

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS BAIXADA SANTISTA

LUCAS EMANUEL OLIVEIRA CARVALHO

**ANÁLISE DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO
AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE AS
ALTERAÇÕES DO METABOLISMO
DESENCADEADAS PELO ESTRESSE NEONATAL
EM RATOS WISTAR**

SANTOS

2018

LUCAS EMANUEL OLIVEIRA CARVALHO

**ANÁLISE DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO
AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE AS
ALTERAÇÕES DO METABOLISMO
DESENCADEADAS PELO ESTRESSE NEONATAL
EM RATOS WISTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de São Paulo como parte dos requisitos curriculares para obtenção do título de bacharel em Educação Física – Modalidade Saúde.

Orientador: Glauca de Castro Champion

Santos

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais Valéria e José Carlos, minha irmã Raquel, minha irmã do coração Ana, minha vó Teresa, meus sobrinhos Bernardo e Abraão, meus tios Bebel e Rai, a Professora Glaucia e ao Gabriel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço todo o tempo que orientadora Gláucia se dispôs a me ajudar e me orientar em cada item deste trabalho, desde a idealização do projeto em 2015 até a finalização do mesmo nos “45 do segundo tempo” em 2018.

Agradeço a professora Hanna Karen por todo o carinho, todo suporte e todos os conselhos em todos estes anos de graduação.

Agradeço ainda as professoras Carolina e Luciana pela parceria durante anos e anos de monitoria de histologia e todo o suporte em todos os meus outros projetos na universidade.

Agradeço a minha família pelo carinho e suporte que me deram em todos esses anos de realização deste trabalho e em toda a graduação por todo o amor que recebi dia a dia, por todos os momentos que me aguentaram estressado e cansado, em especial ao meu pai que me deu suporte durante toda a graduação não deixando me faltar nada que eu precisasse e a minha mãe que me deu todo o conforto todos os dias em que eu chegava em casa exausto.

Não posso deixar de agradecer ao Gabriel por todos os dias que ficou me esperando terminar meus experimentos no corredor, todo os dias que me aturou estressado para terminar as coisas a tempo e todo o carinho que me deu durante todo o tempo de realização deste trabalho.

Encerro agradecendo imensamente a FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

EPIGRAFE

“Desculpem-me os fracassados e 'haters', mas o meu QI é um dos mais altos — e vocês sabem disso. Por favor, não se sintam estúpidos ou inseguros, a culpa não é de vocês”

Donald J. Trump

RESUMO

Atualmente numerosos estudos fornecem evidências de que distúrbios psiquiátricos, metabólicos, cardíaca e imunológica, tem sua gênese determinada pelo estresse neonatal. O estresse neonatal mediado pela ativação do eixo Hipotalâmico-Pituitária-Adrenal (HPA) promove alterações nas estruturas do sistema límbico, especialmente no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal. Em face às evidências de que durante os períodos perinatais a criança é um campo aberto aos diversos tipos de estímulos ambientais, hipotetizamos que os efeitos deletérios provenientes da negligência neonatal, podem ser revertidos ou atenuados com a estimulação em ambiente enriquecido (AE). O AE é especialmente planejado para estimular, as atividades sensoriais, motoras, cognitivas e de interação social entre os animais, gerando uma melhora na aprendizagem espacial, na memória e no comportamento social. O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da exposição ao ambiente enriquecido em animais submetidos ao estresse neonatal. Para tanto, foram utilizadas fêmeas Wistar prenhes, provenientes do CEDEME e após 48 horas do nascimento da prole, foram distribuídas em três grupos diferentes: controle (CTL), estresse (ES) e estresse com exposição ao ambiente enriquecido (EAE). Os animais foram pesados de dois em dois dias e foram realizados testes de atividade (actimetria), teste de campo aberto e teste de tolerância a insulina. Após a eutanásia, foram realizadas análises de perfil lipídico, análise de proteínas e gorduras de carcaça. Os testes de atividade e comportamento mostraram maior locomoção, número de cruzamentos e levantamentos dos grupos estresse e estresse AE em comparação com o grupo controle. Nossos resultados mostraram que os animais do grupo STR apresenta maior massa corpórea e o grupo STRAE o menor índice na comparação entre os grupos experimentais. A análise do perfil lipídico demonstrou que os grupos submetidos ao estresse neonatal (ES e EAE) apresentaram maiores níveis de colesterol total e LDL (lipoproteína de baixa densidade) em relação ao grupo CTL, evidenciando que o estresse tem efeitos sobre a alteração do perfil lipídico dos animais. Consistente com os resultados obtidos na massa corpórea e perfil lipídico, verificou-se que o grupo STR apresentar maior percentual de gordura em relação ao grupo estresse AE. A partir dos dados analisados, concluímos que o estresse promoveu alterações sobre o perfil lipídico, a locomoção, o comportamento e a composição corporal dos animais.

Palavras chave: estresse; corticosterona; ambiente enriquecido.

ABSTRACT

Numerous studies now provide evidence that psychiatric, metabolic, cardiac, and immunological disorders have their genesis determined by neonatal stress. Neonatal stress mediated by activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis promotes changes in limbic system structures, especially in the hippocampus, amygdala and prefrontal cortex. In the face of the evidence that during the perinatal periods the child is an open field to the different types of environmental stimuli, we hypothesize that the deleterious effects of neonatal neglect can be reversed or attenuated with stimulation in the enriched environment. The AE is specially designed to stimulate sensory, motor, cognitive and social interaction activities among animals, generating an improvement in spatial learning, memory and social behavior. The objective of the present study was to investigate the effects of exposure to enriched environment in animals submitted to neonatal stress. In order to do so, pregnant Wistar females were used, from CEDEME and after 48 hours of offspring birth, were divided into three groups: control (CTL), stress (STR) and stress with exposure to the enriched environment (STREE). The animals were weighed every two days and activity tests (actimetry), open field test and insulin tolerance test were performed. After euthanasia, analyzes of lipid profile, protein analysis and carcass fat were carried out. The tests of activity and behavior showed greater locomotion, number of crosses and surveys of the groups stress and AE stress in comparison with the control group. Our results showed that the animals in the STR group had a higher body mass and the STRAE group had the lowest acquisition index among the experimental groups. The analysis of the lipid profile showed that the groups submitted to neonatal stress (STR and STRAE) presented higher levels of total cholesterol and LDL (low density lipoprotein) compared to the CTL group, showing that stress has effects on the alteration of the lipid profile of the animals. Consistent with the results obtained in the body mass and lipid profile, it was verified that the STR group presented a higher percentage of fat in relation to the AE stress group. From the data analyzed, we conclude that stress promoted changes on the lipid profile, locomotion, behavior and body composition of the animals.

