

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LUANA APARECIDA CHAGAS

**TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO DURANTE A GESTAÇÃO INDUZ AO
COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO E DESREGULAÇÃO DO EIXO HIPOTÁLAMO-
PITUITÁRIA-ADRENAL NA PROLE**

Alfenas/MG

2020

LUANA APARECIDA CHAGAS

**TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO DURANTE A GESTAÇÃO INDUZ AO
COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO E DESREGULAÇÃO DO EIXO HIPOTÁLAMO-
PITUITÁRIA-ADRENAL NA PROLE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Fabiana Cardoso Vilela Giusti

Alfenas/MG

2020

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

Chagas, Luana Aparecida

C433t Transtorno do estresse pós-traumático durante a gestação induz ao comportamento tipo-ansioso e desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na prole / Luana Aparecida Chagas. -- Alfenas/MG, 2020.
81 f.: il. --

Orientadora: Fabiana Cardoso Vilela Giusti.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas a Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2020.

Bibliografia.

1. Perinatal. 2. TEPT. 3. Prole. 4. Ansiedade. I. Giusti, Fabiana Cardoso Vilela. II. Título.

CDD-616.8

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

**TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO DURANTE A GESTAÇÃO INDUZ AO
COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO E DESREGULAÇÃO DO EIXO HIPOTÁLAMO-
PITUITÁRIA-ADRENAL NA PROLE**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Aprovada em: 14 de fevereiro de 2020

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

Prof. Dr. Tayllon dos Anjos Garcia
Instituição: Universidade de São Paulo
-USP

Profa. Dra. Bruna Kalil
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Cardoso Vilela, Professor do Magistério Superior**, em 14/02/2020, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Kalil, Professor do Magistério Superior**, em 14/02/2020, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tayllon dos Anjos Garcia, Usuário Externo**, em 14/02/2020, às 16:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](#), informando o código verificador **0259168** e o código CRC **84FBFEE5**.

*Dedico a finalização dessa etapa
a Deus e a Nossa Senhora
Aparecida e aos meus pais
Roselena e José Adélio.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por segurar minhas mãos ao longo do caminho e me levantar todas as vezes em que cai fazendo com que jamais desistisse.

Agradeço ao meus pais Roselena e José Adélio por me ajudarem a chegar até onde cheguei com amor, respeito e companheirismo, sem os quais jamais realizaria sonhos como este.

Agradeço ao Prof. Dr. Mânio de Carvalho Tibúrcio por me incentivar a buscar novos horizontes e me ajudar e apoiar em cada etapa desta jornada.

À minha orientadora Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti, por me acolher e confiar no meu trabalho e pelo seu grande exemplo como pessoa e pesquisadora.

Ao Prof. Alexandre Giusti-Paiva pelo grande exemplo profissional.

Agradeço imensamente aos meus colegas de laboratório que foram imprescindíveis nessa etapa me auxiliando, me ensinando e pelos ótimos momentos que me proporcionaram, tornando-se uma família, vou leva-los para toda minha vida! Meu eterno obrigado.

Agradeço ao José Reis por cuidar tão bem dos meus animais e pelos momentos de descontração durante o árduo trabalho.

Minha imensa gratidão a meus amigos pessoais que sempre me ajudaram e compreenderam as vezes em que não pudemos passar juntos devido á minha dedicação a pesquisa.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde Adriana Aparecida Pereira, pela paciência, simpatia e auxílio.

Agradeço também aos ratinhos utilizados nesse trabalho pois todos os resultados foram alcançados graças a eles.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal de Alfenas por contribuir para que o sonho de me tornar mestra se realizasse.

Agradeço a todos, embora não citados, que contribuíram para a realização deste trabalho

“Protege-me como a menina dos teus olhos; esconde-me à sombra das tuas
asas”

(Salmo 17:8)

RESUMO

Eventos estressantes no período perinatal podem alterar a estrutura e a função cerebral dos filhotes levando a mudanças comportamentais permanentes ao longo da vida. Desse modo, nosso trabalho tem como objetivo avaliar a influência do estresse pós-traumático durante a gestação sobre as respostas comportamentais na mãe e na prole. As ratas gestantes, no 10º dia de gestação, foram divididas em 2 grupos (n = 10 por grupo): não choque e choque. Elas foram expostas ou não a choques inescapáveis nas patas (2 s, 0,8 mA) e isoladas em caixas individuais. Um dia após o nascimento (DPN1), os filhotes foram padronizados em 4 machos e 4 fêmeas e as ratas lactantes foram reexpostas a caixa de choque para avaliar o tempo (s) de congelamento. O comportamento materno foi avaliado no 2º ao 8º dia de lactação nas ratas, o teste de campo aberto foi realizado no 4º dia e o de reconhecimento de objetos no 5º de lactação. A prole foi avaliada na infância nos seguintes testes (n = 10 por grupo): quantificação da vocalização ultrassônica (DPN5) e teste de comportamento de retorno a maravalha da mãe (DPN13). Durante o período de adolescência (DPN 28-32) foram realizados os testes comportamentais de campo aberto, labirinto em cruz elevado, comportamento de brincar e teste da placa de furos. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o *software GraphPad* versão 7.0, teste *t* de *Student* ou *two way Anova* seguido pelo pós teste de *Bonferroni*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de ética em experimentação animal da Unifal-MG, protocolo n° 50/2018. O grupo de mães choque, apresentaram um aumento no tempo de congelamento ao serem reexpostas a caixa de choque, redução do comportamento materno, redução do índice de reconhecimento de objetos a curto prazo e longo prazo, além de apresentarem um nível aumentado de corticosterona plasmática após a exposição e reexposição ao choque quando comparadas ao grupo de mães não choque. Na infância, os filhotes de mães submetidas ao choque, apresentaram aumento no número de vocalizações ultrassônicas, latência para atingir a maravalha da mãe e redução do tempo de permanência na maravalha da mãe quando comparados a filhotes de mães não choque. Já na adolescência, houve redução no tempo total de comportamento de brincar e um aumento no número

de imersões com a cabeça no teste de placa com furos, redução no tempo de permanência nos braços abertos e aumento de mergulhos com a cabeça no teste de labirinto em cruz elevado, além do aumento de expressão de GR no hipocampo e um aumento da corticosterona plasmática após dosagem em nível basal e após o teste de labirinto em cruz elevado. Assim, podemos concluir que o TEPT, além de afetar negativamente a mãe, proporciona uma programação fetal induzindo ao comportamento tipo ansioso na prole.

Palavras chave: Estresse perinatal. TEPT. Prole. Ansiedade.

ABSTRACT

Stressful events in the perinatal period may alter puppies' brain structure and function leading to lifelong permanent behavioral changes. Thus, our study aims to evaluate the influence of posttraumatic stress during pregnancy on behavioral responses in mother and offspring. The pregnant rats on the 10th day of gestation were divided into 2 groups (n = 10 per group): no shock and shock. They were exposed or not to inescapable foot shocks (2 s, 0.8 mA) and isolated in individual boxes. One day after birth (DPN1), puppies were standardized into 4 males and 4 females and lactating rats were re-exposed to the shock box to assess freezing time (s). Maternal behavior was evaluated on the 2nd to 8th day of lactation in rats, the open field test was performed on the 4th day and the recognition of objects on the 5th lactation. The offspring were evaluated in childhood in the following tests (n = 10 per group): quantification of ultrasonic vocalization (DPN5) and mother's return behavior test (DPN13). During adolescence (DPN 28-32) open field behavioral tests, elevated plus maze, play behavior and hole plate test were performed. Statistical analyzes were performed using GraphPad software version 7.0, Student's t-test or two-way Anova followed by Bonferroni post-test. All experimental procedure were approved by the animal experimentation ethics committee of Unifal-MG, protocol no. 50/2018. The group of dams mothers showed an increase in freezing time when re-exposed to shock box, reduced maternal behavior, reduced short-term and long-term object recognition index, and increased plasma corticosterone after exposure and re-exposure to shock when compared to the non-shock mothers group. In childhood, puppies from shocked mothers showed an increase in the number of ultrasonic vocalizations, latency to achieve mother wonder, and reduced time spent in mother wonder when compared to puppies from non-shock mothers. Already in adolescence, there was a reduction in the total time of playing behavior and an increase in the number of head immersions in the hole plate test, reduction in the time spent in the open arms and increased head dips in the elevated cross maze test. , in addition to increased expression of GR in the hippocampus and an increase in plasma corticosterone after baseline dosing and after elevated cross-maze testing. Thus, we can conclude that PTSD, besides negatively affecting the mother, provides fetal reprogramming inducing anxious behavior in the offspring.

Keywords: Perinatal stress. PTSD. Offspring. Anxiety

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sinalização glicocorticoide entre mãe, placenta e feto	25
Figura 2 -	Parâmetros maternos apresentados durante a lactação.....	27
Figura 3 -	Teste de reconhecimento de objetos	36
Figura 4 -	Teste de retorno a maravalha da mãe	37
Figura 5 -	Aparato de labirinto em cruz elevado	38
Figura 6 -	Teste de comportamento de brincar	39
Figura 7 -	Teste de placa com furos	40
Figura 8 -	Equipamento de <i>Westen Blotting</i>	42
Figura 9 -	Variação do ganho de peso das ratas gestantes – Gráfico A e a variação da perda de peso na lactação- Gráfico B de ratas do grupo choque (n=10) e não choque (n=10)	45
Figura 10 -	Tempo de congelamento das ratas lactantes do grupo não choque (n=10) e das ratas lactantes do grupo choque (n=10)	46
Figura 11 -	Avaliação da porcentagem do comportamento materno.....	47
Figura 12 -	Distância percorrida - Gráfico A e tempo de imobilidade –Gráfico B das ratas lactantes do grupo não choque (n =10) e do grupo choque (n=10)	47
Figura 13 -	Reconhecimento de Memória Curto-prazo: Tempo de exploração do objeto familiar -Gráfico A tempo de exploração do objeto novo - Gráfico B: índice de reconhecimento de objetos–Gráfico C das ratas lactantes do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10)	48

Figura 14 -	Dosagem de corticosterona plasmática das ratas gestantes	49
Figura 15 -	Dosagem de corticosterona plasmática das ratas lactantes.....	51
Figura 16 -	Dosagem de corticosterona plasmática das ratas lactantes.....	51
Figura 17 -	Ganho de peso (g) da ninhada provenientes de ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10)	52
Figura 18 -	Número de vocalizações ultrassônicas dos filhotes machos provenientes das ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10) - Gráfico A e número de vocalizações ultrassônicas dos filhotes fêmeas provenientes das ratas do grupo não choque – Gráfico B (n=10) e do grupo choque (n=10)	53
Figura 19 -	Latência (s) dos filhotes para chegar a maravalha da mãe -Gráfico A tempo (s) de permanência dos filhotes na maravalha da mãe- Gráfico B: número de entradas dos filhotes na maravalha da mãe –Gráfico C, número de saídas da maravalha da mãe – Gráfico D de filhotes machos de ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10)	53
Figura 20	Latência (s) dos filhotes para chegar a maravalha da mãe -Gráfico A tempo (s) de permanência dos filhotes na maravalha da mãe- Gráfico B: número de entradas dos filhotes na maravalha da mãe –Gráfico C, número de saídas da maravalha da mãe –Gráfico D de filhotes fêmeas de ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10).....	54

Figura 21 -	Teste de labirinto em cruz elevado. Gráfico A: Tempo de permanência nos braços abertos-Gráfico B: Tempo de permanência nos braços fechados e gráfico C: mergulhos com a cabeça de filhotes machos de ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10).....	55
Figura 22 -	Teste de labirinto em cruz elevado. Gráfico A: Tempo de permanência nos braços abertos-Gráfico B: Tempo de permanência nos braços fechados e gráfico C: mergulhos com a cabeça de filhotes fêmeas de ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10)	55
Figura 23 -	Distância percorrida - Gráfico A, tempo de imobilidade –Gráfico B, tempo de permanência na periferia do aparato –Gráfico C e tempo de permanência no centro do aparato de filhotes machos provenientes das ratas lactantes do grupo não choque (n =10) e do grupo choque (n=10).....	57
Figura 24 -	Distância percorrida - Gráfico A, tempo de imobilidade –Gráfico B, tempo de permanência na periferia do aparato –Gráfico C e tempo de permanência no centro do aparato de filhotes machos provenientes das ratas lactantes do grupo não choque (n =10) e do grupo choque (n=10).....	57
Figura 25 -	Tempo (s) do comportamento total de brincar de filhotes machos –Gráfico A e tempo (s) do comportamento total de brincar de filhotes fêmeas - Gráfico B provenientes das ratas lactantes do grupo não choque (n =10) e do grupo choque (n=10).....	58
Figura 26 -	Número de imersões com a cabeça dos filhotes machos - Gráfico B e número de imersões com a cabeça dos filhotes fêmeas provenientes de ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10)....	59

Figura 27 -	<i>Western Blotting</i> de hipocampo de filhotes machos (n=4-6) e de filhotes fêmeas (n=4-6) provindos de ratas do grupo não choque e do grupo choque	60
Figura 28 -	Dosagem de corticosterona plasmática basal dos filhotes machos e fêmeas (n=7) de filhotes de ratas do grupo não choque e do grupo choque	61
Figura 29 -	Dosagem de corticosterona plasmática após desafio no labirinto em cruz elevado dos filhotes machos e fêmeas (n=7) provindos de ratas do grupo não choque e do grupo choque.....	62

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ACTH	– Hormônio Adrenocorticotrófico
CEUA	– Comitê de Ética do Uso de Animais
CM	– Comportamento Materno
cm	– centímetros
DG	– Dia gestacional
DL	– Dia lactacional
DPN	–Dia Pós-Natal
DSM	--Diagnóstico de saúde mental
EPM	– Erro Padrão da Média
g	– gramas
GR	--Receptores de glicocorticoides
HPA	– Hipotálamo Pituitária Adrenal
H ₂ S ₂	– Dissulfeto de hidrogênio
min	-- minutos
ml	-- mililitros
ng	-- nanogramas
OMS	– Organização Mundial da Saúde
PVN	– Núcleo Paraventricular
s	-- segundos
SNA	– Sistema nervoso autônomo
SPS	– Estresse único prolongado
TEPT	– Transtorno do Estresse Pós-Traumático
UNIFAL	– Universidade Federal de Alfenas
VUS	– Vocalização Ultrassônica

LISTA DE SÍMBOLOS

- * - Asterisco
- °C - Graus célsius
- = - Igual
- + - Mais
- ± - Mais ou menos
- < - Menor
- > - Maior
- / - Por
- % - Porcentagem
- : - Proporção
- α - Alfa
- β - Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	ESTRESSE.....	20
2.2	TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS TRAUMÁTICO.....	22
2.3	ESTRESSE DURANTE A GESTAÇÃO E A LACTAÇÃO E CONSEQUÊNCIAS NA PROLE	24
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVOS	31
4.1	OBJETIVO GERAL.....	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5	MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1	ANIMAIS.....	32
5.2	ACASALAMENTO.....	32
5.3	INDUÇÃO DO TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS TRAUMÁTICO.....	32
5.4	PADRONIZAÇÃO DAS NINHADAS.....	33
5.5	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DA NINHADA.....	33
5.6	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DAS RATAS GESTANTES.....	33
5.7	AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DAS RATAS LACTANTES.....	34
5.7.1	Comportamento materno	34
5.7.2	Teste de Campo aberto	35
5.7.3	Teste de reconhecimento de objetos	35
5.8	AVALIAÇÃO DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS E DA PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES	36
5.8.1	Vocalizações ultrassônicas (VUS)	36
5.8.2	Teste do Comportamento de retorno a maravalha da mãe	
5.8.3	Teste de labirinto em cruz elevado	38

5.8.4	Teste de campo aberto	38
5.8.5	Teste de comportamento de brincar	39
5.8.6	Teste com placa com furos	40
5.8.7	<i>Western Blotting</i>	40
5.8.8	Dosagem de corticosterona plasmática	40
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
7	RESULTADOS	45
7.1	AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO GANHO DE PESO DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES	45
7.2	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO DAS RATAS LACTANTES	45
7.3	AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DAS RATAS LACTANTES	46
7.3.1	Avaliação do comportamento materno	46
7.3.2	Avaliação do teste de campo aberto	47
7.3.3	Avaliação do teste de reconhecimento de objetos de memória a curto prazo (2 horas)	48
7.3.3	Avaliação do teste de reconhecimento de objetos de memória a longo prazo (24 horas)	49
7.3.4	Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona em ratas após a exposição ao choque e após a reexposição ao aparato de choque inescapável	50
7.4	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DAS NINHADA	51
7.5	AVALIAÇÃO DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS E DA PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES	52
7.5.1	Vocalização ultrassônica (VUS)	53
7.5.2	Teste de comportamento de retorno a maravalha da mãe	53
7.5.3	Avaliação do teste de labirinto em cruz elevado	55
7.5.4	Avaliação do teste de campo aberto	56
7.5.5	Avaliação do teste de comportamento de brincar	58
7.5.6	Avaliação do teste de placas com furos	59
7.5.7	Avaliação da expressão de GR por <i>Western Blotting</i>	60

7.5.8	Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona.....	60
8	DISCUSSÃO.....	63
9	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

A vida durante os tempos modernos vem se apresentando cada vez mais estressante, o que tem aumentado a incidência de doenças relacionadas ao estresse (MARGIS, 2003). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estudos realizados nos últimos dez anos, demonstrou que o número de pessoas com depressão cresceu 18,4%, correspondendo a 322 milhões de indivíduos. Somente no Brasil, 5,8% dos habitantes é acometido pela depressão, sendo considerada a maior taxa da América Latina. O país também apresenta uma taxa de 9,3 % da população apresentando sintomas relacionados a ansiedade, podendo contribuir para o surgimento de outras doenças como ataques de pânico, fobias e o transtorno do estresse pós-traumático. Estima-se que até 2020, desordens relacionadas ao estresse sejam a segunda maior causa de incapacidade (OMS, 2019).

O Transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) é uma alteração psiquiátrica gerada após um evento traumático. O transtorno é considerado um distúrbio comum, crônico e incapacitante apresentando três sintomas principais: a reexposição ao trauma causando o estresse, a fuga de situações parecidas as que levaram ao desenvolvimento do transtorno e o estado de hipervigilância (BERARDI *et al.*, 2014; WINGENFELD *et al.*, 2016).

