

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito neuroprotetor do resveratrol (3,4',5-trihidroxi-estilbeno) sobre comportamentos do tipo ansiosos em filhotes fêmeas de mães tratadas com antígenos suspensos na vacina influenza trivalente.

Melissa de Souza Rodrigues

Orientador(a): Professor Dra. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini
Instituto de Ciências Biomédicas

Uberlândia – MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito neuroprotetor do resveratrol (3,4',5-trihidroxi-estilbeno) sobre comportamentos do tipo ansiosos em filhotes fêmeas de mães tratadas com antígenos suspensos na vacina influenza trivalente.

Melissa de Souza Rodrigues

Orientador(a): Professora Dra. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biológicas

Uberlândia – MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito neuroprotetor do resveratrol (3,4',5-trihidroxi-estilbeno) sobre comportamentos do tipo ansiosos em filhotes fêmeas de mães tratadas com antígenos suspensos na vacina influenza trivalente.

Melissa de Souza Rodrigues

Orientador(a): Professora Dra. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini
Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM)

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em __/__/__

Uberlândia - MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito neuroprotetor do resveratrol (3,4',5-trihidroxi-estilbeno) sobre comportamentos do tipo ansiosos em filhotes fêmeas de mães tratadas com antígenos suspensos na vacina influenza trivalente.

Melissa de Souza Rodrigues

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: ____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia,
2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade Federal de Uberlândia, por ter me dado essa oportunidade de estar dentro de uma universidade federal e conseguir vivenciar a ciência de perto, apesar de todos os desafios, valeu muito à pena.

Agradeço também à minha orientadora Vanessa Spini por sempre estar disposta a me ajudar e nunca ter me deixado na mão durante todos esses anos e estar presente em todas as etapas do experimento.

Agradeço também à minha professora Érika Neiro, foi através dela que eu me apaixonei pela neurofisiologia e tive o prazer de fazer parte dessa equipe durante minha trajetória na Iniciação Científica.

Agradeço minha família por sempre acreditar em mim, principalmente meus pais Lázaro César e Luciana, por todo apoio que me deram para eu conseguir fazer faculdade fora da nossa cidade de origem e nunca me deixar faltar nada.

Agradeço meu namorado Matheus Cleber, por me incentivar a correr atrás dos meus sonhos, pelo apoio e companheirismo de sempre.

Agradeço principalmente, os meus colegas de laboratório, Lorena Costa, Bruna Scucuglia, Gabriel Borges, Lara Cecília e Ana Júlia por passar por todos os processos do experimento comigo. Sem vocês nada disso teria dado certo, minha imensa gratidão a todos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa anatômico dos caminhos emocionais e as redes neurais envolvidas

Figura 2: Circuitos neurais envolvidos nas respostas de ansiedade e medo do eixo HHA.

Figura 3: Possíveis mecanismos crosstalk da influência da microbiota materna sobre a prole.

Figura 4: Estrutura molecular do Resveratrol

Figura 5: Gaiolas individuais fornecidas pela Rede de Biotérios UFU

Figura 6: Rolha Vaginal

Figura 7: Fêmea do grupo G3 com 19 dias de gestação e sua prole em P0

Figura 8: Administração via gavagem

Figura 9: Teste comportamental LCE sendo realizado na prole de G2 em idade adulta

Figura 10: Teste comportamental CA sendo realizado na prole de G2 em idade adulta

Figura 11: Porcentagem de tempo nos braços abertos do teste LCE dos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM.

Figura 12: Número de entradas nos braços fechados dos animais dos 4 grupos experimentais no teste LCE. *diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao número de entradas nos braços fechados. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM.

Figura 13: Tempo no campo periférico do teste CA dos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM

Figura 14: Número de cruzamentos centro-periferia do teste CA dos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM

RESUMO

A ansiedade é um problema de saúde pública, que afeta milhões de pessoas no mundo, impactando diretamente na vida pessoal e profissional delas. No Brasil também constitui uma das patologias que figuram entre as mais frequentes, trazendo prejuízos econômicos importantes. Sabe-se que os eventos que ocorrem durante a gravidez e que ativam o sistema imunológico materno, processo conhecido como Ativação Imunológica Maternal (AIM), podem impactar no comportamento da prole em idade adulta, causando distúrbios como depressão, ansiedade, esquizofrenia e autismo. Dentre esses eventos estão as infecções por vírus influenza, herpes vírus, LPS, *Toxoplasma gondii*, dentre outros. Diversos tratamentos, farmacológicos ou não, visam minimizar os danos fisiológicos provocados pela ansiedade e o uso do resveratrol, uma substância encontrada na casca da uva roxa, tem sido considerado promissor devido seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Neste sentido, esse projeto de pesquisa visa avaliar o efeito dos antígenos suspensos na vacina influenza trivalente como agente indutor de Ativação Imunológica Maternal em camundongas Balb C gestantes e seu impacto sobre o comportamento do tipo ansioso na prole fêmea em idade adulta, por meio dos testes de Labirinto em Cruz Elevada e Campo Aberto; investigar ainda um possível efeito neuroprotetor do resveratrol, administrado por gavagem nas mães gestantes, impactando sobre os comportamentos nas proles fêmeas adultas. O seguinte delineamento experimental foi usado: G1: Mães que receberam carboximetilcelulose a 0,5% por gavagem (1 dose por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular única de PBS em E16; G2: Mães que receberam carboximetilcelulose a 0,5% por gavagem (1 dose por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular única de vacina da Influenza A (H1N1) em E16; G3: Mães que receberam resveratrol por gavagem (1 dose por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular única de PBS em E16; G4: Mães que receberam resveratrol por gavagem (1 dose por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular única de vacina da Influenza A (H1N1) em E16. As filhotes fêmeas, filhas de mães tratadas, tiveram seus comportamentos avaliados nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao parâmetro % de tempo explorando os braços abertos (G1 – $10,19 \pm 0,09$; G2 – $9,27 \pm 0,02$; G3 – $3,54 \pm 0,01$; G4 – $2,13 \pm 0,02$). Para o parâmetro número de entradas nos braços fechados, observamos diferença significativa entre os grupos 2 e 4 (G2 - $10 \pm$

1,50; G4 - $18,50 \pm 2,15$). No teste de campo aberto não observamos diferença significativa entre os grupos, para o parâmetro tempo de permanência na periferia (G1 - $273,5 \pm 7,66$; G2 - $256 \pm 3,03$; G3 - $260,75 \pm 4,59$; G4 - $262,66 \pm 12,91$) e o número de cruzamentos centro-periferia (G1 - $14 \pm 4,77$; G2 - $17,14 \pm 1,29$; G3 - $14,5 \pm 1,84$; G4 - $10,66 \pm 4,14$). Neste experimento, portanto, o desafio imunogênico das mães em E16 com antígenos suspensos na vacina influenza trivalente não causou alteração comportamental na prole fêmea adulta, bem como o uso de resveratrol por gavagem não alterou o comportamento das mesmas.

Palavras chaves: Ativação Imunológica Maternal (AIM), ansiedade, Resveratrol, Labirinto em Cruz Elevado, Campo Aberto.

ABSTRACT

Anxiety is a public health problem that affects millions of people worldwide, directly impacting their personal and professional lives. In Brazil, it is also one of the most frequent pathologies, bringing significant economic losses. It is known that events that occur during pregnancy and activate the maternal immune system, a process known as Maternal Immune Activation (MIA), can impact the behavior of offspring in adulthood, causing disorders such as depression, anxiety, schizophrenia, and autism. Among these events are infections by influenza virus, herpes virus, LPS, *Toxoplasma gondii*, among others. Various treatments, pharmacological or not, aim to minimize the physiological damage caused by anxiety, and the use of resveratrol, a substance found in the skin of purple grapes, has been considered promising due to its antioxidant and anti-inflammatory effects. In this sense, this research project aims to evaluate the effect of suspended antigens in the trivalent influenza vaccine as an agent inducing Maternal Immune Activation in pregnant Balb C mice and its impact on anxious behavior in female offspring in adulthood, through the Elevated Plus Maze and Open Field tests; investigate a possible neuroprotective effect of resveratrol, administered by gavage to pregnant mothers, impacting on behaviors in female offspring in adulthood. The following experimental design was used: G1: Mothers who received 0.5% carboxymethylcellulose by gavage (1 dose per day), from E0 to E21 + 1 single intramuscular injection of PBS in E16; G2: Mothers who received 0.5% carboxymethylcellulose by gavage (1 dose per day), from E0 to E21 + 1 single intramuscular injection of Influenza A (H1N1) vaccine in E16; G3: Mothers who received resveratrol by gavage (1 dose per day), from E0 to E21 + 1 single intramuscular injection of PBS in E16; G4: Mothers who received resveratrol by gavage (1 dose per day), from E0 to E21 + 1 single intramuscular injection of Influenza A (H1N1) vaccine in E16. As female puppies, daughters of treated mothers, had their behaviors evaluated in the open field and elevated plus maze tests. The results showed that there was no significant difference between the groups regarding the parameter % of time exploring the open arms (G1 – $10,19 \pm 0,09$; G2 – $9,27 \pm 0,02$; G3 – $3,54 \pm 0,01$; G4 – $2,13 \pm 0,02$). For the parameter number of entries into the closed arms, we observed a significant difference between groups 2 and 4 (G2 - $10 \pm 1,50$; G4 - $18,50 \pm 2,15$). In the open field test, we did not observe a significant difference between the

groups for the parameter time spent in the periphery (G1 - 273.5 ± 7.66 ; G2 - 256 ± 3.03 ; G3 - 260.75 ± 4.59 ; G4 - 262.66 ± 12.91) and the number of center-periphery crossings (G1 - 14 ± 4.77 ; G2 - 17.14 ± 1.29 ; G3 - 14.5 ± 1.84 ; G4 - 10.66 ± 4.14). In this experiment, therefore, the immunogenic challenge of mothers at E16 with antigens suspended in trivalent influenza vaccine did not cause behavioral alteration in adult female offspring, and the use of resveratrol by gavage did not alter their behavior.

Keywords: Maternal Immune Activation (MIA), anxiety, Resveratrol, Elevated Plus Maze, Open Field Test.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM – Ativação Imunológica Maternal

E16 - 16º dia de gestação

E0 - 1º dia de gestação

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

CA - Campo Aberto

PBS - Solução tampão fosfato-salina

P60 – 60 dias de vida pós-nascimento

RSV- Resveratrol

EO – Estresse Oxidativo

EROs – Espécies reativas ao oxigênio

HHA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

TA – Transtorno de ansiedade

SNC - Sistema Nervoso Central

DMS- 5 - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

TEA – Transtorno do Espectro Autista

OMS – Organização Mundial da Saúde

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.1.1 Objetivos Específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Animais experimentais	23
4.2 Delineamento Experimental.....	24
4.3 Testes Comportamentais.....	25
4.4 Análise estatística.....	28
5. RESULTADOS	28
5.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	28
5.2 Teste do Campo Aberto.....	29
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO	33
8. REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

Os transtornos mentais podem ser classificados como doenças com manifestações psicológicas, sendo associadas a danos funcionais devido a alguma perturbação, podendo ser biológica, social, psicológica, física, entre outras. Tais perturbações podem ocasionar modulações de humor e alteração no modo de pensar, atrapalhando o desempenho pessoal, social e familiar do indivíduo (HIANY *et al.*, 2018).

A ansiedade é um transtorno psicológico que, segundo a OMS, atinge cerca de 264 milhões de pessoas no mundo, estando o Brasil (9,3% da população) à frente de outros países (BIERNATH, 2018). Os transtornos de ansiedade reconhecidos pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DMS-5) são: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade social, transtorno de pânico, fobias específicas (de animais, sangue, injeção), agorafobia, transtorno de estresse pós-traumático, entre outros (TESH, 2018).

De acordo com o DSM-5 (2014), os transtornos de ansiedade são aqueles que compartilham características de medo e ansiedade em excesso, além de perturbações comportamentais que estão relacionados. O medo pode ser diferenciado por ser a resposta emocional a alguma ameaça real ou percebida, sendo associado a períodos excitatórios do Sistema Nervoso Autônomo, necessário para luta ou fuga; já a ansiedade se enquadra na antecipação de futuras ameaças, sendo associada a tensão muscular e vigilância em preparação para um perigo futuro e com isso, apresenta comportamentos de cautela ou esquiva. Os transtornos de ansiedade (TAs) se diferenciam do medo e da ansiedade adaptativos, por serem persistentes além dos períodos apropriados, sendo induzidos também por estresse.

Pessoas com transtorno de ansiedade costumam apresentar preocupação persistente e excessiva acerca de vários domínios, acarretando declínio do desempenho tanto no trabalho quanto na escola. O indivíduo encontra dificuldades em controlar seus pensamentos, apresenta inquietação ou sensação de “nervos à flor da pele”, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular, angústia e perturbação de sono. Há também os sintomas físicos da ansiedade, sendo semelhantes aos sintomas de medo, como a taquicardia, tremores, palpitação e sudorese, geralmente associados à ativação do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (TESCH apud WHALEN *et al.*,

2016). Esses sintomas podem acarretar uma série de problemas tanto no âmbito pessoal quanto no profissional, impactando a sociedade como um todo (DMS-5, 2014).

As causas para o surgimento de transtorno de ansiedade são várias, podendo ser provocado por fatores ambientais (como situações psicossociais estressantes que a pessoa pode passar ao longo de sua vida - relacionamentos interpessoais, violências e abusos, entre outros), por abstinência de fármacos ou substâncias (como antidepressivos e ansiolíticos, podendo levar à abstinência após suspender o uso desses medicamentos por algum tempo), além do próprio componente genético (ANDREATINI *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2020).

De acordo com Lima *et al.* (2020), em relação ao componente genético, ainda não há provas que um único gene possa estar associado ao desenvolvimento da ansiedade, mas sim, diversos genes que são responsáveis por regular o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e a sinalização monoaminérgica (MARTIN *et al.*, 2009; SADOCK & SADOCK, 2010).

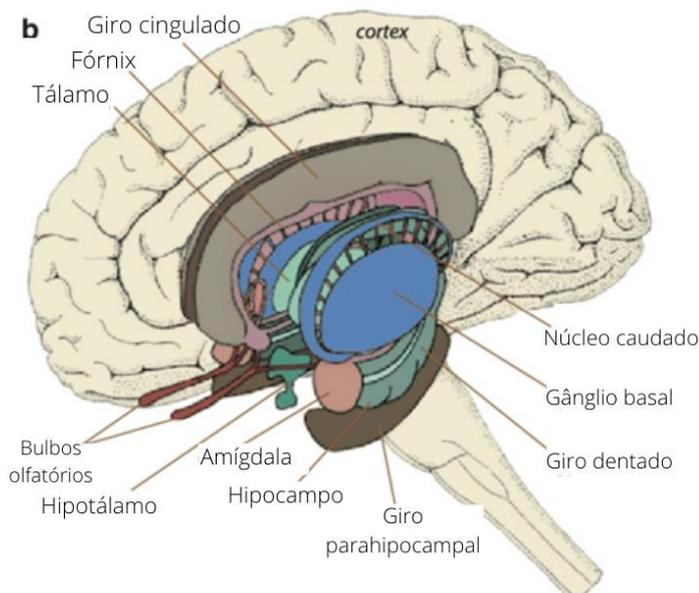
Estudos mostram também que existem outras bases neurofisiológicas para a ansiedade, como as alterações no funcionamento de estruturas neuroanatômicas, alterações na neurotransmissão gabaérgica, noradrenérgica e serotoninérgica, alterações no funcionamento do eixo HHA e a imunoativação maternal (AIM) (LIMA *et al.* 2020).

As alterações no funcionamento de estruturas neuroanatômicas que modulam as emoções e o medo, podem estar diretamente ligadas ao desenvolvimento do TA. Estruturas como a amígdala, hipocampo, córtex pré-frontal e córtex cingulado (FRANKLIN & MANSUY, 2013), bem como os neurotransmissores citados anteriormente, apresentam envolvimento neuroquímico na regulação da resposta de ansiedade, pelo sistema límbico (LIMA *et al.*, 2020 apud SADOCK & SADOCK, 2010; ASSUMPÇÃO JUNIOR & KUCZYNSKI, 2003; MIGUEL, GENTIL & GATTAZ, 2011) (FIG 1).

A amígdala é responsável pelo condicionamento da resposta ao medo, detectando, gerando e mantendo as emoções ligadas ao medo, tendo um papel importante na organização das respostas do medo aprendido referente aos estímulos físicos adversos. Já o hipocampo é responsável por processar essa resposta e pela modulação do circuito de defesa, sendo uma região importante na integração dos estímulos, gerando conhecimento emocional e desempenhando um papel maior nos aspectos cognitivos das emoções (CANTERAS, 2003; ESPERIDIÃO-ANTONIO *et al.*, 2008). Ainda dentro

desse contexto, o córtex pré-frontal também está ligado à modulação do medo, influenciando as emoções, uma vez que pode reconhecer os aspectos emocionais e motivacionais, trabalhando junto com a amígdala. Consegue aprender e reproduzir associações entre estímulos novos e primários, sendo importante para alterar os estímulos associados a respostas comportamentais. Por fim, o córtex cingulado monitora diferenças entre o estado funcional dos organismos e informações novas recebidas de caráter emocional ou motivacional, atuando na integração de informações do hipotálamo e do sistema sensorial do córtex, produzindo os estados emocionais (FRANKLIN & MANSUY, 2013) (FIG 1).

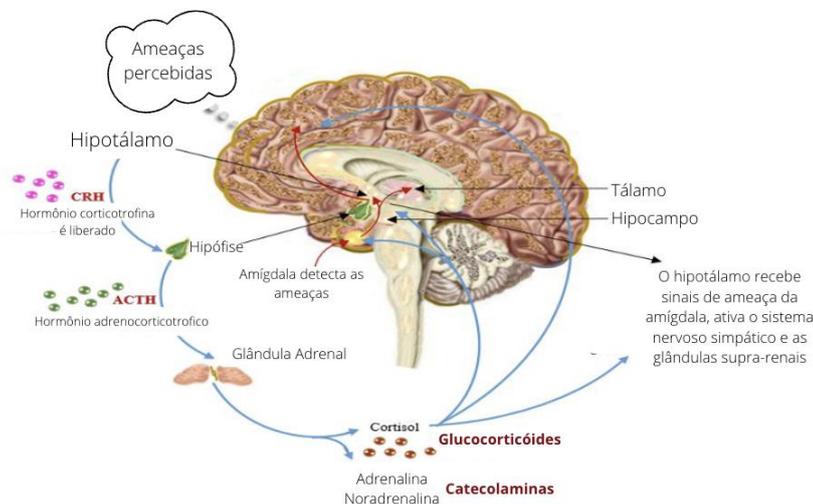
Figura 1: Localização das principais estruturas envolvidas nas emoções, incluindo amígdala, hipotálamo, córtex pré-frontal e córtex cingulado



Fonte: Adaptado de FRANKLIN & MANSUY, 2013.

Além disso, sabe-se que o eixo HHA é fundamental nas respostas neuroendócrinas relacionadas ao estresse, e anormalidades em sua ativação e funcionamento contribuem de forma importante para o estabelecimento e desenvolvimento da ansiedade (LIMA *et al.*, 2020 SADOCK & SADOCK, 2010; ASSUMPCÃO JUNIOR & KUCZYNSKI, 2003; MIGUEL, GENTIL & GATTAZ, 2011). A figura 2, mostra a circuitaria neural que está envolvida no medo, ansiedade e estresse a partir da ativação do HHA, e com isso, ocorrerá a ativação do Sistema Nervoso Autônomo Simpático.

Figura 2: Circuitos neurais envolvidos nas respostas de ansiedade e medo do eixo HHA.



Fonte: Adaptado de CACHA *et al.*, 2020

Evidências científicas mostram que a AIM (eventos que ocorrem com a mãe durante a gestação, desafiando seu sistema imunológico), podem predispor ao surgimento de transtornos neurodesenvolvimentais na prole em idade adulta. Tais transtornos incluem ansiedade, depressão, esquizofrenia e transtorno do espectro autista (TEA) (MCALLISTER and ESTES, 2016; KNUESEL *et al.*, 2014). Sabe-se que o estresse pré-natal está associado à supressão da neurogênese hipocampal seguido de comportamentos e disfunções cognitivas que estão ligadas aos distúrbios mentais da prole adulta (KHAN *et al.*, 2014).

Os estudos de AIM em humanos são limitados, uma vez que os indivíduos são genética e ecologicamente heterogêneos, o que impacta em seu comportamento. Há, portanto, uma dificuldade em se detectar alguma relação casual entre a AIM e o risco de desenvolvimento de distúrbios do neurodesenvolvimento, além do fato de seres humanos não poderem ser submetidos a experimentos invasivos (MCALLISTER and ESTES, 2016). Neste sentido, destaca-se a importância da utilização de modelos animais de AIM, que possibilitem testar o papel da estimulação imunológica precoce como um fator primário que induz alterações neuronais permanentes, para assim

conseguir o desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico e tratamento desses distúrbios (REISINGER *et al.*, 2016).

Em modelos animais de AIM, roedores ou animais primatas não humanos são expostos a insulto imunogênico durante uma fase específica da gestação, sendo que os comportamentos, a função e a estrutura encefálica da prole podem ser avaliadas posteriormente. Dentre os agentes que podem levar à AIM estão o vírus influenza, herpes vírus, *Toxoplasma gondii*, LPS, além dos antígenos suspensos encontrados nas vacinas (MCALLISTER and ESTES, 2016; SPINI *et al.*, 2020).

Estudos mostram que para mães diagnosticadas com alguma infecção no segundo trimestre da gestação, havia uma associação com pontuações mais altas em sintomas de distúrbios mentais nos filhos quando atingiam a puberdade (MURPHY *et al.*, 2017). Diferentes teorias têm tentado explicar as vias pelas quais os insultos durante a gestação possam causar danos neuronais na prole, citando como possibilidades o estresse oxidativo, a inflamação e a ação de citocinas, alteração da microbiota intestinal, dentre outros.

O estresse oxidativo (EO) tem como definição uma perturbação do equilíbrio entre geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante do organismo. Nossas células podem ficar expostas a oxidantes vindos de fontes exógenas (como gás ozônio, radiação, vírus, dentre outros) ou endógenas, a partir do metabolismo celular. Quando nosso sistema antioxidante, mediado por diferentes enzimas, não consegue neutralizar as espécies reativas ao oxigênio (EROs), surge o EO (SOARES, 2014).

As citocinas, por sua vez, são pequenas proteínas que inicialmente foram chamadas de moduladores imunes, mas foram incluídas na mediação de um conjunto variado de funções que não fossem necessariamente imunológicas em vários tecidos, englobando o Sistema Nervoso Central. São moléculas importantes para o desenvolvimento neurológico e possuem um papel central na glicogênese, atuando juntamente com os fatores neurotróficos. Tais fatores são responsáveis por promover a sobrevivência e melhorar as conexões entre as células neurais, atuando ainda como sinalizadores e provocando a apoptose de células inapropriadas (SOARES, 2014). As citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas, interferon-gama e fator de necrose tumoral (HUANG *et al.*, 2022) são liberadas e transportadas para o SNC, afetando a secreção de neurotransmissores localizados na amígdala e no hipocampo (como serotonina,

dopamina), que são áreas importantes de controle da ansiedade e HHA (PARLINDUNGAN *et al.*, 2023).

As citocinas são moléculas importantes durante a gestação, sendo que as citocinas maternas desempenham um papel fundamental desde o início da gravidez, como preparar e adaptar o corpo materno, deixando-o receptivo ao embrião, desenvolvimento do feto, além de ajudarem na implantação do embrião e na manutenção da gravidez (FALEIRO, 2022 apud CRUVINEL *et al.*, 2010; ABY-RAYA *et al.*, 2020).

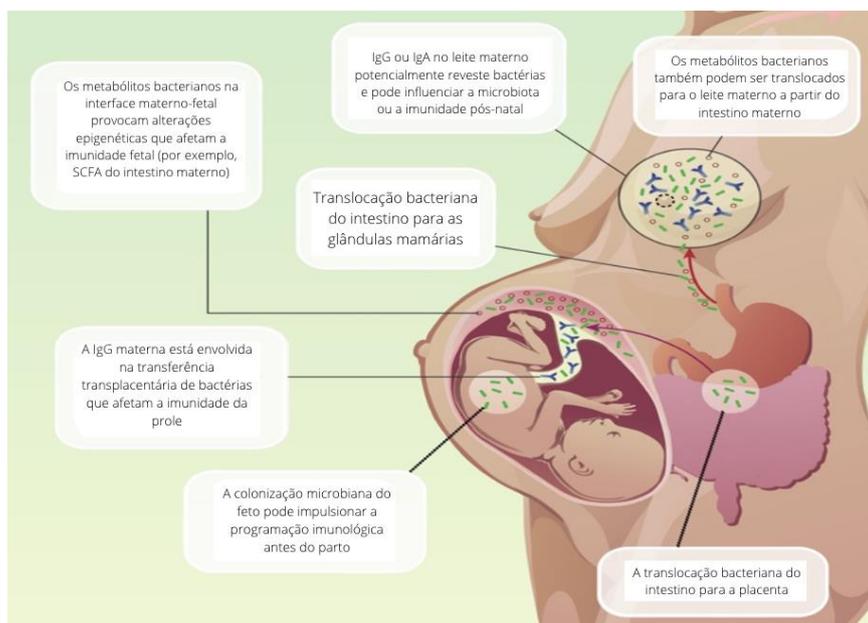
Normalmente, as citocinas ocorrem de forma local, mas seus efeitos podem atingir um nível sistêmico, havendo a participação delas em respostas a alguma infecção materno-fetal (FALEIRO, 2022). As alterações na produção ou regulação das citocinas podem levar a complicações na gestação, como parto prematuro, restrição do crescimento fetal, alterações no desenvolvimento neuronal, entre outras condições adversas. Diversos fatores podem afetar a produção de citocinas, como agentes ambientais tóxicos, estresse, obesidade e tabagismo (SOARES, 2014).

Sabe-se que a gestação é um período de bastante vulnerabilidade para o feto, tendo em vista que os principais processos e as redes neurais são estabelecidos enquanto o feto está em desenvolvimento. Perturbações neurais que ocorram ao longo desse período podem interferir na trajetória típica do desenvolvimento fetal, podendo resultar em efeitos duradouros nos filhos, como a ansiedade, TEA e esquizofrenia (HAN *et al.*, 2021). Fatores inflamatórios maternos, infecciosos ou não, ativam receptores de células imunes inatas maternas e células placentárias, levando a um aumento na produção das citocinas e consequentemente a AIM (HAN *et al.*, 2021).

Outra teoria que tem sido aventada para explicar os efeitos da imunoativação maternal sobre alterações na prole envolve o eixo microbiota-intestino-cérebro. Sabe-se que dieta e a saúde intestinal podem ser responsáveis por alguns sintomas expressos nos transtornos de ansiedade, estresse e depressão. Uma vez que existe uma sinalização bidirecional entre intestino e o cérebro, regulada em diferentes níveis (neural, hormonal e imunológico) (FURTADO *et al.*, 2018), a microbiota pode influenciar na integridade do epitélio intestinal e assim interferir no sistema imunológico e neural (MARESE *et al.*, 2019). De acordo com Furtado *et al.* (2018), as bactérias presentes na microbiota intestinal têm uma função importante no desenvolvimento pós-natal e na maturação dos sistemas imune e endócrino, sustentando a sinalização do SNC.

A dieta materna, obesidade, estresse, toxinas e tabagismo afetam diretamente a composição da microbiota intestinal materna e neonatal (NYANGAHY D.D. and JASPAN, H.B., 2019). Sabe-se que o tipo de dieta da mãe, bem como o uso de antibióticos podem causar disbioses (desequilíbrio na microbiota, com diminuição de microrganismos benéficos). O microbioma materno (presente na vagina, intestino, leite materno) é o primeiro ponto para influenciar na microbiota fetal, além de regular o crescimento, pode afetar a função neural e a cognição na prole adulta. O microbioma intestinal materno altera o desenvolvimento neural, sendo capaz de alterar a função do hipocampo e da amígdala fetal, que, como dito anteriormente, as alterações estruturais e funcionais da amígdala estão associadas a distúrbios neuropsiquiátricos, como a ansiedade (NYANGAHY D.D. and JASPAN, H.B., 2019; BASAK *et al.*, 2022) (FIG 3).

Figura 3: Possíveis mecanismos crosstalk da influência da microbiota materna sobre a prole. A microbiota materna durante a gravidez se move para a interface materno-fetal. As bactérias se deslocam do intestino para a placenta, para o intestino do feto ou para as glândulas mamárias, impactando no desenvolvimento da imunidade do feto por meio de vários mecanismos, como a epigenética, liberação de ácidos graxos de cadeia pequena e alterações nas citocinas. Há também o deslocamento de bactérias para as glândulas mamárias que pode impactar na colonização intestinal do neném e o desenvolvimento do seu sistema imunológico.



Fonte: Adaptado de Nyangahy D. D. and Jaspan H. B. (2019).

Uma vez que os antígenos suspensos nas vacinas desafiam o sistema imunológico da mãe, embora não causem a infecção e a doença, podem ser usados em pesquisas que tentem elucidar aspectos relacionados a alterações no neurodesenvolvimento fetal que impactem nos comportamentos da prole (XIA *et al.*, 2014), como por exemplo a vacina contra influenza (SPINI *et al.*, 2020).

A vacina influenza trivalente é composta por diferentes cepas do vírus *Myxovirus influenzae* inativados, fragmentados e purificados, sendo sua composição e concentração de antígenos hemaglutinina (HA) atualizada todo ano, de acordo com os dados epidemiológicos emitidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Essa vacina é indispensável para prevenção da gripe, evitando as infecções causadas pelo vírus *Myxovirus influenzae*, um dos agentes responsáveis por doenças do trato respiratório, como a gripe influenza (INSTITUTO BUTATAN, 2022).

A vacina influenza age estimulando o organismo a produzir os seus próprios anticorpos; ela faz efeito de duas a três semanas após a aplicação e persiste entre seis meses a um ano. Essa vacina é indicada para gestantes em qualquer fase da gestação e segundo os fabricantes, sendo ministrada sob orientação médica, não apresenta contraindicação (INSTITUTO BUTATAN, 2022).

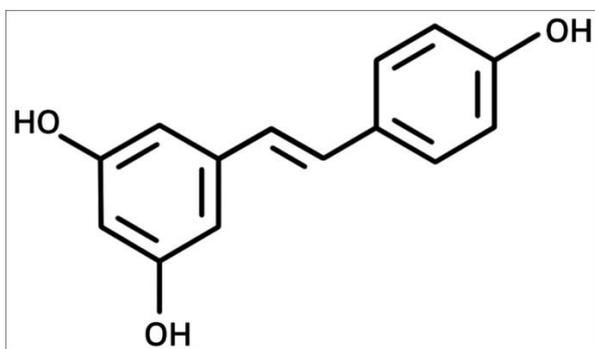
Visto que os antígenos suspensos na vacina atuam como insulto imunogênico, desafiando o sistema imunológico da mãe, o que pode desencadear alterações no sistema neural da prole, torna-se interessante a procura por compostos naturais que diminuam esses danos e previnam as mudanças comportamentais, como a ansiedade, na prole adulta.

O transtorno de ansiedade pode ser tratado farmacologicamente, com a ajuda de um profissional da área, com diferentes fármacos, como benzodiazepínicos, buspirona, antidepressivos, betabloqueadores, antipsicóticos, dentre outros (ANDREATINI *et al.*, 2001). Devido ao grande número de efeitos adversos que podem acontecer com o tratamento farmacológico, faz-se necessário encontrar formas mais naturais para o tratamento de ansiedade. Neste sentido, o uso de tratamentos naturais está se tornando cada vez mais reconhecido, como por exemplo medicamentos fitoterápicos desenvolvidos a partir de matérias primas ativas vegetais, que segundo a ANVISA (2013b), apresentam critérios parecidos de qualidade, segurança e eficácia (SILVA, 2013). Alguns exemplos de produtos naturais com potencial para o tratamento da

ansiedade incluem a geleia real, os ômega 3, 6 e 9 e o resveratrol devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (GOMES, 2019).

O resveratrol (RSV) (3,4',5-trihidroxi-estilbeno) é uma fitoalexina (composto químico de baixo peso molecular com propriedades antimicrobianas) natural produzida por algumas espermatófitas (plantas com sementes), como as videiras (estando muito concentrado na casca da uva roxa), amendoim, frutas vermelhas, e em mais de 70 espécies de plantas (FIG 4) (PAULO, 2011; FRÉMONT, 2000). Produzido em resposta às lesões na planta, é sintetizado naturalmente sob duas formas isoméricas, trans-resveratrol (mais ativo biologicamente e mais abundante que o cis) e cis-resveratrol (menos bioativo ou inativado) (PLACHTA *et al.*, 2024). Trata-se de um potencial candidato para o tratamento da ansiedade, devido suas inúmeras propriedades benéficas ao sistema neural, dentre elas: atua como inibidor de espécies reativas de oxigênio (ERO) reduzindo o estresse oxidativo (ALBERTONI & SCHOR, 2015); apresenta propriedades anti-inflamatórias, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas, interferon-gama e fator de necrose tumoral (HUANG *et al.*, 2022); tem sido considerado um pré-biótico, ao melhorar a microbiota intestinal, tendo em vista que o RSV é capaz de alterar o microbioma intestinal (ALRAFAS *et al.*, 2020). De acordo com Marques (2022), O RSV apresentou também modulações no metabolismo de lipídeos e inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, além de diminuir a agregação de plaquetas, contribuindo para um melhor funcionamento do sistema cardiovascular. Apresenta ainda outras ações benéficas para a saúde, como ação antimicrobiana e anticancerígena.

Figura 4: Estrutura molecular do Resveratrol.



Fonte: ALBERTONI & SCHOR, **Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease - mini-review**, 2015.

Em relação ao sistema neural o RSV possui efeitos neuroprotetores importantes, apresentando ações como a preservação e a manutenção da funcionalidade cerebral, promoção da diferenciação neuronal, além de diminuir a resposta inflamatória no SNC através da modulação de várias vias de sinalização, como a sirtuína. Sua ação neuroprotetora se dá pela capacidade de reduzir a liberação de fatores pró-inflamatórios que são neurotóxicos, inibir as vias de sinalização da cascata celular, envolvendo o fator nuclear kappa B e a proteína ativadora-1, graças à sua ação antioxidante (MARQUES, 2022 apud BASTIANETTO *et al.*, 2015).

De acordo com Bastianetto *et al* (2015), o RSV também consegue proteger neurônios do hipocampo que foram expostos ao óxido nítrico, graças à sua ação antioxidante, que age na eliminação de EROs. O RSV apresenta outra função na resposta celular, conseguindo inibir as enzimas envolvidas no estresse oxidativo, como a quinona redutase 2, além de induzir a proteína heme oxigenase 1 (enzima endógena que apresenta resistência contra danos neurais do estresse oxidativo), aumentando seus níveis em células neurais primárias expostas ao glutamato.

2. JUSTIFICATIVA

A ansiedade é um transtorno psicológico que afeta 9,3% da população brasileira e atinge cerca de 264 milhões de pessoas no mundo, de acordo com a OMS, comprometendo a vida pessoal e produtividade no trabalho das pessoas afetadas por esse transtorno.

Inúmeros estudos apontam para os benefícios de se usar compostos nutracêuticos (ricos em compostos bioativos) como alternativa ao uso de fármacos tradicionais, uma vez que estão sendo cada vez mais conhecidos por causa de sua eficácia, qualidade e segurança.

Um desses produtos naturais que poderia ser eficaz no tratamento da ansiedade é o RSV, por ser um composto antioxidante, anti-inflamatório e modulador da microbiota intestinal, importante para o controle da ansiedade, além de ter outras ações benéficas para a saúde, como efeito anticâncer, modulação do metabolismo lipídico, ação vasodilatadora, alteração da síntese de eicosanoides, dentre outros.

Neste sentido, o estudo do possível efeito neuroprotetor do resveratrol sobre alterações comportamentais associadas a transtornos de humor, como a ansiedade,

poderia contribuir de forma positiva para a busca de potenciais tratamentos alternativos para tais doenças.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral.

Este projeto de pesquisa teve como objetivo geral investigar se o resveratrol, quando administrado durante a gestação, exerce algum efeito protetor sobre possíveis danos comportamentais causados pela ativação imunológica materna (AIM) por antígenos suspensos na vacina influenza trivalente.

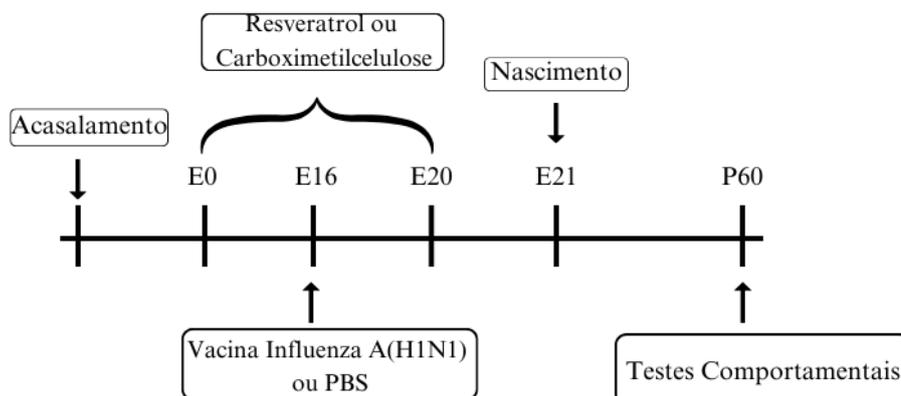
3.1.1 Objetivos Específicos

Investigar os possíveis efeitos da ativação imunológica materna (AIM), com antígenos suspensos na vacina influenza trivalente na idade gestacional E16, sobre comportamentos do tipo ansiosos na prole fêmea em idade adulta, por meio dos testes labirinto em cruz elevada e campo aberto;

Investigar se o resveratrol, administrado cronicamente durante a gestação, por gavagem, apresenta algum efeito neuroprotetor sobre comportamentos do tipo ansiosos na prole fêmea em idade adulta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

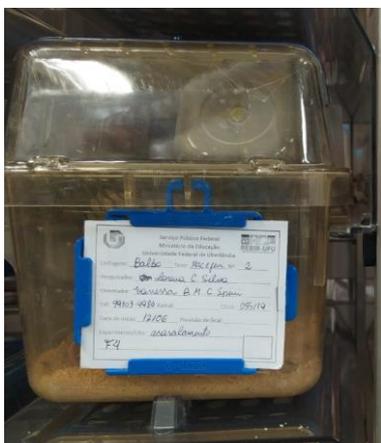
Protocolo em linha:



4.1 Animais experimentais

Durante este estudo, foram utilizados camundongos machos (n=12) e fêmeas (n=24) da linhagem Balb C, fornecidos pela Rede de Biotérios (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia em projeto aprovado pelo CEUA (055/19), sendo mantidos em sala com temperatura controlada ($23^{\circ}\pm 2$), com ciclo de luz 12h luz/ 12h escuro em gaiolas individuais (FIG 5) e livre acesso à água e ração. Para o acasalamento, os animais foram colocados na proporção de duas fêmeas para cada macho, até que fosse visualizada a rolha vaginal (mistura de secreção vaginal e sêmen) (FIG 6), quando então foi considerado o dia zero da gestação (E0).

Figura 5: Gaiolas individuais fornecidas pela Rede de Biotérios UFU



Fonte: Autores (2023).

Figura 6: Rolha vaginal



Fonte: Autores (2023).

4.2 Delineamento Experimental

Após a visualização da rolha vaginal, as fêmeas grávidas foram mantidas em gaiolas individuais até o nascimento da prole, sendo divididas em:

- Grupo 1 (G1): Mães que receberam carboximetilcelulose a 0,5% por gavagem (1 dose por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular única de PBS em E16;
- Grupo 2 (G2): Mães que receberam carboximetilcelulose a 0,5% por gavagem (1 dose por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular única de antígenos suspensos na vacina influenza trivalente em E16;
- Grupo 3 (G3): Mães que receberam resveratrol por gavagem (1 dose por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular única de PBS em E16;
- Grupo 4 (G4): Mães que receberam resveratrol por gavagem (1 dose por dia), de E0 e E21 + 1 injeção intramuscular única de antígenos suspensos na vacina influenza trivalente em E16.

Os filhotes provenientes da reprodução (FIG 7), foram divididos em dois grandes grupos: Grupo 1 formado por filhotes machos e Grupo 2 formado por filhotes fêmeas. Ao atingirem a idade do desmame (P21), os filhotes machos e fêmeas foram separados de acordo com os grupos experimentais, permanecendo no máximo 6 filhotes por gaiola. Foram mantidos nas dependências do REBIR-UFU onde ocorreram os testes comportamentais quando atingiram a idade adulta (P60). No presente estudo foram utilizados apenas filhotes fêmeas.

Figura 7: Fêmea do grupo G3 com 19 dias de gestação e sua prole em P0



Fonte: Autores (2022).

Durante os 21 dias de gestação, as fêmeas foram submetidas à administração do resveratrol (40 mg/kg diluído para todas as fêmeas) ou da carboximetilcelulose (0,5%) por meio de gavagem (0,10 ml) para cada grupo (FIG 8). Quando a gestação chegou em E16 as fêmeas grávidas receberam 1 μ L/g de injeção intramuscular da vacina Influenza A (H1N1) e 1 μ L/g de salina PBS (10x).

Figura 8: Administração via gavagem



Fonte: Autores (2023).

Após 60 dias de nascimento, os animais dos quatro grupos distintos foram submetidos aos testes comportamentais, que foram filmados, sendo posteriormente analisados segundo parâmetros validados pela literatura.

Ao final do período de acasalamento os progenitores foram eutanasiados com cetamina (0,20 ml) e com xilazina (0,10 ml) seguido de deslocamento da cervical. Após os testes comportamentais, a prole também foi eutanasiada com as mesmas dosagens que seus progenitores. Todas as carcaças foram acondicionadas a -20° até o momento de descarte.

4.3 Testes Comportamentais

Os modelos animais são utilizados, desde décadas passadas até os dias atuais, para estudos comportamentais de ansiedade em humanos. Por mais que não possa

basear que, os animais experimentais compartilhem dos mesmos sentimentos análogos à ansiedade dos humanos, porém, há uma relação ampla entre as espécies através dos mecanismos neurais e funções comportamentais semelhante a ansiedade, que pode ser observado desde a concepção de situações que sinalizem perigo até a preparação das respostas de defesa, vista principalmente em mamíferos (CRUZ & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). Diferentes modelos etologicamente fundamentados são usados para acessar comportamentos do tipo ansiosos. Em nossos experimentos utilizamos o Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto.

- **Labirinto em Cruz Elevado (LCE):** Trata-se de um teste comportamental para estudo de ansiedade e alguns aspectos relacionados a desordens de pânico. O teste é baseado no comportamento de “conflito de aproximação-esquiva” do animal em um ambiente desconhecido somado à preferência natural de esquiva às regiões abertas, potencialmente perigosas. A atividade exploratória é avaliada por 5 minutos em um aparato elevado 50 cm do solo e formado por dois braços abertos (34 x 6,5 cm), que formam uma cruz com dois braços fechados (34 x 6,5 x 15 cm). Os principais parâmetros avaliados neste teste são a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados. Como a resposta de esquiva envolve a aquisição de um comportamento em que o animal tenta adiar a ocorrência de um evento aversivo futuro, a diminuição do tempo de permanência do animal nos braços abertos ou aumento de entradas nos braços fechados indica comportamento do tipo ansioso. Inicialmente o animal é colocado no centro do aparato (FIG 9), com a cabeça apontada para o braço aberto e seus comportamentos são gravados por 5 minutos para análise posterior. Entre cada animal testado, o aparato foi higienizado com álcool 70%.

Figura 9: Teste comportamental LCE sendo realizado na prole de G2 em idade adulta.



Fonte: Autores (2022).

- **Campo aberto (CA):** Trata-se de um dos testes mais utilizados para o estudo relacionado à comportamentos do tipo ansiosos e atividade motora em modelos animais. Para este teste utiliza-se um aparato circular com base de 30 cm de diâmetro circundado por uma parede de acrílico de 30 cm de altura, cuja área (base do aparato) é dividida em quadrantes periféricos (adjacentes à parede) e centrais. Os animais são colocados no centro do aparato (FIG 10) para o início dos testes e os comportamentos expressos pelos animais são gravados por 5 minutos para análise posterior. A cada animal testado, o aparato foi higienizado com álcool 70%. O tempo explorando a periferia, o tempo explorando o centro do aparato e o número de vezes que o animal cruzou da periferia para o centro foram os parâmetros avaliados. Nesse teste, quanto menos cruzamentos e menos tempo gasto no centro do aparato (área desprotegida) mais ansioso é considerado o animal.

Figura 10: Teste comportamental CA sendo realizado na prole de G2 em idade adulta



Fonte: Autores (2022).

4.4 Análise estatística

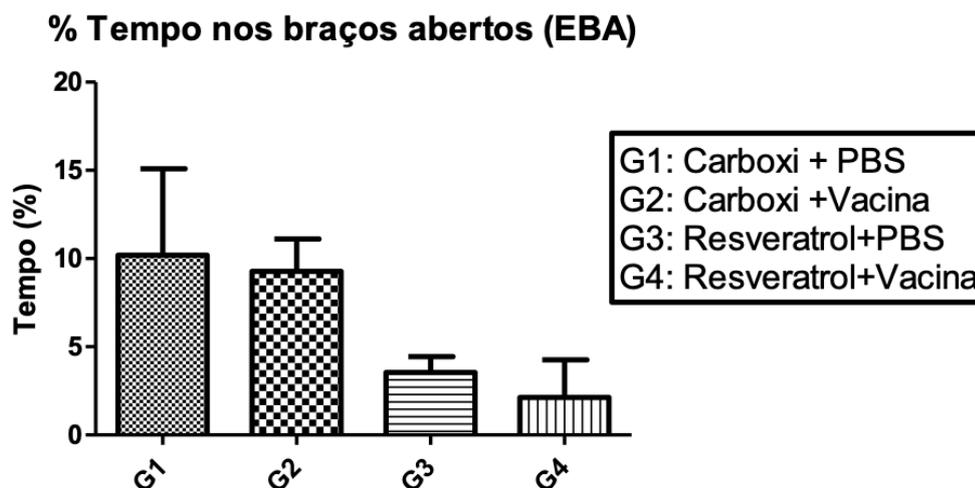
Os resultados dos testes comportamentais foram analisados utilizando-se One-way ANOVA, programa Graphpad Prism 8, sendo os dados expressos como média e EPM. Alterações significativas foram consideradas com $p \leq 0,05$ e quando ANOVA mostrou diferenças significativas a análise foi seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls para comparação entre os grupos de interesse.

5. RESULTADOS

5.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

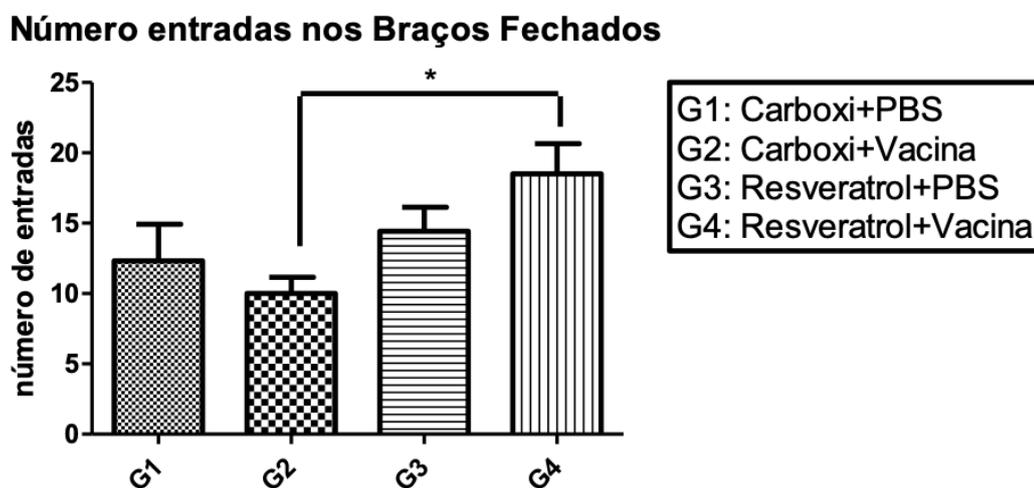
A Figura 11 ilustra a porcentagem do tempo nos braços abertos dos animais de cada grupo experimental submetidos ao LCE. Embora os animais do grupo controle (G1) tenham passado mais tempo explorando os braços abertos ($10,19 \pm 0,09$) que os animais dos demais grupos G2 ($9,27 \pm 0,02$), G3 ($3,54 \pm 0,01$) e G4 ($2,13 \pm 0,02$), a diferença não foi significativa.

Figura 11: Porcentagem de tempo nos braços abertos do teste LCE dos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM.



Já em relação ao número de entrada nos braços fechados, houve uma diferença significativa entre os grupos G2 ($10 \pm 1,50$) e G4 ($18,50 \pm 2,15$). Para os demais grupos não observamos diferença significativa (G1 - $12,33 \pm 2,60$ e G3 - $14,42 \pm 1,97$).

Figura 12: Número de entradas nos braços fechados dos animais dos 4 grupos experimentais no teste LCE. *diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao número de entradas nos braços fechados. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM.

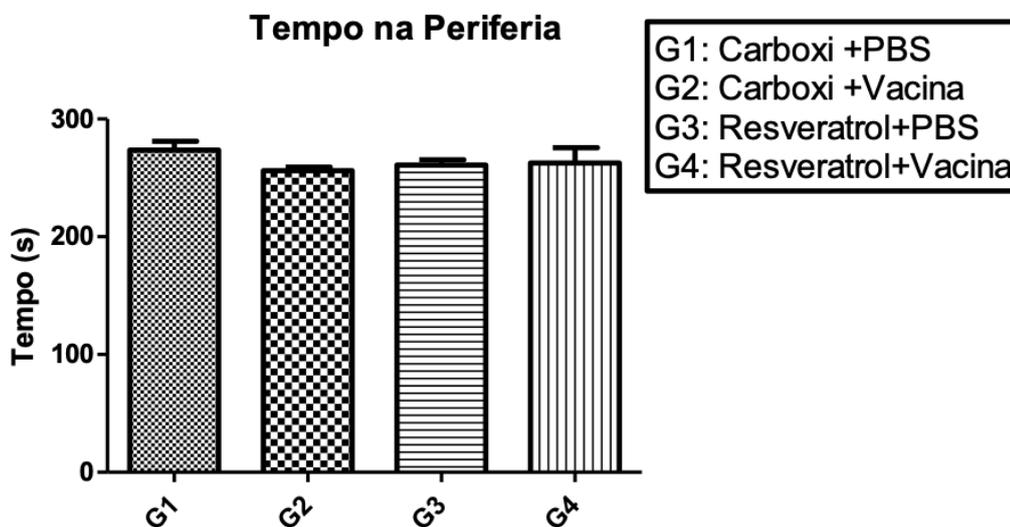


5.2 Teste do Campo Aberto

Os resultados representados na figura 13 indicam o tempo que os animais passaram na periferia do aparato. Não houve uma diferença significativa em relação aos

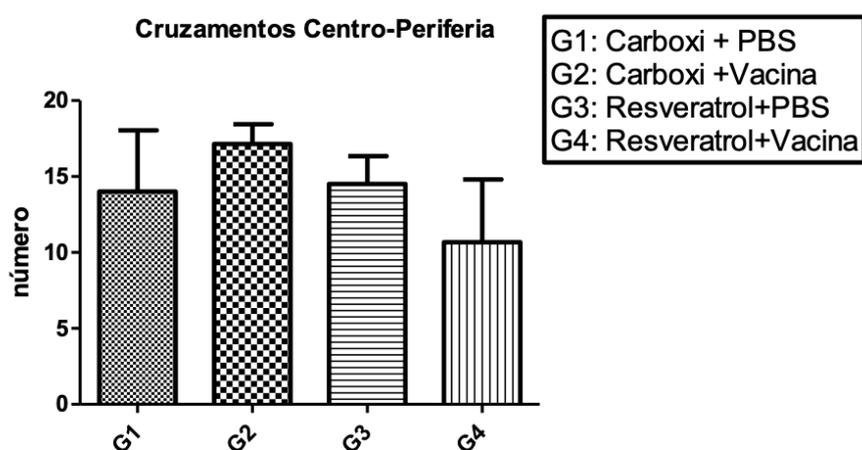
4 grupos, ou seja, os camundongos passaram tempos similares na periferia do aparato (G1 - $273,5 \pm 7,66$; G2 - $256 \pm 3,03$; G3 - $260,75 \pm 4,59$; G4 - $262,66 \pm 12,91$).

Figura 13: Tempo no campo periférico do teste CA dos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM



Outro parâmetro avaliado, o número de cruzamentos centro-periferia, representado na figura 14, indica o número de vezes que os animais cruzaram o aparato. O grupo G2 ($17,14 \pm 1,29$), demonstrou uma quantidade de cruzamentos maior do que os demais grupos (G1 - $14 \pm 4,77$; G3 - $14,5 \pm 1,84$; G4 - $10,66 \pm 4,14$), porém a diferença não foi significativa.

Figura 14: Número de cruzamentos centro-periferia do teste CA dos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM.



6. DISCUSSÃO

No presente estudo buscamos investigar um possível efeito neuroprotetor do resveratrol sobre a prole fêmea adulta, quando administrado de forma crônica, por gavagem, em mães desafiadas com antígenos suspensos na vacina influenza trivalente na idade gestacional E16. Sabe-se que tanto o tipo de insulto imunogênico quanto a fase da gestação em que ele ocorre podem influenciar no neurodesenvolvimento fetal e predispor ao surgimento de transtornos de humor (SPINI *et al*, 2020).

Diferentes testes comportamentais têm sido usados para acessar comportamentos do tipo ansiosos em modelo animal. Labirinto em Cruz Elevado (utilizado para o conflito entre o medo que os roedores têm de altura e espaços abertos e a curiosidade de explorar um ambiente novo) e Campo Aberto (utilizado como forma de observar a locomoção do animal no centro do aparato sendo um parâmetro mais seletivo para observar a ansiedade) (CRUZ & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012) são importantes e os mais utilizados na obtenção de resultados para animais com comportamento do tipo ansioso, cada um com sua especificidade.

Embora esperássemos que a prole das mães desafiadas com os antígenos da vacina desenvolvesse comportamento do tipo ansioso, diminuindo o tempo de exploração nos braços abertos (teste de LCE) e gastando mais tempo na periferia do aparato (teste CA), nossos resultados não mostraram esse efeito ansiogênico da vacina, já visto em outros experimentos do nosso laboratório, porém esses experimentos foram feitos nos filhotes machos (SPINI *et al.*, 2020). Estudos feitos por Magaji *et al* (2017) mostram que o resveratrol apresenta potenciais ansiolíticos e antipsicóticos em testes comportamentais de modelos animais de ansiedade e esquizofrenia. Esperávamos também que o resveratrol, devido suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e pré-bióticas, exibisse um efeito neuroprotetor, com atividade ansiolítica, aumentando o tempo de exploração dos braços abertos no LCE e diminuição do tempo gasto na periferia do aparato, no teste CA. Porém, esse possível efeito neuroprotetor do resveratrol não foi observado.

Ao longo do projeto, no período da pandemia do COVID-19, alguns animais tiveram que ser eutanasiados antes de começar os experimentos, e no período pós pandemia, quando as atividades no biotério estavam voltando a funcionar, as condições do experimento não foram as mesmas, o biotério entrou em reforma, o que pode ter ocasionado estresse adicional em algum grupo específico de animais devido ao barulho,

uma vez que nem todos os grupos foram conduzidos ao mesmo tempo e isso pode ter impactado nos resultados. Teve-se que fazer mais de uma bateria de experimentos para que cada grupo de fêmeas chegassem a um N necessário para fazer as análises estatísticas e comportamentais.

Em experimento anterior nosso grupo de pesquisa desafiou mães Balb-C gestantes com vacina influenza trivalente em E16 e as tratou com resveratrol subcutâneo, encontrando efeito neuroprotetor, manifestado pela diminuição dos comportamentos do tipo ansioso, depressivo e melhora na memória e sociabilidade (dados ainda não publicados) da prole adulta. O resveratrol usado naquele experimento foi fornecido pela FIOCRUZ-RJ e apresentou atividade antioxidante, nos testes ORAC (oxygen radical absorbance capacity) e FRAP (Ferric reducing antioxidant power). No experimento atual usamos resveratrol manipulado na farmácia Biopharma na cidade de Uberlândia, uma vez que grande parte da população utiliza cápsulas manipuladas de resveratrol. Entretanto, como não foram feitos em nosso laboratório testes para comprovação de sua atividade antioxidante, acreditamos que isso possa ser um dos motivos para a discrepância dos resultados obtidos nos dois experimentos.

Além disso, pode-se levantar a hipótese de outros fatores também terem influenciado nos resultados analisados, como o estresse materno ao longo do manejo e o ciclo estral.

Diversos estudos mostram que o estresse materno ao longo da gravidez, principalmente durante a última semana de gestação, resulta em riscos altos de desenvolver distúrbios psiquiátricos na prole, como a ansiedade (MOURA *et al*, 2022). Uma vez que, como citado anteriormente, houve um espaçamento entre as primeiras baterias de testes e as últimas, e uma vez que o comportamento animal é altamente influenciado pelas condições ambientais e de manejo, acreditamos que alguns grupos experimentais possam refletir essa diferença nas condições, como observamos para os grupos 3 e 4, que receberam resveratrol e que exibiram mais comportamentos do tipo ansiosos no teste LCE, assim como G4 no teste de CA.

Camundongos fêmeas são mais vulneráveis que os machos devido às oscilações hormonais graças ao ciclo estral. Dados e estudos acerca do ciclo estral afirmam que o desempenho comportamental desses animais em testes de ansiedade pode variar ao longo das fases hormonais (CASTILLO *et al*, 2022). Embora nossa intenção fosse determinar a fase do ciclo estral em que cada animal estava, antes dos testes, uma das

etapas do protocolo de estadiamento falhou e não conseguimos fazer essa verificação para todos os animais, o que inviabilizou o uso dessa informação para comparação dos comportamentos entre os grupos.

7. CONCLUSÃO

É possível concluir que nas condições usadas nesse experimento, não foram observadas atividade ansiogênica dos antígenos suspensos na vacina influenza trivalente usados como insulto imunológico na mãe em E16, nem atividade neuroprotetora do resveratrol administrado por gavagem às fêmeas gestantes, sobre os comportamentos do tipo ansiosos na prole de fêmeas adultas.

8. REFERÊNCIAS

ALBERTONI, Guilherme & SCHOR, Nestor. **Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease - mini-review.** *J Bras Nefrol* 2015; 37(1): 106-114, 2015. DOI: 10.5935/0101-2800.20150015

ALRAFAS, H.R.; Busbee, P.B.; Chitrala, K.N.; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P. **Alterations in the Gut Microbiome and Suppression of Histone Deacetylases by Resveratrol Are Associated with Attenuation of Colonic Inflammation and Protection Against Colorectal Cancer.** *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1796. DOI: 10.3390/jcm9061796

ANDREATINI, Roberto et al. **Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras.** 2001.

BASAK, S.; Das, R.K.; Banerjee, A.; Paul, S.; Pathak, S.; Duttaroy, A.K. **Maternal Obesity and Gut Microbiota Are Associated with Fetal Brain Development.** *Nutrients* **2022**, *14*, 4515. DOI: 10.3390/nu14214515

BASTIANETTO, Stéphane et al, **Neuroprotective action of resveratrol**, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Volume 1852, Issue 6, 2015, Pages 1195-1201, ISSN 0925-4439, DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.09.011.

BIERNATH, André. **Ansiedade afeta o organismo e pode paralisar sua vida**. 2018

CASTILLO, Laura Yesenia et al. 2022. **Juvenile Exposure to BPA Alters the Estrous Cycle and Differentially Increases Anxiety-like Behavior and Brain Gene Expression in Adult Male and Female Rats**. *Toxics* 10, no. 9: 513. DOI: 10.3390/toxics10090513

CHEN, X. & Oppenheim, JJ. **The phenotypic and functional consequences of tumour necrosis factor receptor type 2 expression on CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells**. 2011. Laboratory of Molecular Immunoregulation – USA. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03460.x

CRUZ, AP de M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. **Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas**. *Métodos em neurociência*, p. 192-217, 2012.

DMS-5. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Fifth Edition, 2013.

ESPERIDIÃO-ANTONIO, Vanderson *et al.* **Neurobiologia das Emoções**. 2008. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, 35 (2), São Paulo – SP. DOI: 10.1590/S0101-60832008000200003.

FALEIRO, Dalana. **Alteração do perfil de citocinas maternas em período gestacional e o diagnóstico de anomalias fetais congênitas: revisão sistemática e estudo pré-clínico**. 2022. 75f. Tese – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

FRANKLIN, Tamara & MANSUY, Isabelle. (2013). **The Neural Bases of Emotions**, *Neurosciences – From Molecule to Behavior: a university textbook*, 2013, pages 525 – 552, DOI: 10.1007/978-3-642-10769-6_24

FRÉMONT, Lucie, **Biological effects of resveratrol**, Life Sciences, Volume 66, Issue 8, 2000, Pages 663-673, ISSN 0024-3205, DOI: 10.1016/S0024-3205(99)00410-5.

FRYE, Cheryl A. *et al.* **Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 α ,5 α -THP**, Pharmacology Biochemistry and Behavior, Volume 67, Issue 3, 2000, Pages 587-596, ISSN 0091-3057, DOI: 10.1016/S0091-3057(00)00392-0

FURTADO, Celine de Carvalho *et al.* **Psicobióticos: uma ferramenta para o tratamento no transtorno de ansiedade e depressão?** Revista UNILUS Ensino e Pesquisa, v. 15, n. 40, Santos, São Paulo, 2018, ISSN: 2318-2083

GOMES, Anna Laura de Jesus. **Efeitos da suplementação com geleia real sobre os comportamentos do tipo ansiosos em camundongos adultos expostos a estresse crônico**. 2019. 41 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

HAN, V.X., Patel, S., Jones, H.F. *et al.* **Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders**. *Nat Rev Neurol* **17**, 564–579 (2021). DOI: 10.1038/s41582-021-00530-8

HIANY, Natália *et al.* **Perfil Epidemiológico dos Transtornos Mentais na População Adulta no Brasil: uma revisão integrativa**. 2018. 11 f. TCC (Graduação) - Curso de Enfermagem, Unimontes, Montes Claros, 2018.

HUANG, L.-Y. *et al.* **Interferon Family Cytokines in Obesity and Insulin Sensitivity**. *Cells* **2022**, *11*, 4041. DOI 10.3390/cells11244041

INSTITUTO BUTATAN. **Vacina Influenza Trivalente**. 2022

KHAN, D *et al.* **Long-term effects of maternal immune activation on depression-like behavior in the mouse.** *Transl Psychiatry* (2014) 4, e363; DOI: 10.1038/tp.2013.132

KNUSEL I *et al.* **Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders.** *Nat Rev Neurol.* 2014 Nov;10(11):643-60. doi: 10.1038/nrneurol.2014.187. Epub 2014 Oct 14. PMID: 25311587.

LEITE, Roberta Maria Pereira. **Ciclo estral e menstrual: repercussão da agressão nutricional precoce sobre parâmetros locomotores em ratas e consequências sobre as propriedades neuromecânicas em mulheres jovens.** 2008. 194 f. Tese (Doutorado) – Curso de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco e Universidade de Tecnologia de Compiègne, Recife, Pernambuco, 2009.

LI, Chunhong *et al.* **Recent progress in nanotechnology-based drug carriers for resveratrol delivery.** *Drug Delivery*, volume 30, Issue 1, 2023. DOI: 10.1080/10717544.2023.2174206

LIMA, C. L. S, *et al.* **Physiological and drug bases of anxiety disorder.** *Research, Society and Development, [S. l.]*, v. 9, n. 9, p. e808997780, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i9.7780

LLEUVELYN, A. Cacha *et al.* **Anxiety-related circuitry in affective neuroscience.** *J. Mol. Clin. Med.* **2020**, 3(3), 67–74. DOI: 10.31083/j.jmcm.2020.03.806

LUKAS Płachta, Marzena Mach, Magdalena Kowalska, Paweł Wydro, **The effect of trans-resveratrol on the physicochemical properties of lipid membranes with different cholesterol content,** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1866, Issue 1, 2024, 184212, ISSN 0005-2736, DOI: 10.1016/j.bbamem.2023.184212.

MAGAJI, M.G. *et al.* **Neurobehavioural evaluation of resveratrol in murine models of anxiety and schizophrenia.** *Metab Brain Dis* **32**, 437–442 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9927-6>

MARCHETTE, Renata Cristina Nunes. **Avaliação temporal dos efeitos do estresse de contenção no frio sobre os comportamentos relacionados a ansiedade e depressão em duas linhagens de camundongos fêmeas, Swiss e C57BL/6J.** 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2013.

MARESE, A., Ficagna, E., Parizotto, R., & Linartevichi, V. (2019). **PRINCIPAIS MECANISMOS QUE CORRELACIONAM A MICROBIOTA INTESTINAL COM A PATOGÊNESE DA DEPRESSÃO.** *FAG JOURNAL OF HEALTH (FJH)*, 1(3), 232-239. DOI: 10.35984/fjh.v1i2.40

MARQUES, Bianca Dolne. **Efeitos neuroprotetores do resveratrol: uma revisão da literatura.** 2022. 38 f. TCC (Graduação) – Curso de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2022.

MARTIN, E. I. *et al.* **The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology.** *The Psychiatric clinics of North America*, 2009, 32(3), 549–575. 10.1016/j.psc.2009.05.004.

MCALLISTER, A. Kimberley and ESTES, Myka L. **Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders.** 2016. 7 f., University Of California Davis, California, 2016.

MOURA, Clarissa A. *et al.*, **Maternal stress during pregnancy in mice induces sex-dependent behavioral alterations in offspring along with impaired serotonin and kynurenine pathways of thryptophan metabolism,** *Dev Neurosci* (2022), 44 (6): 603-614. DOI: 10.1159/000526647

MURPHY, Shannon K. *et al.*, **Maternal infection and stress during pregnancy and depressive symptoms in adolescent offspring,** *Psychiatry Research*, Volume 257, 2017, Pages 102-110, ISSN 0165-1781, DOI: 10.1016/j.psychres.2017.07.025.

NYANGAHY D.D. and Jaspan, H.B. (2019), **Influence of maternal microbiota during pregnancy on infant immunity**. *Clin Exp Immunol*, 198: 47-56. DOI: 10.1111/cei.13331

PARLINDUNGAN, Faisal *et al.* **Association between proinflammatory cytokines and anxiety and depression symptoms in rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional study**. *Clinical Practice & Epidemiology in Mental Health*, volume 19, 2023. DOI: 10.2174/17450179-v19-e230510-2022-34

PAULO, Luísa Alexandra Serrano. **Determinação dos teores de resveratrol em vinhos tintos com denominação de origem controlada beira interior e avaliação das suas propriedades antimicrobianas**. 2011. 198 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biomedicina, Universidade da Beira Interior, Covilhão, 2011

PLACHTA Łukasz *et al.* **The effect of trans-resveratrol on the physicochemical properties of lipid membranes with different cholesterol content**, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1866, Issue 1, 2024, 184212, ISSN 0005-2736, DOI 10.1016/j.bbamem.2023.184212.

REISINGER, Sonali N. *et al.*, **Maternal immune activation epigenetically regulates hippocampal serotonin transporter levels**, *Neurobiology of Stress*, Volume 4, 2016, Pages 34-43, ISSN 2352-2895, DOI: 10.1016/j.ynstr.2016.02.007

ROSS, Elliot D. **Differential Hemispheric Lateralization of Emotions and Related Display Behaviors: Emotion-Type Hypothesis**. *Brain Sci.* **2021**, *11*, 1034. DOI: 10.3390/brainsci11081034

SADOCK, Benjamin J. and SADOCK, Virginia A. **Pocket Handbook of Clinical Psychiatry**. 2010, 600p, 5 edição.

SAKAE, Diana Yae, **Efeito da luminosidade relativa no labirinto em cruz elevado sobre o comportamento exploratório de ratos wistar fêmeas**. 2010. 87 f. Dissertação

(Mestrado) – Pós-graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.

SILVA, José Teofilo Vieira da. **Utilização de fitoterápicos no tratamento da ansiedade: um estudo de caso.** 2013. 5 f. TCC (Graduação) - Faculdade Juazeiro do Norte, Juazeiro do Norte, 2013.

SPINI, Vanessa, *et al.* **Maternal Immune Activation with H1N1 or Toxoplasma gondii Antigens Induces Behavioral Impairments Associated with Mood Disorders in Rodents.** *Neuropsychobiology.* 2021;80(3):234-241. DOI: 10.1159/000510791. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33070134.

SOARES, Evandro da Cruz Cittadin. **A ativação imunológica materna na gênese do comportamento autista: aspectos comportamentais e neuroquímicos.** 2014. 60 f. – Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, 2014.

TESCH, Lucas Aguiar. **Revisão bibliográfica da relação entre receptores 5-HT (3,4,5,6,7) com a ansiedade e depressão.** 2018. 27 f. - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

XIA, Yucen *et al.* **Influenza vaccination during early pregnancy contributes to neurogenesis and behavioral function in offspring.** 2014. 10f. Elsevier Inc. China. DOI 10.1016/j.bbi.2014.06.202