

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito neuroprotetor do resveratrol sobre prejuízos da memória e sociabilidade em filhotes fêmeas de mães Balb-C tratadas com antígenos suspensos na vacina influenza tetravalente.

Lorena Costa Silva

Orientador(a): Prof^ª Dr^ª Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini
Instituto de Ciências Biomédicas

Uberlândia – MG

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito neuroprotetor do resveratrol sobre prejuízos da memória e sociabilidade em filhotes fêmeas de mães Balb-C tratadas com antígenos suspensos na vacina influenza tetravalente.

Lorena Costa Silva

Orientador(a): Prof^a Dr^a Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini

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

Uberlândia – MG

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Efeito neuroprotetor do resveratrol sobre prejuízos da memória e sociabilidade em
filhotes fêmeas de mães Balb-C tratadas com antígenos suspensos na vacina
influenza tetravalente.**

Lorena Costa Silva

Orientador(a): Prof^ª Dr^ª Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini
Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM)

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

Uberlândia - MG

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Efeito neuroprotetor do resveratrol sobre prejuízos da memória e sociabilidade em
filhotes fêmeas de mães tratadas com antígenos suspensos na vacina
influenza tetravalente.**

Lorena Costa Silva

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia,
2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a vida e ter me permitido tantas conquistas.

Aos meus pais, Carmen e Osmar, os quais nunca mediram esforços para que todos os meus sonhos se concretizassem. A educação, o carinho, o amor, o incentivo e apoio que vocês me proporcionaram jamais poderão ser expressados em palavras. Amo vocês com todo o meu coração.

À Universidade Federal de Uberlândia que me acolheu como aluna e me proporcionou uma formação completa e diversificada.

Às minhas avós, madrinhas e todos da minha família por me apoiarem e me amarem tanto.

Aos meus grupos de amizades, “CDR” e “MF”, por todo apoio durante minha graduação e vida pessoal. Obrigada por se tornarem a minha segunda família.

À minha amiga e colega de laboratório Bruna Scucuglia, por dividir esse momento tenso de escrita do TCC comigo e por todo suporte, carinho e companheirismo de sempre.

À minha amiga Suzanne, por todo apoio, carinho, companheirismo. Sem ela o trajeto até aqui teria sido bem mais difícil.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini, por todos os ensinamentos, apoio, paciência, carinho e confiança.

À minha Professora, Dr^a Érika Renata Barbosa Neiro, por ter feito eu me apaixonar pela neurofisiologia durante suas aulas e por ter me dado a oportunidade de conhecer a linha de pesquisa do laboratório para que fosse possível desenvolver meu TCC.

Aos meus colegas de laboratório, Gabriel Borges, Lara Cecília, Melissa Rodrigues e Ana Júlia que não hesitaram em me ajudar sempre que necessário.

Ao doutorando Rener Mateus, por todas as vezes que foi extremamente solícito para tirar dúvidas sobre o projeto.

À técnica Dr^a Simone Deconte, por todo suporte durante a preparação do tratamento dos animais e por sempre tirar qualquer dúvida sobre procedimentos realizados no laboratório.

Às minhas colegas de trabalho, Laís e Maria Eduarda, pelo apoio e incentivo.

À Ayla, por todo companheirismo.

À Drielly Queiroga, por ser minha inspiração como pesquisadora.

À Thaís Crozara, por ser minha inspiração como professora.

Aos meus alunos por sempre me incentivarem a ser uma profissional melhor, pelo carinho, pela cobrança e pelos ensinamentos.

À banca examinadora pela disponibilidade, leitura e colaboração para este trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hipótese monoaminérgica da depressão.....	15
Figura 2: Alterações imunológicas na placenta e no cérebro fetal em resposta à inflamação sistêmica durante a gravidez, resultando em disfunção do desenvolvimento neuronal na prole.....	17
Figura 3: Estresse Oxidativo.....	18
Figura 4: Possíveis mecanismos entre a microbiota materna e sua influência na prole.....	19
Figura 5: Forma cis- e trans- do Resveratrol.....	21
Figura 6: Protocolo em linha.....	24
Figura 7: Caixas isoladas com sistema de exaustão que controla o fluxo de ar (REBIR – UFU).....	25
Figura 8: Rolha vaginal.....	25
Figura 9: Fêmea do grupo G3 em E19.....	27
Figura 10: Prole de G3 em P0.....	27
Figura 11: Administração via gavagem.....	28
Figura 12: Agulha de gavagem.....	28
Figura 13: Vacina Influenza Tetravalente.....	29
Figura 14: Etapas do Teste de Reconhecimento de Objetos.....	30

Figura 15: Teste comportamental de RO sendo realizado na prole de G3 em idade adulta.....	31
Figura 16: Etapas do Teste de Interação Social.....	32
Figura 17: Teste comportamental de IS sendo realizado na prole de G4 em idade adulta.....	33
Figura 18: Porcentagem do tempo de exploração dos camundongos com o objeto familiar (OF) e o objeto novo (ON) nos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM.....	34
Figura 19: Tempo de interação entre os camundongos com a gaiola contendo o animal desconhecido (A) e com a gaiola vazia (C) nos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM.....	35
Figura 20: Tempo de interação entre os camundongos com o animal desconhecido (A) e com o animal familiar (C) nos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM.....	36

RESUMO

Os transtornos mentais são um importante problema de saúde pública, impactando na economia mundial. Eventos que ocorrem durante a gravidez e que ativam o sistema imunológico materno (ativação imunológica materna) podem predispor à alterações no comportamento da prole adulta, causando distúrbios como depressão, ansiedade, esquizofrenia e autismo. O resveratrol, substância encontrada na casca da uva roxa, tem sido considerado um tratamento promissor devido seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Esse projeto de pesquisa avaliou o efeito da vacina influenza tetravalente como agente indutor da ativação imunológica materna em camundongas Balb C gestantes e seu impacto sobre comportamentos relacionados à sociabilidade e memória, na prole fêmea adulta, por meio dos testes de interação social e reconhecimento do objeto; investigou um possível efeito neuroprotetor do resveratrol, administrado por gavagem nas mães gestantes, na prole fêmea adulta, segundo o delineamento: G1: Mães que receberam carboximetilcelulose a 0,5% por gavagem (1 dose de 100 μ L por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular de PBS em E16 (1 μ L/g); G2: Mães que receberam carboximetilcelulose a 0,5% por gavagem (1 dose de 100 μ L por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular de vacina influenza tetravalente em E16 (1 μ L/g); G3: Mães que receberam resveratrol por gavagem (1 dose de 100 μ L por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular de PBS em E16 (1 μ L/g); G4: Mães que receberam resveratrol por gavagem (1 dose de 100 μ L por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular de vacina influenza tetravalente em E16 (1 μ L/g). As fêmeas quando atingiram idade adulta, tiveram seus comportamentos avaliados nos testes de Reconhecimento de objetos (RO) e de Interação social (IS). No teste de RO a análise estatística mostrou que para os diferentes grupos, os animais não distinguiram entre o objeto novo (ON) e o objeto familiar (OF), uma vez que não houve diferença significativa no tempo de exploração dos dois objetos. No teste de Sociabilidade (T1 de IS), os animais de G1 interagiram significativamente mais com o animal desconhecido (A) do que com a gaiola vazia (C), validando o grupo controle ($p \leq 0,05$). Em G4, o resveratrol teve efeito favorável, ou seja, os animais interagiram significativamente mais com (A) do que com (C) ($p \leq 0,05$). No teste de Preferência por novidade social (T2 de IS), os animais de G1 interagiram significativamente mais com o animal desconhecido (A) do que com o animal familiar (C), validando o controle ($p \leq 0,05$). Os demais grupos não obtiveram uma diferença significativa neste teste.

Palavras chaves: Ativação Imunológica Materna (AIM), Resveratrol, Vacina Influenza Tetravalente, Memória, Sociabilidade.

ABSTRACT

Mental disorders are an important public health problem, impacting the world economy. Events that occur during pregnancy and that activate the maternal immune system (maternal immune activation) can predispose to changes in the behavior of adult offspring, causing disorders such as depression, anxiety, schizophrenia and autism. Resveratrol, a substance found in the skin of purple grapes, has been considered a promising treatment due to its antioxidant and anti-inflammatory effects. This research project evaluated the effect of the tetravalent influenza vaccine as an agent that induces maternal immune activation in pregnant Balb C mice and its impact on behaviors related to sociability and memory, in adult female offspring, through social interaction and object recognition tests. ; investigated a possible neuroprotective effect of resveratrol, administered by gavage to pregnant mothers, in adult female offspring, according to the design: G1: Mothers who received 0.5% carboxymethylcellulose by gavage (1 dose of 100 μ L per day), from E0 to E21 + 1 intramuscular injection of PBS at E16 (1 μ L/g); G2: Mothers who received 0.5% carboxymethylcellulose by gavage (1 dose of 100 μ L per day), from E0 to E21 + 1 intramuscular injection of tetravalent influenza vaccine at E16 (1 μ L/g); G3: Mothers who received resveratrol by gavage 1 dose of 100 μ L per day), from E0 to E21 + 1 intramuscular injection of PBS at E16 (1 μ L/g); G4: Mothers who received resveratrol by gavage (1 dose of 100 μ L per day), from E0 to E21 + 1 intramuscular injection of tetravalent influenza vaccine at E16 (1 μ L/g). When females reached adulthood, their behaviors were evaluated in the Object Recognition (RO) and Social Interaction (SI) tests. In the RO test, statistical analysis showed that for the different groups, the animals did not distinguish between the new object (ON) and the familiar object (OF), since there was no significant difference in the exploration time of the two objects. In the Sociability test (T1 of IS), G1 animals interacted significantly more with the unknown animal (A) than with the empty cage (C), validating the control group ($p \leq 0,05$). In G4, resveratrol had a favorable effect, that is, the animals interacted significantly more with (A) than with (C) ($p \leq 0,05$). In the Preference for social novelty test (T2 of IS), G1 animals interacted significantly more with the unfamiliar animal (A) than with the familiar animal (C), validating the control ($p \leq 0,05$). The other groups did not obtain a significant difference in this test.

