



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



TAYNA SABRINA BRÁS

**O EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA MORFOLOGIA
DO HIPOCAMPO E NA DENSIDADE NEURONAL DO CÓRTEX
PERIRRINAL E NA REGIÃO DA AMÍGDALA NA PROLE DE RATAS
COM HIPOTIREOIDISMO CLÍNICO GESTACIONAL.**

São Paulo

2023

TAYNA SABRINA BRÁS

O efeito do Enriquecimento Ambiental na morfologia do hipocampo e na densidade neuronal do córtex perirrinal e na região da amígdala na prole de ratas com Hipotireoidismo Clínico gestacional.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, da Universidade
Presbiteriana Mackenzie, como requisito
parcial à obtenção de título de Bacharel em
Ciências Biológicas, orientado
pela Profa. Dra. Miriam Oliveira Ribeiro.

São Paulo, SP

2023

TAYNA SABRINA BRÁS

O efeito do Enriquecimento Ambiental na morfologia do hipocampo e na densidade neuronal do córtex perirrinal e na região da amígdala na prole de ratas com Hipotireoidismo Clínico gestacional.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, da Universidade
Presbiteriana Mackenzie, como requisito
parcial à obtenção de título de Bacharel em
Ciências Biológicas, orientado pela Prof^a.
Dr^a. Miriam Oliveira Ribeiro.

Aprovado(a) em

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Miriam Oliveira Ribeiro
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Prof^a. Ms. Samuel Pereira Batista
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Prof^a. Dr^a. Esther Lopes Ricci Adari Camargo
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Dedico este trabalho a Deus que tem sido meu pilar sustentador. E ao meu marido Bruno, que esteve sempre nas trincheiras comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, a Deus primeiramente por ter me sustentado com sua poderosa mão até aqui. Sem Deus eu não teria a coragem necessária para concluir esse projeto. Agradeço ao meu marido que me incentivou todas as vezes durante esses anos e carregou meus fardos junto comigo. Agradeço aos meus parentes que sempre se orgulharam da minha trajetória e ofereceram todo suporte e ajuda.

A Universidade Presbiteriana Mackenzie pela disponibilidade do espaço para pesquisa, equipamentos e suporte financeiro. Agradeço ao Departamento Ciências Biológicas e da Saúde, todos os seus docentes e ao ex coordenador Adriano de Castro pela ótima formação e ensinamentos tanto acadêmicos quanto pessoais.

A minha orientadora Miriam Ribeiro por confiar essa responsabilidade a mim e me proporcionar essa oportunidade de aprender com toda sua equipe. Aos alunos do laboratório de Neurociência e Metabolismo Energético, Samuel, Beatriz, Bruna, Juliana, Laís, Alice e ao técnico Eduardo por todo conhecimento transmitido, ajuda, instrução, colaboração e ótimos momentos compartilhados durante meu período de graduação e produção do TCC.

Por fim, agradeço aos meus amigos que me ensinaram sobre coragem e altruísmo. E que deixaram esses 4 anos mais leves e fáceis, Thayna e Stefany.

RESUMO

O primeiro trimestre de gestação é considerado um período crítico no desenvolvimento do sistema nervoso central do feto, que é dependente do hormônio tireoidiano. Considerando que a tireoide fetal amadurece e se torna biologicamente ativa na 14^a semana de gestação, o hormônio tireoidiano materno é fundamental para que esse processo transcorra adequadamente. Assim, falhas na disponibilidade de hormônio tireoidiano materno nos estágios iniciais de desenvolvimento podem acarretar impactos cognitivos e comportamentais na prole. Estudos mostram que crianças de até 9 anos de idade, cujo as mães apresentaram hipotireoidismo clínico no 1^o trimestre gestacional, revelaram déficits de QI em comparação a crianças de mães eutireoideas. O desenvolvimento de estratégias que visem corrigir esses possíveis déficits é essencial para garantir o desenvolvimento e qualidade de vida desses indivíduos. O enriquecimento ambiental é uma estratégia que compreende estímulos físicos, sensoriais, sociais, cognitivos e alimentares que melhora os comportamentos considerados normais e inibe o aparecimento de comportamentos anormais nos animais. De fato, o enriquecimento ambiental demonstrou, em estudos anteriores, melhoras significativas na restauração da memória de curto prazo e a ansiedade, e também a melhora dos comportamentos depressivos de filhotes de ratas com hipotireoidismo gestacional moderado. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o enriquecimento ambiental modificou a densidade neuronal e a morfologia das áreas do hipocampo, córtex perirrinal, amígdala e especificamente a amígdala basolateral e quais os mecanismos envolvidos na melhora da cognição induzidas pelo enriquecimento ambiental em filhotes de fêmeas com hipotireoidismo moderado. Utilizamos um protocolo de enriquecimento ambiental de 8 semanas padronizado pelo próprio grupo de pesquisa. Após isso, fatiamos os cérebros dos ratos para posterior coloração e análise das regiões escolhidas. Nosso estudo mostrou que não há diferença estatisticamente significativa na análise das áreas do hipocampo (CA1, CA2, CA3) e das estruturas do córtex perirrinal, amígdala e amígdala basolateral entre os grupos estudados. No entanto, observou-se um aumento significativo na espessura do giro denteado (GD) nos animais do grupo HC-EA em comparação com o grupo HC n-EA.

Palavras-chave: Gestação, Enriquecimento Ambiental, Hipotireoidismo.

ABSTRACT

The first trimester of gestation is considered a critical period in the development of the fetal central nervous system, which is dependent on thyroid hormone. Considering that the fetal thyroid matures and becomes biologically active by the 14th week of gestation, maternal thyroid hormone is critical for this process to take place properly. Thus, failures in the availability of maternal thyroid hormone in the early stages of development can lead to cognitive and behavioral impacts on the offspring. Studies show that children up to 9 years of age, whose mothers had clinical hypothyroidism in the 1st trimester of gestation, showed IQ deficits compared to children from euthyroid mothers. The development of strategies that aim to correct these possible deficits is essential to ensure the development and quality of life of these individuals. Environmental enrichment is a strategy that comprises physical, sensory, social, cognitive, and food stimuli that improves behaviors considered normal and inhibits the appearance of abnormal behaviors in animals. Indeed, environmental enrichment has demonstrated, in previous studies, significant improvements in restoring short-term memory and anxiety, and also the improvement of depressive behaviors in pups of rats with moderate gestational hypothyroidism. Thus, the aim of the present study was to evaluate whether environmental enrichment modified the neuronal density and morphology of the areas of the hippocampus, perirhinal cortex, amygdala and specifically the basolateral amygdala, and what mechanisms are involved in the improvement of cognition induced by environmental enrichment in female pups with moderate hypothyroidism. We used an 8-week environmental enrichment protocol standardized by our own research group. After this, we sliced the brains of the rats for subsequent staining and analysis of the chosen regions. Our study showed no statistically significant difference in the analysis of hippocampal areas (CA1, CA2, CA3) and structures of the perirhinal cortex, amygdala and basolateral amygdala between the groups studied. However, a significant increase in the thickness of the dentate gyrus (GD) was observed in the animals of the HC-EA group compared to the HC n-EA group.

Keywords: Pregnancy, Environmental Enrichment, Hypothyroidism.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivo Geral	10
2.2	Objetivos Específicos	10
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
4	MÉTODOS	14
4.1	Animais.....	14
4.2	Cruzamento.....	15
4.3	Indução do Hipotireoidismo Gestacional por Tireoidectomia (n=16) ..	15
4.4	Grupos Experimentais	16
4.5	Análise Morfológica	17
4.6	Análise Estatística.....	18
4.7	Hipocampo	18
4.8	CPR, Amígdala e BLA.....	19
5	RESULTADOS.....	20
5.1	Hipocampo	20
5.2	CPR.....	23
5.3	Amígdala	24
5.4	BLA	26
6	DISCUSSÃO	27
7	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

Mulheres com hipotireoidismo tem fertilidade reduzida e sofrem em proporções maiores com o risco de aborto, hipertensão gestacional, anemia, descolamento da placenta e hemorragia pós-parto (MARTINS-COSTA et al., 2017). Durante o período gestacional a prevalência de hipotireoidismo em mulheres foi estimada em 0,3-0,7% (GLINOER, 1997). A disfunção nos níveis dos hormônios tireoidianos (HT) pode comprometer também o desenvolvimento cognitivo do feto (WILLIAMS, 2008).

A partir da 9ª semana de gestação já é observada a expressão de receptores para o hormônio tireoidiano (TRs). Considerando que a produção de HT fetal se inicia apenas a partir da 14ª semana, é muito provável que o HT materno se liga aos TRs fetais durante o primeiro trimestre gestacional (SAHAY; NAGESH, 2012).

O primeiro trimestre de gestação é considerado, portanto, um período crítico, pois o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) do feto é dependente do HT materno. Em um estudo com grávidas hipotireoideas que receberam tratamento logo no primeiro trimestre, apenas 2% das proles foram afetadas com graves anormalidades neurológicas. Porém, quando o tratamento foi iniciado mais tardiamente, 9% da prole foi gravemente comprometida (CAO et al., 1994). Portanto, o diagnóstico e tratamento imediato do hipotireoidismo na gravidez são essenciais, com periódica avaliação dos níveis de TSH e T4 livre da mãe. Uma falha na disponibilidade de HT materno, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, pode acarretar impactos cognitivos e comportamentais, entre outros (MORREALE DE ESCOBAR; OBREGON, 2004; PUIG-DOMINGO, 2013).

