

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ELAINE RODRIGUES DA SILVA PRADO

**SUPERPOPULAÇÃO: UM MODELO DE ESTRESSE SOCIAL DURANTE O
PERÍODO GESTACIONAL E SEUS EFEITOS NA MÃE E NA PROLE.**

Alfenas/MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ELAINE RODRIGUES DA SILVA PRADO

**SUPERPOPULAÇÃO: UM MODELO DE ESTRESSE SOCIAL DURANTE O
PERÍODO GESTACIONAL E SEUS EFEITOS NA MÃE E NA PROLE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas-MG como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde. Área de concentração: Fisiopatologia

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Mollica do Amarante Paffaro

Alfenas/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

P896s Prado, Elaine Rodrigues da Silva
Superpopulação: um modelo de stress social durante o período gestacional e seus efeitos na mãe e na prole / Elaine Rodrigues da Silva Prado. -- Alfenas/MG, 2018.
106 f.: il. --

Orientadora: Andréa Mollica do Amarante Paffaro.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) –
Universidade Federal de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. Estresse -- Prenhez. 2. Camundongo -- Prenhez. 3. Comportamento Materno. 4. Ansiedade. I. Paffaro, Andréa Mollica do Amarante. II. Título.

CDD-616.98

ELAINE RODRIGUES DA SILVA PRADO

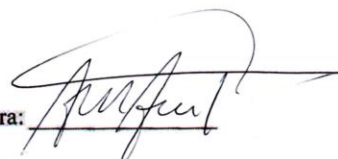
“SUPERPOPULAÇÃO: UM MODELO DE EXTRESSE SOCIAL
DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL E SEUS EFEITOS NA MÃE E
NA PROLE”

A Banca examinadora abaixo assinada aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia Aplicadas à Saúde pela
Universidade Federal de Alfenas- MG. Área de
concentração: Fisiopatologia.

Aprovada em:

Profa. Dra. Andréa Mollica do Amarante Paffaro
Instituição: Universidade Federal de Alfenas- MG
UNIFAL-MG

Assinatura:



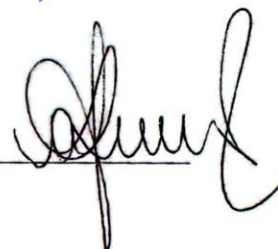
Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti
Instituição: Universidade Federal de Alfenas- MG-
UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Instituição: Instituto de Biotecnologia de Botucatu
UNESP

Assinatura:



*Dedico este trabalho as minhas filhas **Tainá e Jade,***

Razão do meu viver,

com elas aprendi a verdadeira forma de amar.

AGRADECIMENTOS

A oportunidade em realizar este projeto me proporcionou grandes aprendizados, dos quais contribuem em meu desenvolvimento pessoal e profissional. Agradeço a todos que de alguma forma me incentivaram para que este sonho se realizasse.

Primeiramente agradeço a DEUS, por me conduzir para que eu acreditasse que seria possível superar todos os desafios.

As minhas queridas e amadas filhas, Tainá e Jade, que sempre compreenderam sem questionar os momentos de ausência, vocês são meus presentes preciosos.

A minha mãe que sempre acreditou em minha capacidade, meu maior exemplo de determinação, minha eterna admiração. Aos meus irmãos, Cosme e Eliane, pelo apoio.

Ao meu noivo, Evandro você me incentivou, acreditou que tudo isso fosse possível, antes que eu mesma acreditasse. Obrigada pelo apoio, pelo incentivo, sem você tudo teria sido mais difícil.

A minha orientadora, Andrea Mollica do Amarante Paffaro, que sempre esteve me incentivando, que acreditou no meu trabalho, obrigada pela paciência em compartilhar seus conhecimentos com tanto empenho.

Aos Professores, em especial à Fabiana Cardoso Vilela, pela dedicação em me ensinar grande parte dos experimentos, sempre muito gentil, atenciosa e prestativa, Valdemar Antônio Paffaro Jr, Silvia Ruginsk e Marisa Ionta, pela colaboração intelectual e incentivo pessoal para a realização deste trabalho.

As minhas amigas e companheiras de mestrado, Glícia e Fernanda, obrigada pelos conhecimentos compartilhados, por me ajudarem em tantos momentos. Vocês foram um lindo presente durante essa etapa.

Aos meus amigos do Laboratório em especial a Ana Patricia, Vitória e Jefferson obrigada por me ajudarem e compartilharem experiências e experimentos no dia a dia do laboratório.

As nossas queridas assistentes Neuza e Isabel pela competência em cuidar do laboratório!
Obrigada pela paciência e carinho sempre!

A Universidade Federal de Alfenas e ao Laboratório de Biologia Animal Integrativa, por ceder o espaço para os experimentos e pelo suporte financeiro concedido.

RESUMO

Eventos estressores tem se tornado frequentes na sociedade, resultando no aumento de doenças originadas pelo estresse. Dessa maneira, o presente estudo tem como objetivo investigar possíveis efeitos, causados pelo estresse de superpopulação durante a gestação de camundongos avaliando suas consequências na reprodução, no desenvolvimento embrionário, fetal e placentário, na depressão pós-parto e nos padrões de cuidado materno. Assim como, avaliar as consequências deste estresse pré-natal no desenvolvimento físico e neurológico do neonato e no comportamento da prole na puberdade. Neste trabalho, fêmeas de camundongos Swiss foram acasaladas com machos da mesma linhagem e a presença do tampão vaginal foi considerada como 1º dia de gestação (ddg). As prenhes do grupo estresse foram acomodadas com 10 fêmeas não prenhes, durante todo o período gestacional, enquanto as prenhes do grupo controle permaneceram em moradia individual. No 15º ddg, foram realizados os testes de labirinto em cruz elevado (LCE) e campo aberto (CA), para avaliar o comportamento, algumas fêmeas eutanasiadas, para avaliação morfológica dos cornos uterinos, placentas e fetos. Nas demais fêmeas, a gestação foi levada a termo e o ganho de peso materno acompanhado durante toda a gestação. Após o nascimento, a prole foi pesada e padronizada, foram avaliados os parâmetros físicos e neurológicos de desenvolvimento até o 30º dia pós-natal (dpn). A depressão pós-parto foi avaliada no 2º dpn, pelo teste de nado forçado, o cuidado materno (CM) observado no 5º e 10º dpn. Os padrões de comportamento da prole foram avaliados por meio dos testes de LCE e CA entre o 30º e 32º dpn. Os resultados indicaram que o estresse de superpopulação interfere na taxa de prenhez, diminui a implantação e a viabilidade gestacional, aumenta o número de hemorragias e reabsorções nos sítios de desenvolvimento fetais, causa restrição de crescimento intra-uterino (IUGR), diminuição de peso placentário e diminuição da eficiência desse órgão. A análise do comportamento das prenhes não apresentou alterações significativas no LCE, porém elas apresentaram um comportamento do tipo menos ansioso em relação às fêmeas do grupo controle no teste de CA. O estresse de superpopulação diminuiu o ganho de peso materno no final da gestação. A avaliação do desenvolvimento físico da prole demonstrou uma redução nas distâncias naso-anal, naso-caudal e ânus-genital dos filhotes. Quanto ao desenvolvimento neurológico, houve atraso nos reflexos de agarramento palmar e endireitamento. A análise do comportamento materno mostrou que as fêmeas submetidas ao estresse, durante o período gestacional, lambem menos seus filhotes no 5º dpn. Ao avaliarmos o comportamento da prole na puberdade, os filhotes do sexo feminino apresentaram-se menos ansiosos em relação ao

controle. Podemos concluir que o estresse de superpopulação interfere de forma significativa no índice de prenhez, no bem-estar gestacional, na eficiência placentária, no tamanho dos neonatos, no crescimento dos filhotes no primeiro mês de vida, acarretando atrasos no desenvolvimento neurológico. Também foi observado que o estresse de superpopulação pode ter um efeito ansiolítico nas prenhes, transmitindo aos filhotes fêmeas como um mecanismo de adaptação ao estresse.

Palavras-chave: estresse pré-natal; gestação de camundongo; comportamento materno; comportamento da prole, resiliência.

ABSTRACT

Stressful events have become frequent in modern society, resulting in the rise of diseases caused by stress. In this way, in this way, aim of this study is to investigate possible changes caused by stress, resulting from overpopulation, during mice's gestation and also to evaluate their reproductive consequences, in the embryonic, fetal, placental, postpartum depression and maternal care patterns. In addition, it aims to evaluate the prenatal stress consequences in the neonates' physical and neurological developments and also in the offspring's behavior at puberty. In this work, Swiss mice's females were mated with males of the same strain and the presence of the vaginal buffer was considered the 1st gestation day (gd). The pregnant females, in the stress group, were accommodated with 10 non-pregnant females throughout the gestational period, whereas the pregnant women in the control group remained in single dwellings. At 15th gd, elevated plus maze (EPM) and open field (OF) tests were performed to evaluate the behavior and some females were euthanized for morphological evaluation of the uterine horns, placentas and fetuses. In the other females, the gestation was carried out and the maternal weight gain was monitored throughout the gestation period. After birth, offspring were weighed and standardized, the physical and neurological development parameters were evaluated until the 30th postnatal day (pnd). Postpartum depression was assessed in the 2nd pnd, by the forced swimming test, maternal care (MC) observed in the 5th and 10th pnd. Offspring behavior patterns were evaluated by means of the EPM and OF tests between 30th and 32th pnd. The results indicated that overpopulation stress interferes with the pregnancy rate, decreases implantation and gestational viability, increases the number of hemorrhages and resorptions at fetal development sites, causes fetal intrauterine growth restriction (IUGR), placental weight loss and decreased efficiency of this organ. Pregnancy behavior analysis did not present significant alterations in the EPM, but they presented a less anxious behavior in relation to the females of the control group in the OF test. Overpopulation stress resulted in lower maternal weight gain at the end of gestation, reduced weight in offspring. Offspring's physical development evaluation showed reduction in the anus-nose, nose-tail and anus-genital distances. Regarding the neurological development, there was delay in the reflexes of palmar grasping and righting. Maternal behavior's analysis showed that females subjected to stress during the prenatal period licked their pups less in the 5th pnd. When we evaluated offspring's behavior at puberty, female pups were less anxious than control. We can conclude that overpopulation stress significantly interferes with pregnancy index, gestational well-being,

placental efficiency, neonatal size, as well as their growth in the first month of life and lead to delays in neurological development. It has also been, observed that overpopulation stress may have an anxiolytic effect on pregnancy, conferring on female offspring as a mechanism for adapting to stress.

Keywords: prenatal stress; mouse gestation; maternal behavior; offspring behavior, resilience.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Resposta fisiológica após um agente estressor.....	20
Figura 2-	Acondicionamento dos grupos experimentais.....	31
Figura 3-	Design dos grupos experimentais e procedimentos deste estudo.....	32
Figura 4-	Testes realizados para Análise do comportamento.....	33
Figura 5-	Padronização da prole e análise do comportamento materno.....	36
Figura 6-	Marcação padronizada dos filhotes para análise desenvolvimento físico e neurológico.....	38
Figura 7-	Parâmetros do desenvolvimento físico analisados ao decorrer do primeiro mês de vida dos filhotes.....	40
Figura 8-	Testes de desenvolvimento neurológico.....	42
Figura 9-	Gráfico apresenta porcentagem de prenhez dos grupos controle e estresse.....	45
Figura 10-	Análise macroscópica dos cornos uterinos.....	46
Figura 11-	Análise fetal e placentária.....	47
Figura 12-	Análise do ganho de peso durante a gestação.....	48
Figura 13-	Teste de labirinto em cruz elevado entre os grupos experimentais.....	49
Figura 14-	Efeito do estresse de superpopulação sobre o comportamento de fêmeas prenhes.....	50
Figura 15-	Tempo de imobilidade no teste de nado forçado.....	51
Figura 16-	Análise dos parâmetros maternos avaliados no 5° e 10° DPN.....	53
Figura 17-	Análise da prole ao nascer.	54
Figura 18-	Análise do desenvolvimento físico dos filhotes ao longo do primeiro mês de vida.....	55
Figura 19-	Ganho de peso dos filhotes ao longo do primeiro mês de vida.....	57

Figura 20-	Crescimentos naso-caudal, naso-anal e ânus-genital, ao longo do primeiro mês pós-nascimento, de filhotes de mães expostas a estresse de superpopulação.....	59
Figura 21-	Análise do desenvolvimento neurológico dos filhotes ao longo do primeiro mês de vida.....	60
Figura 22-	Análise: Teste de labirinto em cruz elevado em fêmeas expostas ao estresse pré-natal.....	62
Figura 23-	Análise: Teste de labirinto em cruz elevado em machos expostas ao estresse pré-natal.....	63
Figura 24-	Análise: Teste de campo aberto em fêmeas expostas ao estresse gestacional.....	64
Figura 25-	Análise: Teste de campo aberto em machos expostos ao estresse gestacional.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	- Hormônio adrenocorticotropico
ANOVA	- Análise de variância
AP	- Aparecimento de pelo
AV	- Abertura de vagina
CA	- Campo Aberto
CEUA	- Comitê de ética em experimentação animal
CM	- Comportamento Materno
CNM	- Comportamento Não Materno
CRH	- Hormônio liberador de corticotropina
DDG	- Dia de gestação
DPN	- Dia pós-nascimento
DO	- Descolamento de orelha
DT	- Descida de testículos
GC	- Glicocorticóides
HE	- Hematoxilina e Eosina
HPA	- Hipotálamo Pituitária Adrenal
HPG	- Hipotálamo Hipófise Gonodal
ICB	- Instituto de Ciências Biomédicas
IUGR	- Restrição do Crescimento intra-uterino
Kg	- Quilogramas
LABAInt	- Laboratório de Biologia Animal Integrativa
LCE	- Labirinto em Cruz Elevado
N	- Número experimental
PBS	- Tampão Fosfato Salina

RII	- Rompimento de incisivo inferior
RIS	- Rompimento do incisivo superior
SEM	- Desvio padrão da média
SNA	- Sistema Nervoso Autônomo
UNIFAL	- Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	ESTRESSE: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS	18
2.1	ESTRESSE SOCIAL.....	22
2.1	ESTRESSE GESTACIONAL.....	23
2.2	COMPORTAMENTO MATERNO.....	25
3	JUSTIFICATIVA.....	27
4	OBJETIVOS.....	28
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	28
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.1	ANIMAIS.....	29
5.2	MODELO EXPERIMENTAL DE ESTRESSE DE SUPERPOPULAÇÃO.....	29
5.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	30
5.2.1	Delineamento dos Grupos Experimentais.....	31
5.3	ANÁLISE DO GANHO DE PESO MATERNO.....	32
5.4	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE FÊMEAS PRENHES.....	32
5.4.1	Teste Labirinto em cruz elevado (LCE).....	33
5.4.2	Teste campo aberto (CA).....	33
5.5	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	34
5.6	CÁLCULO DA TAXA DE IMPLANTAÇÃO E DA VIABILIDADE GESTACIONAL.....	34
5.6.1	Taxa de Implantação.....	34
5.6.2	Viabilidade Gestacional.....	35
5.7	EFICIÊNCIA PLACENTÁRIA.....	35

5.8	PADRONIZAÇÃO DAS PROLES.....	35
5.9	ANÁLISE DE DEPRESSÃO PÓS-PARTO	36
5.10	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO	37
5.11	ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO FÍSICO E NEUROLÓGICO DA PROLE.....	37
5.11.1	Testes de desenvolvimento físico	38
5.11.2	Testes de desenvolvimento neurológico.....	41
5.12	DESEMPENHO COMPORTAMENTAL DA PROLE JOVEM.....	43
5.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
6	RESULTADOS	44
6.1.1	Percentual Êxito da Prenhez.....	44
6.1.2	Análise Macroscópica dos Cornos Uterinos.....	45
6.1.3	Taxa de Implantação e Viabilidade Gestacional	45
6.1.4	Avaliação Macroscópica dos Fetos e Placentas	46
6.1.5	Ganho De Peso Materno.....	48
6.1.6	Comportamento Semelhante À Ansiedade Durante A Prenhez	48
6.1.6.1	Labirinto em cruz elevado	48
6.1.6.2	Teste de campo aberto	50
6.2	ANÁLISE DAS FÊMEAS PÓS PARTO.....	51
6.2.1	Comportamento Depressivo Após o Parto	51
6.2.2	Comportamento Materno De Cuidados Com A Prole.....	51
6.3	ANÁLISE DA PROLE.....	54
6.3.1	Análise da prole ao nascimento	54
6.3.2	Desenvolvimento físico da prole	55
6.3.3	Análise do Ganho de Peso da Prole.....	56
6.3.4	Análise do Crescimento da Prole.....	58

6.3.4.1	Crescimento Naso-Caudal	58
6.3.4.2	Crescimento Naso-anal	58
6.3.4.3	Crescimento Ânus-genital	58
6.3.5	Desenvolvimento Neurológico	59
6.4	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DA PROLE JOVEM	60
6.4.1	Teste de labirinto em cruz elevado (LCE)	61
6.4.2	Teste Campo Aberto	64
7	DISCUSSÃO	66
8	CONCLUSÕES	83
	<u>REFERÊNCIAS</u>	84
	<u>ANEXO A</u>	106

1 INTRODUÇÃO

A vida cotidiana da sociedade moderna vem se tornando cada vez mais estressante, o que tem resultado no aumento considerável da incidência de doenças relacionadas ao estresse (SILVEIRA, 2007). O termo “estresse” denota o estado gerado pela percepção de estímulos, internos ou externos, que produzem excitação emocional, levando à alteração do estado de homeostase do organismo, induzindo um processo de adaptação que permite ao indivíduo superar certas exigências que o meio ambiente lhe impõe (DONADIO; VARGAS, 2014). Assim, o estresse é desencadeado a partir de um evento estressor ou de uma sucessão deles, causando uma resposta, fisiológica e/ou comportamental, que leva à quebra da homeostase (MCEWEN, 2003).

A gestação é um período de grandes alterações metabólicas e comportamentais e, por si só, já poderia desencadear a ação de diversos fatores estressantes, que influenciam a saúde e o bem-estar materno e fetal (WEERTH; BUITELAAR, 2005). O estresse na gestação pode ocorrer por eventos associados ao próprio período gestacional, como enjoos, medo em relação ao ganho de peso, medo de complicações gestacionais e pavor do parto, bem como eventos nos contextos familiar e social: gravidez indesejada, dificuldade financeira, violência doméstica, uso de drogas e transtornos comportamentais, como pânico e depressão (PEREIRA; LOVISI, 2007).

Durante toda a gestação, o embrião/feto está exposto, direta ou indiretamente, às mesmas alterações que a mãe. Portanto, um evento que estressa o organismo materno, atinge conseqüentemente o bebê em desenvolvimento (SMITH, 2004). Nesse contexto, um ambiente fetal adverso pode estar associado à restrição do crescimento intrauterino (IUGR), à hiperglicemia, à hipertensão, ao aumento da reatividade do eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA), ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, metabólicas, neuroendócrinas e aos distúrbios psicológicos na idade adulta (ATKINSON, WADDELL, 1995; BRUNTON, 2013).

Visando à compreensão dos efeitos do estresse pré-natal, existem diversos modelos de estudo desenvolvidos em roedores. Pesquisas sobre os efeitos do estresse no período gestacional são vastas, porém, existem poucos dados abordando o modelo de estresse de aglomeração social. Nesse modelo, os animais convivem em uma área pequena com outros da mesma espécie, vivenciando a divisão do espaço e a disputa por comida, além de precisar lidar com a moradia em condições insalubres, decorrente do aumento de dejetos. Conseqüentemente, esse

modelo fornece diferentes estímulos estressores ao longo do tempo, sendo de grande validade preditiva a avaliação dos efeitos do estresse de superpopulação durante o período gestacional, assim como a análise desse modelo estressor frente ao cuidado materno e suas consequências à prole.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica é composta de conhecimentos em relação ao Estresse e suas respostas fisiológicas e comportamentais, estresse social, estresse no período gestacional e interferências do estresse sobre o comportamento materno.

2.1 ESTRESSE: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS

O endocrinologista Hans Selye (1936), foi pioneiro em estudos experimentais relacionados ao estresse e à capacidade do organismo em responder e se adaptar aos agentes estressores, denominada por ele de “síndrome de adaptação geral”. Desde então, as pesquisas têm evoluído substancialmente, ampliando o conhecimento sobre alterações de mecanismos autonômicos, neuroendócrinos e imunes relacionados ao estresse. O estresse pode ser considerado como inerente e necessário ao organismo para a manutenção de vida (MCEWEN, 2000). Segundo Selye (1956), determinados tipos de estresse podem promover respostas diferentes: eustresse refere-se às respostas consideradas positivas, preparando o indivíduo para enfrentar novos desafios; distresse é considerado o estresse negativo, excessivo e com resultados de debilidade física e comportamental.

O termo estresse pode ser definido como desordem fisiológica e/ou psicológica de um indivíduo, capaz de gerar respostas imediatas e/ou tardias e alteração do bem-estar (MCEWEN, 2000). O estresse pode ser classificado em agudo e crônico. A condição de estresse agudo ocorre em situações de curto período e alta intensidade, com respostas imediatas. O estresse crônico ocorre por um período prolongado, constante, com menor intensidade e resposta mais tardia (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). O estresse promove uma vasta perturbação na homeostase do organismo, resultando em respostas importantes, visando à adaptação e ao retorno da estabilidade homeostática ideal (LEVINE, 2005). A homeostase corresponde a uma faixa estreita de equilíbrio biológico. Quando os limites de homeostase são alterados, o organismo inicia o processo de alostase, visando alcançar a novamente a sua estabilidade através de mudanças, garantindo assim a sobrevivência. Fica evidente que o conceito alostase é diferente de homeostase, pois se refere ao ajuste orgânico aos eventos previsíveis e imprevisíveis em busca de um novo equilíbrio (MCEWEN; WINGFIELD, 2003).

Nesse contexto, o organismo desenvolve a capacidade de lidar com mudanças no ambiente, manifestando resiliência aos desafios ambientais (KARATSOREOS; MCEWEN, 2013). A palavra resiliência tem sido utilizada para definir situações psicossociais em que indivíduos ou grupos superam situações adversas (BARLACH, FRANÇA; MALVEZZI, 2008).

O estresse é considerado um fator de risco para uma diversidade de doenças, afetando cada pessoa de maneira diferente (SCHMIDT; STERLEMANN; MÜLLER, 2008). De acordo com o período da vida humana ou animal, diversas situações de estresse podem ocorrer, produzindo respostas e consequências adversas, que variam conforme as condições de saúde do indivíduo (MARKOVIĆ, 2011). Nem todos os agentes estressores causam distúrbios inicialmente, pois, na maioria das vezes, as doenças aparecem após experiências estressantes de longa duração. Porém, em alguns casos, a doença pode ser desencadeada após uma experiência aguda de estresse, levando a uma resposta mais branda que o estresse crônico (SCHMIDT; STERLEMANN; MÜLLER, 2008).

Estressores físicos e sociais alteram o ambiente externo, causando uma reação imediata, seguida de uma resposta adaptativa interna do indivíduo. Esse processo promove uma resposta não linear, através de mediadores como o cortisol (KLOET, 2008; MCEWEN et al, 2015). Logo após um evento estressor, a reação inicial é coordenada pelo sistema nervoso simpático e vários neuropeptídios posteriormente o eixo HPA, glicocorticoides (GC) e hormônios (KLOET, 2008). Na sequência, a recuperação e a acomodação ao evento estressor são realizadas pelas mesmas substâncias (Figura 1). Portanto, o corpo responde fisiologicamente ao estresse ativando o sistema nervoso simpático e, em seguida, o eixo HPA. A resposta ao agente estressor via sistema nervoso autônomo (SNA) promove aumento da liberação de catecolaminas: epinefrina (produzidas pela supra-renal) e norepinefrina (produzida por terminações nervosas simpáticas). As catecolaminas, causam várias alterações, como aumento das frequências cardíaca e respiratória e da pressão arterial, além de hiperemia, dilatação das pupilas e dos brônquios, como também alterações metabólicas, para disponibilização de energia (CAPITANIO, 2015; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Outra via da resposta fisiológica ao estresse ocorre a partir da ativação do eixo HPA, durante o qual o hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotropina (CRH). O CRH estimula a hipófise anterior a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea e, em seguida, o córtex da suprarrenal libera os GC: corticosterona em ratos e o cortisol nos seres humanos (MAGUIRE; MODY, 2015).

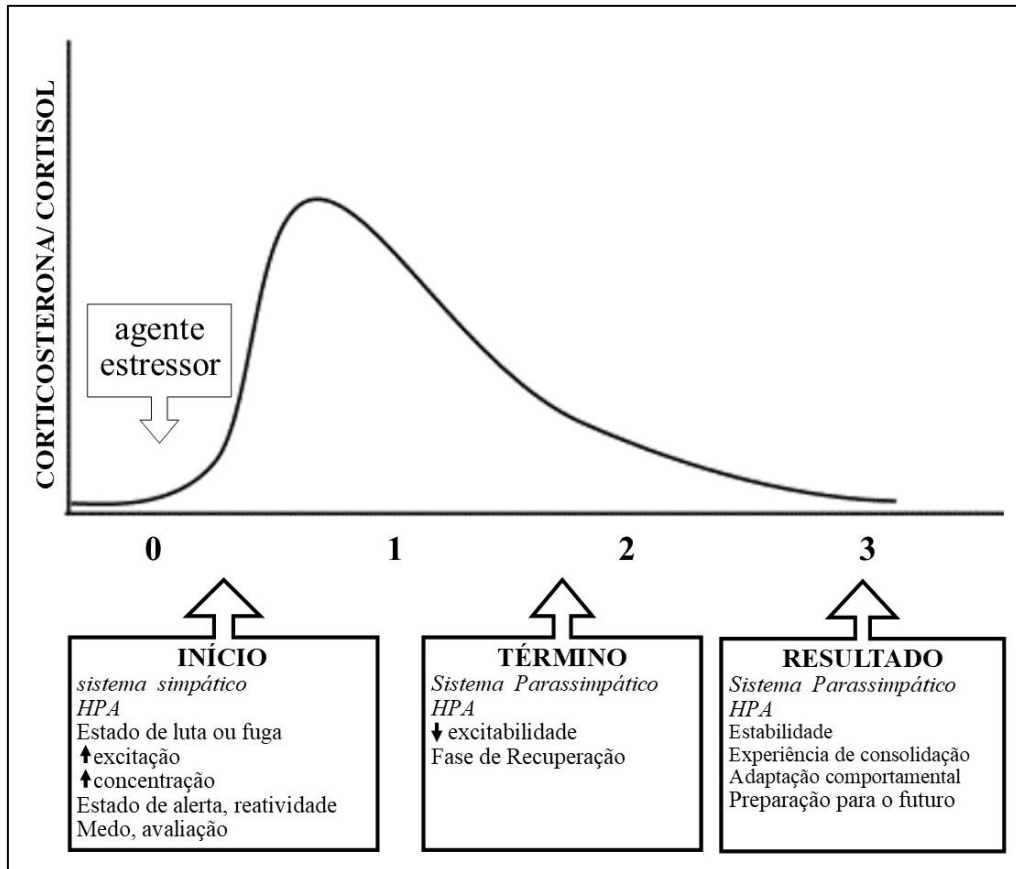


Figura 1- Resposta fisiológica após um agente estressor, período inicial recuperação e acomodação, em roedores e humanos.

Fonte: KLOET, 2008 (adaptado).

Frente ao agente estressor, as respostas comportamentais consistem em reações “luta ou fuga” na grande maioria das espécies animais. Em seres humanos, essas respostas decorrem diretamente de ações associadas a comportamentos inadequados em relação à saúde, como a alimentação, o consumo de álcool, o tabagismo, as drogas ilícitas e outras formas de abuso (MCEWEN, 2000).

Estudos sobre os efeitos do estresse, em sua grande maioria, associam eventos estressores ao aumento da ansiedade e da depressão (SCHMIDT; STERLEMANN; MÜLLER, 2008). Segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-5), a ansiedade é caracterizada por preocupação, medo e vigilância excessiva a um evento. Os indivíduos com transtornos de ansiedade, em geral, superestimam o perigo nas situações que temem ou evitam, apresentando comportamento de cautela ou esquiva. Em análise do comportamento de humanos, a ansiedade tem sido definida como um estado emocional desagradável, que sinaliza um desconforto aversivo relacionado ao medo. Esse estado emocional é, geralmente, relacionado a uma ameaça futura e apreensão desproporcional a uma ameaça real (COELHO; TOURINHO, 2008; ZAMIGNANI; BANACO, 2005). A depressão

segundo o DSM-5, apresenta-se a partir da presença de humor triste, vazio ou irritável, acompanhado de alterações somáticas e cognitivas que afetam significativamente a capacidade de funcionamento do indivíduo. A depressão pode ser vista como uma manifestação de incapacidade em lidar com eventos estressores ao longo da vida, podendo ser causada pela exposição a estressores crônicos, sofrendo também influências genéticas (CRYAN; MOMBÉREAU. 2004). O indivíduo apresenta desinteresse em realizar as atividades diárias, sentimentos de desamparo, medo, culpa, insatisfação, melancolia e pensamentos suicidas recorrentes, com perturbações do apetite e do sono (TENG et al, 2005; WEINSTOCK, 2017).