Keywords: Maternal Immune Activation (MIA), Resveratrol, Tetravalent Influenza Vaccine, Memory, Sociability.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM – Ativação Imunológica Materna
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
E0 - 1º dia de gestação
E16 - 16º dia de gestação
E19 – 19º dia de gestação
E21- 21º dia de gestação (Último dia)
EO – Estresse Oxidativo
IS – Interação Social
LPS – Lipopolissacarídeo
NF-κB- Factor nuclear kappa B
OMS- Organização Mundial da Saúde
P0 – Dia do nascimento
P21 – 21 dias de vida pós-nascimento (Idade do desmame)
P60 – 60 dias de vida pós-nascimento
PBS- Solução tampão fosfato-salina
REBIR – Rede de Biotérios
RO – Reconhecimento de Objeto
EROS – Espécies reativas ao oxigênio
RSV- Resveratrol
REBIR – Rede de Biotérios
TAG - Transtorno de ansiedade generalizada
TEA – Transtorno do Espectro Autista

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral	23
3.1.1 Objetivos Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Animais experimentais	24
4.2 Delineamento Experimental	26
4.3 Testes Comportamentais.....	29
4.4 Análise estatística	33
5. RESULTADOS	33
5.1 Teste de Reconhecimento de Objetos.....	33
5.2 Interação Social (IS) – Teste de sociabilidade.....	34
5.3 Interação Social (IS) - Teste de preferência por novidade social	35
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

Transtornos mentais estão entre as doenças que mais atingem a população mundial. Dados alertam que uma em cada oito pessoas no mundo sofre de algum transtorno mental (OMS, 2022). Transtorno mental é uma síndrome identificada por alterações na cognição, nas emoções ou no comportamento de um indivíduo devido as modificações psicológicas, biológicas ou de desenvolvimento (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos mentais, 2014).

Dessa forma, fazem parte: depressão, ansiedade, transtorno bipolar, esquizofrenia, transtorno do espectro autista, demência, transtorno obsessivo compulsivo, transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (TDAH), transtornos relacionados a trauma e estressores, entre outros (Associação Psiquiátrica Americana, 2014).

A depressão é uma das principais causas de incapacidade no mundo, com aproximadamente 300 milhões de afetados, sendo as mulheres mais acometidas que os homens. O total de pessoas vivendo com transtorno afetivo bipolar é cerca de 60 milhões. O número de casos de esquizofrenia é cerca de 23 milhões. Em relação ao autismo, acredita-se que uma em cada 160 crianças tenha transtorno do espectro autista (Organização Mundial da Saúde, 2019).

Segundo dados da OMS divulgados em 2017, o Brasil é o segundo país com maior número de depressivos nas Américas (com 5,8% da população), perdendo apenas para os Estados Unidos (com 5,9% de indivíduos com depressão). O Brasil também é o país com maior número de ansiosos em toda a América, aproximadamente 9,3% da população (Organização Mundial da Saúde, 2017).

Em alguns distúrbios mentais tanto a sociabilidade como a memória pode ser afetada. Um dos critérios para caracterizar o transtorno do espectro autista é o prejuízo que ocorre na comunicação social e interação social (Associação Psiquiátrica Americana, 2014). Além disso, segundo a literatura, em alguns casos de depressão a mesma é confundida com demência, pelo fato de que em ambas há déficits de memória. Acredita-se que de 1% a 31% dos pacientes com demência tenham na verdade o transtorno depressivo atrelado à dificuldade de memória (Ferreira et al., 2019 apud Katzman et al., 1988).

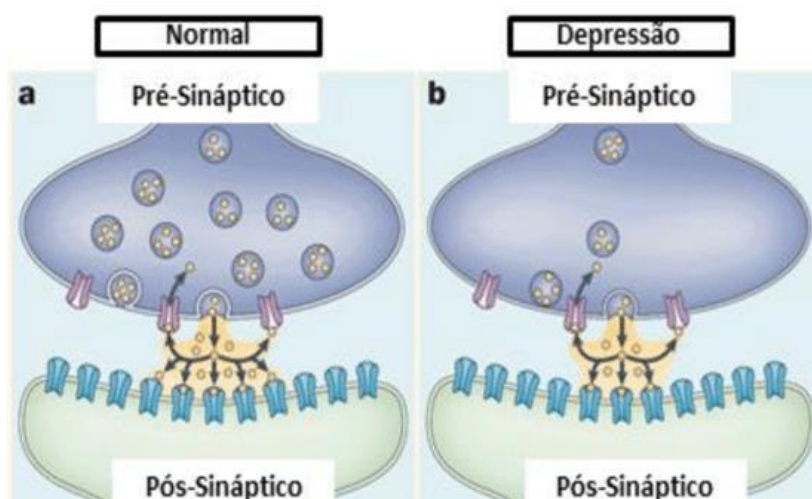
O transtorno do espectro do autismo (TEA) é caracterizado por déficits na sociabilidade e por expressar comportamentos ou interesses restritos, repetitivos e

sensorial-motor incomuns. Além disso, deficiência intelectual, distúrbio da linguagem, epilepsia, ansiedade, depressão e insônia são comuns (Hirota & King, 2023). Algumas linhas de pesquisa demonstraram que fatores genéticos e ambientais podem interferir no desenvolvimento de alterações no circuito neural, assim desenvolvendo a TEA (Soares, 2014).

O transtorno de ansiedade social (TAS) é um transtorno de ansiedade comum caracterizado pelo medo persistente de situações sociais (Boudjafad et al., 2022). Ademais, distúrbios de ansiedade podem levar a incapacidade de regular a memória e a dificuldade de processar emoções, a linguagem e a atenção (Sussman et al., 2016).

Uma das principais teorias que explicam a depressão é a das monoaminas, na qual a deficiência das monoaminas (dopamina, norepinefrina, serotonina) desencadearia um quadro depressivo no paciente. Por conta de tal teoria, os principais antidepressivos possuem certa relação com as monoaminas citadas acima e aumentam a neurotransmissão das mesmas (Stahl, 1998). Alguns outros prováveis fatores responsáveis para a manifestação da depressão são a redução da neuroplasticidade e neurogênese, o aumento de inflamações e alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Dean & Keshavan, 2017).

Figura 1: Hipótese monoaminérgica da depressão



Fonte: Cunha, 2013.

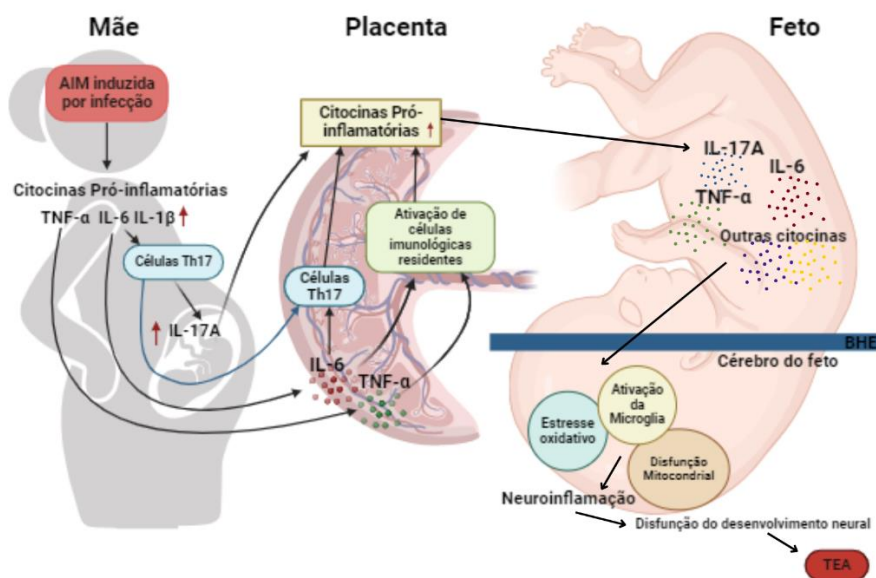
Em relação a ansiedade, neurotransmissores como o GABA, serotonina e noradrenalina estão envolvidos na regulação por meio do sistema límbico. Alterações no funcionamento de estruturas neuroanatômicas nas regiões que modulam o medo e emoções, como a amígdala, o hipocampo e córtex pré-frontal principalmente, também parecem ter envolvimento no desenvolvimento desse transtorno (Lima et al., 2020).

Os transtornos mentais no geral podem ser causados por fatores genéticos e por fatores ambientais, como o estilo de vida agitado e estressante das metrópoles, sobrecarga no trabalho, busca por um bom desempenho acadêmico, os quais afetam principalmente mulheres por estarem sobrecarregadas desempenhando tanto papéis sociais como familiares (Neme & Lipp, 2010). Desse modo, mulheres grávidas ficam ainda mais susceptíveis ao estresse, e fatores ambientais estressantes durante a gestação podem influenciar no desenvolvimento do encéfalo do feto, provocando doenças neuropsiquiátricas posteriormente (Markham & Koenig, 2011).

A Ativação Imunológica Materna (AIM) refere-se à ativação do sistema imunológico materno, que ocorre durante a gestação, por diferentes fatores imunogênicos, como o vírus influenza, herpes vírus, *Toxoplasma gondii*, LPS, dentre outros (Mcallister & Estes, 2016). Muitos estudos induzem a ativação imunológica materna em roedores, principalmente em camundongos, e mais recentemente em ratos, usando uma variedade de estímulos inflamatórios, incluindo o vírus influenza (Shi; Fatemi & Sidwell, 2003). Com isso, existem fortes associações entre a exposição a infecções durante a gravidez e um maior risco de a prole desenvolver esquizofrenia e autismo (Knuesel et al., 2014).