O desenvolvimento de estratégias que visem corrigir esses possíveis déficits é essencial para garantir o desenvolvimento e qualidade de vida desses indivíduos, principalmente em casos em que não foi possível diagnosticar ou iniciar um tratamento eficaz nas mães precocemente.

O enriquecimento ambiental (EA) é uma estratégia utilizada para incentivar a expressão de comportamentos considerados normais ao mesmo tempo que procura inibir o aparecimento de comportamentos anormais, sejam eles de caráter quantitativo ou qualitativo, através de modificações no ambiente. O EA inclui estímulos sociais, físicos, sensoriais, cognitivos e alimentares (NEWBERRY, 1995). Além disso, apresenta um efeito positivo sobre aspectos cognitivos nos animais (BENNETT, 1974; DIAMOND, 1964; KEMPERMANN; KUHN, 1997).

O potencial do EA foi demonstrado em diversos estudos que identificaram que animais, quando submetidos a um ambiente físico e social complexo, apresentavam melhoria no bem-estar, cognição e comportamento. Em estudos com roedores, foi observado que o EA proporciona mudanças comportamentais, morfológicas, neuroquímicas e moleculares além da redução e prevenção de alterações cognitivas e neuroquímicas (PHAM et al., 1999).

Considerando que o EA exibe influência positiva na cognição, nós avaliamos as possíveis alterações histo-morfológicas cerebrais que poderiam estar envolvidas nas alterações do comportamento dessa prole após exposição ao EA. O entendimento desses mecanismos é essencial para melhor compreensão da neuroplasticidade envolvida na reversão de déficits cognitivos induzidos pela falta de HT materno durante a gestação. Diante disto, o objetivo do presente estudo foi analisar os mecanismos envolvidos na recuperação dos impactos cognitivos observados em ratos nascidos de mães com hipotireoidismo clínico gestacional a partir da administração de EA. Para isso focamos em áreas relacionadas a cognição e comportamento, bem como aprendizado e memória para comparar o número de neurônios entre os grupos experimentais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar se alterações morfofuncionais em estruturas do sistema límbico estão envolvidas na recuperação dos impactos cognitivos observados em ratos nascidos de mães com hipotireoidismo clínico gestacional a partir da administração de EA.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a espessura do hipocampo de ratos nascidos de mães com hipotireoidismo clínico gestacional a partir da administração de EA.
- Avaliar a densidade neuronal do córtex perirrinal, amígdala e amígdala basolateral de ratos nascidos de mães com hipotireoidismo clínico gestacional a partir da administração de EA.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Localizada na região anterior do pescoço, a glândula Tireoide é responsável pela secreção dos hormônios tireoidianos (HT), triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) que

atua na regulação do metabolismo de todas as células do corpo. A tireóide é controlada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano (VILAR, 2016). As células tireotróficas representam 5% das células que ocupam a hipófise, e são responsáveis por sintetizar o hormônio estimulante da tireóide (TSH), que se ligará a receptores específicos em células tireoidianas, estimulando a produção e liberação de T4 e T3 pela Tireoide (ABDALLA; BIANCO, 2014). A tetraiodotironina ou tiroxina (T4) é formada pela junção de 2 pares moleculares de iodo, as di-iodotirosinas (DIT), já a tri-iodotironina (T3), é composta por uma DIT e uma monoiodotirosinas (MIT), ou seja, três moléculas de iodo (CERCATO, 2017).

O T4 é considerado um pró-hormônio e é convertido a T3, a forma ativa do HT capaz de se ligar aos receptores nucleares (TRs), pela sua desiodação. As enzimas responsáveis pela desiodação pertencem à família das selenoenzimas iodotironinas desiodases e são de 3 tipos: D1, D2 e D3. A D1 é predominantemente expressa no fígado, ativando e inativando T4. A D2 predomina no sistema nervoso central (SNC) e sua função é converter T4 em T3. A D3 é expressa nos tecidos que estão em desenvolvimento, principalmente no SNC e placenta e atua inativando T3 e T4 (BIANCO, 2006; CROTEAU et al., 1995).

O HT é responsável por exibir papel fundamental no desenvolvimento normal do feto. No SNC, regula os processos de migração e diferenciação neuronal e das células da glia (BERNAL, 2007; WIDMAIER et al., 2017). Na gravidez a produção de HT materno aumenta de 20% a 50% (MEDICI, 2016).

Na 9ª semana de gestação, o feto começa a expressar TRs para o HT, apesar de ainda não ter a tireoide formada e nem produção própria de HT. Assim, durante esse período, a fonte de HT para o feto é exclusivamente materna. O HT se liga aos TRs fetais promovendo a proliferação neuronal e migração no SNC. Por volta da 11ª semana, o feto começa a formar sua tireoide que estará plenamente formada por volta da 15ª semana de gestação, quando começará a sintetizar e liberar HT fetal. No início do 2º trimestre, os HTs, tanto de origem materna quanto do feto, participam dos processos relacionados à neurogênese, migração neuronal, mielinização, diferenciação de células da glia, arborizações dendríticas e sinaptogênese. No 3º trimestre, o HT participa dos processos de maturação do SNC. Finalmente, na fase pós-natal a produção de HT passa a depender totalmente do feto (MORREALE DE ESCOBAR; OBREGON, 2004; WILLIAMS, 2008).

O hipotireoidismo é um estado clínico onde há uma diminuição de T4

acompanhada por um aumento no TSH que impacta negativamente diversos órgãos por reduzir as atividades metabólicas do organismo (BUDENHOFER, 2013; SPRINGER, 2017). A deficiência nos níveis adequados de HT durante a gestação e principalmente durante o primeiro trimestre pode levar à diminuição da sobrevivência e da quantidade de neurônios, com consequências para o bom funcionamento cognitivo, dificuldade no aprendizado e problemas na memória (PUIG-DOMINGO, 2013; WILLIAMS, 2008).

Filhos de gestantes com Hipotireoidismo Clínico (HC) que receberam tratamento com iodo no 1o e 2o trimestre apresentaram disfunções cognitivas moderadas, porém a tardia suplementação resultou no aumento da gravidade dessas disfunções, sugerindo que o período crítico de desenvolvimento dependente de HT materno ocorre no primeiro trimestre gestacional (FENG et al., 2017). Crianças de 10 meses a 9 anos de idade, cujo as mães apresentaram HC no 1º trimestre gestacional, revelaram déficits de QI em comparação a crianças de mães eutireoideas (HADDOW et al., 1999).

Estudos experimentais com roedores demonstraram que filhotes de mães com HC gestacional apresentaram prejuízo no aprendizado e na memória (LU, 2012; PATHAK, 2011; SHAFIEE; VAFAEI, 2016), com distribuição aberrante de proteínas envolvidas com os processos de formação de memória de longo prazo e com a neuroplasticidade, como a PSD-95, expressa pelo gene *Dlg4* e da subunidade do receptor de glutamato [NMDA] expressa pelo gene *Grin1* (OPAZO et al., 2008). Também foi observada uma lentidão na diferenciação celular na prole de ratos filhos de mães com HC (AMBROGINI et al., 2005).

O córtex perirrinal (CPR) consiste nas regiões de Brodmann 35 e 36 e encontra-se adjacente ao sulco rinal no lobo temporal. Essa posição estratégica facilita sua conexão com o hipocampo e diversas áreas corticais sensoriais (TAYLOR et al., 2006). Estudos recentes em macacos e ratos revelaram conexões fortes entre o CPR, hipocampo e amígdala (BURWELL et al., 1995).

No que se refere à Memória de Reconhecimento de Objetos (MRO), duas regiões são consideradas fundamentais para o seu processamento: o hipocampo e o CPR. Vários estudos reconhecem a importância dessas duas regiões no armazenamento e na recuperação da informação relacionada à MRO (BIALA, 2012; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2008; LIU; BILKEY, 2001; MURRAY; RICHMOND, 2001; TANIMIZU; KONO; KIDA, 2018; WARBURTON; BROWN, 2015; WINTERS;

BUSSEY, 2005).

A capacidade de reconhecimento é uma parte essencial do nosso processo de memória. Ela exige a habilidade de identificar e julgar se algo foi encontrado anteriormente (MANDLER, 1980). A MRO é uma forma específica de memória declarativa que se relaciona com a capacidade de distinguir entre objetos familiares e novos (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

O CPR desempenha um papel significativo na reconsolidação da MRO, abrangendo uma ampla variedade de circunstâncias de reativação dessa memória (MORICI et al., 2018). A reconsolidação ocorre quando memórias consolidadas entram em um estado temporário de instabilidade após serem reativadas, o que permite estabilização, fortalecimento e atualização (LEE et al., 2017; MCKENZIE; EICHENBAUM, 2011; MIRANDA; BEKINSCHTEIN, 2018; NADER et al., 2000; RODRIGUEZ-ORTIZ; BERMÚDES-RATTONI, 2017). A remoção cirúrgica do CPR em macacos e ratos afeta negativamente a capacidade da MRO (MEUNIER et al., 1996; MUMBY; PINEL, 1994).

A formação da memória emocional ocorre através da atividade do complexo amigdalóide ou amígdala, um conjunto de núcleos subcorticais no lobo temporal (JOHNSTON, 1923). A amígdala desempenha um papel importante na formação de memórias emocionais, no reconhecimento e interpretação das emoções, na atenção, bem como na expressão fisiológica das respostas emocionais (AGGLETON, 1993; ALBUQUERQUE; SILVA, 2009; SCOTT et al., 1997). A amígdala é crucial no aprendizado associado a estímulos emocionalmente relevantes, sejam eles recompensadores ou punitivos. Pesquisas em roedores e primatas mostram que a atividade neural nessa região é influenciada de maneira específica pela valência emocional do estímulo (PATON et al., 2006; PAZ et al., 2006). O hipocampo e a amígdala desempenham um papel simultâneo nos estágios iniciais da formação da memória e durante a recuperação da informação (BIANCHIN et al., 1993; IZQUIERDO et al., 1992).

