

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Curso de Especialização em Biotérios

Maria Eliza Ferreira do Val de Paulo

**Avaliação comportamental da rata gestante após o transporte nos
primeiros dias de gestação e crias**

São Paulo

2022

Maria Eliza Ferreira do Val de Paulo

Avaliação comportamental da rata gestante após o transporte nos primeiros dias de gestação e cria

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotérios do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotérios.

Orientadora: Renata Gemio dos Reis

São Paulo

2022

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

© Captura Retangular

Paulo, Maria Eliza Ferreira do Val de

Avaliação comportamental da rata gestante após o transporte nos primeiros dias de gestação e cria / Maria Eliza Ferreira do Val de Paulo ; orientador(a) Renata Gemio dos Reis - São Paulo, 2022.

42 p.

Monografia (Especialização) - Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação Lato Sensu - Especialização em biotérios.

1. Estresse pré-natal 2. Comportamento materno. 3. Gestação de ratas Wistar. 4. Estresse de transporte I. Reis, Renata Gemio dos. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação Lato Sensu - Especialização em biotérios. IV. Título.

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Maria Eliza Ferreira do Val de Paulo, aluna do Curso de Especialização em Biotérios, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 20 de janeiro de 2022.



.....
Aluna: Maria Eliza Ferreira do Val de Paulo



De acordo:.....
Orientadora: Dr^a Renata Gemio dos Reis

Ao meu pai e toda a minha família, amigos e colegas de trabalho pelo apoio e incentivos fundamentais para que eu possa alcançar meus objetivos.

À minha amada mãe (*In memoriam*) que estará sempre em meu coração.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr^a Renata Gemio dos Reis pelo imenso apoio.

À Dr^a Vânia Mattaraia pelo carinho e atenção com todos os alunos.

Ao Dr. Marcelo Santoro pelo apoio na coordenação.

Aos meus colegas de turma pelos agradáveis momentos e companheirismo.

À Dr^a Ana Leonor por sua participação como parecerista.

Ao Dr. Lanfranco diretor do laboratório de Farmacologia pela confiança.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste.

A Deus pelo dom da vida e pela força nos momentos difíceis.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.”

John Rusk

RESUMO

PAULO, Maria Eliza Ferreira do Val de. **Avaliação comportamental da rata gestante após o transporte nos primeiros dias de gestação.** 2022. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotérios) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

A gestação é considerada um período de grandes variações no organismo materno. Além disso, a mãe está sujeita às influências estressantes provindas do ambiente externo que podem interferir na saúde e no bem-estar materno-fetal. Assim, o acasalamento feito no próprio biotério de experimentação pode evitar o estresse da manipulação e do transporte da fêmea gestante, garantindo o acompanhamento total do período pré e pós-gestacional. Porém, adquirir fêmeas prenhes pode evitar perdas decorrentes de animais que não conseguem emprenhar e evitar a solicitação de machos. Este estudo buscou determinar se existem alterações comportamentais causadas pela manipulação e transporte em fêmeas adquiridas prenhez a partir do acompanhamento dos períodos pré e pós-natal: gestação, lactação, sanidade dos neonatos e seu desenvolvimento após o desmame para verificação de alterações que possam causar prejuízo no desenvolvimento dos filhotes. Os animais foram avaliados através da realização de testes neurocomportamentais e comparados a resultados obtidos anteriormente em estudos cujo acasalamento fora feito no próprio biotério de experimentação. No teste de reflexo de preensão palmar foi observado um aumento no tempo de realização no grupo experimental em machos e fêmeas no PN4 e diminuição no PN8 em fêmeas. Na comparação dos grupos no reflexo postural os resultados não demonstraram diferença significativa. Os resultados da geotaxia negativa, na comparação dos grupos, não evidenciou nenhuma diferença significativa, tampouco houve diferenças significativas para movimentos de locomoção e na atividade geral. O peso das mães durante o tempo de gestação não apresentou nenhuma diferença significativa do grupo experimental em relação ao grupo controle. Estes resultados, avaliados em conjunto, não nos permitem afirmar que houve uma influência significativa do transporte das fêmeas no estágio inicial da gestação de ratas Wistar.

Palavras-chave: Estresse pré-natal. Comportamento materno. Gestação de ratas *Wistar*. Estresse de transporte.

ABSTRACT

PAULO, Maria Eliza Ferreira do Val de. **Behavior evaluation of the pregnant rat after transportation in the first days after pregnancy.** 2022. 41 p. Monograph (Specialist in Animal Laboratory) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

Pregnancy is considered a period of big variation to the maternal organism. Besides, the mother is due to stressing influences from the external environment that might intervene in health and mother-fetal wellbeing. Thus, mating in the experimental facility may avoid stress from handling and transporting pregnancy females, assuring full observation over pre and post gestational periods. However, to obtain pregnancy females can avoid loss of animals that cannot get pregnant and prevent acquiring males. This study aimed to determine if there are behavior changings caused by handling and transporting females obtained already pregnant by observing pre and postnatal periods: gestation, lactation, soundness of neonates and their development after weaning verifying alterations that could cause injury for litter growth. Animals were evaluated through neurobehavior tests and results were compared to those previously obtained in studies whose mating was performed in the experimental animal facility. In the handgrip reflex test, an increase in the experimental group of males and females was observed on the 4th day of observation and a decrease on the 8th day, in females. When comparing postural reflex, results didn't show significant differences. In the results for negative geotaxia, no significant difference was observed among groups, as well as locomotion movement and general activity. Mother's body weight during pregnancy didn't present any significative difference for the experimental group related to control group. These results, put together, cannot allow stating significant influence in transporting females in the first stages of pregnancy in Wistar rats.

Key-words: Prenatal stress. Maternal behavior. Wistar rats pregnancy. Transportation stress.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 METODOLOGIA	18
3.1 Protocolo CEUA	18
3.2 Sujeitos experimentais	18
3.2 Acasalamentos	18
3.3 Acomodação dos animais	19
3.4 Padronização das ninhadas	19
3.5 Delineamento experimental	19
3.5.1 Grupo Controle	19
3.5.2 Grupo experimental	20
3.6 Desenvolvimento reflexológico	20
3.6.1 Reflexo de preensão palmar	20
3.6.2 Reflexo postural	21
3.6.3 Geotaxia negativa	21
3.6.4 Atividade geral na caixa de atividades	21
3.7. Análise Estatística	22
4 RESULTADOS	23
4.1 Preensão palmar machos	24
4.2 Preensão palmar fêmeas	25
4.3 Reflexo postural machos	26
4.4 Reflexo postural fêmeas	27
4.5 Geotaxia negativa machos	28

4.6 Geotaxia negativa fêmeas.....	29
4.7 Locomoção machos.....	30
4.8 Locomoção fêmeas.....	31
4.9 Atividade geral machos.....	32
4.10 Atividade geral fêmeas.....	33
4.11 Peso das mães.....	34
5 DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

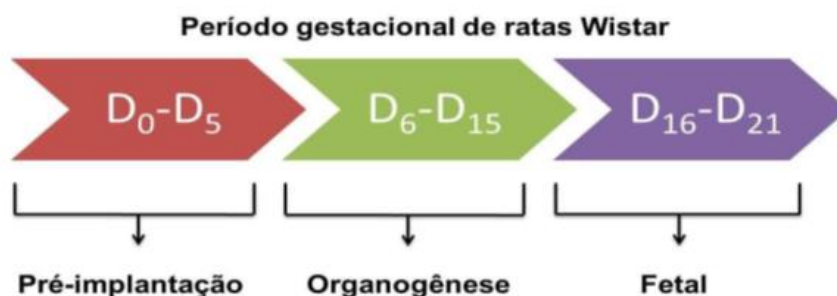
O estresse pode ser definido como um estímulo ambiental sobre um indivíduo que sobrecarrega seus sistemas de controle e reduz sua adaptação, ou parece ter potencial para tanto (FRASER e BROOM, 1990; BROOM e JOHNSON, 1993; BROOM, 1993). Animais de laboratório são extremamente sensíveis ao novo, seja este o ambiente ou alterações do mesmo, introduzir animais em um novo local, com as respectivas mudanças em sua condição de vida e de grupos sociais, produz uma resposta estressante.

De acordo com a Resolução Normativa nº 25 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, alguns dos fatores que podem causar estresse aos animais são: o barulho excessivo, o movimento das gaiolas de transporte, e ambiente e mudança de pessoal. A extensão do estresse em um animal depende de sua espécie, sexo, idade, saúde, condição física (animais gestantes, doentes ou pós-operatórios), lotação e relações sociais.

O transporte, conforme descrito, é conhecido causador de estresse em animais. Esse estresse se deve a alterações no ritmo circadiano, troca de ambiente familiar, barulho e vibração, temperatura extrema, desidratação ou outros fatores de causa desconhecida (ANDRADE, et al., 2002). O desconforto dos animais é afetado pela duração e condição do ambiente durante o transporte e pela qualidade do cuidado dispensado ao longo da viagem. Atualmente se sabe que os efeitos dos transportes de animais afetam diversos parâmetros comportamentais dos roedores e são visíveis mesmo após duas semanas de adaptação (ALSTRUP, 2010).

A gestação pode ser dividida em três fases: pré-implantação, que compreende o intervalo entre o dia 0 e dia 5 de prenhez; organogênese, cujo período se estende do dia 6 ao dia 15 de prenhez; e o período fetal, que ocorre do dia 16 ao dia 21 da prenhez de ratas (Figura 1). O quinto dia corresponde ao final do período de implantação do blastocisto no útero das ratas, o 10º dia corresponde à metade do período de organogênese, e o 16º dia corresponde ao período inicial de maturação cerebral (BERNARDI, 1999). A gravidez é uma fase delicada na formação de diversos sistemas biológicos e, agentes externos ou internos podem gerar distúrbios do desenvolvimento fetal, prejudicando estruturas responsáveis pelo desenvolvimento físico, motor e comportamental da prole (DORCE et. al., 2017).

Figura 1 - Esquema representativo do período gestacional de ratas Wistar.



Fonte: Adaptado de Marinho, A.C.T.A., 2018.

A gestação é o momento onde ocorrem mudanças que refletem na adaptação do organismo ao seu novo estado fisiológico. Ainda, para que haja o desenvolvimento normal do feto após a fecundação, são necessárias duas condições: herança genética e o meio ambiente uterino adequado (MANSON E KANG, 1989). Durante a gestação, o organismo materno passa por transformações e oscilações hormonais importantes para favorecer as adaptações anatômicas e fisiológicas necessárias à nutrição e o desenvolvimento fetal (SOMA-PILLAY et al., 2016).

E, alterações causadas por mudanças drásticas de alojamento, excesso de manipulação, transporte, e a dificuldade da volta do organismo a homeostase podem provocar mudanças no desenvolvimento desta gestação e, ainda causar distúrbios nos parâmetros neurocomportamentais da prole. Dados da literatura associam casos de estresse emocional e ansiedade durante a gestação com abortos espontâneos, retardo no crescimento fetal, neonatos pré-termos, malformação fetal e com distúrbios no desenvolvimento comportamental pós-natal (KOFMAN, 2002; MULDER et. al, 2002).

Os ratos, ao nascer têm um sistema nervoso central imaturo, com deficiente irrigação cerebral e ausência de barreira hematoencefálica (BERNARDI, 1999). Seu desenvolvimento acontece no decorrer do período pós-natal. Qualquer influência que o feto possa sofrer durante a gestação, desde a organogênese até a amamentação pode agir sobre esse processo. O atraso e baixo desenvolvimento dos reflexos neonatais são considerados importantes, pois podem estar associados a modificações cerebrais induzidas por estresse (DRAGO et al., 1999). Estudos em humanos mostram que crianças nascidas de mães que sofreram algum tipo de estresse durante a gestação apresentam atraso na fala e na atividade motora

(PATIN et al., 2004). Se a exposição materna a algum tipo de estresse resultar em dano no desenvolvimento do sistema nervoso, pode-se esperar que o comportamento também se altere (WEINSTOCK, 2001). O desenvolvimento pós-natal da atividade motora do rato compreende alguns processos comportamentais como o desenvolvimento da postura e locomoção quadrúpede, ajustes dinâmicos posturais, algumas respostas de orientação e de habilidades motoras complexas.

Através de testes comportamentais é possível avaliar tais parâmetros nos animais (DORCE, 2007). Para a avaliação prática em experimentos comportamentais, costuma-se dividir os comportamentos em três tipos: dois ditos condicionados (aprendidos), nos quais os comportamentos são rigidamente controlados, e um chamado incondicionado (não aprendido) ou espontâneo, no qual o ambiente é controlado, porém os comportamentos são espontâneos. No comportamento espontâneo ou incondicionado pode-se medir a resposta motora espontânea do animal frente a um estímulo, que pode ser um ambiente novo ou uma mudança no ambiente (NORTON, 1989).

Geralmente, em roedores, a avaliação do comportamento materno é realizada na primeira semana após o parto, pelo fato da prole, neste período, ser dependente exclusivamente do cuidado materno (TEODOROV et al., 2005). Em ratas, os cuidados maternos podem ser agrupados didaticamente em duas categorias: os diretos e os indiretos. Os diretos são aqueles dirigidos aos filhotes, como por exemplo, a busca, o agrupamento, ficar sobre os filhotes aquecendo-os e alimentando-os, enquanto os indiretos são a agressividade voltada a intrusos e a construção do ninho (NUMAN, 1994; BRIDGES, 2015). A respeito do comportamento materno é importante distinguir o comportamento de recolher os filhotes e o de amamentá-los. O comportamento de recolher os filhotes é iniciado pela mãe e classificado como uma resposta materna ativa (HANSEN et al., 1991). O vínculo mãe-filhote é fundamental para o desenvolvimento comportamental da prole, portanto, alterações no comportamento maternal podem gerar distúrbios sociais permanentes nos filhotes (WEINSTOCK, 2017). Alterações no comportamento materno podem, portanto, influenciar nas respostas comportamentais e neuroendócrinas dos filhotes desde o nascimento até a fase adulta, o que torna esse comportamento crucial para o desenvolvimento adequado dos filhotes. Desta forma alterações precoces neste ambiente podem levar a futuras alterações

neuroendócrinas, desequilíbrio das funções cognitivas e na reatividade ao estresse, bem como no comportamento social/reprodutivo (MEANEY, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência que o transporte pode ocasionar no período gestacional, no parto, na qualidade da ninhada e no seu desenvolvimento neurocomportamental.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da manipulação e do transporte no comportamento de ratas no início da gestação.

Avaliar possíveis alterações no desenvolvimento reflexológico e comportamental de suas respectivas crias.

3 METODOLOGIA

3.1 Protocolo CEUA

O estudo seguiu as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan sob protocolo número 7380260821.

3.2 Sujeitos experimentais

Cinco fêmeas primíparas, sexualmente maduras, com peso entre 230- 250g, foram acasaladas no biotério central e, um dia após a confirmação da prenhez através de lavado vaginal (dia 0 de gestação), foram entregues no laboratório.

Dos produtos obtidos dessas fêmeas prenhes, 40 filhotes foram utilizados, após padronização das ninhadas.

Os dados do grupo controle, para comparação de resultados, de fêmeas cujo acasalamento fora feito no biotério do laboratório de Farmacologia, foram obtidos de experimentos do grupo de pesquisa do referido laboratório, especializado no estudo de neurotoxinas no estágio perinatal (MARTINS et al, 2016; BARÃO, 2003).

3.2 Acasalamentos

As fêmeas do grupo controle foram, segundo registros mantidos pelo laboratório, acasaladas no biotério experimental do laboratório de Farmacologia e tiveram a prenhez detectada através do lavado vaginal na manhã do dia seguinte ao cruzamento (dia 0).

O lavado vaginal consiste em injetar aproximadamente 60 microlitros de solução salina, com ajuda de uma pipeta, no canal vaginal da rata e retirar o material obtido. O líquido é colocado numa lâmina de vidro e observado ao microscópio para verificação da presença de espermatozóides e de células de estro (caracterizada como a fase estrogênica máxima), para confirmação do diagnóstico de prenhez (dia zero de gestação). Para o grupo experimental, os cruzamentos e lavados foram feitos no Biotério Central.

3.3 Acomodação dos animais

As fêmeas prenhes recebidas do Biotério Central foram alojadas, imediatamente após o recebimento, no biotério do laboratório de Farmacologia e mantidas individualmente, em gaiolas de polipropileno (40x50x20) com tampa metálica, em estante ventilada (marca Alesco) com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), em ciclo automatizado de 12 horas claro/12 horas escuro, exclusiva para acondicionamento dos animais maternidade.

As trocas de cama dos animais foram feitas 2x por semana. A quantidade da dieta ingerida foi acompanhada semanalmente durante todo o período pré-natal. Os filhotes permaneceram com suas mães até o momento do desmame (21 dias).

3.4 Padronização das ninhadas

Todas as ninhadas foram padronizadas no dia 2 após o nascimento. Sempre que possível, foram utilizados 8 filhotes distribuídos na mesma proporção para machos e fêmeas. Quando não foi possível manter essa mesma proporção, os filhotes foram escolhidos independentemente do sexo até o total de 8 filhotes. Para manuseio dos filhotes, as mãos do pesquisador foram esfregadas na maravalha, a fim de evitar qualquer odor diferente que estressasse o animal. Os animais foram marcados delicadamente com caneta atóxica na cauda, a fim de evitar qualquer trauma, e submetidos a análises físicas e comportamentais.

3.5 Delineamento experimental

3.5.1 Grupo Controle

As informações referentes ao grupo controle foram obtidas de estudos anteriormente realizados pelo Laboratório de Farmacologia. As fêmeas do grupo controle foram acasaladas no biotério de roedores do laboratório de Farmacologia.

3.5.2 Grupo experimental

As fêmeas prenhes, no dia 0 de gestação, foram transportadas até o laboratório de Farmacologia no período da manhã, entre 10 horas e meio dia, em veículo fechado com ar condicionado, num percurso de aproximadamente 1.200 metros. As fêmeas foram observadas durante todo o período gestacional e parto.

Após a recepção, os animais foram pesados para o início do acompanhamento feito durante todo o período gestacional. Os animais foram novamente pesados no 5º dia, 10º dia, 16º dia e no 21º dia.

Além da manipulação das trocas, todas as gestantes foram inoculadas com 1ml/Kg de solução salina por via subcutânea para mimetizar uma inoculação experimental no 5º e 10º dia de gestação e, assim, possibilitar a comparação com os dados obtidos do histórico do laboratório. Os dias de inoculações e os testes comportamentais foram estipulados através de experimentos executados anteriormente pelo laboratório e visam mimetizar os tratamentos feitos em protocolos onde são utilizadas fêmeas Wistar grávidas.

Após o parto, os filhotes eram separados das mães no momento da observação e, imediatamente após esse procedimento, retornavam à sua gaiola.

Todos os testes foram realizados no mesmo horário do dia.

Todas as ninhadas padronizadas foram acompanhadas para verificação do desenvolvimento físico e submetidas a testes de desenvolvimento reflexológicos para verificar a atividade motora (locomoção) e a atividade geral total dos filhotes.

Os filhotes que não foram mantidos, após a padronização, foram eutanasiados por decapitação com tesoura. As respectivas mães foram eutanasiadas com CO₂ após a finalização dos testes. Todos os animais, após a confirmação da ausência de sinais vitais foram acondicionados em freezer destinado para este fim até que fosse feita a coleta pela empresa responsável.

3.6 Desenvolvimento reflexológico

Os seguintes reflexos foram avaliados, nos filhotes obtidos:

3.6.1 Reflexo de preensão palmar

Os animais foram segurados com uma das mãos, tomando-se o cuidado de deixar a pata dianteira esquerda livre a fim de segurarem a ponta de um lápis quando acariciado. O tempo necessário para agarrar a ponta do lápis foi registrado e a média desse tempo foi calculada. Este teste foi realizado no período (pós-natal) PN4, PN6 e PN8.

3.6.2 Reflexo postural

Nesse teste, os filhotes foram colocados em decúbito dorsal em uma superfície plana e não mais contidos. O reflexo postural é considerado totalmente alcançado quando os filhotes giram 180° em torno de seu eixo longitudinal, com as quatro patas em contato com a superfície plana. O tempo necessário para recuperar a posição prona normal foi anotado e a média desse tempo foi calculada. Este teste foi realizado em PN4, PN6, PN8 e PN10.

3.6.3 Geotaxia negativa

A geotaxia negativa é uma reação postural que leva o animal à posição vertical quando é colocado em uma posição descida. Para isso, os filhotes de ratos foram colocados em um plano inclinado de 45°, com o focinho apontando para baixo, e tiveram que girar 180° para trazer o focinho para cima. Foi anotado o tempo necessário para o animal atingir a rotação de 180 e a média desse tempo foi calculada. Este teste foi realizado em PN6, PN8, PN10 e PN12.

3.6.4 Atividade geral na caixa de atividades

Os filhotes foram observados em um monitor de atividades, que é um aparelho constituído por uma gaiola com dois grupos de sensores, cada um ligado a um contador, um que mede apenas a atividade locomotora e outro que mede a atividade geral (locomoção horizontal e outros movimentos). Os filhotes foram colocados nesta gaiola individualmente e todos os movimentos realizados pelos animais foram registrados por 5 minutos e a média das unidades foi calculada. Após cada observação, a gaiola foi limpa com solução alcoólica (5%). O teste foi realizado em PN10, PN14, PN18 e PN22.

3.7. Análise Estatística

Foi utilizado o teste “t” de Student para determinar possíveis diferenças entre os grupos. O intervalo de confiança aceitável para todos os grupos foi determinado em 5%.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Graph pad Prism 5.0. Para análise de comparação do peso das mães foi utilizado o teste ANOVA.

4 RESULTADOS

Foi observado um aumento o reflexo de preensão palmar do grupo experimental machos e fêmeas no 4º dia de observação, e diminuição no 8º dia nas fêmeas, quando comparados ao grupo controle (Figuras 2 e 3).

No reflexo postural, não foi observada nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle, em machos e fêmeas (figuras 4 e 5).

Em relação a geotaxia negativa, não houve nenhuma alteração em nenhum dos grupos observados (figura 6 e 7).

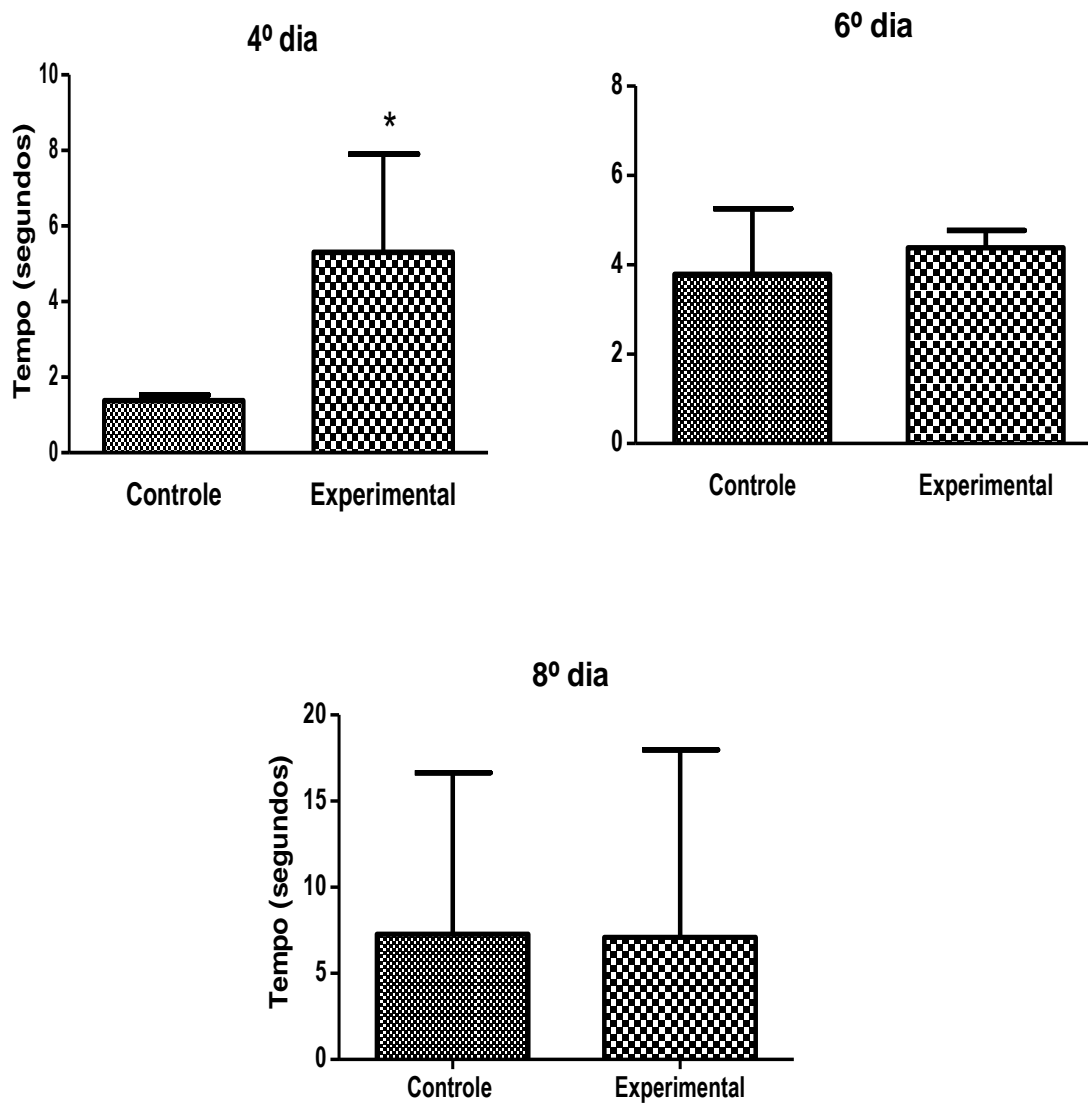
Não houve nenhuma alteração em relação à caixa de atividades em nenhum dos dias de observação, nos grupos estudados (Figuras 8, 9,10 e 11).

À observação de peso das mães durante o período pré-natal, não foi constatada diferença significativa entre os grupos controle e experimental (figura 12).

Todos os resultados estão representados abaixo, como média \pm desvio padrão.

Figura 2 – Preensão palmar machos 4º, 6º e 8º dias de vida.

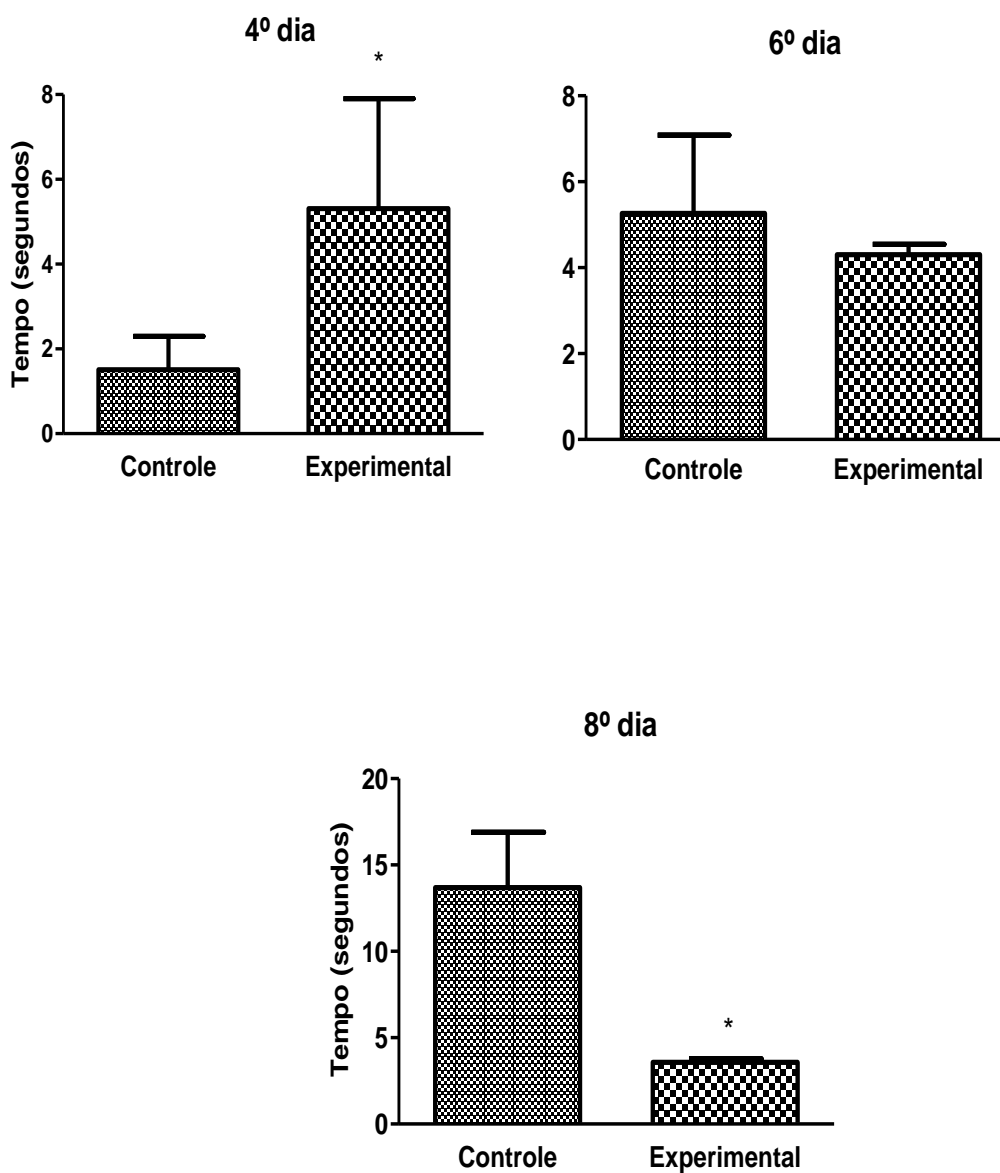
4.1 Preensão palmar machos



Os dados se referem à média \pm desvio padrão da média. ($p < 0.05$). Teste de "t" de Student.

Figura 3 – Preensão palmar fêmeas 4^o, 6^o e 8^o dias de vida.

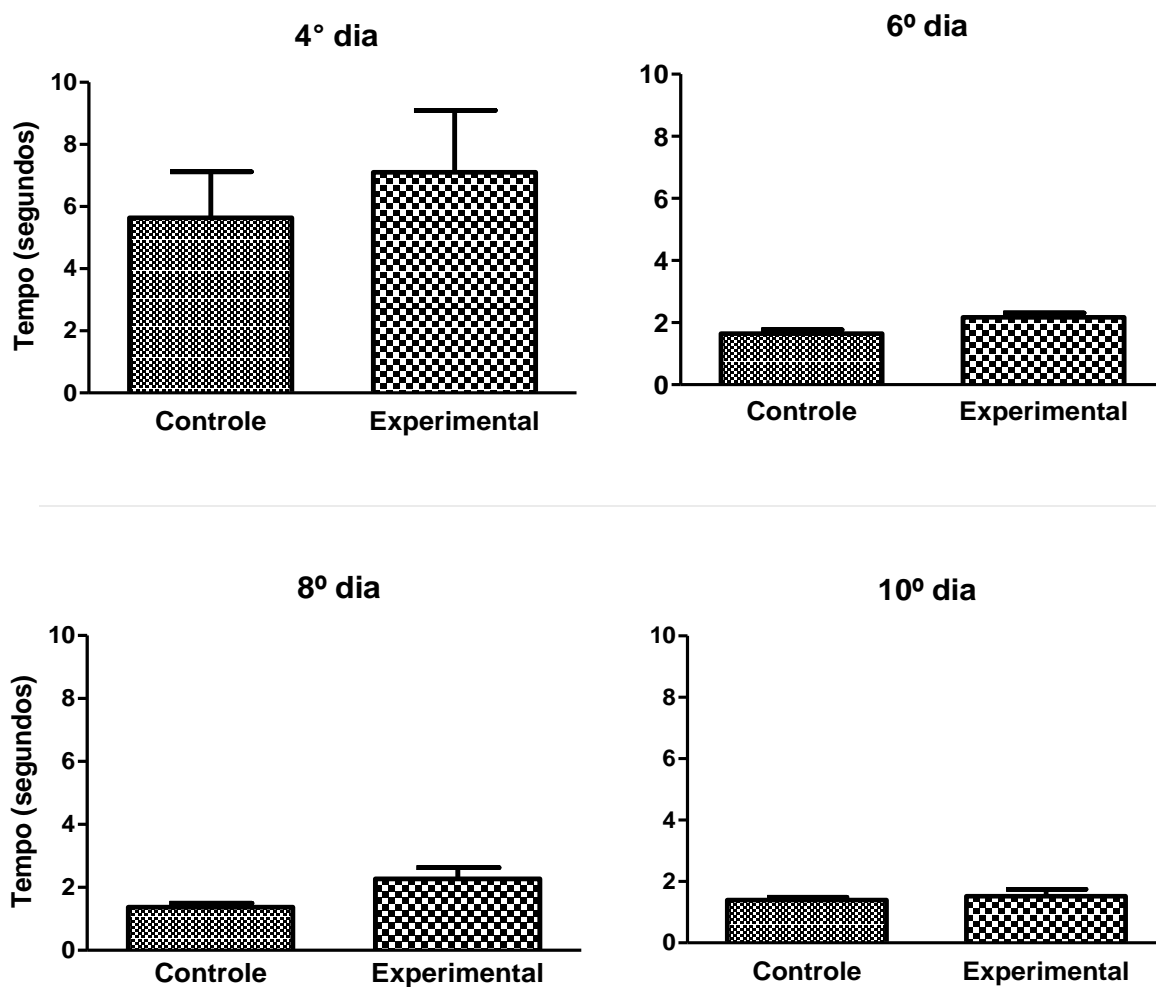
4.2 Preensão palmar fêmeas



Os dados se referem à média \pm desvio padrão da média. ($p < 0.05$). Teste de "t" de Student.

Figura 4 – Reflexo postural machos 4º, 6º, 8º e 10º dias de vida.

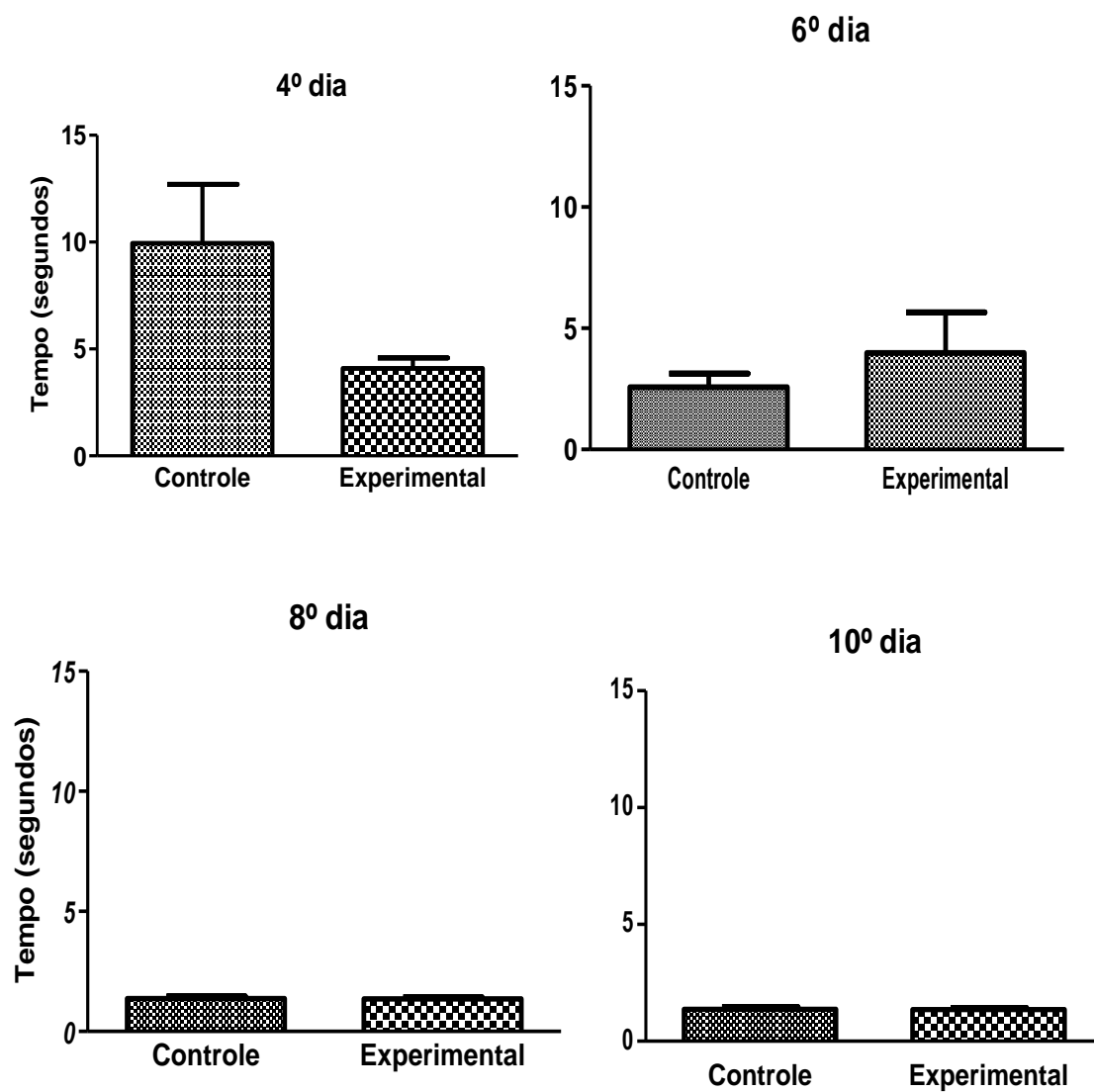
4.3 Reflexo postural machos



Os dados se referem à média \pm desvio padrão da média. ($p < 0.05$). Teste de "t" de Student.

Figura 5 – Reflexo postural fêmeas 4º, 6º, 8º e 10º dias de vida.

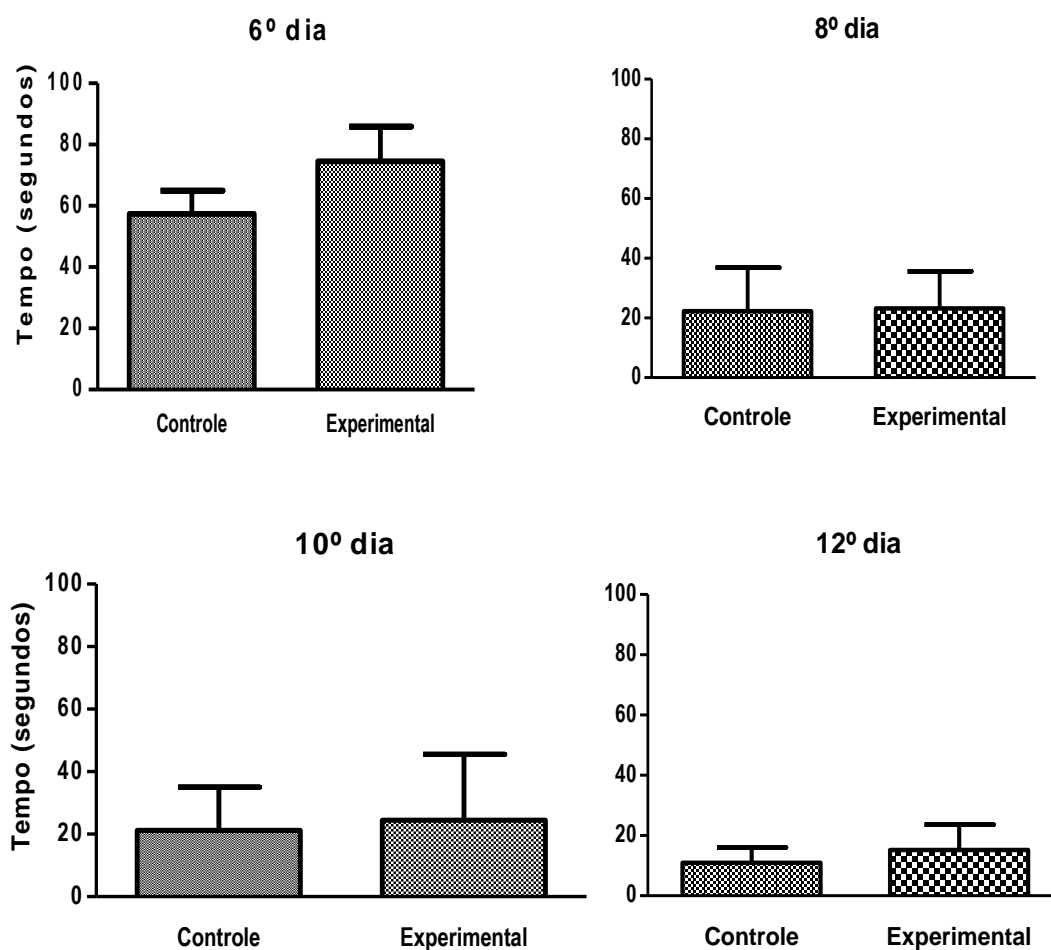
4.4 Reflexo postural fêmeas



Os dados se referem à média \pm desvio padrão da média. ($p < 0.05$). Teste de "t" de Student.

Figura 6- Geotaxia negativa machos 6º, 8º, 10º e 12º dias de vida.

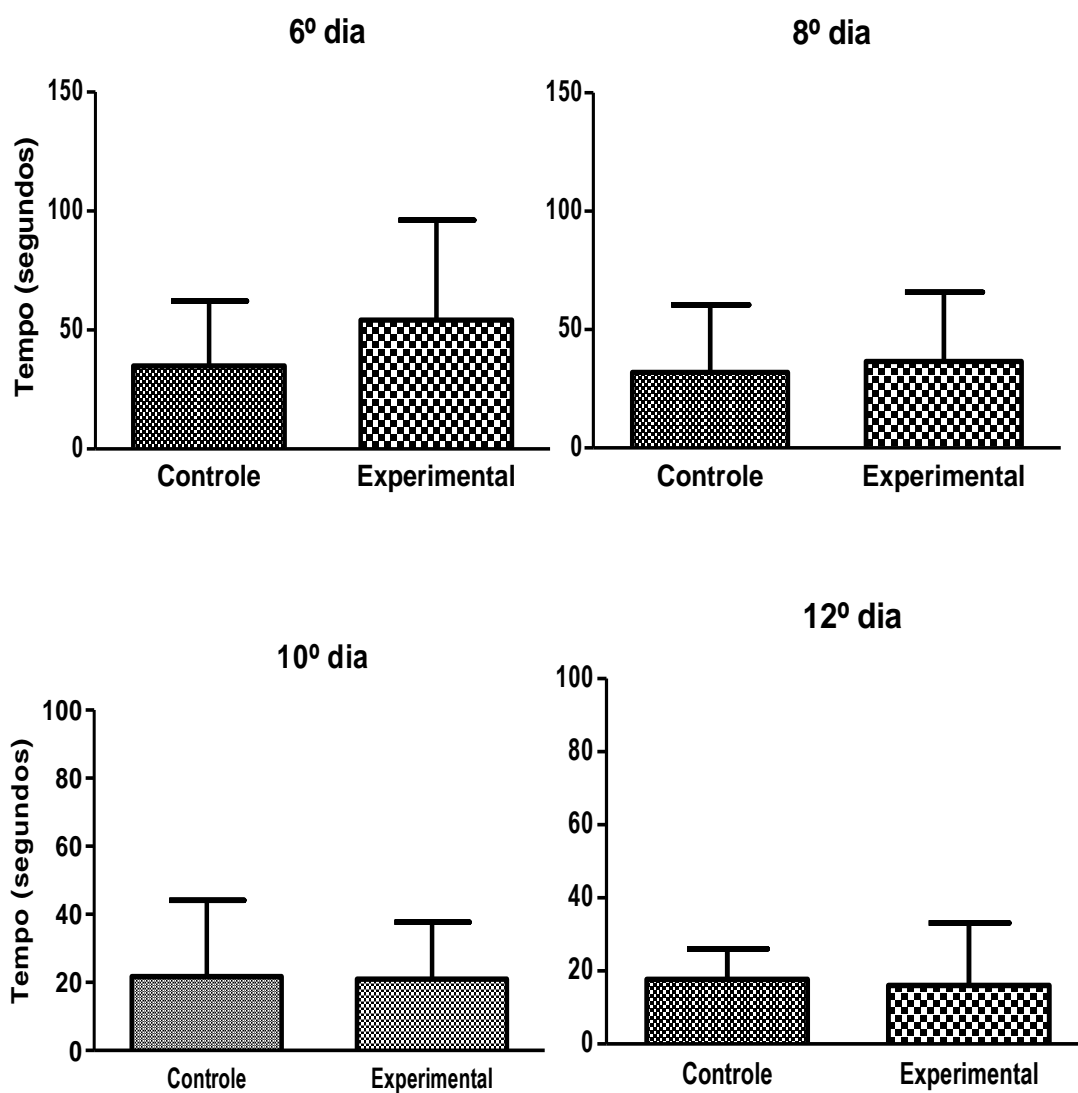
4.5 Geotaxia negativa machos



Os dados se referem à média \pm desvio padrão da média. ($p < 0.05$). Teste de "t" de Student.

Figura 7 – Geotaxia negativa fêmeas 6^o, 8^o, 10^o e 12^o dias de vida.

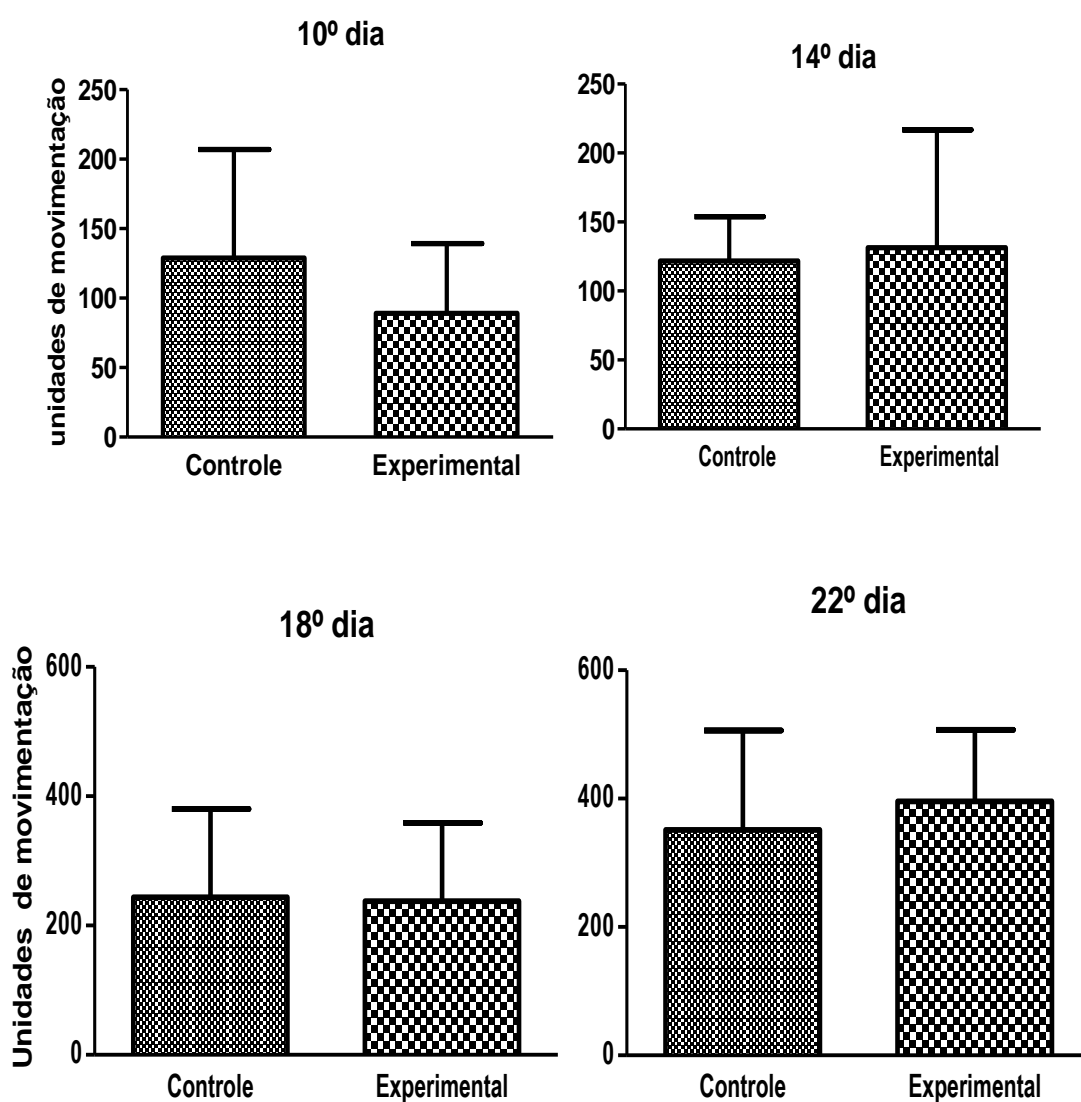
4.6 Geotaxia negativa fêmeas



Os dados se referem à média \pm desvio padrão da média. ($p < 0.05$). Teste de "t" de Student.

Figura 8 – Locomoção machos 10^o, 12^o, 14^o, 22^o dias de vida.

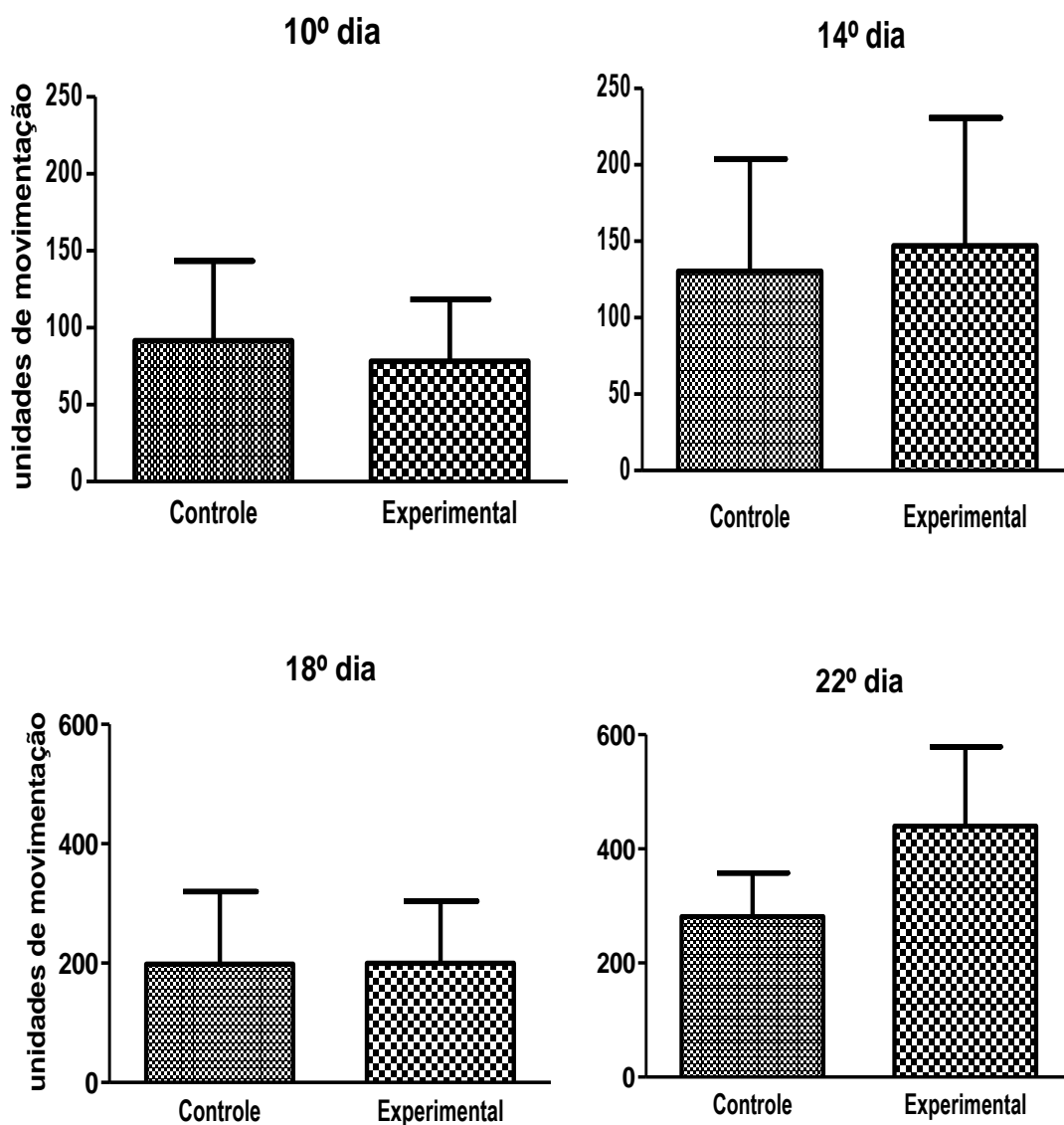
4.7 Locomoção machos



Os dados se referem à média \pm desvio padrão da média. ($p < 0.05$). Teste de "t" de Student.

Figura 9 – Locomoção fêmeas 10^o, 12^o, 14^o e 22^o dias de vida.

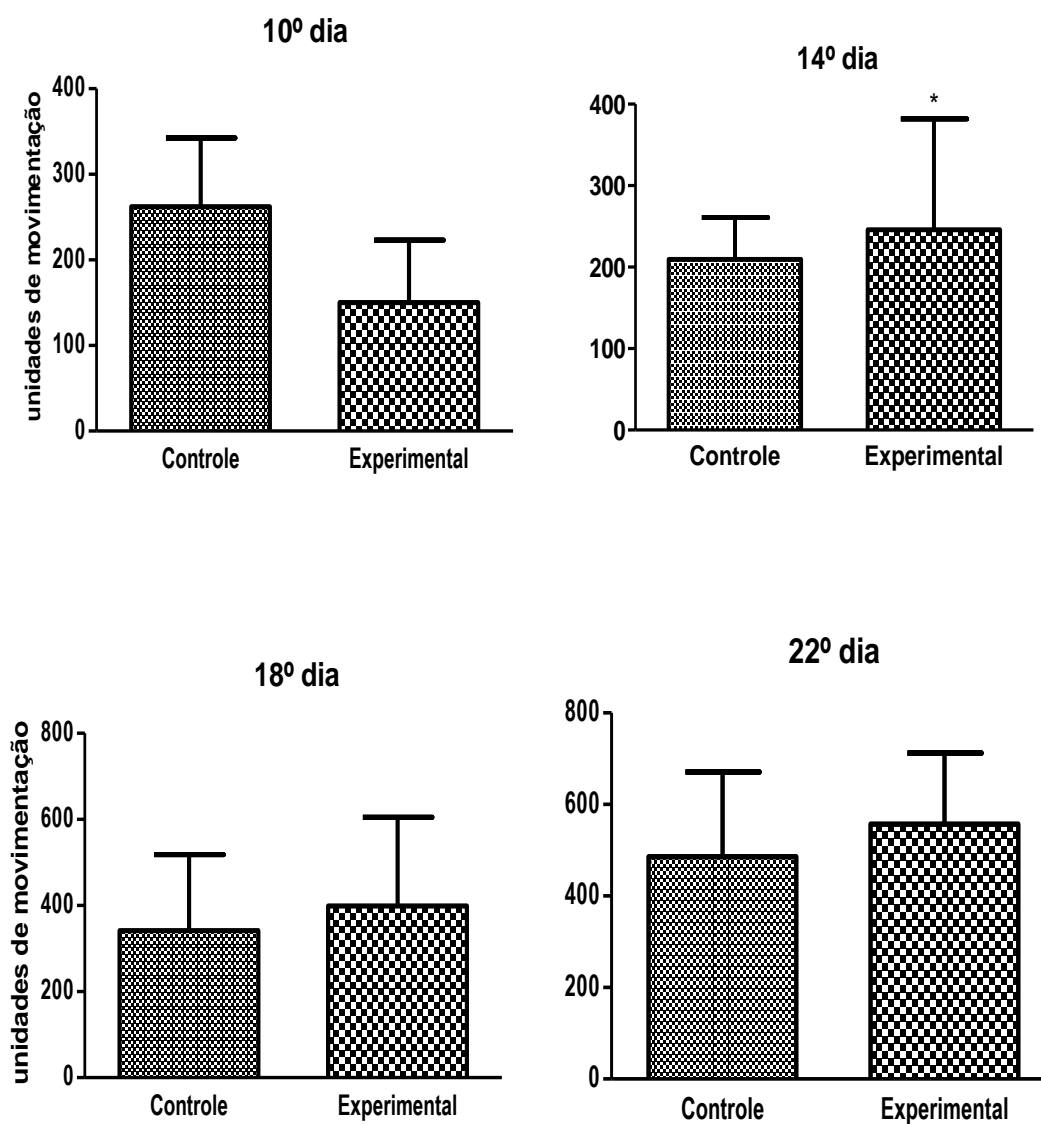
4.8 Locomoção fêmeas



Os dados se referem à média \pm desvio padrão da média. ($p < 0.05$). Teste de "t" de Student.

Figura 10- Atividade geral total machos 10^o, 12^o, 14^o e 22^o dias de vida.

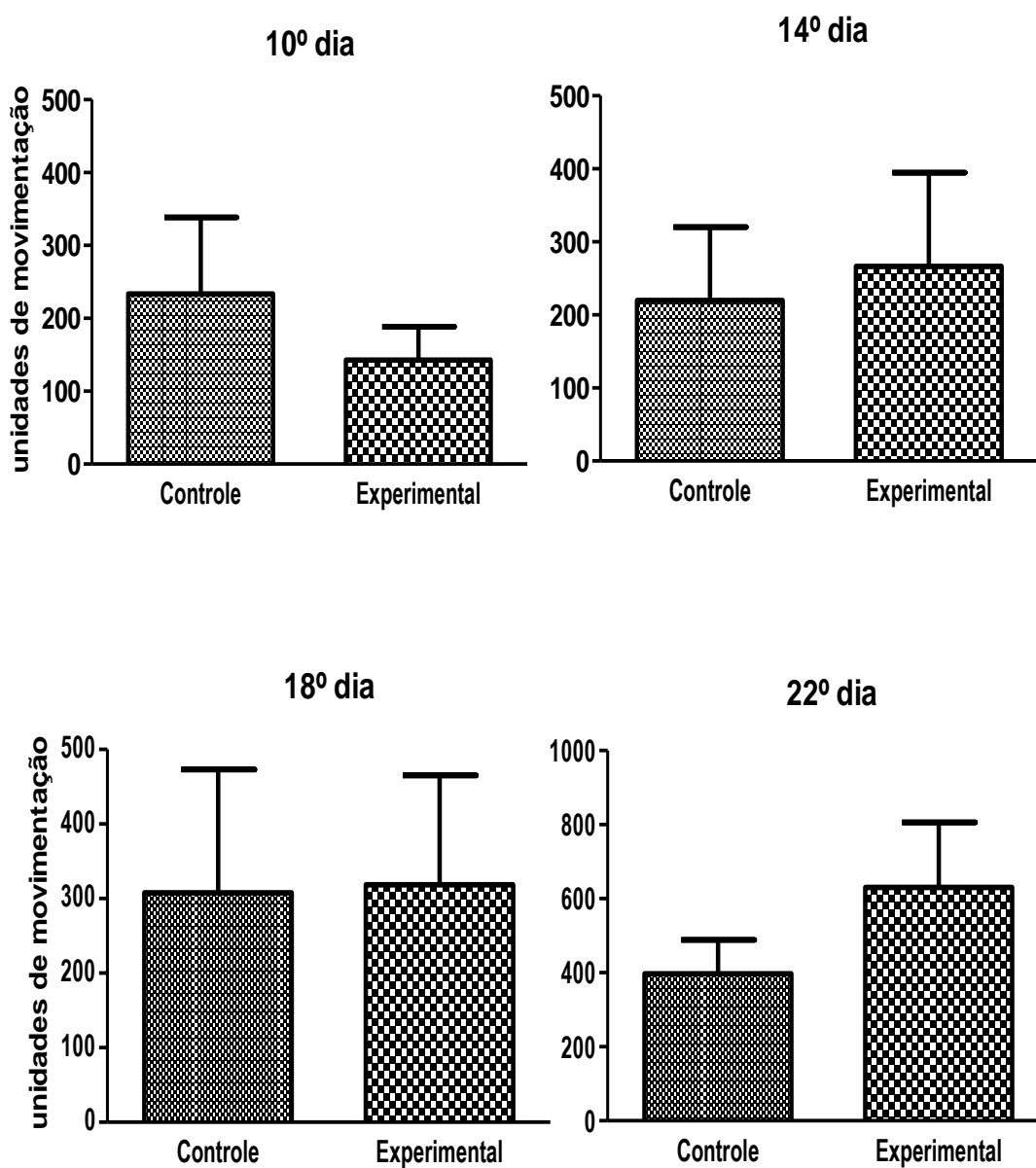
4.9 Atividade geral machos



Os dados se referem à média \pm desvio padrão da média. ($p < 0.05$). Teste de "t" de Student.

Figura 11 – Atividade geral total fêmeas 10^o, 12^o, 14^o, 18^o e 22^o dias de vida

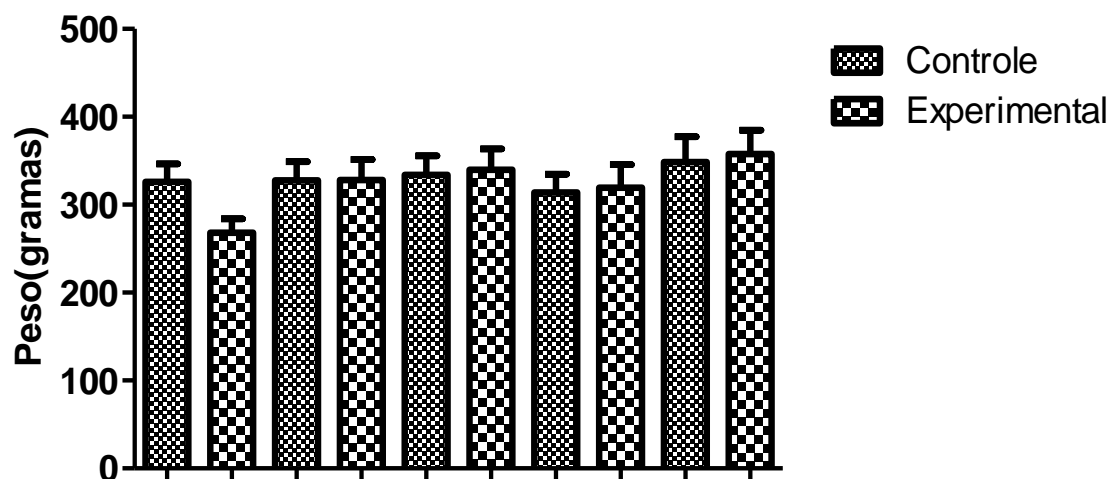
4.10 Atividade geral fêmeas



Os dados referem à média \pm desvio padrão da média. ($p < 0.05$). Teste de "t" de Student.

Figura 12 – Peso das mães nos dias 0,5,10, 16 e 21 de gestação.

4.11 Peso das mães



Os dados referem à média \pm desvio padrão da média. ($p < 0.05$). Teste ANOVA.

5 DISCUSSÃO

O reflexo de preensão palmar é um reflexo motor que envolve a maturação do SNC e SNP do animal. Os filhotes nascem com esse reflexo; e este é o único reflexo que desaparece com o tempo, à medida que o animal se desenvolve, geralmente entre 8^o e 10^o dia pós-natal (WOOD et.al 2003). Filhotes machos e fêmeas de 4^o dia grupo experimental apresentaram aumento do tempo de realização desse reflexo, tiveram um retardo no desaparecimento do reflexo, o que poderia sugerir que o estresse do transporte nos primeiros dias da gestação tenha alguns efeitos na formação e maturação do sistema nervoso desses animais.

Em relação ao reflexo postural, os animais recém-nascidos levam mais tempo para retornar à posição normal e, à medida que o animal cresce o tempo necessário para a execução desse reflexo diminui gradativamente (PATIN et al, 2004). Este reflexo surge logo após o nascimento no rato, entre o 1^o e o 3^o dia pós-natal, e amadurece durante a primeira semana de desenvolvimento. Logo após o início do reflexo de endireitamento, os filhotes de ratos adquirem a capacidade de se orientarem para cima no plano inclinado; como uma resposta não aprendida a pistas gravitacionais. A geotaxia negativa é alcançada entre os dias 6 e 8 dias pós-natal. O reflexo de geotaxia negativa e o endireitamento da superfície estão envolvidos com a relação espacial do animal. Um atraso na maturação do reflexo de geotaxia negativa sugere um atraso na maturação das estruturas do SNC envolvidas com a habilidade motora, em particular no cerebelo.

Os filhotes também foram submetidos ao teste de atividade geral em caixa de atividades. Este teste consiste em uma avaliação da atividade locomotora e atividade geral dos filhotes e tem por objetivo avaliar as mudanças comportamentais induzidas em animais, não só por manipulações fisiológicas e genéticas, como também toxicológicas (BERNARDI E PALERMO-NETO, 1979). O desenvolvimento da atividade motora em ratas continua durante o período de lactação atingindo o pico em torno do 15^o dia pós-natal; depois, a atividade diminui e, no momento do desmame, os níveis de atividade são semelhantes aos dos animais na idade adulta.

6 CONCLUSÃO

Apesar de terem sido observadas diferenças, devido a não realização do grupo controle concomitante ao grupo experimental, a avaliação em conjunto desses resultados não nos permitiu, em princípio, afirmar que houve alguma influência significativa, pois, os grupos trabalhados não foram sujeitos às mesmas condições de alojamento, uma vez que houve uma mudança de toda a estrutura e prédio do biotério do laboratório. Os animais do grupo controle, quando os testes foram realizados, eram mantidos em ambiente controlado, mas em estantes abertas. Atualmente, os animais são mantidos em estantes ventiladas.

Com base nestes resultados, novos estudos devem ser realizados para elucidar os mecanismos neuroendócrinos subjacentes aos comportamentos investigados, bem como outros comportamentos que possam sofrer alterações frente a situações adversas inflingidas durante o período gestacional, e a resposta de importantes sistemas para ajudar a desvendar as consequências oriundas do estresse nesse período.

REFERÊNCIAS¹

ALSTRUP, A.K.O. Anaesthesia and analgesia in Ellegaard Göttingen minipigs, **Science Open.com**, 2010.

ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. postnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Anim. Behav.**, 23 , pp. 896-920,1975 .

DOI [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(75\)90114-1](https://doi.org/10.1016/0003-3472(75)90114-1).

ANDRADE, A.; PINTO, SC.; OLIVEIRA, RS.; orgs. i **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, **2002**. 388 p.

BARÃO, A.A.S.; NENCIONI A.L.A.; CORONADO, V.A. Embryotoxic effects of maternal exposure to *Tityus serrulatus* scorpion venom. **J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**,v.14, n. 2 p. 322–37, 2008.

DOI <https://doi.org/10.1590/S1678-91992008000200010>.

BERNARDI, M.M.; PALLERMO-NETO, J. Effects of abrupt and gradual withdrawal from long term haloperidol treatment and open field behavior of rats.

Psychopharmacol., v. 65, p.247-250, 1979.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology** v. 36, p. 178-196, 2015.

DOI <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.007>.

BROOM, D.M. A usable definition of animal welfare. **Journal of Agriculture and Environmental Ethics, Guelph**, v.6, p.15-25, 1993.

BROOM, D.M.; JOHNSON, K.G. **Stress and Animal Welfare**. 5ª ed. London, 1993. 211 p.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Brasil). **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Fascículo 2:** roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 2019. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/guia.html>

CRUTTENDEN, K.; NENCIONI, A.L.A.; BERNARDI, M.M.; DORCE, V.A.C. Reproductive toxic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Reprod. Toxicol.**; v. 2, n. 4, p. 497–503, 2008.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.04.011>.

DONADIO, M. V. F.; VARGAS M. H. M. efeitos do estresse no período gestacional em diferentes modelos experimentais: uma revisão da literatura. **Rev. Atenção á Saúde**, São Paulo. v. 12 n. 41, p. 81-86, 2014.
DOI <https://10.13037/rbcs.vol12n41.2333>.

DORCE, A.L.; BELLOT, R.G.; DORCE, V.A.; NENCIONI, A.L. Effects of prenatal exposure to *Tityus bahiensis* scorpion venom on rat offspring development. **Reprod Toxicol. V.** 28, n. 3, p. 365–70, 2009.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.04.008>Get rights and content.

DORCE, A.L.C. **Exposição pré-natal ao veneno do escorpião *Tityus bahiensis*: Efeitos na prole de ratos.** 2007. 117 p. Dissertação (mestrado em Ciências – Saúde pública) - SES-SP, Instituto Butantan, São Paulo, 2007.

DORCE, A.L.C.; MARTINS, A.N.; DORCE, V.A.C.; NENCIONI, A.L.A. Perinatal effects of scorpion venoms: maternal and offspring development. **J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.** 23, 31, 2017.
DOI <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0121z>.

DRAGO, F.; DI LEO, F.; GIARDINA, L. Prenatal stress induced body weight deficit and behavioral alterations in rats: the effect of diazepam. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, 9:239-245, 1999.

DOI [https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(98\)00032-7](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(98)00032-7).

FOX, W. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse
Anim. Behav., V.13 p. 234-241,1965. DOI [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(65\)90041-2](https://doi.org/10.1016/0003-3472(65)90041-2).

FRANCIS, D.D.; MEANEY, M.J. Maternal Care and the Development of Stress Responses. **Current Opinion in Neurobiology**, v.9, p. 128-134, 1999.
DOI [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(99\)80016-6](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)80016-6).

FRASER, A.F.; BROOM, D. M. Farm Animal Behaviour and Welfare. **Wallingford: CAB International**, 1990.

HANSEN, W. F.; YANKOWITZ, J. Pharmacologic therapy for medical disorders during pregnancy. **Clinical Obstetrics Gynecology Journal**, v. 45, n. 1, p. 136-152, 2002.

HANSEN, S.; HARTON, C.; WALLIN, E.; LÖFBERG, L.; KJELL, S.
Mesotelencephalic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness. **Behav. Neurosci.**, v.105, n.4, p. 588-598, 1991.
DOI <https://doi.org/10.1037/0735-7044.105.4.588>.

HAUSER, J.; FELDON, J.; PRYCE, C.R. Direct and dam-mediated effects of prenatal dexamethasone on emotionality, cognition and HPA axis in adult Wistar rats. **Horm Behav.**, v. 56, n. 4, p. 364-375, 2009.
DOI <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.07.003>.

HIROTSU, C.; SOUZA, M.C.; ANDERSEN, L.A. Estresses e suas interferências *in*: LAPCHIK V.B.V., MATTARAI, V.G.M., KO, G.M. **Cuidados e manejo de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2017. p. 535.

LIPP, M. E. N. O modelo quadrifásico do stress In M.E.N. Lipp. **Mecanismos neuropsicofisiológicos do stress: teorias e aplicações clínicas**. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2003. p. 227.

KOFMAN, O. The rule of prenatal stress in the etiology of developmental Behavioral disorders. **Neurosc. Biobehav. Rev.**, v. 26 p. 457-470, 2002.

DOI [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(02\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00015-5).

MANSON, J.M.; KANG, Y.J. Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: HAYES, A. W., KRUGER, C. L. **HAYES' Principles and Methods of Toxicology**. New York: Raven Press., London, 1989. p. 311-358.

DOI <https://doi.org/10.1201/b17359>.

MARINHO, A.C.T.A. **Estudo toxicológico reprodutivo do eugenol**. Figura 3 – Esquema representativo do período gestacional de ratas *wistar*. 2018, p. 27. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

MARTINS, A.N.; NENCIONI, A.L.A.; DORCE, A.L.; PAULO, M.E.F.V.; FRARE, E.O.; DORCE, V.A.C. Effect of maternal exposure to *tityus bahiensis* scorpion venom during lactation on the offspring of rats. **Reproductive toxinology** vol. 59, pages 147-158, 2016.

DOI <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.12.008>.

MEANEY, M.J. Maternal care, gene expression and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annu. Rev. Neurosc.**, v.24, p. 1161-1192, 2001.

MULDER, E. J. H.; MEDINA, P. G. R.; HUIZINK, A. C.; VAN DEN BERGH, B. R. H.; BUITELAAR, J. K.; VISSER, G. H. A. Prenatal maternal stress: pregnancy and the (unborn) child. **Early Human Development**, 70:3-14, 2002.

DOI [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(02\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(02)00075-0).

NORTON, S. Methods for behavioral toxicology. *In*: HAYES, A.W., KRUGER, C. L. **Principles and Methods of Toxicology**. Raven Press. London, 1989. p. 553-571. DOI <https://doi.org/10.1201/b17359>.

NUMAN, M. Maternal behavior. *In*: KNOBIL, E., NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**, New York: Raven press, 1994, p. 221-302. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1994.tb00816.x>.

PATIN, V.; VINCENT, A.; LORDI, B.; CASTON, J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? **Developmental Brain Research**. V. 149, p. 85-92, 2004. DOI <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2003.12.008>.

PRADO, E. R. S. **Superpopulação: um modelo de estresse social durante o período gestacional e seus efeitos na mãe e na prole**. 2018. 106 p. Dissertação (mestrado em Biociências aplicadas na saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2018. DOI <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1158>.

SAMUELSSON, A.M.; OHRN, I.; DAHLGREN J.; ERIKSSON, E.; ANGELIN, B.; FOLKOW, B. Prenatal exposure to interleukin-6 results in hypertension and alterations in the renin-angiotensin system of the rat. **Endocrinology**. V. 145, n. 11, p. 4897- 4911, 2004. DOI <https://doi.org/10.1210/en.2004-0742>.

SOMA-PILLAY, P.; NELSON-PIERCY, C.; TOLPPANEN, H.; MEBAZZA, A. Physiological changes in pregnancy; Physiological changes in pregnancy. **Cardiovascular journal of Africa**, v. 27, n. 2, p. 89, 2016. DOI: <https://10.5830/CVJA-2016-021>.

SOUZA-SPINOZA H.; GÓRNIAK S. L.; BERNARDI M. M. Exposição aos elementos durante o período perinatal. *In*: **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 566-574.

SWANN, H.E.; KEMPE, R.B.; VAN ORDEN, A.M.; BRUMLEY, M.R. Serotonergic activation of locomotor behavior and posture in one-day old rats. **Behav. Brain Res.**, V. 302, p. 104 – 14, 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.006>.

TEODOROV, E.; MORAES, A. P.; FELICIO, L. F.; VAROLLI, F. M., BERNARDI, M. M. Perinatal maternal exposure to picrotoxin: Effects on sexual behavior in female rat offspring. **Pharmacol. Biochem. Behavior**, v. 81, p. 935 -942, 2005.

DOI [https://10.1016/s0091-3057\(05\)00268-6](https://10.1016/s0091-3057(05)00268-6).

WEINSTOCK, M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behavior of the offspring. **Prog. Neurobiol.**, v. 65, n. 5, p. 427-451, 2001.

DOI [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(01\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(01)00018-1).

WEINSTOCK, M. Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 3-13, 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.08.004>.

WOOD, S.L.; BEYER B.K.; CAPPON, G.D. Species comparison of postnatal CNS development: functional measures Review Birth Defects **Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.**, V. 68, n. 5, p. 391-407, 2003. DOI <https://doi.org/10.1002/bdrb.10037>.