Uma das teorias é que a AIM ocasiona a produção de citocinas (pequenas proteínas que atuam como mediadores químicos na sinalização entre células durante uma resposta imune) que ao atravessarem a placenta irão interferir no neurodesenvolvimento fetal (Figura 1). Além disso, a prole proveniente de mães que durante a gestação foram submetidas a estresse exibem neuropatologias em diversas fases da sua vida adulta como: espessura cortical reduzida, tamanho ventricular aumentado, déficits na densidade da coluna dendrítica (Mcallister & Estes, 2016).

Figura 2: Alterações imunológicas na placenta e no cérebro fetal em resposta à inflamação sistêmica durante a gravidez, resultando em disfunção do desenvolvimento neuronal na prole



Fonte: Adaptado de Zawadzka; Cieřlik & Adamczyk, 2021.

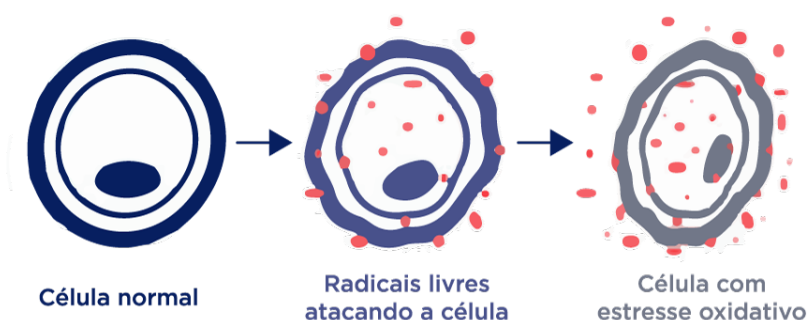
As citocinas fazem a sinalização para que células desnecessárias ou defeituosas sofram apoptose. Elas atuam principalmente de forma local, no entanto seus efeitos podem se estender para a via sistêmica. Dessa forma, a ação das citocinas em resposta a uma infecção durante a gestação pode afetar o desenvolvimento neurológico do feto (Soares, 2014). Estudos sugerem que a ativação imunológica materna afeta o neurodesenvolvimento fetal através da interleucina-6, a qual pode predispor a esquizofrenia (Smith, et al. 2007).

Muitas das citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β podem modular funções que irão colaborar para um quadro depressivo (Jia; Gao & Hu, 2021). A neurogênese está ligada a citocinas pró-inflamatórias e à neuroinflamação. Receptores pró-inflamatórios de citocinas estão associados a regiões importantes para a cognição, como o hipocampo (Kim et al., 2016).

Há algumas outras teorias que tentam explicar as vias pelas quais os insultos durante a gestação podem ser capazes de causar danos neuronais na prole, essas colocam como provável causa o estresse oxidativo, alterações na microbiota intestinal, além da liberação de citocinas que foi citada acima. O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre o nível de oxidantes e antioxidantes no ser vivo favorecendo um número excessivo de

radicais livres, causando danos oxidativos em células e tecidos. Células são expostas aos oxidantes de fontes exógenas (gás ozônio, altas concentrações de oxigênio, bactérias patogênicas, radiação, vírus) ou endógenas (enzimas que são capazes de produzir indiretamente espécies reativas ao oxigênio). Logo, quando o organismo não consegue neutralizar as espécies reativas ao oxigênio (EROS), acontece o estresse oxidativo (Soares, 2014).

Figura 3: Estresse Oxidativo



Fonte: University of Michigan, 2020.

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia entre os ácidos graxos poli-insaturados e EROS, os produtos dessa peroxidação são considerados altamente citotóxicos. Estudo feito com crianças autistas e seus irmãos não autistas (desenvolvimento tido como normal), mostrou uma peroxidação lipídica aumentada no plasma das crianças autistas (Chauhan et al., 2004).

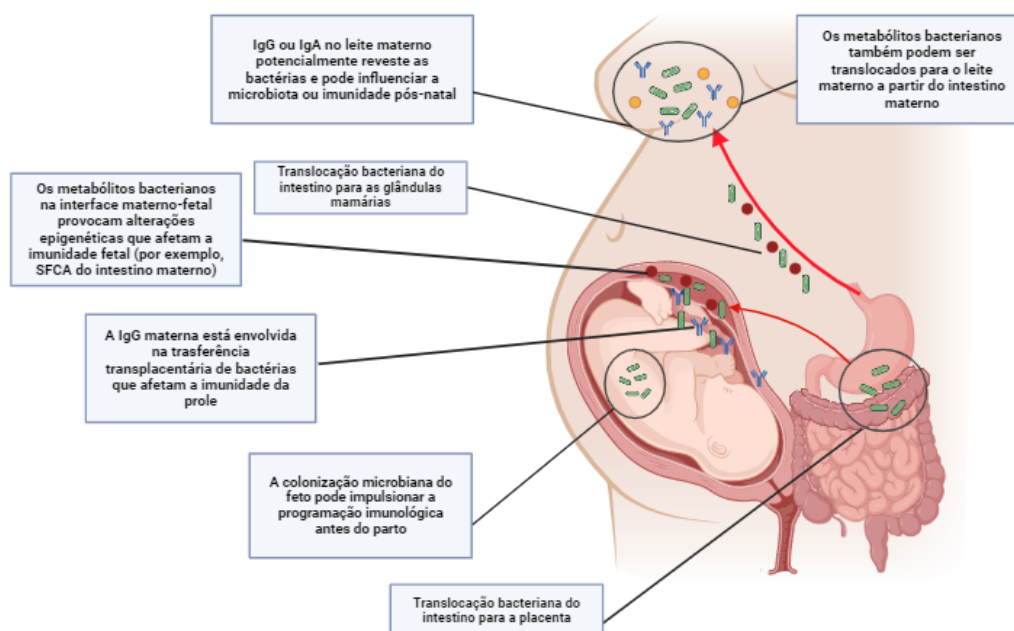
Em relação ao eixo microbiota-intestino-cérebro, sabe-se que durante a gravidez ocorre o primeiro contato com microorganismos maternos que influenciam a imunidade fetal, tal contato pode ocorrer através da vagina, intestino e leite materno (Figura 2). Algumas exposições e eventos durante a gestação são determinantes para a predisposição de doenças na prole no decorrer da sua vida, como exemplo, a obesidade, a dieta materna, estresse, toxinas e tabagismo, os quais podem atuar através de alterações no metabolismo, epigenética e/ou microbiota (Nyangahy & Jaspán, 2019).

A microbiota intestinal é um importante modulador da função e comportamento cerebral. Animais criados desprovidos da colonização microbiana (livres de germes, GF) ou esgotados do microbioma (tratados com antibióticos, ABX) exibem neurofisiologia e comportamento alterados em comparação com controles convencionalmente colonizados (livres de patógenos específicos, SPF) (Vuong et al., 2020).

Desequilíbrios na microbiota intestinal materna, em resposta a desafios como a infecção, a dieta alterada e o estresse durante a gravidez tem sido cada vez mais associados a anormalidades na função cerebral e no comportamento da prole. Durante a gravidez, a microbiota intestinal materna regula os metabólitos, não apenas no compartimento materno, mas também no próprio feto, incluindo o cérebro fetal (Vuong et al., 2020).

Em um estudo com roedores, a ingestão do probiótico *Lactobacillus helveticus* NS8 por mães no período de E13 a E22 da gestação demonstrou reduzir a ansiedade na prole (Niu et al., 2020). Em relação ao comportamento social, o mesmo se reduziu na prole de mães obesas que diminuíram a ingestão de *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp*, (Radford-Smith et al., 2022). No entanto, a reconstituição com microbiota da prole controle através da coprofagia reverteu esses déficits. Também foi demonstrado que independente da obesidade materna, o consumo materno de probióticos tem efeitos a longo prazo para melhora na expressão genética da plasticidade neural e na redução de comportamentos do tipo ansiosos e depressivos em descendentes adultos (Buffington et al., 2016).

Figura 4: Possíveis mecanismos entre a microbiota materna e sua influência na prole



Fonte: Adaptado de Nyangahy & Jaspan, 2019.

A vacina influenza tetravalente (fragmentada e inativada) é utilizada para a imunização contra a influenza, mais conhecida como gripe. A gripe é uma doença respiratória aguda causada pelo vírus *Myxovirus influenzae*. Essa vacina contém quatro cepas de vírus, duas do tipo A e duas do tipo B, visando atingir os mais prováveis causadores da gripe do próximo inverno (INSTITUTO BUTANTAN, 2023).

Antígenos suspensos nas vacinas são capazes de desafiar o sistema imunológico da mãe e assim mimetizar uma infecção. Dessa forma podem ser usados em pesquisas as quais tentam explicar alterações no neurodesenvolvimento fetal que impactam nos comportamentos da prole associados a transtornos de humor. Além dos antígenos suspensos encontrados em vacinas, como na vacina influenza tetravalente, o vírus influenza, herpes vírus, *Toxoplasma gondii* e LPS também podem levar à ativação imunológica materna (McCallister & Estes, 2016).

Os dados apontados nos mostram a importância de se compreender melhor sobre a AIM, os transtornos mentais e buscar por novos tipos de tratamentos. Uma vez que os transtornos mentais se tornaram um grande problema de saúde pública, e dado que vários deles ainda não tem sua causa totalmente elucidada, torna-se de extrema importância o tratamento e o estudo dos mesmos.

Os tratamentos farmacológicos para ansiedade incluem os benzodiazepínicos, alguns antidepressivos tais como inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina. Para a depressão os tratamentos farmacológicos são os antidepressivos tricíclicos, antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, inibidores da recaptação da serotonina e da noradrenalina. No entanto, tais fármacos podem provocar efeitos colaterais nos pacientes, como dor de cabeça, sonolência, tonturas, tremores, insônia. Além disso, muitos tem eficácia limitada e baixa tolerabilidade (Shafiee et al., 2018).

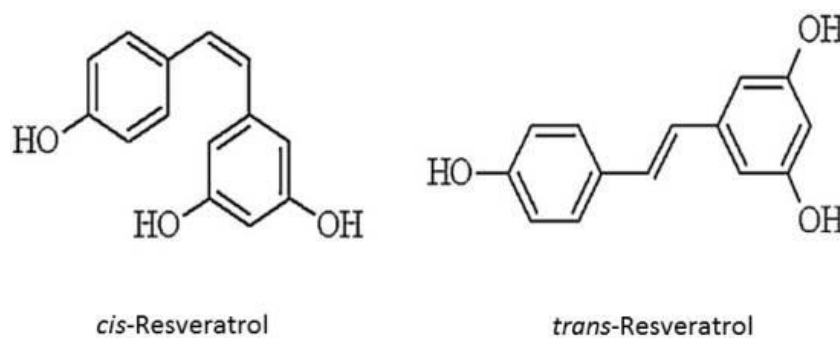
Contudo, vários pesquisadores têm se dedicado em descobrir substâncias naturais para ajudar a combater esses transtornos. Acredita-se que 25% de todos os medicamentos atualmente no mercado contenham fármacos que sejam derivados direta ou indiretamente de compostos naturais (Koehn & Carter, 2005). Nesse sentido, se enquadram: o ômega 3, *Matricaria chamomilla* (camomila), geleia real, *Camellia sinensis* (chá-verde) e *Passiflora incarnata* (passiflora).

Estudos com suplementação materna de vitamina B12 e ácido graxo ômega 3 em ratos sugerem que seu uso pode ajudar a prevenir déficits cognitivos e assim impedir que

distúrbios neurocomportamentais aconteçam na prole (Rathod et al., 2014). Em indivíduos com transtorno de ansiedade generalizada (TAG), o extrato de camomila demonstrou efeito ansiolítico, além de reduzir os sintomas depressivos em indivíduos com TAG e depressão (Amsterdam et al., 2020). Em uma pesquisa feita com ácidos graxos insaturados presentes e exclusivos da geleia real, foi possível ver o seu efeito protetor contra a depressão e ansiedade em camundongos (Ito et al., 2012). O extrato de chá-verde exibiu efeito ansiolítico e antidepressivo em um modelo de ansiedade e depressão induzida por estresse por restrição em ratos (Tabassum et al., 2010). Em uma revisão sistemática foi possível concluir que a passiflora é capaz de reduzir a ansiedade e comportamentos semelhantes a depressão (Janda et al., 2020).

Dentre essas opções naturais, destaca-se o resveratrol, um composto fenólico, pertencente ao grupo dos flavonóides, encontrado em cerca de setenta espécies vegetais, em particular, presente abundantemente em uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*), tanto na forma *cis* (*cis*-3,5,4'-triidroxiestilbeno), como *trans* (*trans*-3,5,4'-triidroxiestilbeno) (Figura 3) (Salehi et al., 2018) com sua síntese ocorrendo principalmente nas cascas dos frutos (Lange et al., 2009 apud Carvalho *et al.*, 2003; Andrade, 2004; Avello & Suwalsky, 2006; Ramalho & Jorge, 2006). Quanto a suas formas isoméricas o *trans*- resveratrol é mais ativo biologicamente e mais abundante que o *cis*-, que por sua vez é menos bioativo ou inativado (Plachta et al., 2024). O RSV ganhou atenção por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, além de suas propriedades neuroprotetoras (Moore et al., 2018). Em humanos, estudos apontam que uma dose de 15 a 20 mg de resveratrol por dia em forma de cápsula traz benefícios significativos para a saúde (Leal et al., 2017).

Figura 5: Forma *cis*- e *trans*- do Resveratrol



Fonte: Retirado de Salehi et al., 2018.

Vários estudos demonstram os efeitos protetores e terapêuticos do resveratrol. Esse composto demonstrou ter uma ação anti-inflamatória, melhora a memória e cognição, ter efeitos antioxidantes, além de modular a composição da microbiota intestinal. A Ação anti-inflamatória do resveratrol acontece pelo fato dessa substância suprimir a síntese da interleucina-6 (IL-6), a qual promove a redução dessa citocina pela ação dos macrófagos. Também diminui os mediadores inflamatórios Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e Interleucina-8 (IL-8), não induzindo a uma citotoxicidade indesejada (Pinheiro et al., 2019).

Esse composto fenólico também bloqueia a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), um complexo proteico que regula a expressão de diversos genes que estão envolvidos na inflamação. Além do NF-kB, o resveratrol bloqueia a ativação de AP-1 (fator de transcrição que regula diversos estímulos, entre eles as citocinas) e das quinases associadas (MEK e JNK). Desse modo, como os efeitos inflamatórios e moduladores do crescimento de muitos produtos químicos são mediados pelo NF-kB, a hipótese é de que a supressão da via de ativação do NF-kB seja causada pela ação do resveratrol (Manna; Mukhopadhyay & Aggarwal, 2000).

As Sirtuínas (SIRT) são enzimas reguladoras envolvidas em vários processos fisiológicos, como o metabolismo e envelhecimento. A sirtuína mais estudada é a SIRT1, que tem um papel ligado a prevenção e evolução de distúrbios neurológicos. O resveratrol demonstrou ser capaz de melhorar a memória e a cognição controlando a SIRT1 através da AMPK e várias outras vias moleculares. Além disso, o resveratrol pode conter o processo inflamatório e a proliferação de células microgлияis através da expressão de SIRT1 (Moraes et al., 2020).

Essa substância também possui ação antioxidante, tal atividade está ligada à presença de três grupos hidroxila na sua estrutura. O resveratrol atua reduzindo radicais livres, diminuindo a atividade da quinona redutase-2 e exercendo regulação positiva de diversas enzimas endógenas. Além disso, tem um efeito inibitório na produção excessiva de EROS e na peroxidação lipídica (Liguori et al., 2018; Moraes et al., 2020). Ademais, já se sabe que o resveratrol é capaz de modular a composição da microbiota intestinal, eliminando bactérias patogênicas e favorecendo bactérias benéficas como bifidobactérias e lactobacilos (Yang et al., 2019; Inchingolo et al., 2022).

No entanto, é importante destacar também que a prole pode apresentar maior suscetibilidade a certas doenças em condições pré-natais ou intrauterinas, as quais podem

ser revertidas pelo resveratrol. Esse composto tem a capacidade de atravessar a placenta, melhorar seu estado oxidativo e afetar diretamente o feto durante o período gestacional, produzindo assim efeitos benéficos e neuroprotetores no desempenho reprodutivo e bem-estar da prole (Ramli et. al, 2023).

2. JUSTIFICATIVA

Uma vez que os transtornos mentais se tornaram um grande problema de saúde pública, torna-se de extrema importância o tratamento dos mesmos. Apesar de já existir diversos fármacos para o tratamento desses transtornos, a maioria provoca efeitos colaterais no paciente. Sendo assim, uma boa alternativa é a busca por compostos naturais, os quais cada vez mais se destacam pela sua eficácia, assim é possível conciliar o uso desses compostos naturais com os fármacos já existentes. Um deles, o resveratrol já foi testado e alguns benefícios na prevenção e tratamento de muitas doenças foram encontrados, tais como: câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, metabólicas e autoimunes (Baur & Sinclair, 2006).

Tais dados evidenciam a importância de se entender melhor sobre as doenças mentais para que novos tratamentos e fármacos possam ser desenvolvidos. Além disso, o possível efeito protetor do resveratrol pode ajudar na criação de estratégias que proponham uma maior proteção da prole, em casos de fatores ambientais estressantes durante a gestação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se o resveratrol, quando administrado durante a gestação, exerce algum efeito protetor sobre possíveis danos causados pela ativação imunológica materna (AIM) por antígenos suspensos na vacina influenza tetravalente.

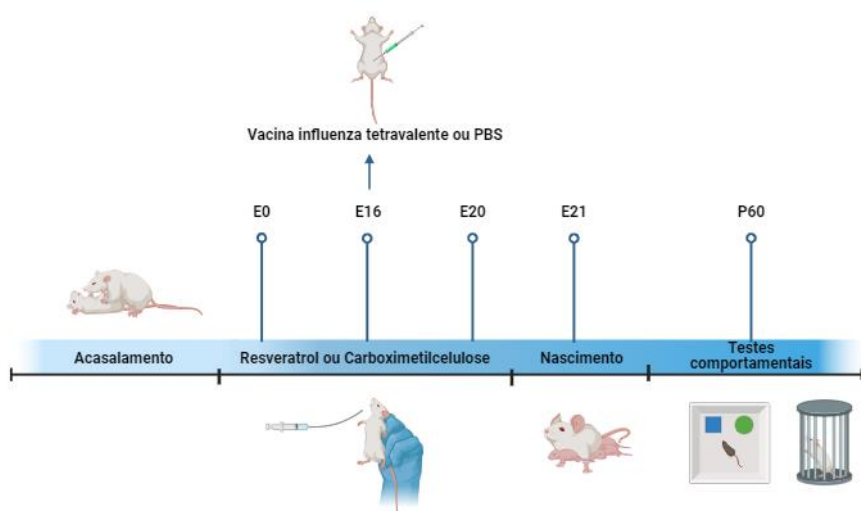
3.1.1 Objetivos Específicos

Investigar os possíveis efeitos da ativação imunológica materna (AIM) por antígenos suspensos na vacina influenza tetravalente na idade gestacional E16 (Período de muita vulnerabilidade em relação as desordens que podem acontecer pela AIM) e como afeta a memória e sociabilidade na prole fêmea em idade adulta, por meio dos testes de reconhecimento de objeto e interação social;

Investigar se o resveratrol, administrado cronicamente durante a gestação (E0 a E21), por gavagem, apresenta algum efeito neuroprotetor sobre prejuízos na memória e sociabilidade na prole fêmea em idade adulta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 6: Protocolo em linha



Fonte: Elaborado pela autora através do Software Biorender, 2024.

4.1 Animais experimentais

Durante este estudo, foram utilizados camundongos machos (n=12) e fêmeas (n=24) da linhagem Balb C, fornecidos e acondicionados pela Rede de Biotérios (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo 055/19. Tal linhagem foi escolhida por conta de resultados positivos obtidos de outra pesquisa do laboratório e pela maior disponibilidade dessa linhagem no biotério da UFU. Foram mantidos em sala com temperatura controlada ($23^{\circ}\pm 2$), com ciclo de luz (12h: claro/ 12h: escuro) com sistema

de exaustão que controla o fluxo de ar em caixas isoladas (Figura 5) e livre acesso à água (potável e filtrada disponibilizada *ad libitum* em bebedouros aos animais) e ração (“BioBase BioTec Alimento Equilibrado” para camundongos). Para obtenção dos filhotes, os progenitores foram colocados para acasalar no próprio REBIR em gaiolas na proporção de duas fêmeas para um macho, sendo as fêmeas avaliadas diariamente para observação da rolha vaginal (mistura de secreção vaginal e sêmen) (Figura 6), quando a rolha foi visualizada, foi considerado o dia zero da gestação (E0).

Figura 7: Caixas isoladas com sistema de exaustão que controla o fluxo de ar (REBIR – UFU)



Fonte: Autoral, 2023.

Figura 8: Rolha vaginal



Fonte: Autoral, 2023.

4.2 Delineamento Experimental

Após a visualização da rolha vaginal, as fêmeas grávidas (Figura 7) foram mantidas em gaiolas individuais até o nascimento da prole, sendo divididas em:

- **Grupo 1 (G1) (n=6):** Mães que receberam carboximetilcelulose a 0,5% por gavagem (1 dose de 100 µL por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular única de PBS em E16 (1 µL/g);
- **Grupo 2 (G2) (n=7):** Mães que receberam carboximetilcelulose a 0,5% por gavagem (1 dose de 100 µL por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular única de antígenos suspensos na vacina influenza tetravalente em E16 (1 µL/g);
- **Grupo 3 (G3) (n=8):** Mães que receberam resveratrol por gavagem (1 dose de 100 µL por dia), de E0 a E21 + 1 injeção intramuscular única de PBS em E16 (1 µL/g);
- **Grupo 4 (G4) (n=6):** Mães que receberam resveratrol por gavagem (1 dose de 100 µL por dia), de E0 e E21 + 1 injeção intramuscular única de antígenos suspensos na vacina influenza tetravalente em E16 (1 µL/g).

Os filhotes provenientes da reprodução (Figura 8), foram divididos em dois grandes grupos: Grupo 1 formado por filhotes machos e Grupo 2 formado por filhotes fêmeas. No presente estudo foram utilizados apenas 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).

Figura 9: Fêmea do grupo G3 em E19



Fonte: Autoral, 2022.

Figura 10: Prole de G3 em P0



Fonte: Autoral, 2022.

Durante os 21 dias de gestação, as fêmeas foram submetidas à administração do resveratrol ou da carboximetilcelulose (0,5%) por meio do método de gavagem (Figura 9) para cada grupo. Foi utilizada uma agulha curva (Figura 10), própria para esse procedimento. Quando a gestação chegou em E16 as fêmeas grávidas receberam $1\mu\text{L/g}$

de injeção intramuscular da vacina Influenza tetravalente Fluarix[®] Tetra (Figura 11) e 1 μ L/g de salina PBS.

Figura 11: Administração via gavagem



Fonte: Autoral, 2023.

Figura 12: Agulha de gavagem



Fonte: Autoral, 2023.

Figura 13: Vacina Influenza Tetraivalente



Fonte: Autoral, 2022.

Após 60 dias de nascimento, os animais dos quatro grupos distintos (G1, G2, G3 e G4) 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 no freezer do REBIR a -20° até o momento de descarte.

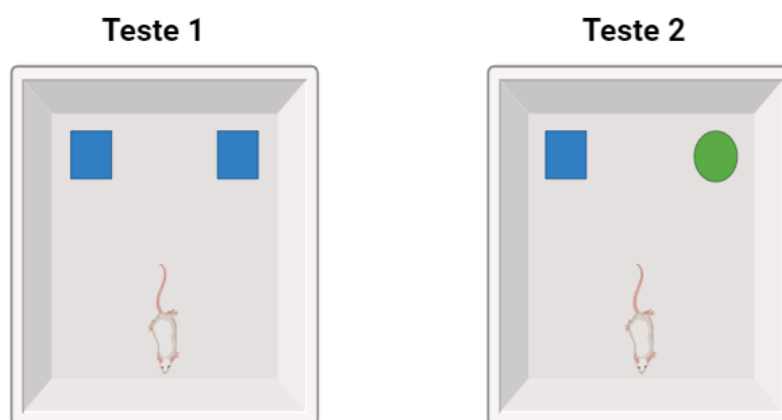
4.3 Testes Comportamentais

Para análise de alterações na prole em idade adulta, em relação à memória e sociabilidade dois testes serão realizados: Reconhecimento de objeto (RO) e Interação Social (IS).

- **Teste de Reconhecimento de objeto (RO):** Roedores têm uma tendência a interagir mais com um objeto novo do que com um familiar. Essa tendência tem sido utilizada para estudos de funções cognitivas, como memória e aprendizagem, que são diminuídas em alguns transtornos psiquiátricos. O teste de

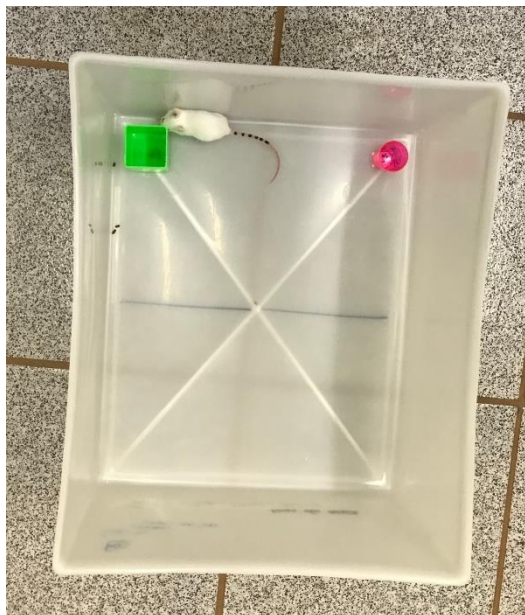
reconhecimento de objeto foi realizado em uma arena quadrangular de polipropileno branca (40x40) (Figura 13). Os animais foram manuseados por ao menos 1 minuto durante 3 dias antes do experimento, na mesma sala onde foi realizado o teste comportamental de reconhecimento de objeto. Um dia antes do experimento, cada animal foi submetido a uma sessão de habituação na arena, na presença de 2 objetos iguais, com duração de 15 min. No dia de realização do teste comportamental, primeiro no teste de aquisição (T1), os animais foram colocados na arena contendo dois objetos idênticos por um período de 10 min. Na segunda avaliação (teste T2), que foi realizada 60 min após T1, os objetos presentes em T1 foram trocados por outro objeto idêntico (objeto conhecido, OC) e por um objeto novo (ON) colocados na mesma posição de T1 (Figura 12). Em seguida, os animais foram colocados na arena novamente por um período de 10 min. Todo o experimento foi documentado por meio de vídeo, com a webcam posicionada acima da arena quadrangular. A memória de reconhecimento foi avaliada a partir da análise do vídeo, determinando-se a diferença entre o tempo de exposição do objeto novo e objeto conhecido em relação ao tempo de exploração total dos dois objetos. A exploração foi definida pelo direcionamento da face do animal ao objeto até uma distância aproximada de 2 cm enquanto observa, cheira ou toca. Após cada experimento o aparato foi limpo com álcool 20%. Os objetos não foram reutilizados.

Figura 14: Etapas do Teste de Reconhecimento de Objetos



Fonte: Elaborado pela autora através do Software Biorender, 2024.

Figura 15: Teste comportamental de RO sendo realizado na prole de G3 em idade adulta

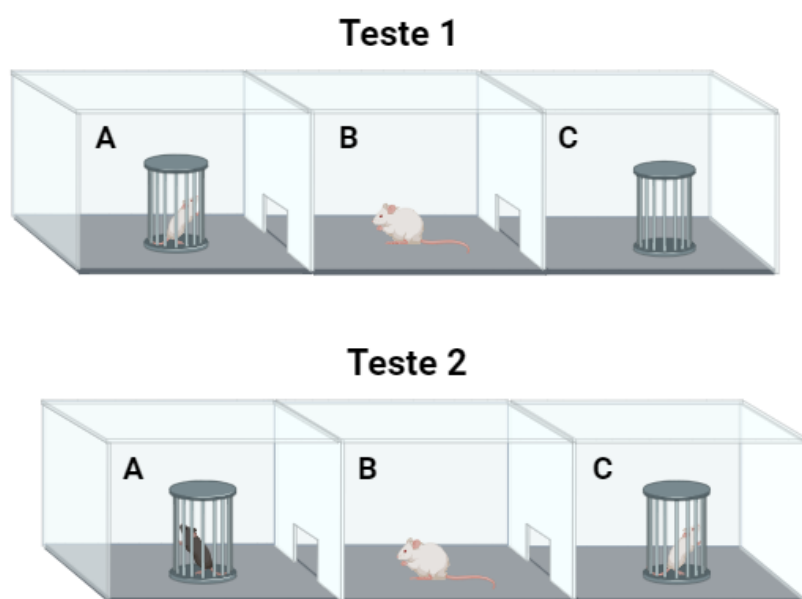


Fonte: Autoral, 2022.

- **Teste de Interação Social (IS):** O teste de paradigma de três câmaras, conhecido como Teste de Sociabilidade Crawley e Teste de Preferência por Novidade Social, tem sido empregado para estudar interação social e memória social e baseia-se no princípio de livre escolha do rato ou camundongo experimental em gastar tempo em um dos três compartimentos por 10 min. Todo o experimento foi documentado por meio de vídeo, com a webcam posicionada acima do aparato. A sociabilidade do animal experimental foi avaliada a partir da análise do vídeo, considerando o número total de contatos, duração total de contatos diretos (em segundos) entre o animal experimental e a gaiola de metal vazia em comparação com o tempo de contato com os animais controle 1 e 2, duração média por contato número total e duração (em segundos) de outros comportamentos (imobilidade, grooming, caminhada, etc) e o total de tempo gasto pelos animais experimentais em cada compartimento do aparato (considerando quando a cabeça e 4 patas estavam dentro do compartimento (denominados CA, CB e CC) (Figura 14). Cada animal foi submetido a uma sessão de habituação na arena, com os compartimentos abertos e gaiolas vazias, o animal explorou livremente o

aparato por 5 minutos. 24 horas após a sessão de habituação foi realizado o Teste 1 (T1), o Teste de Sociabilidade Crawley, no qual um animal controle 1 foi colocado na gaiola de metal localizada em CA, o animal experimental foi colocado no compartimento central CB e no compartimento CC permaneceu a gaiola vazia, a seguir todas as divisórias foram removidas e o animal experimental explorou o aparato livremente entre os compartimento. Após o término de T1, o animais foram removidos do aparato e o mesmo limpo com álcool 20%, em seguida iniciou-se o Teste 2, o Teste de Preferência por Novidade Social, no qual o animal controle 1 utilizado no teste anterior em CA foi colocado na gaiola em CC, sendo utilizado como animal familiar. E em CA foi posicionado um novo animal controle (Animal controle 2), que foi nosso animal não familiar, e como aconteceu no Teste 1 as divisórias foram removidas e o animal experimental explorou o aparato (Figura 15), agora com um animal familiar e não familiar.

Figura 16: Etapas do Teste de Interação Social



Fonte: Elaborado pela autora através do Software Biorender, 2024.

Figura 17: Teste comportamental de IS sendo realizado na prole de G4 em idade adulta



Fonte: Autoral, 2023.

4.4 Análise estatística

Os comportamentos foram analisados e os dados obtidos submetidos à análise estatística utilizando o GraphPad Prism 5, por meio do Two-Way ANOVA, com valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Quando significativo a análise foi seguida pelo teste Post-hoc de Bonferroni.

5. RESULTADOS

5.1 Teste de Reconhecimento de Objetos

Os resultados do teste de RO estão representados pela figura 16, a qual ilustra a porcentagem do tempo de exploração dos camundongos com o objeto novo (ON) e com o objeto familiar (OF).

No RO a análise estatística mostrou que para os diferentes grupos, os animais não distinguiram entre o objeto novo e o objeto familiar, uma vez que não houve diferença significativa no tempo de exploração dos dois objetos (G1– ON: $46 \pm 2,35$, OF: 54

$\pm 2,35$; G2- ON: $46,85 \pm 9,27$, OF: $53,14 \pm 9,27$; G3- ON: $59,12 \pm 4,31$, OF: $40,87 \pm 4,31$; G4- ON: $49,83 \pm 6,72$, OF: $50,16 \pm 6,72$).

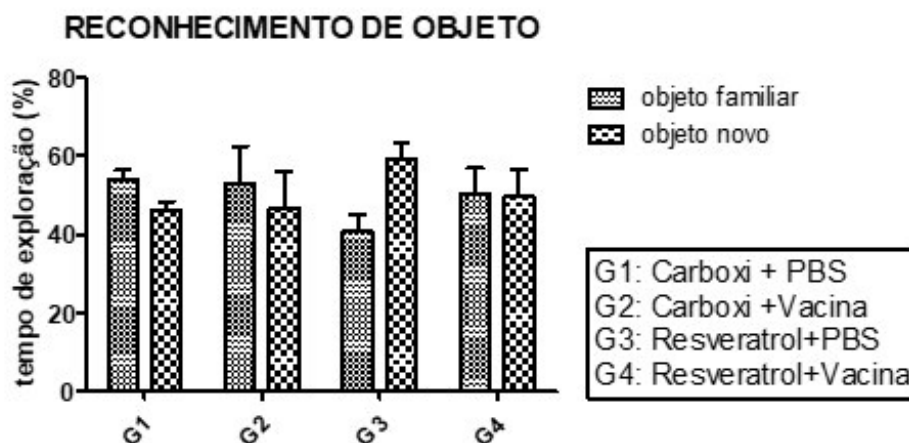


Figura 18: Porcentagem do tempo de exploração dos camundongos com o objeto familiar (OF) e o objeto novo (ON) nos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM.

5.2 Interação Social (IS) – Teste de sociabilidade

Para o teste de sociabilidade, os dados estão representados na figura 17, onde está representado o tempo de interação entre os camundongos com a gaiola contendo o animal desconhecido (A) e com a gaiola vazia (C).

Neste teste, os animais de G1 interagiram significativamente mais com A ($63,72 \pm 2,59$) do que com C ($36,28 \pm 2,59$), o que de fato era esperado para o grupo controle. No caso de G2, foi possível perceber que os antígenos suspensos da vacina influenza tetravalente prejudicaram o comportamento, uma vez que não houve diferença significativa no tempo de interação entre A ($58,30 \pm 6,41$) e C ($41,69 \pm 6,41$), o que também era esperado. No entanto, em G3 imaginava-se uma interação maior com a gaiola do animal desconhecido em relação a gaiola vazia pelo fato de ser um grupo com tratamento de resveratrol, porém não houve diferença significativa, sendo A ($55,41 \pm 2,96$) e C ($44,59 \pm 2,96$). Já em G4, o resveratrol teve efeito favorável, ou seja, os animais interagiram significativamente mais com A ($78,52 \pm 5,20$) do que com C ($21,48 \pm 5,20$).

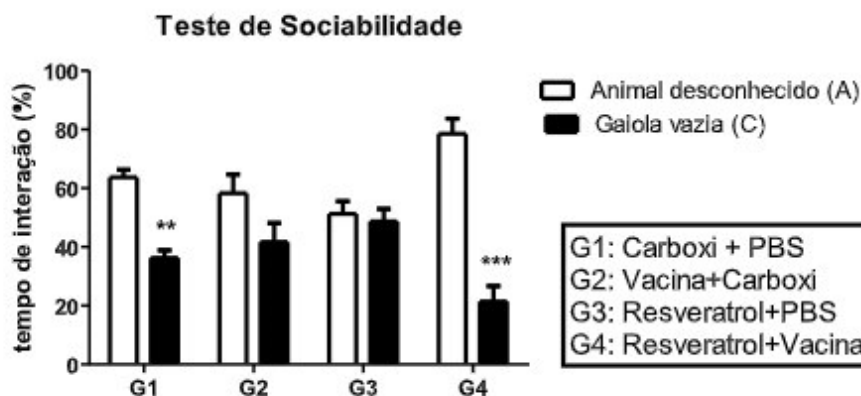


Figura 19: Tempo de interação entre os camundongos com a gaiola contendo o animal desconhecido (A) e com a gaiola vazia (C) nos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM

5.3 Interação Social (IS) - Teste de preferência por novidade social

Para o teste de preferência por novidade social, os dados estão representados na figura 18, na qual está representado o tempo de interação entre os camundongos com o animal desconhecido (A) e com o animal familiar (C).

Neste teste, os animais de G1 interagiram significativamente mais com A ($62,63 \pm 4,59$) do que com C ($37,37 \pm 4,59$), o que de fato era esperado para o grupo controle. Em G2, o resultado deu o contrário do esperado, os animais passaram mais tempo com o A ($59,77 \pm 3,35$) do que com C ($40,22 \pm 3,35$), ou seja, os antígenos suspensos da vacina influenza tetravalente não prejudicaram o comportamento dos animais. Em G3 e G4, não se obteve o resultado esperado, uma vez que não houve diferença significativa no tempo de interação entre o animal desconhecido e animal familiar (G3– A: $55,41 \pm 2,96$, C: $44,59 \pm 2,96$; G4- A: $53,09 \pm 5,48$, C: $46,9 \pm 5,48$), assim não foi possível comprovar o efeito benéfico do resveratrol.

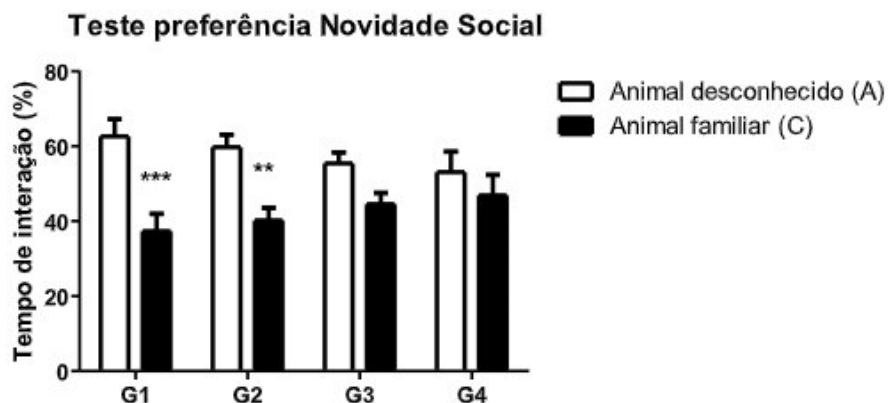


Figura 20: Tempo de interação entre os camundongos com o animal desconhecido (A) e com o animal familiar (C) nos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos na forma média \pm EPM

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho buscamos investigar um possível efeito neuroprotetor do resveratrol sobre a prole fêmea adulta de mães desafiadas com antígenos suspensos na vacina influenza tetravalente na idade gestacional E16. Para verificar se o efeito neuroprotetor foi capaz de reverter os danos ocasionados pelos antígenos suspensos na vacina submetemos os animais aos testes de Reconhecimento de objetos (RO) e Interação Social (IS), para análise da memória e sociabilidade.

Estudos mostram que o RSV e seus metabólitos atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) e penetram no tecido cerebral (Wang et al., 2004; Turner et al., 2015). Resultados de um estudo em ratos sugerem que o resveratrol consegue proteger significativamente o tecido neural (Ates et al., 2007). Além disso, evidências sugerem que o RSV tem atividade neuroprotetora por meio de seus mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes (Ferreira, et al., 2020).

A exposição materna à inflamação pode ser um fator de risco para distúrbios neuropsiquiátricos com disfunção cognitiva na prole mais tarde na vida. Em relação a isso, um estudo com camundongos expostos ao LPS no útero e posteriormente tratados com resveratrol (40 mg/kg) foram capazes de reverter o comprometimento cognitivo e

reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela ativação imunológica materna na prole (Zhang et al., 2023).

O uso de modelos animais contribuiu significativamente para o desenvolvimento de fármacos, vacinas e na compreensão de diversos processos relacionados a saúde humana. Outrossim, também forneceu uma grande quantidade de dados para que fosse possível aliviar o sofrimento humano (Robinson et al., 2019).

No entanto, há complicações no uso de modelos animais para o estudo dos transtornos mentais, pelo fato de que não existem evidências de que o que ocorre no cérebro animal é também o que ocorre no cérebro dos humanos, muitos dos sintomas são subjetivos, faltam biomarcadores. Desse modo, com o progresso dos estudos do tema e no entendimento da fisiopatologia foram definidos alguns testes e valores padrões para que fosse possível comparar animais experimentais com o ser humano (Nestler & Hyman, 2010; Silva et al., 2012).

O teste de reconhecimento de objetos (RO) é um teste comportamental utilizado para acessar a memória em roedores, é avaliado pela diferença no tempo de exploração de objetos familiares e objetos novos. Neste teste, espera-se que animais controles tenham preferência pelo objeto novo, visto que isso significa que o objeto familiar já existe na sua memória (Antunes & Biala, 2012).

Com relação ao teste de RO, embora esperássemos que os animais de G1 (grupo controle) tivesse preferência pelo objeto novo, os mesmos não distinguiram entre o objeto novo e o objeto familiar, uma vez que não houve diferença significativa no tempo de exploração dos dois objetos. Tal resultado não era esperado, visto que animais normais tem a tendência de passar mais tempo explorando o objeto novo do que o objeto familiar.

Além disso, em G2 era esperado que a prole das mães desafiadas com os antígenos da vacina desenvolvesse comportamentos contrários ao do grupo controle, ou seja, que os antígenos da vacina tivessem prejudicado a memória desses animais, mas também não houve uma diferença significativa no tempo de exploração dos dois objetos pelo grupo. Do mesmo modo que aconteceu em G3 e G4, grupos os quais eram previstos que os animais tivessem preferência pelo objeto novo, visto que eram grupos tratados com RSV, composto que devido suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e prébióticas, é capaz de exibir um efeito neuroprotetor beneficiando a memórias desses animais. Mas novamente não houve uma diferença significativa, sendo assim impossível confirmar o efeito neuroprotetor desse composto neste teste.

O teste de paradigma de três câmaras, conhecido como Teste de Sociabilidade Crawley e Teste de Preferência por Novidade Social, tem sido empregado para estudar interação social e memória social e baseia-se no princípio de livre escolha do rato ou camundongo experimental em gastar tempo em um dos três compartimentos do aparato. Animais em que a sociabilidade é expressa tem a tendência de passar mais tempo com a gaiola que tem o animal desconhecido, do que com a gaiola vazia. Já a preferência pela novidade social é vista quando o animal tem preferência de passar mais tempo com a gaiola com um animal novo, do que com a gaiola que tem o animal familiar (Moy et al., 2004).

No teste 1 de IS (Teste de Sociabilidade Crawley), o G1 (grupo controle) teve o comportamento esperado, os animais desse grupo passaram mais tempo com o animal desconhecido do que com a gaiola vazia e a diferença foi significativa, o que valida o teste por ser possível estabelecer critérios de comparações entre os grupos, além de demonstrar que os animais colocados para teste estavam saudáveis. Em G2, o comportamento dos animais foi prejudicado pelos antígenos suspensos da vacina, uma vez que não houve diferença significativa no tempo de interação entre o animal desconhecido e a gaiola, o que também era previsto. Em G3, imaginava-se uma interação maior com a gaiola do animal desconhecido em relação a gaiola vazia pelo fato de ser um grupo com tratamento de resveratrol (neuroprotetor), porém não houve diferença significativa. Já em G4, o resveratrol teve efeito favorável, ou seja, os animais interagiram significativamente mais com o animal desconhecido do que com a gaiola vazia. Sugerindo que mesmo que o comportamento dos animais tivesse sido afetado pelos antígenos suspensos da vacina, o RSV foi capaz de proteger a prole por conta do seu efeito neuroprotetor.

No teste 2 de IS (Preferência por novidade social), G1 (grupo controle) teve o comportamento esperado, ou seja, os animais interagiram significativamente mais com o animal desconhecido do que com o animal familiar. Porém o grupo G2 deu resultados contrários ao que era previsto, uma vez que os antígenos suspensos da vacina não prejudicaram o comportamento desses animais, foram benéficos fazendo com que os animais passassem mais tempo com o animal desconhecido, semelhante ao grupo controle. Já nos grupos que receberam RSV (G3 e G4) não se obteve o resultado esperado, uma vez que não houve diferença significativa no tempo de interação entre o animal

desconhecido e animal familiar, assim não foi possível comprovar o efeito benéfico do resveratrol.

Em um experimento anterior do nosso laboratório, nosso grupo de pesquisa desafiou mães Balb-C gestantes com vacina influenza tetravalente em E16 e realizou o tratamento com resveratrol via subcutânea, atestando o efeito neuroprotetor, o qual se manifestou pela melhora na memória e sociabilidade e diminuição dos comportamentos do tipo ansiosos e depressivos na prole adulta (Dados ainda não publicados).

Alguns fatores podem justificar os resultados inesperados dos testes. Como o fato do resveratrol usado no atual experimento ter sido manipulado pela farmácia Biopharma (Uberlândia – MG), enquanto em testes anteriores (citado acima) realizados pelo nosso laboratório foi usado um RSV produzido na Suíça e foi fornecido pela Fiocruz. Ademais, antes da utilização desse RSV da Fiocruz, a atividade antioxidante do resveratrol foi comprovada por meio de dois ensaios: oxygen radical absorbance capacity (ORAC); Ferric reducing antioxidante power (FRAP).

Com a pandemia da COVID-19, o experimento teve que ser paralisado por conta do fechamento do REBIR alguns animais tiveram que ser eutanasiados. Desse modo, teve que ser feito mais de uma bateria de testes para que fosse possível alcançar o N amostral do trabalho. Assim, foram utilizadas proles de diferentes épocas, o que pode ter afetado os resultados, visto que alguma camundonga fêmea já pode ter iniciado o experimento com alterações em seu comportamento que afetariam sua prole de qualquer forma, mesmo sem receber o tratamento durante a gravidez.

Outro fator que deve ser considerado é a reforma que o biotério passou durante os experimentos, o barulho pode ter gerado um estresse adicional em algum grupo específico pois nem todos os grupos foram submetidos aos testes no mesmo momento. Fatores como ruídos, temperatura, luz, umidade, ventilação e qualidade do ar devem ser rigorosamente controlados para evitar o estresse dos animais (Andrade, 2006).

O ciclo estral também pode afetar no comportamento durante os testes. Em um trabalho realizado com ratos foi visto que o ciclo estral influencia no desempenho relacionado ao gênero no teste comportamental de Labirinto em cruz elevado (Gouveia Júnior & Morato, 2002). Logo, o comportamento de algumas fêmeas pode ter sido afetado pela fase do ciclo estral que estava durante a realização dos testes.

Foi feito o estadiamento do ciclo estral com o intuito de obter informações sobre a influência desse ciclo no comportamento das fêmeas, mas em um dos grupos uma das

etapas do protocolo de coloração das lâminas falhou e assim não foi possível o uso dessas informações para comparar o comportamento entre os grupos.

Além disso, é importante ressaltar que a própria manipulação do animal pelos pesquisadores ao realizar a gavagem pode ter sido um fator estressante para os animais.

7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pelo presente estudo, podemos concluir que no teste de Reconhecimento de objetos não foi possível observar os danos ocasionados na memória dos animais pelos antígenos suspensos na vacina influenza tetravalente, nem o efeito neuroprotetor do resveratrol sobre esses danos pelo fato de que não houve diferença significativa ($p>0,05$) nas condições apresentadas. Já em relação aos testes de Sociabilidade e Preferência por novidade social, deve-se tentar compreender por quê alguns grupos obtiveram os resultados esperados e outros não. Sendo assim, para a obtenção de dados mais conclusivos, os experimentos devem ser ampliados.

8. REFERÊNCIAS

American Psychiatric Association. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Amsterdam, J. D. et al. **Putative Antidepressant Effect of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Oral Extract in Subjects with Comorbid Generalized Anxiety Disorder and Depression**. J. Altern. Complement. Med. (9): 823-819, 2020.

Andrade, M. C. R. **A utilização de símios do gênero *Callithrix* como modelo experimental**, 2006. Disponível em URL: <http://www.cobea.org.br/artigo4.htm>.

Antunes, M. & Biala, G. **The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications**. Cognitive processing, v. 13, n. 2, p. 93-110, 2012.

Ates, O. et al. **Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats**. J Clin Neurosci. 14(3):256-60, 2007.

Baur, J. A. & Sinclair, D. A. **Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence.** *Nature Reviews/Drug Discovery*, v. 5, p. 493-506, 2006.

Boudjafad, Z. et al. **The socially enriched environment test: a new approach to evaluate social behavior in a mouse model of social anxiety disorder.** *Learn Mem.* 29(11):390-400, 2022.

Brasil. Ministério da Saúde. **Doenças relacionadas ao trabalho: manual de procedimentos para os serviços de saúde.** Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

Buffington, S. A. et al. **Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring.** *Cell.* v. 165, n. 7, p. 1762-1775, 2016.

Chauhan, A. et al. **Oxidative stress in autism: increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin--the antioxidant proteins.** *Life Sci.* 75(21):2539-49, 2004.

Cunha, M. P. **Efeito antidepressivo e neuroprotetor da creatina.** Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2013.

Dean, J. & Keshavan, M. **The neurobiology of depression: An integrated view.** *Asian journal of psychiatry*, v. 27, p. 101-111, 2017.

Ferreira, F.R. et al. **O resveratrol melhora o efeito da ativação imunológica materna associada à esquizofrenia na prole na idade adulta.** *Cartas de Neurociências*, 135100, 2020.

Ferreira, J. P. et al. **Alterações de memória e funções executivas em pacientes com depressão.** *Psic., Saúde & Doenças, Lisboa.* v. 20, n. 1, p. 114-121, 2019.

Gouveia Júnior, A. & Morato, S. **Influências do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado.** *Interação Em Psicologia*, 6(2), 2002.

Hirota, T. & King, B. H. **Autism Spectrum Disorder: A Review.** *JAMA*. v. 329, n. 2, p. 157-168, 2023.

Inchingolo, A. D. et al. **Benefits and Implications of Resveratrol Supplementation on Microbiota Modulations: A Systematic Review of the Literature.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 7, p. 4027,2022.

INSTITUTO BUTATAN. **Vacina Influenza Tetravalente**, 2023.

Ito, S. et al. **Antidepressant-like activity of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, a unique unsaturated fatty acid of royal jelly, in stress-inducible depression-like mouse model.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. v. 2012, 2012.

Janda, K. et al. **Passiflora incarnata in neuropsychiatric disorders—A systematic review.** *Nutrients*, v. 12, n. 12, p. 3894, 2020.

Jia, X.; Gao, Z. & Hu, H. **Microglia in depression: current perspectives.** *Sci China Life Sci.* 64(6):911-925, 2021.

Kim, Y. K. et al. **The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation,neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 4(64):277-84, 2016.

Knuesel, I. et al. **Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders.** *Nat Rev Neurol.* 10 (11):643–660, 2014.

Koehn F. E. & Carter G. T. **The evolving role of natural products in drug discovery.** *Nat Rev Drug Discov.* 4(3):206-20, 2005.

Lange, M. K. et al. **Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol.** Braz. J. Pharm. Sci., São Paulo. v. 45, n. 1, p. 145-151, 2009.

Leal, J. B. et al. **Resveratrol: composição química e seus benefícios à saúde.** Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento, São Paulo, v. 11, n. 67, p. 620-629, 2017.

Liguori, I. et al. **Oxidative stress, aging, and diseases.** Clinical interventions in aging, v. 13, p. 757, 2018.

Lima, C. L. S. et al. **Physiological and drug bases of anxiety disorder.** Research, Society and Development, [S.I.], v. 9, n. 9, p. e808997780, 2020.

Manna, S. K.; Mukhopadhyay, A. & Aggarwal, B. B. **Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription Factors NF- κ B, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid Peroxidation.** The Journal of Immunology, 164(12), 6509-6519, 2000.

Markham, J. A. & Koenig, J. I. **Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases.** *Psychopharmacology*. v. 214, n. 1, p. 89-106, 2011.

Mcallister, A. K. & Estes, M. L. **Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders.** University Of California Davis, California. 19;353(6301):772-7, 2016.

Moore, A.; Beidler, J. & Hong, M. **Resveratrol and Depression in Animal Models: A Systematic Review of the Biological Mechanisms.** *Molecules*. 23(9), 2197, 2018.

Moraes, D. S. et al. **Sirtuins, brain and cognition: A review of resveratrol effects.** IBRO Reports, 9, 46-51, 2020.

Moy, S. S. et al. **Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice.** . Genes Brain Behav. 3(5):287-302, 2004.

Neme, C. M. B. & Lipp, M. E. N. **Estresse psicológico e enfrentamento em mulheres com e sem câncer.** Psicologia: Teoria e Pesquisa. 26(3), 475–483, 2010.

Nestler, E. J. & Hyman, S. E. **Animal models of neuropsychiatric disorders.** Nature neuroscience, v. 13, n. 10, p. 1161, 2010.

Niu, Y. et al. **Pre-Gestational intake of Lactobacillus helveticus NS8 has anxiolytic effects in adolescent Sprague Dawley offspring.** Brain Behav. Sep; 10(9): e01714, 2020.

Nyangah, D. D. & Jaspan, H. B **Influence of maternal microbiota during pregnancy on infant immunity.** Clin Exp Immunol, 198: 47-56, 2019.

Pinheiro, D. M. L. et al. **Resveratrol decreases the expression of genes involved in inflammation through transcriptional regulation.** Free Radical Biology and Medicine, v. 130, p. 8–22, 2019.

Płachta, L. 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.

Radford-Smith, D. E. et al. **Modifying the maternal microbiota alters the gut-brain metabolome and prevents emotional dysfunction in the adult offspring of obese dams.** Proceedings of the National Academy of Sciences. v. 119, n. 9, p. e2108581119, 2022.

Ramli, I. et al. **Effect of Resveratrol on Pregnancy, Prenatal Complications and Pregnancy- Associated Structure Alterations.** Antioxidants (Basel). 12(2):341, 2023.

Rathod, R. et al. **Maternal omega-3 fatty acid supplementation on vitamin B12 rich diet improves brain omega-3 fatty acids, neurotrophins and cognition in the Wistar rat offspring.** Brain Dev. 36(10):853-63, 2014.

Representação gráfica traduzida de University of Michigan. **U-M researchers discover stress in early life extends lifespan.** Disponível em: <https://news.umich.edu/u-m-researchers-discover-stress-in-early-life-extends-lifespan/>, 2020.

Robinson, N. B. et al. **The current state of animal models in research: A review.** Int J Surg. 72:9-13, 2019.

Salehi, B. et al. **Resveratrol: A double-edge sword in health benefits.** Biomedicines, v. 6, n. 3, p. 91, 2018.

Salgado, H.R.N; Chorilli, M & Michelin, D.C. **Animais de laboratório: o camundongo.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Araraquara, v. 28, n. 1, p.11-23, 2007.

Shafiee, M. et al. **Saffron in the treatment of depression, anxiety and other mental disorders: Current evidence and potential mechanisms of action.** J Affect Disord. 227:330-337, 2018.

Shi, L.; Fatemi, S. H.; Sidwell, R. W. & Patterson, P. H. **Maternal Influenza Infection Causes Marked Behavioral and Pharmacological Changes in the Offspring.** The Journal of Neuroscience. 23(1), 297–302, 2003.

Silva, L. C. C. P. et al. **O uso de animais de laboratório como modelos experimentais para o estudo de transtornos psiquiátricos.** RESBCAL, v.1 n.3, p. 270-278, 2012.

Smith, S. E. et al. **Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6.** *J Neurosci.* (40):10695-702, 2007.

Soares, E. D. C. C. **A ativação imunológica materna na gênese do comportamento autista: aspectos comportamentais e neuroquímicos.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, 2014.

Stahl, S. M. **Basic psychopharmacology of antidepressants, part 1: Antidepressants have seven distinct mechanisms of action.** *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 59, n. 4, p. 5-14, 1998.

Sussman, D. et al. **Neuroanatomical features in soldiers with post-traumatic stress disorder.** *BMC Neuroscience*, 2016.

Tabassum, I.; Siddiqui Z. N. & Rizvi S.J. **Effects of *Ocimum sanctum* and *Camellia sinensis* on stress-induced anxiety and depression in male albino *Rattus norvegicus*.** *Indian J Pharmacol*, 42(5):283-8, 2010.

Turner, R. S. et al. **A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease.** *Neurology*, vol. 85, no. 16, pp. 1383–1391, 2015.

Vuong, H. E. et al. **The maternal microbiome modulates fetal neurodevelopment in mice.** *Nature*. 586 (7828):281-286, 2020.

Wang, Q. et al. **Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid.** *Neurochem Res.* (11):2105-12, 2004.

World Health Organization. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates.** Geneva: WHO Document Production Services. p. 24, 2017.

World Health Organization. **Fact sheet: Mental disorders**, 2019

World Health Organization. **Key facts: Mental disorders**, 2022.

Yang, C. et al. **Sinapic acid and resveratrol alleviate oxidative stress with modulation of gut microbiota in high-fat diet-fed rats**. Food Res Int, 2019.

Zawadzka, A.; Cieřlik M. & Adamczyk A. **The Role of Maternal Immune Activation in the Pathogenesis of Autism: A Review of the Evidence, Proposed Mechanisms and Implications for Treatment**. Int J Mol Sci. 22(21):11516, 2021.

Zhang, Y. M. et al. **Resveratrol ameliorates maternal immune activation-associated cognitive impairment in adult male offspring by relieving inflammation and improving synaptic dysfunction**. Front Behav Neurosci. 17:1271653, 2023.