

Elisa Caroline Cella

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DEXAMETASONA  
DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL EM PARÂMETROS  
DE COMPORTAMENTO MATERNO, EMOCIONAL,  
MEMÓRIA E COGNIÇÃO NO PÓS-PARTO DE RATAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof. Dra Fernanda Barbosa Lima Christian

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cella, Elisa Caroline

Efeitos da administração de dexametasona durante o período gestacional em parâmetros de comportamento materno, emocional, memória e cognição no pós-parto de ratas. / Elisa Caroline Cella ; orientadora, Fernanda Barbosa Lima Christian, 2018.

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

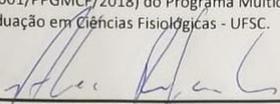
1. Ciências Fisiológicas. 2. Neuroendocrinologia. 3. Período Gestacional. 4. Dexametasona. 5. Comportamento. I. Christian, Fernanda Barbosa Lima. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

**"Efeitos da administração de dexametasona durante o período gestacional em parâmetros de comportamento materno, emocional, cognição e memória no pós-parto de ratas"**

Por

**Elisa Caroline Cella**

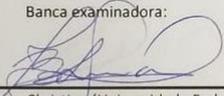
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (001/PPGMCF/2018) do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - UFSC.



---

Prof.(a) Dr.(a) Alex Rafacho  
Coordenador(a) do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Banca examinadora:

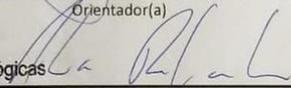


---

Dr.(a) Fernanda Barbosa Lima Christian (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)

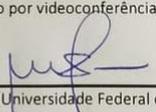
**Alex Rafacho**  
Coordenador do PPG

Multicêntrico em Ciências Fisiológicas



---

Dr.(a) Fabiana Cardoso Vilela Giusti (Universidade Federal de Alfenas/MG – participação por videoconferência)



---

Dr.(a) Moacir Serralvo Faria (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 07 de junho de 2018.



Dedico este trabalho a minha mãe Cleunice e minha tia Cleide. Vocês sempre me mostraram na prática o real significado do cuidado materno.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre recorri com muita fé.

A minha família, meus irmãos e em especial minha mãe Cleunice e minha tia Cleide, por toda base e exemplo de vida, por incentivarem meus estudos e meus sonhos e todo o suporte emocional. Obrigada por me ensinarem que a maior riqueza da vida é o conhecimento.

Ao meu namorado Maurício, que com muito amor sempre me aconselhou e apoiou, me mantendo sempre forte nos meus objetivos.

Aos meus amigos, Bruna B., Priscila, Rafaela, Larissa e Flaviano. Obrigada por sempre escutarem meus desabafos, pela parceria e por sempre me colocarem pra cima. Em especial a irmã que a vida me deu, Ingrid, que muito me incentivou nessa trajetória.

Ao meu avô, em memória, que sempre incentivou minhas curiosidades e estudo, relatando sempre todo esse apoio com muito orgulho. Sei que o céu está em festa por essa conquista.

A professora Marta Aparecida Paschoalini, que me incentivou a fazer parte do mundo da pesquisa.

A minha orientadora, Fernanda Barbosa Lima Christian, pessoa iluminada que guiou meus caminhos durante este trabalho. Além de ser uma orientadora maravilhosa, é uma grande amiga que levarei sempre no coração e uma profissional que sempre irei me espelhar.

Aos professores que colaboraram para a produção deste trabalho, dispondo espaço e materiais. Muito obrigada, em especial aos professores José Marino Neto, Cilene Lino de Oliveira, Moacir Serralvo Faria, Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Alex Rafacho e N Paschoalini.

Aos colegas do LENEC, Jordana, Flaviano e Rafaela, por todo auxílio, compartilhamento de experiências e pelo cafezinho dos intervalos. Um agradecimento em especial para Júlia, Tamires e Bruna que abraçaram o projeto comigo e estiveram ao meu lado aprendendo e

acompanhando os animais, seja as 6 da manhã ou as 8 da noite, de uma segunda ou de um domingo. Vamos lá #teamLENEC!

Aos demais colegas dos outros laboratórios, Karol, Patrick, Rafael, Haíssa, Natalia, Katia. O apoio e experiência de vocês também foi muito importante para execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade.

A UFSC, pelas instalações físicas que possibilitaram a execução deste trabalho.

A CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Aos animais.

## RESUMO

O período gestacional é marcado por várias adaptações neuroendócrinas que garantem o sucesso gestacional e perpetuação da espécie. Dentre estas adaptações, destacam-se a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal da gestante e a proteção do feto à exposição aos glicocorticoides maternos. O presente trabalho avaliou a exposição ao glicocorticoide exógeno dexametasona (DEX) no terço final da gestação em parâmetros comportamentais de cuidado com a prole, emocionais e de memória e cognição no pós-parto de ratas. Ratas Wistar foram tratadas com DEX na água de beber, na dose de 0,2 mg/kg, entre o 14º-19º dia de gestação. Após o parto deu-se início ao protocolo de experimentação, avaliando-se o comportamento materno (CM) e as respostas comportamentais no teste do ninho (TN), labirinto em cruz elevado (LCE), teste do nado forçado repetido (TNFr) e teste de reconhecimento de objetos (RCO). O tratamento com DEX reduziu o ganho de peso gestacional e o desenvolvimento neonatal. Com relação ao cuidado com a prole, as fêmeas tratadas com DEX reduziram os comportamentos maternos típicos do período inicial de pós-parto e apresentaram menor eficiência na construção do ninho. Quanto ao estado emocional das ratas, o tratamento com DEX levou a um aumento do comportamento do tipo ansioso, mas não alterou as respostas no TNFr ou no RCO. No entanto, observou-se que as alterações características do período pós-parto provocaram prejuízo na memória das roedoras, reduzindo o índice de reconhecimento quando comparadas a um grupo virgem, independentemente do tratamento com DEX. Concluímos que o tratamento com DEX no terço final da gestação leva a alterações comportamentais que comprometem o estado emocional da progenitora e dificultam a expressão de comportamentos maternos, o que repercute negativamente na manutenção da prole recém-nascida. Portanto, os riscos de tratamento com glicocorticoides durante a gestação devem ser levados em consideração para as condições emocionais maternas e suas adaptações ao pós-parto.

**Palavras chave:** gestação, dexametasona, comportamento



## ABSTRACT

The gestational period is marked by several neuroendocrine adaptations that ensure gestational success and perpetuation of species. Among these adaptations are the following: suppressed activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and placental protective mechanisms against fetal exposure to maternal glucocorticoids. The present work evaluated the effects of a synthetic glucocorticoid, dexamethasone (DEX) on behavioral parameters related to maternal care, anxiety, depression and memory during the postpartum period. Wistar rats were treated with DEX in the drinking water (0.2 mg/kg) between the 14th and 19th days of gestation. After delivery, the experimental protocol included the evaluation of maternal behavior (CM) and the behavioral responses in the nest building test (TN), elevated plus-maze test (LCE), repeated forced swimming test (TNFr) and object recognition test (RCO). Treatment with DEX reduced gestational weight gain and neonatal development. Regarding maternal care, females treated with DEX not only reduced the expression of typical maternal behaviors exhibited in the initial period of postpartum but also built less effective nests. Treatment with DEX led to an increase in anxiety-like behaviors, but did not alter the responses in TNFr or RCO. However, we observed that the installation of the postpartum caused memory deficits in these rats, reducing the recognition index when compared to a virgin group, independently of the treatment with DEX. We conclude that treatment with DEX in the final third of pregnancy leads to behavioral changes that compromise the maternal emotional state and disrupts the expression of maternal behaviors, which negatively impacts on the maintenance of the offspring. Therefore, the risks of using glucocorticoids during pregnancy should be taken into account for the maternal emotional state and their postpartum adaptations.

**Key words:** pregnancy, dexamethasone, behavior



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Plug vaginal - Células cornificadas e espermatozoides .....	23
<b>Figura 2.</b> Construção de ninho .....	26
<b>Figura 3.</b> Labirinto em Cruz elevado. ....	28
<b>Figura 4.</b> Cuba para o teste de Nado Forçado. ....	29
<b>Figura 5.</b> Teste de Reconhecimento de Objetos. ....	30
<b>Figura 6.</b> Média do comprimento e peso da prole ao nascer. ....	34
<b>Figura 7.</b> Média do comprimento e peso dos filhotes ao nascer. ....	35
<b>Figura 8.</b> Média do peso corporal, das adrenais e dos ovários. ....	35
<b>Figura 9.</b> Cuidado com os filhotes. ....	36
<b>Figura 10.</b> Comportamentos destinados ao cuidado com a prole, exploração da caixa e auto-limpeza.....	37
<b>Figura 11.</b> Teste do Ninho.....	38
<b>Figura 12.</b> Número de entradas no LCE.....	39
<b>Figura 13.</b> Porcentagem de entradas nos braços abertos. ....	39
<b>Figura 14.</b> Tempo de permanência nos braços abertos e fechados.....	40
<b>Figura 15.</b> Variáveis etológicas.....	41
<b>Figura 16.</b> Duração dos comportamentos observados no teste do nado repetido.....	42
<b>Figura 17.</b> Frequência dos comportamentos observados no teste do nado repetido.....	43
<b>Figura 18.</b> Tempo de exploração do objeto A. ....	44
<b>Figura 19.</b> Índice de reconhecimento no teste 1.....	45
<b>Figura 20.</b> Índice de reconhecimento no teste 2.....	45
<b>Figura 21.</b> Atividade locomotora. ....	46
<b>Figura 22.</b> Efeitos do tratamento com dexametasona durante o período gestacional.....	58



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Distribuição dos experimentos entre os lotes.....	23
<b>Quadro 2.</b> Distribuição e duração das sessões de teste do nado forçado repetido.....	29
<b>Quadro 3.</b> Distribuição das sessões no teste de reconhecimento de objeto.....	30



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- APOM** – Área pré-óptica medial  
**CM** – Comportamento Materno  
**CTL** – Controle (grupo)  
**DEX** – Dexametasona  
**HHA** – Hipotálamo-hipófise-adrenal  
**IR** – Índice de reconhecimento  
**LCE** – Labirinto em cruz elevado  
**OCT** - Ocitocina  
**PRL** – Prolactina  
**RCO** – Reconhecimento de Objetos  
**TNFr** – Teste do nado forçado repetido



## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	15
1.1 A gestação e os hormônios envolvidos nas adaptações gestacionais .....	15
1.2 Glicocorticoides durante a gestação.....	18
<b>2 Objetivos</b> .....	22
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Protocolo de Acasalamento.....	22
3.3 Tratamento com Dexametasona.....	23
3.4 Protocolos Experimentais.....	24
3.4.1 Acompanhamento do ganho de massa.....	24
3.4.2 Comportamento materno.....	24
3.4.3 Teste do Ninho.....	25
3.4.5 Labirinto em Cruz Elevado.....	26
3.4.6 Nado forçado repetido.....	28
3.4.7 Reconhecimento de objetos.....	29
3.4.8 Atividade locomotora.....	31
3.5 Eutanásia.....	31
3.6 Análise dos vídeos e estatística.....	32
3.7 Desenho Experimental.....	33
<b>4. Resultados</b> .....	34
4.1 Ganho de peso durante a gestação.....	34
4.2 Medidas da prole e parâmetros murinométricos.....	34

4.3 Comportamento Materno.....	36
4.4 Teste do ninho .....	36
4.5 Labirinto em Cruz Elevado.....	38
4.6 Nado Forçado Repetido .....	41
4.7 Reconhecimento de Objetos .....	44
4.8 Atividade locomotora .....	45
<b>5. Discussão.....</b>	<b>47</b>
5.1 Parâmetros murinométricos .....	47
5.2 Cuidados Maternos .....	48
5.3 Labirinto em Cruz Elevado.....	50
5.4 Nado Forçado Repetido .....	53
5.5 Reconhecimento de Objetos .....	54
<b>6. Considerações finais.....</b>	<b>57</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>59</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A gestação e os hormônios envolvidos nas adaptações gestacionais

O período gestacional é marcado por diversas adaptações, que são essenciais para o sucesso reprodutivo. Estas adaptações são fundamentais para a manutenção da saúde materna, além de prover condições para o desenvolvimento fetal. Os hormônios envolvidos e as alterações neuroendócrinas tornam-se essenciais para o sucesso da reprodução, garantindo a formação fetal, bem como o cuidado com neonato (BRUNTON e RUSSELL, 2008).

Em relação ao metabolismo gestacional, o período inicial é marcado por uma fase anabólica, acompanhada de hiperfagia, aumentando os depósitos de gordura na gestante. Contudo, o terço final do período gestacional é catabólico (HERRERA, 2000), essencial para o período do rápido crescimento e desenvolvimento fetal (VON VERSEN-HOEYNCK e POWERS, 2007).

As alterações da fisiologia gestacional permitem o parto adequado, assim como a indução dos cuidados maternos e lactação (LEVY, 2016). Em espécies altriciais, como os roedores, que nascem desprovidos da capacidade de manutenção das condições para a sobrevivência, o sucesso reprodutivo está inteiramente relacionado com o cuidado materno. A matriarca é responsável pela alimentação por meio da lactação, além da construção de ninho e manutenção de um abrigo para a prole, proteção contra predadores, higienização e conservação da temperatura corporal dos neonatos (KENDRICK et al., 1997). Assim, mecanismos neuro-adaptativos tornam-se essenciais, permitindo a perpetuação da espécie e protegendo o organismo materno das profundas modificações hormonais que se fazem necessárias (NEUMANN, 2003).

O ajuste biológico é fundamental para o preparo ao parto, além de tornar a progenitora apta para as necessidades que a prole apresentará ao nascer, auxiliando no surgimento das interações mãe-prole (LEVY, 2016). Dentre os hormônios envolvidos, destacam-se os esteroides sexuais, progesterona e estradiol, a prolactina (PRL) e a ocitocina (OCT).

Logo após a implantação do embrião, uma das primeiras modificações hormonais na gestante é o aumento dos níveis de progesterona. Em roedores, a cópula é um estímulo para a secreção da

PRL, que em conjunto com a gonadotrofina coriônica garantem a manutenção do corpo lúteo, permitindo um aumento significativo da secreção da progesterona, até que a placenta esteja desenvolvida e com capacidade de secretar este hormônio ao longo da gestação (RUSSELL et al., 2001).