Em um estudo recente conduzido por Paz e colaboradores (2006), foi constatado que a ativação da amígdala basolateral (BLA) melhora o processamento sensorial em situações emocionalmente relevantes. Isso ocorre devido à facilitação da comunicação entre os córtices CPR e entorrinal. Essa facilitação demonstrou uma correlação significativa com o processo de aprendizado, sugerindo que a amígdala desempenha um papel crucial na regulação dos mecanismos de aquisição

e consolidação de informações emocionalmente relevantes, que ocorrem em outras regiões cerebrais. Outras pesquisas mostraram que a BLA pode afetar o potencial sináptico de longo prazo (LTP) no hipocampo. Estímulos fortes na amígdala aumentam a intensidade inicial da LTP, enquanto a desativação ou lesão da BLA reduz sua intensidade (IKEGAYA et al., 1994; IKEGAYA et al., 1996).

O enriquecimento ambiental (EA) engloba técnicas de manejo de animais cativos que fornece estímulos físicos, sociais, sensoriais, cognitivos e alimentares com intuito de proporcionar o bem-estar psicológico e fisiológico melhorando a qualidade de vida desses (MELLEN; SHEPHERDSON, 1997). No entanto, estudos utilizando o EA induziu ao aumento da plasticidade neural e alterações morfológicas, como aumento do peso do cerebelo e de áreas corticais em roedores (BENNETT, 1974; DIAMOND, 1964; KEMPERMANN; KUHN, 1997). Leggio e colaboradores (2005) observaram que em ratos que ficaram em ambiente enriquecido por 2,5 a 3 meses, as espinhas dendríticas nos neurônios piramidais parietais da terceira camada aumentaram.

Além disso, ratos estimulados por EA durante 2 meses após o desmame exibiram aumento da expressão de NGF e BDNF, da neurogênese hipocampal e aumento de 15% no número de neurônios no giro denteado (PHAM et al., 1999; KEMPERMANN; KUHN, 1997). Observou-se também melhora na memória, memória declarativa e redução do comportamento ansioso (KEMPERMANN; KUHN, 1997; HÜTTENRAUCH et al., 2016).

Em um estudo anterior, nós avaliamos o efeito do EA em filhotes de ratas com hipotireoidismo gestacional moderado e observamos que houve uma melhora significativa nos comportamentos do tipo depressivo e ansioso exibido por esses animais. Também observamos melhora importante no prejuízo da memória declarativa desses animais (BATISTUZZO et al., 2022).

Hipótese: Baseados nesses achados, nós nos perguntamos se os efeitos positivos do EA poderiam ser resultado de alterações morfofuncionais do hipocampo, CPR, amígdala e BLA, estruturas envolvidas na cognição e no comportamento.

4 MÉTODOS

4.1 Animais

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Presbiteriana

Mackenzie (CEUA/UPM N° 164/11/2017). Todos os animais foram mantidos no biotério central da Universidade Presbiteriana Mackenzie, campus Higienópolis com período de 12 horas do ciclo claro/escuro e à temperatura média de 25°C. Os animais não submetidos ao protocolo de EA foram mantidos em gabinete ventilado, em caixa de polipropileno, com assoalho recoberto de maravalha. Os grupos submetidos ao EA foram alojados em gaiola com 3 andares com túneis, escadas e redes de modos a manter o ambiente enriquecido. Todos os grupos receberam água e ração à vontade.

4.2 Cruzamento

Foram utilizados 24 ratos Wistar, sendo 8 machos e 16 fêmeas de 8 semanas de idade para cruzamento. Das 16 fêmeas, 8 foram submetidas à tireoidectomia e 8 submetidas à cirurgia sham. Foram utilizados 40 machos nascidos das fêmeas hipotiroideas e sham. Os animais foram escolhidos aleatoriamente entre as ninhadas para comporem os grupos que foram estudados.

4.3 Indução do Hipotireoidismo Gestacional por Tireoidectomia (n=16)

Ratas com 8 semanas de idade (n=8) foram profundamente anestesiadas com quetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e foram submetidas à remoção cirúrgica do tecido glandular incluindo o istmo. Ratas com a mesma idade (n=8) foram submetidas à cirurgia sham para compor o grupo controle. Passados 24 dias da cirurgia, foi administrado T4 via gavagem (0.7ug/100 g de peso corpóreo) caracterizando um quadro de hipotireoidismo clínico (HC). Essa dose foi escolhida para induzir um quadro de hipotireoidismo leve, visto que uma severidade maior poderia comprometer o sucesso reprodutivo ou inviabilizar uma gestação. Após mais 21 dias, todas as fêmeas foram colocadas junto a machos adultos (n=8) para o acasalamento. Ratas do grupo controle receberam água filtrada por gavagem e foram colocadas para acasalamento no mesmo período que o grupo HC. Após o parto (P1), as fêmeas foram acondicionadas individualmente com suas proles. No P21, os filhotes foram desmamados e as mães foram eutanasiadas pela administração intraperitoneal de quetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e decapitadas. Após os desmames, os filhotes machos foram acondicionados em gaiolas convencionais até o P60. Após isto, 20 filhotes de cada grupo foram aleatoriamente escolhidos e divididos em 2 subgrupos: que receberam enriquecimento ambiental (n=10) por 8 semanas e que receberam manejo

convencional não enriquecido (n=10).

4.4 Grupos Experimentais

Para avaliar o efeito do EA administrado da infância até a idade adulta, foram estudados os seguintes grupos:

- 1- Controle (Ctrl n-EA) (n=10): animais nascidos de mães eutireoideas e mantidos em ambiente convencional.
- 2 - Hipo (HC n-EA) (n=10): animais nascidos de mães hipotireoideas e mantidos em ambiente convencional.
- 3- Controle Enriquecido (Ctrl-EA) (n=10): animais nascidos de mães eutireoideas e mantidos em ambiente enriquecido por 8 semanas, de P60 até P116.
- 4 - Hipo Enriquecido (HC-EA) (n=10): animais nascidos de mães hipotireoideas e mantidos em ambiente enriquecido por 8 semanas, de P60 até P116.

Os animais do grupo enriquecidos foram distribuídos em duas gaiolas idênticas de 4 andares (98x50x120) forradas com maravalha conforme a Figura 1. As intervenções foram realizadas duas vezes por semana, em dias alternados ao longo de 8 semanas, simultaneamente e idênticas em ambas as gaiolas. Este protocolo de EA abrange os 5 subtipos de enriquecimentos: Estímulos físicos, sensoriais, sociais, cognitivos e alimentares, seguindo protocolo já utilizado pelo presente grupo de estudo (BATISTUZZO et al., 2022) (Tabela 1).

Tabela 1 - Cronograma de intervenções para enriquecimento ambiental ao longo de 8 semanas, 2 vezes por semana (enriquecimento 1 e 2 respectivamente).

Semanas	Enriquecimento 1	Enriquecimento 2
1	Ambientação com o novo recinto.	Semente de girassol em caixa de luva
2	Redes de balanço e túneis.	Pote de água com ervilhas congeladas.
3	Algodão de diferentes tamanhos em um andar do recinto.	Esconder frutas de preferencia em uma caixa com maravalha.
4	Cenoura em diferentes tamanhos.	Bolinhas plásticas em caixa com maravalha.
5	Trilha com tempeiro (Orégano, erva cidreira ou camomila).	Arroz integral cozido, salada de frutas (banana, maçã e uva).

Semanas	Enriquecimento 1	Enriquecimento 2
6	Gelo no pote com ou sem água.	Pendurar banana-maçã com barbante na gaiola.
7	Pendurar espelho em um dos andares.	Gelatina incolor e colorida com passas.
8	Maravalha de camundongo suja em pontos de foco.	Colocar folhas de jornal em um andar do recinto.

Fonte: Protocolo padronizado pelo presente grupo de pesquisa.

Figura 1 - Gaiola de EA utilizada pelo presente grupo de pesquisa.



Fonte: Batistuzzo et al (2022).

4.5 Análise Morfológica

Após o período de EA, aos 116 dias de idade, parte dos animais estudados foram escolhidos aleatoriamente para avaliação histomorfológica. Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de quetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e, após a perda de consciência e sensibilidade, foram submetidos à

Perfusão Transcardíaca com o fixador. O cérebro foi fatiado para posterior coloração e análise. A densidade neuronal foi avaliada por meio da coloração de Nissl (Violeta de Cresil).