Diversos modelos foram desenvolvidos para a indução da desordem, porém um modelo experimental bem estabelecido em roedores que induz TEPT é a exposição ao choque elétrico inescapável nas patas seguida por isolamento social. Para que seja estabelecida a desordem, é necessário que os animais sejam reexpostos ao local do trauma, gerando alterações neurofisiológicas levando ao comportamento de congelamento (BERARDI *et al* 2014).

Os sintomas podem desenvolver-se imediatamente ou após algum tempo a exposição ao trauma e a ocorrência dos sintomas não é previsível, podendo se apresentar de formas diferentes nos indivíduos que sofreram o trauma (KELMENDI *et al.*, 2016).

Sabe-se que o TEPT ocasiona diversas mudanças neurofisiológicas em um indivíduo, portanto, uma importante questão levantada nesse estudo e que até o presente momento não foi abordada na literatura é que se o desenvolvimento do TEPT durante a gestação traria consequências para o feto,

isso devido a que no período gestacional, o feto/embrião está diretamente ou indiretamente exposto as mesmas alterações da mãe. Sendo assim, um evento que afeta o organismo materno consequentemente atinge o feto/embrião em desenvolvimento (SMITH, 2004). Seguindo esse contexto, um ambiente fetal inapropriado pode promover diversas alterações nos filhotes, como por exemplo, um aumento da responsividade do eixo HPA (BRUNTON, 2008).

Nos últimos anos, foram acumuladas diversas evidências experimentais e epidemiológicas que demonstram que o organismo do indivíduo adulto pode ser fortemente influenciado por experiências no início da vida. As origens do desenvolvimento de saúde e doença no adulto, afirmam que experiências adversas ao feto podem “programar” predisposições a distúrbios posteriores como doenças cardiovasculares, cognitivas, metabólicas e neurodegenerativas (HANSON, 2013).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica traz conhecimentos sobre o estresse, transtorno do estresse pós-traumático, estresse durante a gestação e lactação, ansiedade e a importância de um ambiente gestacional equilibrado para manutenção do feto e consequências na alteração desse meio causando alterações comportamentais e neuroendócrinas na prole.

2.1 ESTRESSE

A vida nos tempos atuais vem se tornando cada vez mais estressante. O estresse provocado pela vida cotidiana e cada vez mais afazeres, pode influenciar em diversos aspectos do nosso corpo e cérebro. Apesar de que, alguns de seus efeitos sejam mediados por hormônios corticosteroides que acometem o sistema nervoso, ainda pouco se sabe sobre como e quando os efeitos do estresse são benéficos ou prejudiciais para se tornar deletério no organismo (LUCASSEN *et. al*, 2014).

A relação entre estresse e doença, atualmente, está caracterizada, porém nem sempre foi assim. Hans Selye (1956), foi quem primeiro incorporou esse termo ao descrever a "resposta não específica do corpo a qualquer demanda", ou seja, estresse seria a situação gerada por um desafio ao qual o organismo estaria submetido (SIANG YONG TAN, 2018).

Selye observou em alguns estudos experimentais as consequências do estresse no organismo de animais de laboratório ao submetê-los a diversos agentes estressores, como por exemplo, variações térmicas, comportamentais, entres outros. No decorrer das investigações, foi constatado que as respostas de luta ou fuga eram apenas a primeira reação de uma sequência de outras que o organismo produz quando é submetido a um agente estressor. Tais reações fisiológicas foram denominadas de Síndrome de Adaptação Geral (SAG) (LEE *et al.*, 2015).

A SAG possui três fases: a primeira consiste na fase de alerta, em que há o mecanismo de resposta de luta ou fuga perante uma situação desafiadora

e sua finalidade é a de mobilizar todos os recursos do organismo para enfrentar o agente. É uma resposta rápida e mediada principalmente pela ativação do sistema nervoso autônomo simpático (SNAs) que promove a liberação de neurotransmissores em diversos órgãos-alvo e estimula a medula das glândulas adrenais na liberação dos hormônios adrenalina e noradrenalina. A segunda fase é a de resistência, em que o agente indutor de estresse se mantém ativo, mas não é severo o suficiente para causar a morte, sendo nessa fase que o organismo tenta se adaptar ao agente causador do estresse ou eliminá-lo.

Assim, as respostas fisiológicas e comportamentais, a fim de restabelecer a homeostase se mantêm e são mediadas principalmente pelo cortisol (hormônio corticosteroide), sintetizado e liberado pelas glândulas suprarrenais, em resposta a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Nessa fase as respostas adaptativas apresentam melhor desempenho físico e cognitivo, além de manifestar uma condição de neutralizar o agente estressor. Na terceira fase temos a exaustão, onde a prolongada estimulação fisiológica faz com que o organismo tenha uma resposta contínua e as alterações fisiológicas e comportamentais, que de início seriam adaptativas, levem a uma sobrecarga energética e exaustão dos sistemas, podendo causar danos irreparáveis como o surgimento de doenças e até levar a morte (KOOLHAAS et al., 2011; PACÁK & PALKOVITS, 2001; RODRIGUES, 2005; RJIA et al., 2010;).

A maneira como a resposta ao estresse é apresentada, varia de um indivíduo para outro, assim como suas consequências e sua resposta ao agente estressor, pois depende de um conjunto de fatores e eventos como fatores ambientais, genéticos, entre outros. Assim, a reação ao agente estressor pode compreender aspectos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que o organismo desenvolve diante de um desafio (agente estressor) de natureza física ou psicossocial (positivo ou negativo), que rompe a homeostase do organismo exigindo assim, um esforço de adaptação, denominado de alostasia (LUCASSEN, 2014 ;RODRIGUES, 2005).

De acordo com McEWEN, (1998), alostasia é definida como uma resposta fisiológica do indivíduo frente a uma situação de estresse, sendo essencial para a manutenção do equilíbrio do organismo e a adaptação a essa adversidade tem consequências para o corpo que pode ser definida como carga alostática.

Sendo assim, a carga alostática é a resposta do corpo e do cérebro resultante da hiperatividade ou da inatividade crônica dos sistemas fisiológicos envolvidos na resposta ao estresse. As respostas mais comuns envolvem a ativação do eixo HPA e do SNA, sendo a ativação do eixo HPA uma resposta a longo prazo com liberação de glicocorticoides pelo córtex da adrenal e a ativação do SNA uma resposta rápida ao estresse com liberação de noradrenalina e adrenalina na corrente sanguínea (LEE *et al.*, 2015).

Essas respostas são resultantes de ajustes do organismo para restabelecer a homeostase frente à um agente estressor e desvios da homeostase física e emocional que podem ocorrer sob condições de estresse agudo ou crônico, traumático ou não-traumático provocando alterações que resultam em distúrbios psiquiátricos e psicossomáticos como depressão, ansiedade e transtorno do estresse pós-traumático (LEE; KIM; CHOI, 2015; MARGIS *et al.*, 2003;).

2.2 TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS TRAUMÁTICO

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), classificado em Trauma e distúrbios relacionados ao estresse no DSM é um problema de saúde mental que pode ocorrer após a experiência de um evento psicologicamente traumático, como guerra, agressão ou desastre. A prevalência estimada de TEPT na população em geral é de 1 a 9%, entre as vítimas com trauma significativo como veteranos de guerra, o número é de 20 a 45% (OMS,2017).

O TEPT começou a ser estudado durante a Segunda Guerra Mundial após soldados e veteranos de guerra apresentarem sintomas de medo, tristeza, intrusão e ansiedade. Os estudos também se concentram em refugiados, militares e indivíduos que foram expostos a grandes experiências traumáticas como violência sexual, assaltos e acidentes (SCHESTATSKY, *et al.*, 2003).

O transtorno é considerado um distúrbio comum, crônico, incapacitante e apresenta manifestações concomitantes de três sintomas: a reexposição ao trauma causando o estresse, a fuga de situações parecidas as anteriores que levaram ao desenvolvimento do transtorno e o estado de hipervigilância (BERARDI *et al.*, 2014; WINGENFELD *et al.*, 2016).

Os sintomas do TEPT podem se desenvolver imediatamente ou algum tempo após a exposição ao evento traumático, manifestando-se de formas

diferentes em cada indivíduo apresentando como principais sintomas distúrbios de humor. Assim pode ocorrer o desenvolvimento de depressão e ansiedade, além de alterações cognitivas (TREZZA; CAMPOLONGO, 2013).

Um modelo experimental em roedores muito bem estabelecido e utilizado neste trabalho, capaz de induzir ao TEPT é a exposição ao choque elétrico inescapável seguido por isolamento social por um período normalmente igual ou superior a sete dias. Após esse período, quando os animais são reexpostos ao local do trauma, eles apresentam comportamento de congelamento, em que se pode observar se houve ou não retenção de memória ligada ao trauma (BERARDI *et al.*, 2014).

Algumas reações apresentadas durante o TEPT, estão associadas com a incapacidade de inibir respostas ao medo, já que sentir medo é uma resposta natural que pode desencadear diversas alterações fisiológicas para preparar o organismo para evitar o perigo, porém os indivíduos que sofrem com TEPT são incapazes de controlar o medo, devido ao fato da reação estar alterada ou danificada. Embora haja um comportamento ansioso em indivíduos com o transtorno, a doença inclui mudanças neuroendócrinas que podem levar a prejuízos cognitivos e ao desenvolvimento de outras desordens emocionais como a depressão. (TREZZA; CAMPOLONGO, 2013; BERARDI *et al.*, 2014).

2.3 ESTRESSE DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO E CONSEQUÊNCIAS NA PROLE.

Durante a gestação, o estresse pode ser ocasionado devido a eventos associados ao próprio período gestacional como o medo de complicações durante a gestação e no parto e mudanças no corpo, além de violência doméstica, gravidez indesejada, uso de drogas, depressão e outros contextos sociais e familiares (PEREIRA; LOVISI, 2007).

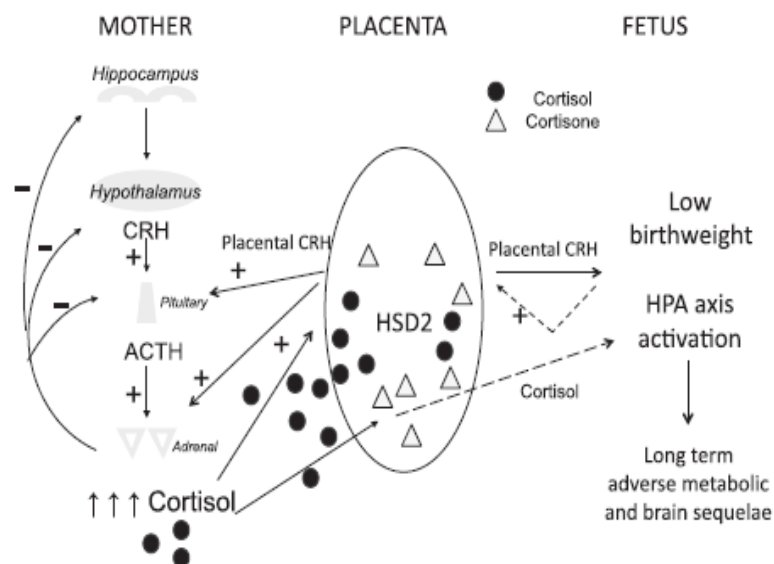
No período gestacional, o feto/embrião está diretamente ou indiretamente exposto as mesmas alterações da mãe. Sendo assim, um evento que afeta o organismo materno consequentemente atinge o feto/embrião em desenvolvimento (SMITH, 2004). Seguindo esse contexto, um ambiente fetal inadequado pode promover diversas alterações nos filhotes, como por exemplo, gerar um aumento do risco de doenças cardiovasculares, aumento da

responsividade do eixo HPA e levar a distúrbios psicológicos na vida adulta (ATKINSON, WADDELL, 1995; BRUNTON, 2013).

Estudos realizados em humanos demonstraram que mães que sofreram estresse psicológico crônico durante a gestação são mais propensas a negligenciar seus filhos. Esses efeitos surgem supostamente da interação dos efeitos do estresse durante a gestação e no pós-parto desencadeando consequências negativas nos filhos, como por exemplo, baixo peso ao nascer, nascimento prematuro, atrasos no desenvolvimento e predisposição a distúrbios psicológicos na vida adulta (MEEK et al., 2001).

Pesquisas realizadas por Reynolds em 2013, demonstraram que, o estresse durante a gestação age diretamente no eixo HPA da mãe, fazendo com que haja uma produção exacerbada de glicocorticoides, que podem atravessar a placenta e desencadear alterações nos filhos como baixo peso ao nascer, efeitos a longo prazo como alterações cerebrais e alterações metabólicas, como é demonstrado abaixo na figura 1:

Figura 1-Sinalização glicocorticoide entre mãe, placenta e feto.



Fonte: Reynolds,2013.

Nota: A figura mostra a interação entre os padrões maternos, placentários e compartimentos fetais durante a gestação que levaram à superexposição do feto em desenvolvimento a glicocorticoides. Ativação do eixo HPA materno durante uma caminhada ao longo dos níveis circulantes de cortisol (círculos preenchidos). O CRH também ativou a hipófise materna e adrenal para aumentar ainda mais os níveis de cortisol, enquanto o cortisol materno também estimula a produção de CRH placentário. O cortisol materno passa através da placenta, onde é decomposto pela enzima HSD2 em cortisona inativa (triângulos cinza). O feto também pode sinalizar a placenta aumentar a

produção de CRH placentário quando as demandas metabólicas fetais aumentam. Superexposição ao cortisol no feto em desenvolvimento leva a ativação do eixo HPA fetal, que está associado ao baixo peso ao nascer e sequelas metabólicas e cerebrais.

Foi demonstrado que os efeitos a longo prazo do estresse precoce são mediados por alterações nos eixos hipotalâmico-hipófise-adrenal materno e fetal, levando à exposição intrauterina a excesso de glicocorticóides (REZNIKOV et al., 1999; REYNOLDS et al., 2013).

As respostas endócrinas e materna-placentária-fetal têm sido propostas como um mecanismo plausível que medeia os efeitos duradouros da exposição ao estresse durante o desenvolvimento gestacional em vários sistemas fisiológicos do organismo em desenvolvimento (ENTRINGER et al., 2010).

O início da vida pós-natal é outro período sensível, com alto potencial para induzir efeitos de programação. Foi demonstrado que o comprometimento das interações mãe-filhote (como separação ou privação materna) durante o período pós-natal inicial, perturba as regulações neuroendócrinas, como a regulação positiva do receptor de glicocorticóide hipocampal (GR) e o fator de liberação de corticotropina, juntamente com os níveis aumentados de corticosterona e hormônio adrenocorticotrópico (LIPPMANN et al., 2007; KOROSI E BARAM, 2010; NISHI et al., 2013).

Tais alterações neuroendócrinas podem ser induzidas pelo estresse e podem causar problemas comportamentais na idade adulta, como comprometimento da memória, aprendizado e comportamentos do tipo ansiedade e depressão (CURLEY et al., 2011).

Existem efeitos duradouros que estão associados a variações naturais no comportamento materno (CM) em roedores como níveis altos ou baixos de lambida e higiene. Ratos machos criados por mães com alta porcentagem de cuidado materno, demonstraram níveis mais baixos de responsividade ao estresse e maior desempenho em tarefas cognitivas na idade adulta, e exploraram mais um ambiente novo do que os filhos de ratas com baixo índice de cuidado materno (LIU et al., 1997, 2000 CALDJI et al., 2000).

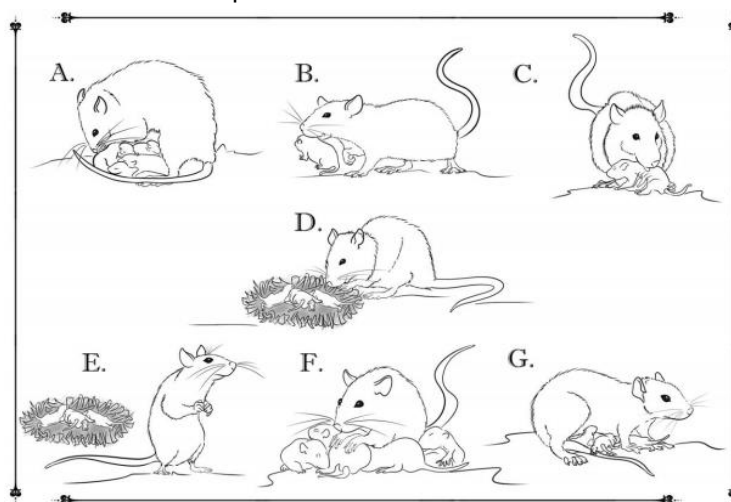
O CM é o conjunto de cuidados que a mãe oferece aos filhotes. Em cada espécie apresenta de forma espontânea, instintiva e específica, determinado por modificações fisiológicas que ocorrem imediatamente antes e após o parto

(NUMAN, 2010). Durante esse período, a meta da fêmea é garantir a própria sobrevivência e de seus filhotes (ORSO et al,2018).

Durante as duas primeiras semanas após o nascimento dos filhotes o CM é mais acentuado devido ao filhote apresentar capacidade sensorial limitada sendo incapazes de regular sua temperatura corporal, nascer desprovidos de pelos e com incapacidade de ouvir, ver, se alimentar e locomover fazendo com que se tornem totalmente dependentes da mãe para sobreviver. Nesse contexto, a mãe desenvolve o comportamento materno para apoiar o desenvolvimento e sobrevivência de sua prole (BRIDGES, 2015).

O CM realizados pelas mães para garantir a sobrevivência dos filhotes incluem: 1) amamentação dos filhotes, onde as ratas lactantes ficam em posição de cifose (em posição arqueada) para facilitar a amamentação; 2) recolhimento dos filhotes, onde a mãe carrega seu filhote com a boca para leva-lo até o ninho ou carrega-lo até outro local; 3) lambidas, que tem por função estimulação para defecar e urinar; 4) construção do ninho para aquecer e manter os filhotes protegidos na ausência da mãe (NUMAM; INSEL, 2003; BRUNTON; RUSSELL, 2008). Na figura 02 abaixo são apresentados alguns dos parâmetros maternos exibidos pelas ratas lactantes.

