending on frequency and intensity, an ultrasound could cross the dam's tissue barriers causing functional changes in fetal neural tissues [49]. Some literature supports the second hypothesis about the possibil-



ity of an indirect effect of sound, through mother, on the fetus. For instance, aversive sound caused chronic stress in pregnant women and pregnant rats [50] [51], activating the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), increasing glucocorticoid levels in both maternal and fetal blood. It is also known that white noise increases corticosteroid levels in blood and induces hippocampal serotonergic system changes [52]. Both corticosteroids and the serotonergic system participate in cognitive and emotional outcomes [53]. Thus, it is reasonable to consider the possibility that the mechanism of action of chronic 22 kHz sound effects on offspring is direct and indirect. But as the rat offspring are not able to hear before the second week of birth, the indirect mechanism might be more probable. Further studies need to be conducted to resolve this question.

The observed effects of 22 kHz sound on ETM inhibitory avoidance and the absence of effect on escape behavior suggest that the neurobiological mechanisms related to anxiety and fear states, respectively, might be distinct. Some author shows that panic attack does not activate HPA axis [54], while the anxiety behavior involves the activation of this axis [24] [55]. As mentioned before, if an aversive sound causes chronic stress in pregnant rats [50] [51], activating the HPA axis and increasing glucocorticoid levels in both maternal and fetal blood, one can hypothesize that it could be one of the mechanisms involved in the effect of 22 kHz sound exposure on inhibitory avoidance. Further studies (e.g., glucocorticoid level determinations) need to be done to clarify this question. These data suggest that there might be a relation between 22 kHz sound and the neurobiological substrate of inhibitory avoidance but no association with escape. Likewise, the fear and anxiety behavior have different effects on the serotonergic system [56] [57].

In spite of the fact that there is evidence that serotonin uptake inhibitors decrease the number of 22 kHz ultrasonic rat vocalizations [58], we are unaware of any study about the effects of 22 kHz sound on serotonergic system activity in different brain areas. This system has an important role in modulation of anxiety state. In addition, the serotonergic activity can facilitate or attenuate the anxious behavior, depending on the brain region and the subtype of receptors involved [59]-[61].

In the present study, the following serotonergic parameter results were obtained after a chronic exposure to a 22 kHz sound during pregnancy: 1) the female and the adult offspring 5-HT concentrations were not affected in any of the assessed brain areas (PFC, PAG, amygdala, thalamus and hippocampus), 2) the adult offspring 5-HIAA concentrations were decreased in hippocampus by chronic 22 kHz sound exposure and increased when both chronic and acute stimuli were associated, 3) the serotonergic turnover rate was decreased in the female PFC and hippocampus, and increased in the offspring PFC. Regarding acute exposure (adult offspring), similar effects were observed as follows: 1) there was no effect on 5-HT levels in any of the assessed brain areas, 2) 5-HIAA concentrations were decreased in the hippocampus, 3) the serotonergic turnover rate was increased in the amygdala, an effect that was not detectable when the previous chronic and acute stimuli were associated. In short, in terms of serotonergic activity assessed by the turnover rate, these findings suggest that chronic exposure to 22 kHz sound causes a serotonergic activity decrease in the hippocampus and in the PFC of females. On the other hand, acute exposure during adulthood increases serotonergic turnover rate in the amygdala. These data indicate the involvement of limbic brain system regions in the neurobiological processes (emotional learning) affected by 22 kHz sound.

The absence of significant effects of 22 kHz sound applied during pregnancy on 5-HT levels observed in the present study accords with reports from other authors, who also did not find effects of white noise exposure on offspring hippocampal 5-HT release [62]. On the other hand, other authors showed that acute sound, including sound in the ultrasonic range, produces rapid activation of the 5-HT system in the frontal cortex, the thalamus and the hypothalamus [63]. Another hypothesis to be considered is that chronically exposed females could habituate to the stimulus. As mentioned before, this hypothesis is supported by other authors who showed that repetitive sound exposure can induce functional inactivation [42]. In addition, serotonergic parameter changes are an essential part of the adaptive process to aversive environmental stimuli [64]. This adaptive phenomenon also occurs in the amygdala, considered to be a key brain structure involved in the emotional circuit in various species [65]. Both acute and chronic stress modulate amygdala reactivity, interfering with cognitive (attention, memory) and physiological (neuroendocrine and neurochemistry) responses [66]-[68]. The plasticity in the amygdala is observed after acute and chronic stressor exposure [69]-[75].