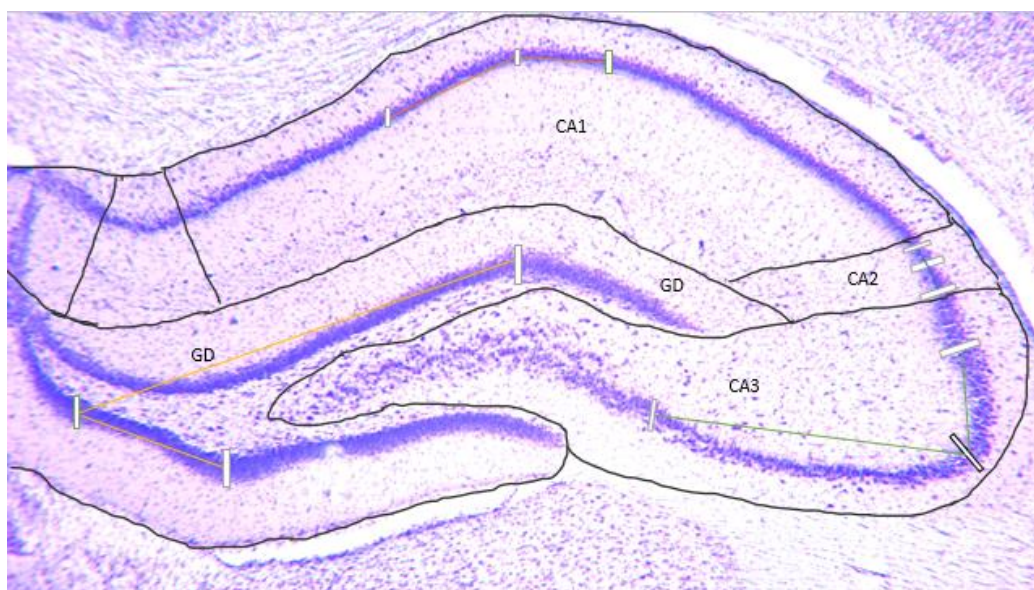
4.6 Análise Estatística

A significância estatística da diferença entre os valores médios entre mais de dois grupos foi avaliada pela ANOVA de 2 vias pelo software Graphpad. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

4.7 Hipocampo

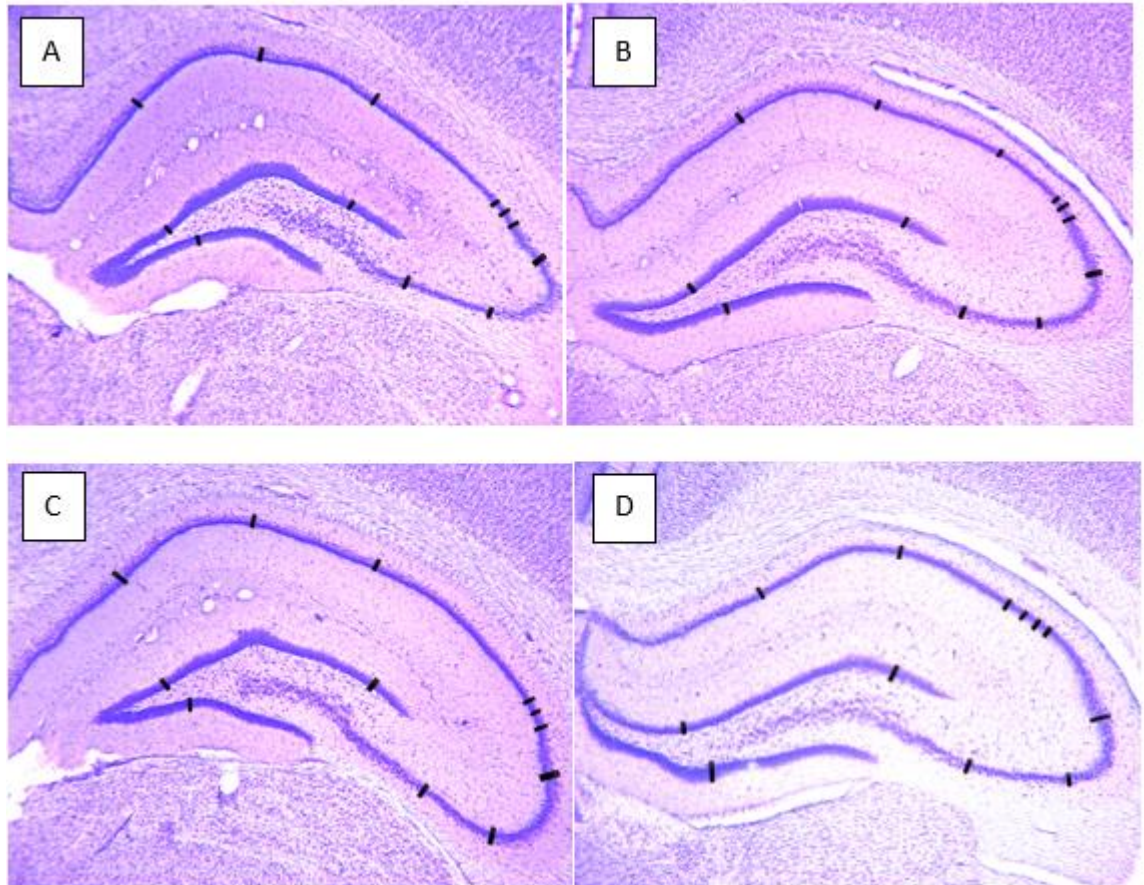
O cérebro foi fatiado para coloração e análise por meio da coloração de Nissl (Violeta de Cresil). A espessura do hipocampo de cada animal foi medida nas regiões CA1, CA2, CA3 e GD (Figura 2). As fotos a seguir foram divididas por áreas do hipocampo, conforme a Figura 2. Todas as imagens utilizadas exibiram a mesma escala 19,05 x 25,4cm para posterior comparação das medidas do hipocampo entre os diferentes grupos. Foram escolhidas lâminas do hipocampo em alturas semelhantes para que isso não interferisse nos resultados. Também foi padronizado os pontos para realização das medidas. Os três pontos utilizados de medidas para cada região do hipocampo estão evidenciados na Figura 3. As imagens do hipocampo foram fotografadas por uma câmera fotográfica acoplada a microscópio da Universidade Presbiteriana Mackenzie, usando o Software Motica. Foram utilizados de 2 a 3 animais por grupo para a análise.

Figura 2 - Hipocampo de rato macho evidenciando as áreas CA1, CA2, CA3 e GD. Coloração em Nissl. Aumento de 40x.



Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

Figura 3 - Hipocampo de ratos machos evidenciando os pontos nos quais foram feitas as medidas da espessura nas áreas CA1, CA2, CA3 e GD. A) Ctrl n-EA; B) HC n-EA; C) Ctrl-EA e D) HC-EA. Coloração de Nissl. Aumento 40x.

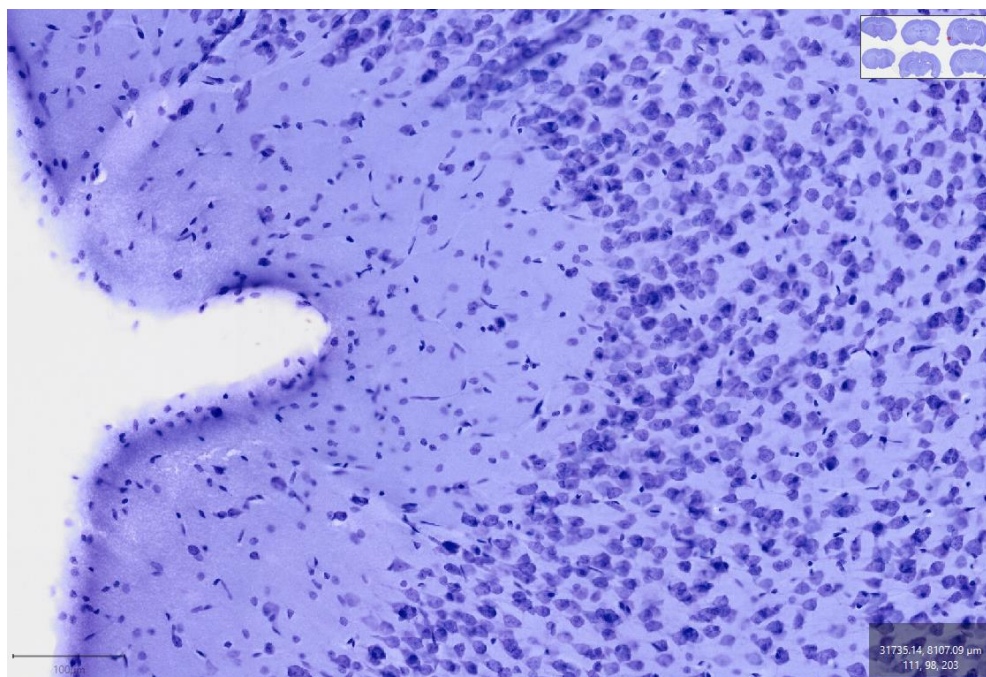


Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

4.8 CPR, Amígdala e BLA

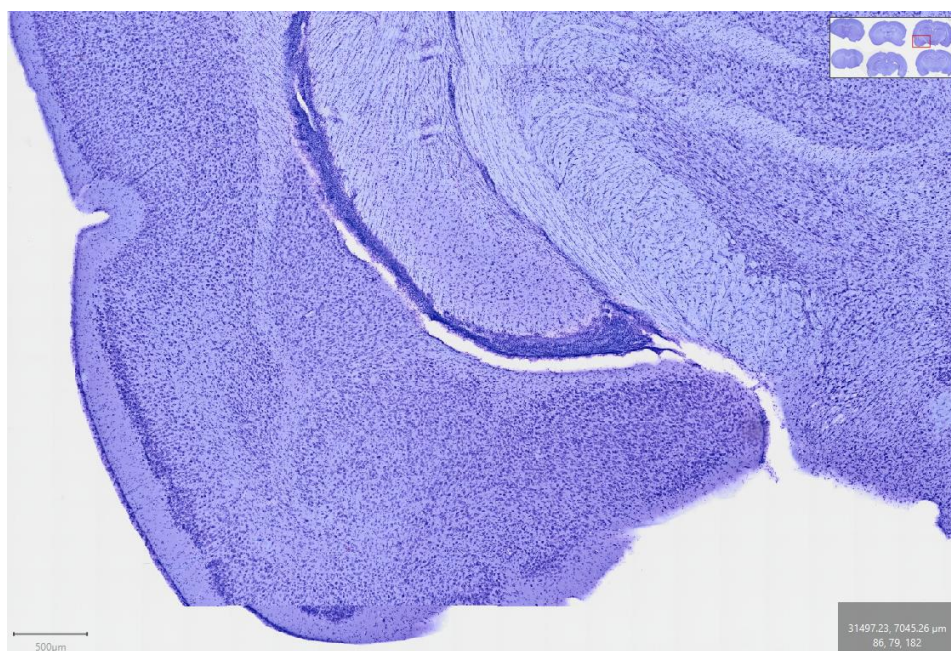
O cérebro foi fatiado para coloração e análise por meio da coloração de Nissl (Violeta de Cresil). Foi analisado através do QuPath a densidade neuronal (número de neurônios dividido pela área da estrutura) do CPR (Figura 4), amígdala e BLA (Figura 5) de todos os grupos. Para localizar esta estrutura em diferentes alturas dos cortes, usamos o Atlas "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates" de Paxinos e Watson (2014). Analisamos a densidade neuronal do hemisfério direito e do esquerdo.

Figura 4 - CPR de rato macho em coloração de Nissl, visualizada pelo QuPath.



Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

Figura 5 - Região da amígdala e da BLA de rato macho em coloração de Nissl, visualizada pelo QuPath.



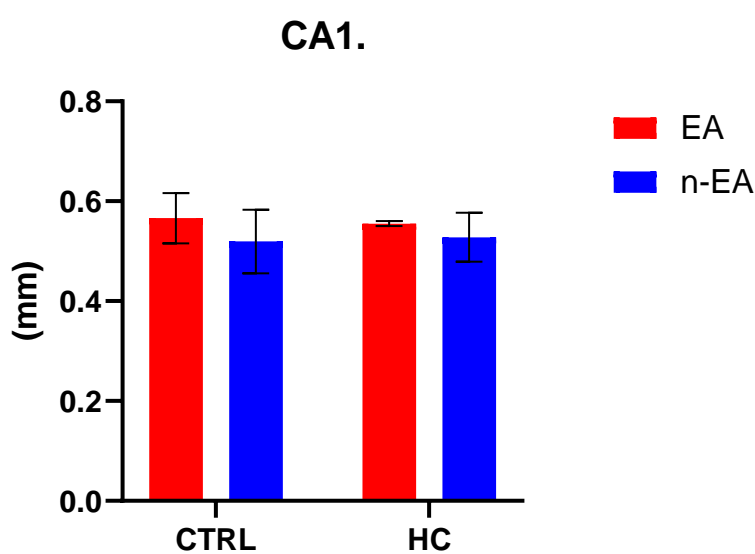
Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

5 RESULTADOS

5.1 Hipocampo

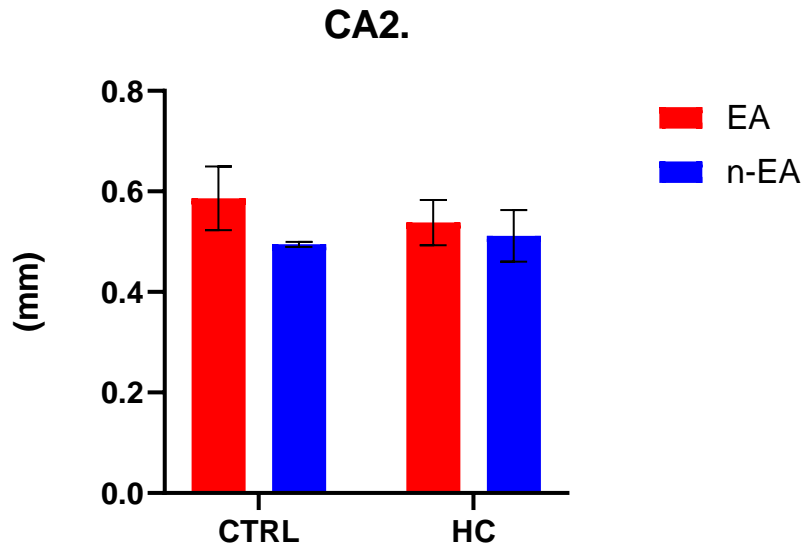
Medida da espessura do hipocampo. Como podemos observar nas Figuras 6, 7 e 8, as medidas da espessura do hipocampo mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA nas áreas do CA1, CA2 e CA3. No entanto, na Figura 9, foi notado um aumento significativo na espessura do GD nos animais pertencentes ao grupo HC-EA em comparação com o grupo HC n-EA, sendo o valor de $p=0.0141 < 0.05$.

Figura 6 - Espessura do hipocampo de ratos machos na área CA1 em Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA.



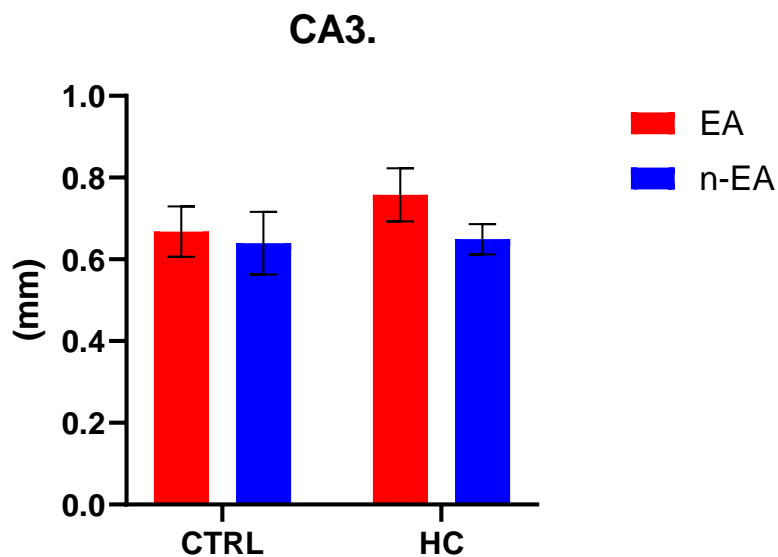
Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

Figura 7 - Espessura do hipocampo de ratos machos na área CA2 em Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA.



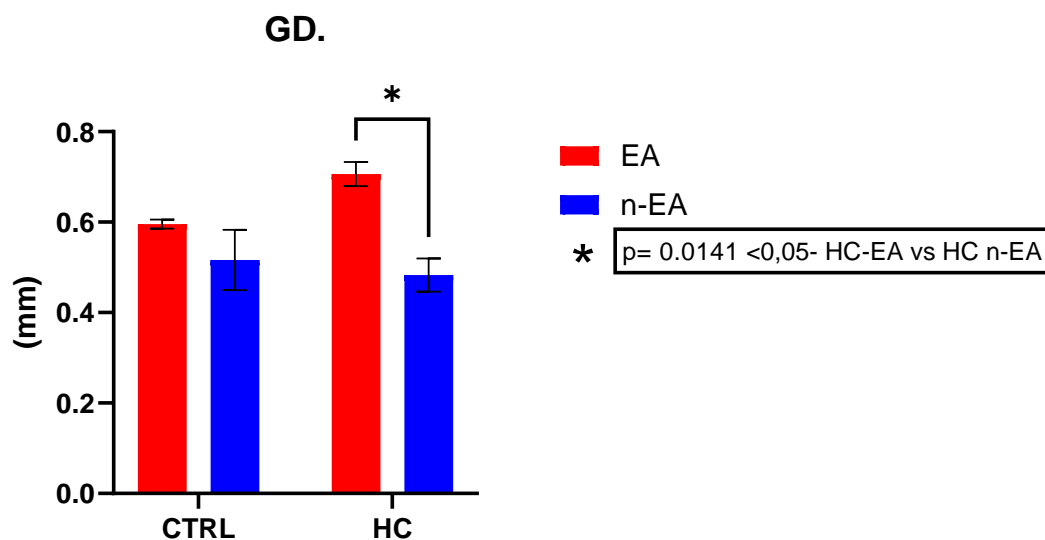
Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

Figura 8 - Espessura do hipocampo de ratos machos na área CA3 em Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA.



Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

Figura 9 - Espessura do hipocampo de ratos machos na área GD em Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA. Evidenciando, um aumento significativo na espessura dos animais pertencentes ao grupo HC-EA em comparação com o grupo HC n-EA. Sendo o valor de $p= 0.0141 < 0,05$.