Figura 2- Representação esquemática de alguns parâmetros maternos exibidos pelas ratas lactantes.



Fonte: Adaptado de VERONESI, 2016.

Nota: A) posição de cifose, B) carregando os filhotes, C) lambidas, D) construção do ninho, F) agrupando os filhotes G) sobre os filhotes.

Entretanto, esse comportamento que a mãe dirige aos filhotes pode ser modificado por diversos fatores, entre eles o estresse durante a gestação. Isso ocorre devido que após o nascimento, o CM representa um forte laço entre mãe e filhote que pode influenciar em alterações no comportamento, no crescimento e na fisiologia de seus descendentes (CURLEY; CHAMPAGNE, 2015).

Um exemplo da influência do comportamento materno na prole, foi observado em um estudo em que filhotes na idade adulta de mães com alta porcentagem de cuidado materno, apresentaram respostas reduzidas de medo frente a novos desafios e baixa ativação do eixo HPA frente a situações estressoras, o que ocorre opostamente em filhotes de mãe com redução na porcentagem de cuidado materno (WORKMAN et al., 2015).

Nesse sentido, tem sido demonstrado que o comportamento materno pode ser modificado pelo estresse gestacional e ainda modificar respostas fisiológicas e comportamentais também na prole. Em um estudo utilizando um modelo de estresse de contenção do 11^o dia de gestação até o dia do nascimento (por 45 minutos/três vezes ao dia, sob luz intensa), observou-se que os filhotes machos e fêmeas provindos de mães que haviam passado pelo estresse de contenção apresentavam um aumento dos níveis de corticosterona e um comportamento tipo-depressivo, e em machos também observou-se um comprometimento da memória durante o envelhecimento (MACCARI et al,2014).

Desse modo, o foco do nosso estudo é avaliar a influência do estresse durante o período gestacional no comportamento materno e efeitos na prole, já que cérebro fetal é altamente susceptível ao estresse durante o período gestacional, ocasionando efeitos ao longo da vida na fisiologia e no comportamento dos descendentes (ITURRA et al ,2018).

2.4 ANSIEDADE

Aproximadamente cerca de 20 milhões de brasileiros sofrem de algum transtorno de ansiedade. Na maioria das vezes os quadros de ansiedade começam na infância ou na adolescência podendo também começar na idade adulta, sendo mais comum nas mulheres do que nos homens (OLIVEIRA et al, 2011).

Caracteriza-se por um sentimento vago e desagradável de medo, apreensão, caracterizado por tensão e desconforto derivado de antecipação de perigo ou algo desconhecido (OMS,2017).

A ansiedade começou a ser estudada em 1895, quando Freud escreveu sobre a 'neurose de ansiedade' e identificou duas fases. A primeira é a saudável que surge de um sentimento difuso de medo, já a segunda é a do sentimento aterrorizante (LEAHY, R. 2011).

Diferentemente da ansiedade normal, a ansiedade patológica causa prejuízos ao indivíduo, ao seu desempenho no trabalho, nas atividades diárias, gerando uma sensação de impotência diante das situações, dificultando o enfrentamento dos eventos geradores de ansiedade. Os transtornos ansiosos são quadros comuns tanto em crianças quanto em adultos, com uma prevalência estimada durante o período de vida de 9% e 15% (BARLOW, 2016).

A ansiedade afeta não apenas a forma como uma pessoa pensa, mas também pode levar a sintomas físicos e pode ocorrer quando uma pessoa encontra dificuldade para controlar o medo durante vários dias mantendo-se por um período superior a seis meses e apresentar algum outro sintoma como irritabilidade, dores de cabeça, sudorese, fadiga, falta de concentração, surgimento de tremores ou tensão muscular (WADHWA et al., 2004).

A causa específica da ansiedade ainda não foi encontrada, porém diversos fatores como genética, fatores ambientais, traumas e questões perinatais podem contribuir para seu surgimento (MARON, 2017).

Soares-Cunha e colaboradores (2018), utilizando de um método de estresse pré-natal imprevisível em ratas *Wistar* durante 4 horas por dia 3 vezes na semana durante toda a gestação, testou os filhotes machos e fêmeas com 2 meses de idade e observou que filhotes provindos de ratas estressadas apresentaram um comportamento do tipo-ansioso demonstrados pela diminuição do tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e no lado claro da caixa escura-clara e pelo aumento do tempo de imobilidade no teste de natação forçada, além de níveis altos de corticosterona plasmática.

Pesquisas realizadas por Barzegar, utilizando método de estresse sonoro, em que ratas prenhes foram submetidas ao estresse sonoro por 1, 2 ou 4 horas por dia durante toda a gestação, demonstraram que os filhotes apresentavam comportamento tipo ansioso e redução da memória espacial, analisados pelo

teste de labirinto em cruz elevado e labirinto aquático de Morris respectivamente e também apresentaram um nível aumentado de corticosterona plasmática, quando comparados com filhotes provindos de ratas não estressadas. Sendo assim, podemos observar uma correlação de comportamentos semelhantes à ansiedade e elevação nos níveis de corticosterona.

Além disso, existem estudos demonstrando a relação do aumento da expressão de GR no hipocampo de roedores logo após desmame (*early life*) e a vulnerabilidade em desenvolver comportamentos semelhantes à ansiedade (WEI et al., 2012).

3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, foram acumuladas diversas evidências experimentais e epidemiológicas que demonstram que o organismo do indivíduo adulto pode ser fortemente influenciado por experiências no início da vida. As origens do desenvolvimento de saúde e doença no adulto, afirmam que experiências adversas ao feto podem “programar” predisposições a distúrbios posteriores como doenças cardiovasculares, cognitivas, metabólicas e neurodegenerativas (HANSON, 2013).

A exposição ao estresse pré-natal pode promover alterações comportamentais e neuroendócrinas permanentes na prole. Porém, pouco é conhecido sobre a influência do TEPT durante a gestação sendo que o TEPT é uma desordem psiquiátrica considerada um distúrbio comum, crônico e incapacitante. Assim, nosso estudo tem por objetivo avaliar a influência do TEPT durante a gestação e suas consequências comportamentais na mãe e na prole.

4 OBJETIVOS

A seguir serão apresentados os objetivos gerais e específicos do presente trabalho:

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do TEPT durante a gestação sobre as respostas comportamentais e neuroendócrinas na mãe e na prole.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o desenvolvimento do TEPT nas mães através da avaliação do tempo de congelamento durante a reexposição ao aparato de choque inescapável e de avaliações comportamentais nos testes de campo aberto e de reconhecimento de objetos;
- b) Avaliar o ganho de peso gestacional e lactacional das ratas não choque e choque;
- c) Avaliar o comportamento materno das ratas lactantes não choque e choque;
- d) Avaliar a concentração plasmática de corticosterona das ratas dos grupos não choque e choque após a reexposição ao aparato de choque inescapável;
- e) Avaliar o ganho de peso da ninhada proveniente das ratas dos grupos não choque e choque durante o período de lactacional;
- f) Avaliar o número de vocalizações ultrassônicas e a performance comportamental no teste de comportamento de retorno a maravalha da mãe dos filhotes provindos de ratas dos grupos não choque e choque;
- g) Avaliar a performance comportamental nos testes de labirinto em cruz elevado, campo aberto, comportamento de brincar e placa de furos dos filhotes provindos de ratas dos grupos não choque e choque.
- h) Avaliar a expressão de GR no hipocampo dos filhotes provindos de ratas dos grupos não choque e choque.
- i) Avaliar a concentração plasmática de corticosterona dos filhotes provindos de ratas dos grupos não choque e choque e da nível basal e após desafio do teste de labirinto em cruz elevado

5 MATERIAIS E MÉTODOS

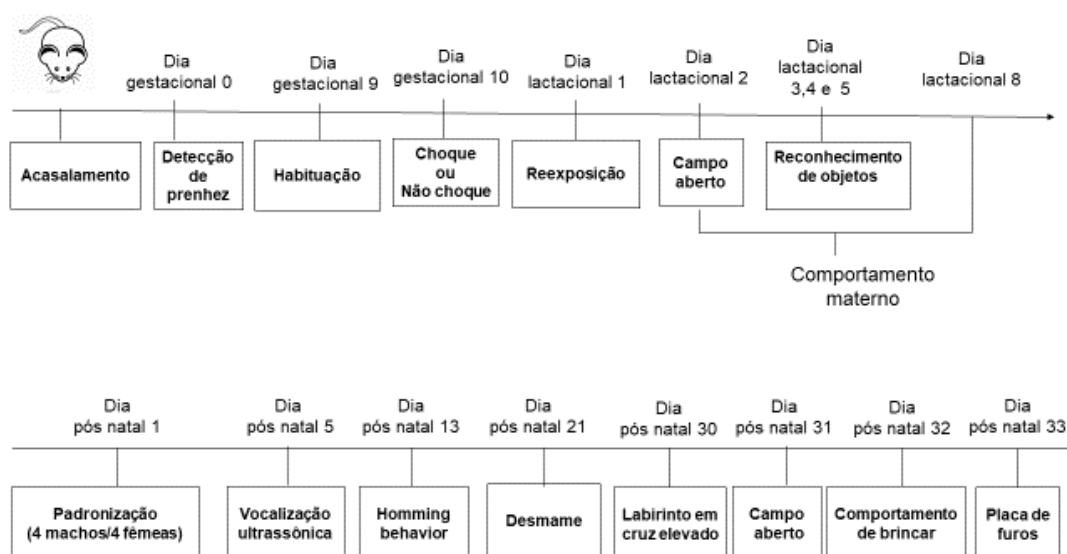
A seguir serão apresentados os materiais e métodos utilizados nesse trabalho.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas *Wistar* pesando de 150 a 200g, a partir de sete semanas de vida provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. As ratas foram alojadas no biotério do laboratório de Fisiologia na UNIFAL-MG, campus Alfenas em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção, tratadas com ração comercial e água “*ad libitum*” e mantidas em sala climatizada a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em ciclo 12 horas claro-escuro. Também foram utilizados ratos da mesma linhagem (pesando entre 250 a 300g) para o acasalamento. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da UNIFAL-MG (CEUA - protocolo nº 50/2018).

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 3- Representação esquemática do delineamento experimental do trabalho



Fonte: Da autora

5.3 ACASALAMENTO

Após o período de ambientação (7 dias), logo ao final do dia, as ratas foram transferidas para caixas com o rato sexualmente experiente na proporção de três fêmeas para um macho. No dia seguinte, no período da manhã (07h00min – 08h00min) a detecção da prenhez foi realizada após coleta e análise do lavado vaginal em microscópio óptico. A confirmação da presença de espermatozoides na fase estral no lavado vaginal foi designada como o dia 0 de gestação (DG0) e o dia do parto foi designado como o dia 0 de lactação (0 DL).

5.4 INDUÇÃO DO TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

Para indução do transtorno do estresse pós-traumático foi seguido o protocolo de Berardi et al., 2014. No dia gestacional 9 (DG), as ratas prenhes foram colocadas individualmente na caixa de choque por 10 minutos para habituação.

No dia seguinte (DG10), as ratas foram colocadas na caixa de choque novamente onde 10 delas receberam o choque e 10 não receberam choque. Os choques foram dados da seguinte maneira: nos primeiros 2 minutos os animais não receberam choque, assim como no último minuto. Durante os três minutos intermediários, os animais receberam 5 choques aleatórios inescapáveis de 0,8 mA e 2 segundos de duração. As ratas não expostas ao choque permaneceram pelo mesmo tempo na caixa. Ao final desse procedimento, todos os animais foram isolados em caixas individuais e foram reexpostos à caixa no dia pós-natal 1 (DPN 1) onde foi avaliado o comportamento de congelamento das ratas que receberam ou não o choque por 10 minutos.

5.5 PADRONIZAÇÃO DAS NINHADAS

O dia do nascimento dos filhotes foi considerado como DPN 0. No DPN1 as ninhadas foram padronizadas em oito filhotes, sendo quatro machos e quatro fêmeas para todos os procedimentos experimentais.

5.6 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DAS NINHADAS

O peso da ninhada foi registrado a cada 3 dias durante a lactação, do PND1 até o desmame (DPN22). Foram então 8 registros de peso da ninhada, sendo no 1º, 4º, 7º, 10º, 13º, 16º, 19º e 22º dia de lactação. Os pesos foram registrados sempre no período na manhã, (11h00min – 12h00min horas).

5.7 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DAS RATAS GESTANTES

O ganho de peso das ratas gestantes foi registrado a cada 3 dias durante a gestação, desde o DG 0 até o nascimento dos filhotes. Foram então 8 registros de peso da ninhada, sendo no 0, 3º, 6º, 9º, 12º, 15º, 18º e 21º dia de lactação. Os pesos foram registrados sempre no período na manhã, (11h00min – 12h00min horas).

5.8 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DAS RATAS LACTANTES

5.8.1 Comportamento materno

No 2º DL, o CM de cada rata tanto do grupo não choque e choque foi registrado diariamente do 2º até o 8º dia de lactação, período este em que há uma maior expressão do CM (GROTA; ADER, 1969), a análise foi realizada durante dois períodos: 2 sessões diárias de 90 minutos de observação cada, as quais ocorreram em dois horários: 7h30min – 09h00min e 15h30min – 17h00min. Cada observação de comportamento ratas foram registrado a cada 3 minutos, contabilizando um total de 31 observações por período x 2 períodos por dia = 62 observações/rata/dia) (adaptado de Vilela; Giusti-Paiva, 2014).

Os parâmetros comportamentais registrados são divididos em maternos e não maternos.

Parâmetros maternos

- a) Porcentagem em que a rata fica sobre a ninhada em posição de amamentação (posição arqueada ou cifose);

- b) Porcentagem em que a rata fica sobre a ninhada sem estar em posição arqueada (sobre os filhotes);
- c) Porcentagem que a rata fica em posição passiva (de barriga para cima) para a amamentação dos filhotes;
- d) Porcentagem de lambidas nos filhotes;
- e) Porcentagem de construções do ninho;
- f) Porcentagem em que a rata estimulou os mamilos para a amamentação

Parâmetros não maternos:

- a) Porcentagem em que a rata está fora do ninho e se alimentando sem os filhotes;
- b) Porcentagem em que a rata permanece sem os filhotes explorando o ambiente
- c) Porcentagem em que a rata permanece sem os filhotes e não explorando o ambiente

5.8.2 Teste de Campo aberto

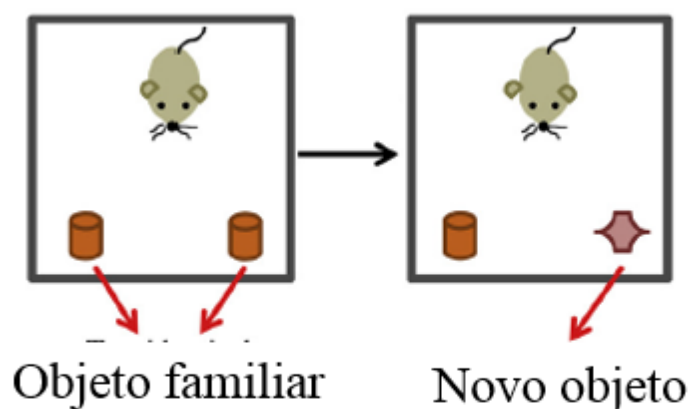
O campo aberto (*open field*), é um modelo utilizado para análise da atividade locomotora do animal, pois permite quantificar a atividade locomotora espontânea. O aparato de campo aberto consiste em uma arena quadrada de acrílico, com diâmetro de 60 cm e paredes com 60 cm de altura, com o piso preto. Os ratos foram colocados no centro da arena e a sua atividade de locomoção foi observada. Foram avaliados a distância percorrida e o tempo de imobilidade durante a filmagem de dez minutos (Valle, 1970) para análises comportamentais subsequentes usando o programa *EThoVision XT 9.0*, um sistema de observação computadorizado que é capaz de realizar rastreamento, análise e reconhecimento comportamental por meios de vídeos (Noldus; Spink; Tegelenbosch, 2001). Após cada teste, o campo aberto foi limpo com álcool 5%.

5.8.3 Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos (RO), avalia a habilidade do roedor em reconhecer um objeto previamente explorado na presença de um

novo objeto não conhecido (Reger; Hovda; Giza, 2009). Dois dias antes do teste, os animais foram expostos a caixa teste (10 minutos) para a habituação para garantir que os animais passem quantidade suficiente de tempo explorando os objetos e não o ambiente (Andersen et al., 2004). O teste foi realizado em uma arena quadrada (60 cm x 60 cm) um dia após o teste de campo aberto. No dia do teste os animais foram apresentados a 2 objetos idênticos (A e B) durante 10 minutos (treinamento), 2 horas após, um dos objetos de treinamento A ou B (objeto familiar) foi substituído por um novo objeto C (objeto novo). Todos os objetos apresentaram texturas e tamanhos semelhantes, mas formas distintas. As ratas foram colocadas individualmente na arena e seu comportamento foi filmado por 10 minutos para análise subsequente. A exploração foi definida da seguinte forma: quando o animal cheirou ou tocou o objeto com o nariz. O tempo gasto pelo animal explorando os dois objetos (objeto familiar ou novo) foi tomado como uma medida de exploração de objetos. Um índice de reconhecimento (RI) foi calculado para cada animal e foi expresso pela razão: $IR = TN / (TF + TN)$, TF = tempo gasto explorando o objeto familiar (objeto A ou B); TN = tempo gasto explorando o novo objeto (objeto C) (Rech et al., 2010; Andersen et al., 2004; Melancia, et al., 2017). Entre os testes, os objetos e a arena foram devidamente limpos com álcool 5%.

Figura 4: Teste de reconhecimento de objetos.



Fonte: Adaptado de MELANCIA, F.; TREZZA, V, 2018

5.9 AVALIAÇÃO DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS E DA PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES

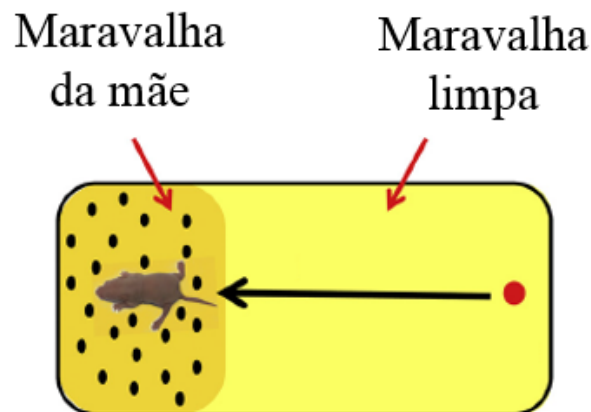
5.9.1 Vocalizações ultrassônicas (VUS)

No DPN 5, um filhote (macho e fêmea) de cada rata lactante foi avaliado para o monitoramento da VUS. Cada filhote foi separado de sua ninhada e colocado em uma caixa com temperatura controlada (30°C) por 10 minutos. Após o isolamento, o filhote foi colocado em um recipiente de acrílico raso situado em uma câmara à prova de som posicionado na câmara abaixo de um microfone conectado a um sistema de aquisição computadorizado (ML 221 *PowerLab*, *ADInstruments*, Bella Vista, NSW, Austrália) para detectar as VUS a 40-100 kHz. Os sons foram registrados por 4 minutos e o número total de VUS foram analisados posteriormente (Batista et al., 2016). A câmara à prova de som e o recipiente de acrílico foram limpos com uma solução de 5% de álcool após cada teste.

5.9.2 Teste de comportamento de retorno a maravalha da mãe

No DPN 13, um filhote macho e fêmea de cada rata lactante foi separado de sua mãe e mantidos durante 30 minutos em uma sala com temperatura controlada. Após esse tempo, cada filhote foi colocado em uma caixa cujo fundo foi coberto por 1/4 com maravalha da mãe e por 3/4 de maravalha limpa. Os filhotes foram posicionados no lado da caixa que estava coberta por maravalha limpa e seu comportamento foi analisado por 4 minutos em tempo real. Os seguintes parâmetros foram registados: latência em segundos para atingir a área com maravalha da mãe, tempo total em segundos gastos pelo filhote na área de maravalha da mãe e número total de entradas e saídas na área de maravalha da mãe (Melancia et al., 2017).

Figura 5- Representação do teste de retorno a maravalha da mãe.

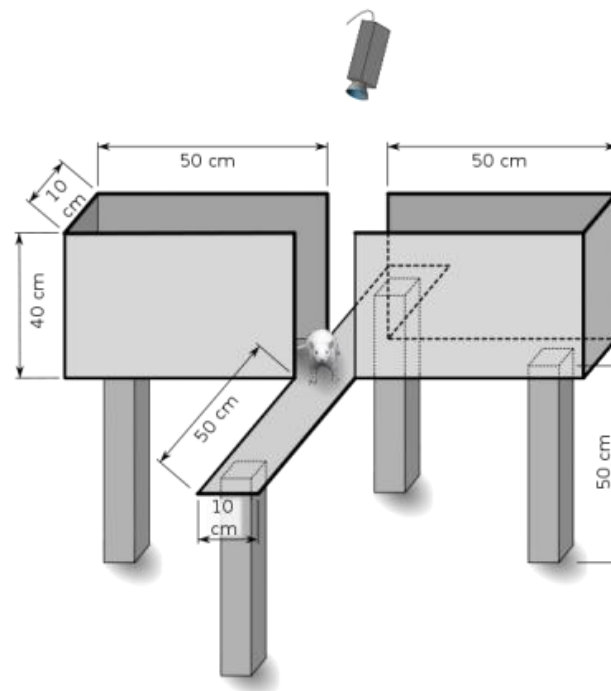


Fonte: Adaptado de MELANCIA, F.; TREZZA, V, 2018.

5.9.3 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado é um aparato com dois braços abertos e dois braços fechados, ligados por uma plataforma central. Os animais serão colocados no centro do aparato, de frente para um dos braços fechados. O comportamento do animal será filmado durante 5 minutos sendo avaliado a frequência de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados. Após o experimento com cada animal, o aparato será limpo com álcool 5% (BISON et al., 2009).

Figura 6- Aparato de labirinto em cruz elevad



Fonte: Insight,2019

5.9.4 Teste de campo aberto

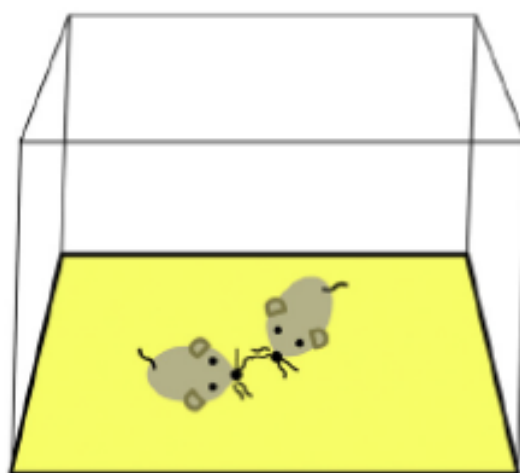
O teste de Campo aberto foi realizado seguindo o mesmo protocolo experimental já descrito para as mães, (item 4.7.2), porém os filhotes foram avaliados entre o DPN 30-32.

5.9.5 Teste de comportamento de brincar

O teste do comportamento de brincar foi realizado em uma caixa quadrada de acrílico (60 cm x 60 cm x 60 cm). Os ratos foram individualmente habituados à caixa de teste durante 10 minutos por 3 dias antes do experimento. No dia do teste (DPN 30-32), os animais foram isolados por 3h30min antes do teste para aumentar sua motivação social e assim facilitar a expressão do comportamento juvenil de brincadeira (Trezza; Vanderschuren; 2008; Trezza; Baarendse; Vanderschuren, 2009). O teste consiste em colocar dois animais pertencentes ao mesmo grupo experimental na arena de teste durante 10 minutos e as

interações do comportamento juvenil de brincadeira foram registradas para posterior análise. Os parâmetros analisados foram: (1) tempo em segundos gastos em exploração social - cheirando qualquer parte do corpo do parceiro de teste, incluindo a área anogenital; (2) tempo em segundos de *following* - avançando na direção ou seguindo o outro animal, que se afasta, e o tempo total de comportamento de brincar se dará com a soma de ambos. Com o objetivo de reduzir as interferências nas respostas comportamentais, os animais em pares não diferem de mais de 10 g no peso corporal e não apresentarão experiência social anterior (Melancia et al., 2017).

Figura 7: Representação do teste de comportamento de brincar

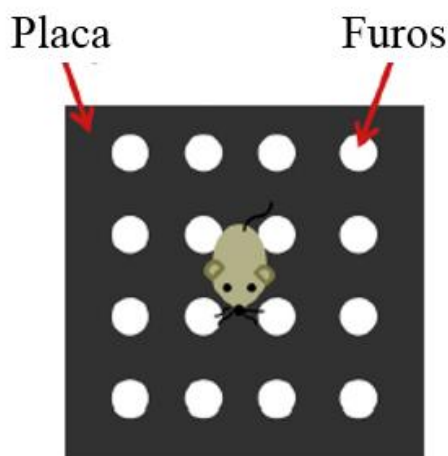


Fonte: Adaptado de MELANCIA, F.; TREZZA, V, 2017

5.9.6 Teste com placas de furos

O teste com placas de furos consiste em um aparato de arena quadrada com fundo preto e 16 furos com três cm de diâmetro cada. No DPN 30-32, os ratos foram colocados no aparato e seu comportamento foi filmado por 5 minutos para análise comportamental. O parâmetro medido através da filmagem foi o número de imersões com a cabeça em cada furo nos orifícios da placa (Servadio et al., 2016). Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 5 %.

Figura 8: Representação do teste de placa com furos.



Fonte: Adaptado de MELANCIA, F.; TREZZA, V, 2018.

5.9.7 Avaliação da expressão do receptor de glicocorticoide por *Western Blotting*

Alguns animais, após o teste de labirinto em cruz elevado, foram utilizados para a análise da expressão de *GR* por *Western Blotting*. Para isso, após o teste de labirinto em cruz elevado, os animais foram mortos por decaptação e imediatamente depois o hipocampo foi dissecado e armazenado em -80°C até o momento da realização do teste de Bradford. Para a realização do teste de Bradford as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise com um coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Em seguida as amostras foram centrifugadas (9200 rpm, 15 minutos, 4°C) e a concentração de proteínas no sobrenadante foi quantificada pelo teste de Bradford.

As amostras contendo o tampão de lise juntamente com *Laemmli* foram fervidas (100°C) submetidas a análise de *Western blotting*. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE a 10% (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio) e em seguida transferidas para membranas de nitrocelulose em um sistema eletroforético semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA).

A membrana foi lavada 3 vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20, bloqueada com 5% de leite desnatado e 0,5% de albumina em TTBS durante 3 h à temperatura ambiente e depois incubadas *overnight*, a 4°C com um

anticorpo anti-Gr (1:1000, Santa Cruz-sc 1004). No dia seguinte, após 3 lavagens em PBS contendo 0,05% de Tween 20, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com anticorpo secundário específico anti-rabbit (1:4000, Abcam-ab). Após o período de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05% e depois aplicou-se um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de detecção ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA).

Posteriormente as membranas passaram pelo processo de *stripping* seguido do bloqueio em 5% de leite desnatado em PBS durante 2 h. Após o bloqueio as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, seguida da incubação *overnight*, a 4 ° C com anticorpo anti-actina (1:5000, sigma aldrich 4700). No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, e as membranas foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário anti-mouse (1:2000, Abcam-ab 6789).

Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, em seguida aplicou-se um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de deteco ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA) e as intensidades de banda foram quantificadas utilizando um software específico da Bio-Rad.

A intensidade de cada banda foi expressa em relação à da β -actina e os dados foram expressos normalizados para o controle.

Figura 9- Equipamentos usados na técnica de *Western Blotting*

Fonte: BIO RAD,2019.

5.9.8 Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona

Para a coleta de sangue foram utilizados os mesmos animais que passaram pelo teste de reexposição ao aparato de choque e labirinto em cruz elevado e animais a nível basal, onde não foi realizado nenhum teste, assim, imediatamente após os testes, os animais provenientes de mães do grupo choque e do grupo não choque foram cuidadosamente transferidos para outra sala onde foram decaptados e o sangue foi coletado do tronco (5 mL), em tubos plásticos heparinizados, mantidos sob o gelo. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4°C, 15 min.) e as alíquotas mantidas a -20°C até o momento da dosagem hormonal.

Antes da dosagem hormonal, as amostras foram liofilizadas. Para isto, as amostras descongeladas, agitadas uma por vez por 30 segundos, em seguida 25 µl do plasma foi adicionado em um tubo de vidro contendo 1 ml de etanol seguido novamente de agitação de uma amostra por vez por 15 segundos. Em seguida as amostras foram mantidas em freezer a (-20°C, por 30 minutos) e posteriormente foram submetidas a centrifugação (4000 rpm, 4°C por 20 minutos). O sobrenadante foi vertido em outro tubo devidamente identificado e submetido a liofilização (*Labconco, Centrizap*). A dosagem de corticosterona foi realizada utilizando-se a técnica de radioimunoensaio, que foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

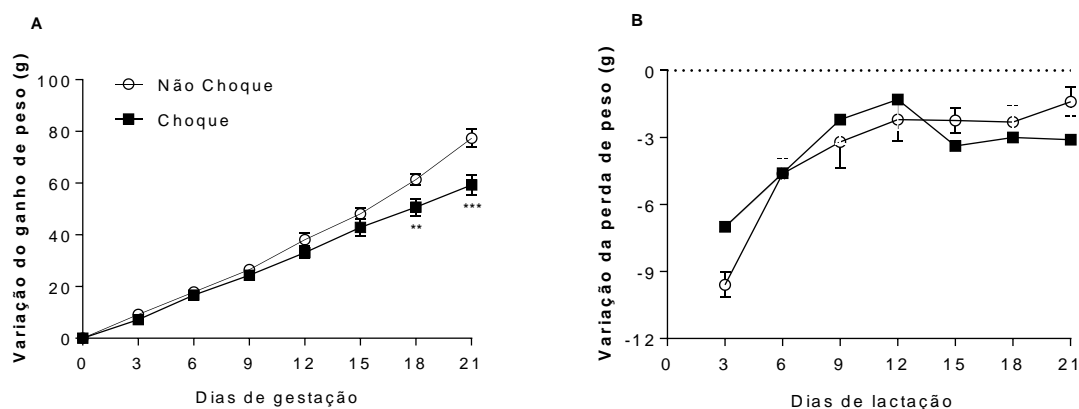
Os resultados obtidos foram analisados utilizando um software GraphPad versão 7.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação de dois grupos foi aplicado o teste “t” de *Student*. Para comparação de dois fatores foi utilizado a análise de variância (ANOVA *two-way*) seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Foram considerados estatisticamente diferentes grupos analisados em que $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO GANHO DE PESO DAS RATAS GESTANTES E LACTANTES

De acordo com a figura 10, gráfico A, observa-se que houve uma redução na variação do ganho de peso nos 18º DG ($p < 0,01$) e 21º DG ($p < 0,001$) das ratas do grupo choque quando comparadas as ratas do grupo não choque. (Fator tratamento: $F_{1,144} = 26,08$ e $p < 0,001$, fator dias de gestação: $F_{7,144} = 239,60$ e $p < 0,006$, interação entre os dois fatores: $F_{7,144} = 3,92$ e $p = 0,001$). No gráfico B observamos que não houve diferença entre os grupos estudados na variação da perda de peso (g).

Figura 10 – Gráfico A: Variação do ganho de peso (g) das ratas do grupo não choque do grupo choque



Fonte: Da autora.

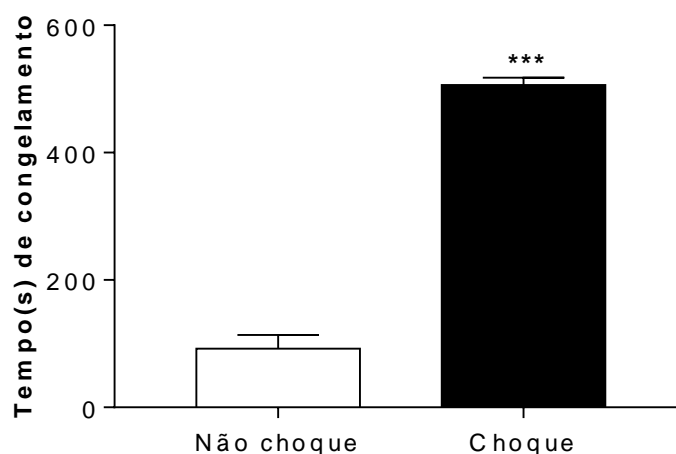
Nota: Gráfico A: Variação do ganho de peso (g) das ratas do grupo não choque (n=10) e ratas do grupo choque (n=10) e gráfico B: Variação da perda de peso (g) das ratas do grupo não choque (n=10) e ratas do grupo choque (n=10)

Valores expressos como média \pm EPM ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparada as ratas do grupo não choque (ANOVA Two-way, seguido pelo pós-teste Bonferroni).

7.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO DAS RATAS LACTANTES

Na figura 11 observa-se que houve um aumento no tempo de congelamento das ratas lactantes do grupo choque (***) $p < 0,001$ quando comparadas as ratas lactantes do grupo não choque.

Figura 11 – Tempo de congelamento das ratas



Fonte: Da autora.

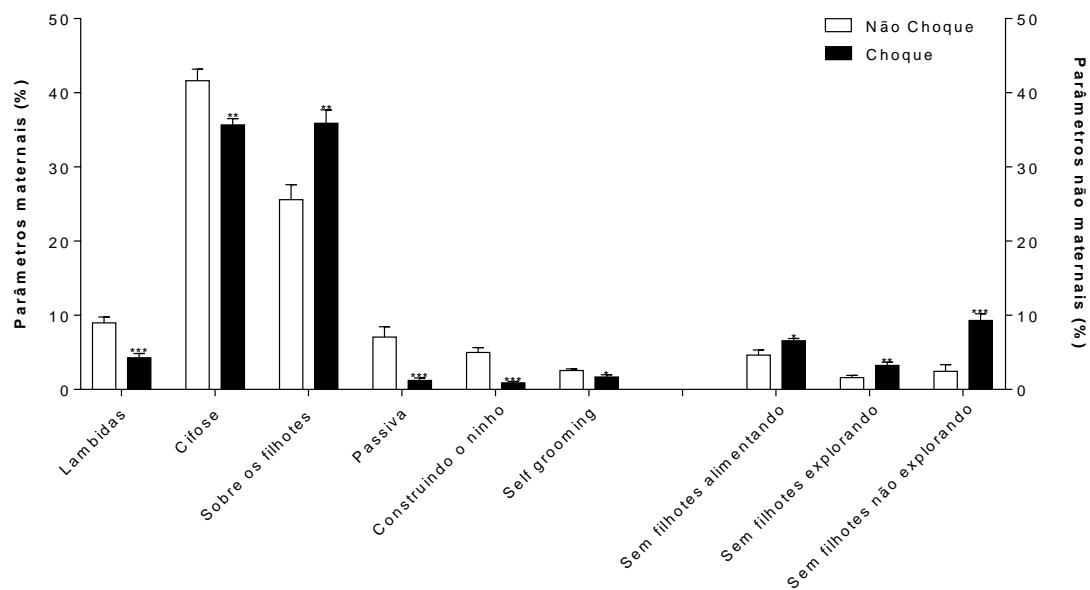
Nota: Tempo de congelamento das ratas lactantes do grupo não choque (n=10) e das ratas lactantes do grupo choque (n=10). Valores expressos como média \pm EPM *** $p < 0,001$ quando comparadas as ratas lactantes do grupo não choque (Teste *t d student*).

7.3 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DAS RATAS LACTANTES

7.3.1 Avaliação do comportamento materno

Na figura 12 observa-se que ocorreu uma redução na porcentagem do número de lambidas ($p < 0,001$), da cifose ($p < 0,01$), posição passiva ($p < 0,001$), porcentagem da construção do ninho ($p < 0,001$), do *self grooming* ($p < 0,05$) e um aumento da porcentagem sob os filhotes ($p < 0,01$), de exploração sem os filhotes ($p < 0,01$), porcentagem de sem os filhotes se alimentando ($p < 0,05$) e sem filhotes não explorando ($p < 0,001$) das ratas lactantes do grupo choque quando comparadas com as ratas lactantes do grupo não choque.

Figura 12– Avaliação da porcentagem do comportamento materno



Fonte: Da autora.

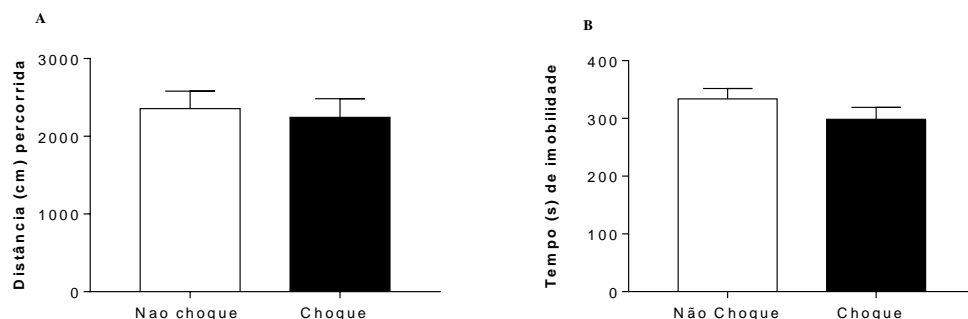
Nota: Avaliação da porcentagem do comportamento materno de lambida, cifose, sobre os filhotes, passiva, construção do ninho e *self-grooming* e do comportamento não materno de alimentação, exploração e não exploração das ratas lactantes do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10).

Valores expressos como média \pm SEM *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 quando comparadas as ratas lactantes do grupo não choque. (Teste *T de student*).

7.3.2 Avaliação do teste de campo aberto

Na figura 12 observa-se que não houve diferença entre os grupos estudados na distância percorrida (cm) e no tempo (s) de imobilidade.

Figura 13- Teste de campo aberto.



Fonte: Da autora.

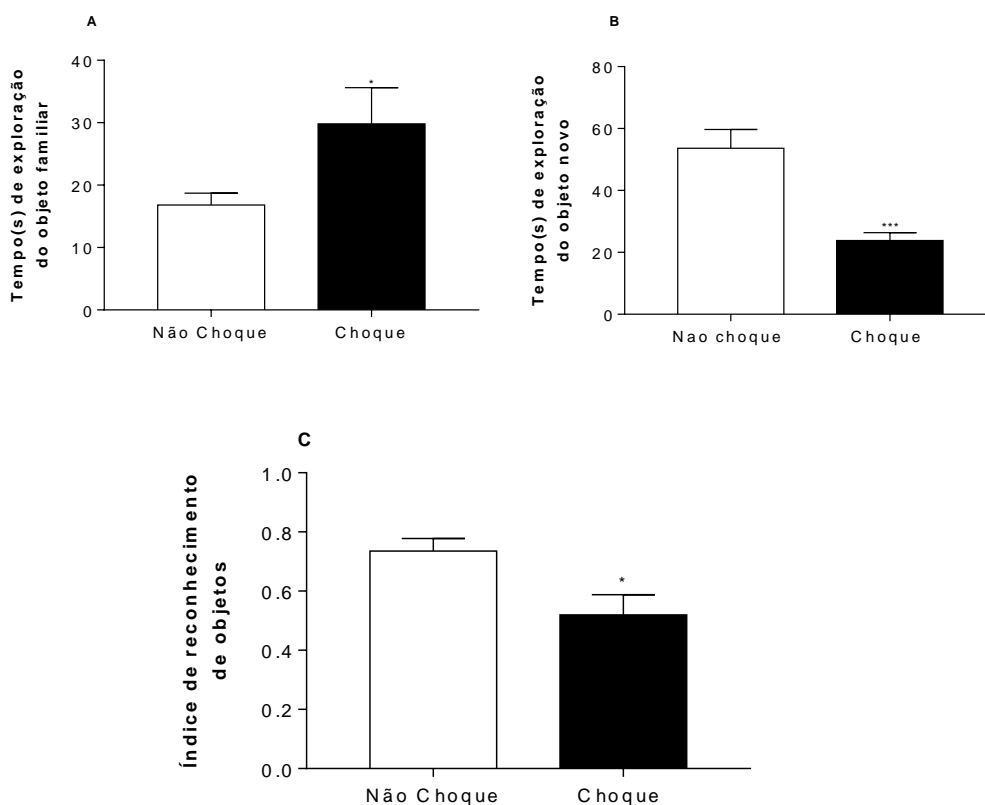
Nota: Gráfico A: distância percorrida (cm) e gráfico B: tempo de imobilidade (s) das ratas lactantes do grupo não choque (n =10) e do grupo choque (n=10). Valores expressos como média \pm EPM (*Teste t de student*)

7.3.3 Avaliação do teste de reconhecimento de objetos de memória a curto prazo (2 horas)

A figura 14 mostra a avaliação do teste de RO de memória a curto prazo (2 horas) de ratas lactantes do grupo não choque e do grupo choque.

No gráfico A observa-se um aumento no tempo (s) de exploração do objeto familiar ($p < 0,05$), no gráfico B observa-se uma redução no tempo (s) de exploração do objeto novo ($p < 0,001$) e no gráfico C uma redução do índice de RO ($p < 0,05$) das ratas lactantes do grupo choque quando comparadas com as ratas lactantes do grupo não choque

Figura 14- Teste de reconhecimento de objetos a curto prazo.



Fonte: Da autora.

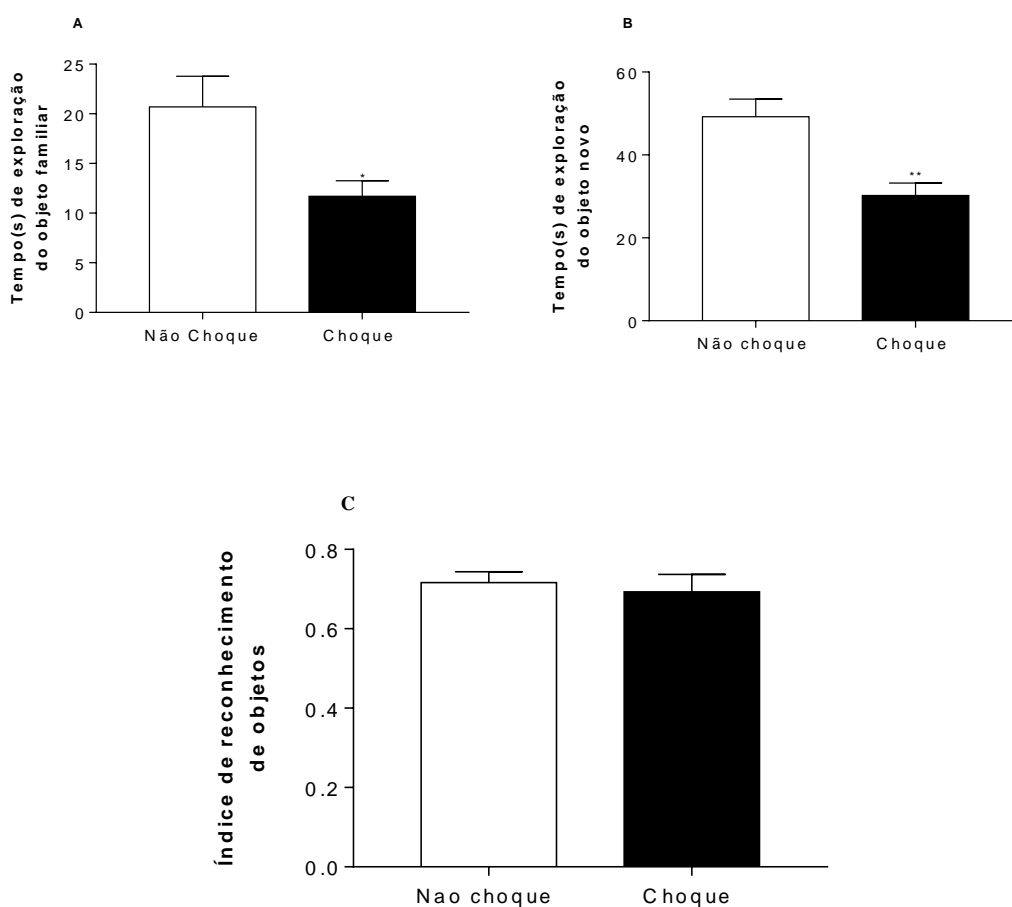
Nota: Gráfico A: Tempo de exploração do objeto familiar, gráfico B: tempo de exploração do objeto novo e gráfico C: índice de reconhecimento de objetos das ratas lactantes do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10).

Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$. e *** $p < 0,001$ quando Comparada as ratas do grupo não choque (*Teste t de student*).

A figura 15 mostra a avaliação do teste de RO de memória a longo prazo (24 horas) das ratas lactantes do grupo não choque e do grupo choque.

No gráfico A observa-se uma redução no tempo (s) de exploração do objeto familiar ($p < 0,05$), no gráfico B observa-se uma redução no tempo (s) de exploração do objeto novo ($p < 0,01$) e no gráfico C não houve alterações entre os grupos de ratas lactantes do grupo choque quando comparadas com as ratas lactantes do grupo não choque

Figura 15- Teste de reconhecimento de objetos a longo prazo.



Fonte: Da autora.

Nota: Gráfico A: Tempo de exploração do objeto familiar, gráfico B: tempo de exploração do objeto novo e gráfico C: índice de reconhecimento de objetos das ratas lactantes do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10).

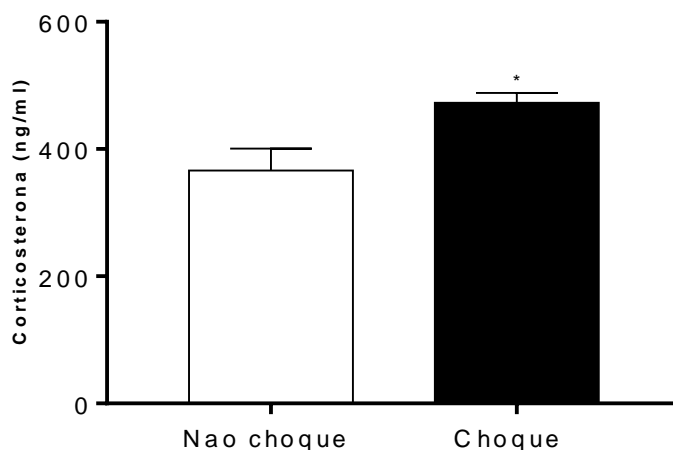
Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparada as ratas do grupo não choque (*Teste t de student*).

7.3.4 Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona em ratas após a exposição ao choque e após a reexposição ao aparato de choque inescapável

A figura 16 mostra a dosagem dos níveis de corticosterona plasmática (ng/ml) das ratas gestantes do grupo não choque e do grupo choque após a exposição ao aparato de choque inescapável.

No gráfico, observa-se um aumento dos níveis de corticosterona ($p < 0,05$) das ratas gestantes do grupo choque quando comparadas com as ratas gestantes do grupo não choque.

Figura 16- Dosagem de corticosterona plasmática



Fonte: Da autora.

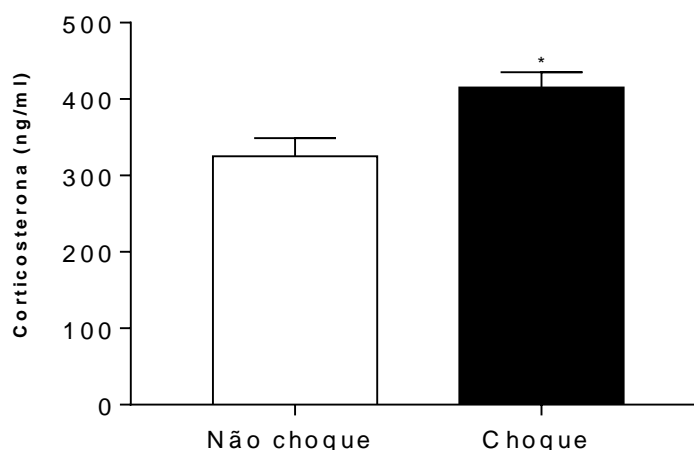
Nota: Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona (ng/ml) das ratas gestantes do grupo não choque (n=7) e do grupo choque (n=7).

Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado as ratas do grupo não choque (*Teste t de student*).

A figura 17 mostra a dosagem dos níveis de corticosterona plasmática (ng/ml) das ratas lactantes do grupo não choque e do grupo choque após a reexposição ao aparato de choque inescapável.

No gráfico, observa-se um aumento dos níveis de corticosterona ($p < 0,5$) das ratas lactantes do grupo choque quando comparadas com as ratas lactantes do grupo não choque.

Figura 17- Dosagem de corticosterona plasmática



Fonte: Da autora.

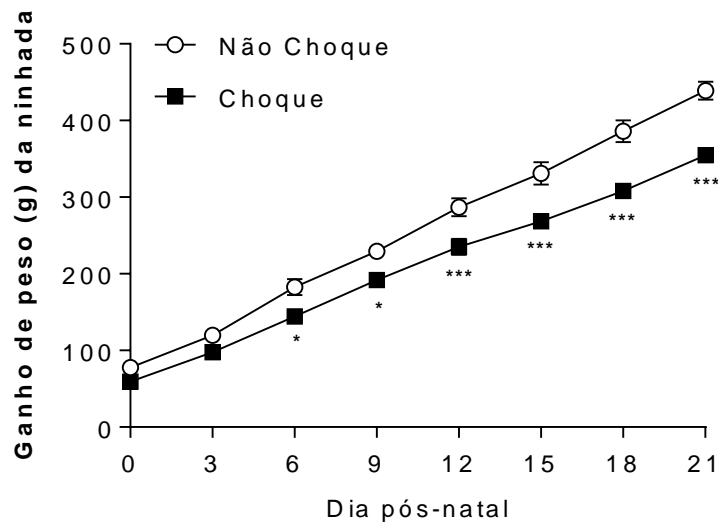
Nota: Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona (ng/ml) das ratas lactantes do grupo não choque (n=7) e do grupo choque (n=7).

Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado as ratas do grupo não choque (*Teste t de student*).

7.4 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO DAS NINHADAS

A análise através de *two-way* ANOVA mostrou que houve efeito no fator tratamento (FT: $F_{1,162} = 118,5$ e $p < 0,0001$), no fator dias pós-natal (FDPN: $F_{8,162} = 488,6$ e $p < 0,001$) e na interação entre os dois fatores (FT x FDPN: $F_{8,162} = 5,453$ e $p < 0,001$) quando analisado o ganho de peso (g) das ninhadas. A análise do pós-teste *Bonferroni* demonstrou que houve uma redução do ganho de peso das ninhadas no 6º DPN ($p < 0,05$), no 9º DPN ($p < 0,05$), 12º DPN ($p < 0,001$), 15º DPN ($p < 0,001$), 18º DPN ($p < 0,001$) e 21º DPN ($p < 0,001$) provenientes de ratas do grupo choque quando comparadas com as ninhadas de ratas do grupo não choque.

Figura 18: Ganho de peso da ninhada.



Fonte: Da autora.

Nota: Ganho de peso (g) da ninhada provenientes de ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10).

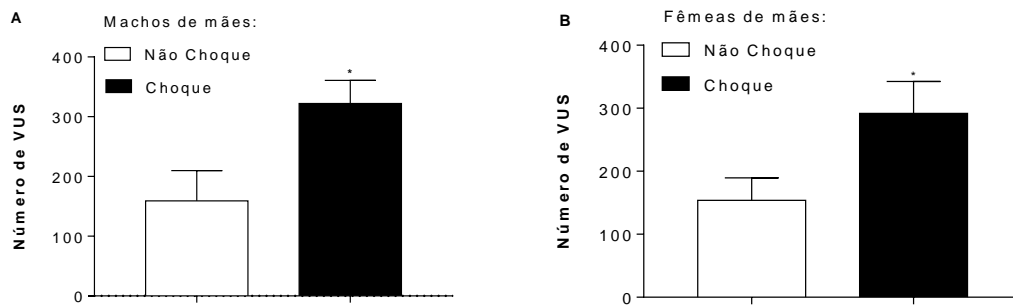
Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparadas com as ninhadas providas de ratas do grupo não choque (ANOVA *Two-way*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni*).

7.5 AVALIAÇÃO DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS E DA PERFORMANCE COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES

7.5.1 Vocalização Ultra-Sônica (VUS)

Na figura 19, gráfico A observa-se um aumento no número de vocalizações ultrassônicas de filhotes machos ($p < 0,05$) e no gráfico B um aumento no número de vocalizações ultrassônicas de filhotes fêmeas ($p < 0,05$) provenientes de ratas do grupo choque quando comparadas com filhotes provenientes de ratas do grupo não choque.

Figura 19- Numero de vocalizações ultrassônicas



Fonte: Da autora.

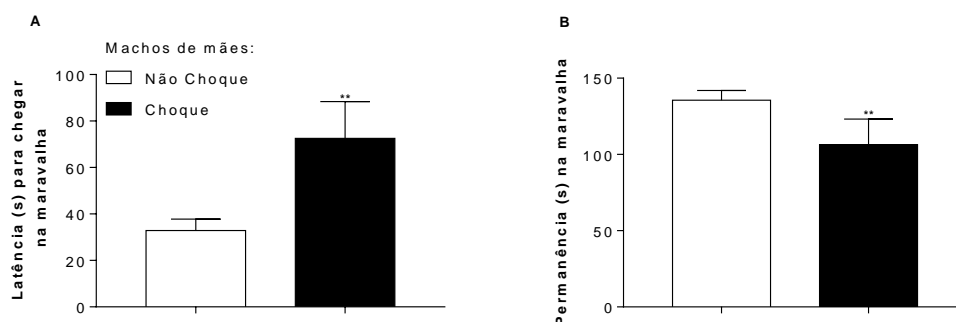
Nota: Gráfico A: Número de vocalizações ultrassônicas dos filhotes machos provenientes das ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10) e gráfico B: número de vocalizações ultrassônicas dos filhotes fêmeas provenientes das ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10).

Valores expressos como média * $p < 0.05$ ±EPM (Teste *t* de student)

7.5.2 Teste de comportamento de retorno a maravalha da mãe

Na figura 20, gráfico A, observa-se que houve um aumento na latência (s) para chegar a maravalha da mãe ($p < 0,01$) e no gráfico B observa-se uma redução no tempo (s) de permanência na maravalha da mãe ($p < 0,01$) dos filhotes machos provenientes de ratas do grupo choque quando comparado a filhotes machos provenientes do grupo não choque.

Figura 20- Teste de retorno a maravalha da mãe.



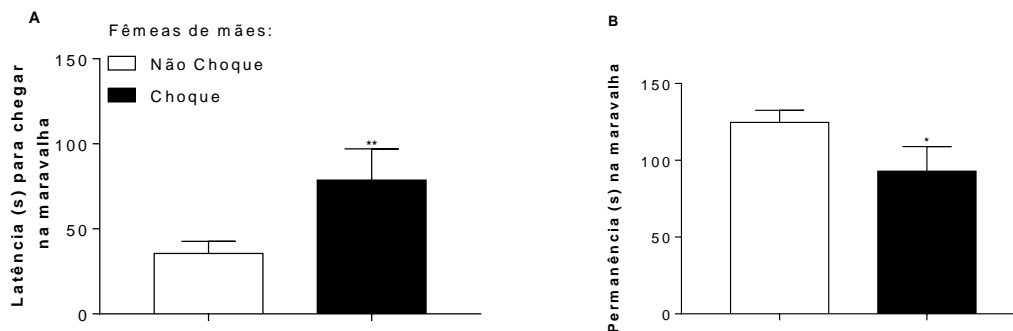
Fonte: Da autora.

Nota: Gráfico A: latência (s) dos filhotes para chegar a maravalha da mãe, gráfico B: tempo(s) de permanência dos filhotes machos na maravalha da mãe de ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque(n=10) .

Valores expressos como média ± EPM. (Teste *t* de student). ** $p < 0,01$ quando comparado com os filhotes machos provenientes de ratas do grupo não choque.

Na figura 21, gráfico A, observa-se que houve um aumento na latência (s) para chegar a maravalha da mãe ($p < 0,01$) e no gráfico B observa-se uma redução no tempo (s) de permanência na maravalha da mãe ($p < 0,05$) dos filhotes fêmeas provenientes de ratas do grupo choque quando comparado a filhotes fêmeas provenientes do grupo não choque.

Figura 21- Teste de retorno a maravalha da mãe.



Fonte: Da autora.

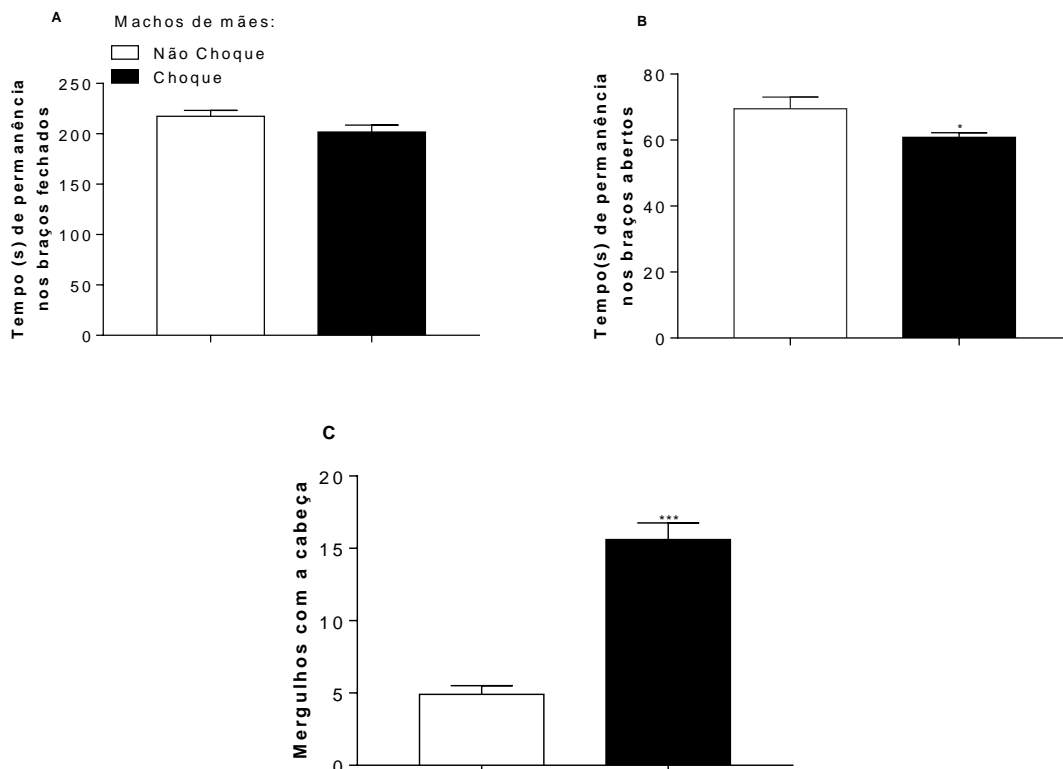
Nota: Gráfico A: latência (s) dos filhotes para chegar a maravalha da mãe, gráfico B: tempo (s) de permanência dos filhotes na maravalha da mãe de filhotes fêmeas de ratas do grupo não choque ($n=10$) e do grupo choque ($n=10$).

Valores expressos como média \pm EPM. (Teste *t* de student). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com filhotes fêmeas provenientes de ratas do grupo não choque.

7.5.3 Avaliação do teste de labirinto em cruz elevado

Na figura 22, gráfico A, observa-se que não houve diferenças entre os grupos estudados quando analisado o tempo (s) de permanência nos braços fechados, no gráfico B observa-se uma redução no tempo (s) de permanência nos braços abertos ($p < 0,05$) e no gráfico C observa-se um aumento no número de mergulhos com a cabeça (** $p < 0,001$) dos filhotes machos provenientes de ratas do grupo choque quando comparado a filhotes machos provenientes do grupo não choque.

Figura 22- Teste de labirinto em cruz elevado

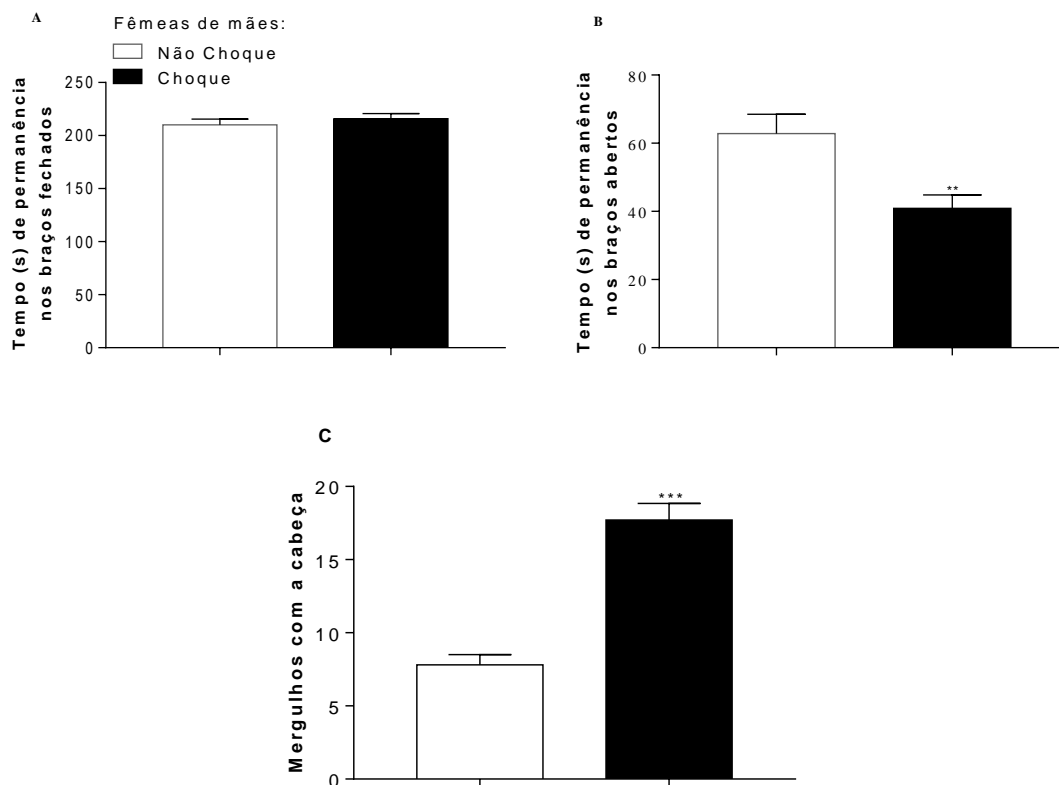


Fonte: Da autora.

Nota: Gráfico A: Tempo (s) de permanência nos braços fechados e gráfico B: tempo (s) de permanência nos braços abertos de filhotes machos de ratas do grupo não choque. Valores expressos como média \pm EPM. (*Teste t de student*). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$) quando comparado com os filhotes machos provenientes de ratas do grupo não choque.

Na figura 23, gráfico A, observa-se que não houve diferenças entre os grupos estudados quando analisado o tempo (s) de permanência nos braços fechados, no gráfico B observa-se uma redução no tempo (s) de permanência nos braços abertos ($p < 0,01$) e no gráfico C observa-se que houve um aumento no número de mergulhos com a cabeça ($p < 0,001$) dos filhotes fêmeas provenientes de ratas do grupo choque quando comparado a filhotes fêmeas provenientes do grupo não choque.

Figura 23- Teste de labirinto em cruz elevado



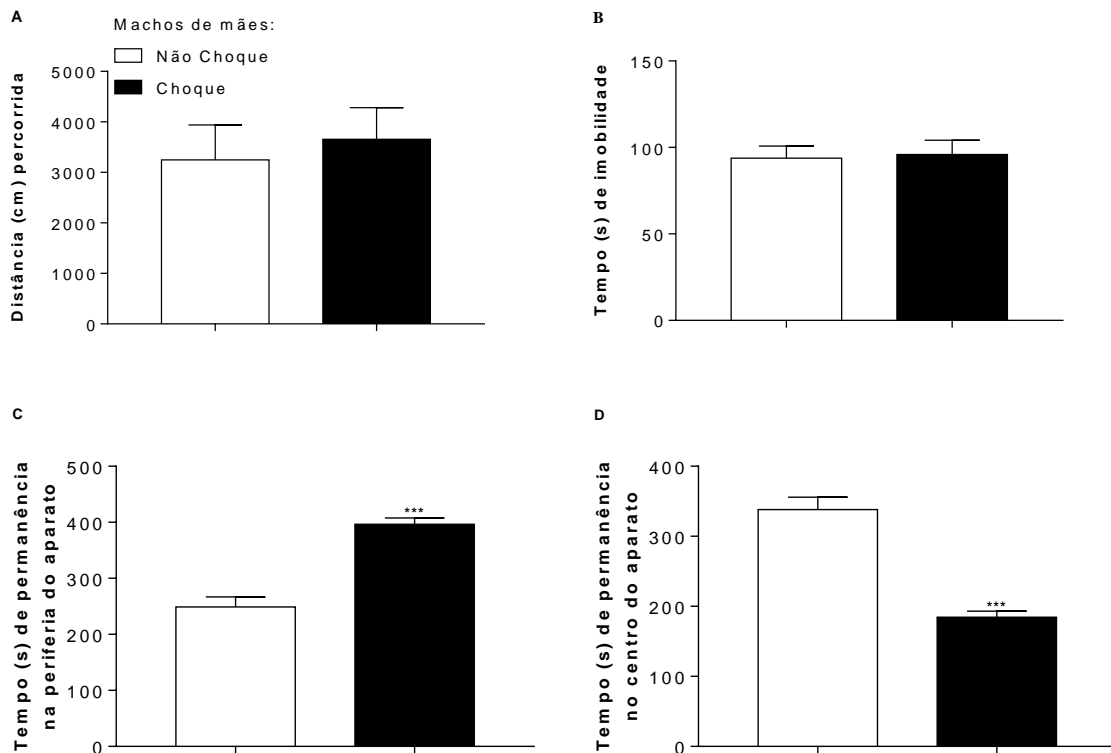
Fonte: Da autora.

Nota: Gráfico A: Tempo (s) de permanência nos braços fechados, gráfico B: tempo (s) de permanência nos braços abertos e gráfico C: mergulhos com a cabeça de filhotes fêmeas de ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10). Valores expressos como média \pm EPM. (Teste *t* de *student*). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com os filhotes fêmeas provenientes de ratas do grupo não choque.

7.5.4 Avaliação do teste de campo aberto

Na figura 24 observa-se que não houve diferenças entre os grupos estudados na distância percorrida (cm) no gráfico A e no tempo (s) de imobilidade no gráfico B, já no gráfico C houve um aumento no tempo (s) de permanência na periferia do aparato e no gráfico D houve uma redução do tempo (s) de permanência no centro do aparato quando comparado filhotes machos provenientes de ratas do grupo choque com os filhotes de ratas do grupo não choque.

Figura 24: Teste de campo aberto.



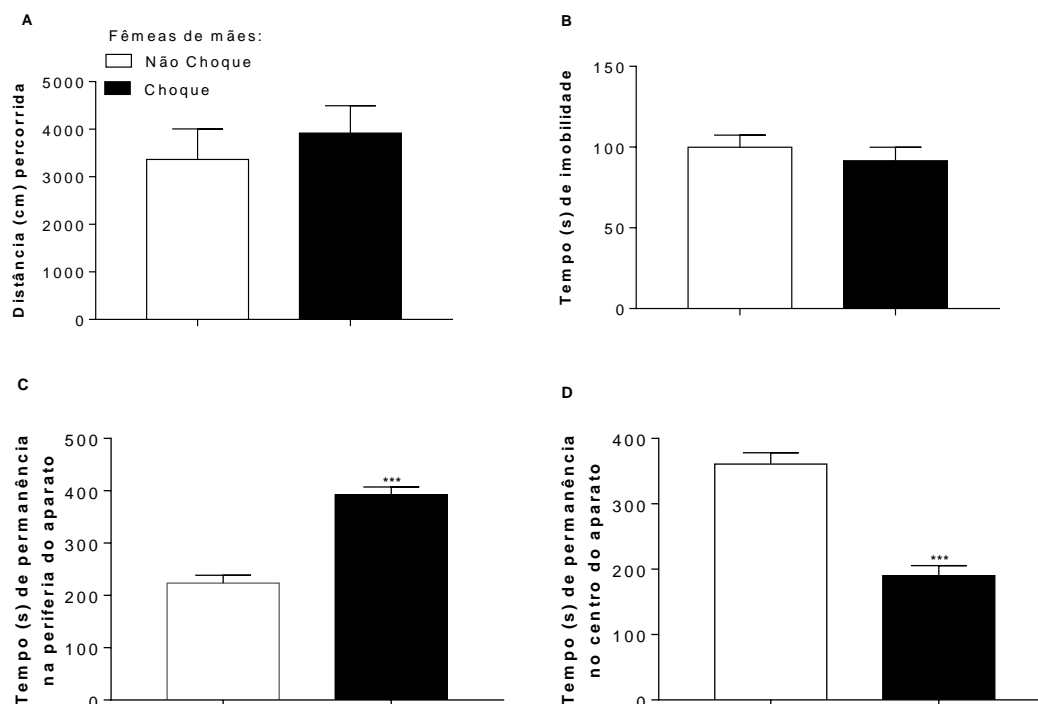
Fonte: Da autora

Nota: Gráfico A: distância percorrida (cm), gráfico B: tempo de imobilidade (s), gráfico C: tempo (s) de permanência na periferia do aparato e gráfico D: tempo (s) de permanência no centro do aparato dos filhotes machos provenientes das ratas lactantes do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10).

Valores expressos como média ± EPM (*Teste t de student*)

Na figura 25 observa-se que não houve diferenças entre os grupos estudados na distância percorrida (cm) no gráfico A e no tempo (s) de imobilidade no gráfico B, já no gráfico C houve um aumento no tempo (s) de permanência na periferia do aparato e no gráfico D houve uma redução do tempo (s) de permanência no centro do aparato quando comparado filhotes fêmeas provenientes de ratas do grupo choque quando comparadas com os filhotes de ratas do grupo não choque.

Figura 25- Teste de campo aberto.



Fonte: Da autora

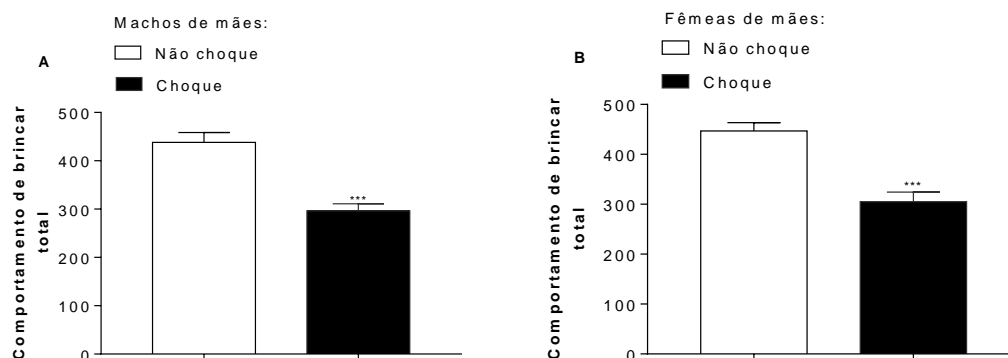
Nota: Gráfico A: distância percorrida (cm), gráfico B: tempo de imobilidade (s), gráfico C: tempo (s) de permanência na periferia do aparato e gráfico D: tempo (s) de permanência no centro do aparato dos filhotes fêmeas provenientes das ratas lactantes do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10).

Valores expressos como média ± EPM (*Teste t de student*)

7.5.5 Teste de comportamento de brincar

Na figura 26, gráfico A observa-se uma redução do tempo (s) do comportamento total de brincar de filhotes machos ($p < 0,001$) e no gráfico B observa-se uma redução do tempo (s) do comportamento total de brincar de filhotes fêmeas ($p < 0,001$) provenientes de ratas do grupo choque quando comparado ao grupo não choque.

Figura 26-Teste de comportamento de brincar



Fonte: Da autora.

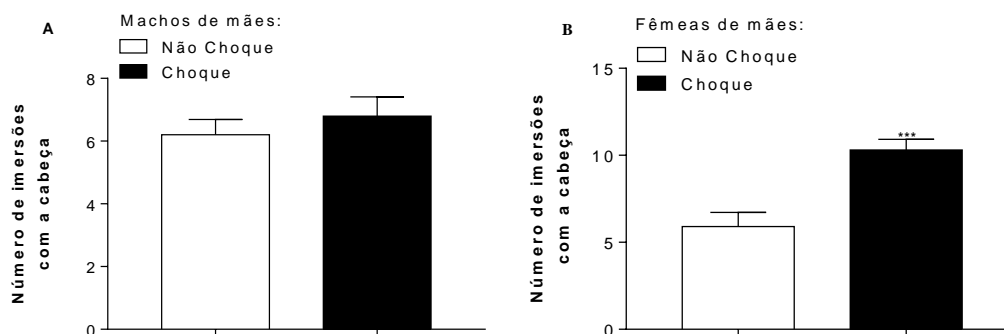
Nota: Gráfico A: Tempo (s) do comportamento total de brincar de filhotes machos e gráfico B: tempo (s) do comportamento total de brincar de filhotes fêmeas provenientes das ratas lactantes do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10).

Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, e *** e $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não choque.

7.5.6 Teste da placa com furos

Na figura 27 observa-se no gráfico A que não houve diferenças no número de imersões com a cabeça dos filhotes machos nos grupos estudados. Já no gráfico B observa-se um aumento no número de imersões com a cabeça de filhotes fêmeas provenientes de ratas do grupo choque ($p < 0,001$) quando comparado com os filhotes fêmeas provenientes de ratas do grupo não choque.

Figura 27- Teste de placa com furos.



Fonte: Da autora.

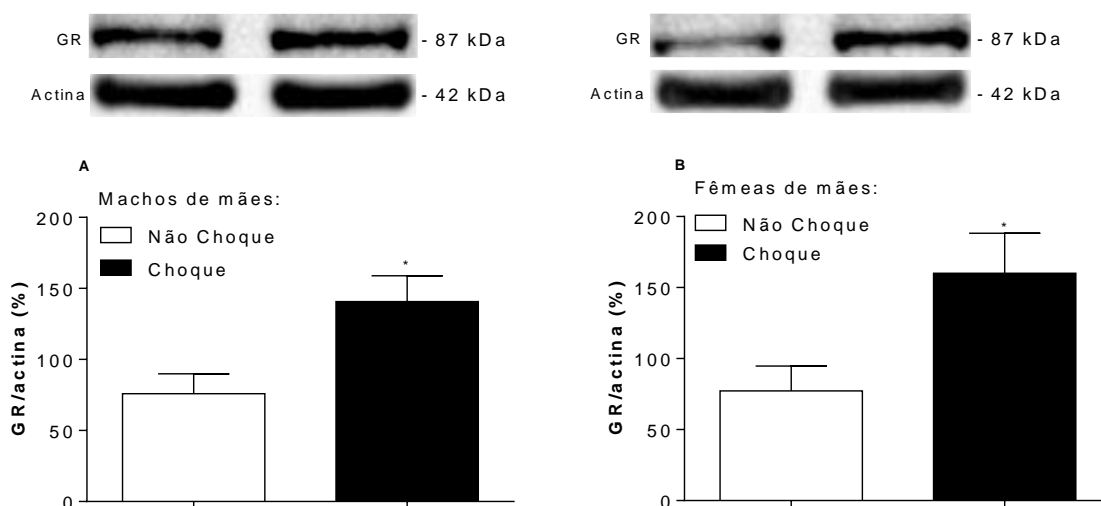
Nota: Gráfico A: Número de imersões com a cabeça dos filhotes machos provenientes de ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10) e gráfico B: Número de imersões com a cabeça dos filhotes fêmeas provenientes de ratas do grupo não choque (n=10) e do grupo choque (n=10)

Valores expressos como média \pm EPM (*Teste t de student*) *** $p < 0,001$

7.5.7 Avaliação da expressão de GR por *Western Blotting*

Na figura 28 observa-se no gráfico A observa-se um aumento da expressão de GR no hipocampo dos filhotes machos provenientes de ratas do grupo choque ($p < 0,05$) quando comparado com os filhotes machos provenientes de ratas do grupo não choque. Já no gráfico B observa-se um aumento da expressão de GR no hipocampo dos filhotes fêmeas provenientes de ratas do grupo choque ($p < 0,05$) quando comparado com os filhotes fêmeas provenientes de ratas do grupo não choque.

Figura 28- Teste de Western blotting



Fonte: Da autora.

Nota: Gráfico A: Expressão de GR dos filhotes machos provenientes de ratas do grupo não choque ($n=4-6$) e do grupo choque ($n=4-6$) e gráfico B: expressão de GR dos filhotes fêmeas provenientes de ratas do grupo não choque ($n=4-6$) e do grupo choque. Nota: Valores expressos como média \pm EPM (*Teste t de student*) * $p < 0,05$ quando comparado com os filhotes do grupo não choque.

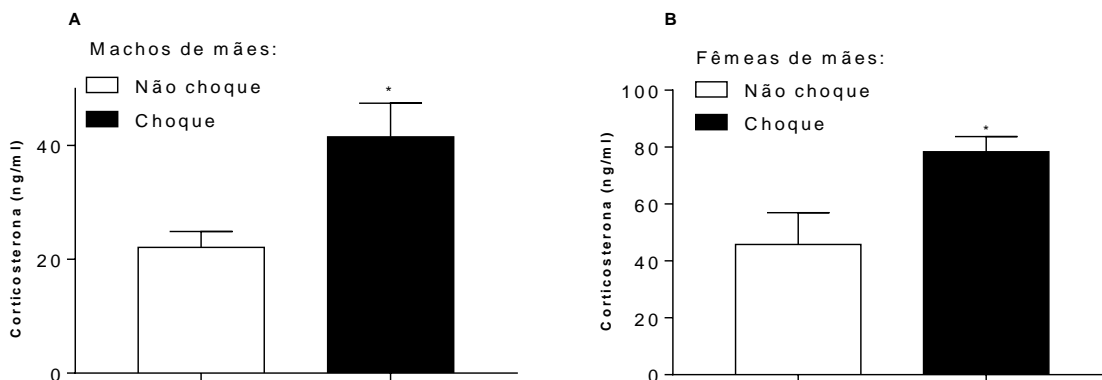
7.5.8 Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona

A figura 29 mostra a dosagem dos níveis de corticosterona plasmática (ng/ml) em filhotes machos e fêmeas do grupo não choque e do grupo choque a nível basal.

No gráfico A, observa-se um aumento dos níveis de corticosterona ($p < 0,05$) dos filhotes machos do grupo choque quando comparados com os filhotes machos do grupo não choque, no gráfico B, também observa-se um aumento

dos níveis de corticosterona ($p < 0,05$) dos filhotes fêmeas do grupo choque quando comparadas com os filhotes fêmeas do grupo não choque,

Figura 29- Dosagem de corticosterona basal.



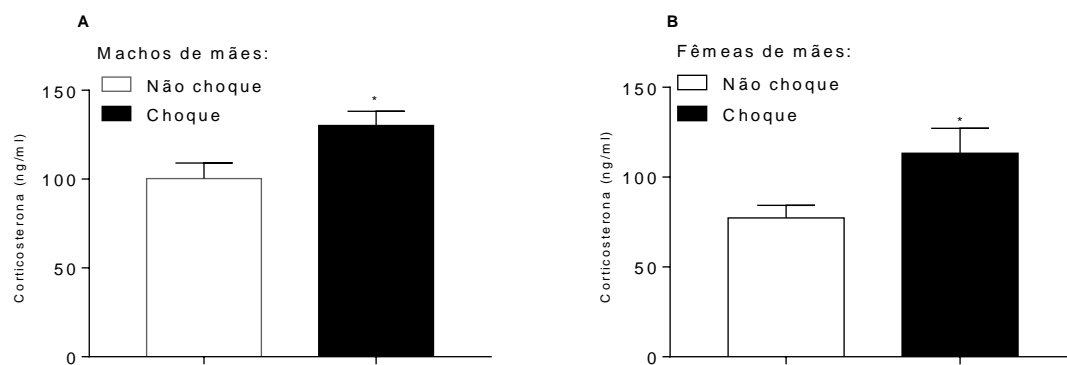
Fonte: Da autora.

Nota: Gráfico A: Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona (ng/ml) dos filhotes machos do grupo não choque ($n=7$) e do grupo choque ($n=7$) e gráfico B: Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona (ng/ml) dos filhotes fêmeas do grupo não choque ($n=7$) e do grupo choque. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado as ratas do grupo não choque (*Teste t de student*).

A figura 30 mostra a dosagem dos níveis de corticosterona plasmática (ng/ml) em filhotes machos e fêmeas do grupo não choque e do grupo choque após o teste de labirinto em cruz elevado.

No gráfico A, observa-se um aumento dos níveis de corticosterona ($p < 0,05$) dos filhotes machos do grupo choque quando comparados com os filhotes machos do grupo não choque, no gráfico B, também observa-se um aumento dos níveis de corticosterona ($p < 0,05$) dos filhotes fêmeas do grupo choque quando comparadas com os filhotes fêmeas do grupo não choque.

Figura 30- Dosagem de corticosterona após teste de labirinto em cruz elevado.



Fonte: Da autora.

Nota: Gráfico A: Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona (ng/ml) dos filhotes machos do grupo não choque (n=7) e do grupo choque (n=7) e gráfico B: : Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona (ng/ml) dos filhotes fêmeas do grupo não choque (n=7) e do grupo choque (n=7). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado as ratas do grupo não choque (*Teste t de student*).

8 DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho demonstram até o momento, que ratas submetidas ao TEPT apresentaram um aumento no tempo de congelamento ao serem reexpostas ao local do trauma, redução do ganho de peso em períodos finais da gestação, além de redução do comportamento materno. Já em filhotes provenientes de ratas submetidas ao TEPT, observamos uma redução do peso ao nascer, aumento do número de vocalizações ultrassônicas, aumento da latência para alcançar a maravalha da mãe e redução do tempo de permanência na maravalha da mãe na infância, além de na adolescência, apresentarem uma redução do tempo de permanência nos braços abertos e aumento no número de mergulhos com a cabeça no teste de labirinto em cruz elevado, redução do comportamento de brincar e aumento no número de imersões com a cabeça no teste de placas com furos quando comparados a filhotes provindos de mãe não submetidas ao TEPT.

Ainda é desconhecida na literatura a influência do TEPT gestacional sobre alterações no comportamento materno e na prole. Diante disso, nosso trabalho faz-se necessário, pois avaliou como um modelo de choque inescapável seguido de isolamento social para indução de estresse pós-traumático pode alterar o comportamento materno e o neurodesenvolvimento da prole.

O TEPT é uma doença psiquiátrica crônica com altos índices de prevalência, sendo desenvolvida em indivíduos após a exposição a um evento traumático. Foi listado na quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) como sendo um transtorno relacionado a trauma e estresse, incluindo em suas características como alterações emocionais e cognitivas relacionadas a uma adaptação ao trauma. Entre os sintomas do TEPT estão: sinais de insegurança, alterações de respostas ao medo e a ansiedade, sintomas associados à depressão, além de alterações cognitivas. Tais disfunções parecem estar ligadas ao desenvolvimento e cronicidade do TEPT (MESSMAN-MOORE; WARD; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; HOLMES & SINGEWALD, 2013).

Um dos modelos utilizado na indução do TEPT, e que foi utilizado em nosso estudo, é o choque elétrico seguido por isolamento social. Este modelo causa efeitos comportamentais e fisiológicos a longo prazo e reproduz sintomas

semelhantes ao TEPT em humanos (PYNOOS et al., 1996; PAWLYK et al., 2005).

Usando sessão de reexposição, avaliamos a retenção de memória analisando o tempo de permanência em congelamento. Foi observado um aumento no tempo de congelamento em animais expostos ao choque demonstrando uma forte memória contextual para a experiência traumática. Corroborando com nossos resultados, outro estudo que utilizou o mesmo modelo de TEPT demonstrou um aumento no tempo de congelamento no mesmo intervalo de retenção (BERARDI et al., 2014).

Para caracterizar o desenvolvimento do TEPT é importante observar alterações de memória não relacionada ao trauma, já que um dos sintomas do TEPT é o déficit cognitivo. Para isso, foi realizado o teste de RO. É um teste simples e não é considerado estressante, apresenta-se muito eficiente para detectar alterações na memória a curto e longo prazo (MIKICS; BARANYI, HALLER, 2008). Estudos anteriores demonstraram um déficit de memória a curto prazo e a longo prazo em ratos machos com TEPT induzido por estresse único prolongado (SPS), quando submetidos ao teste de RO (PHILBERT; BELZUNG; GRIEBEL, 2015). Estes estudos corroboram com nossos dados em que houve uma redução no índice de RO a curto e a longo prazo de ratas submetidas ao choque demonstrando assim déficit de memória não relacionada ao trauma e sugerindo que as ratas que foram submetidas ao choque adquiriram sintomas semelhantes ao TEPT.

Foi realizado também o teste de campo aberto para avaliação da atividade locomotora das ratas submetidas ou não ao choque. Em nossos resultados, não observamos diferença na distância percorrida (cm) e no tempo de imobilidade (seg) entre os grupos, sugerindo que o TEPT não alterou a locomoção no teste de campo aberto. Existem relatos na literatura que roedores com sintomas semelhantes ao TEPT, não demonstraram diferenças de locomoção entre os grupos estudados, corroborando com os resultados desse trabalho. Assim, como em um estudo de Zhang et al (2015), onde observou-se que animais com TEPT induzido por SPS, não apresentaram mudanças relacionadas a locomoção no teste de campo aberto quando comparados a animais não estressados (REZNIKOV et al., 2014; BERARDI, 2014).

Em nosso estudo, foi avaliado o ganho de peso das ratas durante a gestação, onde ratas submetidas ao TEPT apresentaram uma redução do ganho de peso em períodos finais da gestação (18° e 21° DG) quando comparadas com ratas não submetidas ao TEPT. Em um estudo realizado por Prado e colaboradores (2018), observou-se em ratas submetidas ao estresse de superpopulação uma redução do ganho de peso a partir do 14°DG. Essa redução de peso, em relação ao controle, já foi descrita em diferentes modelos de estresse (SPS e nado forçado) (Amugongo, Hlusko. 2014; Fujita, et al., 2010; Liu et al. (2015), assim como, Govindaraj et al. (2017), utilizando um modelo de estresse de contenção, observaram menor ganho de peso durante a gestação. Além disso Nishio et al. (2006) e Haim et al. (2016), demonstram também um efeito do estresse na redução do ganho de peso durante períodos finais da gestação, corroborando assim com nossos resultados.

Avaliamos também o comportamento materno das ratas submetidas ou não ao choque e observamos que houve uma redução do comportamento materno. Pesquisas realizadas em nosso laboratório demonstraram que níveis elevados de corticosterona plasmática devido a uma situação de estresse, podem reduzir o comportamento materno e a secreção de hormônios como ocitocina e prolactina que são essenciais para o início e manutenção do CM (VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2011). Prado e colaboradores (2018) ao utilizar estresse de superpopulação, observaram a redução do comportamento materno, principalmente no número de lambidas. Golub et al. (2016) constataram uma redução no tempo de lambida em camundongos expostos ao estresse pré-natal induzido por choque, demonstrando que uma mãe tipo-ansiosa lambe menos seus filhotes.

Um outro estudo ao utilizar SPS (contenção, 20 minutos de natação forçada, 15 minutos de descanso e 1-2 minutos de éter dietílico) como modelo de indução de estresse no 12° dia de gestação, demonstrou uma redução de lambidas, de cifo e construção do ninho assim como no nosso estudo (Alzoubi.k, H., 2019).

Dosagens de corticosterona plasmáticas também foram realizadas após a exposição ao aparato de choque e após a reexposição ao choque. Logo após a exposição a fonte de estresse, as ratas do grupo choque apresentaram níveis

aumentados de corticosterona plasmática quando comparadas ao grupo não estressado.

Níveis aumentados de corticosterona também foram observados por Jafari e colaboradores (2017), que ao submeter um grupo de camundongos nos dias gestacionais 12, 14 e 17 ao estresse por ruído de 3000 Hz por 24 horas e outro grupo de camundongos ao estresse físico de contenção e realizaram dosagem de corticosterona após o estresse.

Em estudo realizado por Wilson e colaboradores (2012), utilizando do método de estresse único prolongado do 14º dia gestacional até períodos finais da gestação, ao dosar níveis plasmáticos de corticosterona após a exposição ao estresse demonstrou que há um aumento dos níveis em relação a ratas não estressadas.

Ao nascer, a prole provinda de ratas submetidas ao TEPT apresentou um peso reduzido quando comparada a prole de ratas não submetidas ao TEPT. Prado (2018) utilizando um modelo de estresse social por superpopulação durante toda a gestação, observou uma redução do peso da prole ao nascer quando comparada a prole de mães não submetidas ao estresse. Corroborando com nosso trabalho, Vaughan e colaboradores (2012), adicionaram corticosterona na água de beber de ratas prenhes durante toda a gestação e verificaram que houve uma redução do peso da prole. Portanto, estresse durante a gestação pode reduzir o peso da prole ao nascer.

No 5º dia de lactação, foi avaliado o número VUSs e foi encontrado um aumento do número de VUSs dos filhotes machos e fêmeas provindos de ratas submetidas ao TEPT quando comparados com seus respectivos controles. O aumento pode ter sido influenciado pela redução do comportamento materno, como no trabalho de Veronesi e colaboradores (2017), onde ratas que ingeriram dipirona na lactação, apresentaram uma redução do comportamento materno e seus filhotes obtiveram um aumento do número de vocalizações ultrassônicas. Além disso, alguns pesquisadores sugerem que o aumento do número de VUSs pode ser correlacionado com um comportamento inicial semelhante a ansiedade (TONKIS Et al., 2003; SEFFER et al., 2014; BATISTA et al., 2016).

Outra análise realizada durante o período de lactação, no 13º dia, foi o comportamento de retorno a maravalha da mãe. O teste avalia padrões de discriminação olfativa, social e cognitiva dos filhotes mediante a discriminação

do odor da maravalha limpa com o odor da maravalha da mãe (BIGNAMI, 1996; SERVADIO; VANDERSCHUREN; TERRY; JOHANSON, 1996, TREZZA, 2015). Em nosso estudo, os filhotes machos e fêmeas provindos de ratas submetidas ao TEPT, apresentaram uma redução do tempo de permanência e aumento da latência para alcançar a maravalha da mãe. Estes resultados são semelhantes ao estudo realizado por Souza e colaboradores (2013), em que ratas foram colocadas em uma plataforma elevada do 15° ao 18° dia de gestação e posteriormente na sua prole houve uma redução do tempo de permanência maravalha da mãe e um aumento da latência para chegar na maravalha da mãe. Assim, pode-se observar que o estresse gestacional pode prejudicar a discriminação olfativa dos filhotes e este fato pode posteriormente implicar em alterações no desenvolvimento do comportamento social e reconhecimento social (TERRY; JOHANSON, 1996).

Para avaliação de parâmetros preditivos de ansiedade realizamos o teste de labirinto em cruz elevado em que constatamos que animais provindos de mães submetidas ao estresse pré-natal permaneceram menos tempo nos braços abertos e aumento no número de mergulhos com a cabeça no teste, indicando comportamento tipo ansioso. Resultados semelhantes foram obtidos por Golub e colaboradores (2016), em que ao submeter camundongos no 12° dia gestacional ao modelo de choque inescapável nos pés e testaram seus filhotes no 28° de vida no teste de labirinto em cruz elevado e observou que os filhotes provindos de mães estressadas permaneceram menos tempo nos braços abertos e teve mens porcentagem de entrada nos mesmos quando comparados aos filhotes não estressados.

Pesquisas realizadas por Estanilau (2006), ao submeterem ratas durante toda a gestação a choques incontroláveis nos pés e testar seus filhotes com 30,45 e 60 dias de vida no teste de labirinto em cruz elevado, obteve como resultado um menor tempo de permanência nos braços abertos e um aumento no número de mergulhos com a cabeça (head dips). Usando o método de estresse único prolongado, Wilson (2013), também observou o aumento no número de mergulhos com a cabeça de filhotes provindos de ratas estressadas quando comparado com os controles.

A fim de avaliar a atividade locomotora dos filhotes, foi realizado o teste de campo aberto, em que não houve diferenças entre os grupos estudados,

assim como no modelo de estresse gestacional induzido por superpopulação por Prado e colaboradores (2018), onde não houve alterações de locomoção nos grupos analisados. Portanto, as alterações encontradas nos filhotes não estão relacionadas com uma alteração da locomoção. No teste de campo aberto observamos também parâmetros preditivos de ansiedade ao analisar o tempo de permanência no centro e na periferia do aparato e como resultados obtivemos que filhotes provindos de ratas que passaram pelo estresse durante a gestação, passaram mais tempo na periferia do aparato e menos tempo no centro quando comparado com filhotes provindos de ratas não estressadas.

Resultados semelhantes foram observados por Iturra-Mena e colaboradores em 2018, em que ao submeter ratas ao estresse de contenção durante os dias 14 a 21 da gestação e testar sua prole na adolescência no teste de campo aberto, viu que os filhotes eram mais ansiosos e permaneciam mais tempo na periferia do aparato e menos tempo no centro do aparato quando comparado aos filhotes de mães não estressadas. Lussier (2018), ao submeter ratas prenhes ao estresse único prolongado, concluiu que seus filhotes apresentaram um comportamento tipo ansioso analisado pelo labirinto em cruz elevado e no campo aberto, em que permaneceram um tempo menos na área central do aparato, quando comparados a filhote de ratas não estressadas.

Além disso, os animais foram submetidos ao teste de comportamento de brincar, que possibilita a análise de alterações no comportamento de comunicação e contato entre os animais (MANDUCA et. al.,2015). Criado por File e Hyde no ano de 1978, foi baseado no comportamento de interação natural dos animais da mesma espécie, podendo ser analisado o tempo em que o animal gasta cheirando ou seguindo o outro animal (OVERSTREET; KNAPP; BREESE, 2002). Obtivemos em nosso trabalho uma redução do tempo total de comportamento de brincar de filhotes machos e fêmeas provindos de ratas submetidas ao TEPT quando comparadas ao seu controle. O mesmo pode ser observado em um estudo citado anteriormente de Souza e colaboradores (2013), em que filhotes provindos de ratas submetidas ao estresse de plataforma elevada durante a gestação, apresentaram redução no comportamento de brincar. Portanto, pode-se observar que o estresse durante a gestação pode prejudicar o comportamento de brincar e isto pode implicar em consequências tardias como alterações cognitivas e emocionais (SIVIY, 2018).

Utilizamos também o teste de placa com furos, onde é possível avaliar padrões de comportamento tipo-ansioso, observando o número de imersões com a cabeça nos buracos da placa (MAKANJUOLA Et al., 1997). Como resultado, observamos um aumento do número de imersões com a cabeça nos buracos da placa de filhotes fêmeas provindas de ratas com TEPT quando comparados ao controle, sugerindo um comportamento tipo-ansioso. Tais resultados também foram observados em estudo realizado por Siegmund e colaboradores (2009), em que ratas submetidas ao estresse de contenção de 45 minutos por dia durante toda a gestação tiveram seus filhotes testados na adolescência para avaliação de comportamento tipo-ansioso na placa de furos e foi observado um aumento do número de imersões com a cabeça de filhotes provenientes de mães estressadas durante a gestação. Além disso, a administração de fluoxetina em ratos adolescentes provindos de mães submetidas ao estresse de contenção durante a gestação preveniu o aumento do número de imersões com a cabeça nos orifícios da placa com furos (BELZUNG ET.AL., 2001).

Portanto, podemos sugerir que o TEPT durante a gestação levou ao aumento de parâmetros preditivos de ansiedade em diversos testes, além de prejudicar o comportamento de brincar da prole. Estas alterações podem estar associadas com a redução do CM e a exposição intrauterina dos embriões/fetos e pós-natal dos filhotes aos níveis aumentados de corticosterona materna.

Além disso, nossos resultados de corticosterona nos filhotes demonstrou que filhotes provindos de ratas com TEPT apresentaram níveis plasmáticos aumentados de corticosterona quando comparados a filhotes provindos de ratas sem TEPT. De fato, em estudo realizado Villain e colaboradores (2018) camundongos submetidos a um protocolo de estresse contendo nado forçado, contenção e choque inescapável nas patas durante a gestação deram origem a uma prole com maior concentração de corticosterona plasmática na adolescência quando comparado com camundongos provenientes de mães não estressadas, resultado também observado em pesquisa realizada por Golub em 2016, onde camundongos foram submetidos a choque inescapável nas patas no 12º DG e deram origem a filhotes apresentando nível de corticosterona plasmática também aumentado.

Por fim, analisamos a expressão de receptores de glicocorticoides (GR) no hipocampo dos filhotes e observamos um aumento da expressão de GR no hipocampo de filhotes provindos de ratas com TEPT.

A expressão de GR no hipocampo pode estar positivamente correlacionada com comportamentos semelhantes à ansiedade, como observado em estudos de Wei (2004) em que camundongos transgênicos superexpressando GR apresentaram um comportamento tipo ansioso em relação aos controles (WEI et al., 2004). Os efeitos da supreexpressão de GR também foi alvo de estudo de Wei em 2012, onde avaliou-se camundongos no teste de labirinto em cruz elevado e que apresentaram um aumento do comportamento tipo ansioso, tais achados sugerem que as primeiras programações na capacidade de respostas ao estresse são estabelecidas no início do desenvolvimento e tem consequências ao longo da vida para o desenvolvimento do comportamento tipo ansioso.

9 CONCLUSÃO

Diante dos nossos resultados podemos concluir que o TEPT durante a gestação reduz o comportamento materno e induz ao comportamento tipo-ansioso e a prejuízos no comportamento de brincar da prole, além do aumento dos níveis de corticosterona plasmática e da superexpressão de GR no hipocampo de filhotes provindo de ratas que desenvolveram o TEPT gestacional.

Sendo assim, nosso estudo pode auxiliar para desvendar as causas do desenvolvimento de diversas desordens psiquiátricas sendo que o TEPT gestacional pode estar contribuindo para o aumento da incidência de transtornos relacionados à ansiedade.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN M.L. et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. **UNIFESP** – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2004

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. New York: **Endocrinology**, 1995.

Barzegar M, Sajjadi FS, Talaei SA, Hamidi G, Salami M. Prenatal exposure to noise stress: anxiety, impaired spatial memory, and deteriorated hippocampal plasticity in postnatal life. **Hippocampus**. 2015;

BATISTA, T.H et.al. Protein malnutrition during pregnancy alters maternal behavior and anxiety-like behavior in offspring. **Nutr Neurosci.**, 2016.

BERARDI, A. et al. An updated animal model capturing both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 1-12, Abr, 2014.

BISON, S. et al. Differential behavioral, physiological, and hormonal sensitivity to LPS challenge in rats. **Int J Interferon Cytokine Mediator Res**, v. 1, p.1-13. dec. 2009.

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

BRUNTON, P. J.; RUSSELL, J. A. The expectant brain: adapting for motherhood. **Nat Ver Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 11-25, 2008.

DER-AVAKIAN, A.; MARKOU, A. Withdrawal from chronic exposure to amphetamine, but not nicotine, leads to an immediate and enduring deficit in motivated behavior without affecting social interaction in rats. **Behav Pharmacol**. 2014.

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

Estanislau C, Morato S. Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects. **Int J Dev Neurosci**. 2006

FUJITA, S. et al. "Green odor" inhalation by stressed rat dams reduces behavioral and neuroendocrine signs of prenatal stress in the offspring.: New York: **Hormones and Behavior**, 2010.

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. Hoboken: **Develop Neurobiol**, 2016.

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

GROTA, L. J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behavior in *Rattus norvegicus*. **Animal Behavior**, 1969.

HABA, R. et al. Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by impairing cognition and/or motivation in mice: Possible role of activation of the central amygdala. **Behavioural Brain Research.**, 2012.

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

HERNANDES, A. S. et al. Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. **Behavioral Brain Research.**, 2005.

HOLMES A, SINGEWALD N. Individual differences in recovery from traumatic fear. **TRENDS NEUROSCI.**, 2013.

Jafari Z, Mehla J, Afrashteh N, Kolb BE, Mohajerani MH. Corticosterone response to gestational stress and postpartum memory function in mice. **PLoS One**. 2017;

Iturra-Mena AM, Arriagada-Solimano M, Luttecke-Anders A, Dagnino-Subiabre A. Effects of prenatal stress on anxiety- and depressive-like behaviours are sex-specific in prepubertal rats. **J Neuroendocrinol**. 2018;

KAOUANE N, et al. A. Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. **Science.**, 2012

KELMENDI B, ADAMS TG, YARNELL S, SOUTHWICK S, ABDALLAH CG, KRYSTAL JH. PTSD: from neurobiology to pharmacological treatments. **Eur J Psychotraumatol.** .

LEE D.Y., KIM E., CHOI M.H. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. **BMB Rep.**, 2015

LIU, G, et al. Restraint stress delays endometrial adaptive remodeling during mouse embryo implantation. London: **The international Journal on the Biology of Stress.**, 2015

LIU, C. et al. Influência das condições de criação neonatais sobre as respostas adrenocorticotropina induzidas pelo stress e libertação norepinefrina no núcleo paraventricular do hipotálamo **J. Neuroendocrinol.**, 2000.

MACCARI S et al. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine. **Brain**, 2003.

MANN, P. E. Finasteride delays the onset of maternal behavior in primigravid rats. **Physiol Behav**, 2006.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER A. F.; SILVEIRA R. O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **R. Psiquiatr. RS**, 65-74, abril 2003

Maron E, Nutt D. Biological markers of generalized anxiety disorder. **Dialogues Clin Neurosci.** 2017.

McEWEN, B. S. Protective and damaging effects of stress mediators. **N Engl J Med**, 1998.

MELANCIA, F. et al. Testing the correlation between experimentally-induced hypothyroidism during pregnancy and autistic-like symptoms in the rat offspring. **Behav Brain**, 2017.

MESSMAN-MOORE TL, WARD RM, BROWN AL. Substance use and PTSD symptoms impact the likelihood of rape and revictimization in college women. **J Interpers Violence.**,2009

MIRANDA-PAIVA, C.M. et al. A role for the periaqueductal grey in opioidergic inhibition of maternal behavior. **Eur. J. Neurosci.**, v. 18, n. 3, p. 667-674, 2003.

MOISIADIS VG, MATTHEWS SG. Glucocorticoids and fetal programming part 1: Outcomes. **Nat.Rev Endocrinol.**,2014.

NISHIO, et al. Effects of perinatal stress on the anxiety-related behavior of the adolescence mouse. Oxford: **Int. J. Devl Neuroscience.**,2006

NUMAN, M.; INSEL R. T. **The Neurobiology of Parental Behavior.** v. 1. New York: Springer, 2003.

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. **Front Neuroendocrinol.**, 2009.

NUMAN, M.; WOODSIDE, B. Maternity: Neural Mechanisms, Motivational Processes, and Physiological Adaptations. **Behavioral Neuroscience**, v. 124, n. 6, p. 715-741, 2010.

OLIVEIRA, Maria Ines Santana de. Intervenção cognitivo-comportamental em transtorno de ansiedade: relato de caso. **Rev. bras.ter. Cogn.**, Rio de Janeiro. v.7, n. 1, p. 30-34, jun. 2011.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE). BRASIL, 2019. Acesso em junho: <https://www.who.int/eportuguese/publications/pt/>.

Orso R, Wearick-Silva LE, Creutzberg KC, et al. Maternal behavior of the mouse dam toward pups: implications for maternal separation model of early life stress. **Stress**. 2018.

PAWLYK AC, et al. A rodent model of sleep disturbances in posttraumatic stress disorder: the role of context after fear conditioning. **Biol Psychiatry**. 2005.

PEREIRA AS, GIUSTI-PAIVA A, VILELA FC. Central corticosterone disrupt behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Neurosci Lett**. 2015.

PEREIRA, P. K.; LOVISI, G. M. Prevalence of gestacional depression and associated factors. São Paulo: **Rev Psiq Clín.**, 2007.

PHILBERT J, BELZUNG C, GRIEBEL G. Long-lasting memory abnormalities following exposure to the mouse defense test battery: An animal model of PTSD. **Physiol Behav.**, 2015

PYNOOS, R. S., STEINBERG, A. M., GOENJIAN, A. Traumatic stress in childhood and adolescence: Recent developments and current controversies. New York: **Traumatic Stress: The Effects of Overwhelming Experience on Mind, Body, and Society**, 1996

REYNOLDS, R, M. Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: Two decades of testing the hypothesis., *Psychoneuroendocrinology*, 2013,

SCHÖNER J, et al. Post-traumatic stress disorder and beyond: an overview of rodent stress models. **J Cell Mol Med.**, 2017.

SEFFER, RK Schwarting, M. Wöhr Comunicação ultrassônica pró-social em ratos: idéias de estudos de reprodução **J. Neurosci.**, 2014

SERVADIO, M.; VANDERSCHUREN, L.J.; TREZZA, V. Modeling autism-relevant behavioral phenotypes in rats and mice: Do 'autistic' rodents exist **Behav. Pharmacol.**, 2015

SIEGMUND, A. et al. Maternal inexperience as a risk factor of innate fear and PTSD-like symptoms in mice. **J Psychiatr Res.**, 2009.

SHEEHAN, T. et al. Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial nuclei to inhibit maternal behavior in rats. **Neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 341-356, 2001.

SILVEIRA, P. P. et al. Developmental origins of health and disease (DOHaD). Porto Alegre: **J Pediatr.**, 2007.

- SIOPI, E. et al. Evaluation of late cognitive impairment and anxiety states following traumatic brain injury in mice: **The effect of minocycline. Neuroscience Letters.**, 2012.
- SIVIY. SM. Efeitos do manuseio neonatal na brincadeira e ansiedade em ratos F344 e Lewis. **Dev Psychobiol.** 2018
- SMITH JW et al. Estresse gestacional induz Comportamento pós-parto semelhante à depressão e altera o cuidado maternal em ratos. **Rev. Psico.**, 2004.
- Soares-Cunha C, Coimbra B, Borges S, et al. Mild Prenatal Stress Causes Emotional and Brain Structural Modifications in Rats of Both Sexes. **Front Behav Neurosci.** 2018;
- TERRY. LM, Johanson IB. Effects of altered olfactory experiences on the development of infant rats' responses to odors. **Dev Psychobiol.**, 1996.
- TONKISST, KE et al. As características da chamada ultrassônica de filhotes de ratos são alteradas após desnutrição pré-natal **Dev. Psychobiol.**, 2003
- VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **The American Journal of Psychology.**, 1970.
- VAUGHAN et al. Maternal corticosterone regulates nutrient allocation to fetal growth in mice. Orford: **The Journal of Physiology**, 2012.
- VETERE G, et al. Memory formation in the absence of experience. **Nat Neurosci.**, 2019
- Villain H, Benkahoul A, Birmes P, Ferry B, Rouillet P. Influence of early stress on memory reconsolidation: Implications for post-traumatic stress disorder treatment. **PLoS One.** 2018.
- WADHWA, P. D, et al. The contribution of maternal stress to preterm birth: issues and considerations. **Clin Perinatol**, 2011.
- WEERTH C.; BUITELAAR J.K. Physiological stress reactivity in human pregnancy—a review. New York: **Neuroscience and Biobehavioral**, 2005.
- WEI. QIANG, t al. Early-Life Forebrain Glucocorticoid Receptor Overexpression Increases Anxiety Behavior and Cocaine Sensitization. **Biol Psychiatry.**, 2012.
- Wei Q, Lu XY, Liu L, et al. Glucocorticoid receptor overexpression in forebrain: a mouse model of increased emotional lability. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2004;

WHITAKER AM, GILPIN NW, EDWARDS S. Animal models of post-traumatic stress disorder and recent neurobiological insights. **Behav Pharmacol.**, 2014.

WILGENFELD, K. et al. Effect of current and lifetime posttraumatic stress disorder on 24-hour urinary catecholamines and cortisol: results from the mind your heart study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 81-92, Feb, 2016.

Wilson CA, Vazdarjanova A, Terry AV Jr. Exposure to variable prenatal stress in rats: effects on anxiety-related behaviors, innate and contextual fear, and fear extinction. **Behav Brain Res.** 2013