In the present work the chronic intrauterine 22 kHz sound exposure affects female and offspring serotonergic turnover, increasing activity in the hippocampus. For female, this effect was also observed in PFC. For offspring, acute exposure increased serotonergic turnover in amygdala. The significant effects of chronic and acute treatments on 5-HIAA were observed in the hippocampus and an interaction of these treatments was found in the

hippocampus and amygdala. It is important to emphasize that there were no significant effects on serotonergic parameters in the PAG and thalamus in any of the experimental conditions used in the present study. The observation that chronic and acute 22 kHz sound exposure affect inhibitory avoidance but not escape response agrees with the findings that these acoustic sounds affect serotonergic parameters of specific brain areas, such as the hippocampus and amygdala, but not the PAG. It is known that the defensive responses, inhibitory avoidance and escape, involve distinct serotonergic pathways that originate from the raphe nucleus and continue to the forebrain and midbrain areas. The inhibitory avoidance is structured in the forebrain (e.g., amygdala, PFC), while the latter is largely integrated in the midbrain (mainly PAG) (review in [26]).

## 5. Conclusion

The present results are in agreement with the assumption that anxiety and panic are qualitatively different emotions with distinct modulator mechanisms that are related to two defensive strategies, respectively: reaction to potential threat and to proximal menace. Besides illuminating the potential of an early acoustic sound exposure for causing central serotonergic and emotional behavioral changes that can persist into later periods of life, the present data also show that the 22 kHz sound exposure represents a useful tool for understanding the mechanism of a specific defensive behavior. That is, as the 22 kHz sound exposure affects inhibitory avoidance but not escape behavior, it might be relevant for clarifying physiological and molecular aspects of emotion.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgements

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais). The authors thank Aparecida Guerra de Jesus for technical assistance. Patrícia de Oliveira received scholarship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior).

## References

- [1] Anderson, J.W. (1954) The Production of Ultrasonic Sounds by Laboratory Rats and Other Mammals. *Science*, **119**, 808-809. <http://dx.doi.org/10.1126/science.119.3101.808>
- [2] Brudzynski, S.M., *et al.* (1993) Analysis of 22 kHz Ultrasonic Vocalization in Laboratory Rats: Long and Short Calls. *Physiology & Behavior*, **54**, 215-221. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90102-L](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(93)90102-L)
- [3] Wohr, M., Borta, A. and Schwarting, R.K. (2005) Overt Behavior and Ultrasonic Vocalization in a Fear Conditioning Paradigm: A Dose-Response Study in the Rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, **84**, 228-240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2005.07.004>
- [4] Wohr, M. and Schwarting, R.K. (2013) Affective Communication in Rodents: Ultrasonic Vocalizations as a Tool for Research on Emotion and Motivation. *Cell and Tissue Research*, **354**, 81-97. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-013-1607-9>
- [5] Blanchard, R.J., *et al.* (1992) Sex Differences in the Incidence and Sonographic Characteristics of Antipredator Ultrasonic Cries in the Laboratory Rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, **106**, 270-277. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7036.106.3.270>
- [6] Thomas, D.A., Takahashi, L.K. and Barfield, R.J. (1983) Analysis of Ultrasonic Vocalizations Emitted by Intruders during Aggressive Encounters among Rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, **97**, 201-206. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7036.97.3.201>
- [7] Parsana, A.J., Li, N. and Brown, T.H. (2012) Positive and Negative Ultrasonic Social Signals Elicit Opposing Firing Patterns in Rat Amygdala. *Behavioural Brain Research*, **226**, 77-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.08.040>
- [8] Sadananda, M., Wohr, M. and Schwarting, R.K. (2008) Playback of 22-kHz and 50-kHz Ultrasonic Vocalizations Induces Differential c-fos Expression in Rat Brain. *Neuroscience Letters*, **435**, 17-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2008.02.002>
- [9] Jelen, P., Soltysik, S. and Zagrodzka, J. (2003) 22-kHz Ultrasonic Vocalization in Rats as an Index of Anxiety but Not Fear: Behavioral and Pharmacological Modulation of Affective State. *Behavioural Brain Research*, **141**, 63-72. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00321-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00321-2)