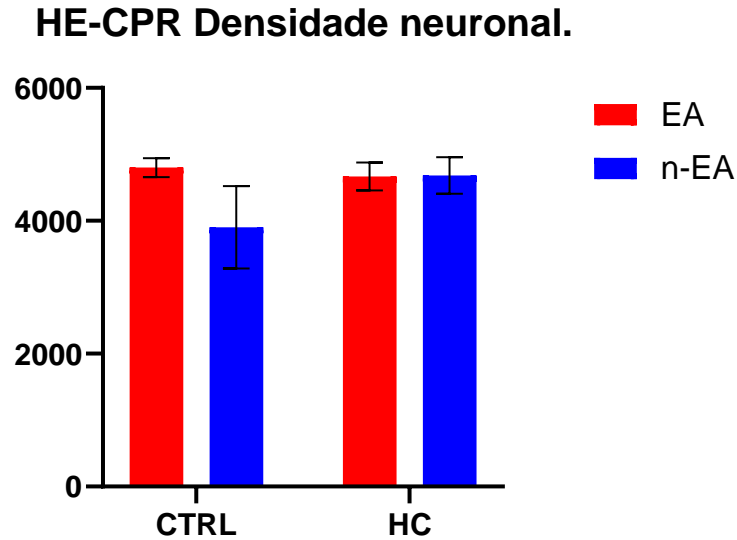


Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

5.2 CPR

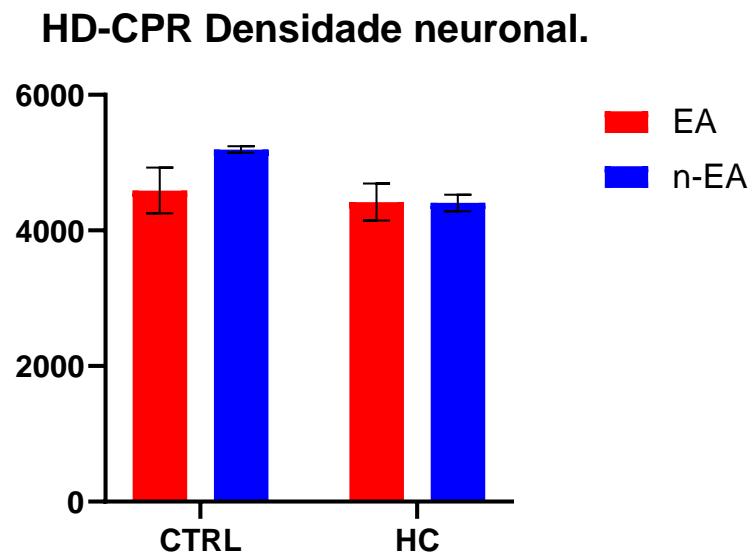
Medida da densidade neuronal do CPR. Como podemos observar nas Figuras 10 e 11, as medidas da densidade neuronal mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA.

Figura 10 - Densidade neuronal do CPR – Hemisfério esquerdo (HE) de ratos machos em Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA.



Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

Figura 11 - Densidade neuronal do CPR – Hemisfério direito (HD) de ratos machos em Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA.



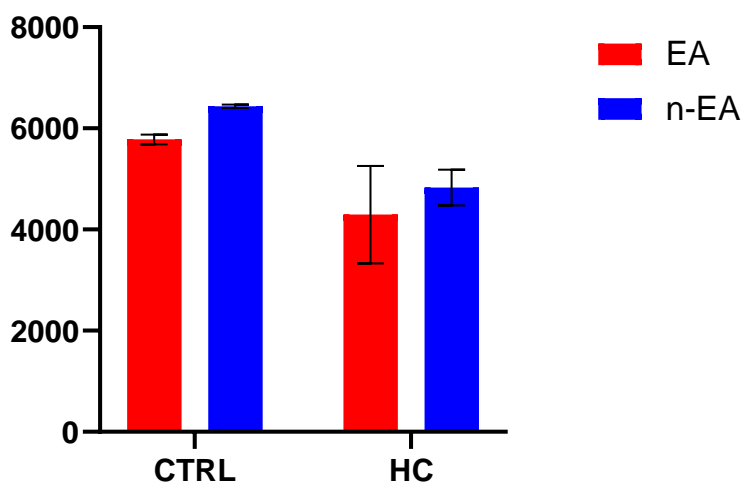
Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

5.3 Amígdala

Medida da densidade neuronal da amígdala. Como podemos observar nas Figuras 12 e 13, as medidas da densidade neuronal mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA.

Figura 12 - Densidade neuronal da amígdala– Hemisfério esquerdo (HE) de ratos machos em Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA.

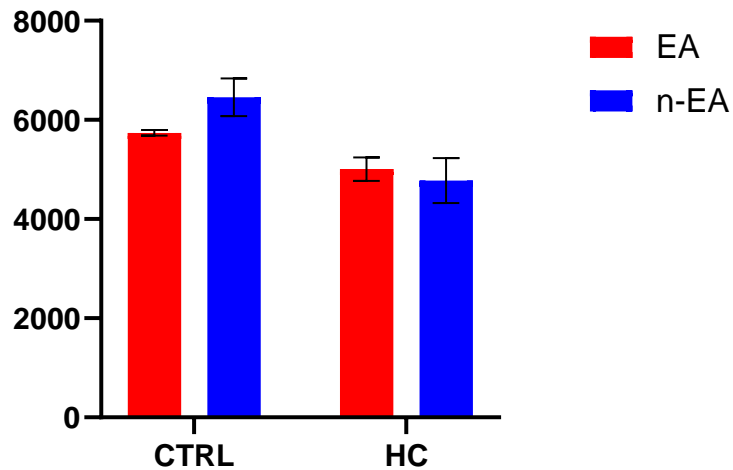
HE-Amígdala Densidade neuronal.



Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

Figura 13 - Densidade neuronal da amígdala– Hemisfério direito (HD) de ratos machos em Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA.

HD-Amígdala Densidade neuronal.



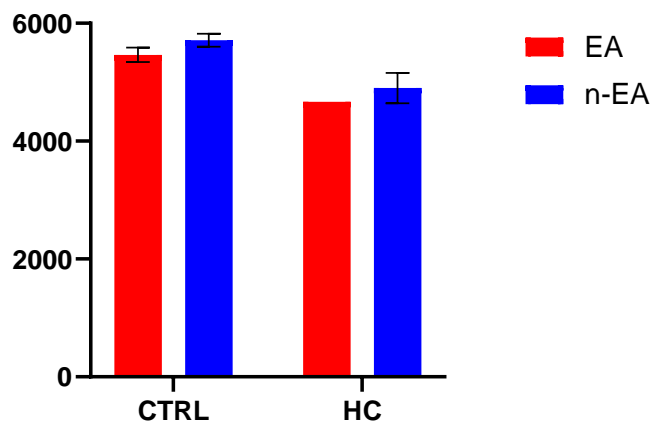
Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

5.4 BLA

Medida da densidade neuronal da BLA. Como podemos observar nas Figuras 14 e 15, as medidas da densidade neuronal mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA.

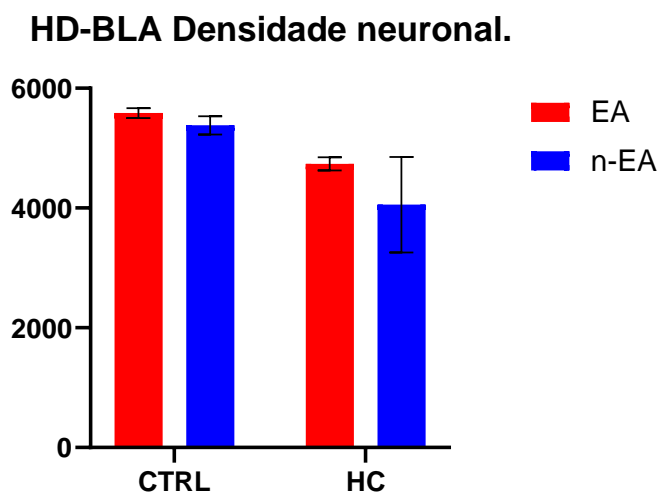
Figura 14 - Densidade neuronal da BLA– Hemisfério esquerdo (HE) de ratos machos em Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA.

HE-BLA Densidade neuronal.



Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

Figura 15 - Densidade neuronal da BLA– Hemisfério direito (HD) de ratos machos em Ctrl n-EA; HC n-EA; Ctrl-EA e HC-EA.



Fonte: Figura padronizada pelo presente grupo de pesquisa.

6 DISCUSSÃO

A análise das áreas do hipocampo: CA1, CA2, CA3 não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos estudados, assim como a análise do CPR, amígdala e BLA. No entanto, o GD dos animais HC-EA exibiu aumento significativo na sua espessura quando comparado ao GD dos animais do grupo HC n-EA. Esse dado corrobora dados da literatura que mostram que o EA leva a aumento na neurogênese hipocampal de roedores. O EA proporcionou um aumento de 15% dos neurônios no giro dentado do hipocampo de camundongos (KEMPERMANN; KUHN, 1997). Assim, é possível que a melhora nas habilidades cognitivas e das alterações comportamentais, como restauração da memória de curto prazo e a ansiedade, e melhora nos comportamentos depressivos, nos filhotes de mães com hipotireoidismo gestacional vistas em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (BATISTUZZO et al., 2022), pode estar associada ao aumento na espessura do GD.

De acordo com o estudo de Lambert et al. (2005), o EA pode ocasionar alterações nas regiões cerebrais ligadas ao aprendizado e à memória, tais como o hipocampo e o neocórtex. A exposição ao EA leva ao aumento da espessura do

córtex em animais, de acordo com Diamond (2001) e Marashi et al. (2003). Apesar desses estudos, não conseguimos comprovar que a submissão ao EA aumenta de forma significativa a densidade neuronal na região do CPR.

No estudo de Leggio et al. (2005), foi constatado que a prática de exercícios físicos resultou em uma maior concentração de sinaptofisinas no córtex e no hipocampo, em comparação com a exposição a estímulos cognitivos. Além disso, os animais submetidos a exercícios apresentaram melhorias significativas na memória. Dessa forma, pode-se concluir que o estímulo cognitivo isolado pode não ser suficiente para aprimorar a memória, enquanto o exercício físico por si só é capaz de promover essa melhora de forma significativa. Considerando que nosso protocolo de enriquecimento ambiental não se concentrou exclusivamente em estímulos físicos, é possível conjecturar que um protocolo que oferecesse uma maior variedade de atividades físicas aos ratos poderia resultar em um notável aumento na densidade neuronal nas regiões cerebrais relacionadas à memória, como o CPR, amígdala e BLA.

No contexto do estímulo alimentar, oferecer uma diversidade de alimentos pode ser uma abordagem interessante para enriquecer o ambiente dos animais. Essa alteração estimula a busca e manipulação dos alimentos, o que pode resultar em uma melhoria da nutrição dos animais (NEWBERRY, 1995). Entretanto, quando utilizada em pesquisas laboratoriais, a introdução de uma variedade de alimentos pode apresentar desafios, devido à falta de uniformidade na dieta dos animais, bem como à falta de praticidade na alimentação, o que pode impactar negativamente a condução dos estudos. De forma intrigante, ratos que residem em EA demonstram um consumo reduzido de glicose em comparação aos animais que vivem em um ambiente convencional (DIAMOND, 2001). No protocolo de EA que utilizamos, incluímos a prática de pendurar banana-maçã em um barbante. Levando em consideração esses aspectos, é essencial avaliar cuidadosamente a maneira como o estímulo alimentar é aplicado no enriquecimento ambiental, a fim de evitar possíveis impactos negativos na condução do estudo e garantir a praticidade no consumo do alimento.

Ao abordar o estímulo social, é crucial considerar que o acúmulo excessivo de animais em um único ambiente pode desencadear estresse. No entanto, em ambientes enriquecidos, esse efeito parece ser reduzido (DIAMOND, 2001). Com base nessas informações, podemos afirmar que o estímulo social utilizado não teve

um impacto negativo nos resultados, uma vez que utilizamos duas gaiolas enriquecidas idênticas, com quatro andares cada (98x50x120). Em cada gaiola, foram colocados apenas 10 animais. Levando em consideração o tamanho das gaiolas em relação ao número de ratos, acreditamos que não houve aglomeração de animais em um espaço reduzido.

A existência de um ambiente externo mais agradável pode estimular os sentidos dos animais e, conseqüentemente, reduzir o estresse. No entanto, a presença de pessoas pode ser um fator estressante para os animais (NEWBERRY, 1995). Esse aspecto pode ter influenciado negativamente nossos resultados, uma vez que as gaiolas de EA estavam situadas no biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie, onde ocorre a circulação frequente de diversos alunos e pesquisadores manuseando seus animais de pesquisa. A presença constante de outras pessoas nesse ambiente pode ter contribuído para que o entorno das gaiolas não fosse um local tranquilo e agradável, tornando-se, assim, uma fonte adicional de estresse para os animais. Porém, é importante ressaltar que essa limitação ocorreu com os dois grupos, tanto o HC-EA quanto o CTRL-EA.

Marashi et al. (2003) observaram que a incorporação de objetos teve um efeito benéfico na redução do comportamento agressivo exibido pelos animais. Os roedores demonstram uma preferência por redes e abrigos que proporcionem proteção contra a luz. Além disso, a presença de objetos pode distrair os animais e ajudar a reduzir seu nível de estresse (NEWBERRY, 1995). Em nosso protocolo, incluímos uma variedade de objetos nas gaiolas de enriquecimento ambiental, como redes de balanço e abrigos em forma de túneis. Levando em conta as informações dos artigos citados, constatamos que o uso desses objetos teve um efeito positivo.

Embora haja vários experimentos mencionados com resultados promissores, ainda não é possível afirmar com certeza quais fatores são diretamente aprimorados pelo uso do enriquecimento (LEGGIO et al., 2005). Isso ocorre porque a variação nos resultados das pesquisas com enriquecimento é influenciada pela individualidade de cada animal, como destacado por Diamond (2001).

É inegável o impacto positivo do EA no desempenho de animais criados em ambientes enriquecidos, em contraste com aqueles mantidos em ambientes convencionais. Estudos têm revelado uma notável melhoria na função de memória e aprendizagem após a exposição ao ambiente enriquecido (NILSSON et al., 1999, WILLIAMS et al., 2001; MESHİ et al., 2006; ECKERT et al., 2010). No entanto, em

nossa própria pesquisa, constatamos uma diferença estatisticamente significativa apenas no aumento da espessura do GD do grupo HC-EA quando comparado ao grupo HC n-EA. Esses resultados ressaltam a necessidade de estudar e aplicar o enriquecimento ambiental de forma precisa e específica para roedores, a fim de promover um bem-estar animal otimizado. Possivelmente, a alteração de alguns fatores na implementação de nosso protocolo de EA poderia contribuir para mudanças significativas na densidade neuronal no CPR, amígdala e BLA, regiões estas, relacionadas a memória e o aprendizado.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar quais alterações no hipocampo, CPR, amígdala e BLA são observados após a administração do EA em ratos nascidos de mães com HC gestacional de modo a compreender os mecanismos envolvidos na recuperação dos impactos cognitivos exibidos por esses animais.

O EA é conhecido por promover melhorias na memória e aprendizagem em animais (LU, 2012; PATHAK, 2011; SHAFIEE; VAFAEI, 2016). No entanto, em nosso estudo, apenas observamos um aumento significativo na espessura do GD no hipocampo dos animais do grupo HC-EA em comparação com o grupo HC n-EA. Comprovando que o EA proporciona mudanças comportamentais induzidas por prejuízos no desenvolvimento embrionário, assim como leva a alterações morfológicas no hipocampo. Entretanto, não encontramos diferenças estatisticamente significativas em outras áreas cerebrais estudadas, como CA1, CA2, CA3, CPR, amígdala e BLA. Isso sugere que o impacto do EA pode ser específico para determinadas regiões cerebrais. Portanto, é importante realizar pesquisas mais aprofundadas e personalizadas para entender melhor como o EA pode afetar o bem-estar animal e a função cognitiva.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, S. M.; BIANCO, A. C. Defending plasma T3 is a biological priority. **Clinical Endocrinology**, v. 81, n. 5, p. 633–641, nov. 2014.
- AGGLETON, J.P. The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. **Trends in Neurosciences**, v. 16, n. 8, p. 328-333, 1993.
- ALBUQUERQUE, F. DA S.; SILVA, R. H. A amígdala e a tênue fronteira entre

memória e emoção. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 31, n. 3, 2009.

AMBROGINI, P. et al. Thyroid Hormones Affect Neurogenesis in the Dentate Gyrus of Adult Rat. **Neuroendocrinology**, v. 81, n. 4, p. 244–253, 2005.

BATISTUZZO, A., et al. A estimulação multissensorial melhora a cognição e o comportamento em ratos machos adultos nascidos de mães tireoidectomizadas tratadas com LT4. **Endocrinologia**, 163(9), 2022.

BENNETT, E. et al. Effects of successive environments on brain measures. **Physiology & Behavior**, v. 12, n. 4, p. 621–631, abr. 1974.

BERNAL, J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**, v. 3, n. 3, p. 249–259, mar. 2007.

BIALA, M. A. G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive processing**, p. 93–110, 2012.

BIANCHIN, M.; WALZ, R.; RUSCHEL, A. C.; ZANATTA, M. S.; DA SILVA, R. C.; BUENO E SILVA, M., et al. Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or the amygdala up to 20 days after training. **Behavioral and Neural Biology**, v. 59, p. 83-86, 1993.

BIANCO, A. C.; KIM, B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 10, p. 2571–2579, 2 out. 2006.

BUDENHOFER, B. K. et al. Thyroid (dys-)function in normal and disturbed pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 287, n. 1, p. 1–7, jan. 2013.

BURWELL, R. D.; WITTER, M. P.; AMARAL, D. G. The perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. **Hippocampus**, v. 5, p. 390-408, 1995.

CAO, X.-Y. et al. Timing of Vulnerability of the Brain to Iodine Deficiency in Endemic Cretinism. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 26, p. 1739–1744, 29 dez. 1994.

CATAPATTI, T. R. et al. Tamanho de amostra e número de repetições para avaliação de caracteres agronômicos em milho-pipoca. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 855-862, jul. 2008.

CERCATO, C.; HALPERN, A.; SALES, P. O Essencial em Endocrinologia. 1. ed. São Paulo: Roca, 2017. 371 p. 5 c.

CROTEAU, W. et al. Cloning and Expression of a cDNA for a Mammalian Type III

Iodothyronine Deiodinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 28, p. 16569–16575, 14 jul. 1995.

DELARCO, A. et al. Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: Studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 176, n. 2, p. 267–273, 25 jan. 2007.

DIAMOND, M. C.; KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R. The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 123, n. 1, p. 111–119, ago. 1964.

DIAMOND, M. C. Response of the brain to enrichment. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 2, p. 211-220. 2001.

ECKERT, M. J.; BILKEY, D. K.; ABRAHAM, W. C. Altered plasticity in hippocampal CA1, but not dentate gyrus, following long-term environmental enrichment. **Journal of neurophysiology**, v. 103, n. 6, p. 3320–9, jun 2010.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Part 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.

FENG, X. et al. Exposure of Pregnant Mice to Perfluorobutanesulfonate Causes Hypothyroxinemia and Developmental Abnormalities in Female Offspring. **Toxicological Sciences**, v. 155, n. 2, p. 409–419, fev. 2017.

GILBERT, M. E. et al. Thyroid Hormone Insufficiency during Brain Development Reduces Parvalbumin Immunoreactivity and Inhibitory Function in the Hippocampus. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 92–102, 1 jan. 2007.

GUAN, S. et al. The mechanism of enriched environment repairing the learning and memory impairment in offspring of prenatal stress by regulating the expression of activity-regulated cytoskeletal-associated and insulin-like growth factor-2 in hippocampus. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 26, 2021.

HADDOW, J. E. et al. Maternal Thyroid Deficiency during Pregnancy and Subsequent Neuropsychological Development of the Child. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 8, p. 549–555, 19 ago. 1999.

HÜTTENRAUCH, M.; SALINAS, G.; WIRTHS, O. Effects of Long-Term Environmental Enrichment on Anxiety, Memory, Hippocampal Plasticity and Overall Brain Gene Expression in C57BL6 Mice. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, 3 ago. 2016.

ICKES, B. R. et al. Long-Term Environmental Enrichment Leads to Regional

Increases in Neurotrophin Levels in Rat Brain. **Experimental Neurology**, v. 164, n. 1, p. 45–52, jul. 2000.

IKEGAYA, Y.; SAITO, H.; ABE, K. Attenuated hippocampal long-term potentiation in basolateral amygdala-lesioned rats. **Brain Research**, v. 656, p. 157-164, 1994.

IKEGAYA, Y.; SAITO, H.; ABE, K. The basomedial and basolateral amygdaloid nuclei contribute to the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. **European Journal of Neuroscience**, v. 8, p. 1833-1839, 1996.

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M. B. C.; MEDINA, J. H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. **Behavioral and Neural Biology**, v. 58, p. 16-26, 1992.

JOHNSTON, J.B. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 35, p. 337-481, 1923.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos: uma abordagem translacional. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 62 p.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 493–495, abr. 1997.

KUMAR, A. et al. Increased Pro-Nerve Growth Factor and p75 Neurotrophin Receptor Levels in Developing Hypothyroid Rat Cerebral Cortex Are Associated with Enhanced Apoptosis. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4893–4903, 1 out. 2006.

LAMBERT, T. J.; FERNANDEZ, S. M.; FRICK, K. M. Different types environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and sinaptophysin levels in female mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 83, p. 206-216, 2005.

LEE, J. L.; NADER, K.; SCHILLER, D. An update on memory reconsolidation updating. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 21, p. 531-545, 2017.

LEGGIO, M. G. et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 163, n. 1, p. 78–90, ago. 2005.

LINDHOLM, D. et al. Neurotrophin-3 induced by tri-iodothyronine in cerebellar granule cells promotes Purkinje cell differentiation. **Journal of Cell Biology**, v. 122, n. 2, p. 443–450, 15 jul. 1993.

LIU, P.; BILKEY, D. K. The effect of excitotoxic lesions centered on the hippocampus or perirhinal cortex in object recognition and spatial memory tasks. **Behavioral**

Neuroscience, v. 115, n. 1, p. 94, 2001.

LU, L., YU, X., TENG, W. et al. Treatment with levothyroxine in pregnant rats with subclinical hypothyroidism improves cell migration in the developing brain of the progeny. **J Endocrinol Invest** **35**, p.490-496, mai. 2012.

MANDLER, G. Recognizing: the judgment of previous occurrence. **Psychological Review**, v. 87, p. 252-271, 1980.

MARASHI, V. et al. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 281-292. 2003.

MCKENZIE, S.; EICHENBAUM, H. Consolidation and reconsolidation: two lives of memories? **Neuron**, v. 71, p. 224-233, 2011.

MEDICI, M. et al. Thyroid function in pregnancy: What is normal? **Biochimica Clinica**, v. 40, n. 4, p. 383–392, 2016.

MELLEN, J. D.; SHEPHERDSON, D. J. Environmental enrichment for felids: an integrated approach. **International Zoo Yearbook**, v. 35, n. 1, p. 191–197, jan. 1997.

MESHI, D., DREW, M. R., SAXE, M., et al. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 6, p. 729-731, 2006.

MEUNIER, M.; HADFIELD, W.; BACHEVALIER, J.; MURRAY, E. A. Effects of rhinal cortex lesions combined with hippocampectomy on visual recognition memory in rhesus monkeys. **Journal of Neurophysiology**, v. 75, p. 1190-1205, 1996.

MIRANDA, M.; BEKINSCHTEIN, P. Plasticity mechanisms of memory consolidation and reconsolidation in the perirhinal cortex. **Neuroscience**, v. 370, 2018.

MORICI, J. F.; MIRANDA, M.; GALLO, F. T.; ZANONI, B.; BEKINSCHTEIN, P.; WEISSTAUB, N. V. 5-HT_{2a} receptor in mPFC influences context-guided reconsolidation of object memory in perirhinal cortex. **ELife**, v. 7, p. e33746, 2018.

MORREALE DE ESCOBAR, G.; OBREGON, M.; ESCOBAR DEL REY, F. Role of thyroid hormone during early brain development. **European Journal of Endocrinology**, p. U25–U37, 1 nov. 2004.

MUMBY, D. G.; PINEL, J. P. J. Rhinal cortex lesions and object recognition in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 108, p. 11-18, 1994.

MURRAY, E. A.; RICHMOND, B. J. Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 2, p. 188-

193, 2001.

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, p. 722-726, 2000.

NEWBERRY, R. C. Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 44, n. 2–4, p. 229–243, set. 1995.

NILSSON, M.; PERFILIEVA, E.; JOHANSSON, U.; ORWAR, O.; ERIKSSON, P. S. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. **Journal of neurobiology**, v. 39, n. 4, p. 569–78, 15 jun 1999.

NITHIANANTHARAJAH, J.; LEVIS, H.; MURPHY, M. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 81, n. 3, p. 200–210, 1 maio 2004.

NOWACKA, A. et al. PSD-95 Serine 73 phosphorylation is not required for induction of NMDA-LTD. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2054, 6 fev. 2020.

O'CONNOR, A. M. et al. Environmental Enrichment From Birth Impacts Parvalbumin Expressing Cells and Wisteria Floribunda Agglutinin Labelled Peri-Neuronal Nets Within the Developing Murine Striatum. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 13, 24 out. 2019.

OPAZO, M. C. et al. Maternal Hypothyroxinemia Impairs Spatial Learning and Synaptic Nature and Function in the Offspring. **Endocrinology**, v. 149, n. 10, p. 5097–5106, 1 out. 2008.

PATHAK, A. et al. Maternal Thyroid Hormone before the Onset of Fetal Thyroid Function Regulates Reelin and Downstream Signaling Cascade Affecting Neocortical Neuronal Migration. **Cerebral Cortex**, v. 21, n. 1, p. 11–21, jan. 2011.

PATON, J. J.; BELOVA, M.A.; MORRISON, S.E.; SALZMAN, C.D. The primate amygdala represents the positive and negative value of visual stimuli during learning. **Nature**, v. 439, n. 7078, p. 865-870, 2006.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 7th ed. San Diego: Academic Press, 2014.

PAZ, R.; PELLETIER, J.G.; BAUER, E.P.; PARE, D. Emotional enhancement of memory via amygdala-driven facilitation of rhinal interactions. **Nature Neuroscience**,

v. 9, n. 10, p. 1321-1329, 2006.

PHAM, T. M. et al. Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 63–70, ago. 1999.

PUIG-DOMINGO, M.; VILA, L. The implications of iodine and its supplementation during pregnancy in fetal brain development. **Current Clinical Pharmacology**, v. 8, n. 2, p. 97–109, mai. 2013.

RODRIGUEZ-ORTIZ, C. J.; BERMÚDEZ-RATTONI, F. Determinants to trigger memory reconsolidation: the role of retrieval and updating information. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 142, p. 4-12, 2017.

SAHAY, R. K.; NAGESH, V. S. Hypothyroidism in pregnancy. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 3, p. 364–370, 2012.

SCOTT, S.K. et al. Impaired auditory recognition of fear and anger following bilateral amygdala lesions. **Nature**, v. 385, n. 6613, p. 254-257, 1997.

SEGOVIA, G.; ARCO, A. DEL; MORA, F. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, n. 8, p. 1007–1016, ago. 2009.

SHAFIEE, S. M.; VAFAEI, A. A.; RASHIDY-POUR, A. Effects of maternal hypothyroidism during pregnancy on learning, memory and hippocampal BDNF in rat pups: Beneficial effects of exercise. **Neuroscience**, v. 329, p. 151–161, ago. 2016.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—Behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 246–264, set. 2011.

SPRINGER, D. et al. Thyroid in pregnancy: From physiology to screening. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 54, n. 2, p. 102–116, 17 fev. 2017.

SQUIRE, L. R.; WIXTED, J. T.; CLARK, R. E. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. **Nature reviews**, v. 8, n. 11, p. 872–883, 2008.

TANIMIZU, T.; KONO, K.; KIDA, S. Brain networks activated to form object recognition memory. **Brain Research Bulletin**, v. 141, n. May 2017, p. 27–34, 2018.

TAYLOR, K. I.; MOSS, H. E.; STAMATAKIS, E. A.; TYLER, L. K. Binding crossmodal object features in perirhinal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 21, p. 8239-8244, 2006.

VAFAEE, F. et al. Insulin-Like Growth Factor 2 (IGF-2) Regulates Neuronal Density and IGF-2 Distribution Following Hippocampal Intracerebral Hemorrhage. **Journal of**

Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association, v. 29, n. 10, p. 105128, out. 2020.

VILAR, L. *Endocrinologia Clínica*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 233 p, 2016.

WARBURTON, E. C.; BROWN, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 131–139, 2015.

WIDMAIER, E. P.; RAFF, H.; STRANG, K. T. *Vander- Fisiologia Humana*. Tradução: Ana C. C. Botelho, [et. al.]. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 351 p. 11 c, 2017.

WILLIAMS, B. M.; LUO, Y.; WARD, C. et al. Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. **Physiology & behavior**, v. 73, n. 4, p. 649-58, jul 2001.

WILLIAMS, G. R. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 784–794, jun. 2008.

WINTERS, B. D.; BUSSEY, T. J. Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 52-61, 2005.