No entanto, existem evidências de que os efeitos do estresse também podem estar associados ao aumento da capacidade de resiliência, por meio da qual o indivíduo pode desempenhar uma melhor habilidade em lidar com um ambiente aversivo (SANTARELLI et al, 2017).

São diversos os modelos de estresse utilizados em experimentos, com o intuito de recriar eventos agressores em roedores, visando avaliar as respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse, à ansiedade e à depressão. Os modelos mais comumente utilizados são o do estresse crônico variável, o de contenção e odor predatórios, com ou sem o predador natural. O modelo de estresse crônico variável consiste na exposição da fêmea prenhe a diferentes tipos de estressores, como a exposição à luz constante (38 horas de duração), o odor predatório, o nado forçado, a exposição ao calor e ao frio e a inversão do ciclo claro/escuro em horários imprevisíveis (JONES, 2010). No modelo de contenção, a fêmea prenhe é colocada em um contentor, causando assim restrição de movimentos do animal (DONADIO; VARGAS, 2014). O odor predatório consiste em colocar a fêmea prenhe em contato com o cheiro do predador (ST-CYR, 2015). No estresse pelo predador natural, a fêmea prenha é exposta à presença de um gato (PATIN, 2002). Todos estes modelos de estresse possuem grande validade preditiva, porém utilizam estressores físicos ou de derrota social. O estresse social, apesar de menos estudado, é considerado de grande importância como fator etiológico para desenvolvimento de distúrbios comportamentais, como ansiedade e depressão (TAYLOR, 2006). Desse modo, o estresse de aglomeração social pode oferecer grande validade preditiva frente aos transtornos comportamentais.

O modelo de aglomeração social oferece vantagens sobre outros modelos de estresse, causando menos trabalho intensivo, já que nenhuma aplicação diária de estresse é necessária, como ocorre nos modelos de derrota social e de estresse crônico leve (LIN, 2015). Estudos recentes têm utilizado cada vez mais estressores psicossociais, como confronto social e

superpopulação, com o intuito de avaliar um estado de instabilidade, que represente uma condição sócio ecológica mais próxima de populações naturais, tornando este modelo uma alternativa amplamente aceita para estudar mecanismos da doença para o estresse (LIN et al, 2015; REISS et al.; 2007)

Em modelos animais, as respostas comportamentais estão relacionadas a um aumento do comportamento semelhante à ansiedade e à depressão, que pode ser mensurado por meio de testes como o de labirinto em cruz elevado (LCE), o de campo aberto (CA) (JONES, 2010; LISTER, 1990; WALF; FRYE, 2007;) e o do nado forçado (PORSOLT, 1977). O LCE é um dos ensaios mais reconhecidos na pesquisa da ansiedade em ratos e camundongos (WALF; FRYE, 2007). Nesse teste, o comportamento de roedores, semelhante à ansiedade, é avaliado pelo tempo gasto nos braços abertos e fechados do aparato utilizado (HANDLEY; MITHANI, 1984). Lister (1987), validou esta metodologia para ser utilizada em camundongos, observando que os animais mais temerosos permanecem mais tempo nos braços fechados, indicando assim um comportamento semelhante à ansiedade. O teste de CA foi desenvolvido por Hall (1934) e tem sido bastante utilizado para estudos da capacidade locomotora e exploratória, averiguando o número de entradas no centro e na periferia, sendo também relacionado com a ansiedade de roedores (BRUNTON; RUSSEL, 2010; SCHMIDT; STERLEMANN; MÜLLER, 2008). O comportamento semelhante à depressão em roedores pode ser mensurado por meio do teste de natação forçada, desenvolvido por Porsolt em 1977. Esse teste consiste em mensurar o tempo em que animal permanece imóvel, quando imerso em água, de forma que o aumento do tempo de imobilidade durante o teste é interpretado como “humor reduzido”, “desistindo da esperança em escapar” (CRYAN; MOMBÉREAU, 2004).

Todos os testes descritos acima podem ser utilizados de maneira complementar, pois são essenciais para o diagnóstico da efetividade de um modelo estressor, como no caso deste trabalho.

2.1 ESTRESSE SOCIAL

Fatores próprios do ambiente social interferem sobre as respostas ao estresse (LIEBERWIRTH et al., 2012). Segundo Ago et al., (2014) condições de sobrevivência de superlotação são consideradas estressores psicossociais e afetam condições biológicas. O impacto da habitação social como modelo estressor, promove eventos desafiadores podendo gerar distúrbios comportamentais como depressão e ansiedade (REISS, et al., 2007;

TRAMULLAS et al., 2012). Entretanto alguns estudos demonstram que o convívio social pode promover resiliência, protegendo o organismo de danos gerados pelo estresse (Davidson e McEwen, 2012). Segundo Lin et al.(2015), o modelo de estresse de superpopulação é um modelo relevante para o estudo de disfunções metabólicas e comportamentais relacionadas ao estresse.

2.1 ESTRESSE GESTACIONAL

A gestação é considerada um período de grandes variações no organismo materno. Além disso, a mãe está sujeita às influências estressantes provindas do ambiente externo, que podem interferir na saúde e no bem-estar materno-fetal. O período gestacional modifica todo o organismo materno, provocando alterações físicas, hormonais e emocionais, podendo deixá-la mais suscetível à manifestação de ansiedade e depressão (PEREIRA; LOVISI, 2007) e, por consequência, alterar os níveis de glicocorticoides (GC) na circulação materna (KLOET, 2008; MAGUIRE; MODY, 2015; MCEWEN et al, 2015). O excesso dos níveis de GC é um importante identificador do estresse materno (WEINSTOCK, 2017).

Os GC, em níveis ideais, desempenham um papel vital durante o desenvolvimento normal do feto (CONSTANTINOF; MOISIADIS; MATTHEWS, 2016; WARD, 1994). Esses hormônios atravessam a placenta, podendo prejudicar o desenvolvimento do eixo HPA (RAKERS et al., 2017). Durante a gestação, os níveis de GC, na circulação fetal normal, sofrem alterações conforme o período gestacional: no início, são mantidos níveis baixos, mas aumentam rapidamente ao fim da gestação. Esse aumento de GC é importante para a maturação dos órgãos, especificamente os pulmões, cérebro e rins (CONSTANTINOF; MOISIADIS; MATTHEWS, 2016) sendo notável o seu papel na promoção da maturação do pulmão e produção do surfactante necessário para a função pulmonar extrauterina (WARD, 1994), levando a uma correlação direta com o desencadeamento do trabalho de parto. Considera-se que o CRH na circulação fetal impulsiona a produção aumentada de cortisol, ajudando na maturação pulmonar fetal e também pode atuar como vasodilatador da circulação placentária fetal (WADHWA et al., 2004).

Um crescente número de evidências sugere que o estresse pré-natal afeta o IUGR fetal, o desenvolvimento físico e neurológico na infância, o comportamento, a regulação do eixo HPA, a imunocompetência e o comportamento afetivo e emocional da prole, gerando ansiedade (FUJITA et al, 2010; KHASHAN et al., 2008; LIU et al, 1997; WEINSTOCK, 2017). No

entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são pouco conhecidos (FONSECA; MASSOCO; MIYAGAWA et al, 2011; NETO, 2002;).

Os efeitos do estresse pré-natal são, em sua grande maioria, mediados via maturação diferenciada do eixo HPA pela exposição ao aumento dos níveis de GC (HARRIS; SECKL 2011; KHASHAN et al., 2008; KLOET, 2008). Alterações persistentes na maturação e feedback da regulação do eixo HPA são associadas, inclusive, às mudanças no desenvolvimento, crescimento e aprendizagem (HARRIS; SECKL, 2011).

No entanto, pela dificuldade de estudar os efeitos de diferentes agentes estressores em humanos, os modelos de pesquisa com roedores são a alternativa mais amplamente aceita (WEINSTOCK, 2017). Os diversos estudos realizados em ratos e camundongos, além de permitirem resultados promissores, em razão da analogia de suas interações materno-fetais, têm possibilitado a obtenção de respostas rápidas e a baixo custo (SCHMIDT; STERLEMANN; MÜLLER, 2008).

As consequências do estresse pré-natal podem ser positivas ou negativas, conforme a severidade do agente estressor. Níveis leves podem originar uma maior resistência ao estresse, sendo vantajoso na vida adulta, demonstrando uma melhor capacidade em lidar com eventos estressantes ao longo da vida (MONAGHAN; HAUSSMANN, 2015), enquanto que a exposição prolongada e repetida ao estresse pode ser prejudicial, causando IUGR, alterações no desenvolvimento físico e neurológico, comprometimento da imunidade e aumento das taxas de doenças (AMUGONGO; HLUSKO, 2014; MONAGHAN; HAUSSMANN, 2015).

A variabilidade do estímulo estressor também reflete a complexidade da interação entre os processos estressantes e metabólicos, destacando a importância do desenvolvimento e a caracterização completa de cada modelo de estresse utilizado (LIN, 2015). A exposição ao estresse, durante a gravidez, tem efeitos prejudiciais sobre a mãe e a prole, causando efeitos de longa duração em vários sistemas dos filhotes (BRUNTON, 2013; RAKERS et al., 2017). Geralmente, associa-se uma prole, submetida a estresse pré-natal de maneira hiper-responsiva, com o aumento da ansiedade (BRUNTON, 2013). Essa influência, no entanto, é bastante variável e, conforme a intensidade, o tempo de exposição ao agente agressor e o período da gestação afetado, ocorrem consequências diversas para o desenvolvimento da prole (DONADIO; VARGAS, 2014).

Estudos que abordam diferentes informações, provindas das diversas áreas de conhecimento, no intuito de investigar e esclarecer a influência de eventos adversos ocorridos em fases precoces do desenvolvimento humano, teorizando de forma mais ampla "Origens do Desenvolvimento da Saúde e Doenças (DOHaD)". Esse ramo da ciência origina-se de uma série

de pesquisas em relação ao ambiente precoce, item fundamental no desenvolvimento de doenças (SILVEIRA, 2007). O resultado esperado de pesquisas envolvendo DOHaD é uma resposta significativa na prevenção de doenças, proporcionando um vínculo entre as ciências biológicas e a área da saúde (FUKUOKA; SATA, 2016)

Apesar de serem utilizados diferentes modelos experimentais, para análise do efeito do estresse pré-natal, não encontramos dados a respeito dos efeitos do estresse de aglomeração social em camundongos prenhes, visando à avaliação do animal nesse estado, relativamente ao desenvolvimento gestacional da prole, assim como seus efeitos na mãe após o parto e na prole depois de adulta.

2.2 COMPORTAMENTO MATERNO

Ao fim da gestação e logo após o parto, a mãe passa por diversas mudanças comportamentais visando à chegada dos filhotes, garantindo assim o bem-estar da prole, (NUMAN, 1994). Ainda nesse período gestacional, ocorre uma queda nos níveis de progesterona e aumento da concentração de estradiol e prolactina, sendo essas alterações responsáveis pelo início do comportamento materno (CM) (NEMSADZE; SILAGAVA, 2010; NUMAN, 2006). Após o nascimento dos filhotes, a lactante mantém um conjunto de cuidados em relação à prole, com o intuito de garantir a sobrevivência e o desenvolvimento, até que eles possam garantir a regulação da temperatura e se alimentarem de forma independente. Entre as espécies de mamíferos, os filhotes reconhecem a mãe através do odor, toque e temperatura, estimulando a atenção da mãe ao expressarem ações como vocalizações e movimentos do corpo (FLEMING; O'DAYB; KRAEMER, 1999).

Em roedores, as ações do CM têm início antes mesmo do parto. A futura mãe constrói o ninho e altera o padrão de higiene, aumentando a autolimpeza da região mamária e estimulando a produção e a ejeção do leite. Segundo Numan e Stolzenberg (2009), os principais cuidados maternos em roedores são: a construção do ninho, que favorece a proteção e a regulação da temperatura na ausência da mãe; a amamentação, que é facilitada por meio da cifose fisiológica, durante a qual a coluna fica em postura arqueada; as lambidas, cuja função é estimular a defecação e a secreção urinária dos filhotes; o recolhimento dos filhotes, por meio do qual a mãe transporta os filhotes pela boca, de um local para outro, ou para um novo ninho, que ela considere mais protegido.

O CM pós-parto diminuído interfere diretamente na atividade do eixo HPA dos filhotes, causando efeitos de longa duração no desenvolvimento da prole, podendo induzir um comportamento semelhante à ansiedade (BRUNTON, 2013; LIU; et al, 1997). Além disso, o estresse durante a gestação pode aumentar o comportamento depressivo da mãe no período pós-parto e alterar o cuidado materno em roedores (BRUMMELTE e GALEA, 2010). Desse modo, os efeitos do estresse gestacional e pós-parto podem ser transmitidos para a prole, associados ao CM (BRUMMELTE; GALEA, 2010; LIU et al, 1997;). O aumento consistente do CM é associado à diminuição das respostas do eixo HPA, reduzindo assim o comportamento semelhante à ansiedade na prole jovem. Em contrapartida, a diminuição do CM produz aumento da atividade do eixo HPA, desencadeando um efeito ansiolítico na prole (LIU et al, 1997). Segundo Maguire e Mody (2015), é provável que a desregulação do eixo HPA, por alterar o CM, possa desempenhar um papel na depressão pós-parto e, por conseguinte, no desenvolvimento da prole, resultando no aumento do comportamento de ansiedade dos filhotes na puberdade.

Segundo Szyf et al (2005), o CM pode programar as respostas comportamentais e neuroendócrinas durante toda a vida do filhote, pois está associado às mudanças de expressão gênica, decorrente das metilações de DNA e das alterações de histonas, conforme define a epigenética (CAO-LEI et al, 2017). Já foram comprovadas alterações epigenéticas, associadas a diversos genes, em resposta ao CM, como nos receptores de corticosteroides (SZYF et al, 2005). Portanto, o estresse durante a gestação altera o CM e os efeitos gerados pelos eventos estressantes podem ser transmitidos através das gerações (CHAMPAGNE; MEANEY, 2006). Essa associação mostra outra grande importância de estudos como o que desenvolvemos nesta pesquisa.

3 JUSTIFICATIVA

A gestação é um momento em que ocorrem diversas alterações: físicas, metabólicas e emocionais deixando a gestante suscetível a fatores exógenos. Apesar do diagnóstico de estresse ser cada vez mais frequente na atualidade, o efeito de fatores estressores na gestação e suas consequências para o organismo materno e o desenvolvimento da prole ainda precisam ser melhor averiguados. Um dos pontos que tem sido negligenciado neste aspecto, seria o estudo do efeito de fatores psicossociais como responsáveis pelo estresse no período de gestação. Alguns dos modelos de estresse social como o de superpopulação tem auxiliado em estudos para verificação de mecanismos translacionais desencadeadores de doenças graves acarretadas por fatores sociais, as quais podem inclusive, inviabilizar a gestação. Estes fatores podem estar relacionados, por exemplo, a condições de disputa por alimento e espaço, assim como, condições insalubres de sobrevivência observadas em diversas regiões superpopulosas do globo o que justifica a importância deste trabalho.

4 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho estão descritos a seguir.

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar as possíveis alterações do estresse crônico de aglomeração social durante todo o período gestacional, no equilíbrio da gestação, no nascimento e desenvolvimento da prole assim como no comportamento materno.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar a influência do estresse de superpopulação nos seguintes itens:

- a) Taxa de prenhez, a implantação embrionária e a viabilidade gestacional;
- b) Morfologia do útero prenhe, das placentas e dos fetos
- c) Comportamento de fêmeas prenhes;
- d) Ganho de peso das fêmeas prenhes
- e) Peso da ninhada e número de filhotes;
- f) Comportamento semelhante a depressão pós-parto;
- g) Cuidado materno de fêmeas lactantes;
- h) Desenvolvimento dos primeiros parâmetros físicos e neurológicos da prole;
- i) Respostas comportamentais de filhotes jovens.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos deste trabalho foram realizados na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), mais especificamente no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt) do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (BCD) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB).

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados nesse trabalho 300 camundongos fêmeas Swiss, entre 8 e 16 semanas, sendo 50 fêmeas prenhes, 250 fêmeas utilizadas para superpopular as gaiolas e 10 machos da mesma linhagem para o acasalamento, todos estes provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/MG). Além dos animais já descritos, foram utilizados 120 filhotes nascidos no Biotério de Experimentação Animal do LABAINT (ver item 5.2). Durante todo o período experimental, os animais foram acondicionados no Biotério de Experimentação LabaInt), em estantes ventiladas com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (Figura 2). O acesso à água e alimentação foi em regime “ad libitum” para todos os animais. Os procedimentos experimentais deste projeto foram avaliados e aprovados pelo Comissão de Ética no uso de animais (CEUA-UNIFAL) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS-MG, processo nº 47/2017.

O acasalamento foi realizado em regime de harém, sendo colocadas ao entardecer 3 fêmeas por macho e na manhã seguinte foi verificada a presença de tampão vaginal (Figura 2C) e a presença do mesmo determinou o 1º dia de gestação (ddg).

5.2 MODELO EXPERIMENTAL DE ESTRESSE DE SUPERPOPULAÇÃO

O modelo de estresse social de superpopulação utilizado durante o período gestacional dos camundongos foi adaptado Reiss et al (2007). As fêmeas prenhes submetidas ao modelo, foram acondicionadas em grupo, onde cada fêmea foi mantida junto com 10 fêmeas não prenhes da mesma linhagem, em uma caixa de polietileno, com as seguintes medidas: 18 cm de largura,

30 cm de comprimento e 13 cm de altura (Figura 2B). No grupo controle a fêmea prenhe foi mantida em moradia individual (Figura 2A), em caixa idêntica, durante o mesmo período de tempo e experimentação. É importante ressaltar que as fêmeas do grupo controle não encontravam-se em condições de isolamento social, pois foram mantidas em uma mesma estante e, por conseguinte, obtinham informações sensoriais de outras fêmeas alojadas em caixas vizinhas, por meio de olfato, audição e visão, e auditivo com os demais animais.

5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Logo no primeiro 1^oddg, as fêmeas foram distribuídas em 2 grupos experimentais. O grupo controle, foi constituído pelas fêmeas prenhes, que permaneceram em moradia individual deste o 1^oddg até o momento da eutanásia ou nascimento da prole e o grupo de estresse de superpopulação, constituído por fêmeas prenhes agrupadas de acordo com o modelo de estresse de superpopulação utilizado neste estudo, o período experimental utilizado foi o mesmo que as fêmeas do grupo controle. Esse grupo permaneceu em estante separada do controle, evitando qualquer contato entre os grupos experimentais.



Figura 2 - Acondicionamento dos grupos experimentais

Fonte: Da autora.

Legenda: (A) Fêmea prenhe do grupo controle acomodada em moradia individual (B) Acomodação de fêmea prenhe alojada com 10 fêmeas não prenhes. (C) Observação de rolha vaginal detectada ao 1º ddg. (D). Estantes ventiladas para armazenamento das gaiolas com camundongos.

5.2.1 Delineamento dos Grupos Experimentais

Fêmeas dos 2 grupos, foram distribuídas em diferentes lotes (Figura 3), dependendo do experimento a ser realizado. Após a constatação do tampão vaginal, um primeiro lote de fêmeas, (em azul) foram eutanasiadas no 15º ddg e tiveram seus cornos uterinos, fetos e placenta analisados morfológicamente. O segundo lote de fêmeas prenhes, (destaque em rosa) foi utilizado para os experimentos de análise do comportamento semelhante à ansiedade em fêmeas prenhes e os filhotes destes animais foram destinados à análise do desenvolvimento físico e neuropsicomotor da prole. No terceiro (em verde), as fêmeas foram para avaliadas quando ao comportamento semelhante a depressão pós-parto no 3º dpn, análise do CM, no 5º dpn e 10º dpn, sendo seus filhotes destinados aos experimentos de análise comportamental da prole. Todos os

experimentos previstos neste trabalho foram realizados em ambos os grupos experimentais simultaneamente.

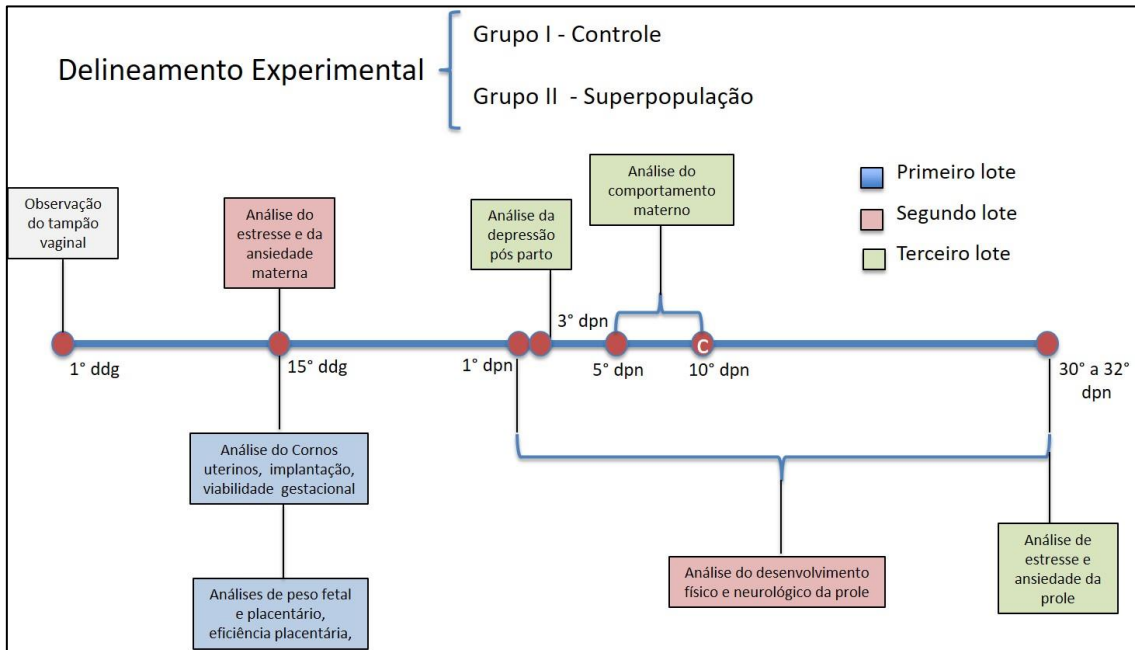


Figura 3 - Design dos grupos experimentais e procedimentos deste estudo.

Fonte: Da autora.

5.3 ANÁLISE DO GANHO DE PESO MATERNO

O ganho de peso das fêmeas prenhes foi averiguado (em todos os lotes experimentais), diariamente, por meio de balança semi-analítica, do 1º ao 19º ddg, visando analisar a interferência do estresse de superpopulação sobre o ganho de peso durante a prenhez.

5.4 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE FÊMEAS PRENHES

Para análise do comportamento das fêmeas prenhes, ambos os grupos foram submetidas aos testes a seguir.

5.4.1 Teste Labirinto em cruz elevado (LCE)

Este teste é muito utilizado para averiguar padrões de ansiedade e depressão em roedores e foi realizado de acordo com o trabalho de Walf e Frye (2007). O aparato utilizado é constituído por duas vias perpendiculares, uma contendo dois braços abertos e a outra por dois braços fechados, todos os 4 braços com 27cm de comprimento. Os braços fechados são rodeados por duas “colunas” de 16 cm de altura e entre os 4 braços observamos uma plataforma central de 6 cm², o que permite a forma de uma cruz característica do LCE (Figura 4A). Para a realização do teste nas dependências do LABAInt, os animais foram transferidos para uma sala isolada, livre de odores e barulhos. Os animais foram então colocados no centro do aparato, de frente para um dos braços fechados e filmados por cinco minutos. Para a análise dos parâmetros de ansiedade, foram computados o número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e fechados (BISON et al, 2009). Esse teste foi realizado no 15^o ddg e, em seguida, a fêmea prenhe foi devolvida para a mesma caixa. De acordo com Pellow et al (1985), animais que apresentam uma redução no comportamento preditivo de ansiedade realizam um maior número de entradas nos braços abertos e passam mais tempo nos mesmos.

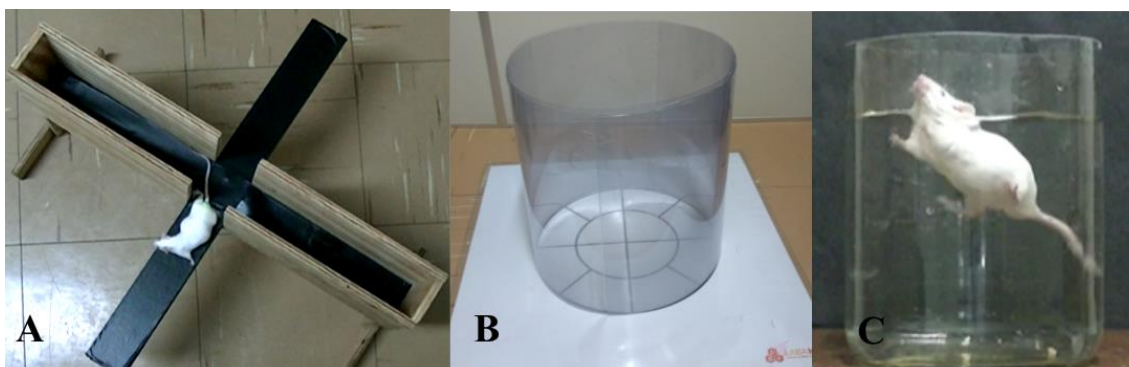


Figura 4 -Testes Realizados para Análise do comportamento.

Fonte: Da autora.

Legenda: (A) Imagem capturada da filmagem do teste de LCE, fêmea prenhe explorando braço aberto do aparato. (B) fotografia do aparato utilizado no teste de campo aberto. (C) Imagem capturada do vídeo referente ao teste de nado forçado.

5.4.2 Teste campo aberto (CA)

Esse teste foi realizado de acordo com os parâmetros desenvolvidos por LISTER (1990), adaptados por JONES (2010) e LIN (2015), para camundongos. A finalidade é avaliar a atividade motora e padrões de ansiedade das fêmeas prenhes. O aparato utilizado possui uma

arena circular bem iluminada com aproximadamente 40 cm de diâmetro, circundada por um cilindro de acrílico de 50 cm de altura (Figura 4B-C). No momento do teste, os animais foram transferidos para a mesma sala descrita no item anterior e cada animal foi colocado cuidadosamente no centro do aparato, sendo sua movimentação filmada durante 5 minutos. Avaliando a filmagem, foram mensurados os seguintes comportamentos: número de ambulações na periferia, número de ambulações no centro e o efeito anti-tigmotático (número de entradas no centro/número total de entradas). A atividade locomotora das fêmeas prenhes foi avaliada considerando o número de entradas com as quatro patas no centro, a posição das quatro patas do animal, para observar a sua mobilidade e o número de cruzamentos no centro, na periferia e o total de cruzamentos. O teste de campo aberto foi realizado nas fêmeas prenhes no 15º ddg, no período da manhã e, na sequência, as fêmeas retornaram para a mesma caixa das quais foram retiradas.

5.5 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Fêmeas prenhes foram eutanasiadas no 15º ddg, por inalação com isoflurano e laparotomizadas. O útero bicórnico foi coletado e contabilizado o número de sítios de desenvolvimento fetal (SDF), hemorragias e reabsorções, para avaliação da viabilidade gestacional. Os SDF encontrados foram individualizados e divididos em dois grupos onde metade foi seccionada para retirada e avaliação macroscópica das placentas e fetos e a outra metade foi seccionada transversalmente para isolamento da região mesometrial uterina.

5.6 CÁLCULO DA TAXA DE IMPLANTAÇÃO E DA VIABILIDADE GESTACIONAL

O cálculo das taxas de implantação e viabilidade foi realizado da seguinte forma.

5.6.1 Taxa de Implantação

Para o cálculo da taxa de implantação, o número de corpos lúteos, encontrados em ambos os ovários da fêmea prenhe, foram somados e comparados ao número de sítios de desenvolvimento fetal (SDF), encontrados nos cornos uterinos. Para a taxa de implantação ser considerada de 100%, os dois números devem ser equivalentes.

5.6.2 Viabilidade Gestacional

A porcentagem de fetos viáveis (V) foi calculada, para o 15º ddd, pela seguinte fórmula:

$$V = (\text{quantidade de fetos ou embriões viáveis} \times 100) / \text{quantidade de corpos lúteos}$$

E a perda calculada pela fórmula:

$$P = (\text{quantidade de sítios em reabsorção ou alterados} \times 100) / \text{quantidade de corpos lúteos}$$

Levando-se em consideração que:

$$V + P = 1$$

5.7 EFICIÊNCIA PLACENTÁRIA

A eficiência placentária foi calculada utilizando-se a divisão entre o peso fetal e peso da placenta, obtendo dessa forma a proporção de placenta necessária, para a manutenção fetal.

5.8 PADRONIZAÇÃO DAS PROLES

No 1º dia pós-natal (dpn) as proles (Figura 5-A) foram contadas, pesadas e avaliadas macroscopicamente em busca de alterações anatômicas evidentes. O número de filhotes foi padronizado em 6 com cada fêmea parturiente, sendo preferencialmente 3 machos e 3 fêmeas (Figura 5-B), que permaneceram na mesma gaiola que a mãe. Para normalização da prole, foi considerado apenas como critério de seleção do filhote a visualização do leite no estômago dos animais. De acordo com Chorilli et al (2007), tal aspecto deve ser considerado se houver necessidade de seleção de animais, pois animais que mamam demonstram maior habilidade para sobreviver.

As proles, juntamente com suas mães, foram distribuídas para análise do comportamento materno ou para análise do desenvolvimento físico e neurológico, ambas realizadas no decorrer do primeiro mês de vida dos neonatos.

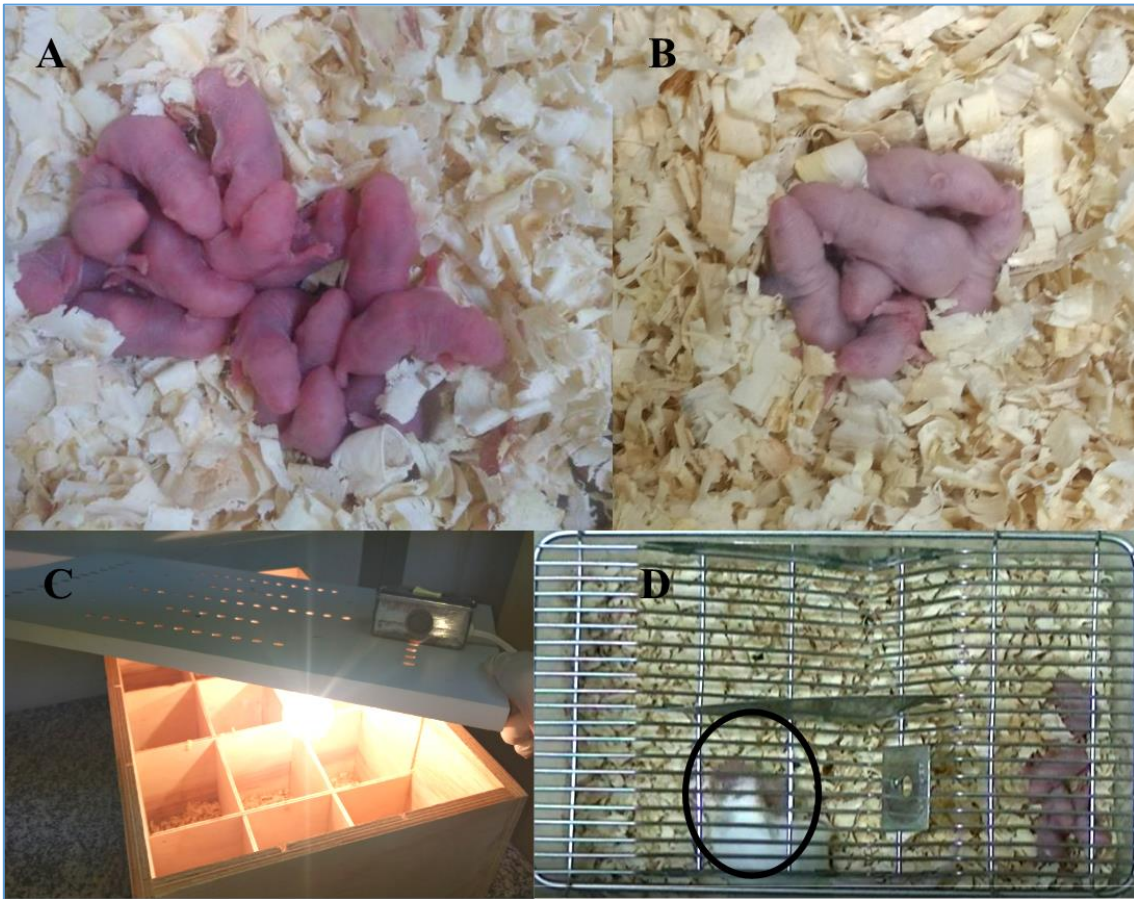


Figura 5 - Padronização da prole e análise do comportamento materno

Fonte: Da autora.

Legenda: (A) Filhotes ao nascer antes da padronização da prole. (B) Prole padronizada com seis machos e seis fêmeas. (C) Caixa para acondicionamento e manutenção da temperatura corporal da prole. (D) Imagem retirada da filmagem referente a análise do comportamento materno, lactante com levando filhote até o ninho (círculo preto).

5.9 ANÁLISE DE DEPRESSÃO PÓS-PARTO

O teste de nado forçado (“forced swimming test”) foi realizado 48 horas após o parto, para análise do comportamento de depressão pós-parto, conforme metodologia descrita por PORSOLT (1977). Nesse teste, foi utilizado um recipiente cilíndrico de vidro, com 14 cm de diâmetro e 20 cm de altura, preenchido com água na temperatura de 30°C. O volume de água colocado no frasco permitia que o animal pudesse boiar, ou nadar, sem encostar as patas na borda nem no fundo do recipiente. Após o animal ser transferido para esse recipiente, ele foi filmado por 6 minutos. Somente os últimos 5 minutos foram avaliados, para que o tempo de imobilidade, ou seja, o período em que o animal permaneceu flutuando, fosse mensurado.

5.10 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO

Visando avaliar o comportamento materno, utilizamos a análise da motivação materna após o período de separação, esta metodologia foi adaptada de Kiss et al (2012). Os filhotes foram separados de suas mães no 5º ou 10º dpn e alojados em uma caixa de madeira adaptada com lâmpadas incandescentes, para a manutenção da temperatura corporal (Figura 5-C), onde permaneceram por 2h. Durante esse período, suas respectivas mães foram transferidas para a sala de filmagem, para ambientação. Após o período de separação maternal, os filhotes foram colocados na gaiola-moradia, no lado oposto ao ninho inicial e distribuídos de forma não homogênea. Foram realizadas filmagens de 30 minutos, visando à avaliação dos parâmetros maternais (Figura 5-D) e não-maternais listados abaixo:

Parâmetros Maternos:

- a) Tempo em segundos em que a mãe tem o primeiro contato com o filhote.
- b) Latência em segundos para buscar cada filhote e levá-lo ao ninho.
- c) Tempo em segundos em que a lactante fica sobre a ninhada em posição arqueada (cifose).
- d) Tempo em segundos de lambida nos filhotes (‘licking pups’).
- e) Tempo em segundos sobre os filhotes sem estar em posição arqueada.

Parâmetros não maternos:

- a) Tempo em segundos em que a lactante permanece fora do ninho (tempo off), ou seja tempo em que a rata lactante está fora do ninho explorando ou não o ambiente.

5.11 ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO FÍSICO E NEUROLÓGICO DA PROLE

Do 2º ao 30º dpn, foi realizada a análise dos parâmetros físicos e neurológicos da prole. Essa avaliação foi sempre realizada no período da manhã, entre 10:00 e 11:00 horas, em uma sala isolada no interior do biotério de experimentação do LaBAInt.

Para possibilitar o reconhecimento de cada um dos animais da prole, os filhotes foram marcados diariamente com caneta permanente nas patas, como padronizado por Greco (2017) (Figura 6).

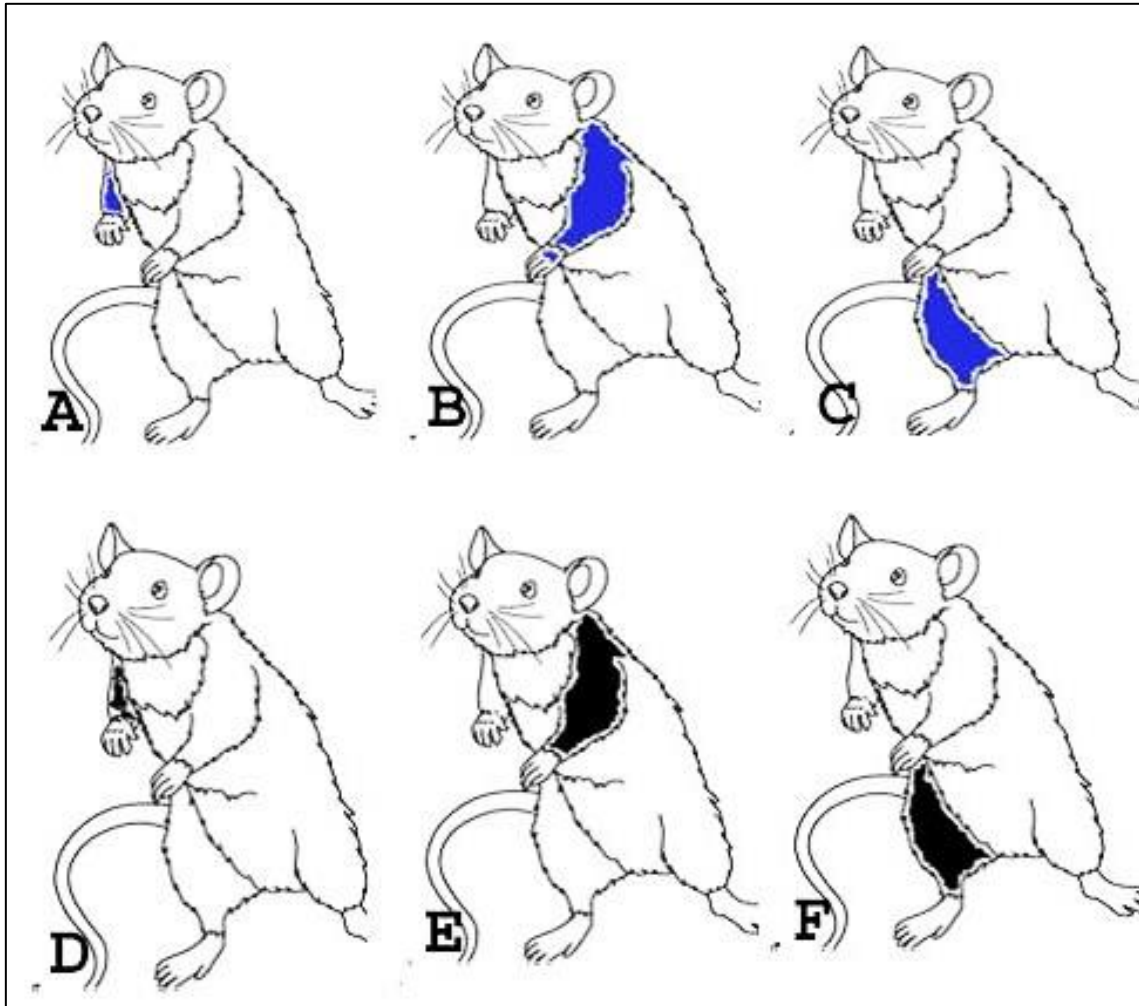


Figura 6 - Marcação padronizada dos filhotes para análise desenvolvimento físico e neurológico

Fonte: Greco, G. M. Z., 2017.

Legenda: (A, B, C) padronização em fêmeas (azul) sendo respectivamente, fêmea 1, fêmea 2 e fêmea 3; (D, E, F) padronização dos para machos (preto), macho 1, macho2 e macho 3, respectivamente.

5.11.1 Testes de desenvolvimento físico

Os testes de desenvolvimento físico executados foram adaptados de Castro et al (2000). A análise de desenvolvimento físico foi relacionada à idade do animal e à presença ou ausência das seguintes características:

- a) Descolamento de orelha;
- b) Aparecimento de pelo;
- c) Abertura do olho;
- d) Rompimento do dente incisivo superior e inferior;
- e) Descida dos testículos;

f) Abertura da vagina.

Todos os filhotes foram analisados até que apresentassem resposta sobre cada uma dessas características (Figura 7).

Os resultados do descolamento de orelha, do rompimento do dente incisivo e da abertura do olho só foram considerados positivos quando ocorreram bilateralmente.

O peso de cada filhote, os comprimentos naso-caudal, naso-anal e ânus-genital (Figura 7 H-J-I) foram registrados a partir do 2º dpn, tendo sido considerado um intervalo de três dias entre as medições. Foram contabilizados, portanto, 10 registros para cada filhote, correspondentes aos seguintes dias: 2º, 5º, 8º, 11º, 14º, 17º, 20º, 23º, 26º e 29ºdpn. As medidas foram realizadas utilizando um paquímetro digital (MARBEG) de 200 mm de extensão.

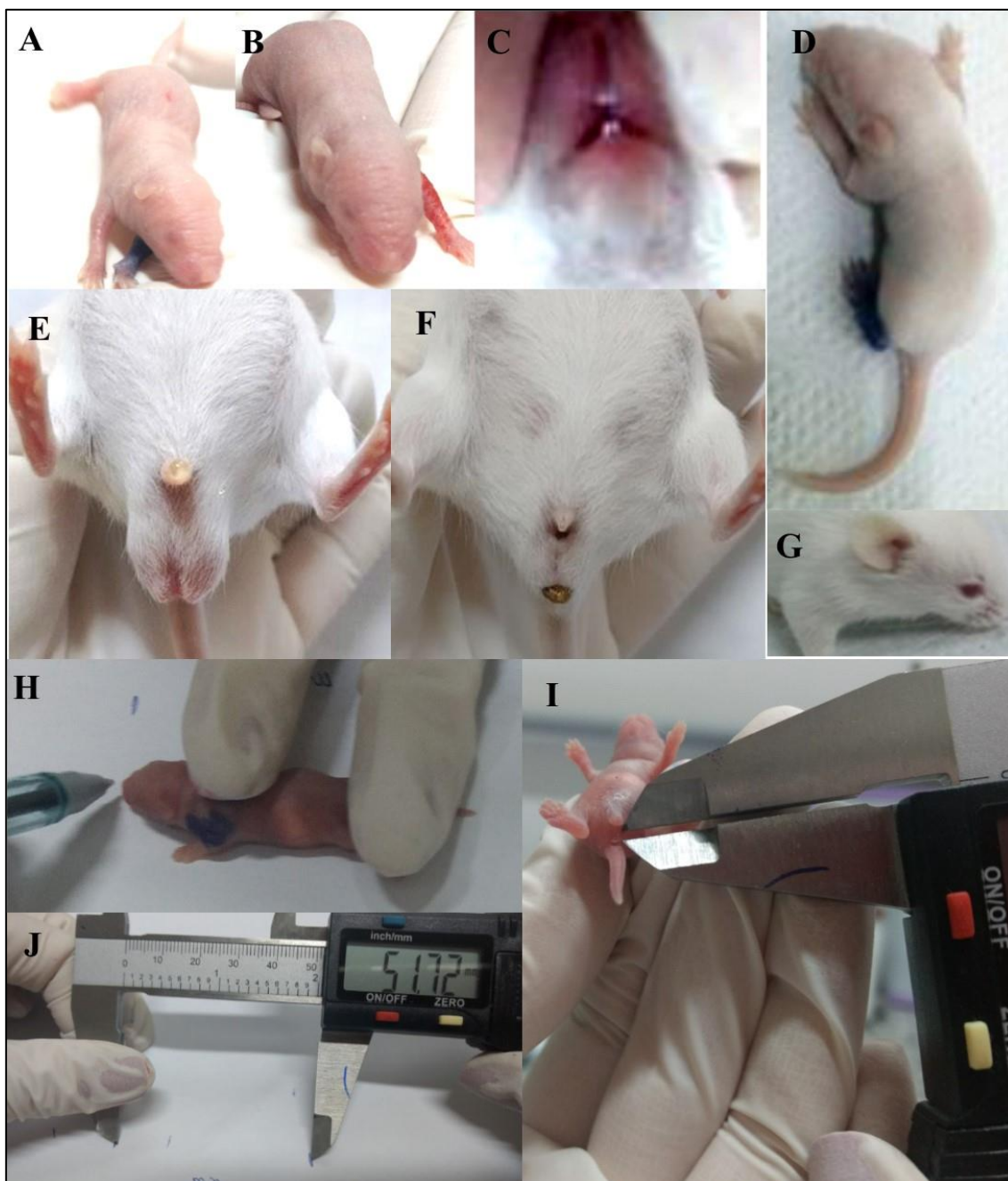


Figura 7- Parâmetros do desenvolvimento físico analisados ao decorrer do primeiro mês de vida dos filhotes.

Fonte: Da autora.

Legenda: (A) Animal ao 5° DPN, observar os olhos fechados, orelhas coladas e ausência de pelos. (B) Descolamento de orelha. (C) Rompimento dos incisivos. (D) Aparecimento de pelos. (E) Descida dos testículos. (F) Abertura de vagina. (G) Abertura de olhos. (H). Posicionamento do animal para marcação no papel para futura medida naso/caudal e naso/anal. (I) Medida da distância ano/genital. (J) Medida da distância naso/caudal com paquímetro digital MARBEG.

5.11.2 Testes de desenvolvimento neurológico

Para os testes de desenvolvimento neurológico, foram utilizados dois filhotes do sexo masculino e dois do sexo feminino de cada prole, tendo sido sempre realizados no mesmo local e no mesmo horário dos testes de desenvolvimento físico. Os testes de desenvolvimento neurológico foram baseados e adaptados dos trabalhos de Castro (2006) e Davydov et al. (2015), realizados como descritos a seguir e ilustrados na Figura 8.

- a) Reflexo de endireitamento: o filhote é colocado deitado em uma superfície plana em decúbito dorsal. Observa-se se, em 60 segundos totais, o animal consegue retornar ao decúbito ventral, com as quatro patas apoiadas na superfície;
- b) Reflexo de agarrar: Passa-se a agulha perpendicularmente na palma das patas dianteiras do filhote e observa-se se há, ou não, resposta de agarrar e segurar. O resultado foi considerado positivo quando o filhote deixou de segurar a agulha.
- c) Geotaxia negativa: Coloca-se o animal em uma rampa de 30°, de superfície antiderrapante, com a cabeça voltada para a parte mais baixa. Observa-se se o animal é capaz de virar-se 180°, de forma a estar com a cabeça voltada para a parte mais alta da rampa, em um tempo total de 60 segundos;
- d) Reflexo de sobressalto: O animal é exposto a um som alto e estridente de intensidade controlada e observa-se se ele percebe o som, causando um sobressalto no animal. O sobressalto indica início da atividade auditiva do animal.

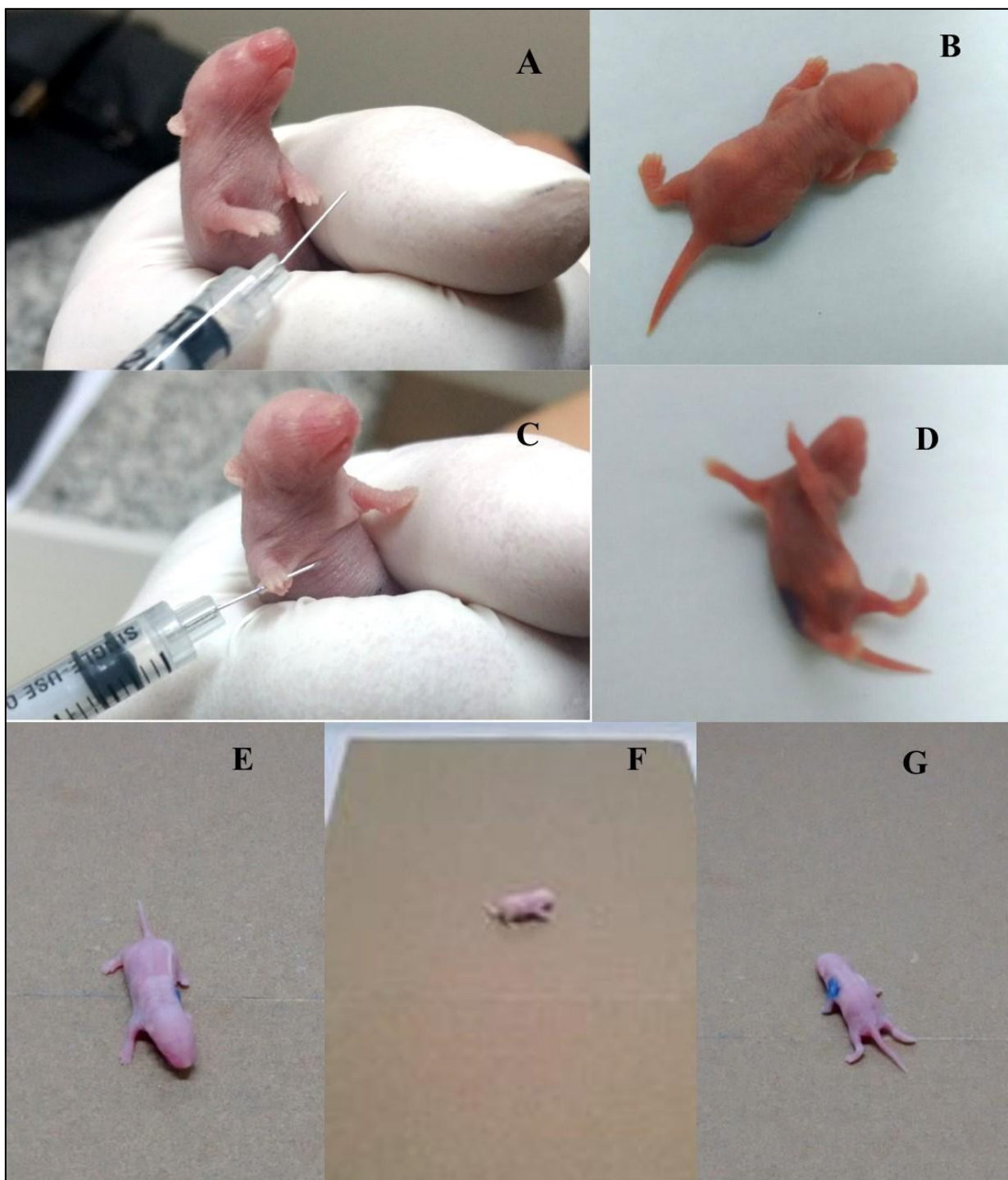


Figura 8 - Testes de desenvolvimento neurológico.

Fonte: Da autora.

Legenda: (A–C) Teste de agarramento palmar. (B-D) Animal realizando teste de reflexo de endireitamento, no qual ao se posicionar na posição decúbito ventral, no tempo estipulado, o teste é considerado positivo. (E-F-G) Animal realizando teste de geotaxia negativa, no qual ao se virar 180° para o lado de cima da rampa o teste é considerado positivo. D, E, F.

5.12 DESEMPENHO COMPORTAMENTAL DA PROLE JOVEM

Para estudo do comportamento da prole jovem, foram avaliados os parâmetros de “comportamento semelhante à ansiedade” nos testes de LCE e CA, já descritos no item 5.4. Foram selecionados, aleatoriamente, um macho em uma fêmea de cada prole, entre o 30º e o 32º dpn, para serem submetidos aos testes realizados.

5.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Em caso de dados paramétricos foi utilizado o teste t não pareado e para dados não paramétricos o teste de comparação Mann-Whitney. Para as análises em que apresentavam duas variáveis (tempo e tratamento), foi realizado o teste de análise de variância ANOVA Two-way (expressos como média \pm desvio padrão), seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Graph pad Prism 6.

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho serão apresentados em etapas, sendo elas; avaliação gestacional, análise das fêmeas pós parto e análise da prole.

6.1 AVALIAÇÃO GESTACIONAL

Os resultados em relação a avaliação gestacional foram subdivididos em: Percentual êxito da prenhez A avaliação gestacional, análise macroscópica dos cornos uterinos, taxa de implantação e viabilidade, avaliação macroscópica dos fetos e placenta, ganho de peso materno e comportamento das prenhas.

6.1.1 Percentual Êxito da Prenhez

Conforme descrito na metodologia, as fêmeas foram colocadas junto com os machos, para acasalamento, no fim da tarde e na manhã seguinte. Quando constatado o tampão vaginal, considerou-se como o 1º ddg e, nesse mesmo dia, as fêmeas do grupo superpopulação foram acondicionadas em uma gaiola com mais 10 companheiras, enquanto as fêmeas do grupo Controle foram mantidas em gaiola individual. Na observação do tampão vaginal, no grupo de superpopulação, observamos uma redução significativa da taxa de êxito gestacional. As gestações, que chegaram a termo nesse grupo, corresponderam a apenas 54,29%, enquanto no grupo controle chegaram a 88,47% (Figura 9).

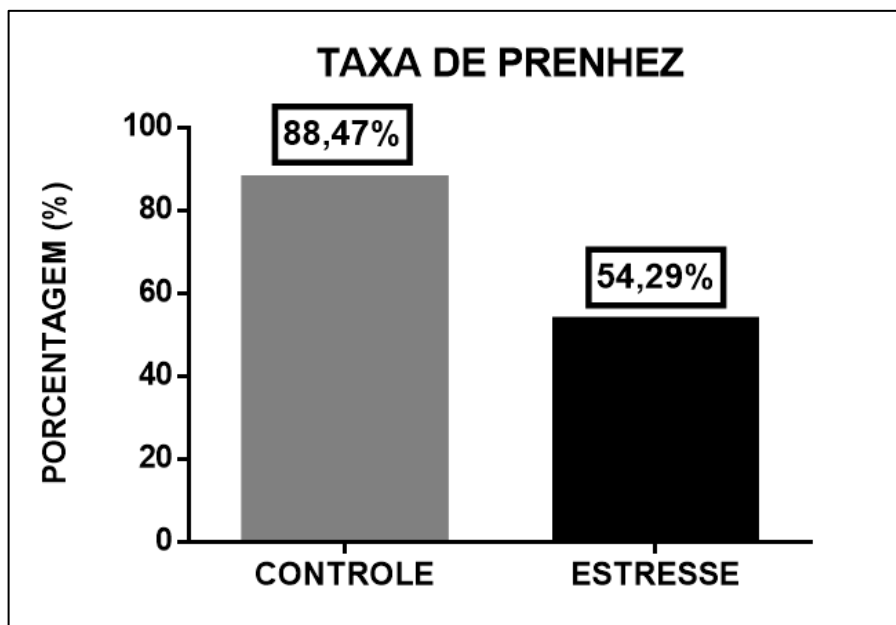


Figura 9 - Gráfico apresenta porcentagem de prenhez dos grupos controle (n=20) e estresse (n=20).

Fonte: Da autora.

6.1.2 Análise Macroscópica dos Cornos Uterinos

Conforme descrito, na metodologia, para avaliação macroscópica dos cornos uterinos, foram consideradas apenas as fêmeas que apresentaram sítios de desenvolvimento fetal (SDF), contendo hemorragias visíveis, tamanho reduzido ou em aparente processo de reabsorção (Figura 10A e B). Constatou-se um aumento significativo de hemorragias e reabsorções nos SDF e, conseqüentemente, uma diminuição no número de sítios normais (SN) nos cornos uterinos provenientes de fêmeas submetidas ao modelo estresse de superpopulação (Figura 10 C).

6.1.3 Taxa de Implantação e Viabilidade Gestacional

A taxa de implantação e a viabilidade gestacional apresentaram-se significativamente reduzidas nas fêmeas que passaram pelo estresse de superpopulação quando comparadas ao controle (Figura 10D).

