

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

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

Lara Cecília dos Santos Ângelo

Orientador(a): Professor Dra. Erika Renata Barbosa Neiro

Instituto de Ciências Biológicas

Uberlândia – MG

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

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

Lara Cecília dos Santos Ângelo

Orientador(a): Professor Dra. Erika Renata Barbosa Neiro

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

Uberlândia – MG

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

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

Lara Cecília dos Santos Ângelo

Orientador(a): Professor Dra. Erika Renata Barbosa Neiro

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

Uberlândia – MG

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

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

Lara Cecília dos Santos Ângelo

Orientador(a): Professor Dra. Erika Renata Barbosa Neiro

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 (3,4',5- trihidroxiestilbeno) sobre comportamentos do tipo ansiosos em filhotes machos de mães tratadas com antígenos suspensos na vacina influenza trivalente.**

Lara Cecília dos Santos Ângelo

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: \_\_\_\_\_

---

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 18 de novembro de 2024

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de vivenciar a pesquisa científica e ter me moldado como pesquisadora. Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo recebimento de bolsa de Iniciação Científica que possibilitou a realização desta pesquisa.

Agradeço ao REBIR/UFU e a todas as pessoas com quem convivi no período em que estive lá pelo cuidado comigo e com os animais que foram utilizados para esta pesquisa: João, Natália, Cenir, Renan, Loyane, Mariane, Alessandra, Fernanda, Fernando e Rafael. Agradeço ao grupo de pesquisa que proporcionou a realização do projeto, apesar das dificuldades: Lorena, Bruna Matias e Melissa; e as professoras Erika e Vanessa.

Agradeço aos meus pais e meu irmão, João Batista Ângelo, Eliane dos Santos Ângelo e Gabriel dos Santos Ângelo, por sempre terem se dedicado à minha formação e terem me apoiado durante toda essa trajetória. Vocês foram essenciais. Amo vocês.

Agradeço aos meus amigos da vida inteira Agnes, Carol, Higor e Igor, por não somente me apoiarem, mas também terem me impulsionado quando foi necessário. Vocês fazem parte de mim desde sempre e para sempre. Amo vocês.

Agradeço às minhas amigas universitárias Bruna Gentil, Bruna Matias, Giuliana, Júlia Inocêncio, Júlia Santiago, Lorena, Marcela, Maria Cecília e Suzanne pelos momentos de leveza e alegria durante a faculdade e pelo apoio (des)didático de sempre. Agradeço à Amanda em especial por ter sido minha companhia desde o primeiro dia até o último. Amo vocês.

Agradeço a empresa MinasBio Consultoria Ambiental e à Jeamylyle pelas experiências de extensão que, apesar de não ter escolhido seguir o caminho que trilhei nestes projetos, me ensinaram muito sobre trabalho em equipe e sobre a comunidade da qual faço parte.

Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram durante a execução deste trabalho pois sem os momentos de conversa, aflição, descontração e carinho eu absolutamente não teria conseguido.

Enfim, Obrigada.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo do desenvolvimento do cérebro e do sistema imunológico, da gestação à vida adulta.....	16
Figura 2. Hipótese de cadeia de eventos pós Ativação Imune Materna.....	17
Figura 3. Via de biossíntese do resveratrol.....	18
Figura 4. Fórmulas moleculares do resveratrol.....	19
Figura 5. Caixas do alojamento dos camundongos no REBIR.....	22
Figura 6. Cronograma experimental em linha do tempo.....	23
Figura 7. Visualização da rolha vaginal.....	23
Figura 8. Agulha de gavagem utilizada durante o experimento (figura A) e Administração de gavagem em fêmea gestante (figura B).....	24
Figura 9. Cronograma experimental em linha do tempo.....	25
Figura 10. Fases da gestação.....	25
Figura 11. Fases do crescimento dos filhotes.....	26
Figura 12. Animal no aparato durante o teste de LCE.....	27
Figura 13. Animal no aparato durante o teste de CA.....	28
Figura 14. Tempo de permanência nos braços abertos, em porcentagem, dos animais dos 4 grupos experimentais do teste de LCE.....	30
Figura 15. Número de episódios de <i>Stretched-Attend Posture</i> (SAP) dos animais dos quatro grupos experimentais do teste de LCE.....	31
Figura 16. Número de episódios de <i>Head Dipping</i> dos animais dos quatro grupos experimentais do teste de LCE.....	32
Figura 17. Locomoção total dos animais dos quatro grupos experimentais do teste de CA....	33

Figura 18. Número de cruzamentos centro-periferia dos animais dos quatro grupos experimentais do teste de CA.....34

Figura 19. Tempo, em segundos, de locomoção entre os quadrantes centrais dos animais dos quatro grupos experimentais do teste de CA.....35

## RESUMO

Medo e ansiedade provocam reações fisiológicas e comportamentais semelhantes em várias espécies, mas diferem quanto à origem: o medo é uma resposta a ameaças reais e imediatas, enquanto a ansiedade surge de um perigo potencial. Em 2019, a OMS estimou que 301 milhões de pessoas sofrem de transtornos de ansiedade no mundo, com o Brasil apresentando altas taxas de prevalência. Traumas podem desencadear ansiedade, e diversos fatores genéticos e ambientais contribuem para o desenvolvimento desses transtornos. A Ativação Imune Materna (AIM), desencadeada por infecções na gestação, é estudada por seu impacto no neurodesenvolvimento do feto. É um processo que causa perturbações no curso normal do desenvolvimento do feto, podendo de diferentes formas, a depender do organismo, impactar na vida adulta da prole. O resveratrol, um polifenol com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, tem mostrado potencial neuroprotetor e efeitos benéficos para a saúde. Este estudo analisou o efeito neuroprotetor do resveratrol administrado cronicamente durante a gestação na prole de camundongos machos adultos, especialmente em relação aos déficits relacionados aos comportamentos do tipo ansiosos associados à administração de antígenos suspensos na vacina de Influenza nas mães gestantes. O resveratrol ou carboximetilcelulose foram administrados via gavagem durante todos os dias da gestação (de E0 a E21) e a vacina ou solução PBS foram aplicados no 16º dia de gestação (E16), de acordo com o grupo experimental. Comportamentos do tipo ansiosos foram analisados na prole usando os testes Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Campo Aberto (CA). No LCE, observou-se uma tendência de comportamento ansioso nos grupos cujas mães receberam apenas a vacina, evidenciado por uma menor frequência de comportamentos exploratórios, como Head Dipping (HD) e Stretched Attend Posture (SAP). O grupo G4 (mães tratadas com resveratrol e vacina) demonstrou maior frequência desses comportamentos, sugerindo que o resveratrol pode mitigar os efeitos da resposta imunológica materna sobre a ansiedade na prole. Embora não houvesse diferenças estatisticamente significativas no tempo passado nos braços abertos do LCE entre os grupos, a prole do grupo G4 exibiu uma tendência a permanecer mais tempo nos braços abertos do que o grupo G2 (apenas vacina). No teste de Campo Aberto, não houve diferenças significativas na locomoção ou na tendência de permanecer no centro do campo, mas uma leve tendência indicou que o G4 passou mais tempo na área central, sinalizando menor comportamento ansioso em comparação ao G2. Fatores externos, como variações no manejo dos animais e reformas no biotério, possivelmente aumentaram o estresse ambiental, o que pode ter influenciado os resultados. O estudo sugere que o resveratrol pode ter efeito

neuroprotetor contra comportamentos ansiosos decorrentes de insultos imunológicos maternos, embora fatores externos e limitações estatísticas indiquem necessidade de mais pesquisas.

**Palavras chave:** Ansiedade, Ativação Imune Materna, Resveratrol, antígenos suspensos na Vacina Influenza, Labirinto em Cruz Elevado, Campo Aberto.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

IFN- $\tau$  - Interferon-tau

IFN- $\gamma$  - Interferon-gama

IL-6 - Interleucina 6

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa

IL-8 - Interleucina 8

IFN- $\beta$  - Interferon-beta

IL-1b - Interleucina 1b

SIRT1 - Sirtuína 1

COX - Ciclooxigenase

HIF-1 $\alpha$  - Fator Induzido por Hipóxia-1-alfa

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

eNOS - Óxido Nítrico Sintase Endotelial

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-13 - Interleucina 13

E0 - 1º dia de gestação

E16 - 16º dia de gestação

E21 - 21º dia de gestação

PBS - Tampão fosfato-salino

P60 - 60 dias de vida da prole

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>20</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
Objetivos gerais	21
Objetivos específicos	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
Animais experimentais	22
Delineamento experimental	24
Testes comportamentais	26
Eutanásia dos animais	28
Análises estatísticas	29
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
5.1. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	30
5.2 Teste de Campo Aberto (CA)	33
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>40</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>41</b>

# 1. INTRODUÇÃO

O medo e a ansiedade são emoções capazes de desencadear reações fisiológicas e comportamentais semelhantes no organismo de diferentes espécies. Em geral, a grande diferença entre medo e ansiedade se dá pela origem das emoções: Enquanto o medo se origina da percepção de perigos reais e iminentes, a ansiedade é causada pela apreensão diante uma situação de perigo vaga e apenas potencial (CRUZ & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Em 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou sua maior revisão desde a virada do século sobre saúde mental. No documento consta que em 2019, 301 milhões de pessoas de todas as idades sofreram de algum transtorno de ansiedade, mundialmente (WHO, 2022). O Brasil figura entre os países no qual a população é mais afetada com transtornos de ansiedade nas Américas, sendo que em 2019, aproximadamente 723 pessoas a cada 100 mil sofriam de algum transtorno de ansiedade que causava incapacidade ao indivíduo (PAHO, 2021).

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), existem diferenças primordiais entre respostas normais de medo e ansiedade e os transtornos de ansiedade. Em geral, os transtornos de ansiedade se diferenciam do medo e da ansiedade como adaptações evolutivas pela excessividade e pela permanência das manifestações fisiológicas além do apropriado. Em diferentes níveis, as perturbações no corpo em resposta a situações de risco são passageiras, de acordo com a necessidade; mas nos transtornos de ansiedade podem ser persistentes e exageradas.

A ocorrência de um trauma pode desencadear reações de ansiedade à medida que a pessoa é novamente exposta a uma situação semelhante em algum aspecto (CAREY et al., 2021). Os transtornos de ansiedade reconhecidos pelo DSM-5 incluem: transtornos de ansiedade de separação, social, generalizada, induzido por substância ou medicamento; mutismo seletivo; transtorno de pânico; agorafobia; transtorno de estresse pós-traumático, entre outros (DSM-5, 2013).

Vários são os fatores que podem levar ao surgimento e agravamento de transtornos de ansiedade. Dentre os principais são vistos os fatores genéticos e ambientais, sem que haja precisão em relação ao quanto cada um influencia (MARGIS et al., 2003). Atualmente, sabe-se que mesmo durante o desenvolvimento fetal, fatores estressores podem desencadear uma

série de consequências para o indivíduo, que quando adulto podem se desenvolver em transtornos (DUARTE, 2019; GONZALEZ-PEREZ et al., 2010).

A Ativação Imune Materna (AIM) é um processo que vem sendo cada vez mais estudado nos últimos anos. A formação do Sistema Nervoso Central (SNC) do feto durante a gestação é delicada, e perturbações que ocorrem no funcionamento fisiológico da mãe podem interferir no neurodesenvolvimento de forma negativa (URAKUBO et al., 2001). Infecções maternas que ocorrem durante a gestação são capazes de ativar o sistema imunológico da mãe de forma que o estresse imunológico cause alterações no feto em desenvolvimento que irão se manifestar após o nascimento (BOULANGER-BERTOULOS et al., 2018).

Estudos epidemiológicos indicam a correlação entre o aumento de doenças em determinada área e posteriormente o aumento de doenças neuropsiquiátricas em crianças cujas mães estavam grávidas durante o surto. Após uma epidemia de rubéola nos Estados Unidos em 1964 houve aumento expressivo no número de crianças que apresentavam características associadas ao Transtorno do Espectro Autista (TEA) que haviam sido diagnosticadas com rubéola congênita (CHESS, 1971). O mesmo ocorreu em Nova York, quando 20% dos filhos de mães que haviam sido infectadas com rubéola durante a gravidez foram diagnosticados com esquizofrenia (SOLEK et al. 2018).

Pesquisas mostram que, além da rubéola, infecções bacterianas em geral, gripes, toxoplasmose, sarampo e herpes também podem estar associadas ao aumento do desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas (PLOEGER et al. 2010; JIANG et al., 2016; SOLEK et al., 2018). Doenças como esquizofrenia, transtorno do espectro autista e transtorno bipolar já foram associadas a ocorrência do aumento de diferentes doenças infecciosas em determinadas áreas por estudos epidemiológicos (DAVIES et al 2003, SOLEK et al. 2018).

A relação entre o sistema imunológico e o SNC ocorre mutuamente. Através de vias neuroendócrinas, componentes do SNC como hipotálamo e hipófise são capazes de modular o sistema imunológico, enquanto a sinalização do sistema imunológico para o SNC ocorre primordialmente através da liberação de citocinas, que são proteínas capazes de modular respostas celulares em diversos alvos do SNC (ALBERTS et al., 2017).

No contexto da gestação, é necessária uma regulação da resposta imunológica da mãe. O feto carrega em si moléculas provenientes do pai, e as estruturas do trofoblasto se alojam profundamente na parede uterina. Ainda assim, apesar da incompatibilidade, tecidos e órgãos

que na mãe agem como um aloenxerto não são rejeitados. Assim, um dos primeiros eventos de uma gestação normal é o desenvolvimento de tolerância imunológica da mãe para com o feto (TIZARD, 2023).

Através da ação de hormônios e citocinas o ambiente uterino torna-se viável à implantação do oócito. Pela ação da progesterona, e de diferentes interferons como IFN- $\tau$  e IFN- $\gamma$ , ocorre a supressão da resposta imune localmente, e o corpo da mãe torna-se tolerante à presença do embrião (TIZARD, 2023). Passadas as primeiras semanas de gestação, ocorre a formação da placenta, que forma a barreira placentária, responsável por filtrar a passagem de substâncias da mãe para o feto e assume importante papel na tolerância imunológica ao feto (LANGMAN, 2021).

Entretanto, a placenta não é capaz de formar uma barreira impenetrável. Quando ocorrem infecções maternas durante a gestação, o sistema imunológico, que já havia sido modulado em diferentes níveis, passa por um desafio maior, comprometendo o delicado equilíbrio do ambiente uterino. Estima-se que o processo de AIM cause um estresse imunológico, e o desenvolvimento fetal normal pode ser comprometido (URAKUBO et al., 2001).

Uma hipótese destacada nas pesquisas sobre o tema é a de que citocinas inflamatórias atuam nas células da micróglia fetal em desenvolvimento, causando distúrbios em seu funcionamento normal (KNUESEL et al., 2014). Ainda não é possível precisar quais os mecanismos moleculares, mas sabe-se que, parte da microglia em roedores deriva de células mielóides de fora do SNC, tendo seu desenvolvimento normal influenciado por substâncias que não necessariamente atravessam a barreira placentária, e posteriormente migrando para o encéfalo (KNUESEL et al., 2014).

Brown e colaboradores identificaram o aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8 no soro materno e fluido amniótico em associação ao aumento de distúrbios neurodesenvolvimentais. O aumento dessas citocinas ocorre em associação à resposta da mãe a infecções (virais ou bacterianas), mas os mesmos distúrbios neurodesenvolvimentais foram também vistos na prole de mães que não sofreram infecções, mas que receberam injeção das próprias citocinas (KNUESEL et al., 2014).

A presença destas citocinas pró-inflamatórias, além de IFN- $\beta$  e IL-1b, tanto no soro materno e líquido amniótico, quanto na placenta e no encéfalo dos roedores indicam que essas

substâncias são capazes de atravessar a barreira placentária e alcançar o embrião em desenvolvimento (URAKUBO et al., 2001), fato esse que se complementa à possibilidade de que células neuronais migram ao encéfalo já com alguma perturbação. Em contrapartida, foi visto que, a aplicação de anticorpos anti-IL-6 em fêmeas de roedores com infecções virais foi capaz de reverter distúrbios neurais (KNUESEL et al., 2014), e o aumento de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-13, foi associado ao mesmo efeito (ALLSWEDE et al., 2016).

É importante destacar que existem períodos nos quais a formação do embrião é mais suscetível a problemas que possam gerar maiores consequências. No início da 3ª semana de gestação ocorre a formação da placa neural, seguida da formação do neuroectoderma, que marca o início do processo de neurulação. A formação do SNC ocorre a partir de consecutivos processos de diferenciação dessas estruturas do folheto ectodérmico, e dependem de diversas substâncias e genes (LANGMAN, 2021). Perturbações neste processo em estágios iniciais do desenvolvimento podem amplificar problemas em todos os processos subsequentes (KNUESEL et al., 2014).

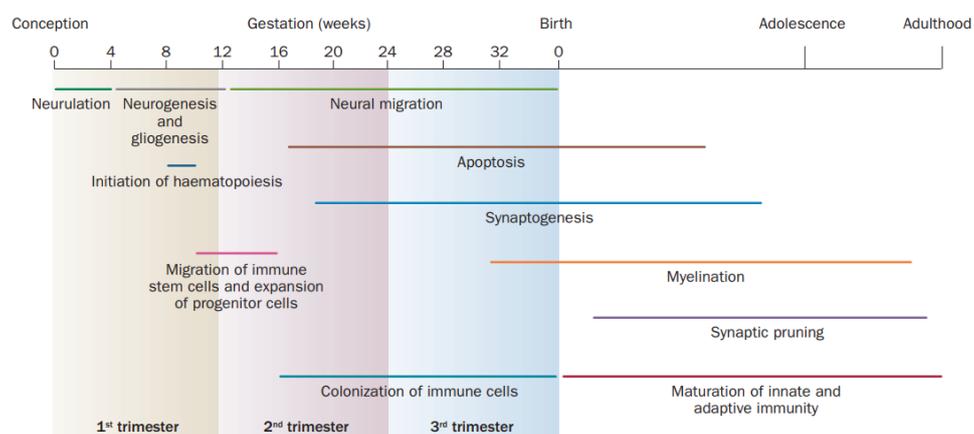


Figura 1. Linha do tempo do desenvolvimento do cérebro e do sistema imunológico, da gestação à vida adulta. Os efeitos de curto e longo prazo da Ativação Imune Materna dependem da predisposição genética, janela de tempo do desenvolvimento fetal ou pós natal e da intensidade do insulto imunogênico. Fonte: Knuesel et al., 2014.

Com isso, estima-se que, o estresse imunológico que ocorra durante as primeiras semanas de gestação tenha, potencialmente, consequências mais graves no desenvolvimento do embrião, podendo inclusive inviabilizá-lo (KNUESEL et al., 2014; KALISH et al., 2021).

Enquanto eventos de Ativação Imunológica Maternal que ocorrem em estágios avançados não propagam com tanta intensidade, mas podem causar distúrbios em diversos sistemas do corpo, em especial neuropsiquiátricos (SPINI et al., 2020).

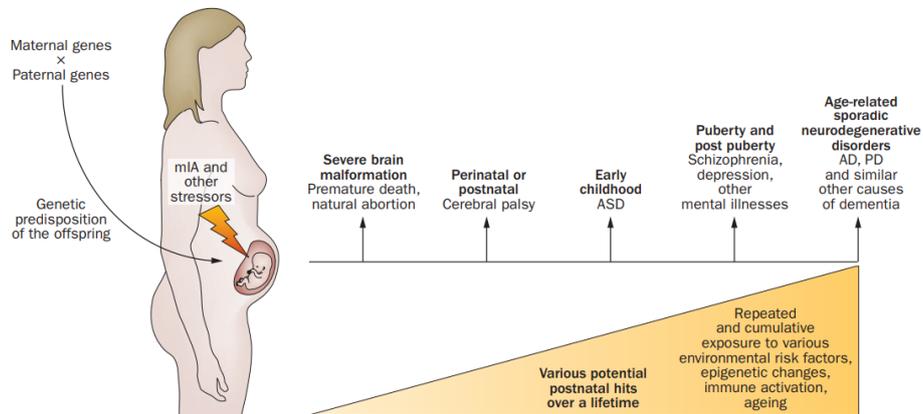


Figura 2. Hipótese de cadeia de eventos pós Ativação Imune Materna. Em humanos, a AIM pode levar a um amplo espectro de disfunções neuronais e fenótipos comportamentais observáveis tanto na prole juvenil, adulta ou envelhecida. Abreviaturas: AD, doença de Alzheimer; ASD, Transtorno do espectro do autista; mIA, ativação imune materna; PD, doença de Parkinson. Fonte: Knuesel et al., 2014.

Em animais não é possível afirmar que a ansiedade ocorre de maneira idêntica ao que ocorre em humanos, porém ao longo dos anos, foram desenvolvidas pesquisas que indicam uma possível correspondência, especialmente de humanos com outros mamíferos. A aplicabilidade destas pesquisas é mais forte no ramo farmacêutico, onde são usadas como parâmetro para o desenvolvimento de novas drogas ansiolíticas (CRUZ & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Além de buscar entender os distúrbios que podem ser causados pela AIM, estudos também são feitos para buscar formas de reverter e/ou prevenir estes problemas. Nas duas últimas décadas, um polifenol de ocorrência natural produzido em várias plantas, especialmente a partir de cascas e sementes de uvas, vêm recebendo destaque pela comunidade científica, por atuar como uma fitoalexina (compostos químicos produzidos pelas plantas para combater infecções contra diversos patógenos), além de desempenhar papéis neuroprotetores e terapêuticos em outros organismos (BAMBINI-JUNIOR et al., 2014; RAHMAN et al., 2020).

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) possui diversas propriedades biológicas em destaque, como atividades anti-inflamatórias e antioxidantes, que podem ser utilizadas para aplicações terapêuticas potenciais e promissoras (DUMONT et al., 2021; CSISZAR, 2011). Na gravidez, acredita-se que o resveratrol possa ser benéfico para reverter algumas possíveis perturbações associadas ao posterior desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas na prole (DARBY et al., 2019).

A molécula de resveratrol é sintetizada a partir da fenilalanina, especialmente nas cascas das uvas, em resposta a alguma patologia que acomete a planta (SOLEAS et al., 1997; SIEMANN e CREASY, 1992). A via de síntese do resveratrol envolve 4 reações enzimáticas que transformam a fenilalanina em uma das isoformas de resveratrol: cis ou trans. Tipicamente, na natureza a forma trans é predominante e é a mais estudada por alcançar os efeitos biológicos descritos em pesquisas (SOLEAS et al., 1997).

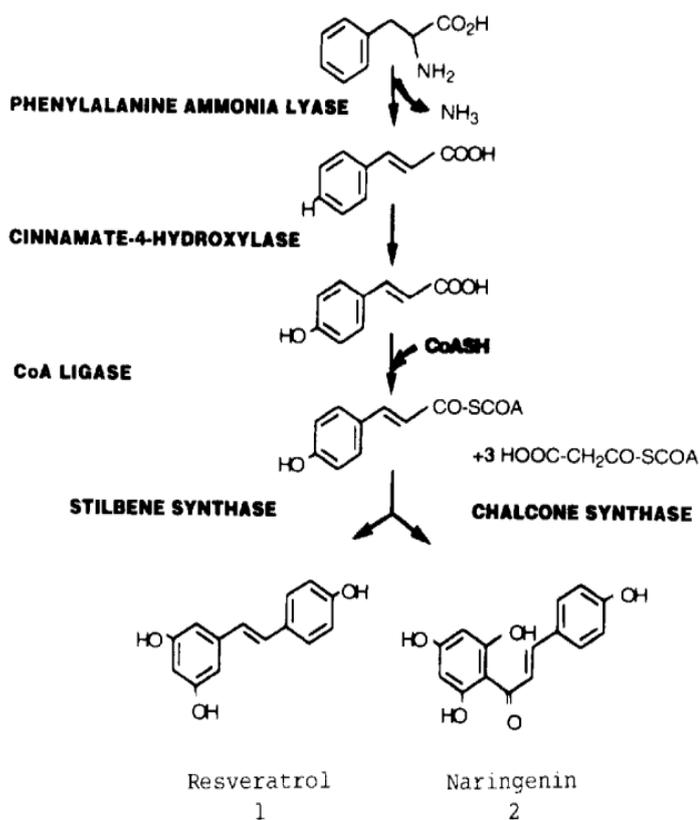


Figura 3. Via de biossíntese do resveratrol (1) a partir da fenilalanina. Fonte: Soleas et al., 1997.

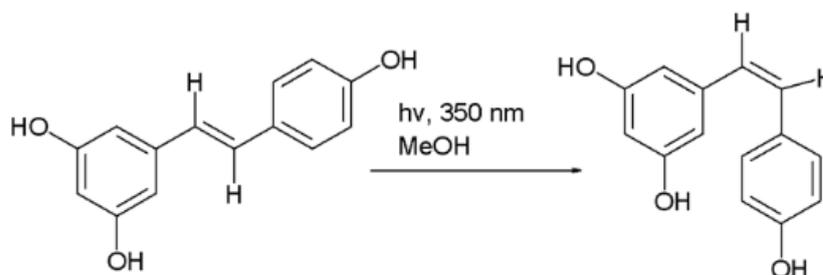


Figura 4. Fórmulas moleculares do resveratrol. Trans-resveratrol a esquerda, e cis-resveratrol a direita. Fonte: Soleas et al., 1997.

Dentre os efeitos benéficos do resveratrol, os que foram melhor descritos incluem sua propriedade antioxidante, por ser capaz de interagir com Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), e ser capaz de inibir competitivamente fosfodiesterases responsáveis pela quebra de Adenosina Monofosfato Cíclico (cAMP) em algumas vias como SIRT1 (DIAZ-GEREVINI et al., 2016) e COX (NAKATA et al. 2012); e sua propriedade anti-inflamatória, por ser capaz de regular a expressão de algumas citocinas, como é o caso do HIF-1 $\alpha$  e VEGF (DIAZ-GEREVINI et al., 2016). Existe também a hipótese de que o resveratrol seja capaz de atuar na via da NO sintetase endotelial (eNOS), que estaria correlacionado aos seus efeitos na saúde cardiovascular (NAKATA et al., 2012).

Especificamente no SNC, o efeito do resveratrol como protetor celular já foi identificado. Em estudos *in vitro*, o resveratrol é capaz de atuar como neuroprotetor sobre neurônios dopaminérgicos (BLANCHET et al. 2008). Em estudo *in vivo*, atuando em neurônios colinérgicos foi capaz de amenizar déficits de memória e aprendizagem causados por comorbidades como *diabetes mellitus* (SCHMATZ et al., 2009). Além disso, foi testado em diversos ensaios clínicos que buscaram demonstrar sua absorção, eficácia e segurança (PATEL et al., 2011).

O tratamento de transtornos psíquicos pode ser feito através de métodos terapêuticos que envolvem, entre outros, a prescrição de psicofármacos (AGUIAR et al., 2016). Dentre os medicamentos mais utilizados, os efeitos adversos podem variar desde perda de apetite e disfunção sexual, à síndrome de abstinência, mesmo que utilizados de forma correta (FAUSTINO, 2010). Atualmente as pesquisas mencionadas buscam alternativas aos tratamentos convencionais para transtornos de ansiedade justamente devido aos problemas que estes podem ocasionar (FAUSTINO, 2010).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Os transtornos de ansiedade afetam grande parte da população mundial, acarretando sofrimento e prejuízos a nível pessoal e social. Os tratamentos para esses transtornos incluem medicamentos que frequentemente causam efeitos colaterais indesejáveis, além de serem dispendiosos. O uso de resveratrol ainda durante a gestação pode ser uma alternativa para se evitar o surgimento deste tipo de transtorno na prole em idade adulta, prevenindo o surgimento do problema, além de ser um composto que não exibe efeitos colaterais conhecidos. Além disso, é importante entender como as vacinas interferem no neurodesenvolvimento do feto, quando aplicadas durante a gestação, pois em dados contextos, a vacinação pode ser necessária, ainda que a gestação esteja em curso.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo geral**

O objetivo geral deste projeto foi investigar se o resveratrol é capaz de atuar como protetor contra prejuízos comportamentais causados pela AIM, devido à administração de antígenos suspensos na vacina Influenza durante a gestação.

#### **Objetivos específicos**

. Investigar os efeitos da AIM sobre comportamentos do tipo ansiosos na prole adulta, causados pela administração de antígenos suspensos na vacina Influenza no 16º dia de gestação;

. Verificar se o resveratrol administrado cronicamente durante a gestação é capaz de atuar como neuroprotetor, impedindo ou minimizando os efeitos deletérios que são esperados pela AIM, na prole de machos adultos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### Animais experimentais

Para esta pesquisa foram utilizados animais da linhagem Balb/C, fornecidos pela Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), de acordo com o projeto 055/19 aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Foram fornecidos inicialmente 12 camundongos machos e 24 fêmeas para acasalamento, todos com 3 semanas de vida. Os animais foram mantidos nas dependências do biotério em caixas individualizadas até que atingissem a idade e o peso para a reprodução.

De acordo com o protocolo aprovado, o alojamento de camundongos foi mantido a uma temperatura de 23°C, e ciclos de luz 12hrs com iluminação/12hrs sem iluminação, e tinham livre acesso à água e comida (Figura 5).



Figura 5. Caixas do alojamento dos camundongos no REBIR.

FONTE: A autora (2024)

Ao atingirem a idade de 5 semanas de vida e o peso de aproximadamente 30g, as fêmeas foram colocadas na caixa do macho, em proporção de 2 fêmeas para 1 macho, e foi contabilizado o início do acasalamento.

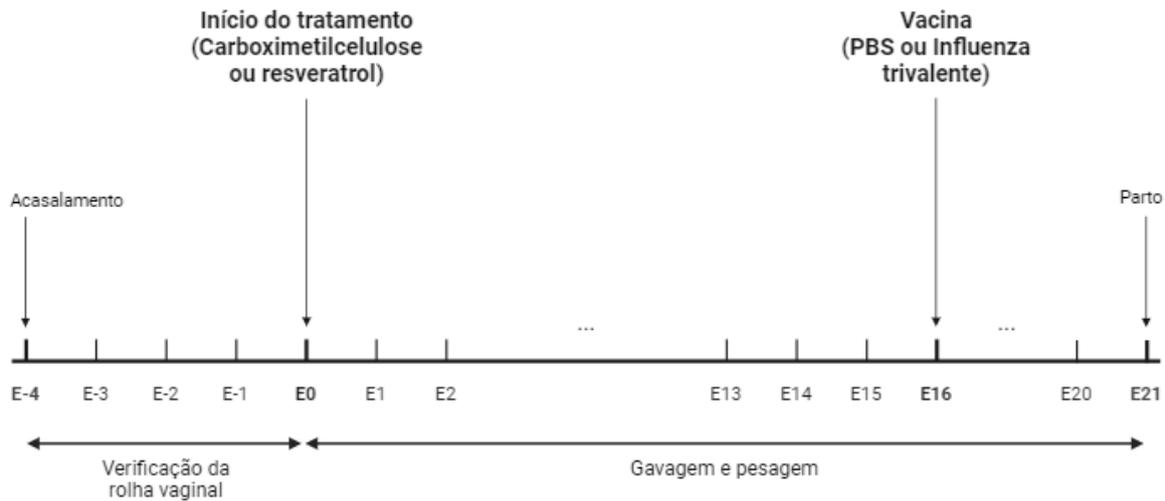


Figura 6. Cronograma experimental em linha do tempo. Fonte: A autora (2024).

Durante os dias de acasalamento as fêmeas eram analisadas em busca de verificar a presença ou ausência da rolha vaginal (mistura de secreção vaginal e sêmen) (Figura 7). Em média, o acasalamento durava 4 dias até que a presença de rolha vaginal fosse confirmada, sendo este dia considerado o 1º dia da gestação e o dia do início do tratamento (E0).



Figura 7. Visualização da rolha vaginal (E0 na linha do tempo). Fonte: A autora (2023)

## Delineamento experimental

Após a visualização da rolha vaginal as fêmeas foram separadas dos machos e colocadas em caixas individuais, e o tratamento foi iniciado de acordo com o grupo:

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

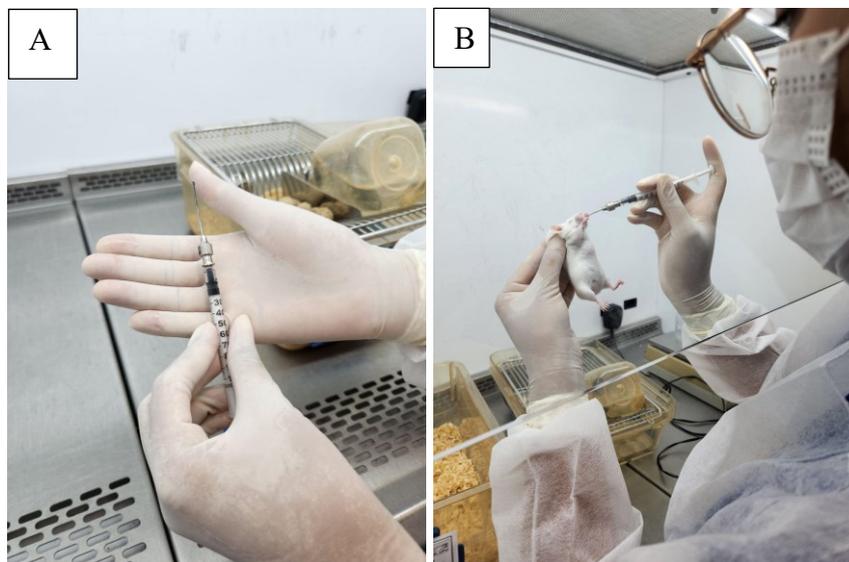


Figura 8. A. Agulha de gavagem utilizada durante o experimento.  
B. Administração de gavagem em fêmea gestante. Fonte: A autora (2023)

O tratamento foi realizado durante todos os dias da gestação, e as fêmeas foram pesadas diariamente para acompanhar a evolução da gravidez. Durante os 21 dias de gestação, as fêmeas foram submetidas à administração do resveratrol (40 mg/kg), fornecido pela farmácia de manipulação Biopharma; ou da carboximetilcelulose (0,5%) por meio de gavagem (0,10 ml) de acordo com o grupo ao qual foram distribuídas. No dia E16 da gestação, as fêmeas grávidas receberam 0,1ml/g de injeção intramuscular antígenos suspensos do vírus Influenza presente

na vacina, fragmentado e inativado (laboratório Sanofi Pasteur) ou 0,1ml/g de salina PBS (10x).

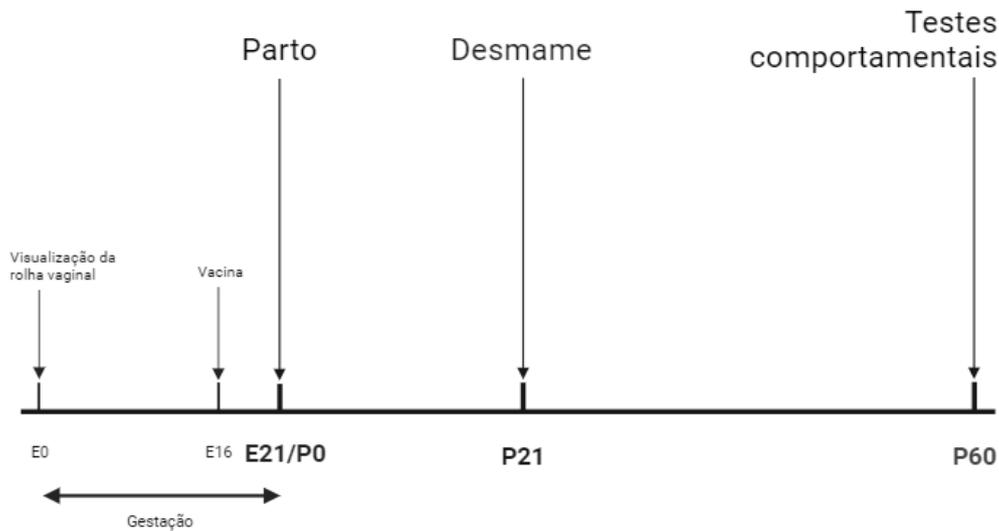


Figura 9. Cronograma experimental em linha do tempo. Fonte: A autora (2024)

As gestações duraram aproximadamente 21 dias, e os filhotes foram mantidos na caixa com a mãe durante 21 dias, que era o período de amamentação. Após o desmame os filhotes foram separados em machos e fêmeas, e mantidos no alojamento de camundongos do biotério até que completassem 60 dias de vida, data estabelecida como parâmetro para que fossem considerados adultos, podendo passar pelos testes comportamentais.

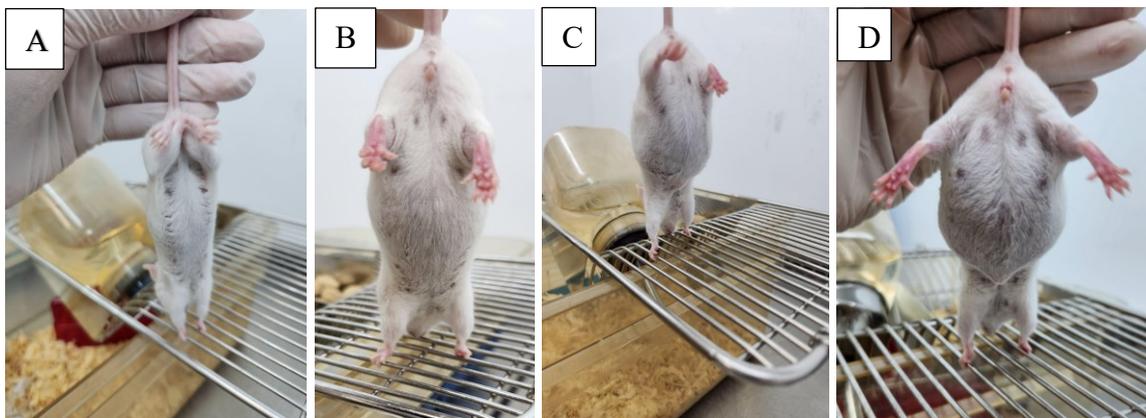


Figura 10. Fases da gestação. A. Fêmea 1 dia após ser visualizada a rolha vaginal (segundo dia de gestação- E1); B. Fêmea no 11º dia de gestação (E10); C. Fêmea no 16º dia de gestação (E15); D. Fêmea no 20º dia de gestação (E19).

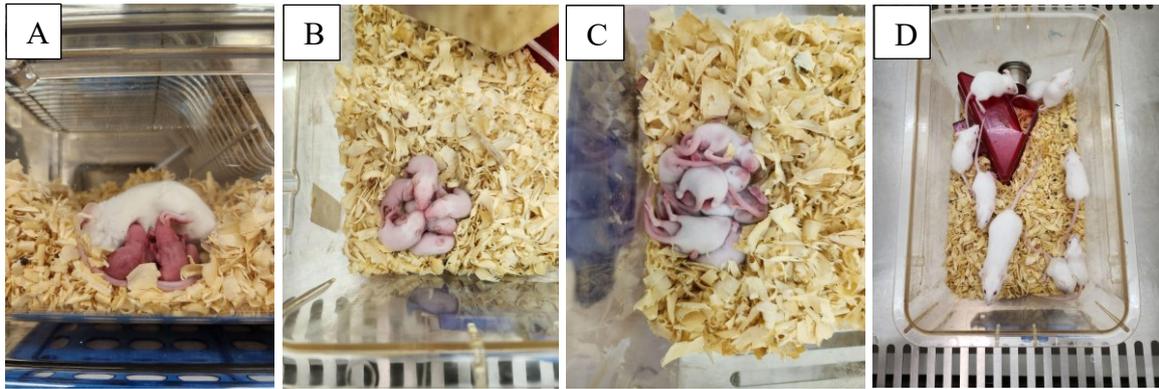


Figura 11. Fases do crescimento dos filhotes. A. Filhotes no 1º dia após o nascimento (P1); B. Filhotes no 7º dia após o nascimento (P7); C. Filhotes do 12º dia após o nascimento (P12); D. Filhotes no 21º dia após o nascimento (P21) na caixa com a mãe antes de ser realizado o desmame. Foi colocado um iglu fornecido pelo biotério como enriquecimento ambiental.

### Testes comportamentais

As pesquisas de doenças neuropsiquiátricas dependem da utilização de modelos animais. O estudo dos fenômenos que ocorrem nos animais dá aos pesquisadores direcionamento para compreender os mecanismos das psicopatologias, e fornecem dados importantes para a pesquisa farmacológica que busca desenvolver medicamentos para melhorar a qualidade de vida de pacientes (CRUZ & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Em termos financeiros, a utilização de testes comportamentais mostra-se muito vantajosa por dar a possibilidade de ser feita com equipamentos relativamente baratos e, utilizando-se dos parâmetros corretos, mostram grande eficácia em fornecer dados relativos ao comportamento padrão e comportamentos disfuncionais de animais de pesquisa (PINTO et al., 2011).

Para avaliar comportamentos do tipo ansiosos, vários testes são utilizados em diversas áreas de pesquisa. Para esta pesquisa os animais foram submetidos aos testes de Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Campo Aberto (CA).

**Labirinto em Cruz Elevado (LCE):** É um teste comportamental utilizado para estudos relacionados aos transtornos de ansiedade e desordens de pânico. No labirinto, ocorre um evento de “conflito de aproximação-esquiva”, baseado no comportamento do animal mediante um ambiente desconhecido, e em sua tendência natural de evitar ambientes abertos e que podem potencialmente oferecer algum risco (PINTO et al.,

2011). O aparato consiste em uma cruz, formada por 2 braços abertos (30 x 5 cm) e 2 braços fechados (30 x 5 x 15 cm), elevados a 50 centímetros do solo. Inicialmente é realizada uma ambientação, na qual o animal é colocado no aparato e mantido por 600 segundos. Para o teste propriamente dito, o animal é posicionado no centro do labirinto, virado de frente para um dos braços abertos, e sua movimentação é monitorada durante 300 segundos. Entre a realização do teste de dois animais diferentes é realizada a limpeza do aparato com álcool 70% e conta-se 120 segundos para dissipação da substância. Posteriormente o comportamento é avaliado através da análise das filmagens, de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos: Tempo que passou nos braços abertos, e episódios de *Stretched Attend Posture* (SAP) e mergulhos de cabeça (*Head Dipping*).

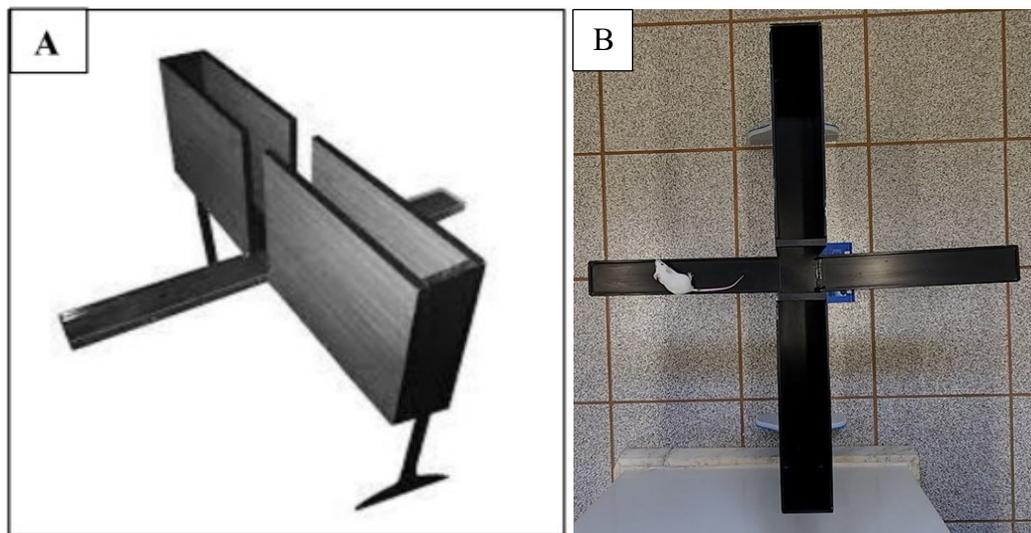


Figura 12. Aparato do teste de LCE. A. Aparato mostrando os braços abertos e fechados. Fonte: Duarte (2019). B. Animal explorando um dos braços abertos do labirinto. Fonte: A autora (2024).

**Campo Aberto (CA):** É um teste utilizado não somente para avaliar comportamentos associados à ansiedade mas também a atividade locomotora do animal. O aparato consiste em uma base de 30 centímetros de diâmetro, dividida em 12 quadrantes (subdivididos em 4 centrais e 8 periféricos), cercados por um cilindro de acrílico de 30 centímetros de altura. Inicialmente é realizada uma ambientação, na qual o animal é colocado no aparato e mantido por 600 segundos. Para o teste propriamente dito, o animal é posicionado no centro do campo, e sua atividade é monitorada por 300 segundos. Entre a realização do teste de dois animais diferentes é realizada a limpeza do aparato com álcool 70% e conta-se 120 segundos para dissipação da substância.

Posteriormente o comportamento é avaliado através da análise das filmagens, de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos: Locomoção total, cruzamentos centro-periferia e tempo nos quadrantes centrais. A avaliação dos parâmetros é feita de acordo com a indicação de comportamentos exploratórios, sendo que quanto mais o animal evita o centro do aparato, onde está supostamente desprotegido, e quanto menos se locomove pelo aparato, menor a indicação de exploração do ambiente, considerando-o com mais comportamentos do tipo ansiosos.

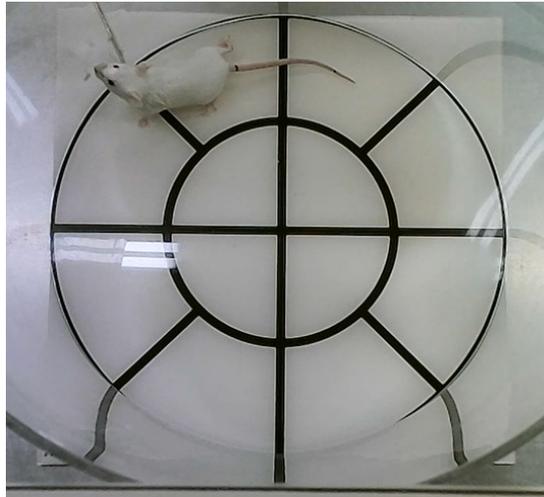


Figura 13. Animal no aparato durante o teste de CA, localizado em um dos quadrantes periféricos. Fonte: A autora (2024).

### **Eutanásia dos animais**

A eutanásia dos animais foi realizada pelo biotério, de acordo com a solicitação para finalização de lote experimental feita pela pesquisadora ao fim de cada bateria de experimentos. As mães e filhotes fêmeas foram eutanasiadas após o desmame, e os filhotes machos após a realização dos testes comportamentais para minimizar o sofrimento animal. O biotério realiza a eutanásia através de exposição ao monóxido de carbono em câmara de gás.

### **Análises estatísticas**

A quantidade de animais em cada grupo variou de acordo com os nascimentos de filhotes machos, tendo sido: G1 (n=7), G2 (n=6), G3 (n=10) e G4 (n=6). Os comportamentos foram analisados e os dados foram submetidos a análise estatística utilizando o programa *GraphPad*

*Prism 5* por *One-Way ANOVA*. Alterações significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$  e neste caso a análise foi seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls para comparação entre os grupos de interesse.

## 5. RESULTADOS

Os resultados dos testes comportamentais foram representados como média e erro padrão da média. Os resultados foram representados em gráficos gerados pelo próprio programa de análise estatística GraphPad Prism 5.

### 5.1. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

A figura 14 mostra a porcentagem de tempo que os animais de cada grupo experimental passaram nos braços abertos do LCE durante o teste comportamental. Não foram notadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais, mas as médias demonstram uma tendência dos animais de G4 (animais cujas mães receberam vacina e foram tratadas com resveratrol) de permanecerem maior tempo nos braços abertos.

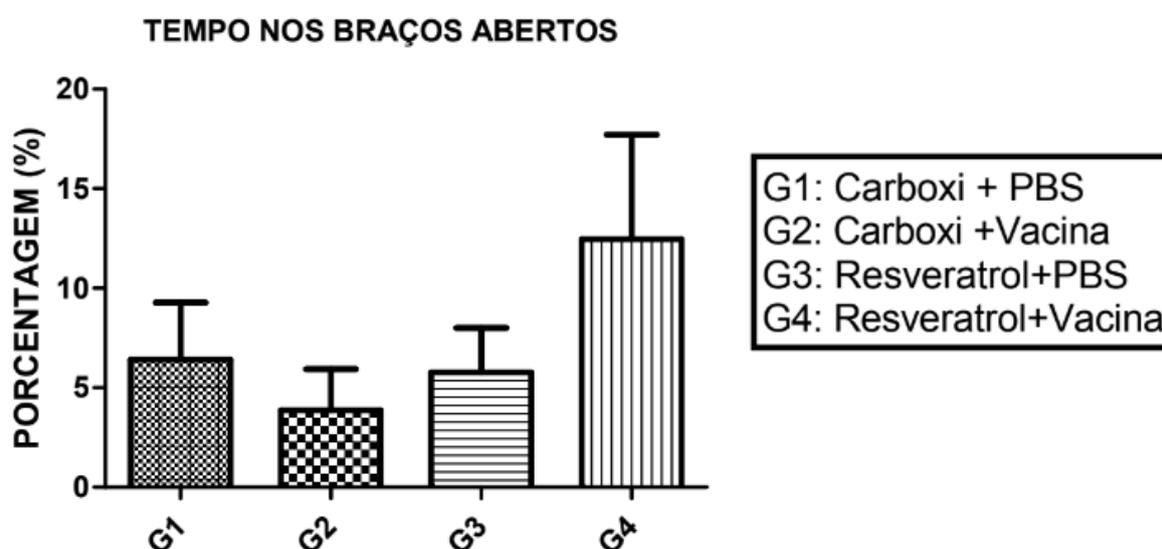


Figura 14. Tempo de permanência nos braços abertos, em porcentagem, dos animais dos 4 grupos experimentais do teste de LCE. G1 ( $6,38 \pm 2,85$ ), G2 ( $3,86 \pm 2,06$ ), G3 ( $6,08 \pm 2,24$ ) e G4 ( $12,46 \pm 5,24$ ). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Diferença estatística significativa considerada se  $p < 0,05$ . Os dados do gráfico estão representados na forma de média  $\pm$  EPM.

*Stretched-Attend Posture* (SAP) é um comportamento típico de avaliação de risco, no qual o animal se inclina para frente e busca informações sobre o ambiente no qual foi inserido. Ao analisar o número de episódios de SAP (figura 15), foram identificadas diferenças estatísticas entre o grupo G4 ( $8 \pm 1,09$ ) e todos os outros grupos experimentais, incluindo o grupo controle. Os valores de média e erro padrão da média para os demais grupos foram: G1 ( $2,29 \pm 1,12$ ), G2 ( $3,33 \pm 1,20$ ) e G3 ( $2,43 \pm 0,48$ ).

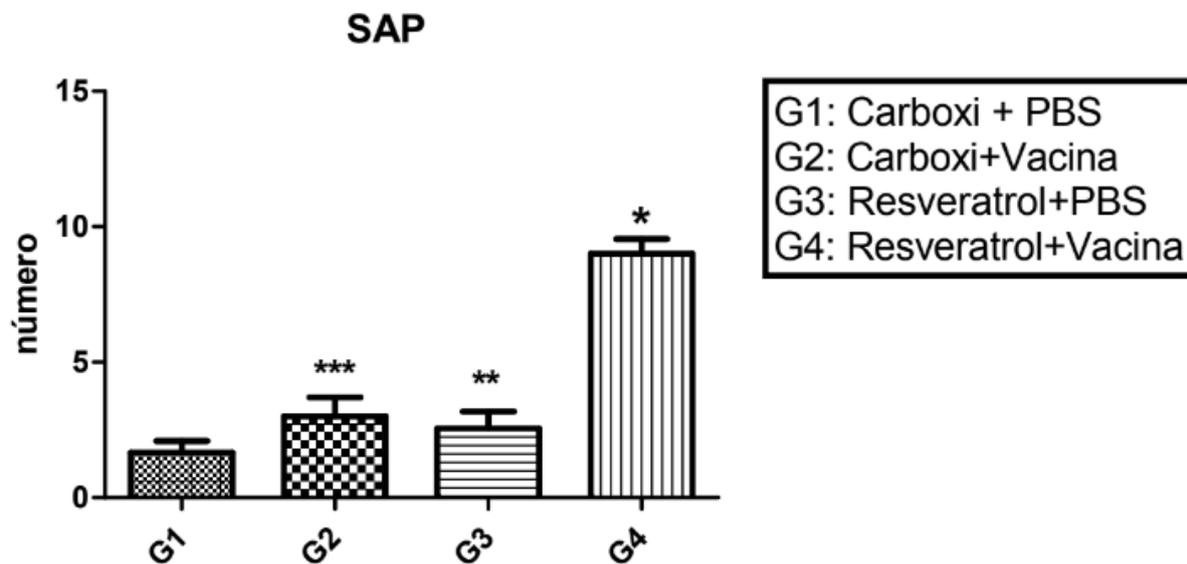


Figura 15. Número de episódios de *Stretched-Attend Posture* (SAP) dos animais dos quatro grupos experimentais do teste de LCE. \* Diferença estatística significativa com G4. \*\* Diferença estatística significativa com G4. \*\*\*Diferença estatística significativa com G4. Diferença estatística significativa considerada se  $p < 0,05$ . Os dados do gráfico estão representados na forma de média  $\pm$  EPM.

O parâmetro comportamental de *Head Dipping* (HD) se refere à inclinação da cabeça do animal para baixo na borda do labirinto, como em um mergulho, sendo um parâmetro exploratório. Analisando o número de episódios de HD representado na figura 16, foi possível perceber diferença estatística significativa somente em relação a G1 ( $0,67 \pm 0,33$ ) e G4 ( $3,6 \pm 1,02$ ), com os animais do G4 apresentando um número maior de mergulhos (soma de mergulhos protegidos e desprotegidos) que os animais de G1. Os valores de média e erro padrão da média para os demais grupos foram: G2 ( $1,4 \pm 0,75$ ) e G3 ( $1,46 \pm 0,6$ )

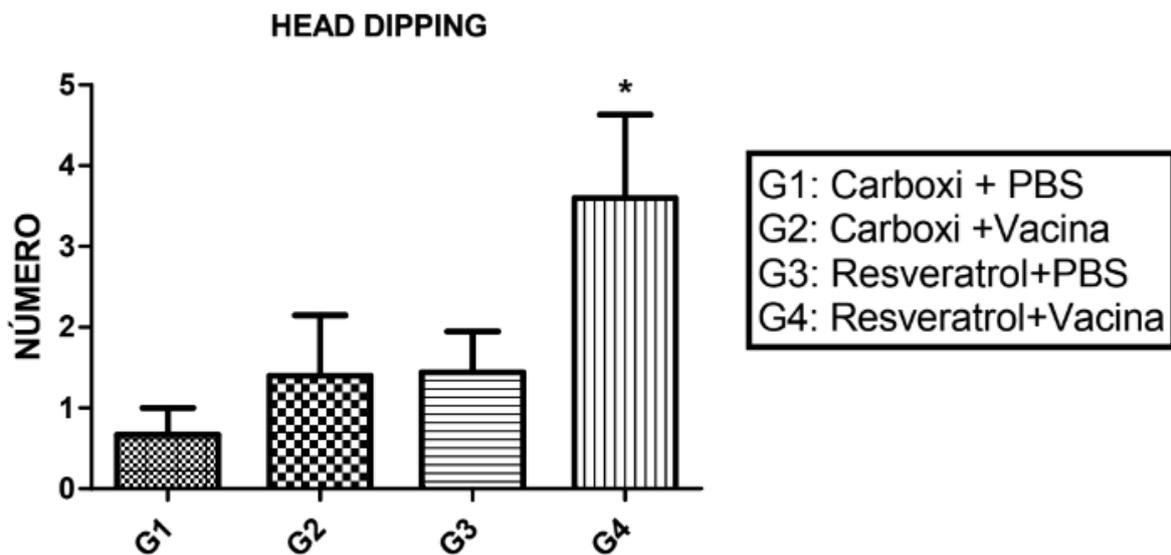


Figura 16. Número de episódios de *Head Dipping* dos animais dos quatro grupos experimentais do teste de LCE. \* Diferença estatística significativa entre G1 e G4. Diferença estatística significativa considerada se  $p < 0,05$ . Os dados do gráfico estão representados na forma de média  $\pm$  EPM.

## 5.2 Teste de Campo Aberto (CA)

Em relação a locomoção total dos animais durante o teste de campo aberto (figura 17) não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais.

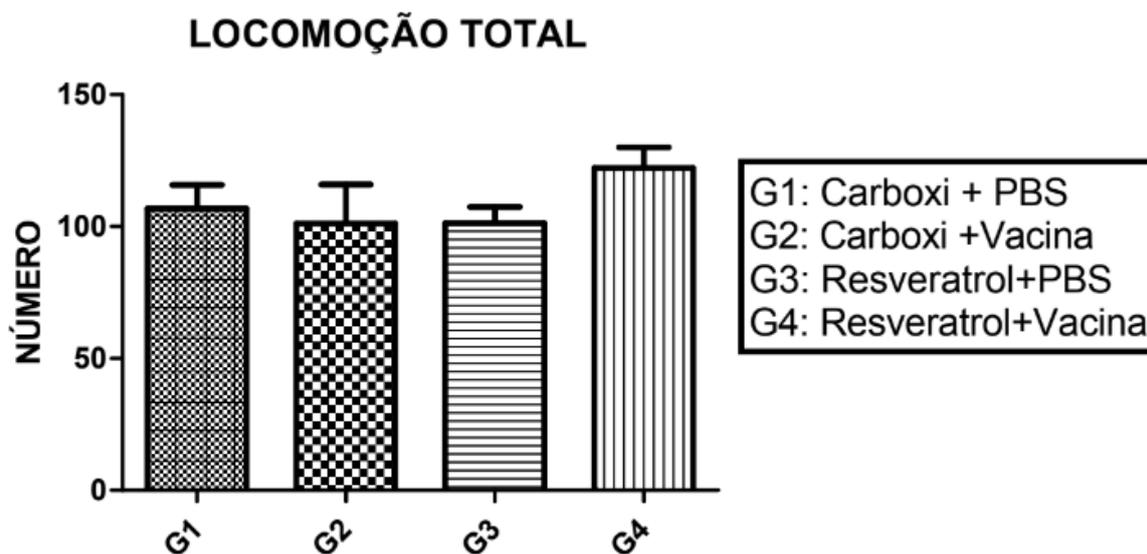


Figura 17. Locomoção total dos animais dos quatro grupos experimentais do teste de CA. G1 (105,5 ± 9,64), G2 (101,16 ± 14,76), G3 (101,3 ± 4,34) e G4 (116,33 ± 5,38). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Diferença estatística significativa considerada se  $p < 0,05$ . Os dados do gráfico estão representados na forma de média ± EPM.

A figura 18 representa os cruzamentos centro-periferia, sendo que os dados demonstram que não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais.

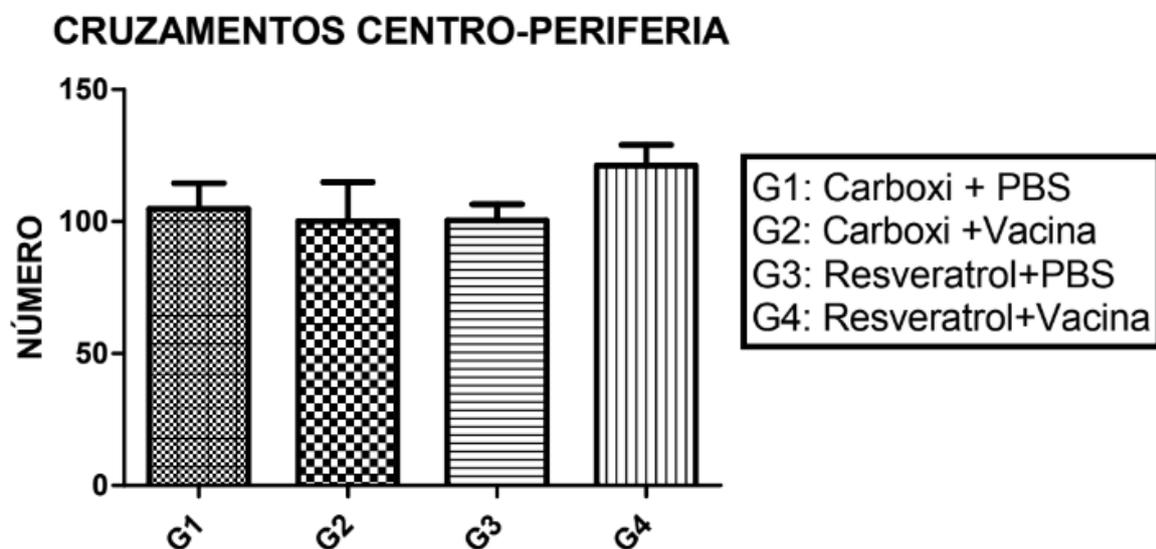


Figura 18. Número de cruzamentos centro-periferia dos animais dos quatro grupos experimentais do teste de CA. G1 ( $103,33 \pm 10,53$ ), G2 ( $100,17 \pm 14,76$ ), G3 ( $100,3 \pm 2,09$ ) e G4 ( $115,33 \pm 5,38$ ). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Diferença estatística significativa considerada se  $p < 0,05$ . Os dados do gráfico estão representados na forma de média  $\pm$  EPM.

A figura 19 mostra que os animais não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos experimentais em relação ao tempo que permaneceram nos quadrantes centrais do campo aberto.

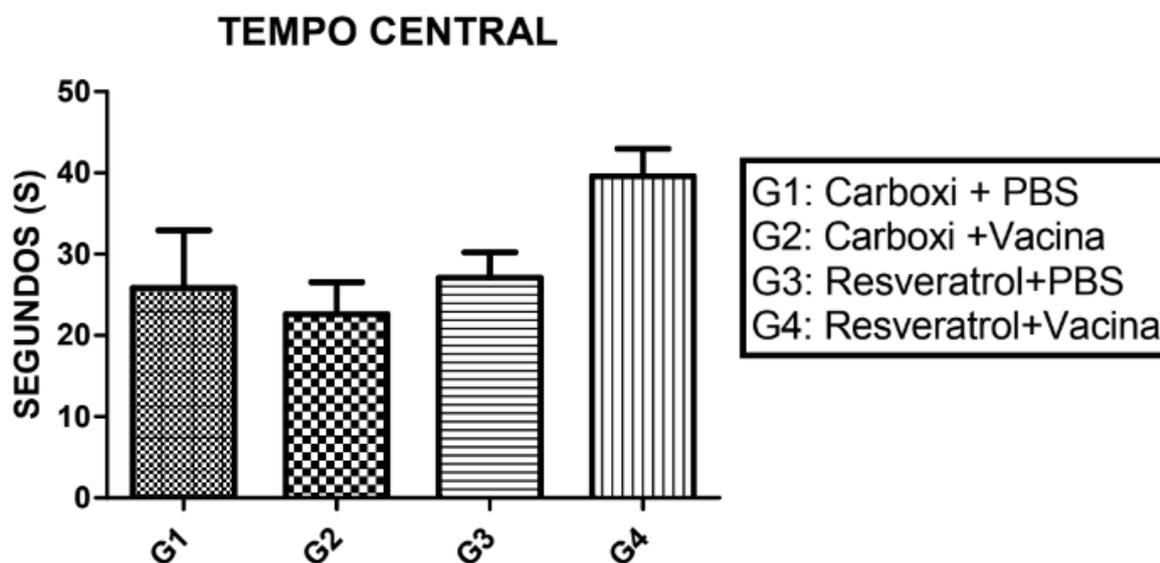


Figura 19. Tempo, em segundos, de locomoção entre os quadrantes centrais dos animais dos quatro grupos experimentais do teste de CA. G1 ( $25,83 \pm 6,57$ ), G2 ( $22,6 \pm 3,6$ ), G3 ( $27,11 \pm 5,76$ ) e G4 ( $39,6 \pm 3,38$ ). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Diferença estatística significativa considerada se  $p < 0,05$ . Os dados do gráfico estão representados na forma de média  $\pm$  EPM.

## 6. DISCUSSÃO

Este estudo investigou o efeito neuroprotetor do resveratrol sobre a prole de machos adultos, quando administrado cronicamente na mãe, durante a gestação (de E0 a E21) por gavagem. A atividade neuroprotetora foi avaliada em relação aos déficits neurodesenvolvimentais causados pela administração de antígenos suspensos na vacina Influenza nas mães em idade gestacional E16.

A administração de insulto imunológico durante a gestação já foi anteriormente associada a distúrbios comportamentais na prole adulta (URAKUBO et al., 2001; ALLSWEDE et al., 2016). A vacinação é uma estratégia que busca amenizar os problemas que possam surgir a partir de uma infecção, pois é capaz de induzir a produção de anticorpos sem que o organismo seja exposto ao patógeno ainda ativo (TIZARD, 2023). Para este estudo, foram avaliados apenas os comportamentos do tipo ansiosos que possam surgir na prole, a partir da exposição materna, durante a gestação, aos antígenos suspensos na vacina influenza, como demonstrado por Spini e colaboradores (2020), ainda que a infecção pela vacina não seja tão potencialmente perigosa quanto a infecção pelos vírus Influenza em si.

A avaliação de comportamentos do tipo ansiosos em modelos experimentais foi aprimorada e refinada ao longo de muitos anos de pesquisa científica (PINTO et al., 2011). Para este estudo foram utilizados 2 testes cujo potencial para avaliação de parâmetros associados aos transtornos de ansiedade já foi muito bem estabelecido em literatura: Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Campo Aberto (CA) (CRUZ & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

O LCE é utilizado para avaliar o paradoxo entre a predisposição natural dos roedores pela exploração de um novo ambiente e sua tendência a evitar ambientes desprotegidos e elevados. Este fenômeno é chamado de *Approach-avoid conflict*, ou “Conflito aproximação-esquiva” (PINTO et al., 2011). A resposta comportamental é interpretada de acordo com a tendência do animal aos comportamentos de esquiva, que indicam uma tentativa de evitar eventos futuros potencialmente aversivos (PINTO et al., 2011; SILVA e FRUSSA-FILHO, 2000; SPINI et al., 2020). A redução do tempo de permanência nos braços abertos, o aumento de entradas nos braços fechados, bem como a diminuição de comportamentos de avaliação de risco e exploratórios tais como *Stretched Attend Posture* (SAP) e *Head Dipping* (HD) e indicam comportamentos do tipo ansiosos (PINTO et al., 2011; SILVA e FRUSSA-FILHO, 2000).

A avaliação de parâmetros exploratórios mostra que em relação a HD e SAP foram vistas diferenças estatísticas significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Na avaliação de SAP

houve diferença estatística significativa entre todos os grupos, sendo que G4, cujas mães receberam ambos os ativos (resveratrol e vacina) demonstraram tendência maior que todos os outros (G1, G2 e G3) de realizar o comportamento. Já na avaliação de HD foi vista diferença estatística significativa apenas entre G1 e G4, seguindo a mesma tendência, de que animais do G4 realizam mais mergulhos.

Em Cruz et al., 1994, é destacada a importância de analisar estes dados a partir da perspectiva de avaliação de risco: a diminuição de comportamentos exploratórios como HD e SAP mostram uma tendência aos comportamentos de precaução e cautela. Sendo assim, a menor quantidade de episódios de HD e SAP que são vistos especialmente em G1, mas também em G2 e G3 em relação ao G4 indicam que não somente o estresse imunológico causado pela vacinação durante a gestação contribuiu para o desenvolvimento de comportamentos do tipo ansiosos na prole de machos adultos, como o resveratrol administrado foi capaz de reverter os prejuízos comportamentais no G4, em relação aos demais.

Em relação ao parâmetro “tempo nos braços abertos” esperava-se que houvesse uma diferença entre o grupo que recebeu a vacina e não recebeu o resveratrol (G2), e o grupo que recebeu a vacina e o resveratrol (G4), indicando que os prejuízos comportamentais causados pela administração da vacina durante a gestação podem ser evitados pelo tratamento com resveratrol. Apesar de não ter sido identificada diferença estatística significativa, que seria considerada apenas se  $p < 0,05$ , os resultados mostram uma clara tendência do grupo 4, de animais cujas mães foram tratadas com resveratrol e com antígenos suspensos na vacina Influenza, de passarem maior quantidade de tempo nos braços abertos do labirinto em relação àquelas cujas mães receberam apenas o insulto imunogênico. Esta tendência, somada aos resultados discutidos anteriormente, pode indicar que o tratamento com resveratrol possivelmente é capaz de reverter prejuízos comportamentais relacionados a transtornos de ansiedade nas condições descritas.

No teste de Campo aberto (CA) busca-se avaliar a locomoção do animal, e sua tendência de permanecer no centro, que indica maior inclinação à exploração do ambiente, ainda que desprotegido; ou na periferia, que indica precaução e cautela (CRUZ & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). Em relação à locomoção não foram vistas diferenças entre os grupos que indicassem o efeito neuroprotetor do resveratrol que está sendo avaliado, nem aumento de comportamentos do tipo ansiosos na prole de mães que receberam insulto imunogênico. A quantidade de cruzamentos centro-periferia vista em todos os grupos indica que os animais se

mantiveram ativos durante o teste, mas não indica nenhuma diferença comportamental entre os grupos (KRAEUTER et al., 2019).

Ao avaliar o tempo que os animais se locomoveram nos quadrantes centrais do campo, apesar de não serem vistas diferenças estatísticas significativas entre os grupos, é vista uma tendência de que animais do G4 permaneçam mais tempo na região desprotegida do campo, enquanto animais do G2 permaneceram menos tempo nesta região. Este é um dado que, isoladamente, não indica o aumento de comportamentos do tipo ansiosos na prole das mães que receberam apenas o insulto imunogênico, nem a capacidade do resveratrol de reverter estes possíveis prejuízos comportamentais, mas aliados aos dados mostrados anteriormente, mostra uma possível correlação entre aumento dos comportamentos do tipo ansiosos em G2 e diminuição em G4 com os tratamentos oferecidos aos grupos.

Neste estudo as fêmeas gestantes foram submetidas ao tratamento com resveratrol durante toda a gestação, e foi demonstrada uma possível ação ansiolítica da substância. Em Duarte (2019) a administração do resveratrol ocorreu apenas de E14 a E19, e ainda sim foi visto efeito positivo da substância em relação diminuição de comportamentos do tipo ansiosos, depressivos e em déficits de memória e sociabilidade. Além disso, neste estudo a administração não ocorreu via gavagem, e sim via injeção intramuscular, mostrando que a via de administração não necessariamente prejudica a ação do resveratrol, desde que a dose seja ajustada.

Spini e colaboradores (2020) também demonstraram que a exposição aos antígenos suspensos em vacina influenza trivalente e suspensão de antígenos de *T. gondii*, em fêmeas de camundongos gestantes, em diferentes estágios da gestação, resultaram em prejuízos comportamentais diferentes. Este estudo demonstra o impacto da AIM em estágios iniciais da gestação. A administração de antígenos suspensos em vacina de influenza em E16 causou impactos significativos no desenvolvimento de comportamentos do tipo ansiosos, mas outros estudos podem esclarecer a possibilidade de existir uma janela de tempo em que o neurodesenvolvimento fetal pode ser mais sensível a estas perturbações.

Alguns fatores relevantes à pesquisa que não foram demonstrados estatisticamente mas foram considerados para a interpretação dos dados são o estresse ambiental e pelo manejo aos quais os animais foram submetidos durante a pesquisa. Primeiramente, sabe-se que camundongos machos estão menos suscetíveis a variações hormonais, o que contribui para a avaliação dos parâmetros sem a interferência deste fator (SPINI et al., 2020).

Um estudo realizado pelo meu grupo de pesquisa por Rodrigues (2023), procurou entender o efeito neuroprotetor do resveratrol sob comportamentos do tipo ansiosos em filhotes fêmeas das mães tratadas com antígenos suspensos em vacina influenza trivalente, estabelecendo a relação entre o ciclo estral e alterações comportamentais que podem ter influencia de AIM, mas não foram demonstradas diferenças comportamentais entre os grupos analisados.

Outro fator foi o ambiente. O biotério passou por mudanças e reformas durante o período de realização dos testes comportamentais que podem ter aumentado o estresse dos animais. Em relação a este fator, houve uma tentativa de reduzir o estresse através da utilização de enriquecimento ambiental fornecido pelo biotério. Houve a utilização do iglu, que foi demonstrada na figura 11D, além de papel picado, feno, algodão, máscaras e bombons de girassol que eram colocados nas caixas de acordo com cronograma feito pela equipe do biotério.

## **7. CONCLUSÃO**

Foi possível concluir através desta pesquisa que antígenos suspensos na vacina de Influenza é capaz de causar alterações comportamentais em parâmetros ligados à ansiedade no LCE na prole em idade adulta se administrado durante a gestação em E16 e que o resveratrol administrado foi capaz de reverter parcialmente estas alterações.

## 8. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. A. de A.; MACEDO, F. de S.; ABDON, A. P. V.; CAMPOS, A. R. **Ansiolíticos e antidepressivos dispensados na Atenção Básica: análise de custos e interações medicamentosas.** *Jornal Brasileiro de Economia da Saúde (Impr.)*; 8(2): 99-107, ago. 2016.
- ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula** [recurso eletrônico] ; tradução: [Ardala Elisa Breda Andrade ... et al.] ; revisão técnica: Ardala Elisa Breda Andrade, Cristiano Valim Bizarro, Gaby Renard. – 6. ed., cap. 15 – Porto Alegre : Artmed, 2017.
- ALLSWEDE D. M., BUKA S. L., YOLKEN R. H., TORREY E. F., CANNON T. D.. **Elevated maternal cytokine levels at birth and risk for psychosis in adult offspring.** *Schizophr res* 172:41-45. 2016.
- BAMBINI-JUNIOR, V., ZANATTA, G., DELLA FLORA NUNES, G., MUELLER de MELLO, G., MICHELS, M., FONTES-DUTRA, M., GOTTFRIED, C. **Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid.** *Neuroscience Letters*, 583, 176–181. 2014.
- BROWN A. S., HOOTON J., SCHAEFER C. A., ZHANG H., PETKOVA E., BABULAS V., PERRIN M., GORMAN J. M., SUSSER E. S.. **Elevated maternal interleukin-8 levels and risk of schizophrenia in adult offspring.** *Am j psychiatry* 161: 889-895. 2004.
- BOULANGER-BERTOLUS, J., PANCARO, C., MASHOUR, G.A. **Increasing Role of maternal immune activation in neurodevelopmental disorders.** *Front. Behav. Neurosci.* 12:230. 2018
- CAREY, G.; GORMEZOGLU, M.; de JONG J.J.A.; HOFMAN P.A.M.; BACKES W.H.; DUJARDIN, K.; LEENTJENS, A.F.G. **Neuroimaging of Anxiety in Parkinson's Disease: A Systematic Review.** *Movement Disorders.* 2021 Feb; 36(2):327-339. 2021.
- CHESS S. 1971. **Autism in children with congenital rubella.** *J Autism Child Schizophr* 1:33–47.
- CRUZ, A. P. M. & LANDEIRA-FERNANDEZ, J. **Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas.** *Métodos em Neurociências.* São Paulo, Manole: 192-217. 2012.

CSISZAR, A. **Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease.** Annals of the New York Academy of Sciences, 1215: 117-122. 2011

DARBY, J.R.T.; MOHD DOLLAH, M.H.B.; REGNAULT, T.R.H.; WILLIAMS, M.T.; MORRISON, J.L. **Systematic review: Impact of resveratrol exposure during pregnancy on maternal and fetal outcomes in animal models of human pregnancy complications-Are we ready for the clinic?** Pharmacol Res. Jun;144:264-278. 2019.

DAVIES, G., WELHAM, J., CHANT, D., TORREY, E.F., MCGRATH, J. **A systematic review and meta-analysis of northern hemisphere season of birth studies in schizophrenia.** Schizophr bull. 2003;29(3):587-93.

DAZ-GEREVINI, G.T., REPOSSI, G., DAIN, A., TARRES, M.C., DAS, U.N., EYNARD, A.R. **Beneficial action of resveratrol: How and why?**, Nutrition. 2015.

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

DUARTE, R. M. F. (2019). **Estudo dos efeitos da ativação imunológica materna em camundongos provocada pela vacina A (H1N1) e o efeito neuroprotetor do resveratrol sobre os prejuízos comportamentais relacionados à ansiedade, depressão, sociabilidade e memória na prole em idade adulta.** 2019. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

DUMONT, U. et al. **Neuroprotective Effect of Maternal Resveratrol Supplementation in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia.** Frontiers in neuroscience, vol. 14. 2021.

FAUSTINO, T.T.; ALMEIDA, R.B.; ANDREATINI, R. **Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados.** Revista Brasileira de Psiquiatria. 32 Suppl 4:429–36. 2010

GONZALEZ-PEREZ, O.; JAUREGUI-HUERTA, F., GALVEAS-CONTRERAS, A.Y. **Immune system modulates the function of adult neural stem cells.** Curr Immunol Rev. Aug 1;6(3):167-173. 2010.

JIANG HY, XU LL, SHAO L, XIA RM, YU ZH, LING ZX, YANG F, DENG M, RUAN B. **Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis.** Brain behav immun. 2016;58:165-72

KALISH, B.T., KIM, E., FINANDER, B., DUFFY, E.E., KIM, H., GILMAN, C.K., YIM, Y.S., TONG, L., KAUFMAN, R.J., GRIFFITH, E.C., CHOI, G.B., GREENBERG, M.E., HUH, J.R. **Maternal immune activation in mice disrupts proteostasis in the fetal brain.** Nature Neuroscience. Feb;24(2):204-213. 2021.

KNUESEL, I., CHICHA, L., BRITSCHGI, M., SCHOBEL, S.A., BODMER, M., HELLINGS, J.A., TOOVEY, S., PRINSSSEN, E.P. **Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders.** Nat rev neurol 10:643–660. 2014.

KRAEUTER A.K., GUEST P.C., SARNYAI Z. **The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior.** Methods Mol Biol. 1916:99-10. 2019.

MARGIS, R., PICON, P., COSNER, A. F., SILVEIRA, R. de O. **Relação entre estressores, estresse e ansiedade.** Revista De Psiquiatria Do Rio Grande Do Sul, 25, 65–74. 2003.

LANGMAN. **Embriologia médica** / T. W. Sadler ; revisão técnica Estela Bevilacqua. 14. ed., Cap. 6 - Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2021.

NAKATA R., TAKAHASHI S., INOUE H. **Recent advances in the study on resveratrol.** Biol. Pharm. Bull. 35(3) 273-279. 2012.

PAHO. **The burden of mental disorders in the Region of the Americas, 2000-2019.** Pan American Health Organization, 2021.

PATEL, K.R., SCOTT, E., BROWN, V.A., GESCHER, A.J., STEWARD, W.P., BROWN, K. **Clinical trials of resveratrol.** Annals of the New York Academy of Sciences, 1215: 161-169. 2011

PINTO, W. B. V. R., KO G. M., VALERO-LAPCHIK, V. B., ARIZA C. B., PORCIONATTO, M.. **Teste de Labirinto em Cruz Elevado: Aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais.** RESBCAL, São Paulo, v.1 n.1, p. 102-120, jan./fev./mar. 2012.

PLOEGER A, RAIJMAKERS ME, VAN DER MAAS HL, GALIS F. **The association between autism and errors in early embryogenesis: what is the causal mechanism?** *Biol psychiatry*. 2010;67(7):602-7.

RAHMAN, Md H., AKTER, R., BATTACHARYA, T., ABDEL-DAIM, M. M., ALKAHTANI, S., ARAFAH, M. W., AL-JOHANI, N. S., ALHOSHANI, N. M., ALKEIRAISHAN N., ALHENAKY A., ABD-ELKADER, O. H., EL-SEEDI H. R., KAUSHIK, D., MITTAL, V.. **Resveratrol and Neuroprotection: Impact and Its Therapeutic Potential in Alzheimer's Disease.** *Frontiers in pharmacology*, vol. 11.

RODRIGUES, M. S. **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.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2023.

SCHMATZ, R., MAZZANTI, C. M., SPANEVELLO, R., STEFANELLO, N., GUTIERRES, J., CORRÊA, M., MORSCH, V. M. **Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats.** *European Journal of Pharmacology*, 610(1-3), 42–48. 2009

SIEMANN, E.H., CREASY, L.L. **Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine.** *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 49—52. 1992.

SILVA, R. H., FRUSSA-FILHO, R. **The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory–anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine.** *Journal of Neuroscience Methods*, 102(2), 117–125. 2000.

SOLEAS, G. J., DIAMANDIS, E. P., GOLDBERG, D. M. **Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone?** *Clinical Biochemistry*, 30(2), 91–113. 1997.

SOLEK, C. M. , FAROOQI N., VERLY M., LIM T. K., RUTHAZER E. S. **Maternal Immune Activation in Neurodevelopmental Disorders.** *Developmental Dynamics*. 247:588–619. 2018.

SPINI, V. B. M. G., FERREIRA, F. R., GOMES, A. O., DUARTE, R. M. F., OLIVEIRA, V. H. S., COSTA, N. B., FERREIRA, A. F. F., DOURADO, M. P. B., RIBEIRO-BARBOSA, E. R. **Maternal Immune Activation with H1N1 or Toxoplasma gondii Antigens Induces Behavioral Impairments Associated with Mood Disorders in Rodents.** *Neuropsychobiology*, 1–8. 2020.

TIZARD, I. **Imunologia veterinária**; revisão científica e tradução Maristela Martins de Camargo, Renata Scavone. - 10. ed., cap. 34 - Rio de Janeiro: GEN | Grupo Editorial Nacional. Publicado pelo selo Editora Guanabara Koogan Ltda. 2023.

URAKUBO A., JARSKOG L.F., LIEBERMAN J.A., GILMORE J.H.. **Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid and fetal brain.** *Schizophr res.* 47:27-36. 2001.

WHO. **World mental health report: transforming mental health for all.** Geneva: World Health Organization; 2022.