Keywords: stress; corticosterone; enriched environment.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 – Estresse	8
1.2 – Eixo HPA.....	9
1.3 – Ambiente Enriquecido.....	11
1.4 – Justificativa.....	11
1.5 – Objetivos.....	12
2.0 – MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1 - Animais	13
2.1.1 - Ratas Prenhes	13
2.2 Modelo de estresse – protocolo experimental e grupos experimentais	14
2.2.1 Grupo Controle(CT).....	14
2.2.2 Grupo Estresse (ES).....	14
2.2.3 Grupo Estresse Exposto ao AE (EAE).....	14
2.3 - Indicadores de Crescimento Somático (massa corpórea).....	15
2.4 - Teste Com o Actímetro	15
2.5 - Teste Campo Aberto (TCA).....	15
2.6 – Avaliação Metabólica.....	15
2.7 – Extração do Conteúdo Total de Lipídeos e Dosagem de Proteínas da Carcaça	16
2.7.1 - Dosagem de proteínas da carcaça	16
2.8 - Análise Estatística	16
3.0 RESULTADOS	17
4.0 DISCUSSÃO	22
5.0 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
Anexo 1	28

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Estresse

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os maus tratos a criança se caracterizam como o abuso e a negligência infligidos em menores de 18 anos, incluindo todos os tipos de abuso físico e emocional (OMS, 2016). Os maus tratos a criança têm sido e constituem um fenômeno complexo que não tem distinção de classes, raça, religião, idade ou nível educacional, e pode resultar em consequências que acometem a saúde física e mental da criança posteriormente, na sua vida adulta (TOFOLLI *et al.*, 2011).

Negligência e todo o tipo de abuso desencadeiam estresse, cujo efeito são distúrbios no desenvolvimento de forma geral (OMS, 2016). Estudos sobre os efeitos do estresse têm mostrado que ambientes adversos durante o período de desenvolvimento fetal e neonatal podem modular permanentemente a fisiologia e o metabolismo da criança, aumentando o risco de doenças na vida adulta (LAI *et al.*, 2010; XIONG *et al.*, 2012).

Em humanos, uma variedade de fatores de risco sócioambientais para a saúde mental tem sido associada com mudanças duradouras na reatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), incluindo maus tratos na infância e exclusão social, mas pouco se sabe sobre a especificidade de diferentes estressores psicossociais (TOST *et al.*, 2015).

Situações de estresse na infância ainda estão associadas a uma elevada resposta inflamatória, encurtamento dos telômeros, reativação do vírus da herpes e uma baixa resposta a tumores imunogênicos. Durante períodos sensíveis do desenvolvimento, eventos estressores podem ainda aumentar a propensão e a ocorrência de doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, obesidade, entre outros (FAGUNDES *et al.*, 2013).

Sendo o estresse durante a infância sendo um fator de risco para inúmeras doenças, é importante que se estude os mecanismos neurobiológicos que possam sugerir algumas intervenções terapêuticas. Trabalhos com humanos exigem possuem limitações éticas e surge a necessidade de se trabalhar com modelos animais (MURTHY & GOULD, 2018).

A resposta fisiológica ao estresse agudo é crucial para a sobrevivência em situações de risco. Contudo, uma falha em resolver a estas situações de estresse pode criar um efeito deletério, levando o indivíduo a uma condição de vulnerabilidade e maiores riscos de transtornos de humor (MÉNARD *et al.*, 2016).

A exposição crônica da criança às situações de estresse pode levar a uma ativação persistente do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), o que leva a uma produção aumentada e prolongada do fator liberador de corticotrofina (CRF), cortisol e catecolaminas (DIELEMAN *et al.*, 2015).

1.2 – Eixo HPA

O hipotálamo é o grande centro de controle da homeostase. Essa pequena área do cérebro possui circuitos neurais altamente conservados, que controlam as funções básicas da vida, incluindo o metabolismo energético, termorregulação, balanço eletrolítico, controle do ritmo circadiano e respostas emergenciais a situações de estresse (SAPER *et al.*, 2014).

O eixo HPA, composto pelo hipotálamo, a hipófise e o córtex da glândula suprarrenal, em um conjunto complexo de interações mediam a resposta ao estresse por meio da ação de glicocorticoides (XIONG *et al.*, 2012). O núcleo paraventricular do hipotálamo sintetiza o fator liberador de corticotrofina (CRF) e o hormônio antidiurético (ADH), que são secretados e estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise, que por sua vez estimula a síntese de glicocorticoides, principalmente o cortisol, em humanos e corticosterona em murinos, pela zona fasciculada da glândula suprarrenal. A ligação dos glicocorticoides com seus receptores diminuem a produção de CRF e ACTH por um ciclo de feedback negativo (QUAX *et al.*, 2013; MOISLADIS *et al.*, 2014).

A ativação do eixo HPA ao estresse gera respostas agudas adaptativas, mas respostas prolongadas ou crônicas podem causar efeitos deletérios no organismo como a reprogramação do córtex pré-frontal e do sistema límbico, neuroplasticidade, funções neuroendócrinas e resposta comportamental a agentes estressores (TOFOLLI *et al.*, 2011). Estudos com animais têm mostrado que o estresse pré-natal pode alterar as funções do eixo HPA e de estruturas cerebrais na prole (GLOVER *et al.*, 2010).

Por outro lado, a ativação do eixo HPA facilita a adaptação bem-sucedida do organismo às ameaças iminentes, assim altera as prioridades fisiológicas de alimentação e reprodução, por exemplo, para funções de apoio a comportamentos defensivos, como suprimento de energia, perfusão, ventilação e cognição (TOST *et al.*, 2015). Glicocorticoides são hormônios esteroides e são o produto final do eixo HPA, que regula a resposta ao estresse. Receptores de glicocorticoides estão expressos abundantemente no hipocampo e implicam no processo de adaptação ao estresse. Em resposta à ativação dos receptores de glicocorticoides fontes de energia são realocadas em preparação para futuros eventos e recuperação dos sistemas (DASKALAKIS *et al.*, 2015).

Níveis de cortisol são altos durante a manhã e gradualmente diminuem durante o dia, com os menores níveis durante a noite. O ritmo circadiano de secreção de cortisol é importante para a regulação de vários processos do corpo humano e mudanças nesse ritmo estão atribuídas ao estresse crônico, que pode levar ao desenvolvimento de sintomas de hipercortisolismo crônico, obesidade abdominal e resistência à insulina (QUAX *et al.*, 2013).

Na vida intrauterina, os glicocorticoides ainda podem afetar sistemas que regulam o crescimento fetal, incluindo a inibição de fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGF) (MOISLADIS *et al.*, 2014). Os glicocorticoides têm um papel importante na regulação do metabolismo, pressão arterial, funções do sistema imune, resposta adaptativa tanto fisiológica quanto psicológica ao estresse e, em excesso, exercem múltiplos efeitos no metabolismo, induzindo obesidade visceral, hipertensão arterial sistêmica, resistência à insulina com diminuição a tolerância à glicose e dislipidemia. Essas complicações configuram uma condição de síndrome metabólica que desempenha um papel importante no aumento de riscos de doenças cardiovasculares (PIVONELLO *et al.*, 2016; QUAX *et al.*, 2013).

Uma vida estressante, com exposição crônica à situações estressantes, por exemplo, está relacionado com o ganho de peso, principalmente em homens. Fisiologicamente, o aumento da concentração de cortisol está relacionado ao acúmulo de gordura e ganho de peso, pois os glicocorticoides promovem a conversão de pré-adipócitos em adipócitos maduros (RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Em humanos, elevados níveis de glicocorticoides ainda estão associados com diminuição da cognição, diminuição da flexibilidade mental e na rapidez de processamento (MOISLADIS *et al.*, 2014).

De forma aguda, o cortisol produz uma resposta anti-inflamatória. Entretanto, cronicamente, altos níveis de cortisol podem levar a uma resistência a resposta dos glicocorticoides. Essa resistência permite que as células do sistema imune produzam citocinas pró-inflamatórias, elevando a inflamação (FAGUNDES *et al.*, 2013).

A atividade física e o exercício físico podem promover mudanças positivas na saúde mental e no bem-estar de indivíduos que sofrem estresse crônico (STULTS-KOLEHMAINEN & SINHA, 2014). Um modelo experimental que pode simular a atividade física espontânea é o Ambiente Enriquecido.

1.3 – Ambiente Enriquecido

O termo ambiente enriquecido (AE) é utilizado para descrever um ambiente caracterizado pela presença brinquedos, tuneis, roda de atividades e planejado para promover interação social, estimulação física e sensorial (CLEMENSON et al., 2015).

É um ambiente preparado para estimular o desenvolvimento cognitivo e motor dos animais e promover interação social, de forma que os animais alojados em AE estão expostos a um ambiente que favorece a atividade física quando comparado as condições padrões de alojamento (MANIAM *et al.*; 2014).

Alguns estudos já evidenciaram o papel do AE em induzir efeitos duradouros no sistema nervoso e no comportamento dos animais, incluindo melhoras no aprendizado, memória e diminuindo o vício em drogas ou comportamentos depressivos (CAO et al., 2014) e diminuição da ansiedade (CROFTON et al., 2015). A exposição ao AE está associada a maiores níveis do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), proporcionando melhora na cognição destes animais. (KOTLOSKI & SUTULA, 2015).

Vários experimentos vêm sendo realizados mostrando a eficácia do AE em promover melhoras metabólicas, endócrinas e também estruturais no sistema nervoso central dos animais (RAMPON et al, 2016), além de promover maior aumento de atividade física espontânea, que é realizada de forma livre, sem motivação (BRENES et al. 2008; KOTZ *et al.*, 2017) .

1.4 – Justificativa

Os maus tratos as crianças, incluindo negligência e toda forma de abuso prevalecem em cerca de 12,5% das crianças (TIETJEN, G. E. et al, 2016). Partindo das evidências de que o abuso e a negligência podem causar alterações permanentes no eixo HPA e essas alterações estão associadas a fatores de risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e obesidade, é essencial entender as correlações fisiológicas, metabólicas e quais as consequências da exposição crônica a um ambiente de estresse que irão perdurar por toda a vida (RODRIGUEZ *et al.*, 2015).

O custo total associado com o estresse precoce, segundo o National Comorbidity Survey Replication, passa de bilhões de dólares, colocando-o perto do custo associado à todos os tipos de câncer combinados. Partindo deste ponto, é essencial entender os efeitos do estresse e suas repercussões no metabolismo para que programas sociais possam ser elaborados de forma a minimizar esses impactos na primeira infância e capacitar profissionais da área da saúde para que possam lidar da melhor maneira no seu campo de trabalho com populações que tenham evidenciado

uma vida coberta de adversidades durante a infância, além de utilizar a atividade física como uma terapia não farmacológica para diminuir os efeitos do estresse.

Durante a graduação do pesquisador, houve interesse pela área de Neuroimunologia, e sabendo de um projeto em que se desenvolvia um modelo experimental de negligência materna, houve grande interesse e o pesquisador julgou ser um projeto importante para que possa contribuir com novas descobertas para o meio científico.

Frente ao exposto, a problemática do estudo é: qual o papel do AE em atenuar os efeitos deletérios provenientes do estresse neonatal e suas consequências no metabolismo de ratos Wistar?

1.5 – Objetivos

O objetivo deste projeto foi verificar por meio de testes de tolerância a insulina, quantificação de proteínas e lipídeos totais quais as alterações metabólicas provenientes da exposição ao ambiente estressor, e a partir destes resultados, qual o papel do efeito do AE como forma de atenuar os efeitos do estresse pós-natal por meio do uso livre a roda de atividades e estimulação sensorial.

2.0 – MATERIAIS E MÉTODOS

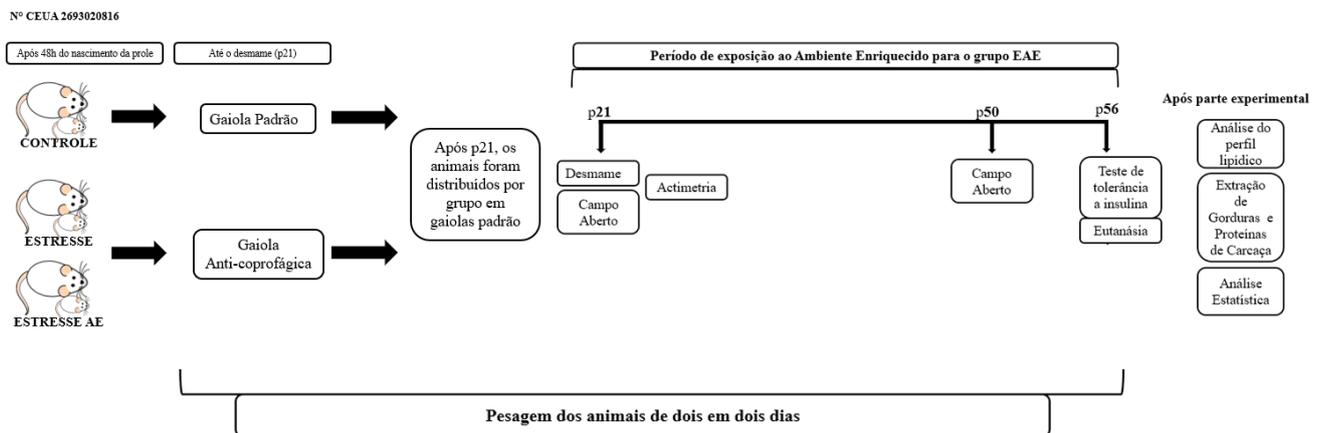


Figura 1 – Desenho experimental da metodologia

2.1 - Animais

Ratas fêmeas Wistar, com seis meses de vida e aproximadamente 250 gramas, provenientes do CEDEME/UNIFESP, foram mantidas a temperatura de 20 a 22°, em ciclo de 12/12h de claro-escuro, com água e comida *ad libitum* no biotério do Departamento de Biociências da Unifesp/Campus Baixada Santista.

Os protocolos de experimentos foram elaborados de acordo com os princípios éticos de experimentação com animais, adotados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unifesp sob número 2693020816.