- [10] Lucas, A. (1994) Role of Nutritional Programming in Determining Adult Morbidity. *Archives of Disease in Childhood*, **71**, 288-290. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.71.4.288>
- [11] Whimbey, A.E. and Denenberg, V.H. (1967) Experimental Programming of Life Histories: The Factor Structure Underlying Experimentally Created Individual Differences. *Behaviour*, **29**, 296-314. <http://dx.doi.org/10.1163/156853967X00163>
- [12] Lucas, A. (1991) Programming by Early Nutrition in Man. *Ciba Foundation Symposium*, **156**, 38-50 (Discussion 50-55).
- [13] Lesage, J., Del-Favero, F., Leonhardt, M., Louvart, H., Maccari, S., Vieau, D. and Darnaudery, M. (2004) Prenatal Stress Induces Intrauterine Growth Restriction and Programmes Glucose Intolerance and Feeding Behaviour Disturbances in the Aged Rat. *Journal of Endocrinology*, **181**, 291-296. <http://dx.doi.org/10.1677/joe.0.1810291>
- [14] Matsumoto, M., Yoshioka, M. and Togashi, H. (2009) Early Postnatal Stress and Neural Circuit Underlying Emotional Regulation. *International Review of Neurobiology*, **85**, 95-107. [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)85007-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742(09)85007-1)
- [15] Anacker, C., O'Donnell, K.J. and Meaney, M.J. (2014) Early Life Adversity and the Epigenetic Programming of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, **16**, 321-333.
- [16] Levine, S. (2002) Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the Neonatal Rat: The Role of Maternal Behavior. *Neurotoxicity Research*, **4**, 557-564. <http://dx.doi.org/10.1080/10298420290030569>
- [17] Vazquez, D.M., Bailey, C., Dent, G.W., Okimoto, D.K., Steffek, A., López, J.F. and Levine, S. (2006) Brain Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Circuits in the Developing Rat: Effect of Maternal Deprivation. *Brain Research*, **1121**, 83-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2006.08.104>
- [18] Kim, C.H., Lee, S.-C., Shin, J.W., Chung, K.-J., Lee, S.-H., Shin, M.-S., *et al.* (2013) Exposure to Music and Noise during Pregnancy Influences Neurogenesis and Thickness in Motor and Somatosensory Cortex of Rat Pups. *International Neuropsychology Journal*, **17**, 107-113. <http://dx.doi.org/10.5213/inj.2013.17.3.107>
- [19] Graeff, F.G., Viana, M.B. and Tomaz, C. (1993) The Elevated T Maze, a New Experimental Model of Anxiety and Memory: Effect of Diazepam. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **26**, 67-70.
- [20] Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. and 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**, 149-167. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- [21] Graeff, F.G., Netto, C.F. and Zangrossi Jr., H. (1998) The Elevated T-Maze as an Experimental Model of Anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **23**, 237-246. [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(98\)00024-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(98)00024-4)
- [22] Viana, M.B., Tomaz, C. and Graeff, F.G. (1994) The Elevated T-Maze: A New Animal Model of Anxiety and Memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **49**, 549-554. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90067-1](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(94)90067-1)
- [23] Zangrossi Jr., H. and Graeff, F.G. (1997) Behavioral Validation of the Elevated T-Maze: A New Animal Model of Anxiety. *Brain Research Bulletin*, **44**, 1-5. [http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230\(96\)00381-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230(96)00381-4)
- [24] Graeff, F.G. (2007) Anxiety, Panic and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *The Revista Brasileira de Psiquiatria*, **29**, S3-S6. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462007000500002>
- [25] Graeff, F.G., Viana, M.B. and Mora, P.O. (1996) Opposed Regulation by Dorsal Raphe Nucleus 5-HT Pathways of Two Types of Fear in the Elevated T-Maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **53**, 171-177. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02012-8](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(95)02012-8)
- [26] Zangrossi Jr., H. and Graeff, F.G. (2014) Serotonin in Anxiety and Panic: Contributions of the Elevated T-Maze. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, **46**, 397-406.
- [27] Escribano, B., Quero, I., Feijóo, M., Tasset, I., Montilla, P. and Túnez, I. (2013) Role of Noise and Music as Anxiety Modulators: Relationship with Ovarian Hormones in the Rat. *Applied Animal Behaviour Science*, **152**, 73-82.
- [28] de Freitas-Silva, D.M., de Souza Resende, L., Pereira, S.R.C., Franco, G.C. and Ribeiro, A.M. (2010) Maternal Thiamine Restriction during Lactation Induces Cognitive Impairments and Changes in Glutamate and GABA Concentrations in Brain of Rat Offspring. *Behavioural Brain Research*, **211**, 33-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.002>
- [29] Goldman, J.M., Murr, A.S. and Cooper, R.L. (2007) The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, **80**, 84-97. <http://dx.doi.org/10.1002/bdrb.20106>
- [30] Furtak, S.C., Allen, T.A. and Brown, T.H. (2007) Single-Unit Firing in Rat Perirhinal Cortex Caused by Fear Conditioning to Arbitrary and Ecological Stimuli. *Journal of Neuroscience*, **27**, 12277-12291. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1653-07.2007>
- [31] Paxinos, G., *et al.* (1985) Bregma, Lambda and the Interaural Midpoint in Stereotaxic Surgery with Rats of Different Sex, Strain and Weight. *Journal of Neuroscience Methods*, **13**, 139-143. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90026-3](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(85)90026-3)

- [32] Paul, E.D. and Lowry, C.A. (2013) Functional Topography of Serotonergic Systems Supports the Deakin/Graeff Hypothesis of Anxiety and Affective Disorders. *Journal of Psychopharmacology*, **27**, 1090-1106. <http://dx.doi.org/10.1177/0269881113490328>
- [33] Oliveira-Silva, I.F., Pinto, L., Pereirab, S.R.C., Ferrazc, V.P., Barbosad, A.J.A., Coelho, V.A.A., *et al.* (2007) Age-Related Deficit in Behavioural Extinction Is Counteracted by Long-Term Ethanol Consumption: Correlation between 5-HIAA/5HT Ratio in Dorsal Raphe Nucleus and Cognitive Parameters. *Behavioural Brain Research*, **180**, 226-234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2007.03.012>
- [34] Shannon, N.J., Gunnet, J.W. and Moore, K.E. (1986) A Comparison of Biochemical Indices of 5-Hydroxytryptaminergic Neuronal Activity Following Electrical Stimulation of the Dorsal Raphe Nucleus. *Journal of Neurochemistry*, **47**, 958-965. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1986.tb00704.x>
- [35] Beckett, S.R.G., Aspley, S., Graham, M. and Marsden, C.A. (1996) Pharmacological Manipulation of Ultrasound Induced Defense Behaviour in the Rat. *Psychopharmacology*, **127**, 384-390. <http://dx.doi.org/10.1007/s002130050102>
- [36] Escribano, B., Quero, I., Feijóo, M., Tasset, I., Montilla, P. and Túnez, I. (2014) Role of Noise and Music as Anxiety Modulators: Relationship with Ovarian Hormones in the Rat. *Applied Animal Behaviour Science*, **152**, 73-82.
- [37] Nishio, H., Kasuga, S., Ushijima, M. and Harada, Y. (2001) Prenatal Stress and Postnatal Development of Neonatal Rats—Sex-Dependent Effects on Emotional Behavior and Learning Ability of Neonatal Rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **19**, 37-45. [http://dx.doi.org/10.1016/S0736-5748\(00\)00070-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0736-5748(00)00070-8)
- [38] Naqvi, F., Haider, S., Perveen, T. and Haleem, D.J. (2012) Sub-Chronic Exposure to Noise Affects Locomotor Activity and Produces Anxiogenic and Depressive like Behavior in Rats. *Pharmacological Reports*, **64**, 64-69. [http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70731-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70731-4)
- [39] Uran, S.L., Caceres, L.G. and Guelman, L.R. (2010) Effects of Loud Noise on Hippocampal and Cerebellar-Related Behaviors. *Brain Research*, **1361**, 102-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.022>
- [40] Morozova, A.Y., Zubkov, E.A., Storozheva, Z.I., Kekelidze, Z.I. and Chekhonin, V.P. (2013) Effect of Ultrasonic Irradiation on the Development of Symptoms of Depression and Anxiety in Rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **154**, 740-743. <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-013-2044-1>
- [41] Grissom, N. and Bhatnagar, S. (2009) Habituation to Repeated Stress: Get Used to It. *Neurobiology of Learning and Memory*, **92**, 215-224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.001>
- [42] Masini, C.V., Babb, J.A., Nyhuis, T.J., Day, H.E.W. and Campeau, S. (2012) Auditory Cortex Lesions Do Not Disrupt Habituation of HPA Axis Responses to Repeated Noise Stress. *Brain Research*, **1443**, 18-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.01.002>
- [43] Wallenius, M.A. (2004) The Interaction of Noise Stress and Personal Project Stress on Subjective Health. *Journal of Environmental Psychology*, **24**, 167-177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvp.2003.12.002>
- [44] Abrams, R., Gerhardt, K. and Antonelli, P. (1998) Fetal Hearing. *Developmental Psychobiology*, **33**, 1-3. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199807\)33:1<1::AID-DEV1>3.0.CO;2-P](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199807)33:1<1::AID-DEV1>3.0.CO;2-P)
- [45] Antonelli, P.J., Gerhardt, K., Abrams, R. and Huang, X. (2002) Fetal Central Auditory System Metabolic Response to Cochlear Implant Stimulation. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, **127**, 131-137. <http://dx.doi.org/10.1067/mhn.2002.126899>
- [46] Hepper, P.G. and Shahidullah, B.S. (1994) Development of Fetal Hearing. *Archives of Disease in Childhood*, **71**, F81-F87. <http://dx.doi.org/10.1136/fn.71.2.F81>
- [47] Geal-Dor, M., Freeman, S., Li, G. and Sohmer, H. (1993) Development of Hearing in Neonatal Rats: Air and Bone Conducted ABR Thresholds. *Hearing Research*, **69**, 236-242. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-5955\(93\)90113-F](http://dx.doi.org/10.1016/0378-5955(93)90113-F)
- [48] Saliu, A. (2011) The Development of Hearing in Rats: Reliability of Wave 1 as a Determinant of Auditory Maturation and Contributions of Peripheral Structure Progression. City College of New York, New York, 33.
- [49] Barnett, S.B., Rott, H.-D., ter Haar, G.R., Ziskin, M.C. and Maeda, K. (1997) The Sensitivity of Biological Tissue to Ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*, **23**, 805-812. [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-5629\(97\)00027-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-5629(97)00027-6)
- [50] Weinstock, M. (1997) Does Prenatal Stress Impair Coping and Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **21**, 1-10. [http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00014-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00014-0)
- [51] Weinstock, M. (2008) The Long-Term Behavioural Consequences of Prenatal Stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **32**, 1073-1086. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.002>
- [52] Hu, L., Yang, J., Song, T.S., Hou, N., Liu, Y., Zhao, X.G., *et al.* (2014) A New Stress Model, a Scream Sound, Alters Learning and Monoamine Levels in Rat Brain. *Physiology & Behavior*, **123**, 105-113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.09.010>
- [53] Lanfumey, L., Mongeau, R., Cohen-Salmon, C. and Hamon, M. (2008) Corticosteroid-Serotonin Interactions in the Neurobiological Mechanisms of Stress-Related Disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **32**, 1174-1184.



- <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.04.006>
- [54] Graeff, F.G., Garcia-Leal, C., Del-Ben, C.M. and Guimarães, F.S. (2005) Does the Panic Attack Activate the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **77**, 477-491. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652005000300009>
- [55] Graeff, F.G. (2011) Defense-Related Emotions in Humans. *Psychology and Neuroscience*, **4**, 183-189. <http://dx.doi.org/10.3922/j.psns.2011.2.003>
- [56] Graeff, F.G. and Zangrossi Jr., H. (2010) The Dual Role of Serotonin in Defense and the Mode of Action of Antidepressants on Generalized Anxiety and Panic Disorders. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, **10**, 207-217. <http://dx.doi.org/10.2174/1871524911006030207>
- [57] Graeff, F.G. (2003) Serotonin, Periaqueductal Gray Matter and Panic Disorder. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, **25**, 42-45. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462003000600010>
- [58] Sanchez, C., Gruca, P. and Papp, M. (2003) R-Citalopram Counteracts the Antidepressant-Like Effect of Escitalopram in a Rat Chronic Mild Stress Model. *Behavioural Pharmacology*, **14**, 465-470.
- [59] Curran, K.P. and Chalasani, S.H. (2012) Serotonin Circuits and Anxiety: What Can Invertebrates Teach Us? *Invertebrate Neuroscience*, **12**, 81-92.
- [60] Maron, E., Nutt, D. and Shlik, J. (2012) Neuroimaging of Serotonin System in Anxiety Disorders. *Current Pharmaceutical Design*, **18**, 5699-5708. <http://dx.doi.org/10.2174/138161212803530844>
- [61] Graeff, F.G. (2002) On Serotonin and Experimental Anxiety. *Psychopharmacology*, **163**, 467-476. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-002-1112-4>
- [62] Rex, A., Voigt, J.P. and Fink, H. (2005) Anxiety but Not Arousal Increases 5-Hydroxytryptamine Release in the Rat Ventral Hippocampus *in Vivo*. *European Journal of Neuroscience*, **22**, 1185-1189. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04251.x>
- [63] Midzyanovskaya, I.S., Kuznetsova, G.D., van Luijtelaar, E.L.J.M., van Rijn, C.M., Tuomisto, L. and MacDonald, E. (2006) The Brain 5HTergic Response to an Acute Sound Stress in Rats with Generalized (Absence and Audiogenic) Epilepsy. *Brain Research Bulletin*, **69**, 631-638. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.03.008>
- [64] Compan, V. (2007) Do Limits of Neuronal Plasticity Represent an Opportunity for Mental Diseases, Such as Addiction to Food and Illegal Drugs? Use and Utilities of Serotonin Receptor Knock-Out Mice. In: Chattopadhyay, A., Ed., *Serotonin Receptors in Neurobiology*, CRC Press, Boca Raton.
- [65] LeDoux, J. (2007) The Amygdala. *Current Biology*, **17**, R868-R874. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.005>
- [66] Berretta, S. (2005) Cortico-Amygdala Circuits: Role in the Conditioned Stress Response. *Stress*, **8**, 221-232. <http://dx.doi.org/10.1080/10253890500489395>
- [67] Shin, L.M. and Liberzon, I. (2010) The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. *Neuropsychopharmacology*, **35**, 169-191. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2009.83>
- [68] van Marle, H.J.F., Hermans, E.J., Qin, S.Z. and Fernández, G. (2009) From Specificity to Sensitivity: How Acute Stress Affects Amygdala Processing of Biologically Salient Stimuli. *Biological Psychiatry*, **66**, 649-655. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.05.014>
- [69] Leuner, B. and Shors, T.J. (2012) Stress, Anxiety, and Dendritic Spines: What Are the Connections? *Neuroscience*, **251**, 108-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.021>
- [70] Mahan, A.L. and Ressler, K.J. (2012) Fear Conditioning, Synaptic Plasticity and the Amygdala: Implications for Post-traumatic Stress Disorder. *Trends in Neurosciences*, **35**, 24-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2011.06.007>
- [71] McEwen, B.S., Eiland, L., Hunter, R.G. and Miller, M.M. (2012) Stress and Anxiety: Structural Plasticity and Epigenetic Regulation as a Consequence of Stress. *Neuropharmacology*, **62**, 3-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.014>
- [72] Mitra, R., Jadhav, S., McEwen, B.S., Vyas, A. and Chattarji, S. (2005) Stress Duration Modulates the Spatiotemporal Patterns of Spine Formation in the Basolateral Amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 9371-9376. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0504011102>
- [73] Mitra, R., Ferguson, D. and Sapolsky, R.M. (2009) SK2 Potassium Channel Overexpression in Basolateral Amygdala Reduces Anxiety, Stress-Induced Corticosterone Secretion and Dendritic Arborization. *Molecular Psychiatry*, **14**, 847-855.
- [74] Roozendaal, B., McReynolds, J.R., Van der Zee, E.A., Lee, S., McGaugh, J.L. and McIntyre, C.K. (2009) Glucocorticoid Effects on Memory Consolidation Depend on Functional Interactions between the Medial Prefrontal Cortex and Basolateral Amygdala. *Journal of Neuroscience*, **29**, 14299-14308. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3626-09.2009>
- [75] Vyas, A., Jadhav, S. and Chattarji, S. (2006) Prolonged Behavioral Stress Enhances Synaptic Connectivity in the Basolateral Amygdala. *Neuroscience*, **143**, 387-393. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.003>

### 3. DADOS BRUTOS

#### 3.1 Dados das fêmeas

##### 3.1.1 Esquiva inibitória

	NGC										NGS										GC										GS									
LB	6,	5,	4,	2,	4,	5,	3,	5,	4,	4,	4,	7,	5,	8,	4,	5,	10,	10,	5,	12,	5,	8,	4,	12,	2,	4,	3,	5,	5,	4,	3,	5,								
E1	14,	300,	4,	5,	2,	101,	5,	9,	5,	8,	5,	35,	91,	12,	11,	18,	116,	300,	7,	19,	91,	12,	11,	19,	3,	17,	4,	18,	5,	4,	13,	12,								
E2	223,	300,	8,	300,	2,	98,	300,	225,	48,	135,	12,	164,	52,	26,	14,	73,	245,	300,	300,	300,	52,	26,	14,	300,	6,	178,	8,	73,	14,	6,	65,	7,								

LB – Linha de Base; E1 – Esquiva 1; E2 – Esquiva 2; NGC=Não Gestantes Controle; NGS=Não Gestantes expostas a Sons de 22 kHz; GC=Gestantes Controles; GS=Gestantes expostas a Sons de 22 kHz.

##### 3.1.2 Fuga

	NGC										NGS										GC										GS									
F1	3,	9,	3,	4,	3,	5,	5,	7,	8,	3,	5,	6,	8,	3,	7,		5,	6,	3,	3,	13,	9,	8,		2,	3,	7,	3,	10,	3,	2,	8,								
F2	12,	4,	3,	3,	3,	11,	4,	2,	3,	3,	4,	18,	3,	3,	2,		7,	16,	4,	4,	7,	6,	4,		3,	24,	13,	10,	12,	4,	12,	6,								
F3	8,	12,	4,	4,	3,	2,	5,	4,	5,	4,	11,	8,	5,	4,	4,		9,	8,	12,	4,	6,	8,	8,		3,	9,	3,	16,	7,	3,	5,	4,								

F1 – Fuga 1; F2 – Fuga 2; F3 – Fuga 3; NGC=Não Gestantes Controle; NGS=Não Gestantes expostas a Sons de 22 kHz; GC=Gestantes Controles; GS=Gestantes expostas a Sons de 22 kHz.

##### 3.1.3 Memória

	NGC										NGS										GC										GS									
Memória	0,02	1,00	1,00	1,00	3,00	3,06	1,00	1,33	6,25	0,46	0,50	0,66					0,51	1,00	0,02	1,00	1,98	0,58	21,43		0,67	0,04	0,75	0,16	0,64	1,33	0,12	3,								

NGS=Não Gestantes expostas a Sons de 22 kHz; GC=Gestantes Controles; GS=Gestantes expostas a Sons de 22 kHz.

##### 3.1.4 Concentração de serotonina

	NGC										NGS										GC										GS									
Hipocampo	112,85	145,40	230,75	205,21	161,96				184,94	152,60	163,35						84,07	112,43							107,30	267,34		156,04	252,88	230,17										
Tálamo	1859,08	148,40	1018,12	412,21	210,60				224,19								139,43	1635,82							2142,78	1646,45	218,70				1764,13									
Amígdala	166,47	154,77	173,15	176,43	232,14				151,35	103,16							83,12	63,44							148,85	151,10	160,41			58,58	238,89									
SCP		628,81	2005,04	885,29	259,95				261,49		57,88						264,75								377,16	431,83	140,14			465,17										
CPF	128,47	112,43	125,63	166,11	436,01				438,13		226,50	269,29					131,61	70,77							314,15	422,50	148,83			217,10										

NGS=Não Gestantes expostas a Sons de 22 kHz; GC=Gestantes Controles; GS=Gestantes expostas a Sons de 22 kHz.

##### 3.1.5 Concentração de 5-HIAA

	NGC					NGS					GC					GS																														
Hipocampo	261,99	232,81	347,91	156,98	241,63						208,05	182,74	156,00													221,44	207,34									209,78	241,20					185,78	217,27	184,39		
Tálamo	845,99	872,72		703,29	1480,26						1229,58																636,51	853,55									719,00	883,12	743,80					705,61		
Amígdala	137,47	410,57	233,13	239,28	121,12						157,31	100,35															137,26	166,84									292,52	139,71	205,18					82,37	273,26	
SCP	395,84	252,30	886,56	864,40	114,88						1243,33		73,43														1220,11	740,90									804,34	1472,70	249,34					637,82		
CPF	602,82	438,80	712,62	770,79	761,90						562,20		539,94	692,90													561,58	431,22							741,88	2030,48	684,13					448,74				

NGS=Não Gestantes expostas a Sons de 22 kHz; GC=Gestantes Controles; GS=Gestantes expostas a Sons de 22 kHz.

### 3.1.6 Taxa de recuperação de serotonina

	NGC					NGS					GC					GS																													
Hipocampo	2,32	1,60	1,51	0,76	1,49						1,12	1,20	0,95														2,63	1,84									1,95	0,90			1,19	0,86	0,80		
Tálamo	0,46	5,88	6,22	1,71	7,03						5,48																4,56	0,52									0,34	0,54	3,40					0,40	
Amígdala	0,83	2,65	1,35	1,36	0,52						1,04	0,97															1,65	2,63									1,97	0,92	1,28					1,41	1,14
SCP	0,12	0,40	0,44	0,98	0,44						4,75		1,27														4,61	0,16									2,13	3,41	1,78					1,37	
CPF	4,69	3,90	5,67	4,64	1,75						1,28		2,38	2,57													4,27	6,09									2,36	4,81	4,60					2,07	

NGS=Não Gestantes expostas a Sons de 22 kHz; GC=Gestantes Controles; GS=Gestantes expostas a Sons de 22 kHz.

## 3.2 Dados da prole

### 3.2.1 Esquiva inibitória

	PC												PI												PA												PIA															
LB	5,	5,	3,	2,	5,	7,	65,	6,	2,	4,	10,	4,	2,	3,	4,	9,	4,	5,	12,	9,	3,	13,	4,	10,	4,	7,	8,	5,	6,	8,	5,	6,							4,	4,	6,	3,	6,	4,	3,	6,						
E1	6,	6,	300,	2,	3,	22,	16,	300,	4,	2,	10,	15,	5,	20,	4,	3,	4,	78,	300,	300,	5,	300,	6,	6,	4,	10,	15,	300,	300,	300,	300,	300,									4,	6,	7,	5,	7,	8,	5,	7,				
E2	4,	300,	300,	21,	6,	160,	14,	300,	17,	7,	6,	104,	8,	77,	5,	8,	16,	300,	300,	300,	12,	300,	13,	300,	7,	10,	118,	300,	300,	300,	300,	300,									18,	12,	28,	15,	7,	300,	15,	7,				

LB – Linha de Base; E1 – Esquiva 1; E2 – Esquiva 2; PC=Prole Controle; PI=Prole Exposta Cronicamente intra-útero; PA=Prole submetida a exposição aguda na fase Adulta; PIA=Prole exposta a Sons de 22k Hz durante a fase intrauterina e na fase adulta.

### 3.2.2 Fuga

	PC												PI												PA												PIA																
F1	4,	5,	5,	3,	3,	4,	6,	4,	6,	16,	5,	3,	30,	3,	2,	3,	2,	10,	6,	4,	4,	9,	4,	2,	3,	4,	3,	4,	3,	4,	4,	3,	2,	10,							14,	4,	4,	6,	3,	5,	3,	3,	2,	10,			
F2	4,	2,	2,	3,	3,	8,	30,	5,	6,	8,	9,	2,	12,	7,	2,	3,	2,	8,	9,	13,	2,	8,	9,	4,	3,	4,	3,	7,	14,	10,	13,	3,	2,	8,							6,	10,	3,	8,	3,	3,	5,	3,	2,	7,			
F3	3,	2,	2,	6,	2,	3,	30,	3,	5,	5,	10,	6,	27,	51,	3,	10,	3,	3,	7,	10,	2,	30,	9,	4,	2,	5,	3,	4,	3,	2,	4,	10,	3,	3,							9,	10,	14,	6,	2,	4,	10,	10,	3,	2,			

F1 – Fuga 1; F2 – Fuga 2; F3 – Fuga 3; PC=Prole Controle; PI=Prole Exposta Cronicamente intra-útero; PA=Prole submetida a exposição aguda na fase Adulta; PIA=Prole exposta a Sons de 22k Hz durante a fase intrauterina e na fase adulta.

### 3.2.3 Memória

	PC												PI												PA												PIA										
Memória	0,7	0,2	1,0	0,9	50,0	1,8	0,7	1,0	0,5	0,7	1,8	0,0	0,7	0,1	1,0	1,1	18,7	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,4	0,1	1,1	0,9	0,08	1,0	0,09	1,0	0,05					10,5	8,8	0,1	0,4	1,1	0,02						

PC=Prole Controle; PI=Prole Exposta Cronicamente intra-útero; PA=Prole submetida a exposição aguda na fase Adulta; PIA=Prole exposta a Sons de 22k Hz durante a fase intrauterina e na fase adulta.

### 3.2.4 Concentração de Serotonina

	PC												PI												PA												PIA											
Hipocampo	40	184	167	133	255	50	50	11	65	26	36	27	10	191	195	14	231	135	18	36	45	48	36	24	21	271	26	27	23	22	27						28	21	39			140						
Tálamo	51	151	232	85	127	122	251	348	283	172	285	130	151	154	112	168	186	267	391	195	393	93	375	370	184	111	148	198	229	336	462						155	516	298	184	360	191						
Amígdala	136	592	146		159	69	84	190	250	273	390	937	145	174	260	38	201	408	89	151	252	78	251	140	113	49	117	73	587	114	110						193	96	69	223	163	182						
SCP	809	340	388	362	684	1397	170	1657	164	388	99	949	269	183	362	386	341	383		667	254	523	674	739	607	219	275	775		468	437						630	783		492		275						
CPF	222	73	104	71	210	90	99	104	262	20	112	122	76	34	64	99	164	74	80	77	91	68	225	33	86	73	80	281	71	48	85						98	93	39	89		94						

PC=Prole Controle; PI=Prole Exposta Cronicamente intra-útero; PA=Prole submetida a exposição aguda na fase Adulta; PIA=Prole exposta a Sons de 22k Hz durante a fase intrauterina e na fase adulta.

### 3.2.5 Concentração de 5-HIAA

	PC												PI												PA												PIA											
Hipocampo	480	266	277	289	258	258	233	197	249	239	419	456	203	337	171	254	140	313	243	286	350	519	432	272	316	241	154	384	352	337	130						444	220	422			1043						
Tálamo	489	817	875	462	860	775	947	780	793	784	566	324	689	896	454	866	486	886	901	675	1083	570	677	746	707	585	690	761	908	808	763						606	794	760	944	818	813						
Amígdala	210	507	107		381	216	140	288	516	449	204	321	87	584	319	68	100	51	119	243	207	94	273	191	164	171	206	176	316	173	220						331	924	87	577	166	456						
SCP	2776	381	1868	2365	2349	1894	98	3174	358	390	655	539	480	494	1885	1795	194	2123	2599	2005	74	2406	5673	1696	82	847	2440	564		1597	2339						1703	2974		482		409						
CPF	579	483	525	573	527	503	588	554	781	130	568	429	720	491	437	519	1036	595	503	446	560	544	637	246	593	413	607	421	501	190	577						770	745	365	589		625						

PC=Prole Controle; PI=Prole Exposta Cronicamente intra-útero; PA=Prole submetida a exposição aguda na fase Adulta; PIA=Prole exposta a Sons de 22k Hz durante a fase intrauterina e na fase adulta.

### 3.2.6 Taxa de recuperação de serotonina

	PC												PI												PA												PIA											
Hipocampo	12,1	1,4	1,7	2,2	1,0	5,2	4,7	18,7	3,8	9,2	11,8	16,7	20,3	1,8	0,9	18,5	0,6	2,3	13,5	8,0	7,8	10,8	12,2	11,4	14,8	0,9	5,9	14,1	15,2	15,3	4,8						15,6	10,6	10,9			7,4						
Tálamo	9,5	5,4	3,8	5,4	6,8	6,4	3,8	2,2	2,8	4,6	2,0	2,5	4,6	5,8	4,0	5,2	2,6	3,3	2,3	3,5	2,8	6,1	1,8	2,0	3,8	5,3	4,7	3,8	4,0	2,4	1,7						3,9	1,5	2,6	5,1	2,3	4,3						
Amígdala	1,5	0,9	0,7		2,4	3,1	1,7	1,5	2,1	1,7	0,5	0,3	0,6	3,4	1,2	1,8	0,5	0,1	1,3	1,6	0,8	1,2	1,1	1,4	1,5	3,5	1,8	2,4	0,5	1,5	2,0						1,7	9,7	1,3	2,6	1,0	2,5						
SCP	3,4	1,1	4,8	6,5	3,4	1,4	0,6	1,9	2,2	1,0	6,6	0,6	1,8	2,7	5,2	4,7	0,6	5,6	0,1	3,0	0,3	4,6	8,4	2,3	0,1	3,9	8,9	0,7		3,4	5,4						2,7	3,8	3,8	1,0		1,5						
CPF	2,6	6,6	5,1	8,1	2,5	5,6	5,9	5,3	3,0	6,5	5,1	3,5	9,5	14,4	6,9	5,3	6,3	8,0	6,3	5,8	6,1	8,0	2,8	7,6	6,9	5,6	7,6	1,5	7,1	3,9	6,8						7,8	8,0	9,4	6,6		6,6						

PC=Prole Controle; PI=Prole Exposta Cronicamente intra-útero; PA=Prole submetida a exposição aguda na fase Adulta; PIA=Prole exposta a Sons de 22k Hz durante a fase intrauterina e na fase adulta.