O período gestacional também é marcado por uma menor responsividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) a estímulos estressores. Essa supressão do eixo é desencadeada indiretamente pela progesterona. A alopregnenolona, metabólito da progesterona, tem ação no sistema nervoso central reduzindo a ativação do eixo. Suas ações se dão por meio dos receptores GABA, prolongando o tempo de abertura dos canais de cloro, no núcleo paraventricular, reduzindo a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH). A ação da alopregnenolona também se estende através dos opióides endógenos, os quais têm seus níveis elevados através do metabólito, aumentando sua ação inibitória pré-sináptica em neurônios noradrenérgicos do núcleo do trato solitário, diminuindo assim a estimulação do núcleo paraventricular e consequente secreção de CRH (BRUNTON et al., 2008; BRUNTON e RUSSELL, 2010).

Durante a gestação de roedores, os níveis de estradiol permanecem baixos até a metade da prenhez, enquanto os níveis de progesterona encontram-se elevados. Alguns dias antes do parto, a progesterona apresenta uma abrupta redução, enquanto os níveis de estradiol se elevam (NUMAN; INSEL, 2003).

Diferentemente dos demais hormônios hipofisários, a PRL apresenta um controle predominantemente inibitório através da dopamina. Durante o período gestacional e lactação, ocorrem adaptações que permitem uma maior produção da PRL. O lactogênio placentário é responsável por inibir a ação dopaminérgica, e juntamente com o estímulo da encefalina, estimula a secreção de PRL. Além disso, a sucção da prole é um potente estimulador da secreção do hormônio (GRATTAN, 2015).

O período gestacional também está associado à hiperfagia. O aumento da ingesta alimentar é importante já que permite o acúmulo de reservas energéticas que garantem a demanda necessária tanto na gestação quanto no período de lactação. O perfil hiperfágico pode ser associado a um conjunto de fatores, como a ação do lactogênio placentário, ação da progesterona e uma resistência a leptina (AUGUSTINE e GRATTAN, 2008). Com a ação de lactogênio placentário e PRL, ocorre um aumento da expressão do neuropeptídeo Y no núcleo arqueado, estimulando a hiperfagia (GARCIA et al., 2003).

A PRL ainda apresenta um papel de estímulo da neurogênese que se inicia na gestação, em regiões que irão auxiliar em comportamentos necessários no período de pós-parto, como a manutenção do cuidado materno com a prole e redução do comportamento do tipo ansioso (LARSEN e GRATAN, 2012). Estudos demonstram que a administração de PRL em fêmeas virgens induz o comportamento materno (CM) (BRIDGES et al., 1985), enquanto a supressão da secreção com haloperidol reduz o comportamento típico em fêmeas durante o pós-parto (STERN e KEER, 1999).

A OCT é um hormônio neuropeptídico sintetizado no hipotálamo, nos núcleos paraventricular e supraóptico, e liberado na circulação periférica através da neurohipófise. Dentre suas ações, ressalta-se o papel de estimulação da contração uterina durante o parto, assim como a ejeção de leite durante a lactação (GIMPL e FAHRENHOLZ, 2001). Os neurônios ocitocinérgicos apresentam projeções para diversas regiões encefálicas fundamentais para o CM, como a área pré-óptica medial (APOM), núcleo leito da estria terminal, área tegmentar ventral, estriado ventral e amígdala (KIM e STRATHEARN, 2016).

Em roedores, a OCT também é secretada em resposta a agentes estressores. O aumento da secreção deste hormônio no período final da gestação pode desencadear o parto prematuro, de modo que é importante que os neurônios ocitocinérgicos sejam mantidos inativos durante o período gestacional, acumulando estoques do hormônio e consequentemente, impedindo que o parto ocorra de maneira precoce (BRUNTON e RUSSELL, 2010). A alopregnenolona também desempenha um papel fundamental na restrição da secreção de OCT (RUSSELL e BRUNTON, 2006).

Modulações dos esteroides sexuais permitem a avaliação de sua participação na adaptação para cuidado com a prole. O estudo de Siegel e Rosenblatt (1975) mostra que a administração de estradiol em ratas virgens reduz a latência para o início do CM. Já Doerr e colaboradores (1981) mostraram que a administração de progesterona não é capaz de reduzir a latência do cuidado materno em fêmeas virgens, porém corroborando os dados de Siegel e Rosenblatt (1975), eles confirmaram que o estradiol apresenta efeito de antecipação do cuidado com a prole.

Estudos demonstram a correlação entre a OCT e o cuidado materno. Por exemplo, a ausência de OCT em camundongos *knockout* afeta negativamente o cuidado materno, o qual é restaurado após injeção subcutânea desse hormônio (RILLING e YOUNG, 2014).

Durante o período de lactação a PRL age no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas reduzindo a secreção dos hormônios hipofisários que

regulam a secreção dos hormônios gonadais. Dessa forma, a hiperprolactinemia exerce um papel na redução da fertilidade, evitando que a fêmea tenha novas gestações em períodos de amamentação (GRATTAN et al., 2007).

## **1.2 Glicocorticoides durante a gestação**

A todo o momento os organismos vivos são desafiados por estímulos estressores internos ou externos, que ameaçam a manutenção da homeostase (JOHNSON et al., 1992). Estes estímulos estressores desencadeiam uma cascata de sinalização, resultando na liberação de glicocorticoides e adrenalina pela glândula adrenal. A ativação do eixo HHA leva a secreção de glicocorticoides pelo córtex da adrenal, enquanto a inervação simpática direta desencadeia a secreção de adrenalina pela medula adrenal (PECKETT et al., 2011).

Os glicocorticoides são relevantes para a adaptação ao estresse, pois regulam o fornecimento da energia por meio da indução de proteólise, glicólise, gliconeogênese e lipólise. Também participam na consolidação da memória, controle central da atividade metabólica, comportamento alimentar e atividade reprodutiva por meio da modulação de síntese e/ou secreção de neuropeptídeos e/ou neurotransmissores (UCHOA et al., 2014).

Desde a introdução dos glicocorticoides para tratamento de artrite reumatóide, no final da década de 40, muito se têm estudado sobre o fármaco, visando o aumento de benefícios clínicos e redução dos efeitos colaterais (CHROUSOS et al., 2000). Visto que estes esteroides apresentam atividade em diversos sistemas, as indicações terapêuticas apresentam um amplo espectro, podendo ser utilizados no tratamento de hipoglicemia, hipercalcemia e maturação celular dos pneumócitos tipo II (LONGUI, 2007).

Apesar da ampla utilização clínica dos glicocorticoides, seus efeitos adversos e toxicidade são fatores relevantes na escolha do fármaco para terapia, visto que o tratamento pode desencadear efeitos neuropsiquiátricos, insuficiência adrenal, entre outros (CHROUSOS et al., 2000).

Estudos em animais demonstram o grande número de efeitos deletérios a que o uso de glicocorticoides pode ser associado. Como exemplo, tem-se que a utilização de dexametasona (DEX) em ratos causa aumento da morte celular no hipocampo, além de redução do peso cerebral (DUKSAL et al., 2009), bem como redução da neurogênese no córtex e na massa cerebral total (KANAGAWA et al., 2006). Além de

estudos que demonstram os efeitos neuronais, a utilização de elevadas doses de DEX leva a atrofia das glândulas adrenais, supressão do eixo HHA, além do aumento dos triglicerídeos e colesterol total, assim como hiperinsulinemia e hiperleptinemia (CHIMIN et al., 2014).

Também se verificou em ratos machos que após a administração de DEX, há redução de OCT e corticosterona e aumento de peptídeo natriurético atrial (LAUAND et al., 2007), podendo agir também de maneira a reduzir a secreção de PRL (DURLO et al., 2004). A redução da secreção de OCT e PRL também pode ser observada em ratas durante o período de lactação após tratamento com DEX (VILELA e GIUSTI-PAIVA, 2011). Outros estudos em ratos demonstram que os glicocorticoides tem ainda ação na homeostase da glicose, de modo que a administração desta classe reduz a sensibilidade periférica a insulina, levando a resistência à insulina de maneira dose dependente. Além disso, a administração de DEX eleva a glicemia e insulinemia, aumentando os triglicerídeos e diminuindo a corticosterona plasmática e ainda o peso da adrenal (RAFACHO et al., 2008).

Experimentalmente, fêmeas que receberam injeção de corticosterona durante e após a gravidez, apresentam uma elevação no nível de corticosterona plasmática apenas no período pós-parto, demonstrando que exposições a glicocorticoides durante este período podem impactar de maneira mais intensa no eixo HHA, além da maior suscetibilidade ao estresse (BRUMMELTE e GALEA, 2010).

O período perinatal influencia o desenvolvimento encefálico, assim como a organização neuronal. Estudos demonstram que experiências adversas ou estresse materno durante a gestação resultam em profundas alterações fisiológicas e comportamentais na prole, aumentando a suscetibilidade a doenças na vida adulta (BRUNTON e RUSSELL, 2011). A administração de glicocorticoides durante o período pré-natal reduz o peso do encéfalo ao nascimento, retarda a maturação de neurônios e a mielinização em ovinos. Já em macacos, observou-se que o tratamento com DEX no período pré-natal leva a degeneração neuronal no hipocampo, de maneira dose dependente (SECKL e MEANEY, 2004). Níveis aumentados de corticosterona em fêmeas são associados com o aumento do comportamento do tipo ansioso na prole (ZAGRON e WEINSTOCK, 2006).

Dentre as alterações causadas pela administração de DEX durante a lactação, destaca-se a redução dos cuidados maternos, redução dos níveis sistêmicos de OCT e PRL, bem como da ejeção de leite, além da redução do comportamento agressivo (VILELA e GIUSTI-PAIVA, 2011). A análise de comportamentos do tipo ansioso por meio do teste

do labirinto em T e do campo aberto demonstra que fêmeas que receberam DEX durante a lactação apresentam uma redução na latência de escape no labirinto em T e redução de entradas no campo aberto, prejudicando a ansiólise existente no período de lactação, induzindo um estado de ansiedade no pós-parto (VILELA et al., 2012).

A exposição a corticosteroides exógenos é tempo e dose-dependente. A administração de diferentes doses de corticosterona atenua o aumento de peso em ratas prenhas, bem como no pós-parto. Em relação aos cuidados maternos, a administração de corticosterona durante e após a gestação não altera os comportamentos, no entanto, observa-se um aumento do comportamento do tipo depressivo no teste de nado forçado em ratas que receberam corticosterona após o parto (BRUMMELTE e GALEA, 2010).

Visto que o período pré-natal traz diversas alterações hormonais que visam o sucesso gestacional, garantindo a manutenção da espécie, e que glicocorticoides podem apresentar efeitos prejudiciais para estes mecanismos, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos da administração da DEX, um glicocorticoide sintético, utilizado durante o período gestacional, sobre parâmetros comportamentais de fêmeas durante o período pós-parto. Desta forma, hipotizamos que, pelo fato da DEX interferir em hormônios importantes no período gestacional e do pós-parto, ela afete parâmetros emocionais que levem ao aumento de comportamentos tipo depressivo e ansioso, bem como cause prejuízos cognitivos na progenitora. Tendo em vista que o tratamento com DEX causa ainda uma alta mortalidade da prole no período neonatal, nossa hipótese é de que, mesmo quando administrado durante a gestação, este glicocorticoide sintético cause um efeito de longo prazo, reduzindo os comportamentos de cuidado com a prole, o que contribuiria para esses altos índices de mortalidade.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o cuidado com a prole e parâmetros comportamentais no pós-parto de ratas expostas a DEX durante o período gestacional.

### **2.2 Objetivos específicos**

-Avaliar se a DEX reduz o ganho de peso no período gestacional de ratas;

-Avaliar se há redução do cuidado com a prole em ratas expostas a DEX durante a gestação;

-Avaliar se a DEX aumenta o comportamento do tipo ansioso em ratas após o parto,

-Avaliar se a DEX aumenta o comportamento do tipo depressivo em ratas após o parto,

-Avaliar se há alterações de memória e cognição no pós-parto de ratas expostas a DEX durante a gestação.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 62 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com idade entre 80 e 125 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, divididas em 3 lotes experimentais, em decorrência da disponibilidade de espaço físico para realização dos experimentos (quadro 1). Os animais foram mantidos no biotério 066 até o início do protocolo de acasalamento, sendo posteriormente transferidos para o biotério de gestantes. Ambos os biotérios foram mantidos com temperatura controlada ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro invertido (luzes apagadas as 06 h e acesas as 18 h). Os animais foram distribuídos randomicamente em número de 5 por caixa de polipropileno (50 x 30 x 10 cm) forrada com maravalha com água e ração *ad libitum*. Após o acasalamento, as ratas foram separadas em número de 3 a 4 por caixa, variando de acordo com o índice de prenhez por dia e 1 dia antes de iniciar o tratamento com DEX (13º dia), os animais foram individualizados, permitindo o tratamento adequado. Para o teste de RCO, foi utilizado um grupo de ratas virgens, com idade de 90 dias, mantidas em um biotério juntamente com machos, com condições de temperatura e iluminação igual aos demais animais utilizados nos experimentos. Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob protocolos PP00782 e PP00842.

#### 3.2 Protocolo de Acasalamento

O protocolo de acasalamento iniciou-se com pareamento, durante 7 dias, onde as caixas das fêmeas foram colocadas lado a lado as caixas machos, a fim de habituar os animais no mesmo ambiente e odores. Após esse período, iniciou-se o acasalamento, onde os animais foram distribuídos randomicamente em caixas de polipropileno (50 x 30 x 10 cm) com 3 fêmeas e 1 macho, variando o número conforme o índice de prenhez por dia. O período de acasalamento foi de 7 dias.

Para confirmação da prenhez, diariamente foi realizado o lavado vaginal, utilizando Pipeta de Pasteur 0,5 mL e solução salina 0,9%. O plug vaginal foi confirmado pela presença de células cornificadas, indicando a fase estro que representa o período fértil do ciclo estral das roedoras, em conjunto com espermatozoides, indicando a cópula (figura

1). As ratas com plug vaginal foram separadas e alojadas no biotério de gestantes, sendo este considerado o dia 0 de gestação.

**Quadro 1.** Distribuição dos experimentos entre os lotes.

<b>Lote 1:</b> Grupo controle prenhe e grupo tratado prenhe	Comportamento Materno Teste do Ninho Labirinto em Cruz Elevado Nado Forçado Repetido
<b>Lote 2:</b> Grupo controle prenhe e grupo tratado prenhe	Comportamento Materno Teste do Ninho Labirinto em Cruz Elevado Nado Forçado Repetido
<b>Lote 3:</b> Grupo controle virgem, grupo controle prenhe e grupo tratado prenhe	Teste de reconhecimento de objetos

**Figura 1.** Plug vaginal - Células cornificadas e espermatozoides



Células cornificadas e espermatozoides representando o plug vaginal.

### 3.3 Tratamento com Dexametasona

O tratamento foi realizado entre o 14º e 19º dia, com dexametasona (Decadron® 4mg/mL), diluída na água de beber, na dose de 0,2 mg/mL/kg. A partir do 13º dia de prenhez as ratas foram individualizadas nas caixa de polipropileno, disponibilizando 200 mL de água por dia. Com base no volume de ingestão hídrica e massa corpórea, verificados diariamente, foi realizado o cálculo para a dose do fármaco, adequando o valor para 200 mL. Após análise do volume de água

ingerido, a solução restante foi descartada, preparando nova solução do fármaco diluído em 200 mL (grupo tratado) ou apenas o mesmo volume de água (grupo controle - CTL). O procedimento foi realizado diariamente no período da manhã, até o 20º dia.

### **3.4 Protocolos Experimentais**

#### **3.4.1 Acompanhamento do ganho de massa**

No dia do início do acasalamento foi verificado o peso das ratas. Durante o período gestacional, o ganho de massa corpórea foi acompanhado a cada 3 dias, até início do tratamento, sendo então verificado diariamente entre o 14º e 20º dia de gestação, para adequação da dose de DEX. Em relação aos filhotes, todos foram pesados e medidos ao nascer.

#### **3.4.2 Comportamento materno**

O teste de CM foi realizado no dia do parto (dia 0), no período da manhã. As ratas foram separadas de seus filhotes durante 30 minutos, retornando para a caixa original e iniciando o teste comportamental.

Para o experimento, os filhotes foram posicionados em lado oposto ao original e o ninho foi desconstruído. A caixa permaneceu em um ambiente escuro, seguindo o ciclo claro-escuro do biotério, com iluminação de luz vermelha (4W), com a mesma intensidade de luz em todos os pontos da caixa, avaliado com auxílio de um luxímetro

O teste foi gravado durante 20 minutos para posterior análise através do software EthoWatcher®. Foram avaliadas a duração (tempo gasto em porcentagem) e/ou frequência (número de vezes da realização do comportamento) dos seguintes comportamentos (Adaptado de: (COVERDILL et al., 2012)):

**-Permanência no ninho:** tempo de permanência no ninho ou sobre os filhotes.

**-Cuidado com os filhotes:** duração e frequência de comportamentos pró-ativos com a prole, como carregar, lambar, aproximação e procura dos filhotes na caixa.

**-Construção de ninho:** duração do comportamento de construção de ninho, através do ato de empurrar a maravalha em formato de ninho ou para próximo dos filhotes. Não foi considerado construção de ninho quando o animal apenas mergulhava na maravalha.

**-Permanência fora do ninho:** tempo em que o animal permaneceu fora do ninho, sem exploração da caixa e sem contato com os filhotes.

**-Exploração da caixa:** tempo em que o animal explorou a caixa, horizontalmente com descolamento sobre ou sob a maravalha e verticalmente com ou sem deslocamento, sem contato com os filhotes e sem locomoção característica de construção de ninho.

**-Auto-limpeza:** frequência da limpeza da superfície corporal, através do ato de passar a língua, dentes e/ou patas dianteiras pelo corpo.

### 3.4.3 Teste do Ninho

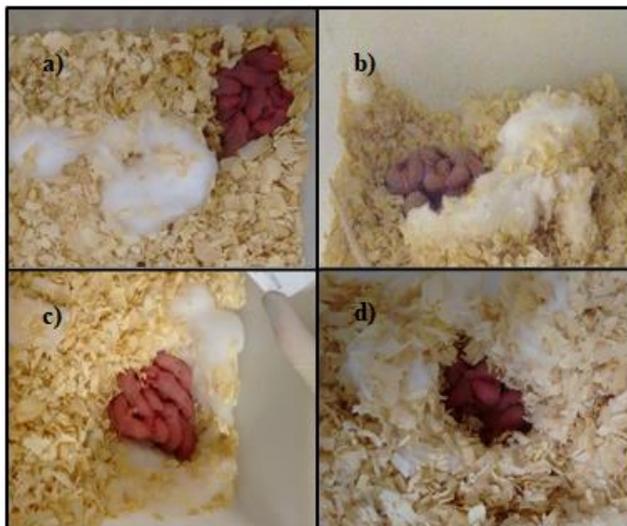
O teste foi realizado em sequência ao CM, para avaliação da construção de ninho a partir de 4,0 g de algodão disponibilizados dentro da caixa de alojamento da fêmea com a prole. Após 36 horas o ninho foi classificado por escores (0-3) de acordo com a qualidade do ninho construído (Adaptado de (VENEROSI et al., 2008; CUTULI et al., 2015)).

-Ausência de ninho (0): Presença de algodão disperso na caixa, sem forma de ninho e sem sinal de exploração.

-Ninho primitivo (1): Algodão moldado em formato plano, circundando parte do ninho.

-Ninho em taça (2): Algodão moldado em formato côncavo, circundando todo o ninho.

-Ninho com teto (3): Algodão moldado em formato de taça, com material recobrindo o ninho, formando um teto.

**Figura 2.** Construção de ninho

Construção de ninho. a) Ausência de ninho (escore 0). b) Ninho primitivo (escore 1). c) Ninho em taça (escore 2). d) Ninho com teto (escore 3).

### 3.4.5 Labirinto em Cruz Elevado

O teste foi realizado no dia 1 após o parto, no período entre 17:00 e 18:00 horas (final da fase escura). O aparato consistiu por duas passarelas de madeira, dispostas perpendicularmente, formando uma cruz simétrica, sendo cada braço com 50 centímetros de comprimento e 10 centímetros de largura (Fig. 3). Uma das passarelas era fechada por paredes laterais de vidro fumê, formando dois braços fechados, enquanto a outra apresentava apenas uma pequena borda lateral de 1 centímetro, para se evitar quedas dos animais, formando os dois braços abertos. A iluminação foi ordenada em forma de cruz, com 4 lâmpadas fluorescentes de 15 W cada, posicionadas 100 cm acima do aparato. Os níveis de iluminação foram 249 lux nos braços abertos e 197 lux nos braços fechados, formando um gradiente de luminosidade de 52 lux entre os braços abertos e fechados.

Os animais foram colocados individualmente na região central do labirinto, virados para o braço fechado. O teste foi filmado durante 5

minutos para posterior análise com auxílio do software Ethowatcher®. Entre a exposição de diferentes animais, o aparato foi higienizado com álcool 20%, a fim de se evitar pistas odoríferas ao animal seguinte. Foram analisadas a duração (tempo gasto em porcentagem) e frequência (número de vezes que o comportamento foi realizado) das variáveis espaço-temporais e apenas a frequência das variáveis etológicas (RODGERS et al., 1997).

### **Variáveis espaço-temporais – Duração e Frequência:**

-Número de entradas nos braços abertos e braços fechados: Frequência de entradas, confirmadas a partir da colocação das quatro patas dos animais em cada um dos braços.

-Número total de entradas: Soma do número de entradas nos braços abertos e fechados.

-Número de entradas nos braços abertos (%): Cálculo de porcentagem do número de entrada nos braços abertos ( $\text{Número de entradas nos braços abertos} \times 100 / \text{Número total de entradas}$ ).

-Tempo de permanência nos braços abertos: Duração da permanência nos braços abertos, iniciando a contagem a partir da colocação das quatro patas dos animais em cada um dos braços.

-Tempo de permanência nos braços fechados: Duração da permanência nos braços fechados, iniciando a contagem a partir da colocação das quatro patas dos animais em cada um dos braços.

### **Variáveis etológicas - Frequência:**

-SAP (Stretched-Attend-Postures): Movimento onde o animal sai de um dos braços fechados apenas com as patas dianteiras e cabeça, investigando o ambiente em sua volta.

-Imersão de cabeça: movimento exploratório no braço aberto, onde o animal projeta a cabeça em direção ao chão, nas bordas dos braços abertos.

-Exploração vertical: Movimento vertical no qual o animal mantém seu corpo erguido somente pelas patas traseiras.

-Auto-limpeza: Movimentos de fricção com as patas dianteiras ou lambidas na cabeça, orelha, tronco, genitais ou cauda.

**Figura 3.** Labirinto em Cruz elevado.



Aparato utilizado para os experimentos de labirinto em cruz elevado.

### **3.4.6 Nado forçado repetido**

O teste consistiu em 4 exposições do animal, em diferentes dias, em uma cuba (Fig. 4) com água a 25°C. A cuba era de PVC opaco, com capacidade para 25 L. O volume de água adicionado na cuba foi o suficiente para impedir que o animal encostasse as patas no fundo ou que escalasse saindo do aparato. Os experimentos ocorreram no período entre 12:00 – 15:00 (fase escura).

A primeira sessão, o pré-teste, ocorreu no dia 2 pós-parto, seguido da sessão teste, 24 horas após da sessão pré-teste, no dia 3 pós-parto. Os retestes 1 e 2 foram realizados 7 dias e 14 dias após o pré-teste, respectivamente (dias 9 e 16 pós-parto). O pré-teste teve duração de 15 minutos, enquanto as demais sessões tiveram duração de 5 minutos (quadro 2) (DOMINGUES, et al., 2018). O teste foi gravado com auxílio de uma webcam posicionada cerca de 30 cm acima da cuba, para posterior análise através do EthoWatcher®. Ao final das exposições, os animais foram cuidadosamente secos e recolocados em suas caixas.

Foram avaliadas a duração (tempo gasto em segundos com os comportamentos) e frequência (número de vezes que o comportamento foi realizado) das seguintes variáveis:

**-Escalada:** Movimento vertical com as patas dianteiras ao redor da cuba ou no meio da mesma, com ou sem deslocamento.

**-Nado:** Movimento horizontal das patas dianteiras, com deslocamento pela cuba.

**-Mergulho:** Movimento em que o animal coloca todo o corpo e cabeça embaixo da água.

**-Imobilidade:** Ausência de movimentação ativa, com movimentos de patas apenas para manter a cabeça fora da água.

Durante a análise, para dar início à contagem da duração e frequência de comportamento, aguardou-se 2 segundos de duração após o início de cada um dos comportamentos.

**Quadro 2.** Distribuição e duração das sessões de teste do nado forçado repetido.

Sessão	Duração	Dia
Pré-teste	15 minutos	2º dia de pós-parto
Teste	5 minutos	3º dia de pós-parto (24 horas após o pré-teste)
Reteste 1	5 minutos	9º dia de pós-parto (7 dias após o pré-teste)
Reteste 2	5 minutos	16º dia de pós-parto (14 dias após o pré-teste)

**Figura 4.** Cuba para o teste de Nado Forçado.



Aparato utilizado para os experimentos de nado forçado repetido.

### 3.4.7 Reconhecimento de objetos

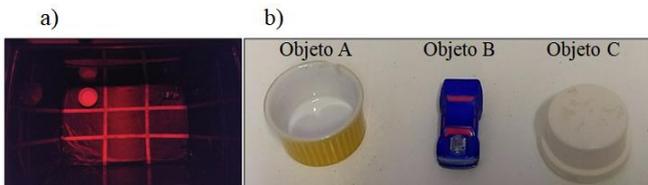
O teste consistiu de 5 sessões que se iniciaram no dia 1 pós-parto e foram realizadas em um aparato de polipropileno preto (30 x 19 x 13). As 3 primeiras sessões foram destinadas a habituação do animal na caixa, com duração de 15 minutos (pré-testes). A quarta exposição,

denominada treino, também teve duração de 15 minutos, colocando o objeto A (cumbuca de porcelana) para livre exploração. 3 horas após o treino, foi realizado o teste 1, com duração de 5 minutos, colocando os objetos A e B (carrinho), em extremidades laterais da caixa. Passadas 24 horas do treino, foi realizado o teste 2 também com duração de 5 minutos, sendo colocados os objetos A e C (cano), também em extremidades laterais da caixa, para livre exploração. Entre a exposição de diferentes animais, o aparato foi higienizado com álcool 20%, a fim de se evitar pistas odoríferas ao animal seguinte.

**Quadro 3.** Distribuição das sessões no teste de reconhecimento de objeto.

Sessão	Duração	Dia	Objetos
<b>Pré-teste 1</b>	15 minutos	1º dia de pós-parto	Sem objetos
<b>Pré-teste 2</b>	15 minutos	2º dia de pós-parto	Sem objetos
<b>Pré-teste 3</b>	15 minutos	3º dia de pós-parto	Sem objetos
<b>Treino</b>	15 minutos	4º dia de pós-parto	Objeto A
<b>Teste 1</b>	5 minutos	5º dia de pós-parto (3 horas após o treino)	Objeto A + B
<b>Teste 2</b>	5 minutos	5º dia de pós-parto (24 horas após o treino)	Objeto A + C

**Figura 5.** Teste de Reconhecimento de Objetos.



Aparatos utilizados para o teste de reconhecimento de objetos. a) Caixa de reconhecimento de objetos. b) Objetos utilizados nas sessões.

Visto que os testes ocorreram no período entre 09:00 – 15:00 (fase escura), onde os animais estão com luzes apagadas, o aparato foi iluminado apenas com uma lâmpada vermelha (4 W), sendo mantida a mesma intensidade de luz em todos os pontos da caixa com auxílio de um luxímetro.

Todas as sessões foram filmadas, sendo analisadas apenas o treino, teste 1 e teste 2, para avaliação da exploração dos objetos. No treino, foi avaliada a duração em porcentagem do tempo total em que o animal explorou o objeto A. Já no teste 1 e 2 a análise foi por meio do índice de reconhecimento (IR), onde foi dividido o tempo de exploração de cada objeto pelo tempo de exploração total dos objetos de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Objeto } x}{\text{Objeto } x + y}$$

Assim como os demais testes, o experimento foi gravado com auxílio de uma webcam para posterior análise através do software Ethowatcher®.

### **3.4.8 Atividade locomotora**

O teste foi realizado no primeiro dia de pré-teste destinado ao RCO, sendo analisados os primeiros 5 minutos da sessão que teve duração de 15 minutos. As condições da caixa e luminosidade estão descritas no tópico anterior.

A análise foi através do software Ethowatcher®, com contagem do número total de quadrantes percorridos por cada animal.

### **3.5 Eutanásia**

Passados 21 dias após o parto, ao final do período de lactação, os animais foram anestesiados com uretana (1,3 g/kg, i.p.), sendo posteriormente avaliados os reflexos palpebral, pupilar e interdigital confirmando o estado anestesiado cirúrgico dos animais. Após, foi realizada coleta de sangue intracardíaca, que foi centrifugado a 400 G e o plasma armazenado a -20°C para posteriores estudos.

Para a retirada dos órgãos, após a coleta de sangue, foi feita uma incisão longitudinal mediana na pele e musculatura, iniciada na região pré-pubiana indo na direção caudo-cranial até o manúbrio. O diafragma foi perfurado e cortado, assim como as costelas, para expor o coração e realizar a perfusão intracardíaca. O ventrículo esquerdo foi perfurado com uma agulha conectada a um cateter ligado a frascos contendo solução de sacarose (9,25%) heparinizada ou paraformaldeído 4% dissolvido em PBS (0,1 M). Foi realizado um pequeno corte no átrio direito do animal, iniciando-se a passagem das soluções, primeiramente

200 mL de sacarose, retirando o sangue dos tecidos, seguido de aproximadamente 200 mL de paraformaldeído 4% até enrijecimento do animal.

Posteriormente a perfusão, foram retirados o encéfalo, glândulas adrenais e ovários, que foram pesados. O armazenamento das adrenais e ovários foi em paraformaldeído 4% e o encéfalo armazenado inicialmente em paraformaldeído 4%, passado para sacarose 30% após 24 horas e refrigerado. Por fim, o encéfalo foi congelado com nitrogênio líquido e mantido a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os órgãos permanecem armazenados para estudos futuros.

### 3.6 Análise dos vídeos e estatística

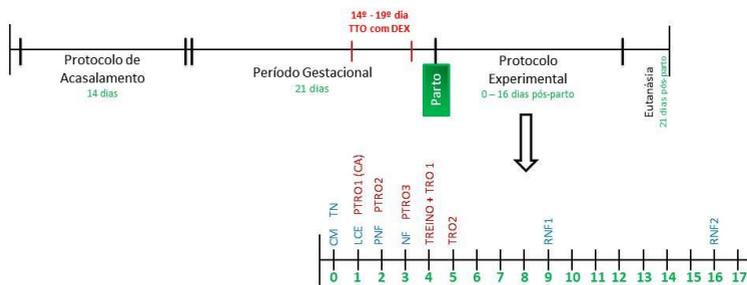
Com exceção do teste do ninho, todos os testes experimentais foram gravados com auxílio de uma webcam para posterior análise através do software Ethowatcher®. A análise dos vídeos foi à cega.

Inicialmente, avaliou-se a presença de *outlier* (resultados que se diferenciam drasticamente dos demais), através do cálculo de média  $\pm$  2x desvio padrão, sendo estes eliminados das análises estatísticas. Seguido isso, os dados passaram pelo teste de Kolgomorov-Smirnov para avaliação da distribuição amostral e escolha do teste estatístico mais adequado, paramétrico ou não-paramétrico.

Os testes de CM, teste do ninho, LCE, atividade locomotora e pesos da prole e dos órgãos foram analisados através de Teste T Student ou Mann-Whitney, de acordo com a normalidade da distribuição dos dados, verificada através do teste de D'Agostino-Pearson.

O ganho de peso durante a gestação foi avaliado através de One-way ANOVA de medidas repetidas. Já o TNFr foi analisado através de ANOVA de medidas repetidas e post-hoc de Tukey ou Friedmann e post-hoc de Dunn, de acordo com a distribuição dos dados, para avaliação da repetição. Já o tratamento foi analisado teste a teste, através do Teste T Student ou Mann-Whitney. Para avaliação do RCO, foi utilizado o teste One-way ANOVA.

### 3.7 Desenho Experimental



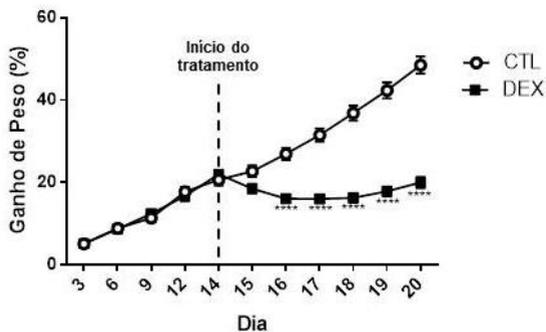
Teste		Lote
CM	Comportamento Materno	Lote 1 e 2
TN	Teste do Ninho	Lote 1 e 2
LCE	Labirinto em Cruz Elevado	Lote 1 e 2
PNF	Pré-teste Nado Forçado repetido	Lote 1 e 2
NF	Nado Forçado Repetido	Lote 1 e 2
RNF	Reteste Nado Forçado Repetido (1 e 2)	Lote 1 e 2
CA	Campo Aberto	Lote 3
PTRO	Pré-teste Reconhecimento de Objetos (1, 2 e 3)	Lote 3
TREINO	Treino do Reconhecimento de Objeto	Lote 3
TRO	Teste de Reconhecimento de Objetos (1 e 2)	Lote 3

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Ganho de peso durante a gestação

A avaliação do ganho de peso em porcentagem mostrou interação significativa dos fatores “dia” e “tratamento com DEX” ( $p < 0,0001$ ;  $F_{10,360} = 146,6$ ). Além disso, houve efeito isolado significativo tanto do fator “dia” ( $p < 0,0001$ ,  $F_{10,360} = 367,5$ ) quanto do fator “tratamento com DEX” ( $p < 0,0001$ ;  $F_{10,36} = 37,19$ ). A análise post-hoc demonstrou que o ganho de peso é afetado pelo tratamento com DEX a partir do 16º dia, permanecendo menor que o grupo CTL até o 20º dia de gestação.

**Figura 6.** Média do comprimento e peso da prole ao nascer.

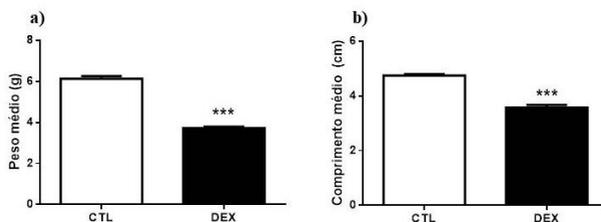


Ganho de peso (%) durante o período gestacional em grupos CTL e DEX. Valores expressos em média  $\pm$  EPM (%). Two-way ANOVA, Post-hoc Sidak

### 4.2 Medidas da prole e parâmetros murinométricos

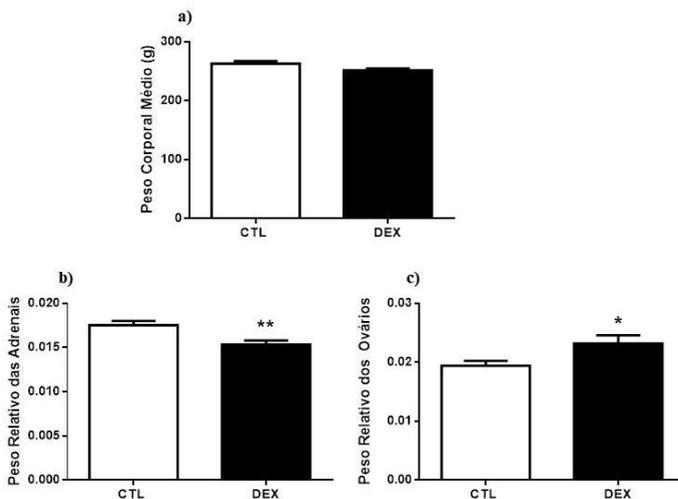
A exposição pré-natal à DEX reduziu o peso ao nascimento (Fig. 7A), assim como o comprimento da prole (Fig. 7B). As medidas de peso corporal e peso relativo dos órgãos, avaliadas 21 dias após o parto (pós-eutanásia) mostraram que os animais tratados com DEX durante a gestação não apresentaram alteração no peso em longo prazo (Fig. 8A), porém há uma redução do peso relativo das adrenais (Fig. 8B). Já em relação ao peso dos ovários (Fig. 8C), o tratamento com DEX aumentou esta medida quando comparada ao grupo CTL.

**Figura 7.** Média do comprimento e peso dos filhotes ao nascer.



Média das medidas de cada filhote no dia do nascimento. a) Peso médio da prole, **nCTL** = 17, **nDEX** = 11,  $p < 0,001$ . b) Comprimento médio da prole. , **nCTL** = 17, **nDEX** = 11,  $p < 0,001$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste T Student.

**Figura 8.** Média do peso corporal, das adrenais e dos ovários.

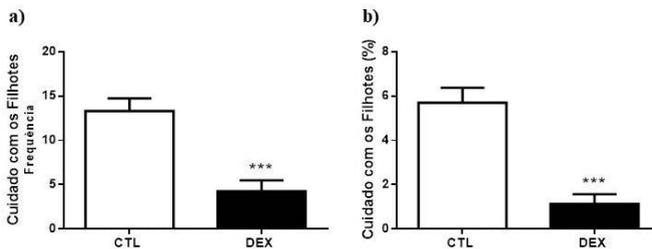


Medidas das ratas 21 dias após o parto. a) Peso corporal, **nCTL** = 22, **nDEX** = 20,  $p = 0,0560$ . b) Peso relativo das adrenais **nCTL** = 22, **nDEX** = 20,  $p = 0,0023$ . c) Peso relativo dos ovários **nCTL** = 22, **nDEX** = 20,  $p = 0,0200$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste T Student.

### 4.3 Comportamento Materno

Tanto a frequência de comportamentos de cuidado com os filhotes (Fig. 9A), quanto o tempo gasto com estes cuidados (Fig. 9B) foram significativamente reduzidos nas ratas tratadas com DEX em comparação às CTL.

**Figura 9.** Cuidado com os filhotes.



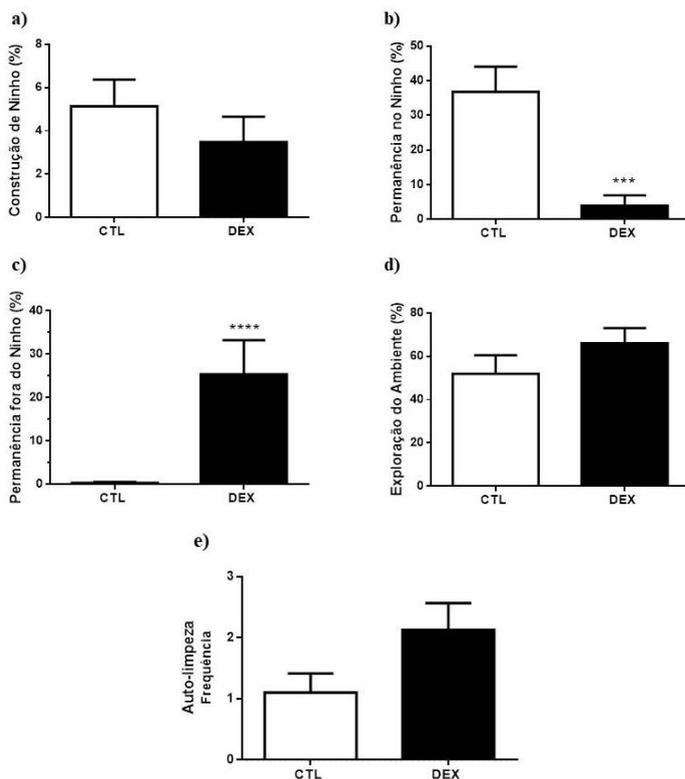
Avaliação do cuidado com a prole. a) Frequência do cuidado com os filhotes, **nCTL** = 10, **nDEX** = 8,  $p = 0,0003$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste T Student. b) Duração expressa em porcentagem de tempo do cuidado com os filhotes, **nCTL** = 10, **nDEX** = 8,  $p = 0,0002$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste Mann Whitney.

O tratamento com DEX não alterou o tempo de construção de ninho (Fig. 10A), assim como de exploração do ambiente (Fig. 10D) quando comparado ao grupo CTL. No entanto, houve uma redução significativa no tempo de permanência no ninho no grupo DEX (Fig. 10B), além do aumento significativo na duração de permanência fora do ninho no grupo tratado quando comparado ao animais CTL (Fig. 10C). Por fim, os resultados de auto-limpeza não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, mas observa-se uma tendência de maior frequência do comportamento no grupo DEX ( $p > 0,0697$ ; Fig. 9E).

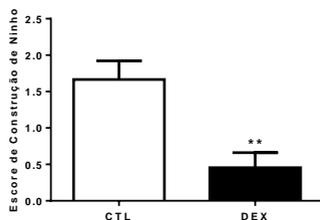
### 4.4 Teste do ninho

O tratamento com DEX durante a gestação afetou significativamente a construção de ninho, reduzindo o escore do ninho construído pelo grupo tratado em comparação ao grupo CTL (Fig. 11).

**Figura 10.** Comportamentos destinados ao cuidado com a prole, exploração da caixa e auto-limpeza.



Duração de comportamentos destinados ao cuidado com a prole ou exploração da caixa. a) Duração expressa em porcentagem de construção de ninho, **nCTL** = 10, **nDEX** = 8,  $p > 0,05$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste T Student. b) Duração expressa em porcentagem de permanência no ninho, **nCTL** = 10, **nDEX** = 8,  $p = 0,0093$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste Mann Whitney. c) Duração expressa em porcentagem de permanência fora do ninho, **nCTL** = 10, **nDEX** = 8,  $p < 0,0001$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste Mann Whitney. d) Duração expressa em porcentagem de exploração do ambiente, **nCTL** = 10, **nDEX** = 8,  $p > 0,05$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste T Student. e) Frequência de auto-limpeza durante o teste de comportamento materno. **nCTL** = 10, **nDEX** = 8,  $p > 0,0697$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste T Student.

**Figura 11.** Teste do Ninho.

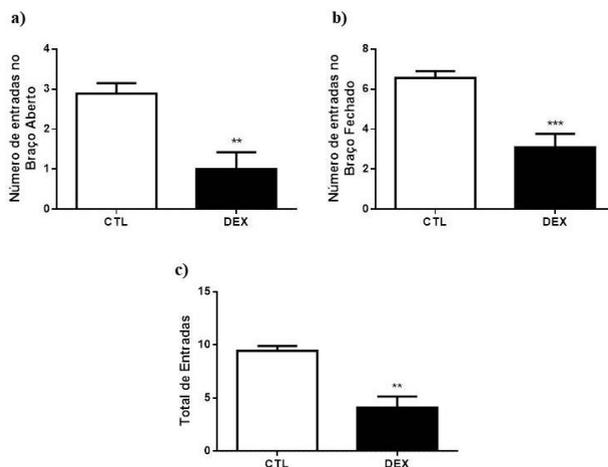
Escore do ninho construído. **nCTL** = 12, **nDEX** = 11,  $p = 0,0035$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste Mann-Whitney.

#### 4.5 Labirinto em Cruz Elevado

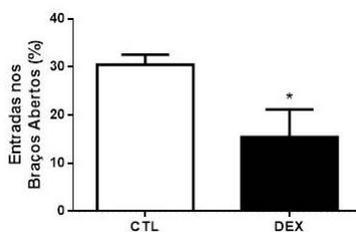
Em relação às variáveis espaço-temporais, o tratamento com DEX reduziu o número de entradas nos braços abertos (Fig. 12A), nos braços fechados (Fig. 12B), assim como o número total de entradas (Fig. 12C).

Em relação à porcentagem do número de entradas nos braços abertos, o tratamento com DEX reduziu o comportamento quando comparado ao grupo CTL (Fig. 13).

Quanto ao tempo de permanência nos braços abertos e fechados, o tratamento com DEX reduziu significativamente o tempo de permanência nos braços abertos e aumentou nos braços fechados (Fig. 14).

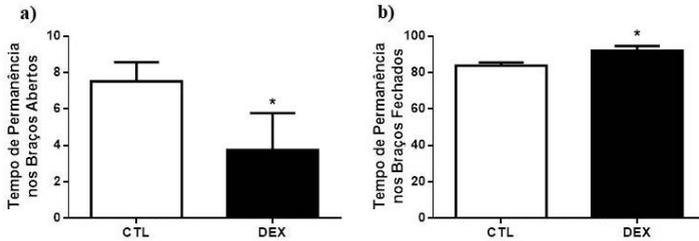
**Figura 12.** Número de entradas no LCE.

Número total de entradas. a) Número total de entradas nos braços abertos. **nCTL** = 9, **nDEX** = 11,  $p = 0,0022$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste T Student. b) Número total de entradas nos braços fechados. **nCTL** = 9, **nDEX** = 11,  $p = 0,0005$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste T Student. c) Número total de entradas. **nCTL** = 9, **nDEX** = 11,  $p = 0,0027$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste Mann-Whitney.

**Figura 13.** Porcentagem de entradas nos braços abertos.

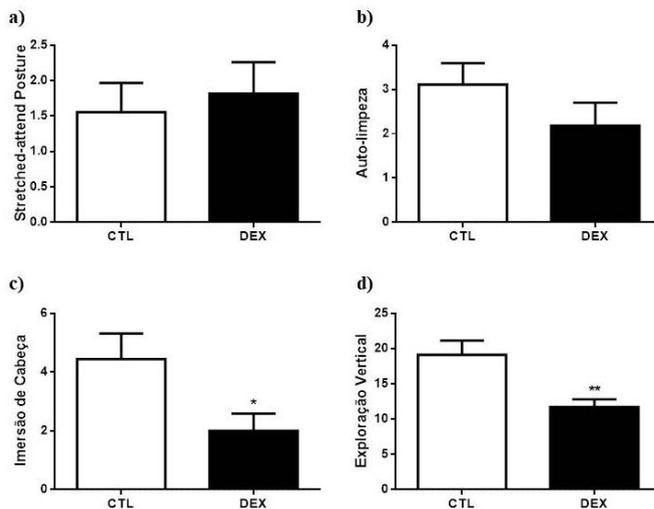
Número de entradas nos braços abertos representado em porcentagem. **nCTL** = 9, **nDEX** = 11,  $p = 0,0359$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste T Student.

**Figura 14.** Tempo de permanência nos braços abertos e fechados.



Tempo de permanência nos braços abertos e fechados representados em porcentagem. a) Tempo de permanência nos braços abertos. **nCTL** = 9, **nDEX** = 11,  $p = 0,0136$ . b) Tempo de permanência nos braços fechados. **nCTL** = 9, **nDEX** = 11,  $p = 0,0124$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste Mann-Whitney.

Entre as variáveis etológicas analisadas, não houve efeito do tratamento no SAP (Fig 15A) e na auto-limpeza (Fig. 15B). Já nas demais variáveis, imersão de cabeça (Fig. 15C) e exploração vertical (Fig. 15D) o tratamento com DEX reduziu significativamente a frequência destes comportamentos.

**Figura 15.** Variáveis etológicas.

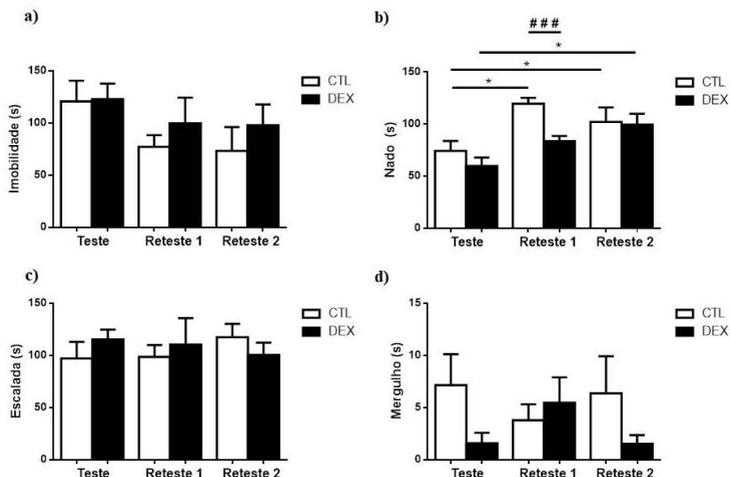
Variáveis etológicas. a) SAP. **nCTL** = 11, **nDEX** = 9,  $p = 0,6751$ . b) Auto-limpeza. **nCTL** = 11, **nDEX** = 9,  $p = 0,2147$ . c) Imersão de cabeça. **nCTL** = 11, **nDEX** = 9,  $p = 0,0273$ . d) Exploração vertical. **nCTL** = 11, **nDEX** = 9,  $p = 0,0033$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste T Student.

#### 4.6 Nado Forçado Repetido

O tratamento com DEX reduziu a duração do nado em comparação ao grupo CTL no reteste 1 ( $p = 0,0004$ ). As demais sessões, bem como os parâmetros analisados não foram alterados pelo tratamento (Fig. 16).

Em relação à análise das exposições, através de ANOVA de uma via de medidas repetidas, foi observado que a reexposição ao NFR nos retestes 1 e 2 aumentou a duração do nado no grupo CTL em ambas as sessões quando comparadas a sessão teste (Fig. 16B. Reteste 1  $p = 0,0194$ ; Reteste 2  $p = 0,0195$ ). Já no grupo DEX, houve um aumento na duração do nado no reteste 2 quando comparado ao teste (Fig. 16B.  $p = 0,0163$ ). Junto a isso, há uma tendência na redução da imobilidade no grupo CTL nos retestes 1 e 2 quando comparados a sessão teste (Fig. 16A.  $p = 0,0574$  e  $p = 0,0864$  respectivamente). Os demais parâmetros não foram afetados pela repetição do teste.

**Figura 16.** Duração dos comportamentos observados no teste do nado repetido.



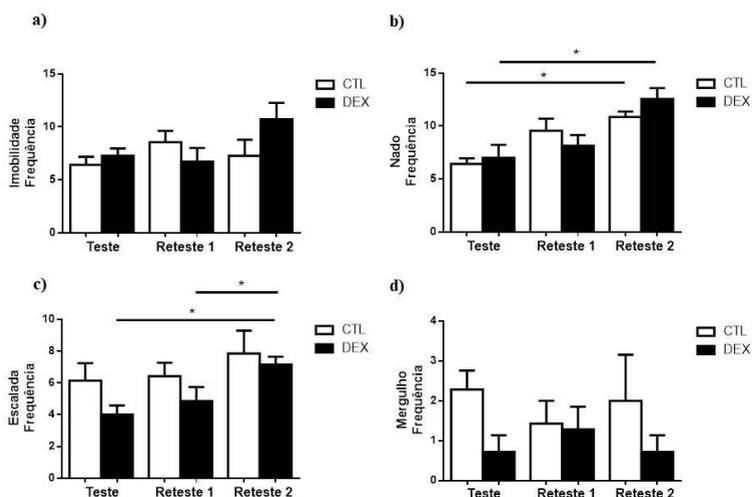
Duração em segundos dos comportamentos avaliados no TNF- $\alpha$  nas sessões teste, reteste 1 e reteste 2 nos grupos CTL (n = 7) e DEX (n = 7). a) Duração da imobilidade. b) Duração do nado. c) Duração da escalada. Análise de ANOVA de medidas repetidas seguida de post-hoc Tukey para avaliação do efeito repetição e teste T Student para avaliação do tratamento. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. d) Duração do mergulho. Friedman de medidas repetidas seguida de post-hoc Dunn para avaliação do efeito repetição e Mann-Whitney para avaliação do tratamento. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. \* Representa efeito da repetição e # do tratamento ( $p < 0,05$ ).

Não foram encontradas diferenças significativas decorrentes no tratamento com DEX na frequência dos comportamentos avaliados no teste, contudo observa-se uma tendência na redução do mergulho na sessão teste decorrente do tratamento com DEX ( $p = 0,0507$ ) (Fig. 17D).

Já em relação aos efeitos da repetição, houve uma tendência no aumento da imobilidade no grupo DEX no reteste 2 quando comparado ao reteste 1 (Fig. 17A) ( $p = 0,0760$ ). A frequência do nado apresentou um aumento no reteste 2 quando comparado a sessão teste, em ambos

os grupos (Fig. 17B) (CTL  $p = 0,0099$ ; DEX  $p = 0,0217$ ). A frequência da escalada foi afetada pelas repetições apenas no grupo DEX (Fig. 17C), com um aumento do comportamento no reteste 2 quando comparado tanto com o teste ( $0,0045$ ), assim como no quando comparado com o reteste 1 ( $p = 0,0217$ ). Não houve alteração significativa com relação à frequência de mergulho ao longo das repetições.

**Figura 17.** Frequência dos comportamentos observados no teste do nado repetido.

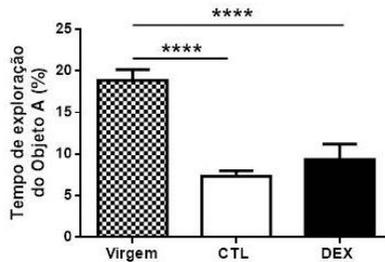


Frequência dos comportamentos avaliados no TNF-r nas sessões teste, reteste 1 e reteste 2 nos grupos CTL ( $n = 7$ ) e DEX ( $n = 7$ ). a) Frequência da imobilidade. b) Frequência do nado. c) Frequência do nado. ANOVA de medidas repetidas seguida de post-hoc Tukey para avaliação do efeito repetição e teste T Student para avaliação do tratamento. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. d) Frequência do mergulho. Friedman de medidas repetidas seguida de post-hoc Dunn para avaliação do efeito repetição e Mann-Whitney para avaliação do tratamento. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. \* representa efeito da repetição e # do tratamento ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7 Reconhecimento de Objetos

O tempo de exploração do objeto A na sessão treino do RCO não foi afetado pelo tratamento com DEX. Entretanto, houve efeito da gestação sobre o tempo de exploração, onde ambos os grupos gestantes exploraram o objeto A em proporção menor do que o grupo virgem (Fig. 18).

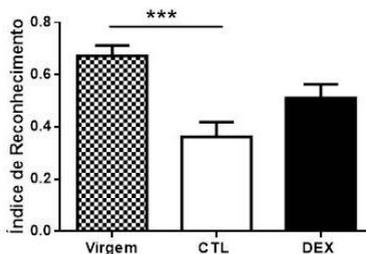
**Figura 18.** Tempo de exploração do objeto A.



Tempo de exploração do Objeto A representado em porcentagem na sessão treino. **nVirgem** = 10,  $18,87 \pm 1,280$ ; **nCTL** n = 9,  $7,318 \pm 0,6708$ ,  $p < 0,000,1$ ; **nDEX** n = 8,  $9,367 \pm 1,841$   $p < 0,0001$ . Valores expressos em média  $\pm$  EPM. ANOVA de uma via.

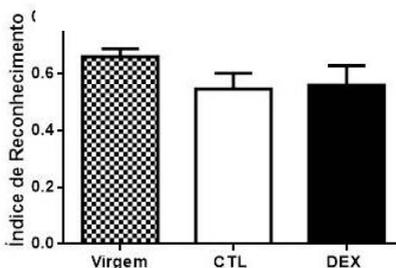
A análise estatística do teste 1, realizado 3 horas depois da sessão treino, apresentada na figura 19, demonstra um maior IR no grupo virgem em relação ao grupo CTL ( $p = 0,004$ ). Há uma tendência na redução no IR do grupo DEX ( $p = 0,0742$ ), assim como observado no grupo CTL. A análise estatística do teste 2, realizado 24 horas após o treino, é apresentada na figura 20 e não demonstrou diferenças significantes entre os grupos analisados.

**Figura 19.** Índice de reconhecimento no teste 1.



Índice de reconhecimento do objeto novo (objeto B), no teste 1. **nVirgem** = 10, 0,6724 ± 0,03973; **nCTL** n = 9, 0,3625 ± 0,05620, p = 0,0004; **nDEX** n = 8, 0,5104 ± 0,05294. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA de uma via

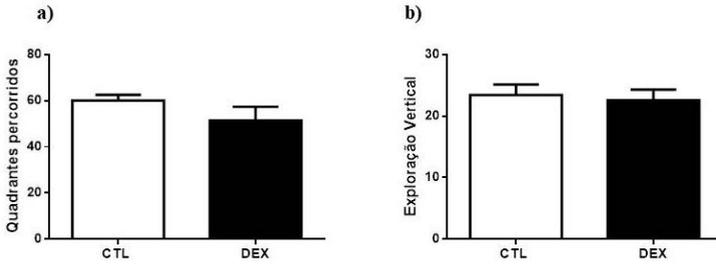
**Figura 20.** Índice de reconhecimento no teste 2.



Índice de reconhecimento do objeto novo (objeto C), no teste 2. **nVirgem** = 10, 0,6611 ± 0,02773; **nCTL** n = 9, 0,5467 ± 0,05612; **nDEX** n = 8, 0,5603 ± 0,06919. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA de uma via

#### 4.8 Atividade locomotora

O tratamento com DEX durante a gestação não apresentou efeito significativo no número de quadrantes percorridos quando comparado ao grupo CTL (Fig. 21A). A frequência de exploração vertical também não foi alterada pelo tratamento (Fig. 21B).

**Figura 21.** Atividade locomotora.

Avaliação da atividade locomotora. a) Quadrantes percorridos. **nCTL** = 9, **nDEX** = 7. b) Exploração vertical. **nCTL** = 9, **nDEX** = 7. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste T Student.  $p > 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Parâmetros murinométricos

O tratamento com o glicocorticoide em ratas prenhes reduziu o ganho de peso esperado no período gestacional. Esta redução pode ser associada à redução do crescimento intrauterino da prole, juntamente aos efeitos catabólicos da DEX. Apesar de não termos mensurado a ingesta alimentar das ratas durante a exposição ao glicocorticoide, estudos em andamento em nosso laboratório, utilizando a dose de 0,1 mg/kg de DEX no mesmo período que o realizado neste trabalho, demonstraram uma redução da ingesta de ração em ratas no período gestacional. Este fator também pode ter contribuído para a redução no ganho de peso encontrada no presente trabalho.

Em ratos, a administração intraperitoneal de hidrocortisona durante 20 dias resulta na redução do ganho de peso, bem como menor ingestão de alimentos (LIU et al., 2011). Já a administração subcutânea de DEX na dose de 2 mg/mL durante 10 dias, também reduz o peso corporal (KONNO et al., 2008), corroborando nossos dados de utilização crônica de glicocorticoides resultando na redução do ganho de peso. Os dados de Motta e colaboradores (2018) também confirmam que o uso de DEX na dose de 0,2 mg/kg na água de beber, entre o 14º e 19º dia de gestação de ratas Wistar, leva a um menor ganho de peso no período gestacional.

A prole exposta a DEX no período pré-natal teve um menor peso e comprimento ao nascer, confirmando dados da literatura que demonstram que a exposição pré-natal de roedores ao glicocorticoide reduz o crescimento intrauterino, afetando o comprimento e peso corporal ao nascer (WADDELL et al., 2000; XU et al., 2011; CHEN et al., 2018). Um estudo realizado por Waddell e colaboradores (2000) com ratas Wistar que receberam DEX na água de beber durante o último terço da gestação demonstra uma redução do peso da prole ao nascer, em conjunto com um aumento da apoptose de células placentárias. Dessa forma, além de afetar o crescimento intrauterino, a ação dos glicocorticoides interfere também no desenvolvimento placentário, que repercute no desenvolvimento fetal. Apesar do alto índice de mortalidade da prole nos primeiros dias de lactação, impossibilitando a avaliação do desenvolvimento pós-parto, dados da literatura mostram que a administração de glicocorticoides no período pré-natal compromete o desenvolvimento encefálico, afeta a cognição, aumenta o

comportamento do tipo ansioso, além de aumentar os riscos de doenças crônicas (MOISIADIS e MATTHEWS, 2014).

Corroborando dados da literatura, o tratamento com DEX reduziu a massa das adrenais (SASANO et al., 1966; LESNIEWSKA et al., 1992; BATTISTON et al., 2017, MOTTA et al., 2018). No estudo realizado por Lesniwska e colaboradores (1992), a administração crônica de DEX em ratas Wistar reduziu a massa das adrenais, indicando a atrofia glandular, além de reduzir os níveis plasmáticos de corticosterona e hormônio adrenocorticotrófico, indicando a ação de DEX na supressão do eixo HHA. A redução da produção de andrógenos pela zona reticular também pode ter contribuído para a redução da massa das adrenais no presente estudo.

O modelo de administração de DEX durante o período gestacional desencadeia a redução da sensibilidade à insulina (MOTTA et al., 2018). Estudos *in vitro* com células da teca exposta a DEX demonstram aumento dos níveis de glicose, confirmando a resistência à insulina esperada com a exposição ao fármaco. Este fenômeno leva à hipertecose e aumento da produção de andrógenos pelas células da teca (QU et al., 2009). Nossos dados corroboram este efeito, pois os animais tratados com DEX apresentaram um aumento da massa ovariana, compatível com uma possível hipertecose em resposta não só ao tratamento com DEX, mas também à supressão do eixo HHA e atrofia das adrenais.

## 5.2 Cuidados Maternos

O tratamento com DEX alterou as relações mãe-prole, reduzindo a capacidade de construção de ninho, os comportamentos proativos de cuidado com a prole e aumentando o tempo de permanência fora do ninho, sem alterações da exploração do ambiente. Foi observado uma tendência de aumento de auto-limpeza no grupo tratado, ou seja, os animais que receberam DEX durante o período gestacional apresentam uma tendência de aumento do auto-cuidado, juntamente com uma redução do cuidado com a prole, demonstrado tanto pela redução de cuidados pró-ativos, como também aumento de permanência distante da prole. A utilização de elevadas doses de corticosterona durante o período gestacional e/ou pós-parto em roedores reduz parâmetros de cuidado com a prole como a postura de amamentação, além de aumentar o tempo fora do ninho (BRUMMELTE e GALEA 2010). Os modelos de stress psicossocial e por restrição durante o período gestacional também afetam os parâmetros citados anteriormente (BOSCH et al., 2007).

A exposição a glicocorticoides no período pós-parto também pode apresentar efeitos quanto às modificações decorrentes da gestação e parto. Pereira e colaboradores (2015) demonstraram o efeito da injeção intracerebroventricular de corticosterona em ratas no 7º dia após o parto, no período de lactação. Foi observada uma redução dos comportamentos típicos de cuidado com a prole quando comparado ao grupo CTL, bem como uma redução da secreção de OCT. Ainda sobre o manejo durante o período de lactação, Vilela e Giusti-Paiva (2011) observaram efeitos semelhantes com a administração de DEX (1 mg/kg, intra-peritoneal) no 6º dia de lactação, com redução na secreção de OCT e PRL, assim como redução dos cuidados com a prole. A manipulação com DEX no período pós-parto também trouxe resultados semelhantes no trabalho de Vilela e colaboradores (2013), que além da redução de cuidado com a prole, observa-se redução no ganho de peso dos filhotes, bem como redução da expressão de c-Fos na APOM da progenitora. As respostas neuroendócrinas ao stress são também relacionadas com o fator liberador de corticotrofina (CRF) e ativação da APOM, uma região importante para o desenvolvimento do cuidado materno. A administração de agonistas de receptores CRF nesta área cerebral em ratas lactantes reduz o tempo de postura de cifo durante a amamentação (KLAMPFL et al., 2018).

Apesar do presente trabalho não ter avaliado a concentração plasmática de PRL e OCT, sabe-se que estes são importantes e dão suporte as adaptações do organismo materno não só durante a gestação, mas auxiliando também em quesitos necessários no pós-parto. A OCT, por exemplo, tem ação tanto periférica, auxiliando na ejeção do leite, quanto central, permitindo a consolidação das adaptações para o cuidado materno (NEUMANN, 2003). Rich e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos *knockout* para o receptor de OCT têm maior porcentagem de abandono ou canibalismo quando comparados com camundongos que apresentam os receptores para o hormônio.

A preparação da glândula mamária durante a gestação permite a produção de leite e provém a nutrição aos neonatos, destacando-se então o papel da PRL (BRUNTON e RUSSELL, 2008). Ratas nulíparas que passaram pelo procedimento de ovariectomia e hipofisectomia, com reposição esteroidal, quando tratadas com PRL apresentam uma redução da latência para início do CM, mesmo sem terem passado pelo processo gestacional (BRIDGES et al., 1985).

O estudo de Durló e colaboradores (2004) mostra que ocorre redução da secreção de OCT e PRL após administração de DEX. Em um estudo para avaliação do aumento do volume extracelular, com uso de

solução hipertônica ou hipotônica, foi observado que a secreção de OCT e PRL é inferior no grupo pré-tratado com DEX quando comparado ao grupo CTL, demonstrando a influência da inibição do eixo HHA na secreção destes hormônios.

Em acordo com a literatura, o presente trabalho mostrou que a administração de DEX durante o período gestacional interfere na adaptação fisiológica necessária para o pós-parto, visto que a progenitora necessita gerar o feto e posteriormente manter condições adequadas para sua sobrevivência, como o ninho e provimento dos nutrientes necessários. Dessa forma, a utilização crônica de glicocorticoides no terço final da gestação em roedores interfere no vínculo materno-filial, podendo desencadear efeitos negativos no desenvolvimento da prole no período após o nascimento. Apesar dos hormônios OCT e PRL não terem sido dosados após o parto, acredita-se que ambos estejam reduzidos, sendo associados à redução dos comportamentos observados, de acordo com dados da literatura já mencionados.

Além do tratamento durante o período gestacional que pode ser associado às alterações comportamentais, os neonatos expostos a DEX no período fetal apresentaram uma redução das medidas ao nascer, corroborando com dados de Motta e colaboradores (2018) e estudos em andamento em nosso grupo de pesquisa. Apesar do preparo neuroendócrino durante a gestação, os cuidados maternos são dependentes do vínculo mãe-prole, o qual é dependente de estímulos dos filhotes (NUMAN, 2007; NUMAN e YOUNG, 2016). Portanto, parte da redução de comportamentos de cuidado materno encontrada neste estudo em ratas tratadas com DEX pode estar associada ao baixo índice de sobrevivência da prole. O efeito da prole poderia ser melhor esclarecido através da utilização da troca de ninhadas (*fostering*), avaliando o cuidado materno do grupo DEX quando expostos a filhotes CTL e vice-versa.

### **5.3 Labirinto em Cruz Elevado**

O presente estudo mostrou que o tratamento com DEX reduziu o número total de entradas, tanto nos braços abertos quanto nos braços fechados. Este resultado poderia indicar uma redução generalizada da atividade locomotora em si, independente da procura pelo braço aberto ou fechado e sua correlação com estímulos ansiolíticos ou ansiogênicos. No entanto, os resultados do teste do campo aberto não suportam esta

hipótese, pois não demonstraram uma redução significativa da atividade locomotora nas ratas tratadas com DEX.

Sabe-se que o comportamento do tipo ansioso é representado principalmente pelo número de entradas nos braços abertos em conjunto com o tempo de permanência nos mesmos (PELLOW et al., 1985; RODGERS e JOHNSON, 1995; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). O tratamento com DEX também reduziu o tempo de permanência nos braços abertos, contudo aumentou o tempo de permanência nos braços fechados. Apesar das entradas nos braços fechados e número total de entradas serem afetados por alterações na atividade locomotora, deve-se considerar também que o animal pode apresentar um aumento da chamada “atividade exploratória protegida”, quando apresenta aumento na frequência de entrada nos braços fechados (BOURIN, 2015). Portanto, nossos dados sugerem um efeito ansiogênico do tratamento com DEX, representado pelo menor tempo de permanência, bem como menor número de entradas nos braços abertos, além de uma redução na atividade exploratória protegida, observada pela redução no número de entradas nos braços fechados. Dessa forma, o modelo utilizado permite a observação de um comportamento do tipo ansioso, bem como um comportamento apático dos animais tratados, que permaneceram estáticos por maior tempo nos braços fechados.

É importante lembrar que tanto as ratas tratadas quanto as CTL eram ratas que estavam no período pós-parto/lactação, o que naturalmente é uma situação fisiológica que poderia alterar a resposta comportamental no LCE. Trabalhos comportamentais clássicos demonstram que este período é caracterizado por uma redução a estímulos ansiogênicos, induzida pelo estado pós-parto (FLEMING e LUEBKE, 1981; HARD e HANSEN, 1985; FERREIRA et al., 1989).

Isto nos permite inferir que a resposta comportamental das ratas tratadas com DEX no LCE pode ter sido devida: 1) a uma ação direta do fármaco ou de seus efeitos metabólicos sobre as áreas de controle emocional, levando ao aumento do comportamento do tipo ansioso ou 2) uma ação indireta da DEX no sentido das alterações encontradas no CM, pois apesar de estarem no 1º dia da lactação no momento do teste, as ratas DEX claramente não apresentavam comportamentos típicos de uma rata lactante. Esta mudança no perfil comportamental da lactante pode ter tido repercussões significativas na resposta emocional destes animais no LCE.

Em relação às variáveis etológicas, a imersão de cabeça é aumentada pelo uso de fármacos ansiolíticos (RODGERS et al., 1997). O tratamento com DEX reduziu a frequência deste comportamento,

além de reduzir a frequência de exploração vertical, confirmando um aumento do comportamento do tipo ansioso nos animais tratados, em conjunto com redução da atividade exploratória.

Modelos que interfiram nas adaptações adequadas no período gestacional, como exposição a agentes estressores, podem desencadear alterações comportamentais a longo prazo (LONSTEIN, 2007). Ratas expostas ao modelo de stress físico com restrição de espaço e exposição à luz na última semana de prenhez, têm redução no tempo de permanência nos braços abertos no LCE, mesmo após 3 semanas de exposição ao estímulo estressor, demonstrando efeitos ansiogênicos do stress a longo prazo (DARNAUDERY et al., 2004). A estimulação de receptores CRF na APOM em roedoras em período de lactação reduz o número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (KLAMPFL et al., 2018), corroborando a ideia de que a resposta ao estresse altera o comportamento neste teste. Ainda em relação a manipulação no período de lactação, Vilela e colaboradores (2012) observaram uma redução na latência de escape no labirinto em T, assim como uma redução de entradas no campo aberto após a administração aguda de DEX na dose de 0,1 mg/kg, corroborando a nossa hipótese de que a exposição ao glicocorticoide reduz respostas ansiolíticas esperadas pelo momento de pós-parto.

Após o parto, alterações comportamentais são observadas na progenitora, relacionadas à sua auto-proteção, bem como a da prole, garantindo a sobrevivência. Dentre as alterações, destaca-se a redução do comportamento do tipo ansioso no período pós-parto (PEREIRA et al., 2005), além do aumento do comportamento do tipo agressivo (ERSKINE et al., 1978). Estas modificações comportamentais podem estar associadas com o aumento das concentrações plasmáticas de PRL e OCT (VILELA et al., 2012). Além disso, a presença da prole parece ser outro estímulo para a redução do comportamento do tipo ansioso (LONSTEIN, 2007). Nossos dados sugerem que o tratamento com DEX impediu que estas modificações comportamentais que reduzem a responsividade a estímulos ansiogênicos tenham se estabelecido nas ratas tratadas, seja por efeito direto do fármaco ou pela ausência da prole, levando as mesmas a uma maior vulnerabilidade a estes estímulos em comparação com as lactantes CTL.

## 5.4 Nado Forçado Repetido

Tipicamente, o TNF é utilizado para avaliação de comportamento do tipo depressivo, através deste parâmetro de imobilidade. A utilização de antidepressivos da classe de tricíclicos e inibidores da monoamino oxidase reduz a imobilidade no teste, de maneira que o comportamento do tipo depressivo é caracterizado pelo aumento da imobilidade (PORSOLT et al., 1977). O tratamento com DEX não alterou significativamente este parâmetro no presente estudo.

Modelos que simulam o período gestacional, como utilizado por Galea e colaboradores (2001) demonstram que a administração de estradiol e progesterona em roedoras durante 23 dias, simulando o período gestacional, seguida da interrupção do tratamento, simulando o pós-termo, desencadeia alterações comportamentais no TNF como redução do nado e aumento da imobilidade. Ambos são comportamentos sugestivos de um modelo de depressão pós-parto, em decorrência do aumento do desespero comportamental (PORSOLT et al., 1977).

O estudo de Craft e colaboradores (2010) mostra que ratas após o termo não aumentam a imobilidade quando comparadas a ratas CTL. No entanto, modelos que simulam a gestação parecem aumentar o tempo deste parâmetro. É importante ressaltar que o período gestacional é associado com outros hormônios, como PRL e OCT, por exemplo (BRUNTON e RUSSELL, 2010). Corroborando com estes dados, o estudo de Molina-Hernandez e Tellez-Alcantara (2001) mostra duração da imobilidade não aumenta em ratas lactantes, mas ratas tratadas com progesterona durante 2 semanas após ovariectomia apresentam redução da imobilidade. Além disso, o trabalho mostrou uma redução na imobilidade durante o período gestacional. Estes dados sugerem que a progesterona e/ou seu metabólito, alopregnenolona, afetam o comportamento depressivo, mas não são os únicos hormônios envolvidos.

Estudos com outros testes que avaliam comportamento do tipo depressivo, como o teste de preferência a sacarose, mostram que a simulação do ambiente hormonal da gestação resulta em menor consumo de sacarose no “pós-parto” (NAVARRE et al., 2010). Todos estes resultados dão suporte ao papel importante dos esteroides sexuais na modulação do estado emocional. Com relação à duração do nado, o tratamento com DEX reduziu este parâmetro na segunda exposição ao TNF em comparação ao grupo CTL, mas quando analisou-se o efeito da repetição da exposição, ambos os grupos apresentaram aumento da duração e frequência do nado. Além disso, o grupo DEX apresentou

aumento na frequência da escalada nas repetições do teste, sugerindo que os comportamentos proativos foram preservados mesmo durante as reexposições.

Em nosso estudo, não tivemos efeitos diretos da exposição à DEX durante o período gestacional, nem efeitos do período pós-parto analisados através das exposições repetidas ao TNFr em comportamentos do tipo depressivo, classicamente avaliados através do presente teste. No entanto, a ausência de um grupo virgem não nos permite afirmar que a gestação não possa interferir em parâmetros comportamentais no TNFr, ficando como sugestão para estudos futuros, em conjunto com os efeitos da alopregnenolona, visto sua avaliação inibitória no eixo HHA, bem como seus efeitos em receptores GABA (BRUNTON e RUSSELL, 2008).

### **5.5 Reconhecimento de Objetos**

O presente trabalho demonstrou que o período pós-parto reduz a atividade de exploração do objeto durante a sessão treino. O prejuízo causado pelo período pós-parto, foi observado durante as sessão de teste 1 (3 horas depois do treino) nas ratas CTL, que apresentaram uma redução no índice de reconhecimento do objeto novo, enquanto o grupo tratado com DEX apresenta uma tendência de redução do índice de reconhecimento do objeto novo. O grupo virgem teve um maior índice exploratório nos objetos novos, como esperado, visto a preferência inata de busca pelo novo (CLARK e SQUIRE, 2010; AMEEN-ALI et al., 2015).

Alterações comportamentais em resposta ao período pós-parto têm sido investigadas em roedores e corroboram os achados do presente estudo. Darnaudéry e colaboradores (2007) mostraram uma alteração na memória espacial durante os primeiros dias do pós-parto, representada por um aumento da latência e da distância percorrida para encontrar a plataforma no labirinto aquático de Morris. Além disso, o trabalho mostra uma redução na proliferação celular hipocampal, juntamente com redução dos níveis de estradiol e aumento da corticosterona. Estes dados, assim como os nossos, indicam que ocorre um prejuízo cognitivo no período pós-parto de roedoras.

Pawluski e colaboradores (2016) sugerem que esta alteração cognitiva possa ser uma estratégia fisiológica de “perda-e-ganho”, ou seja, apesar de ocorrer um déficit cognitivo em um primeiro momento do pós-parto na progenitora, é vantajoso para os filhotes que esta permaneça mais tempo no ninho, visto que a característica altricial da

espécie torna fundamental o cuidado parental. Dessa forma, a redução da habilidade cognitiva observada após o parto na progenitora, auxilia a prole, garantindo uma maior interação mãe-filhote e maior cuidado com o neonato.

O estado gravídico, por outro lado, parece melhorar a cognição, já que ratas prenhes apresentam um melhor desempenho em teste de memória espacial quando comparadas às ratas virgens (BODENSTEINER et al., 2006). Segundo os autores, estas alterações na cognição espacial durante a gravidez devem estar relacionadas à interação de vários processos, dentre eles as altas concentrações de progesterona e seu metabólito, alopregnenolona ao longo da gravidez, que atuam no córtex pré-frontal e modulam esta resposta. Essa ideia corrobora a hipótese de que a queda dos níveis plasmáticos de progesterona no pós-parto seja, pelo menos em parte, responsável pelo declínio cognitivo observado no presente trabalho, tanto em ratas CTL quanto tratadas com DEX.

Além das alterações nos níveis plasmáticos de progesterona, o período inicial de pós-parto é caracterizado por um aumento dos níveis de PRL, estimulado pela sucção da prole, que leva a redução dos níveis de estradiol e ausência da ciclicidade estral em roedoras (TAYA e GREENWALD, 1982). Com o decorrer do período pós-parto, os níveis de estradiol aumentam (SMITH e NEILL, 1977), concomitantemente à redução dos níveis de PRL (TAYA e GREENWALD, 1982), o que confirma o papel inibitório deste hormônio sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (ver em: (MCNEILLY, 1980).

Paris e Frye (2008) avaliaram o efeito do ciclo estral e da gestação em testes cognitivos. Ratas em estro, fase em que ocorre um aumento nos níveis de estradiol, apresentam um melhor desempenho no teste de RCO quando comparadas a ratas em outras fases, com baixos níveis estrogênicos. Além disso, roedoras que passaram por uma gestação prévia também apresentam melhor desempenho cognitivo no teste, em comparação a fêmeas nulíparas. O estudo de Walf e colaboradores (2006) também traz uma correlação positiva entre a concentração dos hormônios ovarianos e a melhora da memória em ratas.

Em nosso estudo, apenas o grupo pós-parto CTL recebeu o estímulo de sucção nos dias em que o experimento foi realizado, já que a prole das ratas tratadas com DEX não sobreviveu. Embora não tenhamos dosado os níveis plasmáticos de PRL, é esperado que estivessem aumentados no período pós-parto, fator determinante para a lactação (BRUNTON e RUSSELL, 2008). Assim, a ação inibitória da

PRL sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e a consequente redução da produção de hormônios ovarianos (TAYA e GREENWALD, 1982) poderia justificar o déficit de memória no grupo pós-parto CTL. Apesar do grupo pós-parto DEX não estar submetido ao estímulo de sucção da prole para a produção de PRL, estas ratas estavam em um período inicial de pós-parto, logo após a queda brusca dos hormônios sexuais em consequência da retirada da placenta. É possível que nesta fase os níveis plasmáticos de estradiol e progesterona não estejam ainda reestabelecidos, o que poderia justificar o déficit cognitivo quando comparadas ao grupo virgem.

Mudanças neurais, como aumento das espinhas dendríticas hipocampais, são observadas em fases da vida de fêmeas adultas em que ocorre um aumento dos hormônios esteroides, como por exemplo, no estro, quando a fêmea está receptiva para o acasalamento, e durante a prenhez, de modo que a experiência reprodutiva e a presença da prole têm efeito benéfico na memória e aprendizado (KINSLEY et al., 1999). A experiência gestacional repercutindo positivamente na cognição auxilia durante o pós-parto, já que nesse momento a fêmea precisa cuidar diretamente da prole, buscar alimento garantindo reservas energéticas para a lactação e reduzindo o tempo de permanência fora do ninho (PAWLUSKI et al., 2016). Além disso, já foi demonstrado que a presença da prole melhora a cognição materna ao final do período pós-parto, tanto em comparação com ratas virgens quanto com ratas em pós-parto, mas que não tiveram contato com a prole (ALBIN-BROOKS et al., 2017). Com base neste dado, apesar de não termos realizado o teste no final, mas sim no início do período pós-parto, acreditamos que ao final do período os animais pós-parto CTL apresentariam uma melhora no RCO em comparação as ratas virgens e às ratas DEX, já que estas tiveram pouco contato com a prole, pelo alto índice de mortalidade nos primeiros dias de pós-parto. Em conjunto com a literatura, nossos dados sugerem que o período pós-parto reflete dois momentos diferentes do CM: em um momento inicial, quando a prole está em seus primeiros dias de vida e consequentemente mais vulnerável, a lactante direciona sua atenção especificamente à prole, explorando menos o ambiente. Entretanto, com o passar do tempo, conforme a prole adquire maior resiliência, a lactante passa a explorar o ambiente de maneira mais eficiente, o que permite que ela busque suprimento e possa dar continuidade à lactação e ao cuidado com os filhotes.

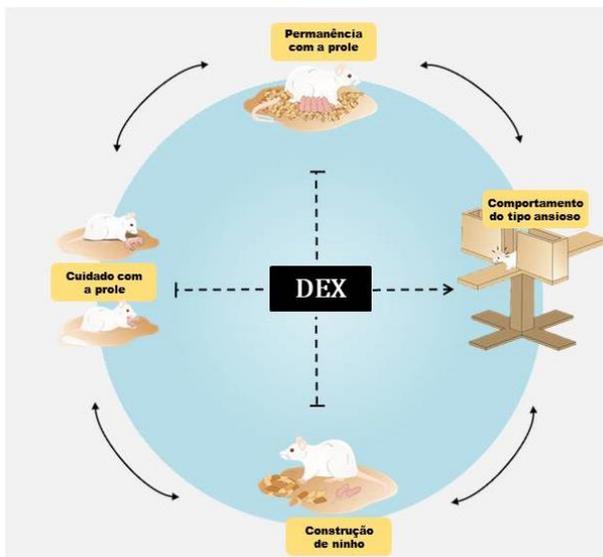
## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou a manipulação com um glicocorticoide durante o período gestacional em diferentes parâmetros comportamentais, ilustrados na figura 22. Apesar de nossa análise do teste de CM não ter sido fracionada, observou-se uma redução no cuidado materno em geral. Além disso, o tratamento com DEX teve efeitos ansiogênicos avaliados a partir do LCE.

Apesar de não termos observado variações do tratamento no teste RCO, o período logo após o termo é marcado por uma redução da memória e cognição nos animais.

Visto as grandes adaptações necessárias à gestação, a adição de um grupo virgem possibilitaria a avaliação de efeitos da gestação *per se*, permitindo a melhor visualização de efeitos da DEX. A exposição de filhotes que não passaram por stress fetal ao grupo DEX possibilitaria a avaliação de como o estado da prole interfere no cuidado materno.

**Figura 22.** Efeitos do tratamento com dexametasona durante o período gestacional.



O tratamento com DEX durante o período gestacional afeta parâmetros comportamentais no período de pós-parto, podendo estes ser inter-relacionados. Observa-se redução de cuidado materno e aumento do comportamento do tipo ansioso. *Seta pontilhada: redução; Seta inteira: aumento.*

## **7. CONCLUSÃO**

O tratamento com DEX no terço final do período gestacional leva a alterações comportamentais que comprometem o estado emocional da progenitora e dificultam a expressão de comportamentos maternos típicos do pós-termo, essenciais para o cuidado e manutenção da prole recém-nascida. Tais alterações podem contribuir de maneira importante com o alto índice de mortalidade da prole neste modelo.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALBIN-BROOKS, C. et al. The influence of offspring, parity, and oxytocin on cognitive flexibility during the postpartum period. *Horm Behav*, v. 89, p. 130-136, Mar 2017.

AMEEN-ALI, K. E.; EASTON, A.; EACOTT, M. J. Moving beyond standard procedures to assess spontaneous recognition memory. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 53, p. 37-51, Jun 2015.

AUGUSTINE, R. A.; GRATTAN, D. R. Induction of central leptin resistance in hyperphagic pseudopregnant rats by chronic prolactin infusion. *Endocrinology*, v. 149, n. 3, p. 1049-55, Mar 2008.

BATTISTON, F. G. et al. Glucose homeostasis in rats treated with 4-vinylcyclohexene diepoxide is not worsened by dexamethasone treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 165, n. Pt B, p. 170-181, Jan 2017.

BODENSTEINER, K. J. et al. Effects of pregnancy on spatial cognition in female Hooded Long-Evans rats. *Horm Behav*, v. 49, n. 3, p. 303-14, Mar 2006.

BOSCH, O. J. et al. Prenatal stress increases HPA axis activity and impairs maternal care in lactating female offspring: implications for postpartum mood disorder. *Psychoneuroendocrinology*, v. 32, n. 3, p. 267-78, Apr 2007.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. *Dialogues Clin Neurosci*, v. 17, n. 3, p. 295-303, Sep 2015.

BRIDGES, R. S. et al. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science*, v. 227, n. 4688, p. 782-4, Feb 15 1985.

BRUMMELTE, S.; GALEA, L. A. Chronic corticosterone during pregnancy and postpartum affects maternal care, cell proliferation and depressive-like behavior in the dam. *Horm Behav*, v. 58, n. 5, p. 769-79, Nov 2010.

BRUNTON, P. J.; RUSSELL, J. A.; DOUGLAS, A. J. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. *J Neuroendocrinol*, v. 20, n. 6, p. 764-76, Jun 2008.

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

BRUNTON, Paula J.; RUSSELL, John A.. Endocrine induced changes in brain function during pregnancy. *Brain Research*, [s.l.], v. 1364, p.198-215, dez. 2010.

BRUNTON, Paula J.; RUSSELL, John A. Neuroendocrine control of maternal stress responses and fetal programming by stress in pregnancy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 35, n. 5, p. 1178-91, Jul 1 2011.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005.

CHEN, Z. et al. Course-, dose-, and stage-dependent toxic effects of prenatal dexamethasone exposure on fetal articular cartilage development. *Toxicol Lett*, v. 286, p. 1-9, Apr 2018.

CHIMIN, P. et al. Chronic glucocorticoid treatment enhances lipogenic activity in visceral adipocytes of male Wistar rats. *Acta Physiol (Oxf)*, v. 211, n. 2, p. 409-20, Jun 2014.

CHROUSOS, G.; PAVLAKI, A. N.; MAGIAKOU, M. A. Glucocorticoid Therapy and Adrenal Suppression. In: DE GROOT, L. J.; BECK-PECCOZ, P., et al (Ed.). *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000.

CLARK, R. E.; SQUIRE, L. R. An animal model of recognition memory and medial temporal lobe amnesia: history and current issues. *Neuropsychologia*, v. 48, n. 8, p. 2234-44, Jul 2010.

COVERDILL, A. J. et al. Effects of Chronic Central Arginine Vasopressin (AVP) on Maternal Behavior in Chronically Stressed Rat Dams. ***Brain Sci***, v. 2, n. 4, Dezembro, 2012.

CRAFT, R. M. et al. Forced swim test behavior in postpartum rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 96, n. 4, p. 402-12, Oct 2010.

CUTULI, D. et al. Pre-reproductive maternal enrichment influences rat maternal care and offspring developmental trajectories: behavioral performances and neuroplasticity correlates. ***Front Behav Neurosci***, v. 9, p. 66, 2015.

DARNAUDERY, M. et al. Early motherhood in rats is associated with a modification of hippocampal function. *Psychoneuroendocrinology*, v. 32, n. 7, p. 803-12, Aug 2007.

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

DOERR, H. K.; SIEGEL, H. I.; ROSENBLATT, J. S. Effects of progesterone withdrawal and estrogen on maternal behavior in nulliparous rats. *Behav Neural Biol*, v. 32, n. 1, p. 35-44, May 1981.

DOMINGUES, K. et al. Repeated forced-swimming test in intact female rats. *Behavioural Pharmacology*. Mar. 2018.

DUKSAL, F. et al. Effects of different corticosteroids on the brain weight and hippocampal neuronal loss in rats. *Brain Res*, v. 1250, p. 75-80, Jan 23 2009.

DURLO, F. V. et al. Interaction of prolactin, ANPergic, oxytocinergic and adrenal systems in response to extracellular volume expansion in rats. *Exp Physiol*, v. 89, n. 5, p. 541-8, Sep 2004.

ERSKINE, M. S.; BARFIELD, R. J.; GOLDMAN, B. D. Intraspecific fighting during late pregnancy and lactation in rats and effects of litter removal. *Behav Biol*, v. 23, n. 2, p. 206-18, Jun 1978.

FERREIRA, A. et al. Behavior of mother rats in conflict tests sensitive to antianxiety agents. *Behav Neurosci*, v. 103, n. 1, p. 193-201, Feb 1989.

FLEMING, A. S.; LUEBKE, C. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiol Behav*, v. 27, n. 5, p. 863-8, Nov 1981.

GALEA, L. A.; WIDE, J. K.; BARR, A. M. Estradiol alleviates depressive-like symptoms in a novel animal model of post-partum depression. *Behav Brain Res*, v. 122, n. 1, p. 1-9, Jul 2001.

GARCIA, M. C. et al. Hypothalamic levels of NPY, MCH, and prepro-orexin mRNA during pregnancy and lactation in the rat: role of prolactin. *Faseb j*, v. 17, n. 11, p. 1392-400, Aug 2003.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*, v. 81, n. 2, p. 629-83, Apr 2001.

GRATTAN, D. R. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *J Endocrinol*, v. 226, n. 2, p. T101-22, Aug 2015.

GRATTAN, D. R. et al. Prolactin regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons to suppress luteinizing hormone secretion in mice. *Endocrinology*, v. 148, n. 9, p. 4344-51, Sep 2007.

HARD, E.; HANSEN, S. Reduced fearfulness in the lactating rat. *Physiol Behav*, v. 35, n. 4, p. 641-3, Oct 1985.

HERRERA, E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr*, v. 54 Suppl 1, p. S47-51, Mar 2000.

JOHNSON, E. O. et al. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 16, n. 2, p. 115-30, Summer 1992.

KANAGAWA, T. et al. The effects of repeated corticosteroid administration on the neurogenesis in the neonatal rat. *Am J Obstet Gynecol*, v. 194, n. 1, p. 231-8, Jan 2006.

KENDRICK, K. M. et al. Neural control of maternal behaviour and olfactory recognition of offspring. *Brain Res Bull*, v. 44, n. 4, p. 383-95, 1997.

KIM, S.; STRATHEARN, L. Oxytocin and Maternal Brain Plasticity. *New Dir Child Adolesc Dev*, v. 2016, n. 153, p. 59-72, Sep 2016.

KINSLEY, C. H. et al. Motherhood improves learning and memory. *Nature*, v. 402, n. 6758, p. 137-8, Nov 11 1999.

KLAMPFL, S. M. et al. Maternal stress and the MPOA: Activation of CRF receptor 1 impairs maternal behavior and triggers local oxytocin release in lactating rats. *Neuropharmacology*, v. 133, p. 440-450, May 1 2018.

KONNO, J. et al. Upregulated expression of neuropeptide Y in hypothalamic-pituitary system of rats by chronic dexamethasone administration. *Neurosci Res*, v. 60, n. 3, p. 259-65, Mar 2008.

LARSEN, C. M.; GRATAN, D. R. Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors. *Brain Behav Immun*, v. 26, n. 2, p. 201-9, Feb 2012.

LAUAND, F. et al. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. *Neuroscience*, v. 147, n. 1, p. 247-57, Jun 15 2007.

LESNIEWSKA, B.; NOWAK, K. W.; MALENDOWICZ, L. K. Dexamethasone-induced adrenal cortex atrophy and recovery of the gland from partial, steroid-induced atrophy. *Exp Clin Endocrinol*, v. 100, n. 3, p. 133-9, 1992.

LEVY, F. Neuroendocrine control of maternal behavior in non-human and human mammals. *Ann Endocrinol (Paris)*, v. 77, n. 2, p. 114-25, Jun 2016.

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

LIU, X. Y. et al. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. *Exp Ther Med*, v. 2, n. 5, p. 977-984, Sep 2011.

LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. *J Pediatr (Rio J)*, v. 83, n. 5 Suppl, p. S163-77, Nov 2007.

LONSTEIN, J. S. Regulation of anxiety during the postpartum period. *Front Neuroendocrinol*, v. 28, n. 2-3, p. 115-41, Aug-Sep 2007.

MCNEILLY, A. S. Prolactin and the control of gonadotrophin secretion in the female. *J Reprod Fertil*, v. 58, n. 2, p. 537-49, Mar 1980.

MOISIADIS, V. G.; MATTHEWS, S. G. Glucocorticoids and fetal programming part 1: Outcomes. *Nat Rev Endocrinol*, v. 10, n. 7, p. 391-402, Jul 2014.

MOLINA-HERNANDEZ, M.; TELLEZ-ALCANTARA, N. P. Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in Wistar rats forced to swim. *Psychoneuroendocrinology*, v. 26, n. 5, p. 479-91, Jul 2001.

MOTTA, K., et al. Dexamethasone administration during late gestation has no major impact on lipid metabolism, but reduces newborn survival rate in Wistar rats. *Frontiers in Physiology*, v. 9, n. 783, Jul 2018.

NAVARRE, B. M.; LAGGART, J. D.; CRAFT, R. M. Anhedonia in postpartum rats. *Physiol Behav*, v. 99, n. 1, p. 59-66, Jan 12 2010.

NEUMANN, I. D. Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. *Depress Anxiety*, v. 17, n. 3, p. 111-21, 2003.

NUMAN, M.; YOUNG, L. J. Neural mechanisms of mother-infant bonding and pair bonding: Similarities, differences, and broader implications. *Horm Behav*, v. 77, p. 98-112, Jan 2016.

NUMAN, M. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Dev Psychobiol*, v. 49, n. 1, p. 12-21, Jan 2007.

NUMAN, Michael; INSEL, Thomas R.. *The Neurobiology of Parental Behavior*. New York: Springer Science & Business Media, 2003. 418 p.

PARIS, J. J.; FRYE, C. A. Estrous cycle, pregnancy, and parity enhance performance of rats in object recognition or object placement tasks. *Reproduction*, v. 136, n. 1, p. 105-15, Jul 2008.

PAWLUSKI, J. L.; LAMBERT, K. G.; KINSLEY, C. H. Neuroplasticity in the maternal hippocampus: Relation to cognition and effects of repeated stress. *Horm Behav*, v. 77, p. 86-97, Jan 2016.

PECKETT, A. J.; WRIGHT, D. C.; RIDDELL, M. C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*, v. 60, n. 11, p. 1500-10, Nov 2011.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985.

PEREIRA, M. et al. Motivational aspects of maternal anxiety in lactating rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 180, n. 2, p. 241-8, Jul 2005.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, v. 229, n. 2, p. 327-36, Oct 1977.

QU, J. et al. Insulin resistance directly contributes to androgenic potential within ovarian theca cells. *Fertil Steril*, v. 91, n. 5 Suppl, p. 1990-7, May 2009.

RAFACHO, A. et al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas*, v. 36, n. 3, p. 284-93, Apr 2008.

RILLING, J. K.; YOUNG, L. J. The biology of mammalian parenting and its effect on offspring social development. *Science*, v. 345, n. 6198, p. 771-6, Aug 15 2014.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 52, n. 2, p. 297-303, Oct 1995.

RODGERS, R. J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res*, v. 30, n. 3, p. 289-304, Mar 1997.

RUSSELL, J. A.; BRUNTON, P. J. Neuroactive steroids attenuate oxytocin stress responses in late pregnancy. *Neuroscience*, v. 138, n. 3, p. 879-89, 2006.

RUSSELL, J. A.; DOUGLAS, A. J.; INGRAM, C. D. Brain preparations for maternity--adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. *Prog Brain Res*, v. 133, p. 1-38, 2001.

SASANO, N. et al. Stimulation of rat adrenocortical cells by glycyrrhizin with special reference to its inhibitory effect on dexamethasone-induced atrophy of the adrenal cortex. *Tohoku J Exp Med*, v. 90, n. 4, p. 391-403, Dec 1966.

SECKL, J. R.; MEANEY, M. J. Glucocorticoid programming. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1032, p. 63-84, Dec 2004.

SIEGEL, H. I.; ROSENBLATT, J. S. Estrogen-induced maternal behavior in hysterectomized-overiectomized virgin rats. *Physiol Behav*, v. 14, n. 04, p. 465-71, Apr 1975.

SMITH, M. S.; NEILL, J. D. Inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat: relative contribution of suckling and ovarian steroids. *Biol Reprod*, v. 17, n. 2, p. 255-61, Sep 1977.

STERN, J. M.; KEER, S. E. Maternal motivation of lactating rats is disrupted by low dosages of haloperidol. *Behav Brain Res*, v. 99, n. 2, p. 231-9, Mar 1999.

TAYA, K.; GREENWALD, G. S. Peripheral blood and ovarian levels of sex steroids in the lactating rat. *Endocrinol Jpn*, v. 29, n. 4, p. 453-9, Aug 1982.

UCHOA, E. T. et al. Novel aspects of glucocorticoid actions. *J Neuroendocrinol*, v. 26, n. 9, p. 557-72, Sep 2014.

VENEROSI, A. et al. Neonatal exposure to chlorpyrifos affects maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood. **Neurotoxicol Teratol**, v. 30, n. 6, p. 468-74, Novembro, 2008.

VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. *Endocrinology*, v. 152, n. 12, p. 4838-45, Dec 2011.

VILELA, F. C.; MELO, C. M.; GIUSTI-PAIVA, A. Glucocorticoids impair maternal anxiety during lactation. *Neurosci Lett*, v. 509, n. 2, p. 121-4, Feb 16 2012.

VILELA, F. C. et al. The CB1 cannabinoid receptor mediates glucocorticoid-induced effects on behavioural and neuronal responses during lactation. *Pflugers Arch*, v. 465, n. 8, p. 1197-207, Aug 2013.

VON VERSEN-HOEYNCK, F. M.; POWERS, R. W. Maternal-fetal metabolism in normal pregnancy and preeclampsia. *Front Biosci*, v. 12, p. 2457-70, Jan 1 2007.

WADDELL, B. J. et al. Apoptosis in rat placenta is zone-dependent and stimulated by glucocorticoids. *Biol Reprod*, v. 63, n. 6, p. 1913-7, Dec 2000.

XU, D. et al. Dexamethasone induces fetal developmental toxicity through affecting the placental glucocorticoid barrier and depressing fetal adrenal function. *Environ Toxicol Pharmacol*, v. 32, n. 3, p. 356-63, Nov 2011.

ZAGRON, G.; WEINSTOCK, M. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behav Brain Res*, v. 175, n. 2, p. 323-8, Dec 15 2006.

## ANEXOS

**Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PFG0842

**Título**

Procedimentos para o uso de animais experimentais no Laboratório de Neuroendocrinologia da Reprodução

**Data de Entrada**

20/12/2012

**Resultado:**

Aprovado

**Data / Prazo**

03/05/2013

**Considerações**

Ofício nº 023/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(á): Prof(a) Dr(a) Fernanda Barbosa Lima Christian, Depto. Ciências Fisiológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de quinhentos ratos (Wistar) fêmeas.

- Procedência do animal: Biotério Central

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)****Data 03/08/2017**

Data 07/05/2013

**Parecer(es):**

**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE**