

SILVIA REGINA SECOLI

ESTUDO DOS EFEITOS DO ESTRESSE PRENATAL NO
DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTO DOS DESCENDENTES

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas (UNICAMP), para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.

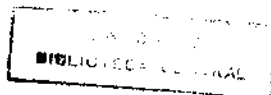
Orientadora: Profa. Dra. Nancy Airolidi Teixeira

Campinas

1993

Se24e

20585/BC



À minha família,

*Antônio e Maria, Silvana,
Silmare e Fernanda,*

e Rafael

pelo incentivo e amor.

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Enfermeira Sílvia Regina Sécoli.

Campinas, 26 de novembro de 1993

Nancy Airolde Teixeira
Profa. Dra. Nancy Airolde Teixeira

-Orientadora-

"De qualquer ponto de vista, há sempre um elemento que obstrue a visão, nunca se vê tudo ...

Na visão do sábio, o mundo é sempre mais amplo que a parcialidade do olho de cada um, e para descobrir novas perspectivas, não se pode parar ...

Neste exercício de humildade, não existe verdade, mas versões.

(Provérbio chinês sec. XVIII)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Em especial, quero agradecer:

À Deus por ter iluminado e guiado os meus passos até o final de mais uma jornada.

À Profa. Dra. Nancy Airolodi Teixeira pela elaboração do projeto de pesquisa, paciência, carinho, dedicação e oportunidade de realização da tese.

Ao Sr. Adilson José Thomaz pela assessoria técnica, amizade sincera, dedicação e zelo pelos experimentos em animais.

Ao Prof. Paulo Roberto Guimarães pelo profissionalismo e dedicação na análise dos dados.

À Profa. Dra. Gun Birgitta Bergsten Mendes pela contribuição e exemplo de mestre.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Flores pela valiosa amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela valiosa ajuda no Summary

À Maria do Socorro S. Flores pelo trabalho de digitação, amizade e paciência.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Farmacologia pela contribuição, amizade e carinho.

Aos Profs. Drs. Vilma A. da Silva, José Roberto Leite, Maria Marta Bernardi e Elenice A. de Moraes Ferrari pelas correções, sugestões e discussão desta tese.

PRINCIPIOS BASICOS PARA PESQUISA ENVOLVENDO O USO DE ANIMAIS

- 1) A experimentação animal deve ser desenvolvida apenas após profunda consideração de sua relevância para a saúde humana e animal e para o avanço do conhecimento científico.
- 2) Os animais selecionados para uma experiência devem ser de espécie e quantidade apropriadas e apresentar boas condições de saúde, utilizando-se o nº mínimo necessário para se obter resultados válidos. Para tanto devem ser utilizados, sempre que possível, estatísticas de pequenos nº, experiência com autocontrole e uso mais eficiente de animais.
- 3) Os procedimentos com animais, que possam causar dor ou angústia devem ser desenvolvidos com sedação, analgesia ou anestesia sempre que possível. Os procedimentos invasivos e drogas paralisantes nunca devem ser empregados sem a administração de agentes anestésicos.
- 4) Experiências crônicas nas quais haverá sobrevida pós-cirúrgica devem prever cuidados com assepsia e prevenção de infecções. Nas experiências cirúrgicas agudas o animal deve ser mantido inconsciente durante toda a sua duração.
- 5) Naquelas experiências que requerem a imobilização física e/ou privação alimentar ou hídrica deve ser dada atenção especial no sentido de minimizar o desconforto ou estresse e de manter as condições gerais de saúde. A imobilização deve ser mantida a um mínimo absolutamente necessário e ser precedida por um período de adaptação.
- 6) Em casos necessários, ao término da experiência, os animais devem ser sacrificados de maneira adequada para a espécie, idade e nº de animais, e de forma rápida, indolor e irreversível.
- 7) O uso de animais em procedimentos experimentais pressupõe a disponibilidade de alojamento que proporcione condições de vida adequadas às espécies. O transporte, a acomodação, a alimentação e os cuidados com os animais criados ou usados para fins biomédicos devem ser realizados por técnico qualificado sob a responsabilidade do pesquisador.
- 8) As experiências devem ser realizadas ou diretamente supervisionadas por pessoas com níveis apropriados de experiência e treinamento para exercer procedimentos em animais vivos. Deve-se criar condições para treinamento de pessoal no local de trabalho, incluindo aspectos do trato e uso humanitário dos animais de laboratório.
- 9) Os casos acima não previstos serão discutidos pela comissão de Ética dessa Sociedade.

Fontes: "Princípios Éticos na experimentação animal", COBEA, Brasil.
"International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" CIOMS, Suíça.
"Statement Regarding the Care and Use of Animals" aprovado pela American Physiological Soc. e pela Soc. for Neuroscience (em Visual Neuroscience)

RESUMO

Neste trabalho ratas da cepa *Wistar*, foram expostas a modalidade de estresse brando crônico imprevisível durante a 2ª e 3ª semana de gravidez. O regime de estresse incluiu alguns estímulos aversivos, tais como privações ocasionais de alimentação e água, agrupamento das fêmeas, exposição à luz estroboscópica por período de 2 - 3 horas.

As ninhadas foram avaliadas quanto ao desenvolvimento somático e neurocomportamental. Na idade adulta apenas filhotes machos (1 por ninhada por teste) foram utilizados para realização dos seguintes testes comportamentais: campo aberto, natação forçada e desamparo aprendido, estes dois últimos conhecidos modelos de indução de depressão experimental.

Os resultados demonstraram que o estresse causou redução de peso das fêmeas, redução do tamanho das ninhadas, e nas crias causou redução da distância ano-genital dos machos, adiantamento no desdobramento de orelhas e abertura de olhos. Na idade adulta, o estresse prenatal e a manipulação na infância, afetaram o comportamento exploratório/emocional dos animais, na natação forçada demonstraram imobilidade, indicando ocorrência do desespero comportamental e no desamparo aprendido mostraram-se capazes de aprender a tarefa de fuga.

Concluiu-se que o protocolo utilizado, foi comprovadamente estressante para fêmeas e crias, no entanto apesar da alteração do comportamento no campo aberto não tornou os descendentes mais susceptíveis à indução de depressão experimental.

SUMMARY

In the present work, female Wistar rats were subjected to mild chronic stress during the second and third week of pregnancy. The stress regimen included aversive stimuli such as occasional deprivation of food and water, grouping of females and exposure to stroboscopic light for 2-3 hr periods.

Subsequently, the somatic and neurobehavioral development of the litters was monitored. Upon reaching adulthood, only male offspring (one/litter/test) were employed in the behavioral tests which included an open field test, forced swimming and learned helplessness. The latter two tests are established models for experimentally inducing depression.

Stress during pregnancy resulted in a reduction in female (dam) weight and a decrease in litter size. In the offspring, there was a reduction in the ano-genital distance in males and generally earlier ear and eye opening dates. Prenatal stress and extensive manipulation of the offspring during infancy affected the exploratory and emotional behavior of the animals: the rats were unable to perform the forced swimming test (indicative of behavioral panic) but in the learned helplessness test they were able to learn the escape response.

In conclusion, the protocol used was sufficiently stressful to the females and offspring and although able to influence the offspring's behavior in the open field test, it did not render them more susceptible to the induction of experimental depression.

INDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. Homeostase e Estresse	1
1.1. Mecanismo da reação de estresse	3
2. Síndrome Geral da Adaptação	6
2.1. Estresse como causa de doenças	9
2.2. Depressão	11
3. Modelos Animais de Depressão	13
3.1. Modelo farmacológico	15
3.2. Modelo de estresse	17
4. Estresse Prenatal	23
4.1. Influência no desenvolvimento e comportamento humano	24
4.2. Influência no desenvolvimento e comportamento dos roedores	27
II. OBJETIVO DO TRABALHO	31
III. MATERIAIS E MÉTODOS	32
1. Animais	32
2. Equipamentos	33
3. Procedimentos Experimentais	35
4. Análise Estatística	45
IV. RESULTADOS	52
V. DISCUSSÃO	68
VI. CONCLUSÃO	74
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
VIII. ANEXO	85

I. INTRODUÇÃO

1. Homeostase versus Estresse

"O cérebro é um tear encantado. Tecendo um desenho esmaecido, sempre um desenho significativo, apesar de nunca duradouro, uma harmonia mutante de subpadrões." (C.S.Sherington, p.198, 1940)

Corpo e cérebro formam a unidade complexa que produz a bioquímica perfeita e compõe os comportamentos, possuindo através da integração e relação de ambos, a capacidade de interagir de maneira harmoniosa com o meio ambiente.

Claude Bernard (1878) foi o primeiro fisiologista a discorrer sobre a relação íntima entre um organismo e seu meio ambiente interno, ou seja, existe um *milieu interieur*, um meio interno no qual vivem órgãos, tecidos e células do organismo.

Observou ainda, que num organismo saudável, esse *milieu interieur* permanece essencialmente constante, mesmo quando o meio externo flutua consideravelmente. Essa descoberta levou-o a formular a famosa sentença "A constância do meio ambiente interno é a condição essencial de vida independente" (Axelrod & Reisine, p.452, 1984).

Posteriormente, o conceito de Bernard foi mais elaborado por outro fisiologista Walter Cannon (1911), que culminou na elaboração do termo HOMEOSTASE (do grego *homoios* - igual, *stasis* - posição), que é definido classicamente como a capacidade

que o organismo saudável possui de manter constante as condições do meio interno, através de equilíbrio dinâmico (Guyton, 1986; Axelrod & Reisine, 1984).

Para manutenção da homeostase, diante das variações do ambiente externo e daquelas provocadas pelo esforço ao qual é submetido o organismo, o sistema nervoso e sistema endócrino desempenham papel fundamental.

Estes sistemas entram em ação quando a homeostase é ameaçada, com uma resposta do organismo frente ao agente agressor. Esta resposta ou estado de instabilidade temporária é conhecido como ESTRESSE.

Do ponto de vista científico, o estresse pode ser definido como um conjunto de alterações físicas e químicas do organismo, desencadeadas pelo cérebro para tornar o indivíduo apto a enfrentar uma situação nova, que exige adaptação. O termo estresse psicológico é usado para denotar situações que, embora não prejudique fisicamente o organismo causando danos teciduais, evoca respostas comportamentais e fisiológicas que são características da resposta estresse (Selye, 1955).

A resposta do organismo frente ao estresse é bastante estereotipada e muito semelhante em animais e humanos, e também dependente de fatores endógenos (genótipo, exposição a drogas) e fatores exógenos (elementos sócio-culturais) (Taché, 1979).

A combinação destes fatores, faz de cada indivíduo diferente do próximo e a resposta estereotipada assim modulada é única e individual (Taché, 1979).

1.1. Mecanismo da reação de estresse

As alterações fisiológicas relacionadas à reação de estresse são complexas, envolvendo a liberação de vários hormônios hipofisários, e possui caracteristicamente dois componentes que estão interrelacionados (Figura 1):

- a) ativação do sistema hipotálamo-hipófise-adrenocortical (HHA);
 - b) ativação do sistema nervoso simpático-adrenomedular (SA)
- (Axelrod & Reisine, 1984; Oliverio, 1988).

Em situações de estresse o hipotálamo é estimulado a sintetizar um mensageiro químico, o fator de liberação de corticotrofina (CRF). Este neuropeptídeo alcança a adenohipófise pelos vasos porta hipotálamo-hipofisários e estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH).

Além do ACTH outros hormônios são liberados pela adenohipófise na corrente sanguínea frente ao estresse: hormônio do crescimento, hormônio estimulante da tireóide, hormônio antidiurético, hormônio folículo estimulante, hormônio luteinizante, prolactina, oxitocina e peptídeos como as endorfinas (Guyton, 1986; Oliverio, 1988).

O ACTH liberado estimula a produção de glicocorticóides pelo córtex da supra-renal, principalmente cortisol e corticosterona. Estes glicocorticóides causam efeitos metabólicos importantes como gliconeogênese, aumento da lipólise, que surgem como fonte de energia para suprir as exigências do organismo frente ao agente agressor, também facilitam outras respostas enzimáticas que são capazes de suprimir reações imunes e inflamatórias.

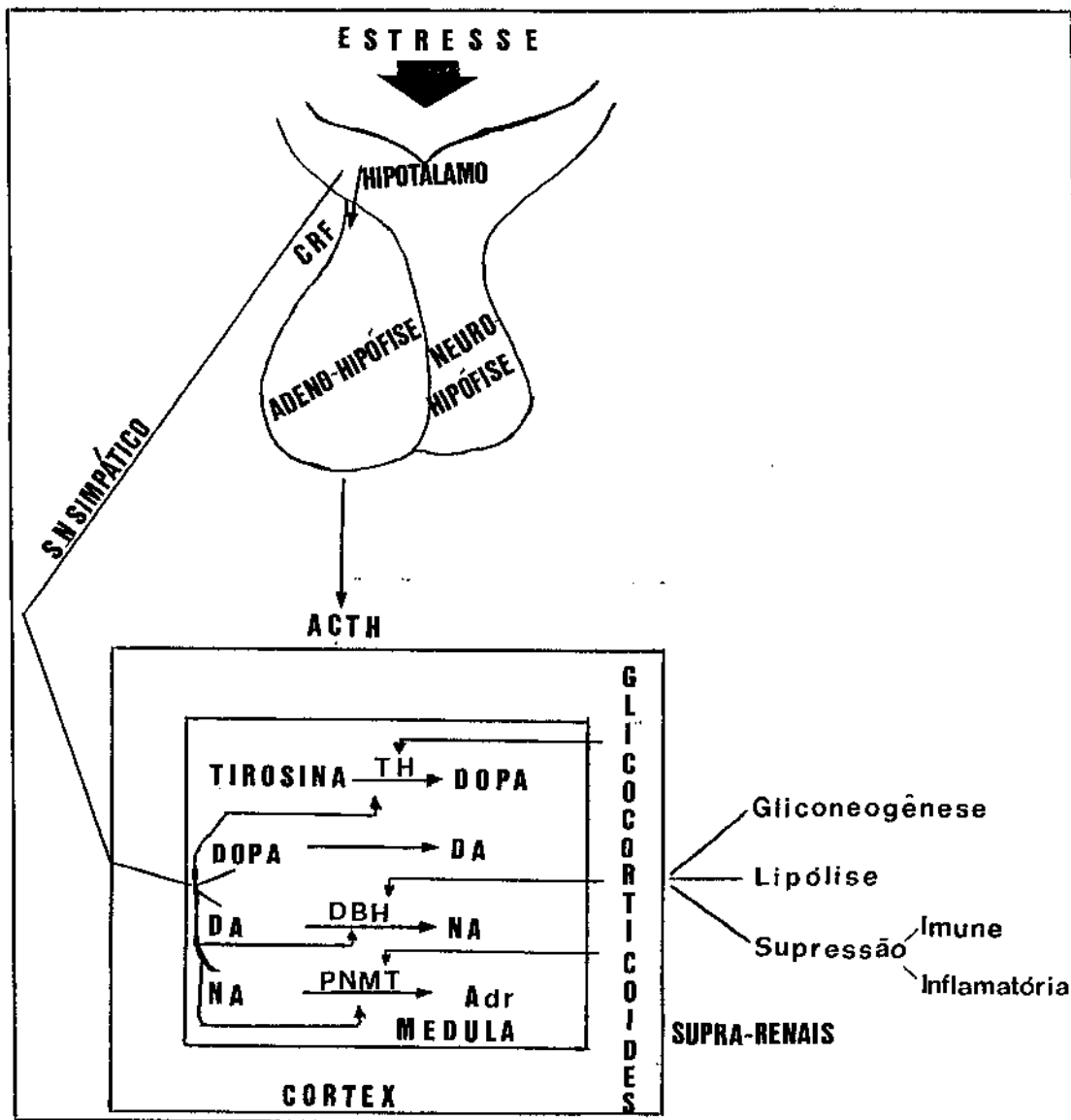


Figura 1: Representação esquemática da reação de estresse. A ativação do sistema hipotálamo-hipófise-adrenocortical (HHA) com a liberação do ACTH pela adenohipófise e estimulação da produção de glicocorticóides pelo córtex da supra-renal causando vários efeitos metabólicos. A ativação do sistema nervoso simpático-adrenomedular (SA) com a regulação da biossíntese das catecolaminas.

Os glicocorticóides atuam sobre as células cromafins da medula da supra-renal e aumentam a atividade das enzimas que sintetizam catecolaminas (tirosina-hidroxilase, dopamina- β hidroxilase e feniletilamina-N-metil-transferase - PNMT) principalmente a adrenalina.

Simultaneamente a ativação do sistema HHA, ocorre o aumento da atividade do sistema SA, que também aumenta a atividade das enzimas que sintetizam catecolaminas, resultando na descarga maciça de adrenalina e noradrenalina na corrente sanguínea, desencadeando sinais e sintomas clássicos da reação luta/fuga.

A adrenalina produz principalmente vasoconstrição periférica, aumento de frequência cardíaca, aumento de pressão arterial, dilatação de pupilas, piloereção, inibição da função do trato gastro-intestinal, vasodilatação nos vasos da musculatura esquelética, estimulação do sistema nervoso central, e o mecanismo de coagulação sanguínea é também alterado visando proteção contra injúrias excessivas (Selye, 1982).

Os glicocorticóides e catecolaminas através das ações específicas nas células-alvo, produzem energia suficiente para atender de maneira eficiente a sobrecarga do organismo, em decorrência do agente agressor.

Mas, existem alguns trabalhos (Oliverio, 1988; Anisman & Zacharko, 1990) que relatam que às respostas de estresse não são limitadas as reações dos sistema HHA e SA na periferia, ou seja, eles implicam também em reações neuroquímicas (aminérgicas) e neuroendócrina (peptídeos) a nível cerebral.

No sistema HHA, foi demonstrado que endorfinas e β lipotrofina são liberadas junto com o ACTH a nível cerebral. Estes peptídeos provêm do mesmo precursor do ACTH, a molécula de POMC (Pro-opiomelanocorticotrofina) (Oliverio, 1988). Estes peptídeos são ativados em diferentes sítios receptores a nível central e periférico, e produzem ou comportamentos estereotipados (Gispem & Isaacson, 1981; Cabid e cols., 1985), ou analgesia induzida por estresse (Amir e cols., 1980) ou quimiotaxia (Ruff e cols., 1985).

A resposta final do mecanismo do estresse resulta em efeitos que envolvem a homeostase do sistema nervoso central e periférico, sistema endócrino e respostas do sistema imunológico (Panerai, 1992).

2. Síndrome Geral de Adaptação

"As modificações fisiológicas que surgem frente ao estresse, podem parecer perturbadoras, mas são sinais de bom funcionamento orgânico para sua própria proteção". (Lipp, p.7, 1990).

Nas observações clínicas e experimentais, Selye (1936) demonstrou que, embora a reação de estresse seja específica, sua indução é não-específica. Ou seja, a reação possui elementos característicos, mas que não dependem qualitativamente da natureza do agente agressor. Qualquer que seja o agente, sua agressão promove uma reação de estresse, que leva a alterações gerais (sistê-

micas), as quais constituem a síndrome geral de adaptação (SGA) (Selye, 1936).

A SGA foi estudada em animais de laboratório e pode evoluir em três fases distintas, com características comportamentais, fisiológicas e metabólicas definidas.

A. Reação de Alarme

A reação de alarme é desencadeada pela exposição súbita a estímulos para os quais o organismo não está qualitativa e quantitativamente preparado, ou seja, o organismo entra em estado de alerta e se prepara para agir, caracterizando a reação luta/fuga

Fisiologicamente ocorre palidez cutânea, sudorese intensa, taquicardia, aumento da frequência respiratória, diminuição da motilidade do trato gastrointestinal e vasodilatação dos vasos da musculatura esquelética.

As glândulas supra-renais encontram-se aumentadas e a produção exagerada de corticóides causa involução do sistema tímico-linfático, e picnose das células linfóides com diminuição de anticorpos circulantes, e pode ocorrer o aparecimento de erosões gastrointestinais (Chapadeiro, 1978).

Dentre as modificações metabólicas encontradas as mais destacadas são: hiperglicemia, hipocloremia, hiperpotassemia e hiponatremia. O colesterol do córtex da supra-renal reduz-se, e há perda de tecido gorduroso. Estas alterações são características da fase de catabolismo do organismo (Selye, 1982). Na fase de alarme há predominância da ativação do sistema SA.

B. Fase de Resistência

São reações gerais produzidas pela exposição prolongada a estímulos para os quais o organismo se adaptou, e que surgem em consequência da permanência da exposição.

Na tentativa de restabelecer a homeostase (perturbada pelo agente agressor) os sintomas descritos anteriormente desaparecem. No entanto esta nova adaptação se faz à custa da energia que o organismo necessita para outras funções vitais (Selye, 1982).

Durante esta fase, o peso das glândulas supra-renais permanece elevado. No entanto, os lipídios, ácido ascórbico e outros produtos de armazenamento descarregados na fase anterior, reaparecem, podendo inclusive aumentar; o timo tende a voltar ao normal (Chapadeiro, 1978).

Na fase de resistência, continua a hiperglicemia, a gordura se reconstitui ou supera o valor inicial. Estas alterações caracterizam a fase de anabolismo do organismo.

Nesta fase há predominância da ativação do sistema HHA.

C. Fase de Exaustão

São reações que finalmente se desenvolvem como consequência da superexposição prolongada a estímulos, para os quais a adaptação se desenvolveu, porém não consegue manter-se (Chapadeiro, 1978).

Nesta fase, quando grande parte da energia de adaptação foi utilizada, aparece o desequilíbrio que, se crônico ou intenso, pode gerar no indivíduo um desgaste físico e mental capaz de

levar ao aparecimento de várias doenças e, até mesmo à morte (Lipp, 1990).

O córtex das glândulas supra-renais encontra-se aumentado, e aparecem hemorragias e infiltração linfoplasmocitária, extensos fenômenos degenerativos e zonas de necrose, devido a sobrecarga sofrida pelo órgão (Chapadeiro, 1978)

Segundo Selye (1936) as fases da SGA são análogas às três fases do ciclo da vida humana, a infância que é caracterizada pela baixa resistência e respostas excessivas a qualquer tipo de estímulo, a idade adulta caracterizada pelo maior número de adaptações conseguidas, maior resistência aos estímulos e a senilidade caracterizada pela perda irreversível da adaptabilidade e eventual exaustão.

2.1. Estresse como causa de doença

As principais teorias sobre a relação estresse/doença foram desenvolvidas por Selye (1979), que não percebia o estresse como fator negativo na vida do organismo. Somente quando esta reação suplantasse a capacidade de reagir deste organismo, seria considerada prejudicial.

O estresse acompanha todo fenômeno de doença, mas quando o organismo é exposto a graus incompatíveis com a possibilidade de adequada resistência e adaptação, o estresse pode gerar doenças (Taché, 1979).

O estresse emocional ou psicogênico pode produzir modificações no metabolismo basal de várias substâncias endó-

genas, como a secreção de histamina, vasopressina, glucagon, aumento plasmático de colesterol, triglicérides, em adição às variações de catecolaminas e outros hormônios (descritos anteriormente). Estas alterações se mantidas por longo tempo, podem ser precursoras no desenvolvimento de algumas doenças (Taché, 1979).

De fato, o estresse está associado a toda doença, embora em algumas a reação seja primariamente responsável pelo aparecimento do distúrbio. Por exemplo, sabe-se que alguns distúrbios do sistema cardiovascular como hipertensão, infarto do miocárdio, e mesmo úlceras gástricas e distúrbios mentais estão primariamente relacionados ao estresse.

Embora as formulações mais gerais a respeito do estresse, não tenham clareado muito a compreensão dos distúrbios mentais, alguns estudos sobre as crises vitais sugerem uma correlação com a doença mental.

Alguns dados clínicos sugerem que em pacientes esquizofrênicos mudanças específicas em suas vidas, nas semanas imediatamente precedentes ao colapso, frequentemente servem como precipitadores para o aparecimento da esquizofrenia (Kaplan & Sadock, 1993).

Estes mesmos autores, descreveram que nas 3 semanas que precedem o aparecimento de um episódio esquizofrênico, 60% dos pacientes experienciaram situações que afetaram diretamente a eles ou às suas famílias.

No caso dos distúrbios do humor (mania e depressão)

algumas evidências sugerem uma associação entre a frequência aumentada de eventos estressantes e o princípio (principalmente) da depressão, em comparação com outros pacientes e a população geral (Rabkin, 1982).

Kaplan & Sadock (1993) citam que a grande maioria dos médicos norte-americanos acreditam na relação dos eventos vitais estressantes e a depressão clínica, outros sugerem que estes eventos desempenham papel primário e outros ainda limitam o papel dos eventos estressantes como contribuintes para o aparecimento do episódio depressivo do momento.

O fato é que o distúrbio do humor, conhecido como depressão maior/unipolar, não tem etiologia esclarecida. Mas a maioria dos transtornos tende a ser recorrente e o início dos episódios é frequentemente relacionado com eventos ou situações estressantes (OMS, 1993).

2.5. Depressão

Há vários anos o fenômeno da depressão como síndrome têm despertado o interesse de pesquisadores e clínicos por seu estudo, e gerado controvérsias quanto ao diagnóstico, à etiologia e os tratamentos. As depressões são síndromes frequentes, graves e incapacitantes. Respondem por mais de um terço dos suicídios e resultam em inúmeras consequências negativas - médicas, psicológicas, econômicas e sociais (Nardi e cols., 1993).

Na depressão, a perturbação fundamental é a alteração do humor, e não do afeto e segundo Kaplan & Sadock (1993) o humor

é definido como "o estado emocional interno de uma pessoa", o afeto "a expressão externa do conteúdo emocional".

Esta alteração do humor é acompanhada de mudanças globais no funcionamento do indivíduo que podem incluir, acentuada diminuição de interesse ou de prazer pela maioria das atividades, insônia ou hipersonia aproximadamente todos os dias, agitação ou lentificação psicomotora, sentimentos de desvalia ou culpa excessiva ou inadequada, pensamentos recorrentes de morte, ideação suicida recorrente, ou tentativa de suicídio (Kaplan & Sadock, 1993). A depressão é, dentre todas as desordens psiquiátricas, a que apresenta maior risco de vida, pois a capacidade de enfrentar dificuldades está praticamente abolida (Graeff, 1990).

O DSM III R (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 1987) relaciona alguns sintomas/sinais de depressão, sob os critérios diagnósticos de Episódio Depressivo maior ou unipolar. Para atualizar-se a classificação, observou-se os critérios do CID 10 (Código Internacional de Doença, 1993) que apresentam sintomas/sinais semelhantes, mas sob a denominação de Episódios Depressivos.

Relação de Sintomas/Sinais

DSM III R

1. Humor deprimido
2. Diminuição intensa de prazer nas atividades
3. Perda de peso
4. Insônia
5. Perda de energia/fadiga

6. Diminuição na capacidade de concentração

CID 10

1. Humor deprimido

2. Perda de interesse e prazer nas atividades

3. Apetite diminuído

4. Sono

5. Redução de energia/fadiga

6. Concentração e atenção reduzida

Este quadro descrito caracteriza o transtorno depressivo maior ou depressão unipolar (apresenta somente episódios de depressão)

A prevalência é duas vezes maior em mulheres do que em homens. O aparecimento do transtorno pode ocorrer da infância até a velhice, mas 50% dos pacientes se encontram na faixa etária dos 20-50 anos.

3. Modelos Animais de Depressão

"O papel do modelo animal na depressão é considerado como uma interface crítica entre a neurociência comportamental e a clínica" (Willner, p.131, 1991).

Os modelos animais de depressão são frequentemente utilizados pela indústria farmacêutica, no desenvolvimento de drogas antidepressivas.

No entanto nas três últimas décadas, uma porcentagem importante dos modelos animais tem sido utilizada em laborató-

rios, simulando a depressão experimentalmente para investigação da sua psicobiologia (Willner, 1991).

O modelo de laboratório não é tão preciso e complexo quanto o fenômeno clínico, e alguns dos sintomas da depressão podem ser modelados em animais, embora outros não.

É comum à depressão clínica em humanos e aos modelos animais de depressão apresentar uma grande variedade de sintomas, diversos componentes neuroquímicos da doença, variabilidade na eficácia dos tratamentos e respostas aos fatores externos (Anisman & Zacharko, 1990).

Para que um modelo animal apresente validade no estudo das doenças mentais em humanos, alguns critérios foram propostos por McKinney e Bunney (1969):

- a) **Validade Aparente (Face Validity):** O modelo deve apresentar sinais semelhantes aqueles apresentados por pacientes;
- b) **Validade de Predição (Predictive Validity):** O modelo deve identificar os tratamentos farmacológicos ou não, clinicamente eficazes no tratamento da doença.
- c) **Validade Construtiva (Construct Validity):** O modelo deve permitir a elaboração de teorias que visem elucidar a psicopatologia da doença.

Vários modelos animais, com metodologias variadas têm sido descritos na literatura. As características comuns destes modelos são que os testes ou drogas utilizados induzem no animal sintomatologia semelhante à depressão, e que as anormalidades comportamentais apresentadas são revertidas por drogas antide-

pressivas(Willner, 1991).

3.1. Modelos farmacológicos

Os primeiros estudos utilizaram os modelos farmacológicos para indução do modelo experimental da depressão. Estes se baseavam na administração de drogas que induziam sintomatologia semelhante às da depressão.

O exemplo clássico é o da Reserpina, droga anti-hipertensiva que, produz como efeito colateral sedação e diversos graus de depressão (Achor e cols., 1955; Muller e cols., 1955; Harris, 1957).

Outro exemplo é o da tetrabenazina (Lingjaerde, 1963). Pacientes tratados com esta droga também desenvolvem depressão. Esta droga apresenta similaridade com a reserpina em suas propriedades farmacológicas, inclusive a depleção de catecolaminas.

A droga α -metil-paratirosina, que inibe a tirosina-hidroxilase interrompe a síntese de dopamina e de noradrenalina no sistema nervoso central, e induz em animais de laboratório, diminuição da atividade motora e sedação (Sector & Sjoerdsma, 1965).

Assim, estas drogas desencadeiam em animais, anormalidades comportamentais, principalmente a diminuição da atividade locomotora (um dos comportamentos mais estudados em modelos animais de depressão), análoga à depressão nos seres humanos (Willner, 1991).

Estes estudos preliminares levaram a propor a hipótese

catecolaminérgica das depressões por Schildkraut em 1965. Esta hipótese relacionava a depleção de catecolaminas, principalmente a noradrenalina ao aparecimento da depressão.

Em 1967 A Copen na Inglaterra, formulou a hipótese serotoninérgica da depressão nos moldes da noradrenérgica: depleção de serotonina cerebral pela reserpina e aumento da atividade serotoninérgica por drogas antidepressivas (IMAO, agentes tricíclicos).

Com tudo, uma questão não resolvida satisfatoriamente pelas hipóteses acima descritas, é a do curso temporal do efeito das drogas antidepressivas. Os compostos tricíclicos inibem a recaptção neuronal de aminas em poucos minutos, ou no máximo horas, o mesmo ocorrendo com os IMAO, que inibem a enzima monoaminoxidase, aumentando a quantidade de aminas no terminal nervoso. Em ambos os casos o efeito terapêutico das drogas leva vários dias ou semanas para se instalar. Por isso, o interesse dos estudiosos deslocou-se para as alterações bioquímicas que surgem após administração contínua de drogas, e os achados mais significativos são com relação a alteração do número de receptores de noradrenalina e serotonina (Graeff, 1990).

Mas, com o surgimento de novas drogas antidepressivas que diferiam estruturalmente dos antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoamina-oxidase (IMAO), como por exemplo o trazodona (Silvestrini, 1982) e a mianserina (Van Riezen, 1972) alguns estudos condenavam a validade dos modelos farmacológicos.

3.2. Modelo de estresse

A psicobiologia experimental passou a desempenhar papel fundamental no desenvolvimento dos modelos animais de depressão, quando surgiram evidências de que fatores ambientais são fatores precipitantes deste distúrbio (Loyd, 1980 a,b).

Desta forma, pesquisadores direcionaram seus trabalhos, na busca de modificações ambientais que induzissem anormalidades comportamentais e/ou alterações bioquímicas nos animais, similares às aquelas causadas pelo distúrbio em seres humanos (Faria, 1991).

3.2.1. Desamparo aprendido

O modelo de depressão desenvolvido por Overmeier & Seligman em 1967, conhecido como desamparo aprendido é um exemplo de distúrbio comportamental associado ao ambiente estressante.

Neste modelo, cães foram expostos a choque elétrico, dos quais não podiam escapar (sessão de incontrolabilidade) e após 24 horas foram novamente expostos aos choques em uma caixa de alternância (sessão de fuga). Nesta ocasião na visão de Seligman, os animais mostravam-se desistentes de fazer qualquer tentativa para escapar ao choque, ou seja os animais haviam aprendido que era inútil fazer qualquer tentativa. Simultaneamente às alterações comportamentais, os animais apresentavam perda de apetite e do peso corporal.

Seligman (1975) propôs que a sessão de incontrolabilidade produzia nos animais uma expectativa de não contingência entre suas respostas e o término dos choques. Esta expectativa

acarretaria alguns déficits: a) Motivacional - visto a redução da probabilidade de iniciação de respostas frente a novos choques; b) Cognitivo - demonstrado pela dificuldade de reconhecer a possibilidade de controle sobre o ambiente e, c) Emocional - caracterizado por fenômenos com alterações fisiológicas como perda de peso, formação de úlceras gátrica.

Os déficits motivacional, cognitivo e emocional apresentados, lembravam sintomas dos distúrbios depressivos em seres humanos.

Foram descritos alguns aspectos para caracterizar o desamparo aprendido em animais (Weiss e cols., 1982):

- a) Desempenho prejudicado em tarefas que requerem comportamento ativo;
- b) Consumo de alimentos e água diminuído;
- c) Perda de peso;
- d) Perda de agressividade e rivalidade;
- e) Perda de comportamentos habituais como limpeza (*grooming*) ou brincadeira;
- f) Sono diminuído

É possível tentar estabelecer um paralelo entre os aspectos observados em animais e humanos acometidos pelo distúrbio, segundo características diagnóstica do CID-10 (Classificação Internacional das Doenças, 1993) que são respectivamente:

- a) Perda de interesse, prazer, energia reduzida levando a fadigabilidade aumentada e atividade diminuída;

- b) Apetite diminuído;
- c) Perda de peso;
- d) Falta de reatividade emocional a ambientes e eventos normalmente prazerosos;
- e) Perda de interesse ou prazer em atividades que normalmente são agradáveis;
- f) Sono perturbado.

A semelhança entre animais desamparados e pacientes deprimidos proporcionou ao modelo, considerável validade aparente (Matthysse, 1986; Willner, 1986).

O modelo é sensível a vários tratamentos clinicamente efetivos na depressão (Willner, 1984; 1986; 1990) demonstrando aceitável validade de predição.

Os antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoamina-oxidase (IMAO), reduzem de maneira dose dependente o desamparo aprendido (Martin e cols., 1987).

A eletroconvulsoterapia aplicada de maneira sub-crônica também reverte o desamparo aprendido (Sherman e cols., 1982).

A validade construtiva tem sido sustentada por inúmeros trabalhos utilizando tanto animais quanto humanos (Alloy & Abramson, 1979; Nation & Boyajian, 1981).

Seligman (1975) pelo seus trabalhos concluiu que a ausência de contingência entre o comportamento apresentado e o término das situações aversivas, poderia ser o ponto central da etiologia da depressão.

Abramson e cols. (1978) passaram a predizer que su-

jeitos deprimidos atribuem os acontecimentos desagradáveis a si próprios (causa interna) e os acontecimentos agradáveis como sendo produto de causas externas (sorte).

Apesar de controverso, o modelo é atualmente o mais aceito e que melhor preenche os critérios de validação (Willner, 1986; 1990).

3.2.2. Desespero comportamental

O modelo do desespero comportamental, também conhecido como natação forçada ou teste de imobilidade foi criado por Porsolt e cols. (1977) e prediz que ratos quando forçados a nadar num espaço restrito, após várias tentativas de fuga, assumem uma postura de imobilidade.

No princípio, o modelo mostrou-se sensível a várias drogas antidepressivas como tricíclicos e inibidores da mono-aminoxidase (IMAO), que quando administrados no dia do treino retardavam o aparecimento de imobilidade no dia do teste (Porsolt e cols., 1979).

Entretanto apresentou resultados falso-positivo, pois drogas clinicamente ineficazes no tratamento da depressão, como os neurolépticos e ansiolíticos eram eficazes no modelo (Porsolt e cols., 1979). Por outro lado também apresentou resultados falso-negativo pois drogas como a clorimipramina e o trazodona clinicamente eficazes no tratamento da depressão não eram reconhecidas pelo modelo (Porsolt e cols., 1979).

Estes resultados acarretaram ao modelo, prejuízo da validade de predição, pois o modelo mostrou-se falho na identifica-

ção de tratamentos clinicamente efetivos (Willner, 1984).

Outro aspecto prejudicado foi a validade construtiva, visto que a metodologia proposta por Porsolt, não isolava a variável incontrolabilidade (O'Neil & Valentino, 1982), ou seja, no modelo do desespero comportamental o animal não apresenta no dia do teste a oportunidade de escapabilidade.

Importante ressaltar, que apesar do prejuízo das validades de predição e construtiva, este modelo é o mais utilizado rotineiramente em indústrias farmacêuticas para o *screening* de drogas antidepressivas.

3.2.3. Estresse crônico imprevisível

Este modelo foi criado na década de 80 por Katz & Hersh (1981) e consiste em expor ratos à diversos estímulos aversivos (choques elétricos, inversão de ciclo claro/escuro, imersão em água fria, entre outros) por um período de 3 semanas e a seguir submetê-los a uma sessão de estresse agudo (exposição ao som de alta intensidade e iluminação intensa).

O modelo prediz que animais não estressados, quando expostos à sessão de estresse agudo, apresentam aumento de atividade no teste de campo aberto, mas em animais estressados cronicamente, o aumento de atividade não é observado (Katz & Hersh, 1981).

Estes animais estressados cronicamente apresentavam um aumento nos níveis plasmáticos de corticosteróides (Katz & Hersh, 1981) e déficit no aumento de consumo de líquidos, quando se adiciona sacarina à água de bebida (Katz & Sibel, 1982).

Drogas antidepressivas quando administradas a estes animais são capazes de reduzir o aumento dos níveis plasmáticos de corticosteróides e manter o efeito ativador do estresse agudo, quando administrado simultaneamente ao regime de estresse crônico (Katz, 1981; Katz e cols., 1981; Soblosky & Thurmond, 1986).

Foi observado também melhora do aumento do consumo de sacarina (parcialmente restaurado) após administração de imipramina (Katz, 1982).

Portanto estes resultados conferem ao modelo, validação aparente, e parcial de predição, pois o aumento nos níveis plasmáticos de corticosteróides, perda de reatividade ao estresse agudo e falta de respostas a um estímulo presumivelmente reforçador que é a solução de sacarina, são sinais presentes na depressão (Willner, 1990).

A validade construtiva do modelo relaciona a depressão aos eventos desagradáveis da vida. Isolados, podem ser variável relativamente determinante na etiologia da depressão (Lloyd, 1980b), enquanto que o aumento de situações aversivas crônicas podem ter efeito desencadeante mais efetivo no estabelecimento de depressão (Aneshensel & Stone, 1982).

3.2.4. Estresse brando crônico imprevisível

O modelo descrito por Willner e cols. (1987) foi elaborado de forma semelhante ao estabelecido por Katz (1981), porém utilizando estímulos aversivos supostamente mais brandos.

O modelo consiste em expor ratos a privações ocasionais de água e alimento, mudança de ambiente, exposição a objetos e

odores desconhecidos, e inclinação de gaiolas entre outros (Willner e cols., 1987).

Após o regime de estresse, os animais demonstravam redução gradual no consumo de sacarose. O tratamento com antidepressivos como desipramina, imipramina e amitriptilina restaura o consumo de sacarose (Willner e cols., 1987). Os resultados conferem ao modelo certa validade aparente e de predição (Faria, 1991).

A validade construtiva do modelo foi amparada pela suposição de que o estresse brando crônico imprevisível pode ser determinante na etiologia da depressão (Aneshensel & Stone, 1982).

Segundo Willner (1990), a validade construtiva do modelo prediz que a depressão deve envolver muitos estímulos aversivos brandos, e de modo frequente, já que estes podem ser mais análogos aos estresses diários da vida.

4. Estresse Prenatal

"Qualquer visão de um transtorno emocional deve considerar o ambiente uterino, a placenta, e o substrato neurobiológico do feto" (Kaplan & Sadock, 1993).

A gravidez é um conjunto de fenômenos que da concepção ao nascimento permitem a elaboração e a maturação de um novo ser vivo. Produz em animais e humanos um equilíbrio instável, pois as alterações endócrinas que ocorrem no decorrer do processo são

fontes constantes mudanças comportamentais, fisiológicas e bioquímicas.

A comunicação entre mãe e feto é estabelecida pela placenta e através desta, mãe e feto estabelecem uma relação complementar de funcionamento e equilíbrio. O meio ambiente fetal desta forma é controlado fisiologicamente pela mãe, podendo o ambiente prenatal desempenhar papel importante na determinação de características fisiológicas e mesmo comportamentais dos descendentes (Joffe, 1969; Herrenkohl, 1986).

Sabe-se que os danos que ocorrem no estágio fetal, geralmente são mais globais do que os causados após o nascimento, pois os órgãos em rápido crescimento são mais vulneráveis (Rodier, 1980).

4.1. Influência do estresse prenatal no desenvolvimento e comportamento humano

Nas últimas três décadas tornou-se claro que o desenvolvimento e comportamento de um indivíduo não é apenas determinado por fatores genéticos ou pelo ambiente de criação pós-natal. Existe uma clara influência de fatores ambientais aos quais a mãe é exposta durante a gravidez, no desenvolvimento do repertório comportamental dos descendentes (Joffe, 1969).

Dentre os fatores ambientais que podem influenciar no desenvolvimento intrauterino, estão drogas ingeridas pela mãe, o estado nutricional, doenças infecciosas, e a vivência de situações estressantes (Joffe, 1978; Swaab, 1984; Weistock, 1988).

No homem, a pesquisa sobre estas relações é bastante complicado, devido à dificuldade do estabelecimento de relações causais entre vários fatores que muitas vezes estão associados. A falta de registros detalhados referentes a mãe e as crianças e, a questão ética envolvida na situação de investigação dos descendentes também dificultam os estudos.

Apesar disto alguns estudos têm sido realizados. Por exemplo sabe-se que a desnutrição materna grave nos países do terceiro mundo é causa importante de bebês com retardo de crescimento e de natimortos (Kaplan & Sadock, 1993).

A administração de andrógenos na prevenção de abortos, afeta a diferenciação sexual no feto. Os bebês do sexo feminino podem ter órgãos masculinizados, como por exemplo o clitoris aumentado ou útero hipoplásico. Os dados são inconclusivos em relação aos bebês do sexo masculino (Kaplan & Sadock, 1993).

O álcool pode causar diferentes distúrbios nas crianças, como distúrbios cognitivos e retardo mental (Spaans & Verspreit, 1981), distúrbios de linguagem (Gusella & Fried, 1984), dependendo do estágio de desenvolvimento no qual se encontra o cérebro fetal.

Estudos sobre a incidência de morbidade infantil como eczema, bronquite e outros problemas respiratórios, bem como retardo no crescimento e desenvolvimento (andar, controlar esfíncter), dificuldade de deglutição e defeitos de linguagem demonstram ter correlação com o estresse materno ocasionado pela discordia entre os membros familiares ou cônjuge (Stott, 1973).

Em situações mais aversivas, como exposição a ruídos incontroláveis e constantes, as crianças têm demonstrado diminuição na motivação de iniciar respostas a novas situações, e também aumento na agressividade e irritabilidade (Cohen e cols., 1980).

Foi realizado estudo comparativo dos descendentes de mães que estiveram grávidas durante a guerra dos 6 dias entre árabes e israelenses, e mães que estiveram grávidas 1-2 anos após. As crianças do primeiro grupo apresentaram atraso no desenvolvimento do andar, do falar, e foram descritas como crianças antisociais, regredidas e facilmente irritáveis (Meir, 1985).

Algumas similaridades podem ser identificadas neste estudos. As mães foram expostas a situações aversivas, em que não havia possibilidade escapatória ou não se tinha controle sobre a mesma (Quirce e cols., 1981; Swenson & Vogel, 1983; Muir & Pfister, 1986).

Na verdade, o estresse provoca um desequilíbrio geral no organismo materno, que estimula várias modificações na própria mãe e no feto, mas que podem ser transmitidas em períodos críticos do desenvolvimento fetal.

Considerando os dados de literatura formou-se a hipótese de que o estresse tem um impacto crítico no desenvolvimento do organismo durante o estágio prenatal, quando os circuitos neuronais que são a base bioquímica do comportamento, estão sendo estabelecidos (Herrenkohl, 1986). Através deste afetando negativamente o comportamento tardio em animais e humanos.

4.2. Influência do estresse prenatal no desenvolvimento e comportamento dos roedores.

A extrapolação dos estudos em roedores para a situação clínica é limitada e inerente às diferenças entre as espécies. Por outro lado, as vantagens advindas da possibilidade de controle de variáveis e fácil observação dos descendentes até a idade adulta, suplantaram as limitações (Sechzer, 1983). Assim os trabalhos experimentais utilizando roedores, em especial o rato, multiplicaram-se nos últimos anos (Weinstock e cols., 1988).

O estudo clássico de estresse prenatal em animais foi desenvolvido por Thompson (1962), que observou que estresse em ratas durante a gravidez, aumentavam a reatividade da fêmea e da ninhada. Thompson (1962) treinou ratas a escaparem de uma situação estressante, associando o som de uma campainha à emissão de choques. Completada a aprendizagem da tarefa, as ratas foram acasaladas, e durante a gestação foram novamente expostas à situação, agora somente com a expectativa do choque, pois a campainha soava, mas o choque não era aplicado. Os sinais fisiológicos da reatividade emocional estiveram presente durante o teste: piloereção e excessiva defecação.

Dentre os trabalhos realizados mais recentemente houve um predomínio marcante no estudo do estresse intenso, tais como os induzidos por choques elétricos, contenção da fêmea, exposição a ruídos fortes, exposição a luzes, ou ainda exposição a temperaturas elevadas (Barlow e cols., 1978; Herrenkohl e cols., 1988; Takahashi e cols., 1990).

Os resultados destes estudos mostram que os descendentes estressados prenatalmente apresentam alterações no desenvolvimento motor (Barlow e cols., 1978; Fride & Weinstock, 1984), e nos filhotes machos redução na distância ano-genital (Dahlof e cols., 1978; Moore & Power, 1986), observou-se ainda as alterações comportamentais com relação à atividade sexual com aumento do comportamento de lordose, e redução da porcentagem de copulação e ejaculação (Ward, 1972).

O estresse tipo contenção produziu nos descendentes machos, feminilização quando na idade adulta (Ward, 1984). Anormalidade similares do desenvolvimento e comportamento dos machos podem ser induzidas por tratamento materno com opióides (Badway e cols., 1981; Ward e cols., 1983), sugerindo que estes efeitos podem ser mediados pela excessiva atividade opióide induzida pelo estresse (Lim & Funder, 1983).

No teste do campo aberto, que avalia a capacidade exploratória e emocional dos animais, os descendentes machos apresentaram padrões típicos de fêmeas (aumento de ambulação e diminuição da emissão de bolos fecais) (Thompson e cols., 1962; Masterpasqua e cols., 1976).

Nos descendentes fêmeas os resultados sugerem aumento da incidência de distúrbios no ciclo estral, abortos espontâneos e hemorragias vaginais (Herrenkohl & Politch, 1978; Herrenkohl, 1979).

O estresse prenatal produz mudanças permanentes no desenvolvimento e comportamento dos descendentes que podem ser de-

vidos a alterações hormonais ocorridas na mãe (Ward, 1984).

Mesmo eventos estressantes brandos (manipulação, aglomeração) durante a gravidez, podem levar a liberação de ACTH, e assim aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona (Pfister & Muir, 1989). Assim, a corticosterona liberada pela mãe atravessa a barreira placentária e pode influenciar diretamente o desenvolvimento neuronal do feto (Szuran e cols., 1991).

É possível que os hormônios hipofisários-adrenais liberados da mãe alcancem o hipocampo fetal num período crítico do desenvolvimento e assim possam causar alterações permanentes na reatividade do eixo H.H.A. (Sapolsky e cols., 1984). Estas alterações podem resultar em mudanças comportamentais, particularmente sob condições estressantes (Weinstock e cols., 1988).

Sabe-se ainda que concentrações de hormônios da hipófise e adrenal liberados durante o estresse são diferentes em animais estressados prenatalmente e controles (Politch e cols., 1978; Peters, 1982).

Os níveis de aminas cerebrais encontram-se modificados a 5-hidroxitriptamina (5H-T) em todo o cérebro (Plaut e cols., 1972), e noradrenalina (NA) em algumas regiões cerebrais associadas com a secreção de gonadotrofinas e a regulação do comportamento sexual (Moyer e cols., 1978).

Moyer e cols. (1978) sugerem que o estresse prenatal pode modificar a organização neuroanatômica e bioquímica do cérebro dos descendentes machos e fêmeas, e ainda nos machos direcionar o desenvolvimento cerebral para a feminilização.

A via noradrenérgica que mais sofre mudanças durante o estresse é o ramo ascendente ventral (o núcleo preoptico medial, hipotalamo anterior e o feixe mediano do telencéfalo). Neste ramo observa-se uma diminuição de níveis basais de dopamina (DA). Estas regiões coincidem com aquelas em que a depleção de catecolaminas tem sido implicada primordialmente em desordem afetiva em humanos (Moyer, 1978).

Moyer (1977) postula ainda que a alta incidência de certas doenças mentais ocorre quando há flutuação de hormônios sexuais e catecolaminas (período pós-parto e menopausa) segue uma interrelação entre hormônios femininos, catecolaminas e estado psicológico.

As informações sugerem que a exposição da mãe ao estresse durante o período gestacional apresenta influência significativa no desenvolvimento do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e do sistema hipotálamo-hipofise-gonadal (HHG) que podem ser o elo das alterações comportamentais (Takahashi e cols., 1990).

II. OBJETIVO DO TRABALHO

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do estresse prenatal brando crônico imprevisível nas fêmeas e no desenvolvimento somático e neurocomportamental dos descendentes. Na idade adulta o comportamento dos descendentes machos foi avaliada aplicando-se testes como o campo aberto, a natação forçada e o desamparo aprendido.

III. MATERIAIS E METODOS

1. Animais

Foram utilizadas ratas fêmeas nulíparas da cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) com 3 meses de idade, fornecidas pelo biotério central da UNICAMP.

As fêmeas foram mantidas em grupos de 2 em gaiolas de arame medindo 30x16x19 cm, e submetidas a período de adaptação de 10 dias no biotério do departamento de farmacologia, sob temperatura ambiental $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Foi mantido ciclo 12h claro 12h/escuro, foram fornecidas alimentação (ração Nuvilab) e água *ad libitum*.

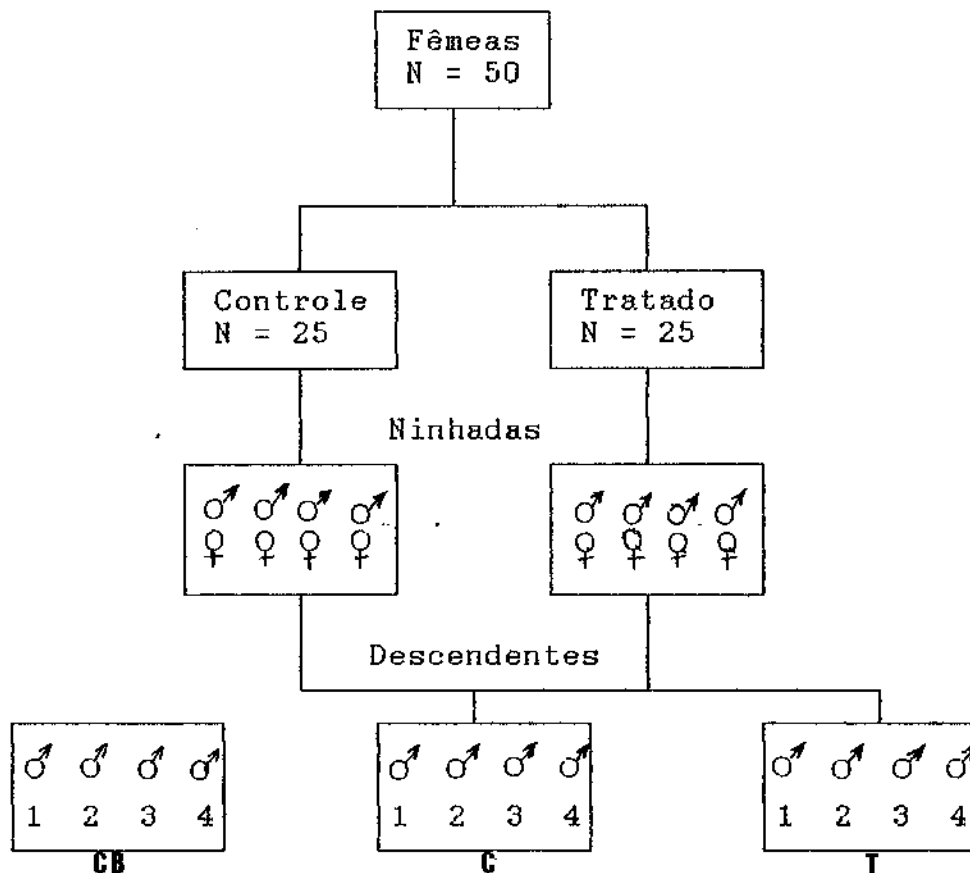
Utilizou-se a seguinte divisão de grupos experimentais:

1. Grupo Controle: Fêmeas mantidas sob condições ambientais descritas acima, sem qualquer manipulação durante o período gestacional.

2. Grupo Tratado: Fêmeas submetidas a regime de estresse brando crônico imprevisível, segundo Willner (1987), durante a 2ª e 3ª semana de gestação.

Para controle de possível interferência do estresse da manipulação na infância, no comportamento da idade adulta dos descendentes, acrescentou-se um grupo de animais nascidos de fêmeas não estressadas e não manipulados durante a infância (grupo controle branco - CB).

Organograma dos Grupos Experimentais



- 1 - Teste de Campo Aberto
- 2 - Teste de Natação Forçada
- 3 - Teste do Desamparo Aprendido (sub-grupo CC)
- 4 - Teste do Desamparo Aprendido (sub-grupo NC)

2. Equipamentos

2.1. Aparelho de teste de campo aberto

O aparelho de teste consiste em um círculo de madeira de 85 cm de diâmetro, totalmente cercado de um anteparo e madeira na altura de 32 cm. O aparelho todo é revestido de pintura na cor branca. O fundo desta arena, tem desenhado em linhas negras, 3 círculos concêntricos, interceptados por 9 segmentos de retas radiais, desta maneira, o chão do campo aberto fica subdividido em

19 regiões de áreas iguais.

Circundando este sistema, há uma estrutura metálica a uma altura de 110 cm do piso do aparelho, que suporta 2 lâmpadas de 100 watts. A estrutura metálica e as lâmpadas são cobertas por um cortinado de tule, que destina-se a impedir que o experimentador seja visto pelo animal do interior do campo aberto. Ao lado do aparelho, foi colocado um circulador de ar que manteve a temperatura da sala constante e gerou um ruído constante que abafa os ruídos externos.

2.2. Tanque do teste de natação forçada

Foi utilizado um tanque de vidro (30 cm de altura por 20 cm de diâmetro), completo com água de torneira até a altura de 19 cm, mantido em temperatura ambiente.

2.3. Caixa de choque do teste do desamparo aprendido

2.3.1. Choques Escapáveis

A *shuttle box* utilizada corresponde a uma caixa de alumínio medindo 50x29x29 cm com tampa e parede frontal de acrílico transparente, modelo "vai e vem". A caixa é dividida em dois compartimentos iguais, separados por uma placa de alumínio, onde há um orifício retangular de 7,5 cm de altura por 6,0 cm de largura, distante 8,0 cm acima do piso de barras da caixa, que permite a locomoção do animal de um compartimento ao outro da caixa.

Cada compartimento possui 2 fotocélulas, distando 6,0 cm uma da outra, que são sensíveis (por interrupção do feixe de

luz) ao movimento do animal entre os compartimentos.

Deste modo, foi possível registrar o tempo de travessia do animal de um compartimento para o outro, além de registrar também presença no compartimento em que o mesmo se localiza num dado momento da sessão. Estas informações são dirigidas automaticamente ao aparelho de comando programável (Albarsch) que libera os choques.

O piso é composto por barras de latão de 0,3 cm de diâmetro, distando 1,0 cm entre sí, através das quais os choques elétricos foram ministrados com mecanismos *scrambler*.

2.3.2. Choques inescapáveis

Para a realização da sessão de incontrolabilidade, utilizou-se como fonte geradora de choque um gerador (marca Albarsch) não programável.

Este gerador manual foi conectado a uma caixa medindo 25x20x20 cm (caixa de choques) tendo a parede frontal de acrílico transparente, as restantes, eram de alumínio com tampa no teto. O piso consistia de 15 barras de latão medindo 0,3 cm de espessura distante 1,0 cm uma da outra, através das quais os choques inescapáveis eram ministrados.

3. Procedimentos Experimentais

3.1. Acasalamento

Após o período de adaptação, ratos machos da cepa Wistar (*Rattus norvegicus*), com 5 meses de idade foram colocados um em cada gaiola (na proporção de 2 fêmeas para 1 macho) por 3

dias com finalidade de acasalamento.

Foi considerado dia 0 de gravidez, o dia em que observou-se um tampão de esperma na vagina das fêmeas.

Posteriormente a identificação do tampão de esperma na vagina, as fêmeas foram isoladas e randomicamente distribuídas entre os grupos controle e tratado. As gaiolas das fêmeas foram identificadas com etiquetas no dia 0 (zero) de gravidez para aplicação temporal adequada do protocolo de estresse e observação das ninhadas.

3.2. Exposição ao regime de estresse

O regime de estresse que começou sempre no dia 7 de gravidez (2ª semana), incluiu período de privação de água e alimentação, iluminação ambiental contínua, inclinação da gaiola, agrupamento de animais, gaiola úmida, exposição a sala resfriada, barulho intermitente de 85 db, luz estroboscópica, garrafas vazias após privação de água, acesso restrito a alimentação, odor novo e objetos estranhos na gaiola (pedaços de madeira/plástico). A intensidade de alguns agentes estressores aumentou gradativamente na 2ª semana do regime (Ex: a inclinação da gaiola foi de 30° para 50°, o agrupamento médio de 2 para 3 animais por gaiola). Para maiores detalhes, vide Willner (1987) e Anexo 1.

No 20º dia pós cruzamento o regime de estresse foi suspenso. Fêmeas de ambos os grupos foram então colocadas em gaiolas de criação de polietileno medindo 30x17x13 cm, forradas com serragem baixa de pinus, água e ração *ad libitum* para

provável parto. Nesta data as fêmeas foram inspecionadas 2 vezes ao dia (às 9:00 e às 15:00 horas) para verificação do nascimento dos filhotes.

3.3. Avaliação ponderal das fêmeas

As fêmeas foram submetidas a pesagem após o cruzamento (no dia da divisão dos grupos experimentais - dia 0 de gravidez) e no 20º dia pós cruzamento, antes de serem isoladas nas caixas de criação.

A evolução ponderal (crescimento mínimo de 30 g por semana) como critério de prenhez não foi considerada para evitarmos o sacrifício equivocado das fêmeas que estivessem grávidas. Apesar de uma possível evolução ponderal inferior, mantivemos todas as fêmeas, até a data prevista para o nascimento dos filhotes.

3.4. Adoção das crias

Ao nascimento, as ninhadas do grupo tratado foram adotadas por fêmeas do grupo controle que foram engravidadas com a finalidade única de adotarem as crias deste grupo. Foram utilizadas apenas as fêmeas adotivas que pariram no mesmo dia que as tratadas. As fêmeas do grupo tratado e as crias das fêmeas controle foram sacrificadas.

3.5. Avaliação do desenvolvimento das ninhadas

Os filhotes foram observados desde o nascimento até a

idade adulta (aos 3 meses de idade). Em determinados períodos do crescimento foram realizados testes com o intuito de avaliar a integridade e o desenvolvimento físico e comportamental.

As ninhadas dos 2 grupos experimentais foram contadas, tiveram o sexo determinado e inspecionadas quanto a malformações, números de descendentes natimortos, pesadas e efetuada a medição da distância ano-genital dos machos. Posteriormente as ninhadas foram reduzidas a 8 filhotes, contendo se possível a mesma quantidade de machos e fêmeas.

3.5.1. Evolução ponderal

Foi realizada pesagem dos filhotes ao nascimento e nas idades de 7, 14, 21 e 28 dias de vida. Tais datas foram padronizadas em nosso laboratório em estudos piloto, como as melhores para o registro das observações que se seguem.

3.5.2. Desdobramento de orelhas

Observação realizada no 29 dia de idade. Considerou-se positivo o fenômeno somente quando as duas orelhas estivessem totalmente desdobradas

3.5.3. Abertura de olhos.

Observação realizada no 149 dia de idade. Considerou-se positivo o fenômeno, somente quando os dois olhos estivessem completamente abertos.

3.5.4. Descida de testículos

Observação realizada no 289 dia de idade. Considerou-se positivo o fenômeno, somente quando os testículos estivessem completamente na bolsa escrotal.

3.5.5. Abertura de vagina

Observação realizada no 46º dia de idade.

Considerou-se positivo o fenômeno somente quando a vagina estivesse completamente aberta.

3.5.6. Reflexo postural

No dia do nascimento, o filhote foi colocado em posição de decubito dorsal e então, registrou-se a latência com que o animal recuperou a postura de decubito ventral, virando e apoiando-se com as quatro patas sobre a bancada, no limite máximo de 60 segundos. Se o animal não conseguisse realizar a tarefa no tempo determinado, considerava-se a resposta negativa.

3.5.7. Recuperação de filhotes

No segundo dia de vida dos filhotes, mães e crias foram submetidas a teste que depende da emissão de ultrassom pelas crias e do comportamento materno. No momento do teste, transferiu-se mãe e ninhada da gaiola de criação para outra gaiola de polietileno medindo 49x34x16 cm, com serragem baixa de pinus, tampa, sem água e sem ração, deixando-a adaptar-se e constituir um ninho, por 20 minutos. Após este período retirou-se somente a fêmea e foi mudada a posição da ninhada, com parte da serragem circundante do ninho, para o lado diametralmente oposto da gaiola. Em seguida, foi recolocada a fêmea ao centro da caixa de teste e registrou-se a latência que esta levava, para recuperar do primeiro ao último filhote, levando-os de volta ao ninho inicialmente construído. O período máximo de observação deste comportamento foi de 15 minutos.

Para fêmeas que não fizeram o ninho, e aquelas que o fizeram e não recuperaram todos os filhotes, considerou-se resposta negativa. As fêmeas que recuperaram suas crias no prazo estipulado de 15 min, considerou-se resposta positiva. Calculou-se através da média de recuperação de filhotes a latência média por cria da recuperação.

3.5.8. Coordenação motora

Foi realizado aos 21 dias de idade o teste de rota-rod como descrito por Vorhees (1979). Neste teste, os animais foram apoiados numa barra de 3 cm de diâmetro, que girava a velocidade constante de 20 rotações por minuto. Registrou-se o tempo que o animal levava desde que era colocado na barra em rotação até cair na bancada, no tempo máximo de 60 segundos.

A resposta positiva foi dada aos animais que conseguiram permanecer na barra até o limite estipulado.

3.5.9. Reação ao som

Para avaliar a reação auditiva dos animais como descrito por Vorhees (1979), aos 21 dias de idade colocou-se um filhote de cada vez em sala isolada de ruído externo, a 1 segundo de som, tipo campainha, liberando ruído de aproximadamente 80 db. Se o animal demonstrasse algum sinal de alerta frente ao som, considerou-se resposta positiva.

3.6. Avaliações comportamentais na idade adulta

Na idade adulta animais dos 3 grupos experimentais foram isolados em gaiolas de arame medindo 30x16x19 cm, por 3 dias

antes de serem testados. Os testes foram realizados no período da tarde (13:30 - 17:30).

Para cada teste foi sorteado um filhote macho por ninhada, desta forma cada descendente passava apenas por um teste comportamental.

No intervalo entre os animais a serem testados limpávamos o aparelho de treino/teste com álcool a 70%, afim de evitarmos que qualquer pista odorífera pudesse interferir no comportamento do animal a ser testado posteriormente.

3.6.1. Exploração e Emocionalidade

Efetuuou-se teste de campo aberto aos 60 dias de idade, conforme descrito por Meisel (1979).

O teste consistiu na exposição individual do animal à arena, por 3 minutos, e iniciou-se pela colocação do animal no centro da arena, com as luzes acesas e o circulador de ar ligado. O cortinado de tule foi então fechado e registrou-se o número de espaços invadidos (ambulação) e a movimentação vertical (levantar-se), avaliada pelo número de vezes que o animal apoiou-se nas patas traseiras. Registrou-se também o tempo de centro (tempo que o animal demorou para deixar o centro da arena), e o número de bolos fecais emitidos até o final da sessão.

3.6.2. Natação forçada

Aos 60 dias de idade, cada animal foi colocado para nadar em um tanque de vidro, completo com água de torneira até a altura de 19 cm, mantido em temperatura ambiente.

Após 15 minutos, o animal foi retirado do tanque e

permitido que secasse por 15 minutos em compartimento aquecido (30º) antes de retornar ao biotério.

Este animal retornava ao tanque de nataçãõ 24 horas após a primeira exposiçãõ. Registrou-se o comportamento de nataçãõ conforme descrito por Forsolt (1977) durante 5 minutos. Durante este período de tempo cronometrou-se cumulativamente o período em que o animal flutuava passivamente na água - tempo de imobilidade, realizando apenas pequenos movimentos para manter-se com a cabeça acima da superfície da água. Registrou-se também o período de tempo que o animal levava para iniciar a imobilidade - tempo inicial de imobilidade.

3.6.3. Desamparo aprendido

Conforme descrito por Seligman (1975) e Weiss (1981) procedeu-se a induçãõ do desamparo aprendido nos animais aos 90 dias de idade.

Foram utilizadas 2 animais de cada ninhada para sessãõ de induçãõ de desamparo aprendido. Estes animais foram divididos em dois grupos.

A: Grupo submetido previamente ao choque (CC) - Animais submetidos a choques inescapáveis pelo período de 30 min.

B: Grupo confinado (NC) - Animais apenas confinados por 30 min, mas não recebendo choque.

A induçãõ do desamparo foi iniciada pelo confinamento dos animais do grupo NC. Vinte e quatro horas após este confinamento os animais deste grupo eram colocados em uma *shuttle box* e submetido à sessãõ de fuga (choques escapáveis).

Nesta data 2 animais eram manipulados simultaneamente, um animal do grupo NC, que era submetido a sessão de fuga em uma *shuttle box* e outro animal do grupo CC pareado (yoked) que recebia em outra caixa, choques inescapáveis pelo mesmo período, intensidade e intervalo de choques que o animal do grupo NC.

Vinte e quatro horas após, somente os animais do grupo CC eram expostos à *shuttle box* para desempenho da tarefa de fuga (choques escapáveis).

As 30 primeiras latências da sessão do grupo NC foram então comparadas a latência da tarefa de fuga do grupo CC.

Choques escapáveis - sessão de fuga

A sessão foi iniciada com a colocação do animal no compartimento direito da *shuttle box*. O aparelho gerador de choques (Albarsch) foi programado para liberar o primeiro choque somente após decorrer um tempo de 3 minutos (início da sessão) afim de que o animal pudesse se acostumar às condições da caixa e explorá-la.

Decorrido o tempo de 3 minutos, foi liberado um primeiro choque de 1,0 mA através das barras de latão do assoalho da caixa.

Os próximos choques, todos de 1,0 mA, foram ministrados sempre no compartimento em que se encontrava o animal, até um total de 60 choques.

A resposta exigida do animal para o término do choque foi a de saltar de um compartimento para o outro. Registrava-se o tempo desde o início de cada choque, até o término deste (latên-

cia de fuga ou tempo de choque).

O tempo máximo de duração por choque foi de 30 segundos sendo que se o animal não cruzasse os compartimentos, novo choque era imediatamente iniciado. O cronômetro, uma vez alcançado o valor de 30 segundos, voltava automaticamente ao zero e iniciava imediatamente nova contagem de latência.

Os choques foram ministrados randomicamente em intervalos de 12 a 50 segundos.

Choques inescapáveis

A sessão foi iniciada simultaneamente com a sessão de fuga. Após o início do choque na *shuttle box* ministrava-se manualmente e simultaneamente um choque na caixa de choques inescapáveis.

A cada resposta de fuga emitida pelo animal na sessão de fuga, desligava-se manualmente e simultaneamente o choque na caixa de choques inescapáveis.

Dessa maneira, o animal do grupo CC recebia também 60 choques de 1,0 mA de intensidade e de mesma duração dos animais do grupo NC, porém, os choques não eram contingentes a nenhuma resposta do animal, sendo portanto incontroláveis.

Tarefa de Fuga

Para o desempenho de tarefa de fuga, utilizou-se a mesma *shuttle box* e procedimento descrito para sessão de fuga. Esta sessão entretanto encerrava com 30 choques.

4. Análise Estatística

Para análise foi realizado estatística paramétrica e não paramétrica e admitiu-se para probabilidade de erro $\alpha = 5\%$.

Utilizou-se para comparação de 2 grupos o Teste de Qui Quadrado de Pearson (Agresti, 1990), no número de fêmeas que recuperaram os filhotes.

O Teste das Probabilidades de Fisher (Agresti, 1990) foi utilizado para comparar 2 grupos quanto a ocorrência de natimortos nas ninhadas, número de ninhadas que responderam positivamente ao teste de reflexo postural e rota-rod, desdobramento de orelhas, abertura de olhos e número de filhotes machos com descida de testículos, aos 28 dias.

O Teste t de Student (Snedecor, 1980) foi utilizado para comparação de médias de 2 grupos quanto à distância ano-genital, número de filhotes nascidos vivos nas ninhadas, número de machos/fêmeas, latência para realização do teste de reflexo postural, latência por cria para recuperação de filhotes e evolução ponderal dos filhotes.

A Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para comparar os grupos quanto a evolução ponderal das fêmeas e no teste de campo aberto para variável tempo de centro.

O Teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os grupos nas variáveis de ambulação, levantar-se, emissão de bolos fecais e tempo de imobilidade.

Nos resultados do desamparo aprendido a análise foi

feita dividindo-se as sessões de teste, em blocos de 5 tentativas. A cada bloco correspondeu uma média aritmética das latências de fuga obtidas. Utilizou-se Análise de Variância Multivariada (MANOVA) para dados emparelhados, seguido de testes estatísticos multivariados (Pillai, Hotelling, Wilks e Roy)

IV. RESULTADOS

Nos dados referentes às fêmeas verificou-se pela comparação dos ganhos de peso (Tabela 1) que não houve diferença entre os grupos com relação ao peso inicial ($F(3,74)=0,97$ $p=0,41$), no entanto o estresse prenatal reduziu a evolução ponderal, quer as fêmeas estivessem grávidas ou não ($F(1,74)=130,47$, $p \leq 0,001$). Na análise da interação estresse x gravidez, também houve diferença significativa ($F(1,74)=7,87$, $p \leq 0,001$).

Nos resultados do teste de recuperação de filhotes representado na Tabela 2, não foi observado diferença quanto ao número de fêmeas que conseguiram recuperar (positivo) ou não (negativo) as crias nos grupos controle e tratado ($X^2=1,22$, $p=0,269$); na latência média de recuperação por cria não foi verificada diferença estatística entre os grupos ($t=0,69$, $p=0,49$).

TABELA 1: Efeito do Estresse Prenatal na Evolução Ponderal das Fêmeas.

Grupo	Dia 0	Dia 20
Controle não grávida	208,80 $\pm$ 3,52	229,53 $\pm$ 6,73
Tratado não grávida	204,92 $\pm$ 3,77	189,15*** $\pm$ 3,24
Controle grávida	201,96 $\pm$ 3,15	271,68 $\pm$ 5,77
Tratado grávida	201,36 $\pm$ 3,16	209,16*** $\pm$ 4,03
*** Estatisticamente significativo em relação aos respectivos controles ($p \leq 0,001$; ANOVA)		

TABELA 2: Efeito do Estresse Prenatal.

Grupo	Recuperação		N
	Sim	Não	
Controle	22	3	25
Tratado	19	6	25
Total	41	9	50

Os valores representam o número de fêmeas que conseguiram recuperar suas crias (Sim) ou (Não).
N indica o número de ninhadas.

Quanto ao tamanho da ninhada (Tabela 3) foi observado que o número total de filhotes nascidos vivos foi menor no grupo tratado ($t=2,80$; $p \leq 0,01$), sendo que houve redução marcante no número de filhotes machos ($t=5,77$; $p \leq 0,001$). No número de filhotes fêmeas não houve diferença entre os grupos comparados ($t=0,23$; $p > 0,05$)

TABELA 3: Efeito do Estresse Prenatal no tamanho da ninhada

Grupo	Total	Machos	Fêmeas	N
Controle	10,72 $\pm$ 1,56	5,36 $\pm$ 2,28	5,12 $\pm$ 1,69	25
Tratado	9,20 $\pm^{**}$ 2,29	3,80 $\pm^{***}$ 1,35	5,00 $\pm$ 2,02	25

$**$, $***$ Estatisticamente significativo em relação aos respectivos controles ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$; t-Student)
Os números representam a média $\pm$ desvio padrão do número de filhotes.
N indica o número de ninhadas

Quanto a ocorrência de natimortos nas ninhadas foi observado que 12% das ninhadas estressadas, e 8% das ninhadas controle apresentaram filhotes natimortos. No entanto não houve diferença estatisticamente significativa no índice de natimortos entre os grupos comparados ($p=0,82$).

Pode-se verificar pela Tabela 4 que o estresse reduziu a distância ano-genital dos filhotes machos ($t=18,03$; $p \leq 0,001$)

TABELA 4: Efeito do Estresse Prenatal na Distância Ano-Genital (Dia 0) dos filhotes machos.

Grupo	Distância ano-genital	N
Controle	$0,32 \pm 0,03$	25
Tratado	$0,19 \pm 0,02^{***}$	25

*** estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p \leq 0,001$; t-Student)

Os números representam a média $\pm$ desvio padrão da distância ano-genital.

N indica o número de ninhadas

Nos resultados referentes aos parâmetros de desenvolvimento das ninhadas, utilizou-se o critério de que a ninhada receberia a pontuação positiva somente se 5 filhotes, ou seja, mais que 50% dos filhotes da ninhada respondessem positivamente ao teste ou índice de avaliação de crescimento.

No teste de reflexo postural (Tabela 5) verificou-se que 92% das ninhadas responderam positivamente ao teste, ou seja as crias conseguiram recuperar a postura decúbito ventral e apoiar as quatro patas sobre a bancada. Entretanto não observou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,172$), entre

grupo controle e tratado. Ao se comparar as latências médias por filhotes para a realização do teste (Tabela 6), verificou-se que crias do grupo estressado readquirem a postura mais rapidamente ($t=2,80$; $p \leq 0,01$).

TABELA 5: Efeito do estresse prenatal no teste de reflexo postural.

Grupo	Negativo	Positivo	N
Controle	3	22	25
Tratado	3	24	25
Total	4	46	50

Os valores representam o número de ninhadas cujos filhotes responderam positivamente (+) ou negativamente (-) ao teste. N indica o número de ninhadas

TABELA 6: Efeito do estresse prenatal na realização do teste reflexo postural

Grupo	Latência para recuperar a postura	N
Controle	21,07 $\pm$ 12,52	25
Tratado	12,97 $\pm$ 7,29**	25

** Estatisticamente significativo em relação grupo controle ($p \leq 0,01$; t-Student)

Os números representam a média $\pm$ desvio padrão da latência (em segundo) da realização do teste.

N indica o número de ninhadas.

Pelos dados da Tabela 7 verificou-se que houve um maior número de ninhadas (48%) do grupo estressado com orelhas desdobradas na data crítica ($p=0,013$).

TABELA 7: Efeito do estresse prenatal no desdobramento de orelhas (dia 2).

Grupo	Negativo	Positivo	N
Controle	9	16	25
Tratado	1**	24**	25
Total	10	40	50

** Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p \leq 0,01$; Fischer)
 Os valores representam o número de ninhadas cujos filhotes desdobraram (positivo) ou não (negativo) as orelhas.
 N indica o número de ninhadas.

Observou-se pela Tabela 8 que a abertura de olhos também adiantou no grupo estressado ($p=0,05$).

TABELA 8: Efeito do estresse prenatal na abertura de olhos (dia 14)

Grupo	Negativo	Positivo	N
Controle	12	13	25
Tratado	4*	21*	25
Total	16	34	50

* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$; Fischer)
 Os valores representam o número de ninhadas cujos filhotes abriram (positivo) ou não (negativo) os olhos
 N indica o número de ninhadas.

No teste de Reação ao som realizado aos 21 dias de idade, observou-se que todos os filhotes das ninhadas do grupo controle e tratado apresentaram resposta positiva ao teste.

No teste do rata-rod representado na Tabela 9 não observou-se diferença estatisticamente significativa entre as ninhadas dos grupos comparados ($p=0,149$).

TABELA 9: Efeito do estresse prenatal na coordenação motora (Rota Rod).

Grupo	Negativo	Positivo	N
Controle	19	6	25
Tratado	23	2	25
Total	45	5	50

Os valores representam o número de ninhadas cujos filhotes conseguiram (positivo) ou não (negativo) realizar o teste. N indica o número de ninhadas.

A evolução ponderal (Tabela 10) sugere que as ninhadas nascem com o mesmo peso médio não apresentando diferença no ganho de peso até o 21º dia. No dia 0 ($t=0,90$), dia 7 ($t=1,56$), dia 14 ($t=0,07$), dia 21 ($t=0,10$). Após o 21º dia, ocorreu uma diferenciação no ganho de peso e no 28º dia de idade, as ninhadas do grupo tratado apresentaram um peso médio por filhote inferior as ninhadas do grupo controle ($t=2,15$; $p=0,05$).

TABELA 10:Efeito do estresse prenatal na evolução ponderal dos filhotes

Grupo	Dias de Idade					N
	0	7	14	21	28	
Controle	5,66± 0,36	14,00± 1,98	26,45± 2,63	41,62± 4,77	69,06± 6,22	25
Tratado	5,75± 0,46	14,75± 1,52	26,58± 2,49	41,74± 3,71	65,98*± 3,60	25

* Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$; t-Student)

Os números representam as médias $\pm$ desvio padrão dos pesos das ninhadas ao nascimento (Dia 0) e nos dias 7, 14, 21 e 28.

N indica o número de ninhadas

No teste de campo aberto, observou-se (Figura 2) que animais estressados/manipulados (T) e não estressados/manipulados (C) permaneceram maior tempo no centro da arena, quando comparados ao grupo não estressados/não manipulados (CB) ($F(2,25)=39,24$, $p=0,001$). O tempo de permanência no centro da arena foi cerca de 3-4 vezes maior nos grupos C e T em relação ao grupo CB. Não foi observada diferença entre os grupos C e T.

Pela Figura 3 verificou-se uma redução no número de quadrados invadidos pelos grupos C e T em relação a CB ($X^2=43,27$, $p=0,01$, $Q=31,14$, $p \leq 0,01$). Não observou-se diferença significativa quando grupos C e T foram comparados.

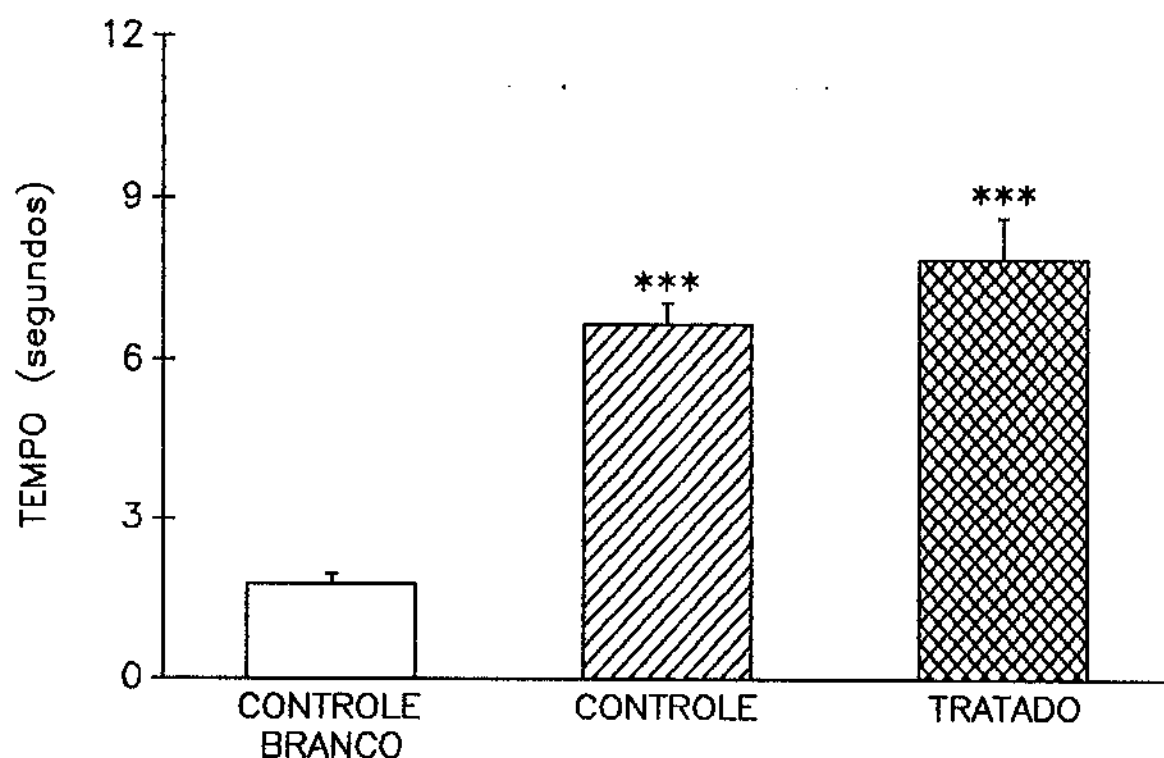


Figura 2: Teste de campo aberto. As colunas representam a média do tempo (em segundos $\pm$ EPM) de permanência dos animais não estressados prenatalmente e não manipulados na infância (CB), não estressados prenatalmente e manipulados na infância (C) e estressados prenatalmente e manipulados na infância (T) no centro da arena. Foram utilizados 25 animais por grupo
 *** Estatisticamente significativo na comparação entre os grupos CB x T ou CB x C ($p \leq 0,001$; ANOVA; teste de Duncan).

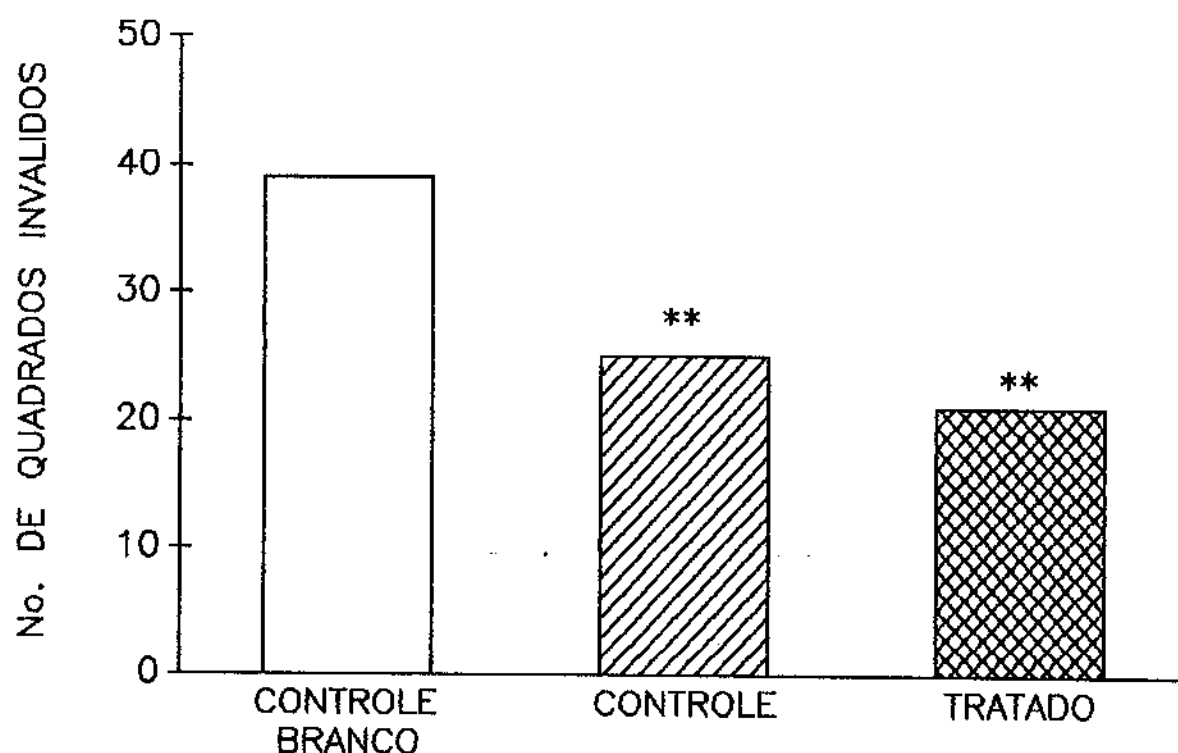


Figura 3: Teste de campo aberto. As colunas representam a mediana do número de quadrados invadidos (comportamento de ambulação) dos animais não estressados prenatalmente e não manipulados na infância (CB), não estressados prenatalmente e manipulados na infância (C) e estressados prenatalmente e manipulados na infância (T) no centro da arena. Foram utilizados 25 animais por grupo
 ** Estatisticamente significativo na comparação entre os grupos CB x T ou CB x C ($p \leq 0,01$; Kruskal-Wallis; Mann Whitney)

Na variável levantar-se (Figura 4) observou-se redução no comportamento do grupo C e T em relação ao CB ($X^2=50,82$, $p=0,001$; $Q=26,19$, $p \leq 0,01$). Não observou-se diferença estatística entre os grupos C e T.

Quanto ao número de bolos fecais (Figura 5) emitidos durante a sessão, observou-se uma redução no número de bolos fecais eliminados pelo grupo T em relação ao grupo CB ($X^2=8,34$, $p=0,01$; $Q=14,94$, $p \leq 0,01$). Não observou-se diferença estatisticamente significativa ao se comparar os grupos CB x C e C x T.

No teste da natação forçada, para a variável início de imobilidade (Figura 6), não verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos CB x C x T ($X^2=3,45$, $p=0,17$). Para a variável tempo total de imobilidade (Figura 7) também não foi verificada diferença entre os grupos CB x C x T ($X^2=0,98$, $p=0,61$).

No teste de indução de desamparo aprendido, observou-se (Figura 8) o desempenho da fuga do grupo CB e verificou-se que animais confinados (NC) e animais submetidos previamente ao choque (CC) aprenderam a tarefa de fuga. Tal aprendizado manifestou-se pela redução das latências do início (1º bloco) ao término do teste (6º bloco; t pareado NC $p \leq 0,001$, CC $p \leq 0,001$). Verificou-se também que o subgrupo NC apresentou latências menores que o subgrupo CC.

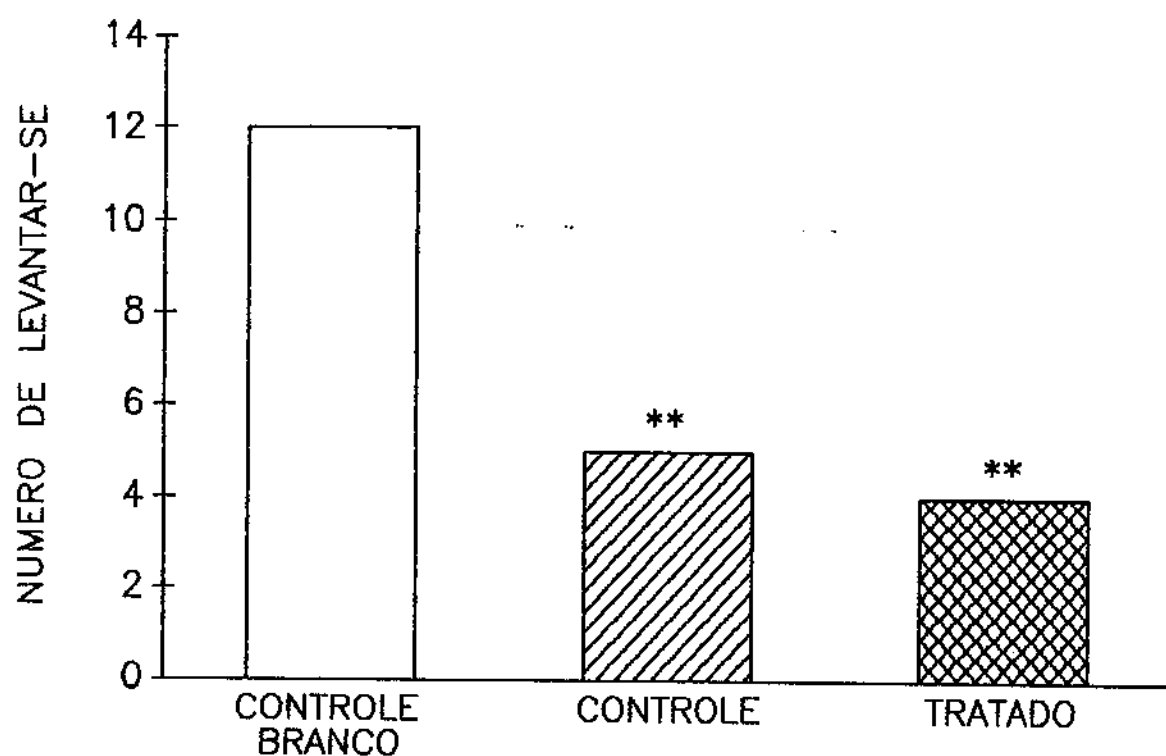


Figura 4: Teste de campo aberto. As colunas representam a mediana do número de levantar-se dos animais não estressados prenatalmente e não manipulados na infância (CB), não estressados prenatalmente e manipulados na infância (C) e estressados prenatalmente e manipulados na infância (T) no centro da arena. Foram utilizados 25 animais por grupo
 ** Estatisticamente significativo na comparação entre os grupos CB x T ou CB x C ($p \leq 0,01$; Kruskal-Wallis; Mann Whitney)

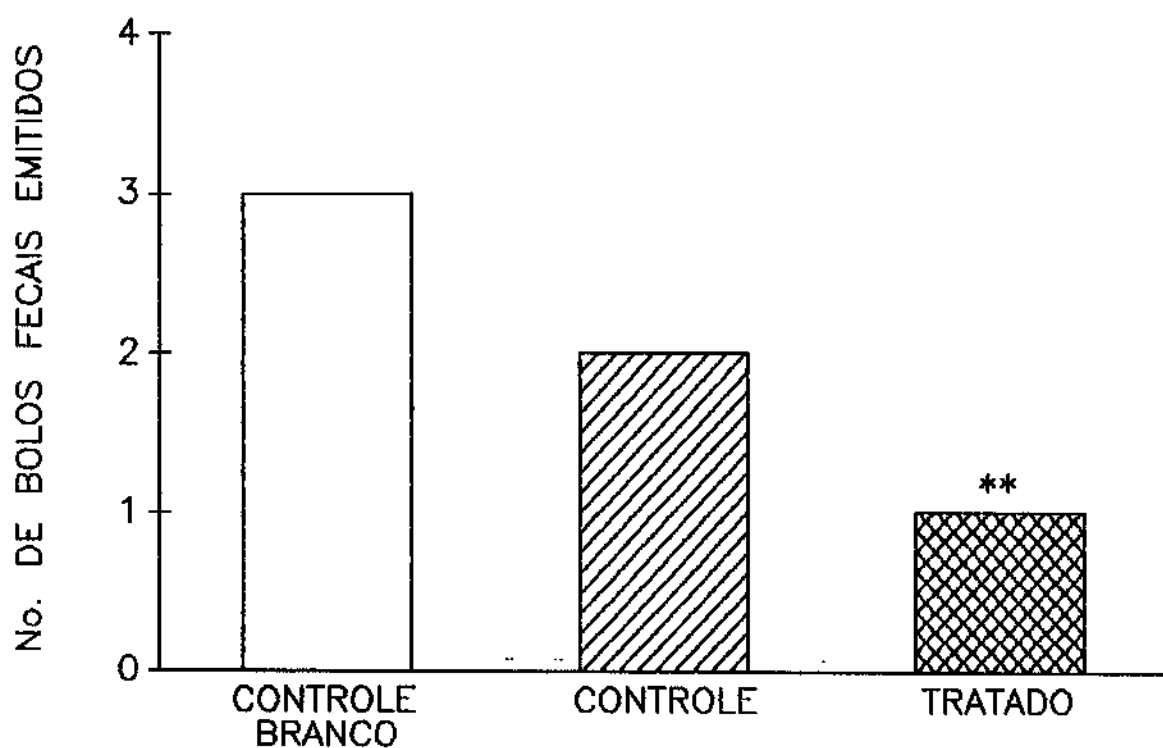


Figura 5: Teste de campo aberto. As colunas representam a mediana do número de bolos fecais emitidos dos animais não estressados prenatalmente e não manipulados na infância (CB), não estressados prenatalmente e manipulados na infância (C) e estressados prenatalmente e manipulados na infância (T) no centro da arena. Foram utilizados 25 animais por grupo
 ** Estatisticamente significativo na comparação entre os grupos CB x T ($p \leq 0,01$; Kruskal-Wallis; Mann Whitney)

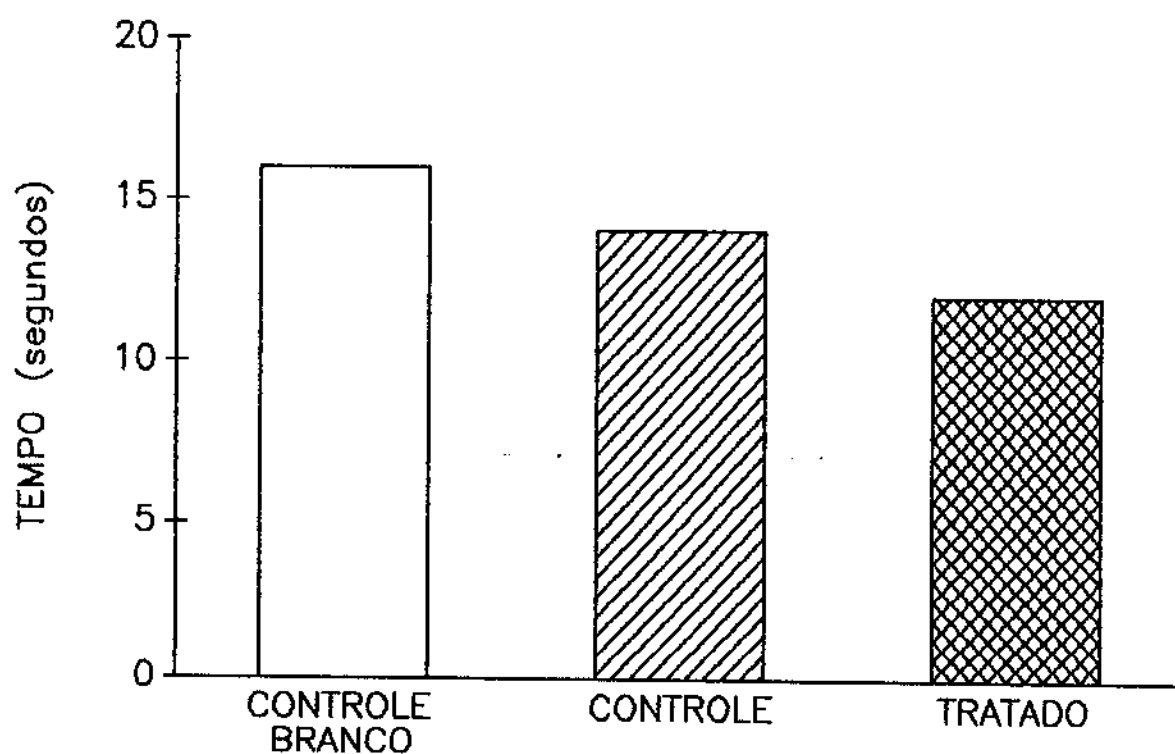


Figura 6: Teste de natação forçada. As colunas representam a mediana do tempo (em segundos) do início de imobilidade dos animais não estressados prenatalmente e não manipulados na infância (CB), não estressados prenatalmente e manipulados na infância (C) e estressados prenatalmente e manipulados na infância (T) no centro da arena. Foram utilizados 25 animais por grupo

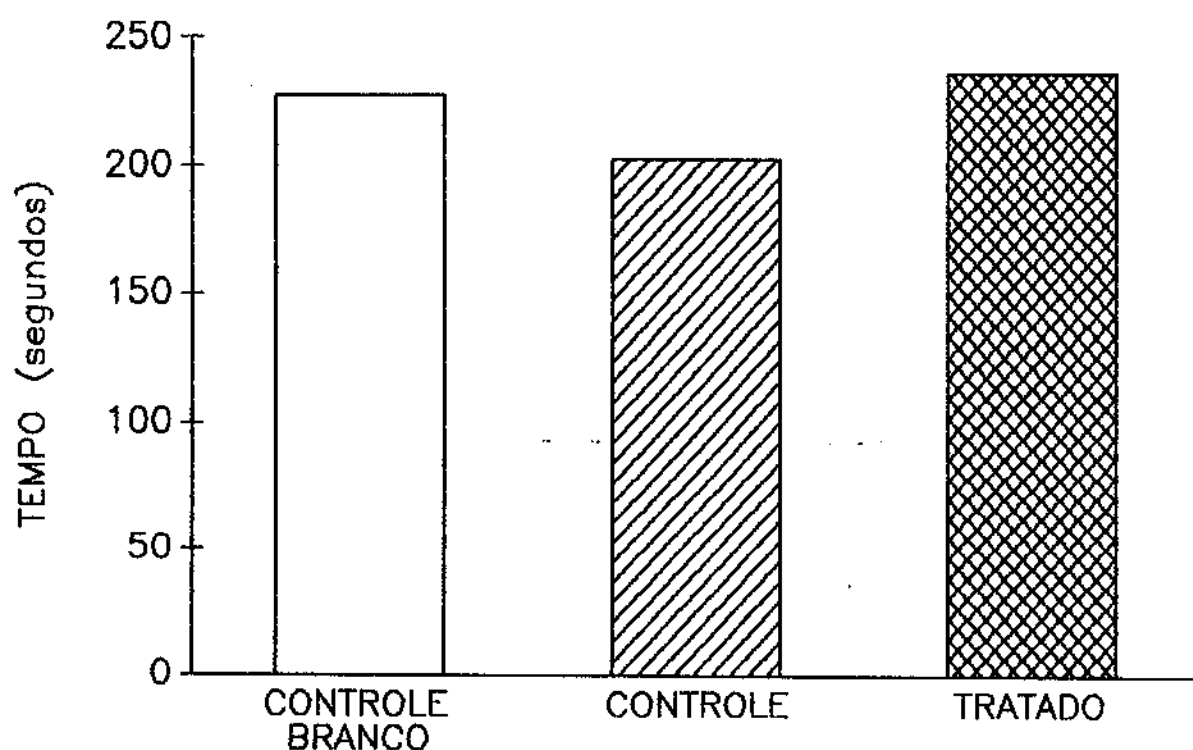


Figura 7: Teste de natação forçada. As colunas representam a mediana do tempo (em segundos) de imobilidade total dos animais não estressados prenatalmente e não manipulados na infância (CB), não estressados prenatalmente e manipulados na infância (C) e estressados prenatalmente e manipulados na infância (T) no centro da arena. Foram utilizados 25 animais por grupo

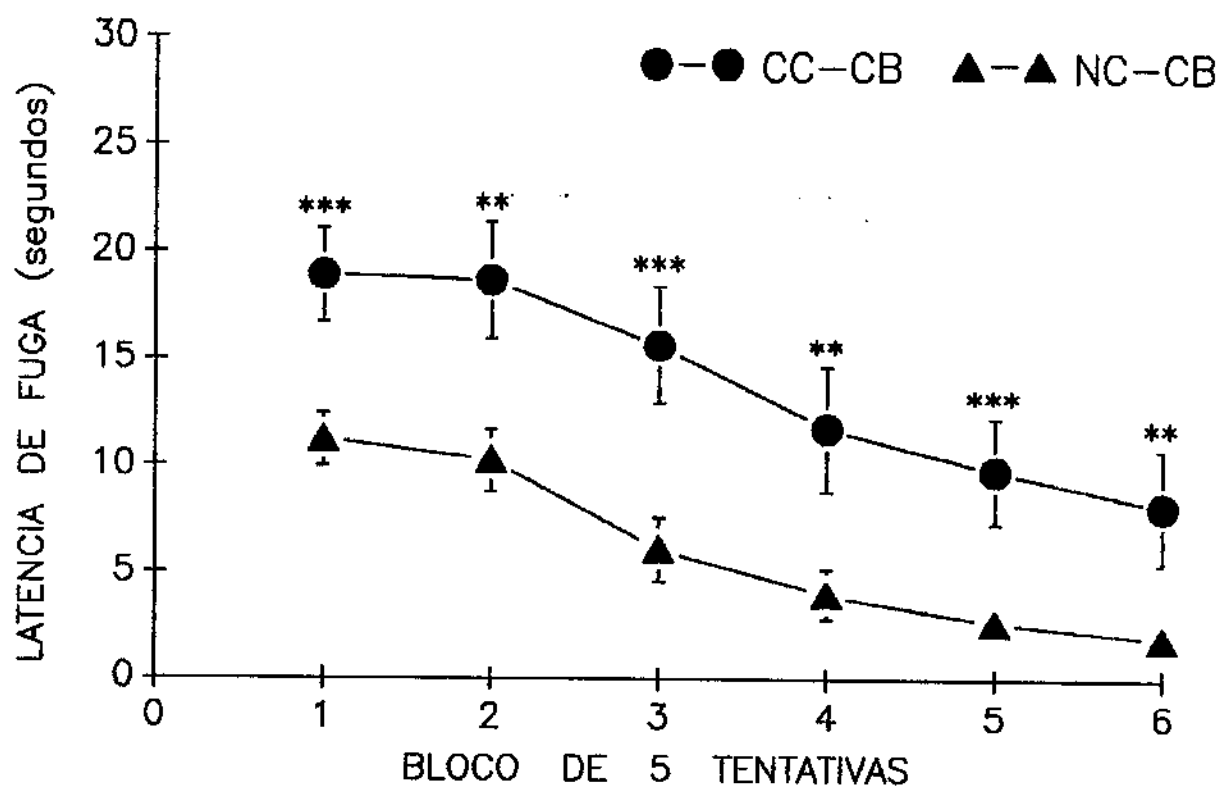


Figura 8: Teste de fuga. As curvas representam a latência média (em segundos) $\pm$ EPM da resposta de fuga, por bloco de 5 tentativas do grupo não estressado prenatalmente e não manipulado na infância (CB), dos animais expostos previamente ao choque (CC) e pré-confinados (NC). Foram utilizados 18 animais por grupo. **, *** Estatisticamente significativa em relação ao subgrupo CC ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$; MANOVA)

A comparação do desempenho de fuga entre os subgrupos NC x CC apresentou em todos os blocos diferenças estatisticamente significativas (1º bloco $F(1,36)=13,79$, $p \leq 0,001$; 2º bloco $F(1,36)=6,46$, $p \leq 0,01$; 3º bloco $F(1,36)=9,58$, $p \leq 0,001$; 4º bloco $F(1,36)=6,01$, $p \leq 0,01$; 5º bloco $F(1,36)=7,62$, $p \leq 0,001$; 6º bloco $F(1,36)=6,9$, $p=0,01$).

Na Figura 9 observou-se o desempenho de fuga do grupo C e verificou-se que ambos os subgrupos NC e CC aprenderam a tarefa de fuga, apresentando redução nas latências (1º x 6º bloco) no decorrer da sessão (t pareado NC $p \leq 0,001$, CC $p \leq 0,001$). O subgrupo NC apresentou latências menores que o sub-grupo CC.

A comparação do desempenho de fuga entre os subgrupos NC x CC apresentou alguns pontos estatisticamente significativos (MANOVA 2º bloco $F(1,36)=4,99$, $p \leq 0,01$; 3º bloco $F(1,36)=12,97$, $p \leq 0,001$; 4º bloco $F(1,36)=6,53$, $p \leq 0,01$; 5º bloco $F(1,36)=10,33$, $p \leq 0,001$; 6º bloco $F(1,36)=4,86$, $p \leq 0,01$).

Na Figura 10 observou-se o desempenho de fuga do grupo T e verificou-se que animais dos subgrupos NC e CC aprenderam a tarefa de fuga (t pareado NC $p \leq 0,001$, CC $p \leq 0,001$). O subgrupo NC apresentou latências menores que o CC.

A comparação do desempenho de fuga entre os subgrupos NC x CC apresentou em todos os blocos diferenças estatisticamente significativas (1º bloco $F(1,36)=11,8$, $p \leq 0,001$; 2º bloco $F(1,36)=9,77$, $p \leq 0,001$; 3º bloco $F(1,36)=6,63$, $p \leq 0,01$; 4º bloco $F(1,36)=11,09$, $p \leq 0,001$; 5º bloco $F(1,36)=10,92$, $p \leq 0,001$; 6º bloco $F(1,36)=10,53$, $p \leq 0,001$).

Na Figura 11 observou-se o desempenho de fuga dos 3 grupos (CB x C x T), dos animais confinados-NC e verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No entanto, os animais do grupo C apresentaram menor latência para fuga, seguido do grupo CB e posteriormente do grupo T. Todos os grupos aprenderam a tarefa de fuga, apresentando uma curva de aprendizado típica.

Na Figura 12, observou-se o desempenho de fuga dos 3 grupos (CB x C x T), dos animais submetidos previamente ao choque (CC) e verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Apesar de aprenderem a tarefa de fuga como os animais dos subgrupos NC, este subgrupo CC apresentou latências de fuga maiores.

A indução do desamparo aprendido ocorreu nos animais dos 3 grupos CB, C e T, e foi demonstrada pelo déficit no aprendizado de fuga (subgrupos CC)

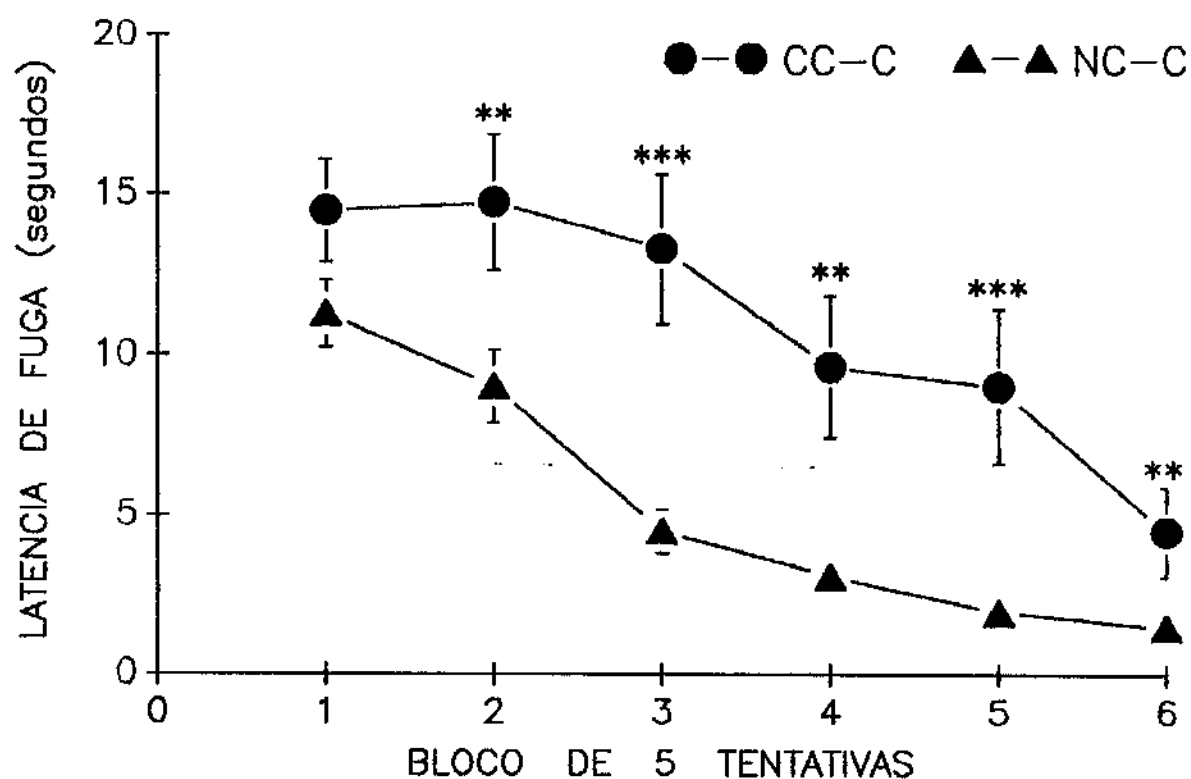


Figura 9: Teste de fuga. As curvas representam a latência média (em segundos) $\pm$ EPM da resposta de fuga, por bloco de 5 tentativas do grupo não estressado prenatalmente e manipulado na infância (C), dos animais expostos previamente ao choque (CC —) e pré-confinados (NC —). Foram utilizados 18 animais por grupo. **, *** Estatisticamente significativa em relação ao subgrupo CC ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$; MANOVA)

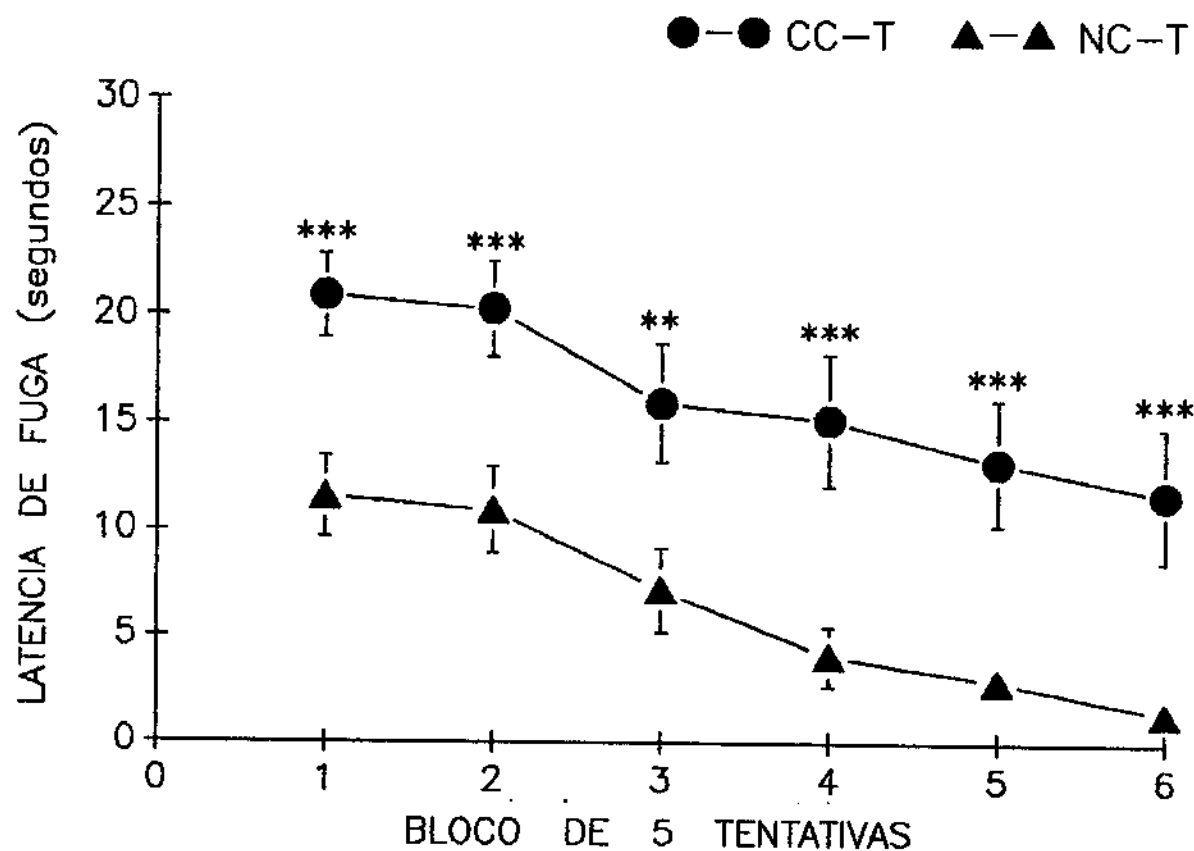


Figura 10: Teste de fuga. As curvas representam a latência média (em segundos) $\pm$ EPM da resposta de fuga, por bloco de 5 tentativas do grupo estressado prenatalmente e manipulado na infância (T), dos animais expostos previamente ao choque (CC —) e pré-confinados (NC —). Foram utilizados 18 animais por grupo. **, *** Estatisticamente significativa em relação ao subgrupo CC ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$; MANOVA)

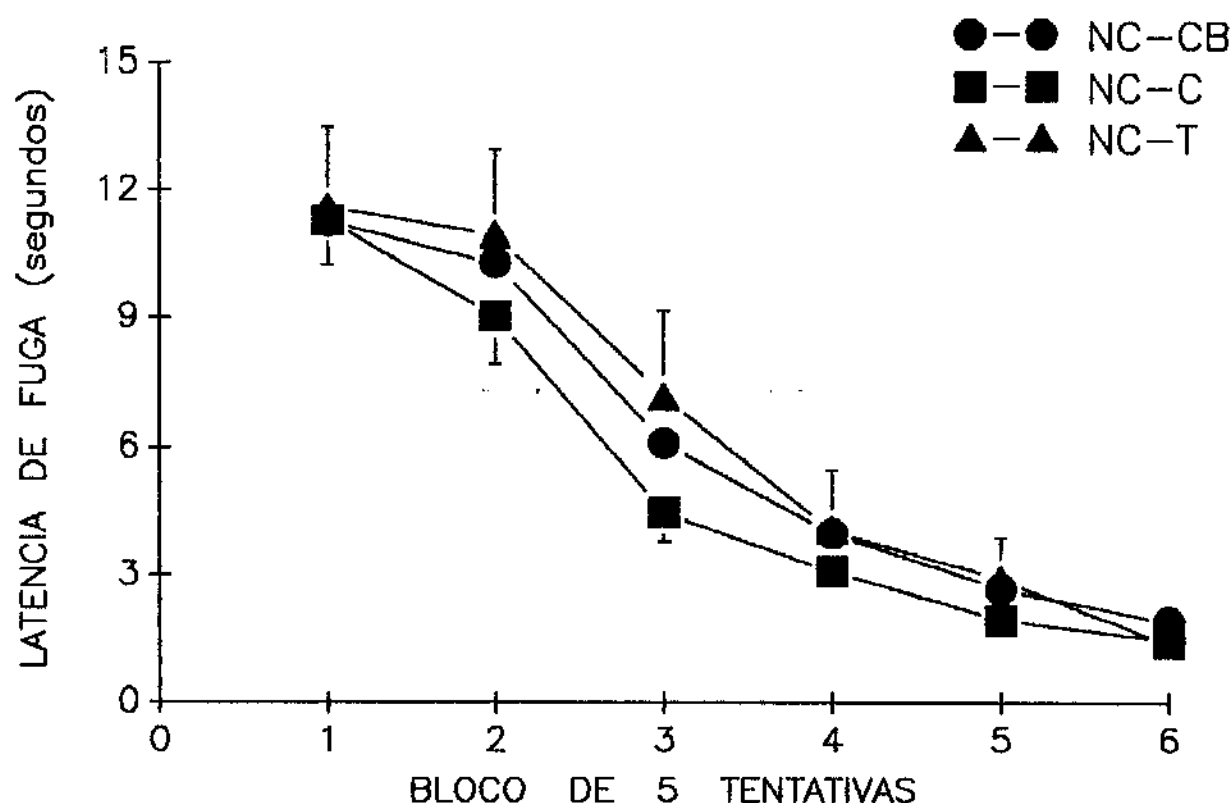


Figura 11: Teste de fuga. As curvas representam a latência média (em segundos) $\pm$ EPM da resposta de fuga, por bloco de 5 tentativas do grupo não estressado prenatalmente e não manipulado na infância (CB), não estressado prenatalmente e manipulado na infância (C) e estressado prenatalmente e manipulado na infância (T) dos animais pré-confinados (NC). Foram utilizados 18 animais por grupo.

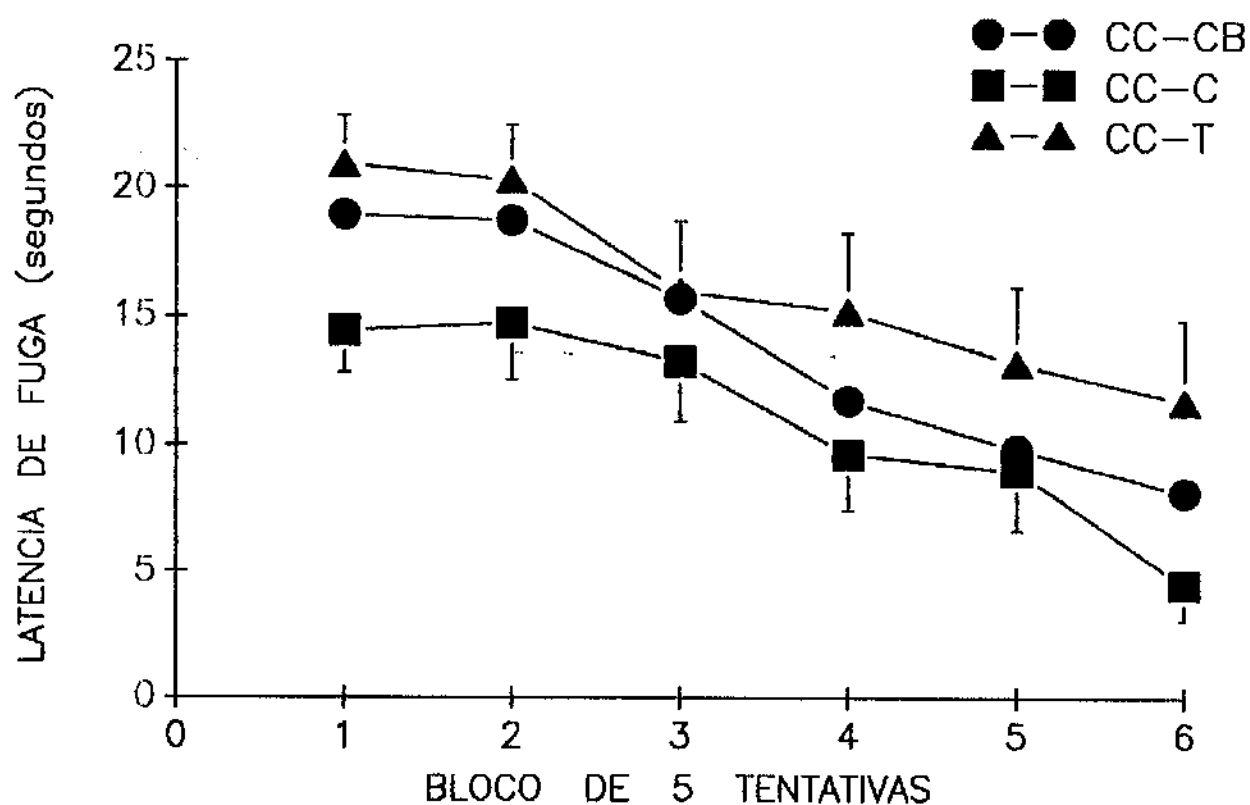


Figura 12: Teste de fuga. As curvas representam a latência média (em segundos) $\pm$ EPM da resposta de fuga, por bloco de 5 tentativas do grupo não estressado prenatalmente e não manipulado na infância (CB), não estressados prenatalmente e manipulado na infância (C) e estressado prenatalmente e manipulado na infância (T) dos animais expostos previamente ao choque (CC). Foram utilizados 18 animais por grupo.

V. DISCUSSÃO

O regime de estresse brando crônico imprevisível aplicado às fêmeas grávidas ou não, produziu redução no ganho de peso corporal. Nas fêmeas grávidas, a redução não interferiu no peso das crias ao nascimento, mas na redução do número de filhotes nas ninhadas. Importante considerar neste dado que os partos foram espontâneos, e desta forma não foi possível realizar a avaliação das perdas gestacionais (número de reabsorções, número de fetos mortos). Pois sabe-se que recém-nascidos com malformações ou com pouca vitalidade são frequentemente mortos e canibalizados pelas mães (Gleich & Froberg, 1987). Portanto a queda do peso das fêmeas, também pode estar relacionada a ocorrência de natimortos que não foram computados, pois as caixas de criação foram inspecionadas apenas duas vezes ao dia.

Estes resultados foram similares aos encontrados em regime de estresse intenso, como imobilização da fêmea (Politch & Herrenkohl, 1979) exposição da fêmea à luminosidade intensa com lâmpada de 150 watts (Kinsley & Svare, 1988).

Nas ninhadas nascidas, houve redução marcante no número de machos que demonstraram serem mais sensíveis ao estresse prenatal. Atualmente os geneticistas reconhecem que os fetos machos são mais vulneráveis aos danos, no decorrer do desenvolvimento, do que as fêmeas, que demonstram maior vigor biológico, que pode estar relacionado ao segundo cromossomo X (Kaplan & Sadock, 1993).

Segundo alguns autores (Dahlof e col., 1978; Ward, 1972) a redução da distância ano-genital dos machos pode ser um sinal de masculinização incompleta dos animais. Vários agentes estressores resultam em diminuição da produção de testosterona presumivelmente devido ao aumento de corticosteróides que causam redução de hormônios gonodotróficos (Ward & Weisy, 1984).

Anderson e cols. (1985), relatam que o estresse da contenção, causou nos descendentes do rato redução da distância ano-genital e redução aproximadamente de 50% da área do núcleo de dimorfismo sexual na região pré-ótica do hipotálamo dos descendentes machos. A normalidade semelhante deste desenvolvimento sexual de machos, foi produzida pelo tratamento materno com opióides (Badway e cols., 1981; Ward e cols., 1983) sugerindo que os efeitos podem ser mediados pela excessiva atividade opióide induzida pelo estresse (Lim & Funder, 1983).

Em humanos, a presença ou não da testosterona no feto é fator determinante no desenvolvimento dos órgãos genitais e as características secundárias masculinas. Supõe-se que a redução da distância ano-genital dos descendentes machos neste estudo, esteja relacionada a atividade opióide induzida pelo estresse brando crônico imprevisível.

O estresse prenatal brando crônico imprevisível causou alterações em alguns parâmetros do desenvolvimento somático e neurocomportamental das crias, acelerando a realização do teste de reflexo postural, adiantamento no desdobramento de orelhas e abertura de olhos. Estes resultados contrastam com alguns autores

que relatam que o desenvolvimento pode ser acelerado ou retardado, dependendo do tratamento a que os animais foram submetidos (Silva, 1991). A desnutrição *in utero* e no período de amamentação provocou nos descendentes retardo no desenvolvimento de vários reflexos e na abertura de olhos (Smart & Dobbing, 1971). No entanto o fator de crescimento epidérmico (Epidermal Growth Factors - EGF) acelerou a abertura de olhos em ratos, camundongos e hamsters (Carpenter & Cohen, 1979; Smart e cols., 1987), mas retardou a abertura de vagina (Smart e cols., 1987).

O teste de reação ao som realizado aos 21 dias de idade (Vorhees e cols., 1979) foi utilizado somente para investigar se a reação sensorial auditiva estava presente mas o aparecimento da função auditiva *startle* se aparece por volta dos 12 dias segundo Smart & Dobbing (1971).

No teste de coordenação motora rota-rod, a obtenção de resposta negativa evidenciada nos dois grupos, suspeitou-se que foi relacionada a severidade do critério da avaliação estatística. Outra hipótese foi que a manipulação sofrida pelos filhotes (em ambos os grupos) em decorrência da realização dos testes causou retardo na coordenação motora. Pois, sabe-se que o período mais crítico onde o cérebro neonatal é particularmente sensível a alteração por estresse ambiental é desde o nascimento até a segunda semana de vida (Kloet e cols., 1988). Segundo Rodier (1980) a hipoatividade apresentada pelos animais pode estar relacionada ao período de proliferação de neurônios do cerebelo, e é apenas um dos efeitos comportamentais do mal funcionamento cerebelar. A

hipoatividade foi observada em ratos tratados por Raio X no período pós-natal (Brunner & Altman, 1973).

Poucos estudos têm comparado os efeitos dos diferentes tipos de estresse durante a gravidez no desenvolvimento e comportamento subsequente dos descendentes na idade adulta. Mas alguns estudos sugerem que a diferença entre descendentes estressados prenatalmente e não estressados forma mais evidentes quando foram colocados frente a novas situações ou situações estressantes (Pfister & Ivinskis, 1983; Fride e cols., 1985). Os resultados no campo aberto demonstraram uma redução no comportamento de ambulação e levantar-se para animais não estressados prenatalmente e manipulados na infância (C), e animais estressados prenatalmente e manipulados (T). Esses dados revelaram uma queda na exploração, contrariando estudos que apontam para um aumento do comportamento exploratório em animais manipulados na infância (Weinberg e cols., 1978; Peters, 1988). Foi observado em descendentes estressados prenatalmente (estresse intenso) aumento do comportamento de ambulação e redução da emissão de bolos fecais, indicando maior emocionalidade, ou seja um comportamento próximo do desempenhado pelas fêmeas (Hutchings & Gibbon, 1970; Meisel, 1979).

A hipoatividade manifesta pela redução do comportamento exploratório dos animais não estressados/manipulados e estressados/manipulados pode ter ocorrido em decorrência da manipulação na infância em período crítico da neurogênese da região cerebral, na primeira semana pós-natal (Rodier, 1980). A tendência em apresentar uma redução mais acentuada, em média, no grupo estres-

sado e manipulado pode sugerir que o estresse adicional (em relação ao grupo não estressado/manipulado), na segunda semana de gravidez, possa, de alguma forma, estar agravando a hipoatividade observada, pois este também é considerado um período crítico na neurogênese (Rodier, 1980).

Pelo fato do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ser o efetor da reação geral de adaptação desencadeada pelo estresse, vários investigadores levantam a possibilidade de que a depressão possa ser uma resposta anormal ao estresse, principalmente se crônico (Graef, 1990). Nesse trabalho o estresse aplicado aos descendentes na idade adulta foi produzido por situações aversivas incontroláveis: a natação forçada e desamparo aprendido.

No teste de natação forçada o estresse prenatal e a manipulação não interferiram no comportamento dos animais que, como o grupo controle branco, manifestaram imobilidade quase total no dia do teste, indicando ocorrência do desespero comportamental.

No teste de desamparo aprendido observou-se que os animais não estressados prenatalmente/não manipulados, não estressados/manipulados e os estressados/manipulados submetidos previamente aos choques incontroláveis apresentaram latências de fuga semelhantes, demonstrando um déficit na aprendizagem da resposta de fuga, confirmando os resultados obtidos por Seligman (1976), mostrando que no rato não se evidencia ausência, mas sim uma aprendizagem mais lenta por parte dos animais submetidos previamente aos choques incontroláveis.

Esses resultados demonstraram que o estresse prenatal e a manipulação na infância não tornaram os animais mais susceptíveis a indução do quadro de depressão experimental, manifesto pela imobilidade total na natação forçada e o déficit de aprendizagem na resposta de fuga no desamparo aprendido.

VI. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o estresse prenatal brando crônico imprevisível afetou as fêmeas, causando queda no ganho ponderal e redução do tamanho das ninhadas. Os descendentes tiveram o desenvolvimento alterado, demonstrado pela redução na distância ano-genital dos machos e adiantamento tanto no desdobramento de orelhas bem como na abertura de olhos. Na idade adulta o estresse prenatal e a manipulação na infância diminuíram o comportamento exploratório dos descendentes machos. No entanto, essas manobras experimentais não tornaram os animais mais susceptíveis à depressão experimental frente aos modelos utilizados.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABRAMSON, L.Y.; SELIGMAN, M.E.P.; TEASDALE, J.D. Learned helplessness in humans: Critique and reformulation. *J.Abn. Psychol.*, 87:49-74, 1978.
- ACHOR, R.W.P.; HANSON, N.O. & GIFFORD, R.W.Jr. Hypertension treated with *Rauwolfia serpentina* (Woole root) and with reserpine. *JAMA*, 159:841-845, 1955.
- AGRESTI, A. *Categorical Data Analysis*. In: John Wiley & Sons. (Eds.) New York, p.59, 1990.
- ALLOY, L.B. & ABRAMSON, L.Y. Judgement of contingency in depressed and nondepressed students. Sadder but wiser? *J.Exp.Psychol.*, 108:441-485, 1979.
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of psychiatric disorders (DSM III-R)*, Washington, 1987.
- AMIR, S.; BROWN, Z.W. & AMITZ. The role of endorphins in stress: evidence and speculation. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, 4:77-86, 1980.
- ANDERSON, R.W.; FLEMING, D.E.; RHEES, R.W. & KINGHORN, E. Relationship between sexual activity, plasma testosterone and the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic in prenatally stressed and non-stressed rats. *Brain Res.*, 370:1-10, 1986.
- ANESTHENSEL, C.S. & STONE, J.N. Stress and depressions. A test of the buffering model of social support. *Arch.Gen. Psychiatry*, 33:1392-1396
- ANISMAN, H. Neurochemical changes elicited by stress. In: Anisman H., Bignami, G. (Eds.). *Psychopharmacology of Aversively Motivated Behavior*. pp.119-172, 1978.
- ANISMAN, H. & ZACHARKO, R.M. Multiple neurochemical and behavioral consequences of stressors: Implications for depression. *Pharmacol.Ther.*, 46:119-136, 1990.
- AXELROD, J. & REISINE, T.D. Stress Hormones: Their interactions and regulation. *Science*, 224:452-459, 1984.

- BADWAY, D.; ORTH, J. & WEISZ. Effect of morphine on $\Delta^5\beta$ -OL steroid dehydrogenase (3 β OH) in leydig cells of fetal rats; a quantitative cytochemical study. *Anat.Rec.*, 199:15a, 1981.
- BARLOW, S.M.; KNIGHT, A.F. & SULLIVAN, F.M. Delay in postinatal growth and development of offspring produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat. *Teratology*, 18:211-218, 1978.
- BRUNNER, R.L. & ALTMAN, J. Locomotor deficits in adult rat with moderate to massive retardations of cerebellar development during infancy. *Behav.Biol.*, 9:169-188, 1973.
- CABID, S.; PUGLISH-ALLEGRA, S.; OLIVERIO, A. A genetic analysis in the mouse dopaminergic plasticity following chronic stress. *Behav.Neural.Biol.*, 44:239-248, 1985.
- CHAPADEIRO, E. Síndrome geral da adaptação. Estresse. In: Bogliolo L. (Ed.). *Patologia Geral Básica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp.271-277, 1978.
- COHEN, S.; EVANS, G.W.; KRANTZ, D.S. & STOKOLS, D. Physiological, motivational and cognitive effects of aircraft noise on children. *Am.Psychol.*, 35:231-243, 1980.
- DAHLOF, L.G.; HARD, E. & LARSSON, K. Influence of maternal stress on development of the fetal genital system. *Physiol.Behav.*, 20:193-195, 1978.
- DEUTCH, A.Y.; TAM, S.Y. & ROTH, R.H. Foot-shock and conditioned stress increase 3.4. dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the ventral tegmental area but not substantia nigra. *Brain Res.*, 33:143-146, 1985.
- DUNN, A.J.; CHILDERS, S.R.; KRAMARCY, N.R. et al. ACTH - induced grooming involves high affinity opiate receptors. *Behav.Neural.Biol.*, 31:105-109, 1981.
- FARIA, M.S. Estudo da administração crônica de doses profiláticas do lítio sobre o paradigma do desamparo aprendido. Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia. UNICAMP, Campinas, Brasil, 1991.
- FRIDE, E. & WEINSTOCK, M. The effects of prenatal exposure to predictable or unpredictable stress on early development in the rat. *Dev.Psychobiology*, 17(6):651-660, 1984.
- FRIDE, E.; DAN, Y.; GAVISH, M. & WEINSTOCK, M. Prenatal stress impairs maternal behavior in a conflict situation and reduces hippocampal benzodiazepin receptors. *Life Sci.*, 36:2103-2109, 1985.

- GISPEN, W.H. & ISAACSON, R.L. ACTH-induced excessive grooming in the rat. *Pharmacol.Ther.*, 12:209-246, 1981.
- GLEICH, J.; FROHBERG, H. General teratological techniques. In: D. Neubert; H.J. Merker; T.E. Kwasigroch (Eds). Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1977.
- GRAEFF, F.G. *Drogas psicotrópicas e seu modo de ação*, E.P.V., São Paulo, pp.41-57, 1990.
- GUILLEMIN, R.; VARGO, T.; ROISSIER, J. et al. β -endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland. *Science*, 197:1367-1369, 1981.
- GUSELLA, J.L. & FRIED, P.A. Effects of maternal social drinking and smoking on offspring at 13 months. *Neurobehav.Toxicol. Teratol.*, 6:13-17, 1984.
- GUYTON, A.C. Organização funcional do corpo humano e controle do meio interno. In: _____. *Tratado de Fisiologia Médica*, Guanabara, Rio de Janeiro, pp.3-5, 1986.
- HARRIS, T.H. Depression induced by *Rauwolfia serpentina* compounds. *Ame.J.Psychiatry*, 113:950, 1957.
- HELLHAMMER, D.H.; HINGTGEN, J.N.; WADE, S.E.; SHEA, P.A. & APRISON, M.H. Serotonergic changes in specific areas of rat brain associated activity-stress gastric lesions. *Psychosom.Med.*, 45:115-122, 1983.
- HERMAN, J.P.; GUILLONNEAU, D.; DANTZER, R.; SCATTON, B.; SEMERDJIAN-ROUQUIER, L. & LEMOAL, M. Differential effects of inescapable footshock and stimuli previously paired with inescapable footshocks on dopamine turnover in cortical and limbic areas of the rat. *Life Sci.*, 30:2207-2214, 1982.
- HERRENROHL, L.R. & POLITCH, J.A. Effects of prenatal stress on the estrous cycle of female offspring as adults. *Experientia*, 34:1240-1241, 1978.
- HERRENROHL, L.R. Prenatal stress reduces fertility and fecundity in female offspring. *Science*, 206:1097-1099, 1979.
- HERRENROHL, L.R. Prenatal stress disrupt reproductive behavior and physiology in offspring. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, pp.120-126, 1986.
- HERRENROHL, L.R.; RIBARY, J.; SCHLUMPF, M. & LICHTENSTEIGER, W. Maternal stress alters monoamine metabolites in fetal and neonatal rat brain. *Experientia*, 44:457-459, 1988.

- HUTCHINGS, D.E. & GIBBON, J. Preliminary study of behavioral and teratogenic effects of two stress procedures administered during different periods of gestation in the rat. *Psychol. Rev.* 26:239-246, 1970.
- JOFFE, J.M. *Prenatal determinants of behaviour*. Oxford, Pergamon Press. 1969.
- JOFFE, J.M. Hormonal mediation of the effects of prenatal stress on offspring behavior. In: G. Gottlieb (Ed.), *Studies on the development of behavior on the nervous system: Early influences*, vol. 4, Acad. Press, New York, pp.108-144, 1978.
- KAPLAN, H.I. & SADOCK, J.B. *Compêndio de psiquiatria - Ciências Comportamentais*, Artes Médicas, Porto Alegre, 1993.
- KATZ, R.J. & HERSH, S. Amitriptyline and siopolamine in an animal model of depression. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, 5:265-271, 1981
- KATZ, R.J. & SIBEL, M. Animal model of depression tests of three structurally and pharmacologically noud antidepressant compounds. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 16:973-977, 1982.
- KINSLEY, C. & SVARE, B. Prenatal stress effects: are they mediated by reductions in maternal food and water intake and by body weight gain? *Physiol.Behav.*, 37:191-193, 1986.
- KLOCT, E.; ROSENFELD, P.; ECKELEN, J.A.M.; SUTANHO, W. & LEVINE, S. Stress glucocorticoids and development. *Prog.Brain Res.*, 73:101-119, 1988.
- LIM, A.T.W. & FUNDER, J.W. Stress-induced changes in plasma, pituitary and hypothalamic immunoreactive β -endorphin. Effects of diurnal variation, adrenalectomy corticosteroids and opiate agonist and antagonists. *Neuroendocrinology*, 36:225-234, 1983.
- LINGJAERDE, O. Tetrabenazine (nitoman) in the treatment of psychoses. *Acta Psychiatr.Scand.*, 39(suppl 170):1-109, 1963.
- LIPP, M.N. *Como enfrentar o estress*, 3a edição, UNICAMP, Campinas, 1990.
- LLOYD, C. Life events and depressive disorders reviewed 1. Events an predisposing factors. *Arch.Gen. Psychiatry*, 37:529-535, 1980.
- LLOYD, C. Life events and depressive disorders reviewed 2. Events an predisposing factors. *Arch.Gen. Psychiatry*, 37:541-548, 1980.

- MAIER, S.F. & SELIGMAN, M.E.P. Failure to escape traumatic shock. *J.Exp.Psychol.*, 74:1-9, 1967.
- MARTIN, P.; SOUBRIE, P. & SIMON, P. The effect of monoamine oxidase inhibitors compared with classical tricyclic antidepressants on learned helplessness paradigm. *Prog. Neuro-Psychopharmacol.Biol. Psychiatric*, 11:1-7, 1987.
- MASTERPASQUA, F.; CHAPMAN, R.H. & LORE, R.K. The effects of prenatal psychological stress on the sexual behavior and reactivity of male rats. *Dev.Psychobiol.*, 9:403-411, 1976.
- MATTHYSE, S. Animal models in psychiatry research. *Prog. Brain Res.*, 65:259-270, 1986.
- McKINNEY, W.T. & BUNNEY, W.E. Animal model of depression. Review of evidence and implication for research. *Arch.Gen. Psychiatry*, 21:240-248, 1969.
- MEIER, A. Child psychiatric sequelae of maternal war stress. *Acta Psychiatri.Scand.*, 72:505-517, 1985.
- MEISEL, R.L.; DOHANICH, G.D. & WARD, I. Effects of prenatal stress of avoidance acquisition on open field performance and lordotic behavior in male rats. *Physiol.Behav.*, 22:527-531, 1978.
- MOORE, C.L. & POWER, K.L. Prenatal stress mother-infant interaction in Norway rats. *Dev.Psychobiol.*, 19(3):235-245, 1986.
- MOYER, J.A.; HERRENKOHL, R.L. & JACOBOWITZ, D.M. Effects of stress during pregnancy on catecholamines in discrete brain regions. *Brain Res.*, 121:385-393, 1977.
- MOYER, J.A.; HERRENKOHL, R.L. & JACOBOWITZ, D.M. Stress during pregnancy: effects on catecholamines in discrete brain regions of offspring as adults. *Brain Res.*, 144:173-178, 1978.
- MUIR, J.L. & PFISTER, H.P. Corticosterone and prolactin responses to predictable and unpredictable novelty stress in rats. *Physiol.Behav.*, 37:285-288, 1986.
- MULLER, J.C.; PRYER, W.W.; GIBBONS, J.E. & ORGAIN, E.S. Depression and anxiety occurring during rauwolfia therapy. *JAMA*, 159:836-839, 1955.
- NARDI, A.E.; SABOYA, E.; PINTO, S.; FIGUEIRA, I. e cols. Distímia: aspectos clínico-terapêuticos. *J.Bras.Psiqu.*, 42(7): 357-372, 1993.

- NATION, J.R. & BOYAJIAN, L.G. Treatment length as a determinant of immunization against learned helplessness in humans. *Bull.Psychonomic Soc.*, 17:19-22, 1981.
- OLIVERIO, A. Neurochemical and behavioral responses to stress. *Pol.J.Pharmacol.*, 40:489-495, 1988.
- O'NEILL, K.A. & VALENTINO, D. Escapability and generalization: effects on behavioural despair. *Eur.J.Pharmacol.*, 78:379-380, 1982.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE. Classificação de transtornos mentais e de comportamentos. In:_____. Código Internacional de Doenças. (CID 10). Porto Alegre, Artes Médicas, pp.109-121, 1993.
- OVERMEIER, J.B. & SELIGMAN, M.E.P. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J.Comp. Physiol.*, 63:28-33, 1967.
- PANERAI, A.E. Cognitive and noncognitive stress. *Pharmacol.Res.*, 26:273-276, 1992.
- PETERS, D.A.V. Prenatal stress: Effects on brain biogenic amines and plasma cortisosterone levels. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 17:721-725, 1982.
- PETERS, D.A.V. Both prenatal and postnatal factors contribute to the effects of maternal stress as offspring behavior and central 5-hydroxytryptamine receptors in the rat. *Pharmacol. Biochem.Behav.*, 30:669-673, 1988.
- PFEIFER, W.D.; ROTUANDO, R.; MEYER, M. & DENENBERG, V.H. Stimulation in infancy. Unique effects of handling. *Physiol. Behav.*, 17:781-784, 1976.
- PFISTER, H.P. & IVINSKIS, A. Prenatal psychological stress effects on offspring behaviour in rats. *Aust.J. Psychology*, 35(1):21-36, 1983.
- PFISTER, H.P. & MUIR, J.L. Psychological stress and administered oxytocin during pregnancy. Effect corticosterone and prolactin response in lactating rats. *Int.J.Neurosci.*, 45:91-99, 1989.
- PLAUT, S.M.; GRAHAM, C.W. & LEINER, K.Y. Effects of prenatal maternal handling and rearing with aunts on behavior brain weight and whole-brain serotonin levels. *Dev.Psychobiol.*, 5: 215-221, 1972.

- POLITCH, J.A.; HERRENKOHL, L.R. & GALA, R.R. Effects of ether stress on prolactin and corticosterone levels in prenatally stressed male rats as adults. *Physiol.Behav.*, 20: 91-93, 1978.
- PORSOLT, R.D.; LEPICHON, M.; JALFRE, M. Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatment. *Nature*. 226: 730-732, 1977.
- PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; BLAVET, M. DENIEL, M. & JALFRE, M. Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agents which modify central catecholamines and serotonin activity. *Eur.J.Pharmacol.*, 57:201-210, 1979.
- QUIRCE, C.M. ODIO, M. & SOLANO, J.M. The effects of predictable and unpredictable schedules of physical restraint upon rats. *Life Sci.*, 28:1897-1902, 1981.
- RABKIN, J.G. Stress and psychiatric disorders. In: Leo Goldeberger and Shlomo Breznitz (Eds), *Handbook of Stress Theoretical and Clinical Aspects*. The Free Press, 566-581, 1982.
- RODIER, P.M. Chronology of neuron development: Animal studies and their clinical implication. *Develop.Med. Child Neurol.*, 22: 525-545, 1980.
- RUFF, M.R.; PERT, C.B.; WEBER, R.J.; WHAL, L.M. & PAUL, S.M. Benzodiazepine receptor-mediated chemotaxis of human monocytes. *Science*, 229:1281-1283, 1985.
- SAPOLSKY, R.M.; KREY, L.C. & MCEWEN, B.S. Stress down-regulates corticosteroid receptors in a site specific manner in the brain. *Endocrinology*, 114:287-292, 1984.
- SAPOLSKY, R.M.; MEANY, M.S. & MCEWEN, B.S. The development of the glucocorticoid receptors system in the rat limbic brain III. Negative feedback regulation. *Dev. Brain Rev.*, 18:169-173, 1985.
- SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *Am.J.Psychiatry*, 122:509-522, 1965.
- SECHZER, J.A. The role of animals in biomedical research. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 106, 1983.
- SECTOR, S. & SJOERDSMA, A. Blockade of endogenous norepinephrine synthesis by α -ethyl-tyrosine, an inhibitor of tyrosine hydroxylase. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 147:66-95, 1965.

- SELIGMAN, M.E.P. In: Freeman, W.H. (Ed.), **Helplessness. On depression, development and death.** San Francisco and London, 1975.
- SELYE, H. A syndrome produced by divers noxious agents. **Nature.** 138:32, 1936.
- SELYE, H. Stress and disease. **Science**, 122:625-631, 1955.
- SELYE, H. Stress without distress. In: George Serban (Ed.), **Psychopathology of Human Adaptation.** Plenum Press, New York, pp.137-146. 1976.
- SELYE, H. History and present status of the stress concept. In: Leo Goldberger and Shlomo Breznitz (Ed.), **Handbook of Stress. Theoretical and Clinical Aspects**, cap 2, The Free Press, New York, pp.7-17, 1982.
- SILVA, V.A. Métodos experimentais utilizados na avaliação de efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento. In: M. Nazareth Rabello-Gay; M.A.R. Rodrigues & R. Neto-Monteleone (Eds.), **Mutagenese, Teratogenese e Carcinogenese. Métodos e critérios de avaliação.** Socied. Bras. de Genética, Ribeirão Preto, pp.218-241, 1991.
- SILVESTRINI, B. Trazodone - A new type of antidepressant: A discussion of pharmacological data and their clinical implications. In: Costa, E. & Racagni, G. (Eds), **Typical and atypical antidepressants: Molecular mechanisms.** Raven Press, New York, pp. 327-340, 1982.
- SMART, J.L.; SILVA, V.A.; MALHEIROS, L.R.; PAUMGARTTEN, F.J.R. & MASSEY, R.F. Epidermal growth factor advances some aspects of development but retards others in both rats and hamsters. **J.Dev.Physiol.**, 11:153-158, 1987.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. **Statistical Methods.** The Iowa State University Press, Iowa, pp.89-90, 1989.
- SPAANS, C. & VERSPREET, F.A.M. Het foetale alcohol-syndroom: Vier patiënten in Een gezin. **Ned.Tijdschr Geneeskde**, 125:452-454, 1981.
- SOBLOSKY, J.S. & THURMOND, J.B. Biochemical and behavioral correlates of chronic stress: Effects of tricyclic antidepressants. **Pharmacol.Biochem.Behav.**, 24:1361-1368.
- STOTT, D.N. Follow-up study from birth of the effects of prenatal stress. **Dev.Med.Child.Neurol.**, 15:770-787, 1973.

- SWAAB, D.F. & MIRMIRAN, M. Possible mechanism underlying the teratogenic effects of medicines on the developing brain. In: J. Yanai (Ed). *Neurobehav.Toxicol.*, Elsevier, Amsterdam, pp.55-71, 1984.
- SWENSON, R.M. & VOGEL, W.H. Plasma catecholamines and corticosterone as well as brain catecholamine changes during coping in rats exposed to stress full footshock. *Pharmacol. Biochem.Behav.*, 18:689-693, 1983.
- SZURAN, T.; ZIMMERNAN, E.; PLISKA, V.; PFISTER, H.P. & WELZL, H. Prenatal stress effects on exploratory activity and stress-induced analgesia in rats. *Dev.Psychobiol.*, 24(5):361-372, 1991.
- TACHÉ, J. Stress as a cause of disease. In: Jean Taché, Hans Selye, Stacey, B. Day, J. (Ed.), *Cancer, Stress and Death*, Plenum Medical Book Company, New York, pp.1-7, 1979.
- TAKAHASHI, L.K.; BAKER, E.W. & KALIN, N.H. Ontogeny of behavioral and hormonal responses to stress in prenatally stressed male rat pups. *Physiol.Behav.*, 47:357-364, 1990.
- THOMPSON, W.R.; WATSON, J. & CHARLESWORTH, W.K. The effects of prenatal stress on offspring behavior in rats. *Psychol.Med. Monogr.*, 76:1-26, 1962.
- VANRIEZEN, H. Different central effects of the 5-HT. antagonists mianserin and cyproheptodine. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, 196:256-269, 1971.
- VORHEES, C.V.; BRUNNER, R.L. & BUTCHER, R.E. Psychotropic drugs as behavioral teratogens. *Science*, 205:1220-1224, 1979.
- WARD, I.L. Prenatal stress feminizes and desmasculinizes the behavior of males. *Science*, 175:82-84, 1972.
- WARD, I.L. & WEISZ, J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology*, 84:1145-1163, 1984.
- WARD, O.B.; ORTH, J.M. & WEISZ, J. A possible role of opiates in modifying sexual differentiation. In: M. Schlumpf and W. Lichtensteigen (Eds), *Monographs in Neural Science. 9. Drugs and Hormones in Brain Development*. S. Karger, Basel, pp. 194-200, 1983.
- WEINBERG, J.; KRAHN, E.A. & LEVINE, S. Differential effects of handling on exploration in male and female rats. *Dev. Psychobiology*, 11(3):251-259, 1978.

- WEINSTOCK, M.; FRIDE, E. & HERTZBERG, R. Prenatal stress effects on functional development of the offspring. *Prog.Brain Res.*, 73:319-331, 1988.
- WEISS, J.M.; BAILEY, M.H. GOODMAN, P.A.; HOFFMAN, C.J.; AMBROSE, M.J.; SALMAN, S. & CHARRY, J.M. A model for neurochemical study of depression. In: Spiegelstein, M.Y. and Levy, A. (Eds). *Behavioral models and analysis of drug action*. Elsevier, Amsterdam, pp.195-223, 1982.
- WILLNER, P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*, 83:1-16, 1984.
- WILLNER, P. Validating criteria for animal models of human mental disorders. Learned helplessness as a paradigm case. *Prog. Neuro Psychopharmacol.Biol.Psychiatry*, 10:677-690, 1986.
- WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEOUS, S. & MUSCAT, R.. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by a tricycle antidepressant. *Psychopharmacology*, 93:358-364, 1987.
- WILLNER, P. Animal models of depression. An overview. *Pharmacol. Ther.*, 45:425-455, 1990.
- WILLNER, P. Animal models as stimulation of depression. *TIPS* Elsevier Science Publisher, 12:131-136, 1991.
- WOOD, C.H. & RUDOLPH, A.M. Can maternal stress alter fetal adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology*, 115:298-301, 1984.

VIII. ANEXO

ANEXO 1

Protocolo do Estresse

Dias da Semana	Privação Total de Comida	Privação Total de Água	Iluminação Contínua	Inclinação Gaiola 30° - 50°	Agrupamento Gaiola 2-3 fêmeas	Gaiola Úmida	Sala Resfriada $\pm 10^{\circ} \text{C}$	Barulho Intermitente 85 db	Luz Estroboscópica	Garrafa Vazia	Alimentação Reduzida	Odor Novo	Objeto Estranho na gaiola
2ª	14 14	14 14		9		16 9	14 14:30		9 11				
3ª			16 9					14 16					
4ª	16 16	10:30 16					9:30 10:00	13 16	13 16	10 10:30			16 9
5ª		9 9		9:30 16	16 9		9 9:30						
6ª	11 11						13 13:30	11 16			9:00 11	16 9	
Sáb.	9 9	9 9	16 16										
Dom.	14 14	14 14	14 14	16 16									

O esquema representa o protocolo de estresse brando crônico imprevisível aplicado à fêmeas grávidas na 2ª e 3ª semana de gestação.

Na linha horizontal estão relacionados os estímulos aversivos utilizados e na linha vertical os dias da semana.

Os números relacionados nos quadrados ligados por linha cheia representam o tempo em horas da exposição ao estímulo aversivo