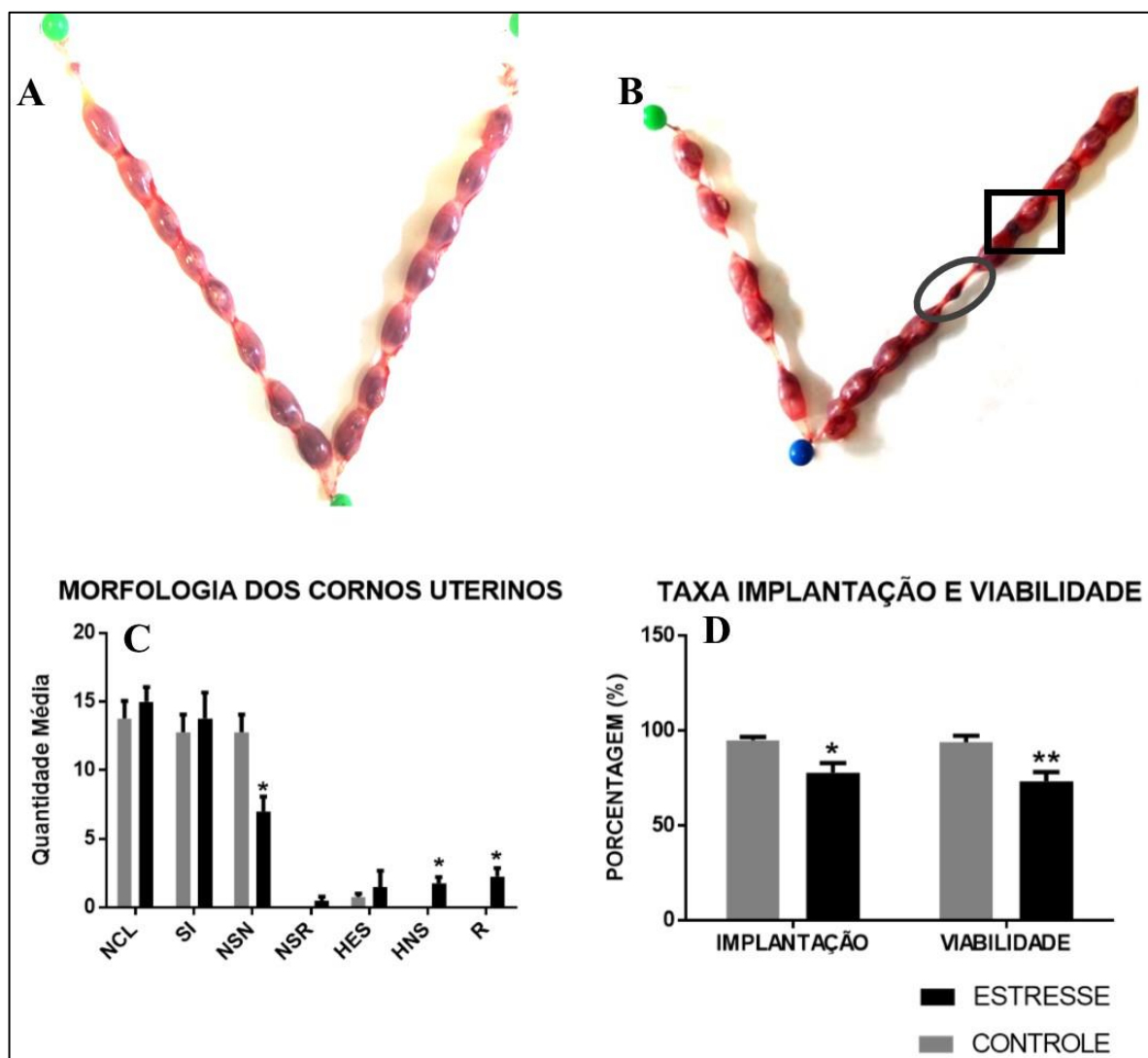


Figura 10 - Análise macroscópica dos cornos uterinos

Fonte: Da autora

Legenda: (A-B): Fotografia dos cornos uterinos no 15º ddg, grupos controle e estresse, respectivamente (observar hemorragia marcada com quadrado e reabsorção marcada com círculo). (C) Morfologia dos cornos uterinos dos grupos controle (n=6) e expostos a estresse de superpopulação (n=6); (NCL) número de corpos lúteos, (SI) número de sítios implantados, (NSN) número de sítios normais*, (NSR) número de sítios reduzidos, (HES) hemorragias entre os sítios, (HNS) hemorragias nos sítios* e (R) reabsorções*. (D) taxa de implantação* e viabilidade **. Valores expressos sem média \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$ (teste Mann Withney).

6.1.4 Avaliação Macroscópica dos Fetos e Placentas

Após a avaliação dos SDF, os cornos uterinos foram abertos e as placentas e fetos de 15º ddg foram isolados, avaliados morfológicamente e pesados.

As placentas apresentaram aparência discoide e coloração rosada, com aspecto uniforme, sem evidências de hemorragias e infartos, tanto no grupo controle como no grupo de

superpopulação (Figura 11A). No entanto, uma redução de peso significativa foi observada nas placentas de mães submetidas ao estresse de superpopulação (Figura 11C).

Os fetos do grupo Controle apresentaram coloração e tamanho adequados, sem nenhuma teratologia evidente. A proeminência hepática estava bem visível, ocupando o maior espaço da cavidade abdominal e os plexos vasculares da face e do couro cabeludo foram facilmente observados (Figura 11B) nos filhotes do grupo controle. Os fetos do grupo submetido ao estresse de superpopulação apresentaram tamanho visivelmente reduzido e uma coloração mais pálida, quando comparados com os fetos do controle. A proeminência hepática dos fetos expostos a estresse pré-natal, estava bastante reduzida e os plexos vasculares ainda estavam quase imperceptíveis a olho nu, embora não tenham sido observadas alterações teratogênicas maiores (Figura 11B). Após pesados, os fetos do grupo de superpopulação apresentaram uma redução bastante significativa de massa quando comparados aos fetos do mesmo período de gestação de mães controle.

A razão entre o peso fetal e o peso da placenta foi obtida para cálculo da eficiência placentária, sendo constatada uma redução da eficiência desse órgão no grupo submetido ao estresse social (Figura 11D).

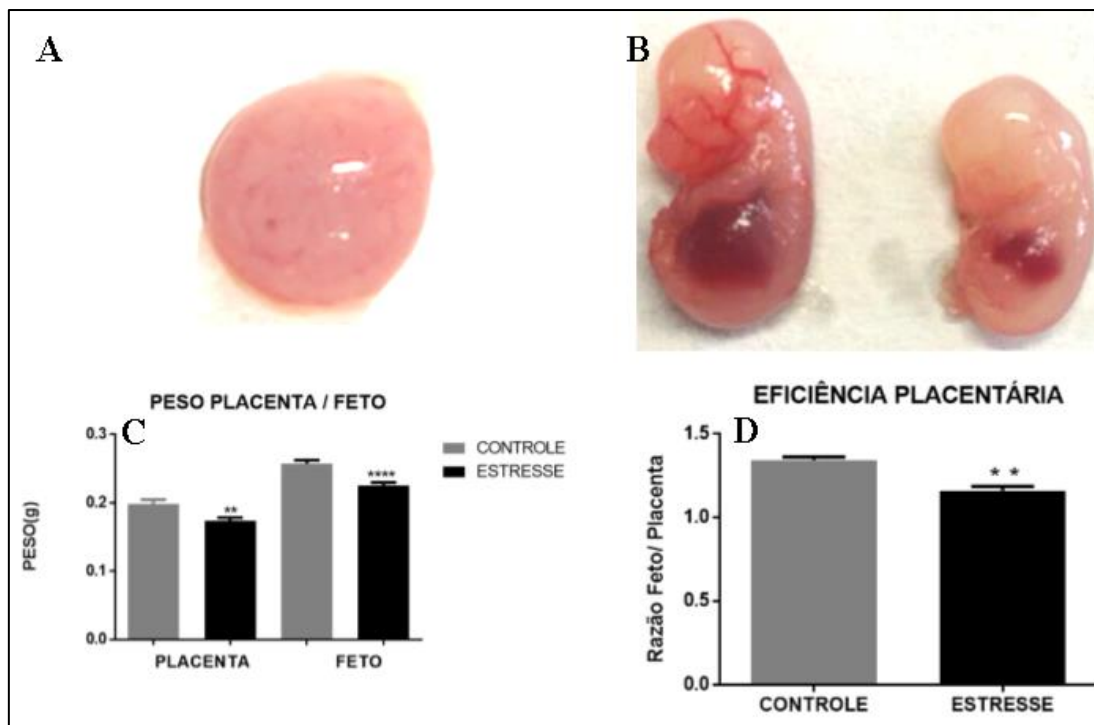


Figura 11 - Análise fetal e placentária.

Fonte: Da autora

Legenda: (A) fotografia da placenta; (B) fotografia dos fetos (à esquerda, feto do grupo controle, seguido pelo feto exposto ao estresse pré-natal, à direita). (C) Gráfico do peso das placentas** e Fetos **** no 15º DDG. (D) Eficiência placentária: razão "feto dividido pela placenta". Controle: n=6; Estresse: n=6. Valores expressos em média \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; teste Mann Withney.

6.1.5 Ganho De Peso Materno

O peso dos animais prenhes de ambos os grupos foi acompanhado durante a gestação, sendo mensurado diariamente do 1° ao 19° ddg. Foi constatada uma diminuição importante no ganho de peso das fêmeas submetidas ao estresse, a partir do 14° ddg em comparação com o grupo controle (Figura 12).

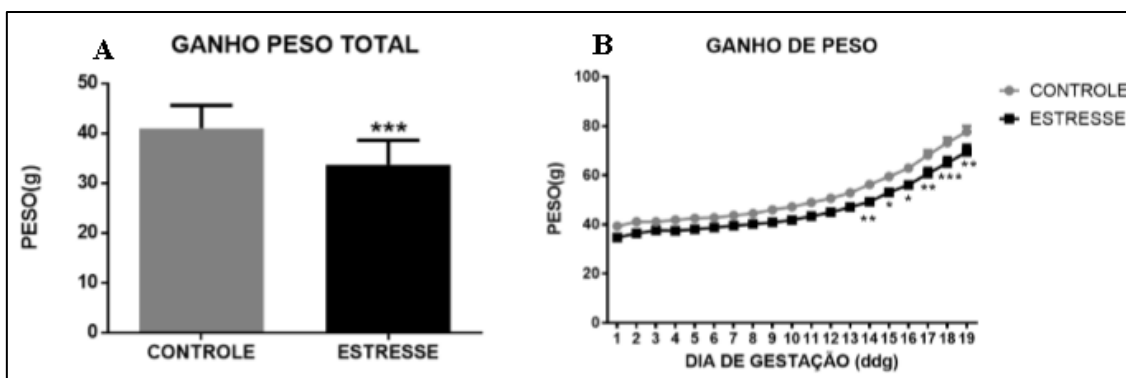


Figura 12 - Análise do ganho de peso durante a gestação.

Fonte: Da autora.

Legenda: (A) Ganho de peso total durante a gestação. (B) ganho de peso do 1° ddg ao 19°ddg. Pode ser observado, a partir do 14°ddg, um ganho de peso significativamente menor nas fêmeas prenhes submetidas ao estresse (n=13), comparado com o grupo controle (n=13). * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Two-way ANOVA e pós-teste Bonferroni (média \pm SEM).

6.1.6 Comportamento Semelhante À Ansiedade Durante A Prenhez

Os resultados dos testes de comportamento, realizados nas fêmeas prenhes estão apresentados abaixo.

6.1.6.1 Labirinto em cruz elevado

O teste de LCE foi realizado no 15° ddg com o intuito de avaliar o comportamento semelhante à ansiedade das fêmeas prenhes. Esse teste demonstrou um aumento no número de entradas nos braços abertos (Figura 13A). No entanto, os demais parâmetros, como frequência de entradas nos braços fechados (Figura 13B), o tempo de permanência nos braços abertos e braços fechados (Figura 13C-D) e o número total de entradas (Figura 13E) não demonstraram diferenças significativas.

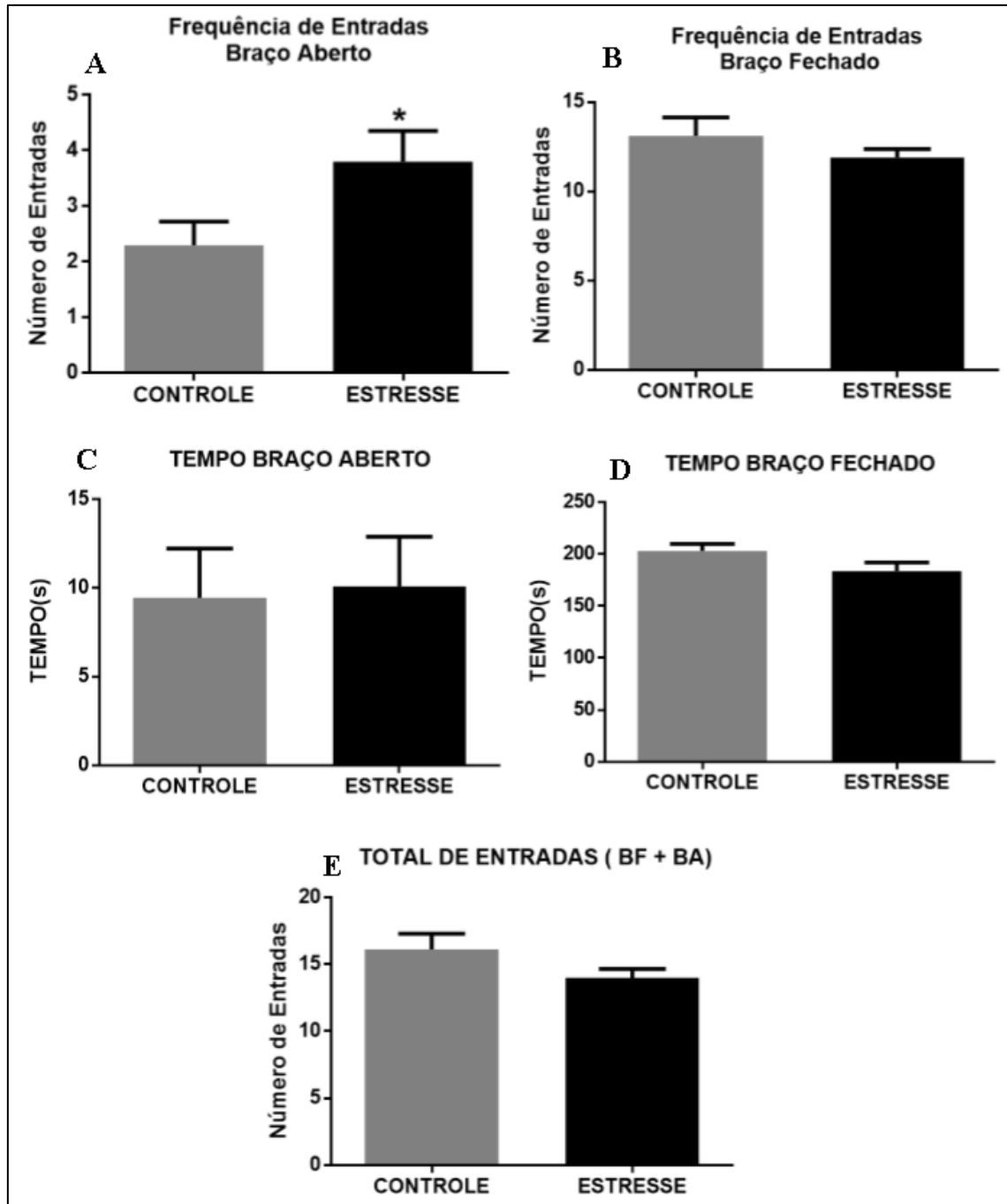


Figura 13 - Teste de Labirinto em cruz elevado entre os grupos experimentais.

Fonte: Da Autora.

Legenda: (A) Frequência de entradas no braço aberto; (B) Frequência de entradas no braço fechado; (C) Tempo de permanência no braço aberto; (D) Tempo de permanência no braço Fechado; (E) Número total de entradas nos braços do labirinto (BF+BA). Controle: n=10; Estresse: n=10. Valores expressos em média \pm SEM; $p < 0,05$ (teste Mann Withney).

6.1.6.2 Teste de campo aberto

O teste de Campo aberto, utilizado neste trabalho para analisar a atividade emocional e locomotora das fêmeas prenhes, demonstrou que o grupo de animais submetidos ao estresse de superpopulação apresentou um aumento significativo no número de cruzamentos centrais (Figura 14A), no número de cruzamentos totais (Figura 14B) e, por conseguinte, na razão de entradas no centro sobre o total de entradas (Figura 14D), em relação ao grupo controle. A análise do cruzamento periférico não apresentou diferenças significativas em relação aos grupos deste estudo (Figura 14C).

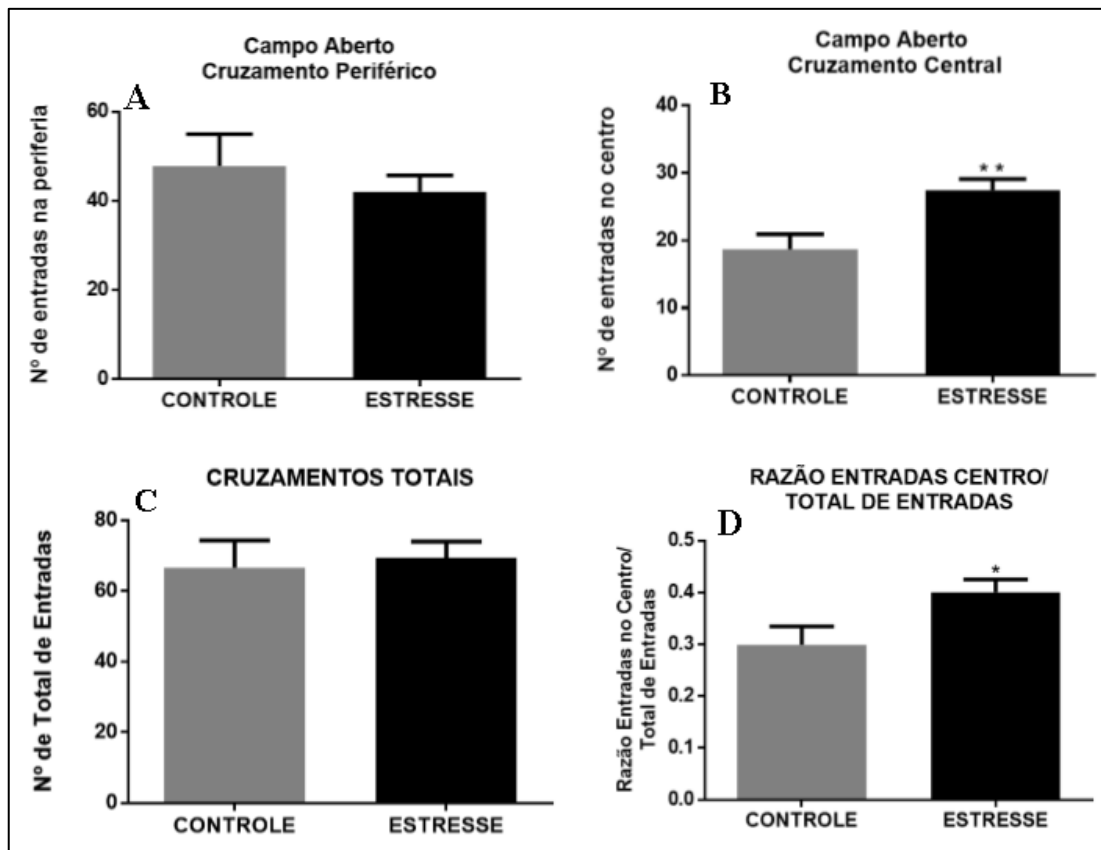


Figura 14 - Efeito do Estresse de superpopulação sobre o comportamento de fêmeas prenhes.

Fonte: Da autora.

Legenda: (A) número de cruzamentos na periferia; (B) números de cruzamentos no centro; (C) número de cruzamentos totais; (D) Razão de entradas no centro sobre o total de entradas. Controle: n=10; Estresse: n=10. Valores expressos em média \pm SEM; $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (teste Mann Withney).

6.2 ANÁLISE DAS FÊMEAS PÓS PARTO

Os resultados referentes a análise das fêmeas pós parto foram foram a análise do comportamento semelhante à depressão pós parto e análise do comportamento materno em relação à prole apresentados abaixo.

6.2.1 Comportamento Depressivo Após o Parto

A depressão pós-parto foi avaliada 48h após o nascimento, utilizando-se o teste de nado forçado. Foi observada uma diferença de mobilidade significativa entre o grupo controle e o submetido ao estresse, com esse último permanecendo imóvel por um menor período de tempo (Figura 15).

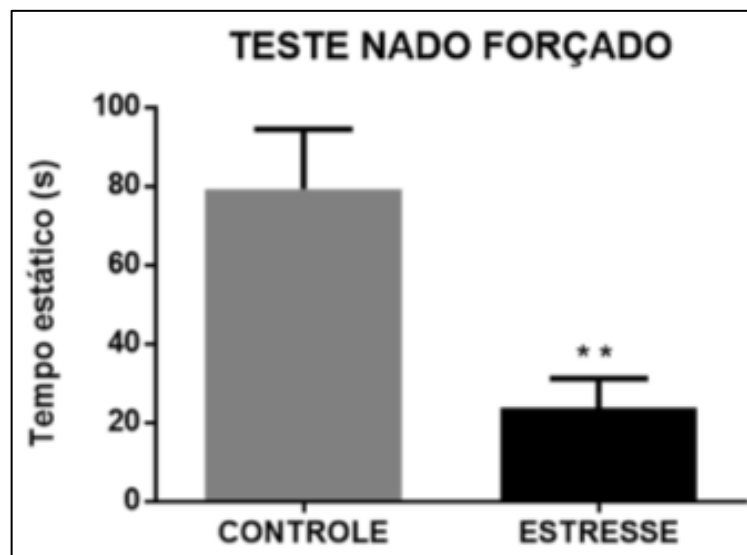


Figura 15 - Tempo de imobilidade no teste de nado forçado.

Fonte: Da autora

Legenda: O grupo exposto ao estresse de superpopulação apresentou uma diminuição significativa no tempo de imobilidade (**). Controle n=10; Estresse n=10. Valores expressos em média ± SEM. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (teste Mann Withney).

6.2.2 Comportamento Materno De Cuidados Com A Prole

Conforme descrito na metodologia, os filhotes foram separados das mães por 2h no 5º e 10º dia pós-nascimento (dpn). Durante o período em que ficou separada da mãe, a prole foi

constantemente observada, visando à manutenção adequada da temperatura corpórea e à homeostase dos filhotes.

Os trinta minutos iniciais do contato entre a mãe e a prole, devolvida à gaiola moradia, foram filmados e avaliados, tendo sido constatado que o estresse gestacional, ao qual a mãe foi submetida, não revelou diferenças significativas nos parâmetros de reconstrução do ninho (Figura 16A-B), bem como no tempo em que a fêmea permaneceu no ninho, nem no tempo que passou fora dele (Figura 16C-D). Também não foi observada diferença na latência de contato com o primeiro filhote (Figura 16E), assim como no tempo em que a fêmea permaneceu em posição de cifose (Figura 16F). No entanto, o estresse reduziu o tempo de lambida da mãe nos filhotes no 5° dpn, não alterando este parâmetro de maneira significativa no 10° dpn, quando comparadas com o controle (Figura 16G).

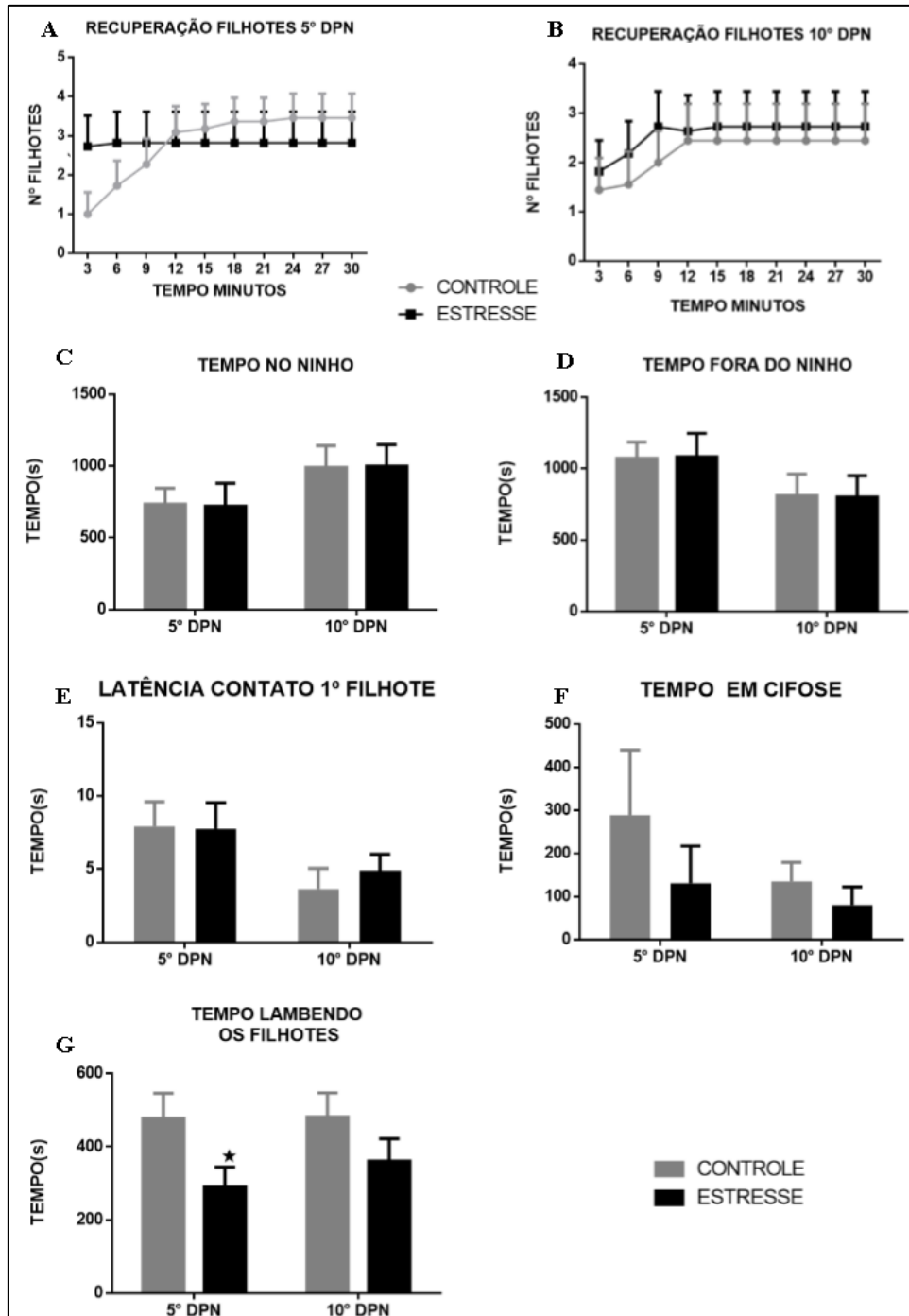


Figura 16- Análise dos parâmetros maternos avaliados no 5° e 10° DPN)

Fonte: Da Autora.

Legenda: Grupos Controle (n=11) e o grupo exposto ao estresse de superpopulação (n=11) (A, B) Construção do ninho no 5° e 10 DPN; (C) Tempo em que a lactante permanece no ninho; (D) Tempo em que a lactante fica fora do ninho; (E) Latência de contato com o primeiro filhote; (F) Tempo em que a lactante permanece em posição de cifose; (G) Tempo, em segundos, em que a lactante lambe os filhotes. Valores expressos em média \pm SEM; $p < 0,05$.

6.3 ANÁLISE DA PROLE

Os resultados em relação a prole foram subdivididos em; análise da prole ao nascimento, desenvolvimento físico da prole, análise do ganho de peso e crescimento da prole e desenvolvimento neurológico, todos estes dados estão apresentados a seguir.

6.3.1 Análise da prole ao nascimento

O peso da prole, ao nascer, apresentou números significativamente menores no grupo submetido ao estresse, quando comparado ao grupo controle (Figura 17 A e B), Apesar do peso reduzido, verificou-se um aumento do número de filhotes nascidos das mães expostas ao estresse em relação ao controle (Figura 17C).

Outro dado interessante foi o aumento do número de natimortos no grupo em que as mães foram submetidas ao estresse social (Figura 17D).

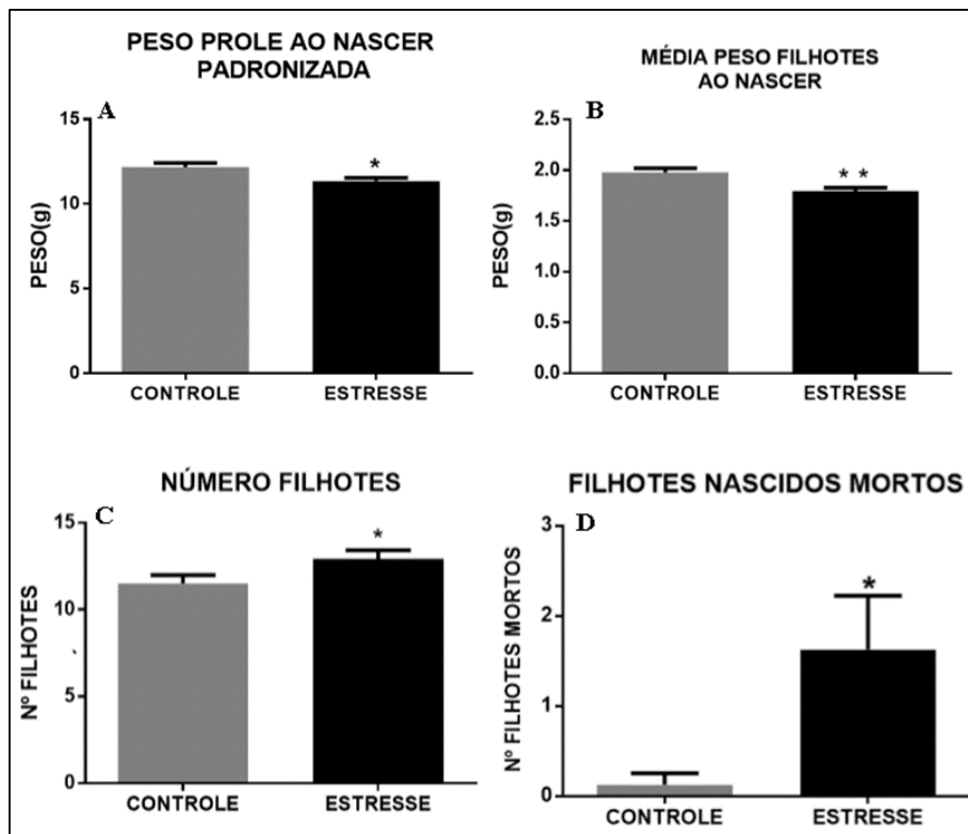


Figura 17- Análise da prole ao nascer.

Fonte: Da autora.

Legenda: (A) Peso da prole após prapadronização (6 filhotes); (B) média de peso dos filhotes por prole; (C) número de filhotes por prole; e (D) média de natimortos. Controle: n=13; Estresse: n=13. Valores expressos em média ± SEM, * p<0,05, ** p<0,01 (teste Mann Withney).

6.3.2 Desenvolvimento físico da prole

Alguns parâmetros físicos, avaliados neste estudo (descolamento de orelha, abertura de olho, aparecimento de pelos, rompimento de incisivos superior e inferior, abertura de vagina e descida dos testículos) não demonstraram significância estatística entre os filhotes gerados por mães submetidas ao estresse pré-natal de superpopulação, quando comparados com os filhotes das mães mantidas em gaiolas individuais, considerados como controle (Figura 18).

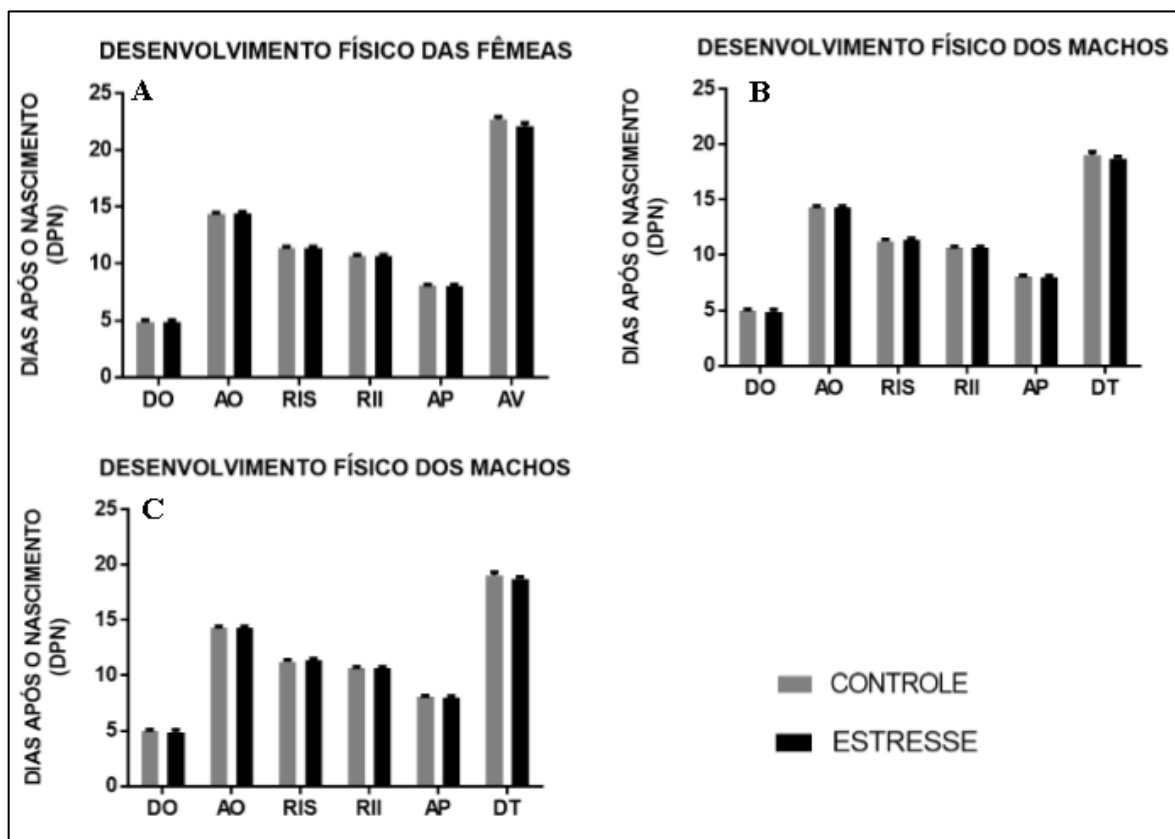


Figura 18- Análise do desenvolvimento físico dos filhotes ao longo do primeiro mês de vida.

Fonte: Da Autora.

Legenda: (A) desenvolvimento físico de filhotes fêmeas; (B) Desenvolvimento físico de filhotes machos; (C) Desenvolvimento físico de filhotes de ambos os sexos. **DO**: descolamento de orelha; **AO**: abertura de olho; **RIS**: rompimento de incisivo superior; **RII**: rompimento de incisivo inferior; **AP**: aparecimento de pelo; **AV**: abertura de vagina; **DT**: descida dos testículos. Controle: n=18; Estresse: n=18. Valores expressos em média \pm SEM (teste Mann Withney).

6.3.3 Análise do Ganho de Peso da Prole

A curva, que relaciona a interferência do modelo de estresse utilizado durante a gestação sobre o ganho de peso da prole, durante o primeiro mês de vida, não apresentou alterações para os filhotes de ambos os sexos (Figura 19). No entanto, quando consideramos o peso total adquirido durante o primeiro mês de vida, observamos que os filhotes do sexo feminino, cujas mães foram submetidas ao estresse social durante a gestação, apresentaram uma diminuição no ganho de peso total (Figura 19B). Para os filhotes machos, não encontramos diferença na curva de peso adquirido durante o primeiro mês de vida, assim como no ganho de peso total.

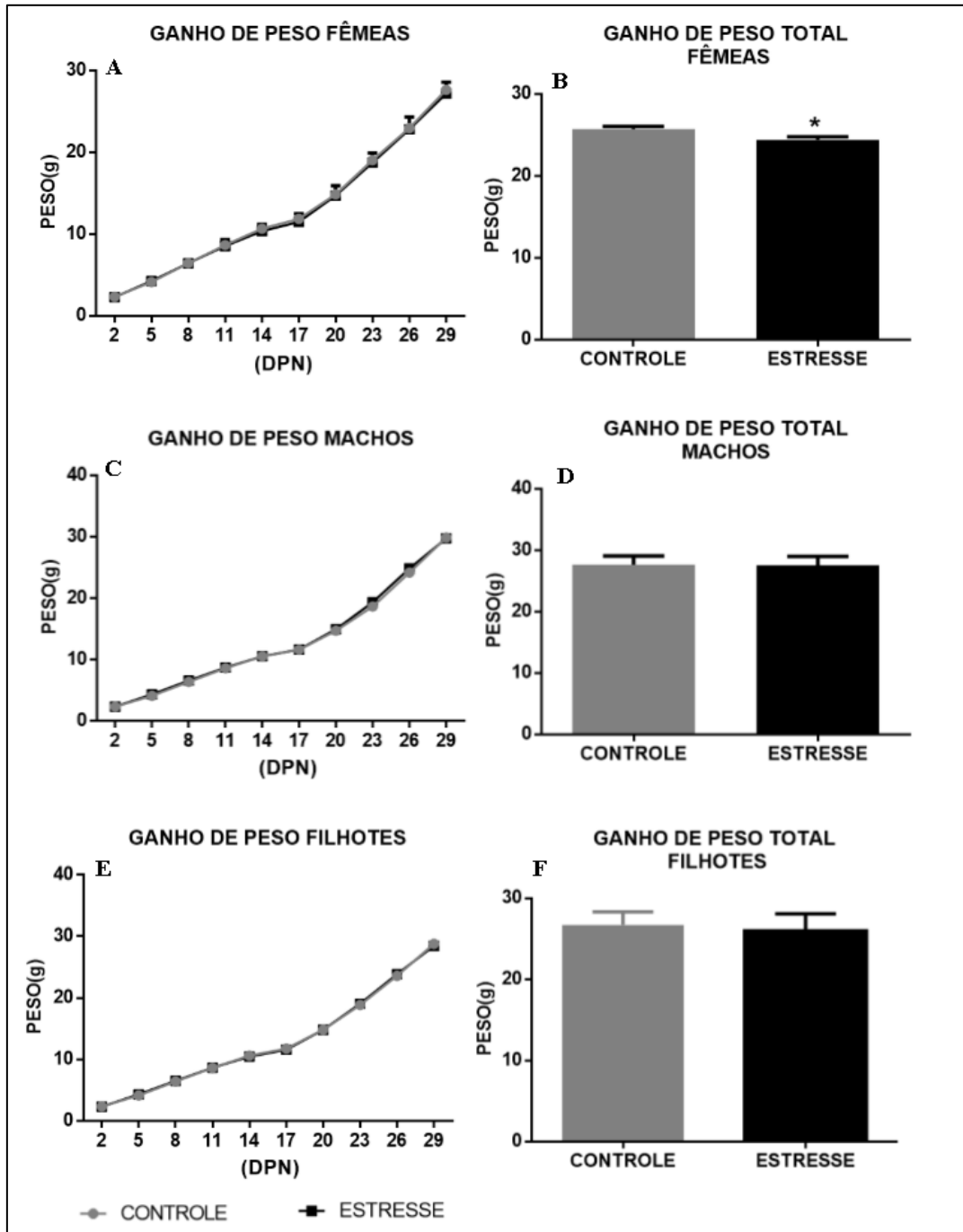


Figura 19 - Ganho de peso dos filhotes ao longo do primeiro mês de vida. $p < 0,05$.

Fonte: Da autora.

Legenda: (A) Curva do ganho; (B) Média do ganho de peso total ao longo do primeiro mês de vida dos filhotes fêmeas; (C). Curva do ganho de peso de filhotes machos ao longo do primeiro mês de vida; (D) Média do ganho de peso total ao longo do primeiro mês de vida dos filhotes Machos; (E) Curva do ganho de peso dos filhotes de ambos os sexos, ao longo do primeiro mês de vida; (F) Média do ganho de peso total dos filhotes de ambos os sexos, ao longo do primeiro mês de vida. Controle: $n=18$, Estresse: $n=18$. Valores expressos em média \pm SEM, teste ANOVA Two-Way, seguido de Bonferroni e teste Mann Withney. (*)

6.3.4 Análise do Crescimento da Prole

O crescimento dos filhotes foi avaliado utilizando-se três parâmetros (distância naso-caudal, distância naso-anal e distância ânus-genital) conforme dados apresentados a seguir:

6.3.4.1 Crescimento Naso-Caudal

O crescimento naso-caudal das fêmeas (Figura 20A) não exibiu diferenças significativas entre os grupos avaliados. Entretanto, os filhotes machos expostos ao estresse pré-natal de superpopulação apresentaram uma diminuição significativa deste parâmetro, pontualmente no 29° dpn (Figura 20B). Ao serem considerados os filhotes de ambos os sexos, observou-se uma diminuição significativa desta medida no 23° e 29° dpn em relação ao grupo originado da mãe que permaneceu em moradia individual.

6.3.4.2 Crescimento Naso-anal

Ao mensurar o comprimento naso-anal dos filhotes, foi constatada uma redução de tamanho no grupo submetido ao estresse pré-natal, quando comparado com o controle. Esta redução ocorreu na análise das fêmeas no 26° e no 29° dpn (Figura 20D) e, nos machos, apenas no 29° dpn (Figura 20E). No entanto, quando os dados de ambos os sexos foram considerados a alteração de tamanho naso-anal demonstrou-se significativa nos 23°, 26° e 29° dpn (Figura 20F).

6.3.4.3 Crescimento Ânus-genital

Esse parâmetro apresentou diminuição significativa nos filhotes machos e fêmeas, na puberdade, tendo sido mais aparente em fêmeas, pois foi detectada uma redução muito significativa desta medida nos 23°, 26° e 29° dpn (figura 20G). Esse parâmetro, quando avaliado nos machos, apresentou-se menor em relação ao grupo de filhotes-controle nos 26° e 29° dpn e a diferença foi menos significativa que a encontrada em filhotes do sexo feminino.

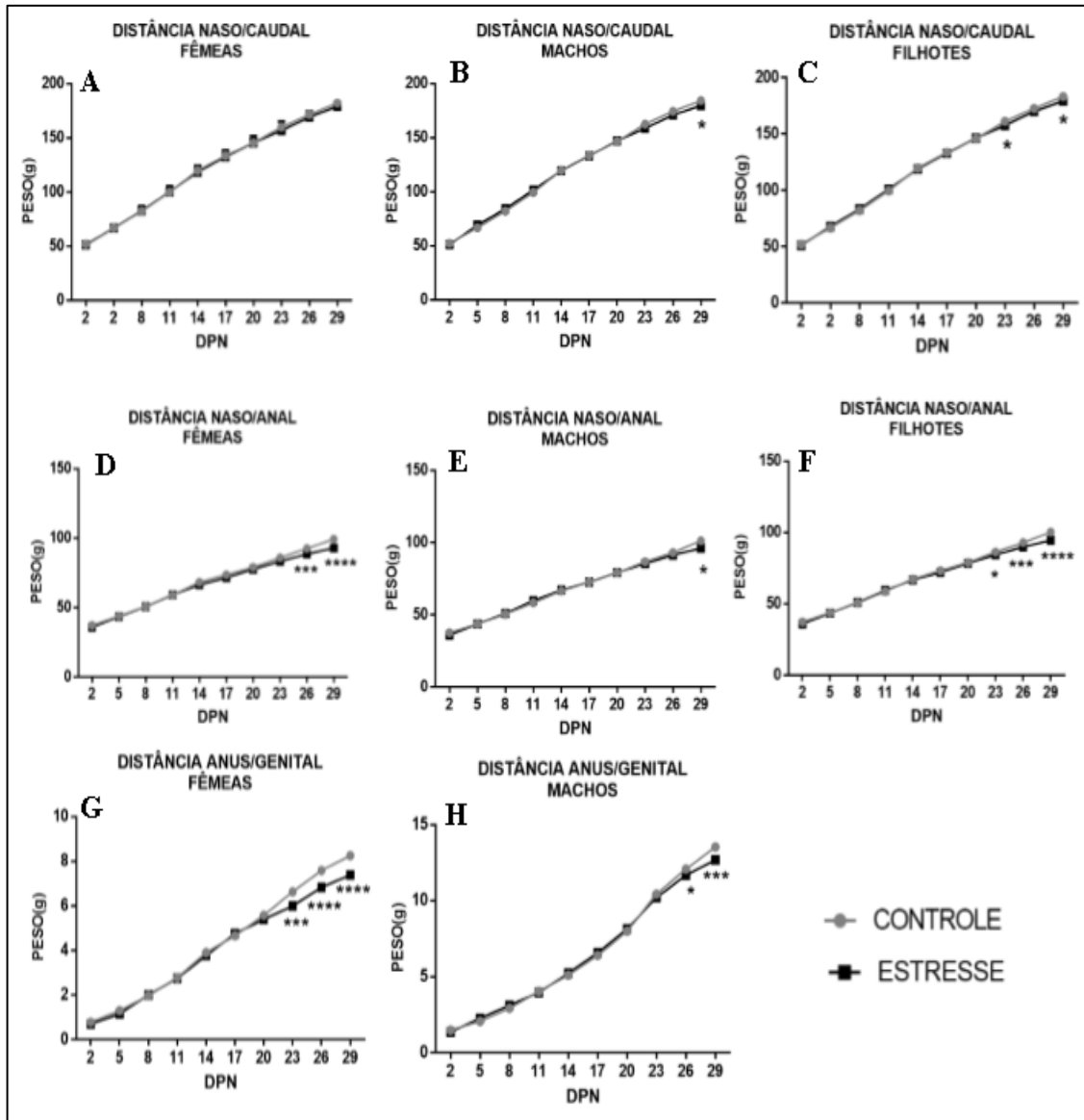


Figura 20 - Crescimentos naso-caudal, naso-anal e ânus-genital, ao longo do primeiro mês pós nascimento, de filhotes de mães expostas a estresse de superpopulação.

Fonte: Da autora.

Legenda: Respectivamente: crescimento naso-caudal de filhotes fêmeas (A); machos (B); e de ambos os sexos (C). Crescimento naso-anal de filhotes fêmeas (D); machos (E); e de ambos os sexos (E). Crescimento ânus-genital de filhotes fêmeas (G); machos (H); e de ambos os sexos (I). Controle: n=18; Estresse: n=18. Valores expressos sem média \pm . teste ANOVA Two-Way seguido de Bonferroni. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

6.3.5 Desenvolvimento Neurológico

Em relação aos parâmetros avaliados nos testes de desenvolvimento neurológico, realizados neste trabalho (agarramento palmar, geotaxia negativa, reflexo de endireitamento e sobresalto auditivo), os filhotes expostos ao estresse pré-natal, demonstraram um atraso

significativo no agarramento palmar e no reflexo de endireitamento, tanto nas fêmeas quanto nos machos (Figura 21A-B). Esse aumento do tempo para manifestação do reflexo foi ainda mais significativo na análise conjunta dos filhotes de ambos os sexos (Figura 21C). Os testes de geotaxia negativa e sobressalto auditivo não apresentaram variações significativas.

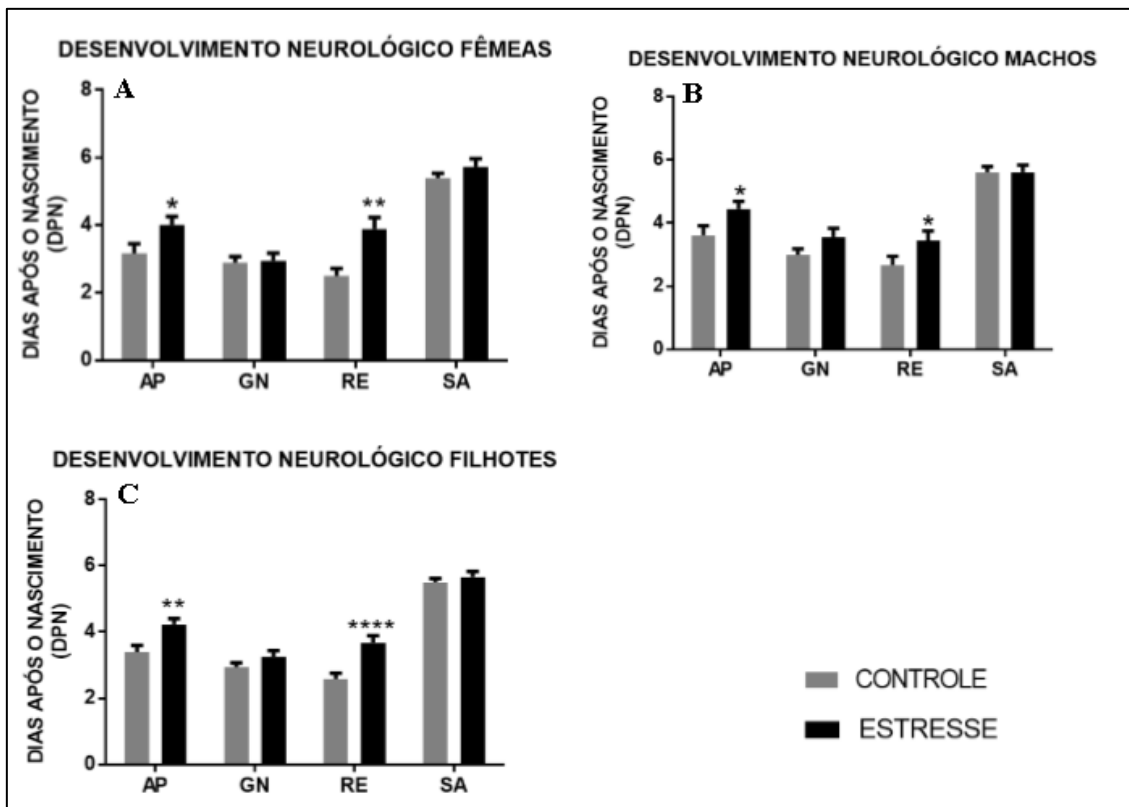


Figura 21 - Análise do desenvolvimento neurológico dos filhotes ao longo do primeiro mês de vida.

Fonte: Da autora.

Legenda: (A) Reflexos neurológicos dos filhotes fêmeas; (B) Reflexos neurológicos dos filhotes machos; (C) Reflexos neurológicos dos filhotes de ambos os sexos. AP: agarramento palmar; GN: geotaxia negativa; RE: reflexo de endireitamento; SA: sobressalto auditivo. Controle: n=18; Estresse: n=18. Valores expressos em média \pm SEM. (*) $p \leq 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$. Teste Mann Withney.

6.4 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DA PROLE JOVEM

Em relação aos resultados dos testes realizados para análise do comportamento da prole jovem, estão apresentados a seguir.

6.4.1 Teste de labirinto em cruz elevado (LCE)

A análise do comportamento da prole jovem foi realizada logo no final do primeiro mês de vida através do teste de LCE, não tendo sido verificadas diferenças significativas no tempo de permanência nos braços abertos e braços fechados em fêmeas expostas ao estresse pré-natal (Figura 22A-B). Porém, foi observado um aumento significativo na frequência de entradas nos braços abertos do aparato (Figura 22C) pelas fêmeas quando as mães foram expostas aos estresse pré-natal, em comparação aos que foram gerados em moradia individual. A frequência de entrada nos braços fechados (Figura 22D) não apresentou diferenças significativas, assim como o número total de entradas em ambos os braços (Figura 22E).

O teste de LCE, realizado em filhotes machos, não apresentou alterações significativas nos parâmetros analisados (Figura 23), quando comparados os grupos controle e estresse social pré-natal.

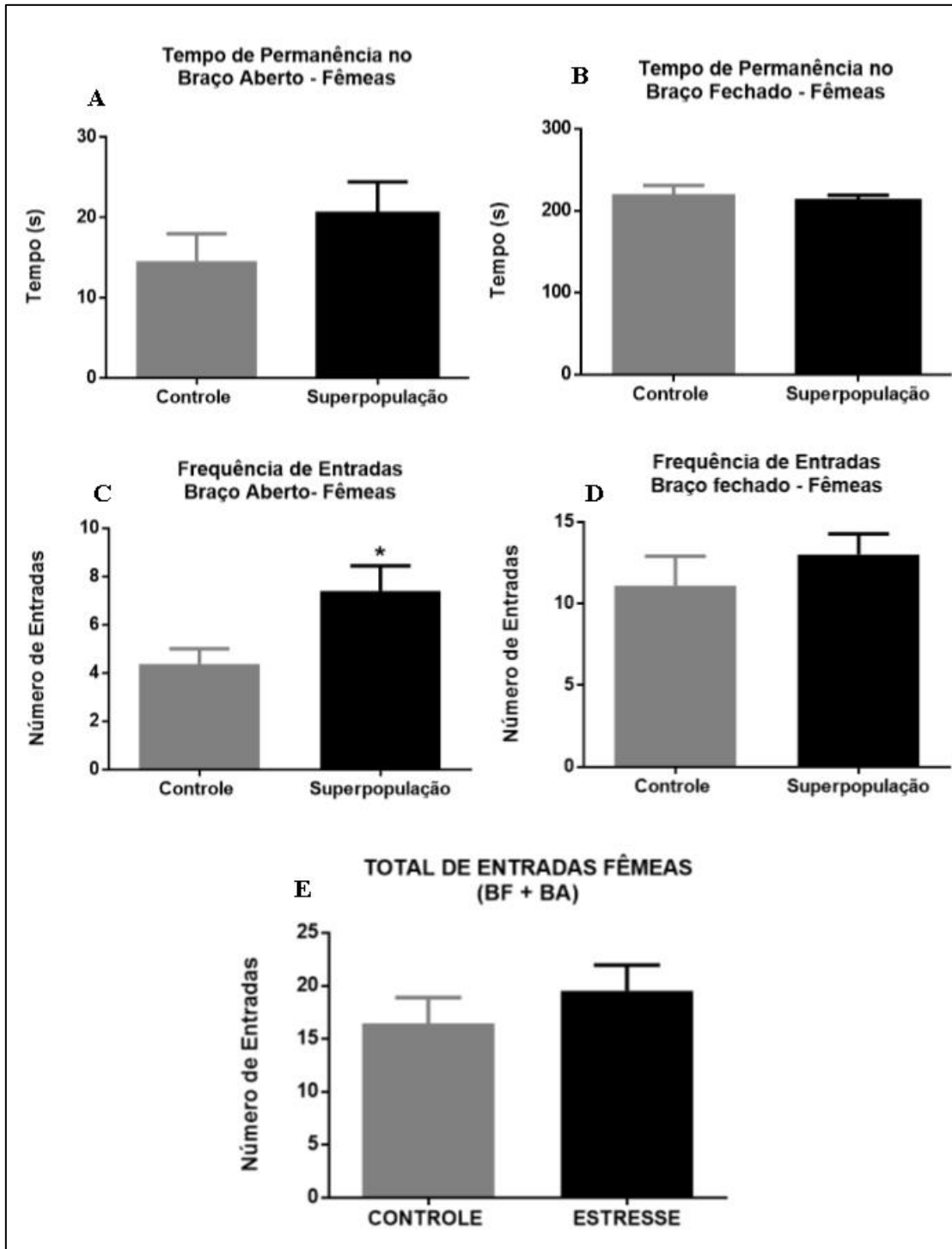


Figura 22 - Análise: Teste de Labirinto em cruz elevado em fêmeas expostas ao estresse pré-natal.

Fonte: Da Autora

Legenda: (A) Tempo de permanência no braço aberto; (B) Tempo de permanência no braço fechado; (C) Frequência de entradas no braço aberto; (D) Frequência de entradas no braço fechado; (E) Número total de entradas nos braços do labirinto. Controle: n=10; Estresse n=10. Valores expressos em média \pm SEM. (*) $p < 0,05$. Teste Mann Withney.

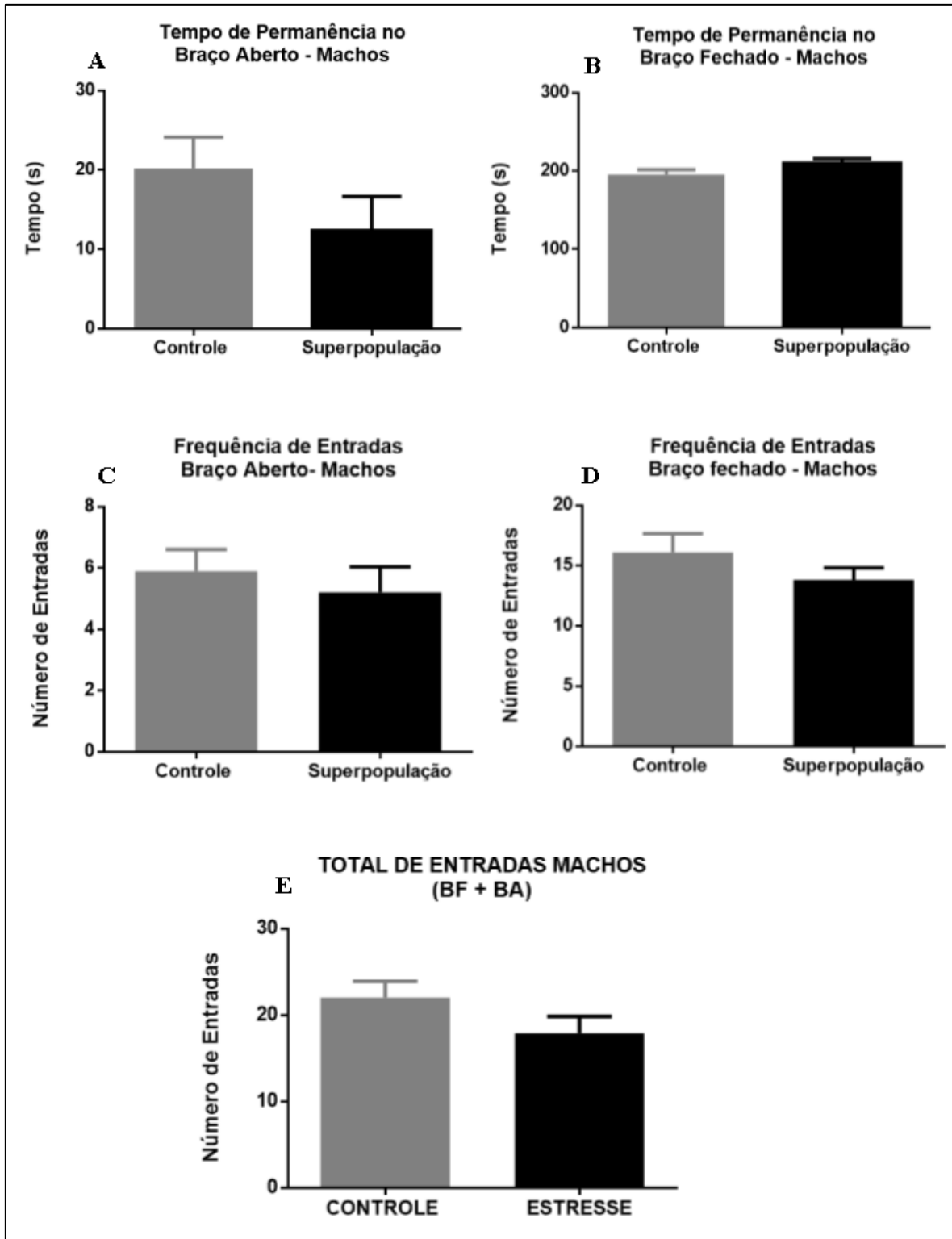


Figura 23 - Análise: Teste de Labirinto em cruz elevado em machos expostas ao estresse pré-natal.

Fonte: Da Autora

Legenda: (A) Tempo de permanência no braço aberto; (B) tempo de permanência no braço Fechado; (C) Frequência de entradas no braço aberto; (D) Frequência de entradas no braço fechado; (E) Número total de entradas nos braços do labirinto. Controle: n=10; Estresse: n=10. Teste Mann Withney.

6.4.2 Teste Campo Aberto

Os animais expostos ao estresse pré-natal de superpopulação, foram submetidos ao teste de campo aberto entre o 30ºdpn e 32ºdpn. Não houve diferença significativa entre os grupos, em nenhum dos parâmetros analisados no teste de campo aberto, tanto nas fêmeas (Figura 24), quanto nos machos (Figura 25).

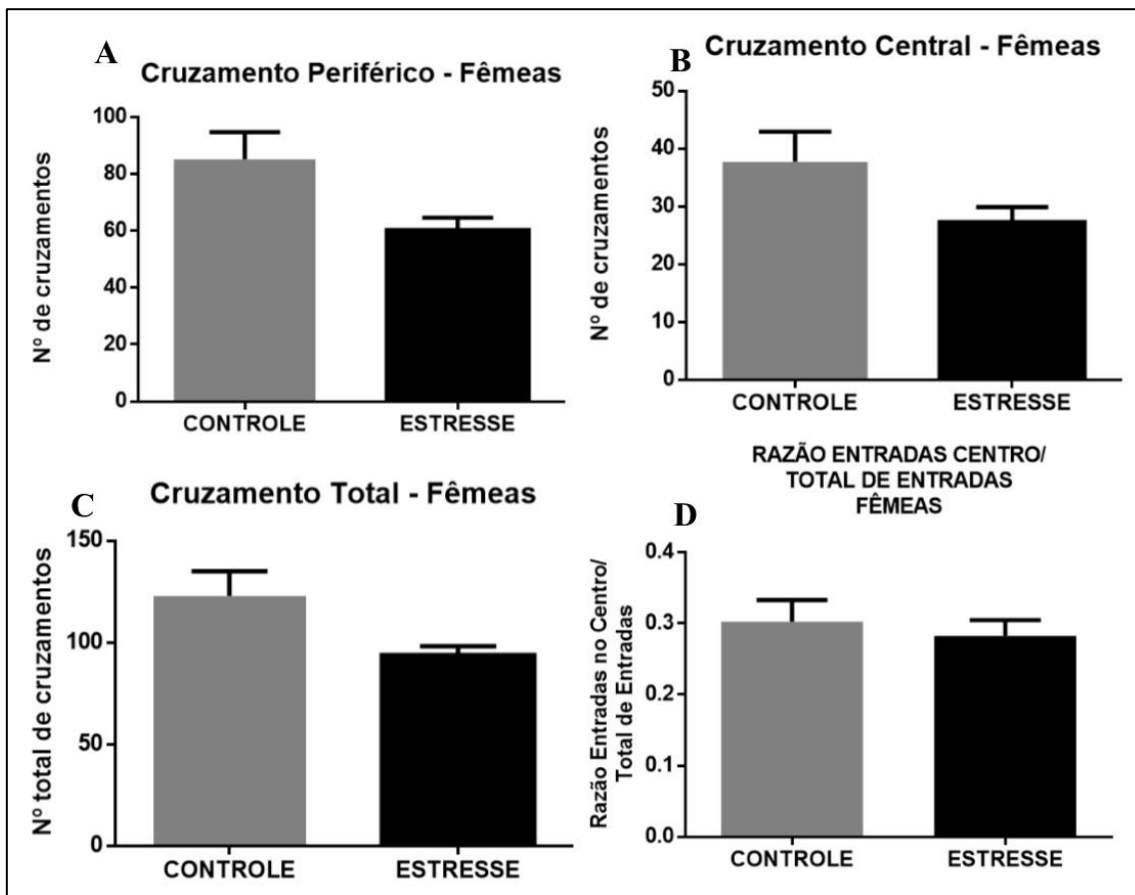


Figura 24 - Análise: Teste de campo aberto em fêmeas expostas ao estresse gestacional.

Fonte: Da Autora.

Legenda: (A) cruzamento periférico; (B) cruzamento central; (C) cruzamento total; (D) razão de entradas no centro sobre o total de entradas. Controle: n=10; Estresse: n=10. Teste Mann Withney.

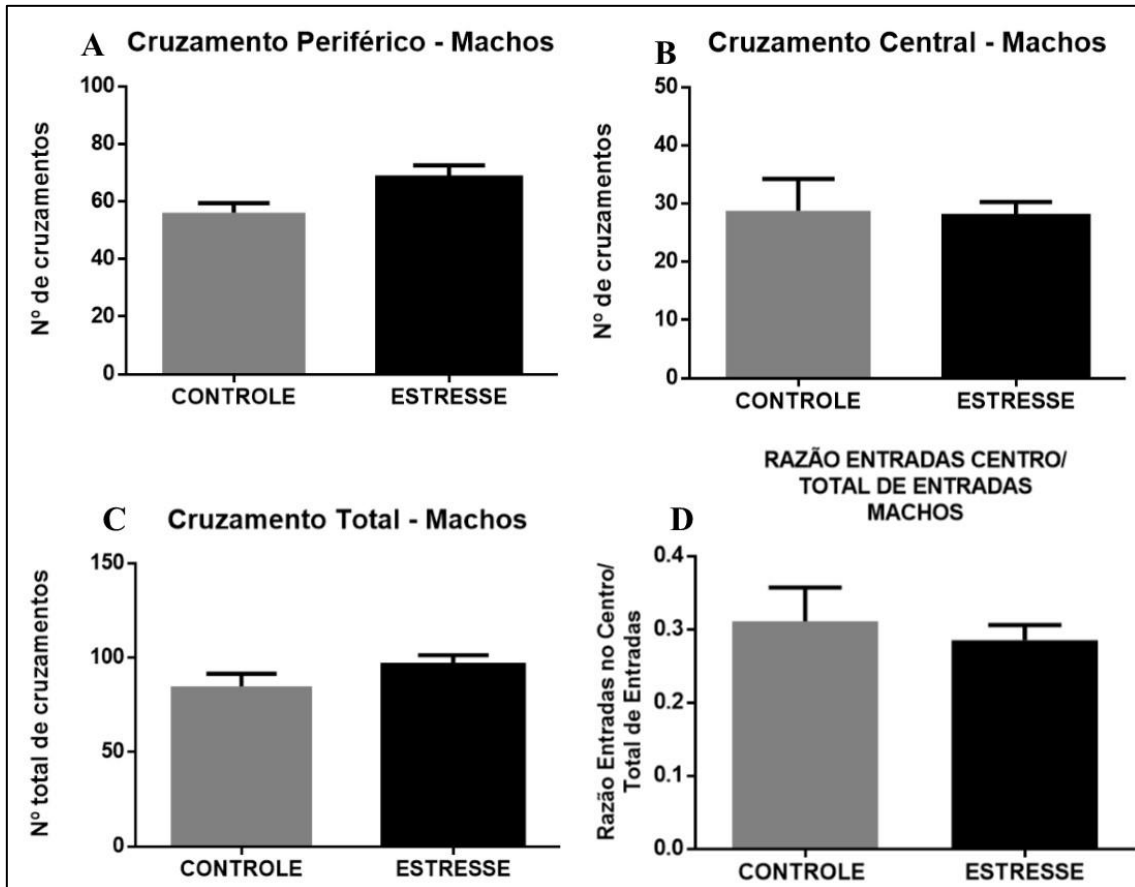


Figura 25 - Análise: Teste de campo aberto em machos expostos ao estresse gestacional.

Fonte: Da Autora.

Legenda: (A) cruzamento periférico; (B) cruzamento central; (C) cruzamento total; (D) razão de entradas no centro sobre o total de entradas. Controle: n=10; Estresse: n=10. Teste Mann Withney.

7 DISCUSSÃO

A maneira como o estresse gestacional interfere na prenhez ainda não é bem compreendida, observamos em nossos estudos que o estresse de superpopulação diminui o percentual de êxito da prenhez. Este efeito do estresse sobre o índice de gravidez já é um conhecimento antigo. Esse efeito do estresse sobre a taxa de prenhez já é antigo. Wiebold et al (1986) observaram, há 30 anos, que o estresse de contenção aplicado do 1º ao 6º ddg causou uma queda de 52% na taxa de prenhez.

O estresse ativa o sistema simpático e o eixo HPA aumentando a secreção de glicocorticoides e a liberação de catecolaminas. Mudanças consistentes no eixo HPA podem promover uma inibição do eixo HPG, diminuindo assim gonadotrofinas circulantes (TOUFEXIS, 2014). Segundo Arck (2004), os hormônios relacionados ao estresse e/ou à gravidez (CRH) podem diminuir a progesterona circulante e resultar em mudanças na produção de citocinas, desencadeando abortos em ratos expostos ao estresse durante a gestação. Diferentes modelos de estresse como: alimentar (FELICIONNI 2014); auditivo e plataforma elevada (JAFARI et al., 2017); contenção (BURKUS et al, 2015; GOVINDARAJ et al., 2017; LIU et al., 2015; WIELBOLD et al., 1986); ultrassom (ARCK et al., 1995); lipopolissacarídeos (LPS) (SOLATI et al., 2015; ZAVAN et al., 2016); demonstraram aumento de perda gestacional devido ao estresse gestacional, corroborando nossos resultados.

A fêmea submetida ao estresse de superpopulação apresentou uma perda gestacional muito elevada, que pode estar associada a problemas na fase de implantação. De acordo com Burkus et al. (2015), existe interferência direta do estresse materno sobre o aumento na corticosterona e no número de células trofoblásticas do blastocisto nos primeiros dias da prenhez, o que pode promover uma redução na taxa de implantação. Nesse contexto, altos níveis de hormônios relacionados ao estresse podem diminuir a progesterona disponível, encurtando a fase lútea e interferindo no sucesso da implantação (NAKAMURA; SHEPS; ARCK, 2008)

Segundo Liu et al. (2015), o estresse de contenção prejudica a prenhez por falha na implantação e aborto espontâneo recorrente, afetando a vascularização uterina, induzindo apoptose em células endometriais e resultando na diminuição do número de sítios de implantação. Outra evidência correlacionada aos nossos resultados é que, segundo Whirledge et al. (2015), os glicocorticoides (GR) são essenciais no útero de roedores para a fertilidade normal, porém os níveis elevados podem prejudicar a implantação, levando a um desarranjo no ambiente uterino e causando uma inflamação estromal.

Em situação de estresse, é sabido que ocorre uma elevação significativa de glicocorticoides (RAKERS, 2017). Exposição elevada de glicocorticoides nos períodos iniciais da gestação, afeta o desenvolvimento do conceito no período pré-implantacional (MIHALIK et al., 2010) desencadeando problemas na implantação (ZHAO et al., 2013; BURKUS et al., 2015), esses dados corroboram com a hipótese de que o estresse de superpopulação possa interferir logo no desenvolvimento inicial. Para correlacionar melhor esse dado, seria muito importante avaliar se não está ocorrendo uma elevação nos níveis de corticosterona nas fêmeas submetidas ao estresse de superpopulação.

Nos resultados desta dissertação, a ocorrência de alterações no desenvolvimento inicial e de problemas na implantação devido ao estresse de superpopulação está evidente. No entanto, parte dessa perda gestacional parece ter ocorrido após a implantação durante o período embrionário pois a viabilidade gestacional demonstrou-se diminuída em nossos experimentos. Vale salientar que a perda na fase de desenvolvimento embrionário aparentemente demonstrou ser menor do que a perda observada inicialmente, pois a porcentagem de fêmeas não prenhes, que não foram consideradas na avaliação dos sítios de desenvolvimento fetais (SDF), foi muito maior do que a perda observada por reabsorção ou número de sítios anormais aos 15 ddg. Sob esse aspecto, existem dois fatores que merecem ser apontados. O primeiro é que, no início da gestação, vale a “lei do tudo ou nada” (MOORE; PERSUAD, 2016; PEREIRA et al., 2014;), defendendo que alterações no desenvolvimento inicial impedem a implantação embrionária. O segundo fator é que, o período embrionário é sem dúvidas o mais suscetível a alterações visíveis ao nascimento (MOORE; PERSUAD, 2016). Nesse contexto, os embriões implantados sofrem menor quantidade de alterações, ou porque o efeito do estresse é mais reduzido no período embrionário, ou porque pode estar ocorrendo um mecanismo de adaptação materna ao modelo estressor, causando menos danos ao feto, como demonstrado no trabalho de Govindaraj et al. (2017).

O estresse de contenção tem sido o modelo experimental mais amplamente utilizado na gestação de roedores (BURKUS et al., 2015; CHOE et al., 2011; GOVINDARAJ et al., 2017; LIU et al., 2015; WIELBOLD et al., 1986), sendo sabido que a interferência deste modelo, de maneira aguda nos primeiros dias da prenhez, pode acarretar impactos negativos nos períodos embrionário e fetal e na vida pós-natal (BURKUS et al., 2015). Parte dessas alterações pode estar associada ao fato de que a corticosterona materna possui características lipofílicas e atravessa com facilidade a barreira trofoblástica (RAKERS et al., 2017).

Segundo Golub et al. (2004), que avaliaram vários trabalhos focando o estresse de contenção, esse tipo de estresse, induzido nas fases iniciais da gestação, é também capaz de

produzir um aumento da reabsorção embrionária ou fetal. Ainda nesse contexto, já foi comprovado que o estresse materno não afeta a gestação apenas nas suas fases iniciais. Jafari et al. (2017), observaram um aumento de reabsorções em camundongos C57BL/6 submetidos a estresse físico (restrição e plataforma elevada) apenas entre o 12° e 16° ddg.

Em decorrência das alterações constatadas nos cornos uterinos e do baixo índice de fêmeas prenhes, em comparação ao grupo controle, é possível relatar um importante efeito negativo do estresse social de superpopulação utilizado nesta dissertação, que ainda não havia sido observado anteriormente. Além disso, acreditamos que este trabalho possa também demonstrar um indício de que o modelo de estresse de superpopulação, por ser um modelo de estresse moderado e aplicado a longo prazo, pode acarretar uma acomodação no organismo da fêmea prenhe, o que justificaria causar danos menos intensos do que o observado em outros modelos estressores aplicados por um tempo menor. Neste contexto, o organismo responde ao estresse promovendo uma resposta adaptativa denominada alostase (MCEWEN, 2003). Reafirmando a hipótese de estar ocorrendo uma acomodação ao modelo de estresse, podemos citar um trabalho de estresse de restrição de movimento realizado por Govindaraj et al. (2017), que aponta uma resposta mais intensa em fêmeas submetidas ao estresse na primeira metade do período gestacional quando comparadas às fêmeas que foram estressadas na gestação inteira. Em contrapartida, este mesmo trabalho apresenta alterações morfológicas mais severas, ou em maior número, na prole que passou pelo estresse gestacional durante a segunda metade da prenhez, em comparação com a que foi submetida à mesma condição durante todo o período de prenhez, indicando uma possível adaptação ao modelo estressor utilizado pelos pesquisadores.

A avaliação morfológica das placentas não apresentou anormalidades macroscópicas. Esta descrição é importante pois necroses e hemorragias placentárias podem estar associadas a perdas gestacionais devido ao aumento dos níveis do fator de necrose tumoral (TNF α) e sua interferência na vascularização placentária (ARCK et al., 1995) o que poderia estar relacionado a um sofrimento fetal intrauterino. O estresse aumenta os índices de TNF α (ARCK et al., 1995), e esta evidencia não pode ser avaliada em nosso modelo devido ao curto espaço de tempo para as conclusões experimentais.

Os fetos do grupo Controle apresentaram tamanho, coloração e características morfológicas externas adequadas, conforme descrito na bibliografia, para o período de gestação analisado (SANTOS; 2002). Os fetos do grupo submetido ao estresse pré-natal também não apresentaram alterações maiores, não obstante alterações morfológicas significativas já tenham sido descritas em outros modelos de estresse (GOVINDARAJ et al., 2017). Entretanto, os fetos do grupo superpopulação demonstraram um aparente atraso no desenvolvimento, que pode ser

observado pelo tamanho reduzido da proeminência hepática e pela ausência dos seios vasculares na região de cabeça e pescoço. Já foi descrito que o modelo de estresse psicológico causa um retardo no crescimento dos fetos, modificando o ambiente intrauterino e que níveis elevados de glicocorticoides feto-placentários, derivados da administração materna de corticosteroides sintéticos, ou da produção endógena de cortisol fetal, resultam em restrição do crescimento intrauterino (GOVINDARAJ et al., 2017).

Nos fetos de mães submetidas ao estresse de superpopulação, também foi observada uma redução de peso significativa. Esses dados conferem com a literatura, uma vez que agentes estressores podem ser relacionados a um IUGR (CHOE et al., 2011; GOVINDARAJ et al., 2017). Mulheres que apresentam um quadro de estresse ou ansiedade gestacional costumam ter bebês com baixo peso e parto prematuro (FERREIRA et al., 2014). Além disso, Vaughan et al. (2012) adicionaram corticosterona na água das fêmeas prenhes e verificaram que o aumento da concentração desse hormônio, no organismo materno pode causar uma diminuição de crescimento e desenvolvimento fetal, decorrente de alterações na capacidade de transporte nutricional placentário. Mais uma vez, os dados apresentados na literatura nos levam a considerar a importância em mensurar a corticosterona das fêmeas prenhes submetidas ao estresse de superpopulação para melhor sedimentação dos resultados deste trabalho.

Quando foi avaliado o peso fetal em relação à placenta, observamos que o grupo submetido ao estresse social apresentava uma redução na eficiência placentária, pois a razão entre o feto e a placenta foi menor, demonstrando ser necessária uma área maior de placenta para a manutenção fetal. A placenta, apresentando eficiência reduzida, pode estar relacionada a alguma alteração morfológica desse órgão, como um aumento de morte celular (CORREIA-SILVA et al., 2004; LIU et al., 2015) ou como a diminuição da camada labirinto/trofoblasto, uma vez que é a responsável pelas trocas nutricionais (GEORGIADES et al., 2002; KANAI-AZZUMA, 1996; PEL; BUMER, 1976; SIMMONS; CROSS, 2005; WATSON, 2005;). No entanto, podem estar relacionadas ainda às alterações fisiológicas, que modificam o metabolismo deste órgão (BROAD; KEVERNE 2011; COAN et al., 2008; FELICIONI, 2014) ou ainda a alguma alteração vascular, como a descrita via TNF (ARCK et al 1995; RAKERS et al 2015) e patologias gestacionais (CHISWICK, 1985; REDMAN et al., 2005; REGNAULT et al., 2002;). Além disso, é preciso ressaltar que uma placenta alterada provavelmente tem sua síntese de hormônios e corticoides modificada e este descontrole endócrino pode interferir diretamente no desenvolvimento embrio/fetal (COSTA, 2012; FOWDEN et al., 2015; NGUYEN et al., 2012;).

De acordo com Rakers et al. (2017), o excesso de cortisol materno tem efeito direto no eixo HPA fetal em desenvolvimento. Estes autores também acrescentam que, junto com a corticosterona, as catecolaminas maternas, aumentadas em uma situação de estresse psicossocial, também têm um efeito muito significativo. As catecolaminas não atravessam a barreira placentária de forma relevante, mas acarretam vasoconstrição, alterando o fluxo sanguíneo útero/placentário, levando assim a um IUGR fetal. Esses achados corroboram perfeitamente os resultados encontrados em nosso trabalho que associam uma baixa eficiência placentária e o IUGR fetal ao estresse de superpopulação.

Constatamos uma diminuição significativa no ganho de peso das fêmeas submetidas ao estresse em comparação ao grupo controle, a partir do 14^oddg, deixando evidente que o estresse de superpopulação diminui o ganho de peso corporal durante as etapas finais da prenhez. Essa diminuição de peso, em relação ao controle, já foi descrita em diferentes modelos de estresse (AMUGONGO, HLUKSKO. 2014; FUJITA, et al., 2010; NISHIO et al., 2006; WEINSTOCK. 2017). Liu et al. (2015), assim como, Govindaraj et al. (2017), trabalhando com um modelo de estresse de contenção, observaram menor ganho de peso já nas primeiras semanas de gestação, corroborando com nossos resultados, além disso Nishio et al. (2006) e Haim et al. (2016), demonstram também um efeito do estresse no ganho de peso materno na última semana gestacional.

Também vale discutir, neste momento, que parte do ganho de peso da mãe, no final da gestação, pode ser diretamente associado ao aumento de massa fetal. Neste trabalho, assim como em outros já referenciados acima, foi descrito que os fetos apresentaram tamanho e peso reduzidos, em decorrência do estresse, o que pode resultar em um peso reduzido na fêmea prenhe, não nos permitindo associar diretamente a redução do peso observada a somente uma perda de ganho corpóreo da gestante.

Por outro lado, na literatura encontramos associação direta do estresse com a perda de peso, atribuída a uma redução do apetite materno, com evidente diminuição de ingesta (HARRIS, 2011). A ingestão calórica da fêmea prenhe pode ser reduzida, potencialmente devido ao excesso de cortisol que altera o controle hipotalâmico da ingesta de alimentos (AMUGONGO; HLUKSKO, 2014). O estresse materno eleva os níveis de glicocorticoides, podendo ocorrer um estímulo da gliconeogênese e do metabolismo hepático, levando a uma diminuição da ingestão de alimentos (GOVINDARAJ et al., 2017). No entanto, neste estudo, não foi possível mensurar a ingesta das fêmeas prenhes devido ao modelo de aglomeração social, onde os animais permaneceram todo o tempo alojados em gaiolas coletivas. Neste modelo de estudo, como descrito na metodologia, além da fêmea prenhe, estavam alocadas na

gaiola mais dez outras fêmeas. Portanto, realizar uma média da ingestão por gaiola não nos permitiria uma estimativa adequada da ingestão da fêmea prenhe para avaliação desse dado. Por outro lado, o sistema de moradia coletiva faz com que, por um período prolongado, de baixo consumo alimentar, a alimentação em grupo resulte numa disputa pelo alimento, prejudicando o período gestacional de porcas alojadas em conjunto (JOHNSON, 2017). Portanto, a competição por alimento, gerada pela aglomeração social, pode ter causado uma diminuição na ingestão, principalmente ao fim da gestação, onde a prenha se encontrava mais pesada que fêmeas não prenhes e dessa maneira apresentou uma maior dificuldade em enfrentar o desafio da luta pelo alimento.

Para análise do comportamento semelhante à ansiedade das fêmeas, utilizamos o teste de LCE, bastante utilizado em pesquisas para atestar uma atividade ansiogênica ou ansiolítica em diferentes modelos de estresse (GUZZO et al., 2015; MACBETH et al., 2008,). Segundo File (2001), o comportamento ansioso é observado de acordo com o número de entradas no braço aberto e o tempo gasto, tanto no braço aberto quanto no braço fechado. Assim, maior atividade no braço aberto indica uma redução do comportamento ansioso e alterações no número de entradas no braço fechado indicam efeitos não-específicos da atividade locomotora (MENARD; TREIT, 1999).

No entanto, ao buscar experimentos realizados no LCE durante a prenhez, encontramos algumas referências a respeito (GUZZO, 2015; LEUNER; SHORS, 2006; NELMANN, 2001; ZAVAN, 2011;). Em nosso estudo, a análise dos parâmetros do teste de LCE, realizado no 15º ddg, demonstrou um aumento significativo no número de entradas nos braços abertos das fêmeas prenhes, expostas ao estresse de superpopulação, quando comparadas à moradia individual. Como a tendência natural do roedor é evitar os braços abertos, o aumento do número de entradas nos braços abertos indica um efeito ansiolítico (FRYE, 2007; LISTER, 1987; LISTER, 1990; WALF;). Segundo Colnaghi et al. (2016), alguns organismos possuem sistemas neuronais que atribuem o envolvimento social ao melhor enfrentamento de situações aversivas, com respostas atenuadas em situações de estresse. A prenha exposta ao estresse de superpopulação pode ter desenvolvido um comportamento menos ansioso, em relação ao controle, devido ao convívio social durante o período em que permaneceu em gaiolas superlotadas.

Misdrahi et al. (2005) observaram, no 15ºddg, um aumento dos níveis de estradiol e corticosterona em camundongos prenhes, expostas ao modelo de estresse crônico variável durante toda a gestação. Nesse cenário, altos níveis de estrogênio exercem um efeito ansiolítico,

exercendo atividade moduladora sobre ansiedade e comportamentos depressivos (ORTOLAZA, 2017; SAYIN, 2014;).

Para análise da atividade exploratória é comumente utilizado o teste de campo aberto averiguando o número de entradas com as quatro patas no centro, na periferia e o total de cruzamentos. Um aumento desses parâmetros indica uma possível atividade ansiolítica (PRUT e BELZUNG, 2003; ZHAO, et al, 2017).

Os animais possuem uma tendência a ficar por mais tempo na periferia em comparação com a área central. Essa preferência pela periferia é conhecida como tigmotaxia e uma diminuição dessa preferência leva a um aumento do efeito anti-tigmotático, que pode ser observado no teste de campo aberto sendo associado a uma ação ansiolítica (VALLÉE, 1997). O teste de campo aberto, realizado nas fêmeas prenhes, revelou um aumento da atividade exploratória, demonstrando que fêmeas prenhes, expostas ao estresse de superpopulação, apresentaram uma diminuição da responsividade emocional, apresentando um comportamento menos ansioso em relação ao controle. As buscas bibliográficas não apontam trabalhos que estudem a locomoção de fêmeas prenhes no teste de campo aberto. Em geral, esses trabalhos referem-se a testes aplicados na prole de mães submetidas a algum tipo de tratamento durante a prenhez. No entanto, num estudo com machos, alojados em gaiolas com alta densidade populacional (7 animais por caixa), por um período de 28 dias, eles apresentaram níveis elevados de corticosterona e redução significativa na atividade locomotora no teste de campo (REISS et al., 2007), o que é controverso em relação ao encontrado nas fêmeas prenhes estudadas nesta dissertação.

Nossos resultados podem ser justificados por alterações fisiológicas da própria gestação, pois o período gestacional é marcado por um aumento exponencial de corticosterona conforme a gestação avança (ATKINSON; WADDELL, 1995). Segundo Weerth e Buitelaar (2005), respostas de estresse fisiológico a desafios exógenos parecem ser atenuadas durante a gravidez dentre as mulheres avaliadas. Isso é verdadeiro tanto para os desafios físicos e psicológicos, quanto para as respostas autonômicas e endócrinas. Ainda nesse contexto, ao fim da gestação, o aumento da prolactina exerce um efeito inibitório sobre a atividade do eixo HPA com consequente redução neuroendócrina de respostas ao estresse (SLATTERY; NEUMANN, 2008). Segundo estes autores, as alterações inerentes ao período gestacional podem proteger o organismo materno, minimizando as respostas comportamentais e cognitivas e melhorando os esforços de enfrentamento.

Certificando as interferências do estresse de superpopulação no comportamento das mães, o resultado do teste de nado forçado, realizado 48 horas após o parto para análise do

comportamento do tipo depressivo, indicou um aumento da mobilidade, em que as fêmeas se demonstraram mais ativas. Maguire e Mody (2015), analisaram a interferência, sobre a depressão pós-parto, do estresse do tipo variável ou imprevisível durante a prenhez, utilizando o teste de nado forçado apenas 24 horas após o parto. O resultado foi um aumento no tempo de imobilidade, demonstrando um comportamento mais ativo. Resultados deste mesmo teste, realizados por Smith et al. (2004), utilizando fêmeas expostas ao estresse de contenção no 3º e 4º dpn, demonstraram tempos de imobilidade elevados em relação ao controle apenas no 4º dpn, não tendo ocorrido queda da mobilidade no 3º dpn. Observamos, portanto, que o estresse gestacional crônico pode aumentar o comportamento depressivo pós-parto (HAIM et al., 2014; LEUNER et al., 2014; SMITH et al., 2004). Em nosso trabalho, no 2º dpn existe a probabilidade de a depressão pós-parto não estar elevada devido à suspeita de a fêmea ter-se acomodado ao mecanismo indutor do estresse em nosso modelo experimental, em um comportamento semelhante a resiliência frente ao agente estressor (KLOET, MOLENDIJK, 2015). Um ambiente aversivo pode favorecer o desenvolvimento da tolerância ao estresse, especialmente em fêmeas (FARAJI, et al., 2007). A exposição da vida a níveis leves de estressores pode ter efeitos benéficos sobre a resiliência, essas respostas são dependentes do tipo de agente de estresse pré-natal e sua intensidade (MONAGHAN; HAUSSMANN, 2015; ST-CYR, 2015)

Além deste aspecto, vale salientar que a ansiedade durante a gestação pode estar diretamente associada à depressão pós-parto (MIAO et al., 2017). Corroborando os dados acima, é sabido que níveis elevados de glicocorticoides podem estar associados à depressão. Dessa forma, o estresse gestacional pode induzir depressão pós-parto, dependendo da elevação de glicocorticoides causada pelo agente estressor (MAGUIRE; MODY, 2016). De acordo com Brummelte e Galea (2010), altas doses de glicocorticoides (40 mg/kg) administradas durante toda a gestação de roedores aumentaram o comportamento do tipo depressivo pós-parto observado pelo teste de nado forçado. Porém, nesse mesmo estudo, níveis baixos de glicocorticoides durante a gestação (10 mg/kg), não interferiram no comportamento de depressão após o parto.

Eventos estressantes ao longo da vida são geralmente considerados estressores crônicos leves e têm sido associados ao desenvolvimento da depressão (WILLNER et al., 1992; 1997). No entanto, segundo Colnaghi et al. (2016), o envolvimento social desempenha um papel importante no desenvolvimento da resiliência às adversidades. Nesse contexto, o modelo de superpopulação em foco pode promover um ambiente com a alta competitividade, gerando diferentes situações de estresse entre as fêmeas acondicionadas na mesma gaiola e assim gerar uma sensibilização reduzida aos novos estressores e um aumento da capacidade de lidar com

desafios. Santeralli et al. (2017), defendem que um ambiente de criação moderadamente estressante será útil para desenvolver habilidades efetivas necessárias para lidar com adversidades desafiadoras no decorrer da vida. Portanto, o grupo exposto ao estresse de superpopulação pode ter desenvolvido maior atividade no ambiente aversivo do teste de nado forçado, apresentando um comportamento ativo. Também é importante salientar que fêmeas pós-parto respondem de forma diferente ao estresse, em comparação às fêmeas virgens, demonstrando uma maior resistência a novos agentes estressores (LEUNER, SHORS; 2006).

Vale salientar que, se compararmos essa situação à atividade humana, já foi descrito que o maior convívio social (tais como bairros de maior ocupação) foi associado a menor incidência de transtornos mentais (STOCKDALE et al., 2007). De acordo com Colnaghi et al. (2016), o envolvimento social de camundongos altera a resposta a um ambiente ou evento adverso, modulando o aprendizado e o processamento do medo. Esses autores descrevem também uma exploração aumentada, medida através do aumento do movimento quando os camundongos são expostos a um novo ambiente, o que pode estar diretamente relacionado ao aumento do tempo gasto nos braços abertos do labirinto e ao campo aberto.

Consoante o que foi descrito acima, é possível observar que tanto os relatos de Leuner et al. (2006), como os de Colnaghi et al. (2016) estão em concordância com os resultados desta dissertação. Desse modo, não apenas o comportamento de depressão pós-parto, mas também a diminuição do quadro de ansiedade descrito nas análises do LCE e do CA, durante a prenhez, podem estar associados a dois fatores importantes: a resiliência e o convívio social. Assim, os efeitos negativos do estresse, sobre o comportamento do camundongo prenhe, podem ter sido diferentes do esperado, devido à influência destes dois fatores em nosso modelo experimental.

Já foi descrito anteriormente, neste trabalho, que uma quantidade significativa de fêmeas não conseguiu manter a gestação até o nascimento dos filhotes. No entanto, entre as fêmeas parturientes, foi estimado um pequeno aumento em relação ao número de filhotes nascidos. Apesar disso, mostraram-se reduzidos o peso da prole ao nascer e a média de peso dos filhotes. Segundo Götz et al. (2008), ninhadas de ratos cujas mães foram expostas ao estresse crônico são menores quanto ao número de filhotes. No entanto, os nossos resultados, não são os primeiros resultados mostrando esta situação inversamente proporcional em modelos de estresse gestacional. O trabalho de Amugongo e Hlusko (2014) também descreve um número médio maior de filhotes com peso menor em fêmeas expostas ao estresse gestacional durante a primeira e a segunda semanas de gestação em ratos. Takiuti et al. (2002), demonstraram a mesma situação e justificaram este fato por uma correlação inversa entre o peso fetal e os níveis

de pressão arterial materna. Segundo esses autores, o número de filhotes é aumentado proporcionalmente ao aumento da pressão arterial materna e à disfunção endotelial.

Associações entre o baixo peso da prole e estresse materno também são descritas em gestações humanas. Ferreira et al. (2014) demonstraram que mães que apresentavam sintomas de ansiedade e depressão, constatados através de um questionário de anamnese específico, para avaliar parâmetros psicológicos, sociais e econômicos no terceiro trimestre gestacional, foram progenitoras de crianças com baixo IUGR. Muitos outros autores falam desta correlação frente a diversos mecanismos estressores (GOVINDARAJ 2017;; NISHIO et al., 2006; TAKIUTI et al., 2002; WEINSTOCK, 2017). Segundo Khashan et al. (2008) a exposição materna a eventos graves da vida durante o período gestacional resulta em bebês significativamente menores.

Outro dado que chama a atenção, ao avaliar o nascimento da prole, é o aumento do número de filhotes nascidos mortos. Govindaraj et al. (2017) descrevem resultados semelhantes em ratos e destacam que, quanto maior o período do estresse pré-natal de contenção, maior a mortalidade neonatal. Estudos em humanos relataram que as pessoas expostas ao estresse psicológico durante a gravidez mostraram maior incidência de natimortos (SILVER, RUIZ, 2013). De forma semelhante, Rasmussen et al. (2009), observaram em camundongos expostos a estresse de altos ruídos sonoros, durante o período gestacional, uma maior incidência de natimortos. Esses resultados estão de acordo com o que foi observado em nosso modelo de estresse social de superpopulação, porém não se atribuem causas que justifiquem efetivamente essa ocorrência. Nesse aspecto, podemos retornar a discutir o fato de que o estresse pode acarretar alterações nos níveis de glicocorticoides, pois o aumento dos níveis de glicocorticoides pode ser diretamente associado ao aumento da mortalidade. O aumento de glicocorticoides pode atuar pela alteração do metabolismo fetal, elevando a liberação de catecolaminas e limitando substratos entregues ao feto (YATES et al., 2011; VAUGHAN et al., 2012), acarretando aumento de óbitos fetais. Tais resultados podem ainda estar diretamente relacionados à constatação da diminuição na eficiência placentária, descrita anteriormente, de uma forma mais grave, podendo causar além de um IUGR, algumas patologias que não permitam a sobrevivência fetal até o momento pós-parto (AMINU et al., 2014).

O estresse social pré-natal também interfere sobre o futuro CM, o que é imprescindível para o desenvolvimento saudável da prole (BRUNTON, 2013; NEUMANN et al., 2005). O filhote recebe informações do ambiente através do CM, que interfere diretamente no seu desenvolvimento (BRUMMELTE; GALEA, 2010; CALDJI et al., 2000), o que pode destacar inclusive um potencial de fenótipos negativos a serem transmitidos às gerações futuras

(BRUNTON, 2013). Portanto, é importante o bem-estar materno para o desenvolvimento adequado dos filhotes.

Ocorre uma diminuição da resposta do eixo HPA materno ao estresse, nesse período de atenção com a prole, visando proteger o esforço reprodutivo de uma possível interrupção, induzida pela resposta ao estresse pela progenitora (BÓKONY et al., 2009; WINGFIELD; SAPOLSKY, 2003;). Um dos mecanismos propostos, para atenuar influências externas junto às fêmeas lactantes, seria a interrupção da variação circadiana na atividade do eixo HPA e a atenuação das respostas a agentes estressores (BRUNTON et al., 2008). Dessa maneira, eventos estressores dificilmente conseguem estimular o eixo HPA materno durante o período de lactação (BRUNTON et al., 2008) o que pode justificar o comportamento materno não ter sido muito alterado em nosso modelo. No entanto, Vilela e Giusti (2011), demonstraram que níveis elevados de glicocorticoides, frente a uma situação de estresse, podem reduzir o comportamento materno e a secreção de hormônios, essenciais para as adaptações adequadas no período da lactação, afetando a resposta neuroendócrina e reduzindo a ocitocina e a prolactina.

Os possíveis mecanismos através dos quais o estresse materno, durante a gravidez, é transmitido aos fetos e como o cérebro fetal é programado, também são discutidos (BRUNTON, 2013). Golub et al. (2016) constataram uma redução no tempo de lambida em camundongos C57Bl expostos a estresse pré-natal de choque, mostrando que uma mãe ansiosa lambe menos seus filhotes. No entanto, outros fatores devem também interferir nesse comportamento, pois as mães estudadas, que foram submetidas a estresse de superpopulação, apesar de se apresentarem menos ansiosas, também diminuíram o parâmetro referente ao tempo de lambida nos filhotes no 5º dpn.

Ao avaliarmos o desenvolvimento físico da prole, podemos constatar que o modelo de estresse utilizado não gerou alterações morfológicas graves ou teratogênicas. Na maioria dos trabalhos, onde a mãe é submetida ao estresse pré-natal, a prole não costuma apresentar alterações graves (BURKUS et al., 2015; CHOE et al., 2011; GOLUB et al., 2004; LIU et al., 2015; OSÓRIO et al., 2009; RODRIGUEZ-PEREZ et al., 1992; WIELBOLD et al., 1986). Em controversia, Govindaraj et al. (2016), mostraram filhotes com teratogenia grave decorrente do estresse sonoro agudo e do estresse de plataforma elevada, aplicados durante a primeira metade da gestação. No entanto, com relação ao modelo de estresse social de superpopulação, não foram encontrados dados literários que auxiliem a discussão dos nossos resultados.

De acordo com a literatura, padrões do desenvolvimento físico podem ser alterados pelo estresse pré-natal de manipulação, ruído, luz e aumento da temperatura (MEEK et al., 2000), demonstrando alterações morfológicas menores. Em nosso trabalho, não observamos

alterações nos parâmetros físicos avaliados (descolamento de orelha, abertura de olho, aparecimento de pelo, rompimento dos incisivos, abertura de vagina e descida dos testículos).

Por outro lado, foram encontradas alterações no ganho de peso total dos filhotes fêmeas e crescimento dos filhotes de ambos os sexos. Na literatura existem dados que apontam o estresse pré-natal como indutor de ganho de peso pós-natal em machos (SCHULTZ et al., 2011). O ganho de peso dos filhotes machos, expostos a estresse pré-natal e avaliados neste trabalho, demonstrou uma tendência à recuperação do baixo peso do nascimento logo nos primeiros dias pós-parto. No entanto, não foi indicativo de ganho de peso diferente do controle até a puberdade. As fêmeas, por outro lado, demonstraram a mesma tendência a ganho de peso semelhante ao controle, porém o ganho de peso total destes filhotes até a puberdade, parece ter sido reduzido em comparação as fêmeas das ninhadas controle.

Além de o ganho de peso ser um pouco reduzido nos filhotes fêmeas, podemos observar que existem indícios de crescimento um pouco mais reduzido dos filhotes de ambos os sexos no grupo superpopulação, quando comparado ao controle, principalmente na puberdade. Diferente dos nossos resultados, Amugongo e Hlusko (2014), observaram um crescimento físico linear em filhotes expostos a estresse pré-natal. Segundo Mueller e Bale (2006) existe uma correlação entre peso ao nascimento anormal e uma futura predisposição para o desenvolvimento de sobrepeso ou obesidade, indicando que alterações na homeostase energética podem estar influenciando o peso corporal a longo prazo. Estes dados podem justificar que os filhotes expostos a estresse pré-natal de superpopulação, apresentaram um menor tamanho, sem grandes alterações no peso, demonstrando uma relação alterada entre o peso e comprimento do corpo o que pode estar relacionado com sobrepeso. De acordo com Amugongo e Hlusko (2014), a prole submetida a estresse pré-natal, desenvolveu-se mais rapidamente em termos de crescimento geral corpóreo e crescimento ósseo em comparação com a descendência de controle, no entanto, apresentaram maior área óssea e uma taxa de formação óssea potencialmente maior indicada por um maior número de osteoblastos o que também justificaria o aumento de peso observado em nossos resultados.

A distância ânus-genital (AGD) também demonstrou uma redução significativa na adolescência dos filhotes machos e fêmeas do grupo tratado. Essa distância é comumente associada às alterações nos níveis andrógenos em muitas espécies (BARRETT et al., 2014). Em contraste com nossos resultados, Ashworth et al. (2016), observaram um aumento significativo na distância ânus-genital de machos expostos a estresse pré-natal social durante a última semana de gestação. No entanto, reduções no comprimento ânus-genital, em roedores expostos a estresse pré-natal, já foram apontadas em diversos estudos (DESAULNIERS et al., 2016;

PALLARES et al., 2013). Willians et al. (1998), observaram uma redução da distância ânus-genital em machos submetidos ao estresse pré-natal de calor, luz e restrição de movimento, ao fim da gestação. Esse resultado pode ser justificado pelo fato de já ser descrito há quase duas décadas, pois machos expostos a estresse gestacional exibem uma diminuição da síntese de testosterona durante o desenvolvimento intrauterino, devido às alterações do eixo HPA, que interferem diretamente no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) afetando a masculinização dos descendentes (WILLIANS et al., 1998). Ainda nesse contexto, Pallares et al. (2013), observaram uma diminuição na concentração de testosterona em ratos machos adultos expostos a estresse pré-natal de contenção durante a última semana gestacional. Esses dados indicam que o estresse durante a gestação pode afetar o sistema reprodutivo da prole masculina.

Avaliando a distância ânus-genital em fêmeas, Kinsley e Svare (1988), constataram uma diminuição desse padrão em camundongos submetidos ao estresse pré-natal de contenção no período do 13^o ao 18^oddg, o que entra em concordância com os resultados desta dissertação. Acreditamos que esse encurtamento possa estar associado a problemas no eixo HPA e HPG, lembrando que um prejuízo no desenvolvimento sexual e no ciclo estral já foi descrito por Harvey e Chevins (1987), e associada ao estresse materno. No entanto, esse trabalho também descreve um atraso na abertura da vagina associado a estas alterações, o que não foi observado em nosso estudo. Outro fato interessante é que, em meninas, também já foi observada uma interferência no desenvolvimento reprodutivo devida ao estresse materno (BARRET et al., 2013).

Para avaliação adequada da interferência de fatores exógenos no desenvolvimento, além dos aspectos morfológicos, devemos considerar possíveis alterações fisiológicas em um sistema específico, ou em um organismo como um todo. Desse modo, o tempo de aparecimento das respostas reflexológicas é uma ferramenta bastante utilizada para detectar os efeitos de fatores ambientais na maturação do sistema nervoso (RODRIGUEZ-PEREZ et al., 1992; BELLUSCIO et al., 2014). Os testes de desenvolvimento neurológico, realizados no nosso modelo, demonstraram um atraso significativo no agarramento palmar e no reflexo de endireitamento, tanto nas fêmeas quanto nos machos. Esse resultado foi ainda mais significativo na análise conjunta de ambos os sexos. Meek et al. (2000), constataram um atraso no reflexo de endireitamento em filhotes expostos ao estresse pré-natal de manipulação, ruído, luz e aumento da temperatura, demonstrando, portanto, um efeito do estresse no desenvolvimento cerebelar. Secher et al. (2006), descrevem que os testes reflexivos, utilizados em nosso trabalho, são importantes para avaliar a capacidade sensório-motora-cerebelar e o atraso observado pode indicar um retardo na maturação desse órgão. Xu et al. (2013), também observaram alterações

em padrões neurológicos pontuais de desenvolvimento como geotaxia e endireitamento. Segundo Osório et al. (2009), atrasos evidentes no desenvolvimento neurológico da prole, observados através de testes reflexivos, podem ser correlacionadas às alterações no comportamento na vida adulta.

De acordo com Xu et al. (2013), o estresse materno pode alterar o desenvolvimento cerebral da prole, acarretando uma hipomielinização do hipocampo, levando a respostas reflexivas tardias. O estresse pré-natal pode afetar diretamente o metabolismo de corticoides e, segundo Rodriguez-Perez et al. (1992), os corticoides chegam a produzir ação mais severa e generalizada que a desnutrição no sistema nervoso e nas respostas reflexivas. Portanto, acreditamos que novos estudos ainda precisam ser realizados para melhor associar as alterações neurológicas observadas, na prole do grupo submetido ao estresse de superpopulação, com alterações na morfologia cerebral e na fisiologia do eixo HPA.

De acordo com o que foi descrito acima, podemos supor que o modelo de estresse utilizado, por ser crônico, não possibilitou alterações graves no período embrionário devido a uma possível acomodação do estresse pela mãe. Nesse período da prenhez, o sistema nervoso começa a se estabelecer e os filhotes aparentemente sofreram consequências mais brandas, o que pode ser evidenciado pelas alterações neurológicas reflexas encontradas (CLANCY et al., 2007; WORKMAN et al., 2013). Ainda corroborando nossos resultados, Brunton (2013), afirma que a exposição ao estresse pré-natal depende de quando o estímulo estressor ocorreu durante a gravidez.

Outro aspecto importante a ser avaliado é o fato de o comportamento materno influenciar o desenvolvimento pós-natal dos filhotes (KISS, et al., 2012). Mães que demonstram diminuição da lambida, por exemplo, tem filhotes relativamente mais ansiosos na vida adulta (CALDJI et al., 2000). De acordo com Neves (2013), filhotes bem cuidados tornam-se adultos tranquilos e menos estressados.

Esta influência ocorre em razão de o período pós-natal ser também de grande importância na formação cerebral de ratos e camundongos. O desenvolvimento neurológico dessas espécies ocorre mais tardiamente que em humanos, considerando que os primeiros dez dias pós-natais dos roedores são equivalentes ao 3º trimestre de gestação humana (CLANCY et al., 2007; WORKMAN et al., 2013). Assim, podemos associar o desenvolvimento neural durante a infância, à regulação de sistemas de reatividade ao estresse na vida adulta. Diante dessa afirmação, o comportamento da prole jovem também foi avaliado no LCE e no CA para observação de padrões de ansiedade e locomoção.

Nos resultados dos testes de LCE da prole, foi observada uma ocorrência maior de entradas no braço aberto pelos filhotes fêmeas das proles submetidas ao estresse de superpopulação, o que pode demonstrar um comportamento menos ansioso desses filhotes. No entanto, não foram observadas alterações no comportamento dos filhotes machos para os mesmos padrões do teste. A locomoção da prole foi avaliada pelo teste de CA e não demonstrou alterações significativas para os filhotes de ambos os sexos, submetidos a estresse pré-natal, nem do grupo controle.

Achados contraditórios do efeito do estresse pré-natal sobre o comportamento exploratório são comuns e provavelmente relacionados às diferenças entre os agentes estressores (MEEK et al., 2000) ou sexo-dependentes (ZUENA, et al., 2008). Existem muitos trabalhos que descrevem um efeito ansiogênico para o estresse pré-natal (ABE et al., 2007; MIYAGAWA, 2011; SCHULZ, 2011). No entanto, outros trabalhos importantes descrevem uma ansiólise em fêmeas após estresse pré-natal (LIAN et al., 2018; ZUENA et al., 2008;).

Complementando, as respostas neuroendócrinas e comportamentais ao estresse pré-natal são particularmente sensíveis à programação fetal através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) podendo resultar em mudanças permanentes no cérebro da prole (BRUNTON, 2013; WEINSTOCK, 2017). Alterações no eixo HPA têm uma interação recíproca com o eixo gonadal (HPG), pois o eixo HPA pode inibir a produção de estrogênio e progesterona, importantes na programação fetal (BRUNTON, 2013; TOUFEXIS et al., 2014;) causando na prole, além de defeitos no seu potencial e comportamento reprodutivos, alterações no comportamento social (BRUNTON, 2013).

Como descrito anteriormente, o estresse durante a gestação diminui a testosterona e altera a atividade de catecolaminas em filhotes machos, interferindo no seu desenvolvimento cerebral (PALLARES, 2013; WEINSTOCK, 2007; WILLIAMS, HENNESSY; DAVIS, 1998;) e causando um padrão de resposta ao estresse dismórfico entre os sexos da prole (LIAN et al., 2018).

O estresse social pré-natal também prediz o futuro comportamento materno, destacando o potencial de fenótipos negativos a serem transmitidos às gerações futuras (BRUNTON, 2014). Segundo Faraji et al. (2017), experiências aversivas no início da vida desencadeiam processos adaptativos, como mudanças epigenéticas, facilitando a sobrevivência ao ambiente estressante. Dessa maneira, um ambiente adverso pode favorecer o desenvolvimento de respostas comportamentais positivas de resiliência, sendo importante salientar o componente hereditário e a intensidade do agente estressor (GAPP, 2014). Portanto, podemos observar que existem evidências de que um agente estressor pré-natal, o período de

submissão ao estresse e a sua intensidade podem modificar o fenótipo expresso, o qual pode variar em adaptativo ou patológico (ST-CYR, 2015). Nesse contexto, podemos incluir a resiliência materna ao estresse e a redução de ansiedade dos filhotes fêmeas, observadas em nosso trabalho. Sendo assim, um ambiente sub-ótimo no útero, como resultado do estresse materno, pode ter efeitos prejudiciais na gravidez e efeitos adversos de "programação", que podem ser percebidos de maneira variável na prole a longo prazo. Além disso, baseando-se no conceito recente de DOHaD (FUKUOKA; SATA, 2016; SILVEIRA, 2007;), podemos vislumbrar ainda um possível efeito do estresse não apenas na prole submetida ao agente estressor, como a possibilidade de uma possível alteração epigenética que possa ser passada através de gerações (CHAMPAGNE; MEANEY, 2006), aumentando a capacidade destes animais a adaptar-se ao modelo estressor. Szyf et al. (2005), discute claramente este conceito no pós-parto, associando alterações no DNA dos filhotes ao comportamento materno. No entanto, os possíveis mecanismos através dos quais o estresse materno, durante a gravidez, é transmitido aos fetos permitindo uma programação do cérebro fetal pelo estresse pré-natal, ainda precisam de maiores discussões (BRUTON, 2013).

Avaliando os resultados desta dissertação, é importante ainda enfatizar que foram observadas alterações no comportamento das mães do grupo controle, principalmente em relação ao teste de nado forçado, que é indicativo de depressão. De acordo com Stranahan et al. (2006), o modelo de moradia individual impede a influência positiva da interação social, normalmente benéfica, influenciando na neurogênese do adulto e na secreção de corticosterona. No entanto, esse modelo de criação é utilizado com frequência nos laboratórios que trabalham com análise reprodutiva, análise do desenvolvimento embrio-fetal, lactação e desenvolvimento da prole. Vale salientar que, inicialmente, a moradia individual não é o mesmo que estresse de isolamento social (LIEBERWIRTH et al., 2012), pois os animais têm contato olfativo e sonoro com as gaiolas adjacentes.

O convívio social demonstra uma influência na capacidade de resposta ao estresse, podendo amortecer a influência de alguns agentes estressores sobre a atividade do eixo HPA (WEISS et al., 2004). Neste foco o modelo de aglomeração social pode fazer um papel euroestressor interferindo de maneira positiva frente ao enfrentamento de alguns desafios, segundo o conceito de Selve (1956). Em humanos, esse fator é tão importante, que o apoio social parece diminuir o impacto negativo do estresse em gestantes, protegendo até mesmo contra doenças psiquiátricas (HEINRICHS et al., 2003). Consequentemente, passamos a questionar o modelo de moradia individual utilizado em biotérios de experimentação, pois o

ideal talvez não seja a moradia individual, mas uma possível acomodação conjunta com mais uma ou duas companheiras.

8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados desta dissertação, podemos concluir que o modelo social de estresse pré-natal de superpopulação:

- a) Interfere na taxa de prenhez, na implantação e viabilidade gestacional, aumentando o número de hemorragias e reabsorções;
- b) Diminui o peso fetal e da placenta interferindo negativamente na eficiência placentária;
- c) Reduz o ganho de peso materno ao fim da gestação e aumenta a atividade exploratória das fêmeas prenhes;
- d) Acarretou uma redução no peso da prole ao nascimento e no seu tamanho e peso no primeiro mês de vida;
- e) Diminuiu a distância anus-genital dos filhotes de ambos os sexos, afetando morfológicamente o dimorfismo sexual;
- f) Atrasou os padrões de desenvolvimento neurológico de endireitamento e agarramento palmar;
- g) Alterou de maneira positiva causando um comportamento menos depressivo no pós-parto, mas alterou o cuidado materno reduzindo o tempo de lambida da mãe no 5º dpn;
- h) Interferiu reduzindo os padrões de ansiedade dos filhotes fêmeas na puberdade.

REFERÊNCIAS

ABE, H.; ISHIDA, Y.; IWASAKI, T. Perirhinal N-methyl-D-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. **Neuroscience Letters**, Limerick. v.356, p.191–194, 2004.

ABE, H. et al. Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Neurosci. Res**, Limerick, v.59, p.145-151, 2007.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. DSM-5. 5ª Edição, Artmed, Porto Alegre, 2014.

AMINU et al. Causes of and factors associated with **stillbirth** in low- and middle-income countries: a systematic literature review. **Royal College of Obstetricians and Gynaecologists**, Oxford, v.4 p.141-153, 2014.

AMUGONGO S.K., HLUSKO L. J. Impact of Maternal Prenatal Stress on Growth of the Offspring. **Aging and Disease**, California, v. 5, p. 1-16, 2014.

ANDRADE,A; PINTO, S.C; OLIVEIRA,R.S. Orgs. Animais de laboratório: criação e experimentação[online] **Editora FIOCRUZ**, Rio de Janeiro, 2002.

ARCK P.C. et al. Stress-Induced Murine Abortion Associated with Substance P-Dependent Alteration in Cytokines in Maternal Uterine Decidua. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, New York v. 53, p. 814-819, 1995.

ARCK P.C. Stress and embryo implantation. **J Gynecol Obstet Biol Reprod**, Paris v. 33, p. 40-42, 2004.

ASHWORTH C.J. et al. Sex-specific prenatal stress effects on the rat reproductive axis and adrenal gland structure, **Reproduction**, Bristol, v.151, p.709–717, 2016.

ATKINSON H.C, WADDELL B.J. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Rat Pregnancy and Lactation: Circadian Variation and Interrelationship of Plasma Adrenocorticotropin and Corticosterone. **Endocrinology**, New York v.136, p. 512-520, 1995.
BARLACH L., FRANÇA A.C, MALVEZZI S. O Conceito de Resiliência Aplicado ao Trabalho nas Organizações. **Interamerican Journal of Psychology**, São Paulo.v.42, p.101-112, 2008.

BARRETT et al. Prenatal stress as a modifier of associations between phthalate exposure and reproductive development: results from a multicenter pregnancy cohort study. **Paediatr Perinat Epidemiol.**, Boston. v.30(2), p. 105–114, 2016.

BELLUSCIO, L. M.; et al. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. **Physiology and Behavior**, New York n. 129, p. 237-254, 2014.

BOKONY, V. et al. Stress response and the value of reproduction: are birds prudent parents? **American Naturalist**, Chicago v. 173, p. 589-598, 2009.

BURKUS, J; et al. Stress exposure during the preimplantation period affects blastocyst lineages and offspring development. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo. v. 61, p.325-331, 2015.

BROAD, K. D.; KEVERNE, E. B. Placental protection of the fetal brain during shortterm food deprivation. **PNAS**. Washington v. 108, p. 15237-15241, 2011.

BRUMMELTE, S; GALEA, L.A.M. Chronic corticosterone during pregnancy and postpartum affects maternal care, cell proliferation and depressive-like behavior in the dam. **Hormones and Behavior**, New York. v 58, p. 769–779, 2010.

BRUNTON, P. J. et al. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. **Journal of Neuroendocrinology**, Malden v. 20, p. 764-776, 2008.

BRUNTON, P. J., RUSSELL, J. A. Attenuated hypothalamo-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge during pregnancy: the neurosteroid-opioid connection. **Journal of Physiology**, Oxford. v. 586, p. 369-375, 2008.

BRUNTON, P. J; RUSSEL, J. A. Prenatal Social Stress in the Rat Programmes Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress in the Adult Offspring: Sex-Specific Effects. **Journal of Neuroendocrinology**, Malden v.22, p.258-271, 2010.

BRUNTON, P.J. Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. **Reproduction**, Bristol, v 146, p175-189,2013.

CAO-LEI L et al. Prenatal stress and epigenetics. **Neurosci Biobehav Rev**, New York. v 18, 2017.

CALDJI, C.; DIORIO, J.; MEANEY M. J. Variations in Maternal Care in Infancy Regulate the Development of Stress Reactivity. **Biol Psychiatry**, New York, v.48, p.1164–1174, 2000.

CAPITANIO, J.P; COLE, S.W. Social instability and immunity in rhesus monkeys: the role of the sympathetic nervous system. **The Royal Society**, London v. B 370, p 1-11, 2015.

CASTRO, V. L.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. **Toxicology Letters**, Amsterdam v. 118, n.1-2, p.93-102, 2000.

CASTRO, V. L. Estudo experimental em ratos da interação mãe/filhote expostos a agroquímicos. **Circular técnica- Embrapa**, Jaguariúna 1º Edição, p.1-7, 2006.

CHAMPAGNE, F.A; MEANEY, M.J. Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. **Biol. Psychiatry**, New York v 59, p. 1227–1235, 2006.

CHISWICK, M. L. Intrauterine growth retardation. **British medical journal**, London. v. 291, p. 845-848, 1985.

CHOE et al. Maternal stress retards fetal development in mice with transcriptome-wide impact on gene expression profiles of the limb. **Stress**, London. v.14(2), p. 194-204, 2011.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H.RN. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, Araraquara. v. 28, n.1, p.11-23, 2007.

CLANCY, B. et al. Extrapolating brain development from experimental species to humans. **NeuroToxicology**, Amsterdam v.28, p. 931-37, 2007.

COAN, P. M.; et al. Adaptations in placental nutrient transfer capacity to meet fetal growth demands depend on placental size in mice. **J. Physiol.** Oxford 586.18, p. 4567-4576, 2008.

COÊLHO, N. L.; TOURINHO, E. Z. O conceito de ansiedade na análise do comportamento. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, Porto Alegre. v. 21(2), p.171-178, 2008.

CONSTANTINOF, A.; MOISIADIS, V. G; MATTHEWS, S. G. Programming of stress pathways: A transgenerational perspective. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford v. 160, p.175–180, 2016.

CORREIA-DA-SILVA G. et al. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. **Placenta**, Amsterdam v. 25, p. 538-547, 2004.

COLNAGHI, L. et al. Social Involvement Modulates the Response to Novel and Adverse Life Events in Mice. **Plos One**, San Francisco. v.11(9), 2016.

COSTA M. The endocrine function of human placenta: an overview. **Molecular Reproduction & Development**. Amsterdam v.79, p.239–254, 2012.

CRYAN J. F.; MOMBÉREAU C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. **Molecular Psychiatry**, Basingstoke. v. 9, p. 326-357, 2004.

DAVYDOV, P. et al. Neurodevelopment and phenotype-modulating functions of S100B protein: A pilot study. **Physiology & Behavior**, New York. v.140, p. 188-196, 2015.

DESAULNIERS, A. T.; LAMBERSON W. R.; SAFRANSKI T. J. Prenatal heat stress reduces male anogenital distance at birth and adult testis size, which are rescued by concurrent maternal

Artemisia absinthium consumption. **Journal of Thermal Biology**, Oxford. v. 57, p. 84–91, 2016.

DONADIO, M. V. F.; VARGAS, M. H. M. Efeitos do estresse no período gestacional em diferentes modelos experimentais: uma revisão da literatura. **Rev. de Atenção à saúde**, São Paulo. v.12, n 41, p. 81-86, 2014.

FARAJI, J. et al. Evidence for Ancestral Programming of Resilience in a Two-Hit Stress Model. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, Lausanne. v.11, p.1-11, art. 89, 2017.

FERREIRA, R. C. et al. Prevalence of anxiety symptoms and depression in the third gestational trimester. **Arch Gynecol Obstet**, London v. 291, p.999–1003, 2014.

FELICIONI, F. **Efeitos morfológicos e de lipoperoxidação da restrição alimentar aguda durante a gestação de camundongos**. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, MG, 2014.

FILE, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam. v. 125, p.151-157, 2001.

FLEMING, A. S.; O'DAYB, D. H.; KRAEMER, G.W. Neurobiology of mother–infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York. v 23, p.673–685, 1999.

FONSECA. E. S. M.; MASSOCO, C. O.; NETO, J. P. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. **Physiology & Behavior**, New York. v. 77, p.205–215, 2002.

FOWDEN A. L. et al. Endocrine regulation of placental phenotype. **Placenta**, London. v. 29, p.S50-S59, 2015.

FUJITA, S. et al. “Green odor” inhalation by stressed rat dams reduces behavioral and neuroendocrine signs of prenatal stress in the offspring. **Hormones and Behavior**, New York v 58, p. 264–272, 2010.

FUKUOKA, H.; SATA, F. Molecular Mechanism of Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). **Nihon Eiseigaku Zasshi**, Tokyo. v.71, p.185-187, 2016.

GAPP, K. et al. Early life stress in fathers improves behavioural flexibility in their offspring. **Nature Communications**, London. v. p.1-8, 2014.

GEORGIADES, P.; FERGUSON-SMITH, A. C.; BURTON, G. J. Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. **Placenta**, London. v. 23, p.3-19, 2002.

GOLUB, M. S. et al. Effects of Restraint Stress in Gestation: Implications for Rodent Developmental Toxicology Studies. **Birth Defects Research**, Hoboken. v. 71, p.26-36, 2004.

GOLUB, M. S. et al. Effects of In Utero Environment and Maternal Behavior on Neuroendocrine and Behavioral Alterations in a Mouse Model of Prenatal Trauma. **Developmental Neurobiology**, Hoboken. v. 76, p.1254-1265, 2016.

GOTZ, A. A; WOLF, M; STEFANSKI. Psychosocial maternal stress during pregnancy: Effects on reproduction for F0 and F1 generation laboratory rats. **Physiology & Behavior**, New York. v 93, p.1055–1060, 2008.

GOVINDARAJ, S.; SHANMUGANATHAN, A.; RAJAN, R. Maternal psychological stress-induced developmental disability, neonatal mortality and stillbirth in the offspring of Wistar albino rats. **Plos One**, San Francisco. v. 21, p. 1-17, 2017.

GRECO, G. M. Z. **Dieta hiperproteica na gestação de camundongos e seus efeitos na mãe e no desenvolvimento inicial de filhotes**. Minas Gerais, 2017. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde, Universidade Federal de Alfenas, MG, 2016.

GUZZO, S. F. C. B. et al. Impact of chronic stressors on the anxiety profile of pregnant rats. **Physiology & Behavior**, New York. v.142, p.137–145, 2015.

HAIM C. The effects of gestational stress and SSRI antidepressant treatment on structural plasticity in the postpartum brain - a translational model for postpartum depression. **Horm Behav**. New York. v. 77, p.124–131, 2016.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. 1. defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, New York. v18, p.382-403, 1934.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of α -adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmeideberg's Arch Pharmacol**, Berlin. v.327, p.1-5, 1984.

HARRIS, A.; SECKL, J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. **Hormones and Behavior**, New York. v 59, p.279–289, 2011.

HARVEY, P.W; CHEVINS, P.F.D. Crowding during pregnancy delays puberty and alters estrous cycles of female offspring in mice. **Birkhauser Verlag**. Basilea. v. 43, p.306-308, 1987.

HEINRICHS M. Social Support and Oxytocin Interact to Suppress Cortisol and Subjective Responses to Psychosocial Stress. **Biol Psychiatry**, New York v. 54, p. 1389-1398, 2003.

JAFARI Z. et al. The Adverse Effects of Auditory Stress on Mouse Uterus Receptivity and Behaviour. **Scientific Reports**, London, v.5, p. 1-11, 2017.

JOHNSON, J.L.S. Social status and housing factors affect reproductive performance of pregnant sows in groups. **Mol Reprod Dev**. New York, p.1–9, 2017.

JONES, K.L. et al. Combined effect of maternal serotonin transporter genotype and prenatal stress in modulating offspring social interaction. **Int J Dev Neurosci**, Oxford, v. 28(6), p. 529-536, 2010.

KANAI-AZUMA, M.; et al. Giant-cell transformation of trophoblast cells in mice. **Endocrine Journal**, Kyoto. v. 41, p.33-41, 1994.

KHASHAN, A.S et al. Reduced Infant Birthweight Consequent Upon Maternal Exposure to Severe Life Events. **Psychosom Med**, Hagerstown. v.70, p.688-694, 2008.

KARATSOREOS I. N; MCEWEN B. S. Resilience and vulnerability: a neurobiological perspective. **F1000Prime Reports**, London. v, 5, p.1-5, 2013.

KINSLEY, C.; SVARE, B. Prenatal Stress Alters Maternal Aggression in Mice. **Physiology e Behavior**, New York. v. 42, p.7-13, 1988.

KISS A.C.I. Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of Wistar rats. **Physiology & Behavior**, New York. v. 107, p. 292–300, 2012.

KLOET, E.R. About Stress Hormones and Resilience to Psychopathology. **Journal of Neuroendocrinology**, Malden. v 20, p. 885–892, 2008.

KLOET, E. R.; MOLENDIJK, M. L. Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. **Neural Plasticity**, Montreal. v. 2016, p.1-13, 2016.

LEUNER, B.; SHORS, T. J. Learning during motherhood: A resistance to stress. **Horm Behav.**, New York. v. 50(1), p.38–51, 2006.

LEVINE, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. **Psycho neuro endocrinology**, Oxford. v.30, p.939–946, 2005.

LIAN, S. et al. Prenatal cold stress: effect on maternal hippocampus and offspring behavior in rats. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 346, p.1-10, 2018.

LIEBERWIRTH, C. et al. Social isolation impairs adult neurogenesis in the limbic system and alters behaviors in female prairie voles. **Horm Behav**, New York. v. 62, p.357–366, 2012.

LIN, E.D. et al. Social overcrowding as a chronic stress model that increases adiposity in mice. **Psycho neuro endocrinology**, Oxford. v.51, p.318–330, 2015.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, Berlin. v. 92, p.180-185, 1987.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac. Ther**, Oxford. v. 46, p.321-340, 1990.

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic–pituitary–adrenal responses to stress. **American Association for the Advancement of Science**, New York. v.277, p.1659-1662, 1997.

LIU, G, et al. Restraint stress delays endometrial adaptive remodeling during mouse embryo implantation. **The international Journal on the Biology of Stress**, London. v.18, p 699-709, 2015.

MACBETH, A. H.; GAUTREAUX, C.; LUINE, V. N. Pregnant rats show enhanced spatial memory, decreased anxiety, and altered levels of monoaminergic neurotransmitters. **Brain Res**. Amsterdam. v, 19; 1241: p.136–147, 2008.

MAGUIRE, J; MODY, I. Behavioral Deficits in Juveniles Mediated by Maternal Stress Hormones in Mice. **Neural Plasticity**, Montreal. v. 2016, p.1-13, 2015.

MARKOVIĆ, V. M. et al. Predictive modeling of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis response to acute and chronic stress. **Endocrine Journal**, Kyoto. v 58, p.889-904, 2011.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, Amsterdam, v. 886, p.172–189, 2000.

MCEWEN, B.S; WINGFIELD B, J.C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, New York v.43, p.2-15, 2003.

MCEWEN, B.S et al. Mechanisms of stress in the brain. **Nat Neurosci**, New York. v. 18, p.1353–1363, 2015.

MEEK, L.R. et al. Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning. **Physiology and Behavior**, New York. v 71, p. 543-549, 2000.

MENARD, J. TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience Biobehavior Reviews**, New York. v. 23, p.591-613, 1999.

MIAO, Z. et al. Anxiety-Related Behaviours Associated with microRNA-206-3p and BDNF Expression in Pregnant Female Mice Following Psychological Social Stress. **Mol Neurobiol**, Clifton. v. 55, p.1097-111, 2018.

MIHALIK, J. et al. Impact of 2 doses of clorgyline on the rat preimplantation embryo development and the monoamine levels in urine. **Reprod Sci**, Thousand Oaks. v. 17, p.734–741, 2010.

MISDRAHI, D. et al. Prepartum chronic ultramild stress increases corticosterone and estradiol levels in gestating mice: Implications for postpartum depressive disorders. **Psychiatry Research**, Limerick. v. 137, p.123–130, 2005.

MIYAGAWA, K. Prenatal stress induces anxiety-like behavior together with the disruption of central serotonin neurons in mice. **Neuroscience Research**, Limerick. v. 70, p.111–117, 2011.

MONAGHAN, P.; HAUSSMANN, M.F. The positive and negative consequences of stressors during early life. **Early Human Development**, Limerick. v. 91, p.643–647, 2015.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 14^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

MUELLER, B. R. BALE, T. L. Impact of prenatal stress on long term body weight is dependent on timing and maternal Sensitivity. **Physiology & Behavior**, New York. v88, p. 605–614, 2006.

NAKAMURA, K.; SHEPS, S.; ARCK, P. C. Stress and reproductive failure: past notions, present insights and future directions. **J Assist Reprod Genet**, Amsterdam. v. 25, p.47–62, 2008.

NEMSADZE, K.; SILAGAVA, M. Neuroendocrine foundation of maternal-child attachment. **Georgian Med News**, Tbilisiv. v. 189, p.21-6, 2010.

NEUMANN, I.D. Alterations in behavioral and neuroendocrine stress coping strategies in pregnant, parturient and lactating rats. **Progress in Brain Research, The Maternal Brain**, Amsterdam. v. 133, p.143–152, 2001.

NEUMANN, I. D. Effects of psycho-social stress during pregnancy on neuroendocrine and behavioural parameters in lactation depend on the genetically determined stress vulnerability. **Psycho neuro endocrinology**, Oxford. v. 30, p.791–806, 2005.

NEVES, S. M. P; FILHO, J. M.; MENEZES, E. W. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo, 2013.

NGUYEN A.J. et al. Multilevel Regulation of Steroid Synthesis and Metabolism in the Bovine Placenta. **Molecular reproduction development**, Hoboken. v. 79, p.239-254, 2012.

NISHIO, et al. Effects of perinatal stress on the anxiety-related behavior of the adolescence mouse. **Int. J. Devl Neuroscience**, Oxford. v. 24, p.263–268, 2006.

NUMAN, M. A. neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. **Acta Paediatr Suppl**, Oslo. v. 397, p.19-28. 1994.

NUMAN, M. Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. **Behav Cogn Neurosci Rev**, Thousand Oaks. v. 5, n. 4, p.163-190, 2006.

NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural system in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Frontiers in Neuroendocrinology**, Orlando. v. 30, n. 1, p.46-64, 2009.

ORTOLAZ, D. L. R. et al. Ovarian hormones modify anxiety behavior and glucocorticoid receptors after chronic social isolation stress. **Behav Brain Res**. Amsterdam. v. 15;328, p.115-122, 2017.

OSÓRIO, N. S. et al. Neurodevelopmental delay in the Cln3 Δ ex7/8 mouse model for Batten disease, **Genes Brain Behav**, Oxford. v. 8, p.337–345, 2009.

PALLARE`S, M. E. et al. Prenatal maternal restraint stress exposure alters the reproductive hormone profile and testis development of the rat male offspring. **Stress**, London. v. 16, p.429-440, 2013.

PATIN, P. et al. Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. **Developmental Brain Research**, Amsterdam. v.139, p.1–8, 2002.

PEEL, S.; BULMER, D. Proliferation and differentiation of the trophoblast in the establishment of the rat chorio-allantoic. **Placenta**, London. v. 124, p.675-687, 1976.

PEREIRA, P. K.; LOVISI, G. M. Prevalence of gestacional depression and associated factors. **Rev Psiq Clín**, São Paulo. v.35, p.144-153, 2007.

PEREIRA, L. A.V.; JUSTINO, M. L.; MORAES, S. G. Embriologia humana integrada: animações e casos clínicos. Campinas, 2014

PORSOLT, R. O.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Interna Pharma Ther**, Gent. v. 229, p.327-336, 1977.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam. v. 463, p.3-33, 2003.

RAKERS, F et al. Transfer of Maternal Psychosocial Stress to the Fetus. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York. v.16, p.2-45, 2017.

RASMUSSEM, S. et al. Construction Noise Decreases Reproductive Efficiency in Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, Memphis. v.48, n.4 p.363-370, 2009.

REDMAN, C. W.; Sargent, I. L. Latest Advances in Understanding Preeclampsia. **Science**, Washington. v. 308, p.1592-1594, 2005.

REISS, D. et al. Effects of social crowding on emotionality and expression of hippocampal nociceptin/ orphanin FQ system transcripts in mice. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam. v 184, p.167-173, 2007.

REGNAUT, T. R. et al. Placental development in normal and compromised pregnancies-- a review. **Placenta**, London. v. 23, p.119-129, 2002.

RODRIGUEZ-PEREZ, M. C. Effects of Protein Malnutrition and the Administration of Cortisol on the Reflexologic Development in Rats. **Behavioral and Neural Biology**, New York. v. 58, p.165-170, 1992.

SANTERALLI, S. et al. An adverse early life environment can enhance stress resilience in adulthood. **Psycho neuro endocrinology**, Oxford. v 78, 213-221, 2017.

SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: **Fiocruz**, p.115-8, 2002.

SAPOLSKY, R.M; ROMERO L.M; MUNCK, A.U. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. **Endocrine Reviews**, Kyoto. v 21, p.55-58, 2000.

SAYIN, A. et al. The effects of the estrus cycle and citalopram on anxiety-like behaviors and c-fos expression in rats. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, Tarrytown. v. 124, p.180-187, 2014.

SECHER, T. et al. A neural cell adhesion molecule-derived fibroblast growth factor receptor agonist, the FGL-peptide, promotes early postnatal sensorimotor development and enhances social memory retention. **Neuroscience**, New York. v.141, p.1289–99, 2006.

SCHMIDT, M. V.; STERLEMAN, V.; MÜLLER, M. B. Chronic Stress and Individual Vulnerability. **Stress, Neurotransmitters, and Hormones**, New York. v.1148, p.174-183, 2008.

SCHULZ, K. M. et al. Maternal stress during pregnancy causes sex-specific alterations in offspring memory performance, social interactions, indices of anxiety, and body mass. **Physiol Behav**, New York. v. 104, p.340–347, 2011.

SELYE, H. A. Syndrome produced by noxious agents. **Nature**, Basingstoke. v 32, 1936.

SELYE, H. Thymus and Adrenals in the Response of the Organism to Injuries and Intoxications. **Brit. J. Exper. Pathol**, Oxford. v. 17, p.234-248, 1936.

SELYE, H. The stress of life. New York: McGraw Hill, 1984 (publicado originalmente em 1956).

SILVER RM, RUIZ RJ. Invited commentary: maternal stress and stillbirth: another piece of the puzzle. **Am J Epidemiol**, Baltimore. v.177, p.228-229, 2013.

SILVEIRA, P. P. et al. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **J Pediatr**, Porto Alegre. v, 83, p. 494-504, 2007.

SIMMONS, D. G.; CROSS, J. C. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. **Developmental Biology**. Tarrytown. v.284, p.12- 24, 2005.

SLATTERY, D. A.; NEUMANN, I. D. No stress please! Mechanisms of stress hyperresponsiveness of the maternal brain. **J Physiol**, Oxford. v.586.2 p.377–385, 2008.

SMITH, J. W. et al Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. **Psycho neuro endocrinology**, Oxford. v 29, p 227-244, 2004.

SOLATI, J. et al. Inverse effects of lipopolysaccharides on anxiety in pregnant mice and their offspring. **Physiology & Behavior**, New York. v. 74, p.139:369, 2015.

ST-CYR, S.; MCGOWAN, P.O. Programming of stress-related behavior and epigenetic neural gene regulation in mice offspring through maternal exposure to predator odor. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, Lausanne. V. 9, p.144, 2015.

STOCKDALE, S. The Importance of Social Context: Neighborhood Stressors Stress-Buffering Mechanisms, and Alcohol, Drug, and Mental Health Disorders. **Soc Sci Med**, Oxford. v. 65, p.1867–1881, 2007.

STRANAHAN, A. M. et al. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. **Nature Neuroscience**, New York. v. 9, p.526-533, 2006.

SZYF, M. et al. Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat. **Front Neuroendocrinol**, Orlando. v.26, p.139–162, 2005.

TAKIUTI, N. H.; KAHHALE, S.; ZUGAIB, M. Stress in pregnancy: A new Wistar rat model for human preeclampsia. **Am j obstet gynecol**, St. Louis. v. 186, p.544-550, 2002.

TAYLOR, S. et al. Genetic and environmental origins of health anxiety: a twin study. **World Psychiatry**, Milan. v.5, p.47-50, 2006.

TENG, C.T.; HUMES, E.C.; DEMETRIO, F.N. Depressão e comorbidades clínicas. **Rev. Psiq. Clín**, São Paulo. v.32, p.149-159, 2005.

TOUFEXIS, D. et al. Stress and the Reproductive Axis. **J Neuroendocrinol**, Malden. v.26, p.573–586, 2014.

VALLÉE, M. et al. Prenatal Stress Induces High Anxiety and Postnatal Handling Induces Low Anxiety in Adult Offspring: Correlation with Stress- Induced corticosterone Secretion. **The Journal of Neuroscience**, Washington. v.17, p.2626–2636, 1997.

VAUGHAN et al. Maternal corticosterone regulates nutrient allocation to fetal growth in mice. **The Journal of Physiology**, Oxford v. 590.21, p. 5529–5540, 2012.

VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. **Endocrinology**, New York. v.152(12), p. 4838–4845, 2011.

WADHWA, P. D. et al. Placental corticotropin-releasing hormone (CRH), spontaneous preterm birth, and fetal growth restriction: a prospective investigation. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis. v.191, p.1063- 1069, 2004.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. Parity and estrogen-administration alter affective behavior of ovariectomized rats. **Physiol Behav**, New York. v. 28, p.351–356, 2007.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nat Protoc**, London. v.2, p.322–328, 2007

WARD, R. M.; Pharmacologic enhancement of fetal lung maturation. **Clin Perinatol**, Philadelphia. v. 21, p.523-542, 1994.

WATSON, E. D.; CROSS, J. C. Developmental of structures and transport functions in the mouse placenta. **Physiology**, Bethesda. v. 20, p. 180-193, 2005.

WEERTH C.; BUITELAAR J.K. Physiological stress reactivity in human pregnancy—a review. **Neuroscience and Biobehavioral**, New York. v.29, p.295–312, 2005.

WEISS, I. C. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam. v. 152, p.279–295, 2004.

WEINSTOCK, M. Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. **Neurobiology of Stress**, New York. v. 6, p.3-13, 2017.

WHIRLEDGE, S. D. et al Uterine glucocorticoid receptors are critical for fertility in mice through control of embryo implantation and decidualization. **PNAS**, Washington. v.112, p. 15166–15171, 2015.

WIEBOLD. J.L et al. The effect of restraint stress in early pregnancy in mice. **Journal of Reproduction Fertility**, Colchester. v. 78, p.185-192, 1986.

WILLIAMS M. T.; HENNESSY M. B.; DAVIS H. N. Stress During Pregnancy Alters Rat Offspring Morphology and Ultrasonic Vocalizations. **Physiology & Behavior**, New York, v. 63, p. 337–343, 1998.

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci. Biobehav. Rev**, New York. v. 16, p.525–534, 1992.

WILLNER P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress (CMS) model of depression: a ten-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, Berlin. v. 134, p.319–329, 1997.

WINGFIELD, J. C.; SAPOLSKY, R. M. Reproduction and adaptation stresssistance to stress: when and how. **Journal of Neuroendocrinology**, Malden. v. 15, p. 711-724, 2003.

WORKMAN, A. D. et al. Modeling Transformations of Neurodevelopmental Sequences across Mammalian Species. **The Journal of Neuroscience**, Washington. v. 33, n. 17, p.7368-7383, 2013.

XU, J. Effects of duration and timing of prenatal stress on hippocampal myelination and synaptophysin expression. **Brain Research**, Amsterdam. v. p. 1-10, 2013.

YATES, D. T.; GREEN, A. S.; LIMESAND S. W. Catecholamines mediate multiple fetal adaptations during placental insufficiency that contribute to intrauterine growth restriction: lessons from hyperthermic sheep. **J Pregnancy**, Cairo. 2011.

ZAMIGNANI, D. R.; BANACO. R.A. Um Panorama Analítico-Comportamental sobre os Transtornos de Ansiedade. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, São Paulo. v.7, n. 1, p. 77- 92, 2005.

ZAVAN, B. et al. COX-2 plays a role in angiogenic DBA(+) uNK cell subsets activation and pregnancy protection in LPS-exposed mice. **Placenta**, London. v.44, p.34-45, 2016.

ZHAO, Y. et al. Restraint stress inhibits mouse implantation: temporal window and the involvement of HB-EGF, estrogen and progesterone. **PLoS ONE**, San Francisco. v.8, p.1-8, 2013.

ZHAO, Y. et al. Anti-depressant-like effects of Jieyu chufan capsules in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. **Experimental and Therapeutic Medicine**, Athens. v. 14, p.1086-1094, 2017.

ZUENA A.R et al. Prenatal Restraint Stress Generates Two Distinct Behavioral and Neurochemical Profiles in Male and Female Rats. **PLOS ONE**, San Francisco. v. 3, p.1-13, 2008.

ANEXO A

Anexo A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA-UNIFAL)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 709 - Alfenas/MG CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000 Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Superpopulação como um método de estresse pré-natal e suas consequências na prenhez, no cuidado materno, no desenvolvimento e comportamento da prole de camundongos", registrada com o nº 47/2017, sob a responsabilidade de Andrea Mollica do Amarante Paffaro, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 19/12/2017 a 15/03/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico
Nº de animais	283
Sexo	Machos: 10 Fêmeas: 273
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 19 de Dezembro de 2017.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador CEUA-UNIFAL