2.1.1 - Ratas Prenhes

Para aclimação do operador, as ratas prenhes foram manipuladas diariamente por um período de 3-8 minutos, até o nascimento dos filhotes, quando então os animais foram distribuídos nos diferentes grupos experimentais.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no período entre 8h e 14h com objetivo de minimizar a variabilidade associada à resposta ao estresse. Todas as proles foram reduzidas a oito filhotes imediatamente após a verificação do nascimento para evitar a ocorrência de desnutrição, por decapitação. As mães e respectivas proles foram distribuídas aleatoriamente nos diferentes grupos:

Grupo 1: Controle (foram mantidos em gaiola padrão durante os 56 dias de experimento);

Grupo 2: Estresse (foram mantidos em gaiola anti-coprofágica, no período de 21 dias até o período de desmame e posteriormente mantidos em gaiola padrão até a eutanásia no dia 56). A gaiola anti-coprofágica possui uma divisão que separa os animais de fezes e urina, impedindo-os de se alimentar disto. Ao invés da maravalha, foi utilizada uma folha de papel toalha como forragem, sendo trocada a cada dois dias. O papel toalha será picado pelas mães e utilizado na tentativa de montagem de um ninho.

Grupo 3: Estresse com exposição ao AE (foram mantidos em gaiola anti-coprofágica no período de 21 dias até o desmame, mantidos em gaiola padrão até o 56º dia e, em seguida, expostos ao ambiente enriquecido uma vez ao dia por uma hora).

2.2 Modelo de estresse

As mães e respectivas proles foram distribuídas nos Grupos Experimentais e mantidas nas condições abaixo descritas até o período de desmame, que ocorreu aos 21 dias de vida (P21). Foram utilizados 4 machos no grupo CTL, 5 machos no grupo ES e 6 machos no grupo EAE. As ninhadas apresentaram um número reduzido de fêmeas, por essa razão seus dados não foram utilizados neste estudo.

2.2.1 Grupo Controle (CTL)

A mãe e sua respectiva prole foram mantidas em gaiolas comuns com maravalha trocada, a cada dois dias.

2.2.2 Grupo Estresse (ES)

No terceiro dia pós-natal (P3), a mãe e sua respectiva prole foram colocadas em gaiola anti-coprofágica (Insight – Ribeirão Preto/SP). Ao invés da maravalha foi utilizada uma folha de papel toalha como forragem, que foi trocada a cada dois dias. O papel toalha foi picado pelas mães e utilizado na tentativa de montagem de um ninho, sem sucesso.

2.2.3 Grupo Estresse Exposto ao AE (EAE)

No terceiro dia pós-natal (P3), a mãe e sua respectiva prole foram colocadas em gaiola anti-coprofágica (Insight – Ribeirão Preto/SP). Ao invés da maravalha foi utilizada uma folha de papel toalha como forragem, que foi trocada a cada dois dias. Após o período de desmame (21 dias após o nascimento) os animais foram submetidos ao AE por 35 dias, até o 56º dia.

As sessões de ambiente enriquecido consistiam na colocação dos animais em uma gaiola com três pavimentos, equipada com rampas, escadas, rede, material para nidificação e

roda para exercício pelo período de uma hora diariamente. A cada sessão foram adicionados novos brinquedos coloridos, variadas formas, pesos, texturas e tamanhos, sendo que a maioria emitia sons quando manipulados a fim de estimular sensorialmente os animais. Os brinquedos foram alterados a cada sessão, para que o estímulo não seja incorporado ao ambiente.

2.3 - Indicadores de Crescimento Somático (massa corpórea)

Como indicador do crescimento somático, a massa corpórea foi avaliada, sendo aferida a cada dois dias em balança digital (Marte, modelo S-100 com sensibilidade de 0.01g) a fim de estabelecer a evolução ponderal dos grupos experimentais durante o período de aleitamento e pós desmame.

2.4 - Teste Com o Actímetro

Foi realizado em p21. O registro da atividade física foi realizado individualmente, onde utilizamos o equipamento Acti-track v2713 - Harvard Apparatus (Barcelona, Espanha), que é composto por uma moldura quadrada (25 x 25 cm) que envolve uma gaiola de acrílico. Dois dos lados dessa moldura possuem 16 emissores de raios infravermelho cada, separados uns dos outros por 1,3 cm, e os dois lados opostos detectam esses raios, de forma que a atividade física é registrada nos eixos x e y. Esse sistema forneceu a contagem total (cada vez que um raio infravermelho é interrompido) e contagem ambulatória (cada vez que um novo raio infravermelho é interrompido). A atividade física foi registrada durante 24 horas consecutivas apenas uma vez.

2.5 - Teste Campo Aberto (TCA)

Foi realizado em P21 e P50. Neste teste foram quantificados os números de cruzamentos e número de levantamentos. Tem o objetivo de avaliar, a locomoção de animais e a atividade exploratória. Os animais foram colocados no centro da arena e expostos, individualmente, por 5 minutos e registrados por uma filmadora. Após a realização de cada teste foi realizada a limpeza da arena com álcool 70%.

2.6 – Avaliação Metabólica

Em P56 os animais encontravam-se em jejum de 10 horas e então foram submetidos à anestesia conforme descrito, e o sangue foi coletado por via transcardíaca.. Para avaliação metabólica, após a dosagem da glicose basal, foi aplicada a insulina (2 U/Kg, I.P. - Biohulin) e realizada a coleta de sangue da cauda nos tempos de 4, 8, 12 e 16 minutos.

2.7 – Extração do Conteúdo Total de Lipídeos e Dosagem de Proteínas da Carcaça

O conteúdo total de lipídios foi extraído conforme descrito por Stansbie e colaboradores (1976) e quantificado através do método gravimétrico (Oller do Nascimento e Williamson, 1986). As carcaças foram autoclavadas a 120° C por 180 minutos e homogeneizadas com o dobro do peso da água. Duplicadas da mistura (aproximadamente 3 g) foram digeridas em tubos de vidro hermeticamente fechados com 3ml de KOH 30% por 15 minutos a 70°C, em seguida acrescidos 3,0ml de etanol absoluto por mais 2 horas. Após o resfriamento, 2ml de H₂SO₄ 12N foram adicionados e o conteúdo dos tubos homogeneizados. A seguir, a mistura foi lavada três vezes por 10 minutos cada utilizando-se éter de petróleo (Synth) e centrifugada por 2 minutos a 2.000 rpm, para decantação dos detritos de tecido. O sobrenadante, contendo os lipídios totais diluídos no éter de petróleo, foi transferido para tubos de vidro cujos pesos serão previamente aferidos em balança analítica. Após total evaporação do solvente, em capela de exaustão à temperatura ambiente, o peso dos frascos contendo os lipídios da carcaça foram aferidos. O peso da gordura foi obtido subtraindo-se o peso do frasco contendo os lipídios do peso dos frascos vazios, multiplicado pela diluição. Os resultados serão expressos em g de lipídios\100 g da carcaça.

2.7.1 - Dosagem de proteínas da carcaça

Foi utilizado o método descrito por Lowry e colaboradores (1951). Em síntese, alíquotas em triplicata do mesmo homogeneizado (aproximadamente 1 g) da carcaça foram aquecidos a 37°C por 1 hora em 0.6 N KOH sob agitação constante. Após clarificação por centrifugação, o conteúdo de proteína foi medido espectrofotometricamente, através da reação colorimétrica com o uso Bradford assay (Bio-rad, Hercules, Califórnia). Uma curva de concentração de albumina foi utilizada como fator de ajuste. Os resultados serão expressos em g de proteína\100 g carcaça.

2.8 - Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. A comparação da massa corpórea entre os grupos foi realizada através da análise de variância de dois fatores fixos (ANOVA de Duas Vias) de medidas repetidas, seguido por comparação múltipla pelo teste pos hoc de Tukey. Os dados foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparação múltipla pelo teste de Dunn. O intervalo de confiança adotado foi de 95%, considerando significativos valores com $p < 0,05$.

3.0 RESULTADOS

No presente trabalho, nós avaliamos as consequências da exposição ao estresse neonatal sobre o comportamento e parâmetros metabólicos do metabolismo lipídico de ratos wistar e os efeitos da exposição do AE sobre estes parâmetros.

Os animais foram pesados a cada dois a partir do terceiro dia de nascimento dos filhotes. No último dia de avaliação, o grupo estresse apresentou maior massa corpórea em relação ao grupo controle, bem como quando comparado ao grupo estresse AE(Figura 2).

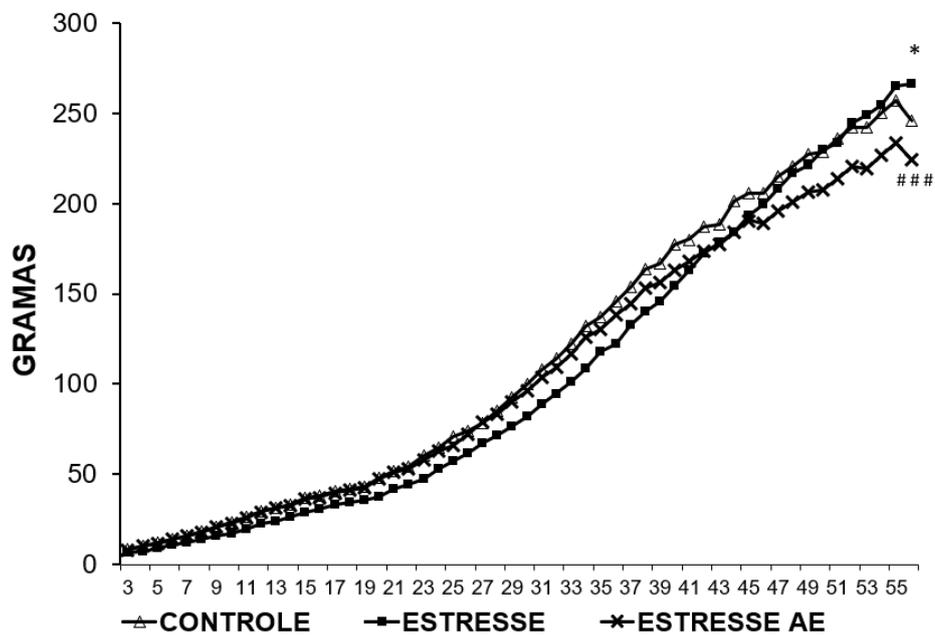


Figura 2 –

Figura 2 -Figura representando a massa corpórea dos animais durante 56 dias. O grupo estresse apresentou resultados significativamente maiores em relação ao grupo controle ($p \leq 0.03$) e em relação ao grupo estresse AE ($p \leq 0.0001$).

A Figura 3 representa o teste de atividade total, que foi realizado em p21, a fim de avaliar se o estresse tem algum efeito sobre a locomoção dos animais. Observamos que os resultados do teste não se mostram significantes quando avaliamos o ciclo claro dos animais que corresponde o período entre sete e 19 horas. Entretanto, quando avaliado apenas o ciclo escuro, período correspondente entre 19 e sete horas, observou-se que esses animais apresentam atividade mais elevada.

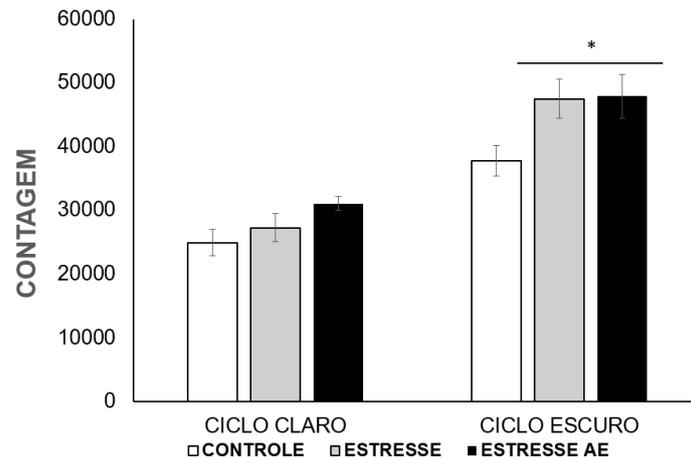


Figura 3 - Figura representando o teste de atividade realizado em p21. Sem significância estatística no ciclo claro. No ciclo escuro, grupos Estresse e Estresse AE apresentaram resultados significativamente maiores em relação ao controle ($p \leq 0.03$).

O teste comportamental de campo aberto representado pela Figura 4, foi realizado em duas situações diferentes: no 21º dia de vida dos animais e no 50º dia de vida dos animais. Foram observados apenas os levantamentos e os cruzamentos como forma de avaliar a locomoção dos animais e os níveis de ansiedade. Os levantamentos mostraram que os grupos estressados apresentaram números significativamente maiores em relação ao grupo controle em ambos os dias de teste (p21 e p50).

Os dados da pesquisa mostram que em relação aos cruzamentos, os animais de ambos os grupos estressados apresentaram resultados maiores em relação ao grupo controle em p21, e em p50 o grupo estresse apresentou maiores resultados em comparação ao grupo estresse ambiente enriquecido.

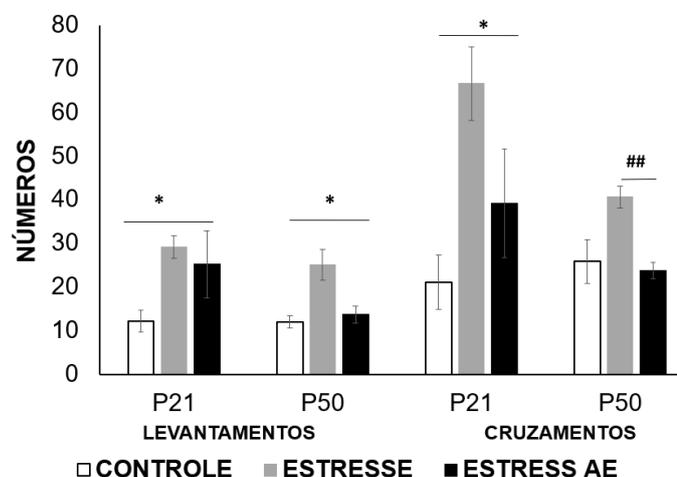


Figura 4 –Figura representando o teste comportamental de campo aberto, realizado em p21 e p50. Levantamentos mostraram resultados significativos em p21 e p50 entre estresse e estresse AE

comparado ao controle ($p \leq 0.04$). Cruzamentos mostraram resultados significativos entre estresse e estresse AE comparado ao controle ($p \leq 0.04$) e entre estresse e estresse ambiente enriquecido em p50 ($p \leq 0.04$).

O teste de tolerância a insulina foi realizado em p56 antes da eutanásia com os animais em jejum por 12 horas. Sangue foi coletado da calda dos animais no início do teste, a glicemia foi aferida e insulina foi injetada via intraperitoneal nos animais. Posteriormente foram realizadas coletas de sangue a cada 4 minutos até completar 16 minutos. Não foram observadas diferenças em 0, 4, 8 e 16 minutos. Entretanto, em 12 minutos, houveram diferenças significativas entre o grupo estresse e o grupo controle.

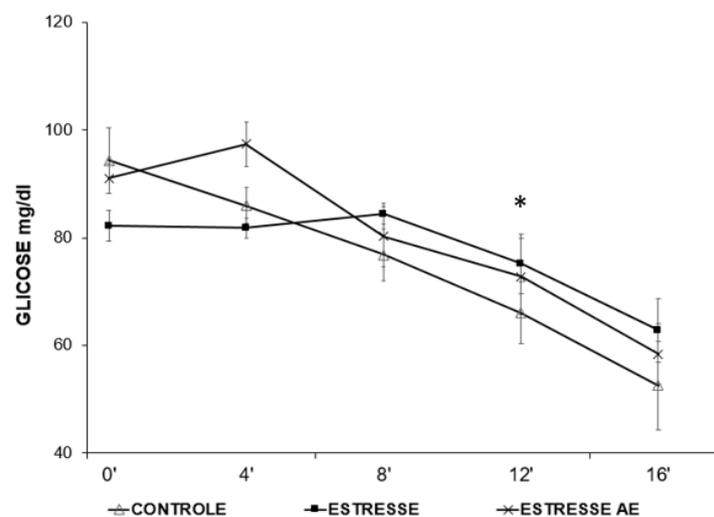


Figura 5 - Figura representando o teste de tolerância a insulina, realizado em p56. Sem resultados significativos nos minutos 0, 4, 8 e 16, e resultados significativos entre os grupos estresse e controle no minuto 12 ($p \leq 0.04$).

As dosagens de colesterol total (Figura 6) mostraram significância entre ambos os grupos estressados e o grupo controle. Não foram observadas alterações significativas para os resultados de análise de HDL (lipoproteína de alta densidade).

As dosagens de LDL (lipoproteína de baixa densidade) mostraram resultados significativos entre os grupos estresse e estresse ambiente enriquecido em comparação ao grupo controle. Em relação as análises de triglicérides, os dados da pesquisa não mostraram alterações significativas.

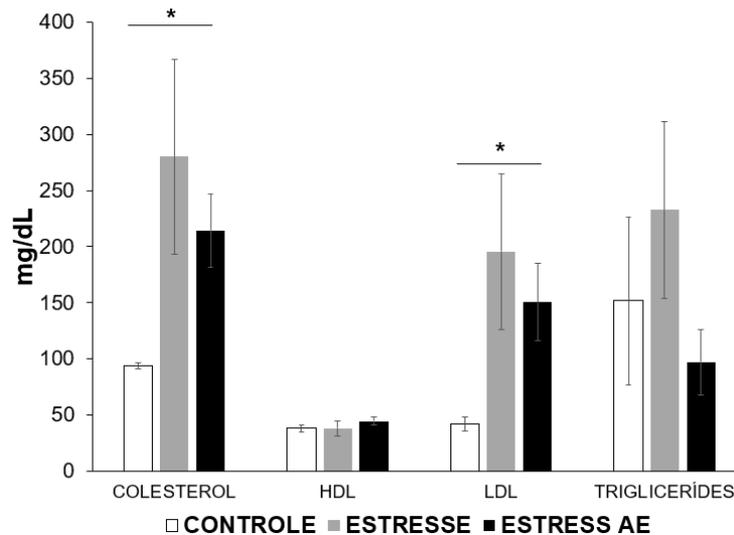


Figura 6 - Figura representando as análises de perfil lipídico, realizadas após a eutanásia. As análises de colesterol mostraram resultados significativamente maiores do grupo estresse e estresse AE em relação ao grupo controle ($p \leq 0.04$). Análises de HDL não mostraram resultados significativos. Análises de LDL mostraram que grupo estresse e estresse AE tem resultados significativamente maiores que o grupo controle ($p \leq 0.03$). Sem resultados estatisticamente significativos entre as análises de triglicérides.

Em relação a análise de extração de proteínas da carcaça dos animais (Figura 7), não houveram resultados significativos em comparação dos grupos entre si, mesmo que o grupo controle tenha apresentado o menor percentual entre os grupos.

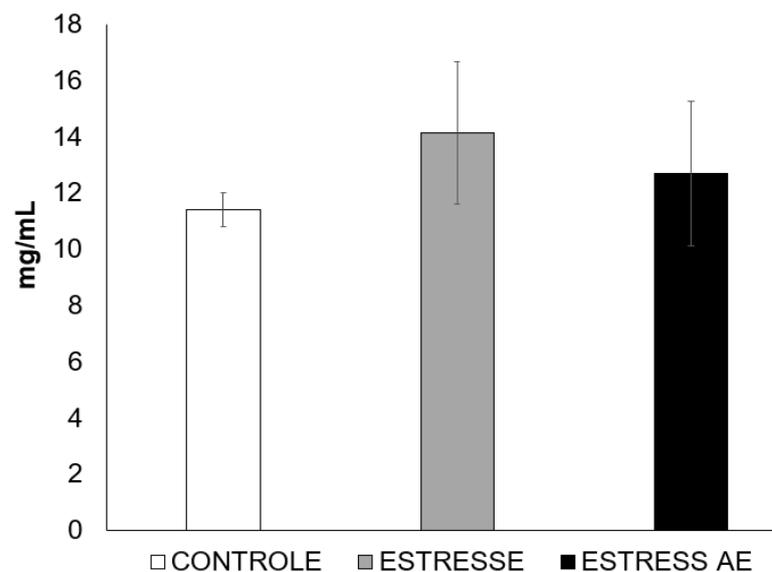


Figura 7 – Figura representando a extração de proteínas de carcaça. Não houveram resultados significativos estatisticamente.

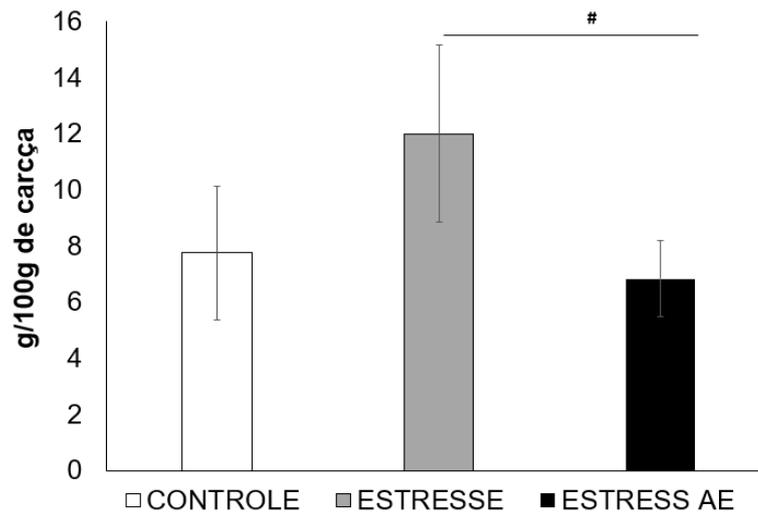


Figura 8 - Figura representando a extração de gorduras totais de carcaça. Houveram resultados significativos entre o grupo estresse e o grupo estresse AE, sendo o grupo estresse o grupo com o maior percentual de gordura de todos os animais analisados, e o grupo estresse AE o menor ($p \leq 0.01$)

A extração de gorduras totais, realizada com a carcaça dos animais (Figura 8) não mostrou significância quando comparados os grupos controle e grupo estresse, entretanto, quando comparados os grupos estresse e estresse AE, os resultados se mostraram significantes, sendo o grupo estresse AEO grupo com o menor percentual de gordura de todo o teste.

4.0 DISCUSSÃO

É descrito na literatura que a exposição a ao estresse nos primeiros anos de vida está associada diretamente com o desenvolvimento de obesidade e sobrepeso em adolescentes e adultos (MILLER & LUMENG, 2018). Os dados deste estudo evidenciaram que o grupo estresse obteve maior massa corpórea em relação a todos os outros grupos avaliados no último dia de análise.

Chama a atenção que o grupo estresse com exposição ao ambiente enriquecido apresentou a menor massa corpórea em relação aos demais, mostrando que a atividade física espontânea, por meio do uso livre da roda de atividades, obteve um importante papel em promover diminuição da massa corpórea total destes animais (STULTS-KOLEHMAINEN & SINHA, 2015).

Ao término do período de estresse, isto é, imediatamente após o desmame, os animais tiveram sua atividade monitorada por 24 horas.

O teste de atividade, representado evidencia que ambos os grupos estressados quando observamos o ciclo escuro (período onde os animais estão mais ativos) estavam significativamente em maior atividade em comparação ao grupo controle. A literatura traz dados conflitantes sobre como o estresse crônico afeta a locomoção dos animais, podendo causar até hiperlocomoção (STREKALOVA *et al.*, 2005). Contudo, neste projeto, ambos os grupos estressados apresentaram significativamente maior locomoção em relação aos animais controle, sugerindo que este modelo de estresse possa induzir hiperlocomoção.

Os resultados da pesquisa mostraram que o grupo estresse apresentou maior número de levantamentos em relação ao grupo controle em p21 e em p50. O número de cruzamentos também se mostrou maior no grupo estresse em comparação com o grupo controle em p21, e em p50, maior número de cruzamentos em comparação do grupo estresse ao estresse AE. Estes resultados sugerem que o grupo estresse explorava mais que os outros grupos, mas não podemos afirmar que a exposição ao estresse neonatal seja ansiolítica.

A literatura apresenta que o estresse crônico pode induzir maiores níveis de ansiedade em comparação com indivíduos que não tiveram experiências estressantes por um período crônico. Supõe-se que, como já discutido anteriormente sobre o teste de atividade, este modelo de estresse possa ter induzido nos animais uma hiperlocomoção e possam ser necessários outros parâmetros para avaliarmos os níveis de ansiedade destes animais (MANIAM *et al.*, 2015; SEIBENHER & WOOTEN, 2015).

Inúmeras evidências vem surgindo fazendo uma relação entre estresse e desenvolvimento de desordens metabólicas como a diabetes tipo II e consequente aumento da resistência à insulina por meio de uma hiper estimulação do eixo HPA em decorrência do estresse crônico. Neste presente estudo, em relação ao teste de tolerância a insulina, representado pela Figura 5, observa-se que os grupos estressados por mais que apresentem uma curva de glicose maior em relação ao grupo controle, estatisticamente não representam significância durante todo o teste, exceto ao minuto 12, onde observamos que o grupo estresse apresenta uma curva significativamente maior que o grupo controle (YAN *et al.*, 2016).

Quando observada a Figura 6, que representa as análises de perfil lipídico dos grupos, observa-se que não houveram mudanças significativas quando avaliamos o HDL e o Triglicérides dos animais, mesmo que o triglicérides do grupo estresse tenha mostrado uma barra maior em comparação aos outros grupos.

Em relação as análises de colesterol total, o grupo estresse apresentou resultados significativamente maiores em comparação com o grupo controle, assim como as medidas de LDL também apresentaram resultados significativos comparando os mesmos grupos citados.

Apesar de não haver significância entre os resultados das análises entre o grupo estresse comparado ao estresse com exposição ao ambiente enriquecido, este último apresentou resultados menores, porém não significativos para demonstrar efetividade do ambiente enriquecido em diminuir os efeitos do estresse sobre o perfil lipídico dos animais.

O estresse além de ser associado a mudanças no padrão alimentar e no ganho de peso, ele também vem sendo associado ao aumento de gordura corporal, o que está associado a maiores riscos de saúde (SCOTT *et al.*, 2012), e em relação a análise do percentual de gordura, representada pela Figura 6, os resultados apresentaram significância entre o percentual de gordura dos grupos estresse e estresse AE, sendo o grupo estresse o maior percentual de gordura dos grupos analisados e o grupo estresse AE o menor.

Em relação a análise de proteínas representada pela Figura 7, não houveram mudanças significativas, sugerindo que nosso protocolo de estresse e exposição ao ambiente enriquecido não trouxe resultados significativos para este parâmetro.

5.0 CONCLUSÃO

A partir dos dados analisados, concluímos que o estresse promoveu alterações no aumento de colesterol e frações, sobre a locomoção, a composição corporal dos animais e o comportamento apresentou mudanças na hiperlocomoção. Entretanto, o ambiente enriquecido só se mostrou eficaz em atenuar os efeitos do estresse em relação a alguns parâmetros que foram analisados, como a massa corpórea dos animais, o percentual de gordura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAO, W. *et al.* Early enriched environment induces an increased conversion of proBDNF to BDNF in the adult rat's hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 265, p. 76-83, 2014.
- CLEMENSON, G. D. *et al.* Environmental enrichment and neurogenesis: from mice to humans. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 4, p. 56-62, 2015.
- CROFTON, E. J. *et al.* Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 49, p. 19-31, 2015.
- DASKALAKIS, N. P. *et al.* Early Life Stress Effects on Glucocorticoid – BDNF Interplay in the Hippocampus. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v.16, s/n, p. 1-13, 2015.
- DIELEMAN, G. C. *et al.* Alterations in HPA-axis and autonomic nervous system functioning in childhood anxiety disorders point to a chronic stress hypothesis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, s/n, p. 135-150, 2015.
- DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biology Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 27-1116, 2006.
- EICHENBAUM, H. *et al.* The hippocampus and mechanisms of declarative memory. **Behavior Brain Research**, v. 103, n. 2, p. 33-123, 1999.
- FAGUNDES, C. P. *et al.* Stressful early life experiences and immune dysregulation across the lifespan. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 27, s/n, p. 8-12, 2013.
- FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Behavior Brain Research**, v.13, n. 2, p. 41-234, 1965.
- GLOVER, V. *et al.* Prenatal stress and the programming of the HPA axis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, s/n, p. 17-22, 2010.
- KOTLOSKI, R. J.; SUTULA, T. P. Environmental enrichment: Evidence for an unexpected therapeutic influence. **Experimental Neurology**, v. 264, p. 121-126, 2015.

LAI, M.; HUANG, L. Effects of Early Life Stress on Neuroendocrine and Neurobehavior: Mechanisms and Implications. **Pediatrics and Neonatology**, v. 52, s/n, p. 122-129, 2011.

MANIAM, J. *et al.* Early Life Stress, HPA Axis Adaptation, and Mechanisms Contributing to Later Health Outcomes. **Frontiers Endocrinology**, v. 5, s/n, p. 1-17, 2014.

MCINTYRE, C. K. *et al.* Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. **The New York Academy of Sciences**. v. 11, n. 12, 2003.

MÉNARD, C. *et al.* Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience. **Neuropsychopharmacology Reviews**, v.42, s/n, p. 1-19, 2016.

MOISLADIS, G. V. *et al.* Glucocorticoids and fetal programming part 1: outcomes. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, s/n, p. 391-402, 2014.

MURTHY, S.; GOULD, E. Early Life Stress in Rodents: Animal Models of Illness or Resilience? **Frontiers in behavioural neuroscience**, v. 12, s/n, p. 1-5, 2018.

PIVONELLO, R. *et al.* Metabolic Alterations and Cardiovascular Outcomes of Cortisol Excess. **Frontiers of Hormone Research**, v. 46, s/n, p. 54-65, 2016.

QUAX, R. A. *et al.* Glucocorticoid sensitivity in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, s/n, p. 1-17, 2013.

RAMPON, C. *et al.* Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. **Nature Neuroscience**, v. 18, p. 1421-1431, 2015.

RODRIGUEZ, A. C. I. *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A resistematic review. **Psychoneuroendocrinology**, v. 62, s/n, p. 301-318, 2015.

SAPER, C. B. *et al.* The Hypothalamus. **Current Biology**, v. 24, n. 23, p. 1-6, 2014.

SCOTT, K.A. *et al.* Effects of Chronic Social Stress on Obesity. **Current Obesity Reports**, v. 1, n.1, p. 16-25, 2012.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 52, s/n, p. 1-6, 2015.

SINGER, A. C.; FRANK, L. M. Reward outcomes enhance reactivation of experience in the hippocampus. **Neuron**, v. 64, n. 6, p. 21-910, 2009.

STREKALOVA, T. *et al.* Stress-induced hyperlocomotion as a confounding factor in anxiety and depression models in mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 16, s/n, p. 171-180, 2005.

STULTS-KOLEHMAINEN, M. A.; SINHA, R. The Effects of Stress on Physical Activity and Exercise. **Sports Medicine**, v.44, s/n, p. 81-121, 2014.

TIETJEN, G. E. *et al.* Childhood Maltreatment in the Migraine Patient. **Current Treatment Options in Neurology**, v. 18, s/n, p. 1-15, 2016.

TOFOLLI, S. M. C. *et al.* Early life stress, HPA axis, and depression. **Psychology & Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 229-234, 2011.

TOST, H. *et al.* Environmental influence in the brain, human welfare and mental health. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 4121-4131, 2015.

WHO. **Child maltreatment (child abuse)**. Geneva: Who, 2017. Disponível em: http://www.who.int/violence_injury_prevention/violence/child/en/. Acessado em: 17/04/2017.

XIONG, F.; ZHANG L. Role of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in developmental programming of health and disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 34, p. 27-46, 2013.

YAN, X. *et al.*, Investigation of the Relationship Between Chronic Stress and Insulin Resistance in a Chinese Population. **Journal of Epidemiology**, v. 26, n. 7, p. 355-360, 2016.

Anexo 1



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTRESSE NEONATAL E SUAS REPERCUSSÕES EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO COM AMBIENTE ENRIQUECIDO", protocolada sob o CEUA nº 2693020816, sob a responsabilidade de **Evandro Romualdo Visigalli e equipe; Ebonny Dandarah Paranhos de Oliveira; Camila Aparecida Machado de Oliveira; Cristiano Mendes da Silva; Lucas Emanuel Oliveira Carvalho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 08/02/2017.

We certify that the proposal "", utilizing 18 Heterogenics rats (18 females), protocol number CEUA 2693020816, under the responsibility of **Evandro Romualdo Visigalli and team; Ebonny Dandarah Paranhos de Oliveira; Camila Aparecida Machado de Oliveira; Cristiano Mendes da Silva; Lucas Emanuel Oliveira Carvalho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 02/08/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 02/2017 a 05/2018 Área: [Biotécnicas](#)

Origem: [CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia](#)
 Espécie: [Ratos heterogênicos](#) sexo: [Fêmeas](#) idade: [90 a 90 dias](#) N: [18](#)
 Linhagem: [Wistar](#) Peso: [300 a 300 g](#)

Resumo: Atualmente numerosos estudos fornecem evidências de que desordens psiquiátricas, metabólicas, cardíaca e imunológica, tem sua gênese determinada pelo estresse neonatal. O estresse neonatal mediado pela ativação do eixo Hipotalâmico-Pituitária-Adrenal (HPA) promove alterações nas estruturas do sistema límbico, especialmente no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal. Em face às evidências de que durante os períodos perinatais a criança é um campo aberto aos diversos tipos de estímulos ambientais, hipotetizamos que os efeitos deletérios provenientes da negligência neonatal, podem ser revertidos ou atenuados com a estimulação em ambiente enriquecido (AE). O AE é especialmente planejado para estimular, as atividades sensoriais, motoras, cognitivas e de interação social entre os animais, gerando uma melhora na aprendizagem espacial, na memória e no comportamento social. Estudos apontam para alterações desencadeadas pela plasticidade neural associada ao AE que incluem aumento da ramificação dendrítica, do número de sinapses por neurônio e número de células gliais. O presente projeto tem como objetivo estabelecer a relação entre a negligência pós-natal e as consequências do estresse infantil com os efeitos da exposição ao ambiente enriquecido e da alta estimulação no desenvolvimento do filhote, correlacionando alterações comportamentais com testes metabólicos, a expressão de fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e marcadores do estresse. ANIMAIS Serão utilizados: 18 ratos heterogênicos Wistar, fêmeas, 300 a 300 g, 90 a 90 dias Procedência: CEDEME - UNIFESP Manutenção: Biotério de Experimentação do Departamento de Biotécnicas Cronograma do estudo, início previsto para: 02/2017 com término previsto para: 05/2018

Local do experimento: Universidade Federal de São Paulo Campus Baixada Santista - Instituto De Saúde E Sociedade. Biotério e Laboratório de Neuroimunologia.

São Paulo, 08 de fevereiro de 2017



Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Tatiana Helfenstein
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo