



Perspectivas Médicas

ISSN: 0100-2929

perspectivasmedicas@fmj.br

Faculdade de Medicina de Jundiaí
Brasil

Hamaué, Michele Cristiane; Sarti e Silva, Luana; Guimarães Moraes, Suzana
Alterações do ciclo reprodutivo de camundongos submetidos ao estresse e consequências na sua
prole.

Perspectivas Médicas, vol. 22, núm. 2, julio-diciembre, 2011, pp. 11-15

Faculdade de Medicina de Jundiaí
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=243221599003>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Alterações do ciclo reprodutivo de camundongos submetidos ao estresse e consequências na sua prole.

Changes of the reproductive cycle of mice subjected to stress and its consequences in offspring.

Palavras-chave: estresse, reprodutivo, prenhez, malformações, camundongo.

Key words: stress, reproductive, pregnancy, malformations, mice.

Michele Cristiane Hamaué*

Luana Sarti e Silva*

Suzana Guimarães Moraes**

**Alunas do Curso de Graduação em Medicina da Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ), em Jundiaí, São Paulo, Brasil.*

** *Professora Doutora do Departamento de Morfologia e Patologia Básica da FMJ, Jundiaí, São Paulo, Brasil.*

Endereço para correspondência:

Suzana Guimarães Moraes - Departamento de Morfologia e Patologia Básica da Faculdade de Medicina de Jundiaí - Rua Francisco Telles, 250, V. Arens - Jundiaí, São Paulo, Brasil. Tel: (11) 4587-1095. CEP 13.202-550. Cx. Postal 1295. E-mail: smoraes@hotmail.com

Não há conflitos de interesse.

Artigo ainda não publicado na íntegra.

Artigo recebido em 28 de Abril de 2011.

Artigo aceito em 12 de Setembro de 2011.

RESUMO

O estresse representa a resposta do organismo frente a estímulos agressores ou desconhecidos; seu agente causador é definido como estímulo estressante. O objetivo do presente trabalho foi estudar as consequências do estresse sobre o aparelho reprodutor feminino e na prole de fêmeas de camundongos. Para isto, foram utilizados fêmeas e machos de camundongos swiss; os estímulos estressores utilizados foram: luz contínua, ruído branco e rampas com angulação de 45°. No décimo oitavo dia gestacional, as fêmeas prenhas e não prenhas foram anestesiadas e eutanasiadas. A morfologia do aparelho reprodutor feminino foi estudada através da análise histológica dos seus órgãos; foram procuradas reabsorções precoces e tardias. Os fetos foram pesados e então medidos os comprimentos craniocaudal, occipitonasal e biauricular; foi pesquisada a presença de malformações externas. A análise histológica dos úteros e ovidutos não revelou diferenças morfológicas que pudessem ser associadas ao estresse. Foram encontradas reabsorções precoces

nos úteros de ambos os grupos. Os pesos e comprimentos craniocaudais dos fetos provenientes de prenhas submetidas e não submetidas ao estresse, não apresentaram diferença estatística significativa; também não houve diferença nos parâmetros occipitonasal e biauricular. Maior percentual de baixa implantação auricular foi encontrado no grupo de fetos oriundos do grupo estressado. Assim, o estresse não teve efeito teratogênico no desenvolvimento fetal analisado.

ABSTRACT

Stress represents the organism's answer to aggressive or unknown stimuli; its causing agent is defined as "stressing stimulus". The objective of the present work is to study the consequences of stress on the reproductive system of female mice and their offspring. For this purpose female and male Swiss mice have been utilized; the stressing stimuli employed were: continuous light, white noise and 45-degree ramps. On the eighteenth gestational day, both pregnant and nonpregnant females were lethally anaesthetized. The female reproductive system's morphology was studied through histological analysis of their organs; premature and late reabsorptions were searched. The fetuses were weighed and their craniocaudalis, occipitalnasalis and biauricularis lengths were measured; the presence of external malformations was searched. The histological analysis of the uteri and the oviducts did not reveal any morphological differences that could be associated with stress. Premature reabsorptions were found in the uteri of both groups. Fetal weights and craniocaudalis lengths from both groups of pregnant females (submitted and not submitted to stress) did not demonstrate any significant statistical difference; there was also no difference in the occipitalnasalis and biauricularis parameters. Higher percentage of low auricular implant was found in the fetuses from the stressed group. Thus stress did not have any teratogenic effect on the fetal development under analysis.

INTRODUÇÃO

Fisiologia do Estresse.

Estresse representa a resposta do organismo frente a estímulos agressores ou desconhecidos e o seu agente causador é definido como estímulo estressante ou estressor⁽¹⁾.

Podemos dividir a reação ao estresse em três fases: fase de alarme ou excitação, fase de resistência e fase de exaustão. A fase de alarme ou excitação é aquela na qual o estímulo é reconhecido como estressante, há um aumento da capacidade orgânica em responder ao estímulo através da elevação da liberação de noradrenalina e adrenalina, além de glicocorticoides. Já a fase de resistência é caracterizada quando o estímulo se mantém constante por certo período de tempo, diminuindo, desta forma, a capacidade de resposta do organismo frente ao estressor; há adaptação do organismo. A fase de exaustão, por sua vez, ocorre quando essa exposição constante ao estímulo não leva o organismo à diminuição da capacidade de reação e, portanto, não o leva à adaptação⁽²⁾.

O estresse tem o potencial de acarretar inúmeras alterações funcionais ao organismo humano, inclusive no ciclo reprodutivo; sua principal finalidade é promover adaptação às novas condições. A função reprodutiva humana está interligada a complexas relações entre o sistema nervoso central (SNC), hipófise, ovários, outras estruturas endócrinas e órgãos reprodutivos. Assim, quando o sistema límbico é estimulado por um agente estressante, ocorre ativação do hipotálamo, o qual, por sua vez, integra as informações neurais e humorais, estimula a atividade simpática, a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a vasopressina^(3,4). Estes neuro-hormônios são transportados até a hipófise anterior, estimulando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)⁽²⁾. O ACTH, ao atuar na zona fasciculada da glândula adrenal, promove maior secreção de glicocorticoides. O cortisol e as catecolaminas liberados pela adrenal são os responsáveis pela resposta fisiológica ao estresse⁽³⁾. A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) induzida pelo estresse, reduz a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas, GnRH, produzido no núcleo arqueado do hipotálamo tuberal, privando o folículo ovariano de adequado suporte de gonadotrofinas e resultando em anovulação⁽²⁾.

É importante ressaltar que, de acordo com Handa (2000) citado por Tanno (2002), a resposta aos estímulos estressores físicos ou psicológicos e o consequente aumento da secreção de ACTH e corticosterona é maior e mais prolongado em fêmeas do que em machos.

Além da influência dos esteroides sexuais sobre a ativação do eixo HHA em situação de estresse, foi também evidenciado que os hormônios secretados durante o estresse, como o CRH e os corticosteroides, podem afetar diretamente a secreção gonadal de esteroides sexuais, alterando, portanto, a função reprodutiva em muitas espécies⁽⁵⁾.

Há, também, evidências de que, tanto em humanos, como em animais, a antecipação de um evento é um potente ativador do eixo HHA, quando comparado ao evento propriamente dito. Em pacientes que apresentam fobia a algum estímulo, ocorre maior elevação nos níveis de cortisol no dia anterior em relação ao momento da exposição ao estímulo⁽⁶⁾.

Estudos indicam que a arginina-vasopressina (AVP), cuja origem é paraventricular, também está envolvida na resposta ao estresse⁽⁴⁾. A ativação do sistema nervoso simpático também leva ao aumento da glicemia, pressão arterial sanguínea e frequência cardíaca. Os opioides intrínsecos ao organismo humano, por exemplo, a beta-endorfina, também podem inibir o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano⁽³⁾.

Dependendo da intensidade e duração desses estímulos, as mulheres submetidas podem desenvolver "amenorréia hipotalâmica funcional" ou "anovulação crônica hipotalâmica", caracterizadas pela quiescência ovariana, amenorreia e consequente infertilidade⁽³⁾.

Estresse versus Gestantes

A gravidez está intimamente associada a importantes alterações fisiológicas e a adaptação fetal é crucial para seu desenvolvimento normal; o estresse pode interferir nesta adaptação⁽⁷⁾.

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema nervoso simpático (SNS) estão ativados durante a fase aguda do estresse. Um aumento na ativação destes sistemas é frequentemente relatado nos pacientes deprimidos e ansiosos, e mudanças dramáticas ocorrem durante a gravidez normal, para acomodar as exigências metabólicas materno-fetais⁽⁷⁾. Além disso, pode haver estresse e ansiedade significativos associados à transição à maternidade. A relação entre a aflição psicológica e o estresse materno, depressão e ansiedade durante a gravidez podem ter consequências graves para o desenvolvimento do feto expressas, por exemplo, por alterações do sono e apetite, alterações do eixo HHA e ativação SNS⁽⁴⁾. A desregulação de ambos os sistemas pode ser a base para uma importante ligação etiológica entre o estresse materno e o neurodesenvolvimento fetal⁽⁷⁾.

Em consequência da sobrecarga de atividades profissionais e decorrente postergação de planos de gravidez, dupla ou múltiplas jornadas de trabalho,

escassez de tempo dedicado ao lazer, compromisso a ser cumprido perante a família, violência, trânsito, cobranças, concorrência, desejos não realizados e tantos outros fatores estressantes, há um número crescente de indivíduos afetados pelo assunto em questão.

Estresse versus Feto

Devido ao seu rápido crescimento, o feto é particularmente vulnerável a insultos e modificações hormonais, o que sugere que situações adversas, como estresse e quaisquer mudanças negativas experimentadas pela gestante podem alterar o desenvolvimento e a saúde da criança⁽⁸⁻¹¹⁾.

Os resultados do estresse materno no feto podem ser baixo peso ao nascer, menor duração do tempo gestacional e menor circunferência da cabeça, que estão associados a um neurodesenvolvimento prejudicado, caracterizado por diminuição da habilidade acadêmica, baixa capacidade cognitiva, menor QI, problemas comportamentais, sofrimento psíquico e depressão. Além disso, crianças com baixo peso ao nascer têm maior risco para problemas comportamentais, como hiperatividade e dificuldades para interagir com outras pessoas^(4,7,12,13).

Em condições basais, aproximadamente 5% do cortisol total está na forma livre e é desta forma que atravessa a barreira hematoencefálica, porém níveis elevados de cortisol durante longos períodos de tempo podem ter efeitos prejudiciais sobre o cérebro humano. Além disso, o cortisol materno pode atravessar a placenta e estimular o eixo HHA fetal; mesmo se essa travessia não ocorrer, o cortisol materno pode estimular a produção de CRH fetal e da placenta, o que leva ao aumento dos níveis de cortisol^(7,14). O aumento dos níveis de cortisol durante a gravidez pode ser danoso, porém níveis elevados da enzima placentária, 11-beta-hidroxisteroide hidrogenase tipo 2 (11b-HSD2), protege o feto em desenvolvimento, ao converter o cortisol em sua forma inativa, a cortisona⁽⁴⁾. A atividade da 11b-HSD2 é influenciada por diversos fatores. Em experimentos, ratos expostos ao estresse agudo mostraram um aumento imediato da atividade enzimática em 160%, enquanto que não houve mudança nos seis dias seguintes da exposição ao estresse, indicando que o estresse crônico pode ser prejudicial para uma gravidez saudável⁽⁷⁾.

No entanto, alguns pesquisadores sugeriram que os baixos níveis de estresse podem realmente ter uma função adaptativa e pode afetar positivamente a criança; existe a possibilidade de que níveis baixos ou moderados de estresse durante a gravidez podem aumentar a maturação fetal. Ademais, estes autores sugerem que a genética é capaz de desempenhar um

papel que explica porquê alguns indivíduos são influenciados negativamente pelo estresse pré-natal e outros permanecem resilientes ou mesmo beneficiam-se dele⁽⁷⁾. Outros, porém, afirmam que não há correlação entre as situações.

Muito do entendimento desses mecanismos provém de modelos animais, no entanto, deve-se ter cautela ao fazer um paralelo com o ser humano, pois há importantes diferenças no desenvolvimento neurológico entre as espécies. Por exemplo, o desenvolvimento do cérebro de ratos e camundongos ocorre após o nascimento, diferentemente dos humanos, nos quais a maioria do desenvolvimento ocorre no período pré-natal⁽⁷⁾.

OBJETIVOS

Tendo em vista que diversos autores estudados durante a revisão bibliográfica divergiram quanto aos seus achados que relacionavam o estresse às possíveis alterações em órgãos reprodutores femininos e teratogênese, tivemos como motivação avaliar aquelas estruturas, bem como o peso, crescimento e morfologia fetal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Camundongos fêmeas (*Mus musculus domesticus*), do gênero swiss provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas foram colocadas para acasalar; na proporção de duas fêmeas para um macho; nas manhãs seguintes, foi verificada a presença de rolhas vaginais, cuja detecção determina a metade do primeiro dia gestacional.

As fêmeas foram divididas em quatro grupos de acordo com a presença de gestação e submissão ao estresse, o grupo um e dois continham fêmeas prenhas submetidas e não submetidas ao estresse, respectivamente; o três e o quatro, compunham-se de não prenhas com estresse e sem estresse, respectivamente.

Como agentes estressores foram utilizados luz contínua, ruído branco e rampa para inclinar a gaiola a 45° e dificultar o acesso à ração. Para evitar a fase de exaustão do estresse, tais agentes foram substituídos a cada dois dias.

Ao fim de 18 dias de experimento houve sacrifício em câmara de gás carbônico de todas as fêmeas, as quais foram submetidas à laparotomia e tiveram seus úteros e fetos, quando presentes, retirados; foram calculados os índices reprodutivos, Índice de Acasalamento (IA= número de fêmeas que acasalaram/número de fêmeas do grupo x 100) e Índice de Fertilidade (IF= número de fêmeas com crias/número de fêmeas que acasalaram x 100). Os úteros e ovidutos dos grupos três e quatro foram, então, processados convencionalmente, desidratados e incluídos em parafina, com cortes de

5 m e corados com hematoxilina e eosina. As lâminas histológicas foram analisadas e documentadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E800. A captura das imagens foi realizada por meio de um programa de análise de imagens (software Image Pro Lite). Foram avaliados, em aumento de 100X, 5 campos aleatórios por lâmina de todas as fêmeas de cada grupo. Os cornos uterinos dos grupos um e dois foram seccionados na extensão longitudinal e se procedeu à análise e contagem dos fetos, das placentas e das reabsorções tardias. Em seguida os úteros foram colocados em sulfeto de amônia 10% (por 10 minutos), lavados em água corrente e em seguida imersos em solução constituída por partes iguais de ácido clorídrico a 1% e solução de ferrocianeto de potássio a 20%, para contagem dos sítios de implantação e de reabsorções embrionárias precoces⁽¹⁵⁾. As reabsorções tardias e os fetos foram contados; estes também foram pesados e os comprimentos craniocaudal, occipitonasal e biauricular medidos, além de observados quanto à presença de malformações externas com auxílio de um estereomicroscópio. As medidas obtidas dos fetos foram submetidas ao estudo estatístico utilizando-se os testes ANOVA e TUKEY'S MULTIPLE COMPARISON TEST, com nível de rejeição para hipótese de nulidade fixada em 5% ($p < 0,05$), com o auxílio do software PRISMA 2.0.

RESULTADOS

Os índices de acasalamento e fertilidade foram, respectivamente, 100% e 6,66%. A análise histológica dos úteros e ovidutos não revelou diferenças morfológicas entre os grupos experimentais que pudessem ser associadas ao estresse. Foram observadas apenas as alterações já esperadas entre úteros de nulíparas e grávidas, como por exemplo a decidualização dos fibroblastos, presente no útero grávidico, sendo todas observações características deste processo.

Com relação à análise dos úteros grávidicos foram encontradas reabsorções precoces nos úteros de fêmeas de ambos os grupos, não havendo diferença estatística ($p > 0,05$).

Os pesos, comprimentos craniocaudais, occipitonasal e biauricular dos fetos provenientes de prenhas submetidas ao estresse não apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas ao grupo controle. Maior percentual de baixa implantação de orelhas foi encontrado no grupo de fetos do grupo exposto aos agentes estressores, contudo igualmente sem significância estatística ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Até mesmo em 400 A.C., Hipócrates já tinha conhecimento da importância das emoções sobre a

gravidez. Além disso, há mais de mil anos na China, sabe-se da importância das atitudes no pré-natal, o que levou os chineses a instituir a primeira clínica de pré-natal. Tornou-se claro, então, que as condições neonatais muitas vezes são marcadores para o futuro da saúde e estes resultados têm estimulado muitas linhas de pesquisa para explorar a natureza da programação fetal^(16,17).

Revendo a bibliografia, Lazinski et al.(2008) referem em seu estudo que o resultado do estresse materno ao feto pode ser baixo peso ao nascer; porém no presente estudo não foi obtido este resultado, assim como o estudo realizado com 1500 mulheres suecas e estudo de coorte com quase 700 mulheres norueguesas citados pelo mesmo autor não encontraram nenhuma associação entre depressão ou ansiedade materna durante a gestação e peso fetal ao nascer⁽⁷⁾.

O estresse, segundo outros estudos, também possui efeitos sobre o sistema imunológico. O recém-nascido é rapidamente colonizado por uma microflora nos epitélios de revestimento e, portanto, dependente do início precoce da imunidade inata. O processo de nascimento e de adaptação pós-natal está associado com o recrutamento e ativação de leucócitos, uma resposta de fase aguda. A hipótese naqueles estudos foi de que o processo de nascimento, associado com o estresse e as principais alterações fisiológicas, incluindo a criação de uma microflora comensal, poderia ter um impacto sobre a resposta imune inata do recém-nascido em termos de recrutamento de leucócitos e quimiotaxia⁽¹²⁾.

Segundo Wisborg (2008), o estresse psicológico durante a gravidez também aumenta o risco de natimortalidade em 80%⁽¹⁷⁾. O resultado foi ajustado para um número de potenciais fatores contribuintes, mas a influência de fatores não controlados não pode ser descartada^(12,13).

De acordo com os resultados obtidos, não deve ser descartada a possibilidade de existir maior maturação fetal quando há exposição a baixos ou moderados níveis de estresse, assim como citou Lazinski et al.(2008), já que foram encontrados maior peso e maior comprimento nos fetos provenientes de fêmeas submetidas ao estresse⁽⁷⁾. Este fato pode ser explicado pela teoria da adaptação do organismo ao estresse aliada à genética que pode favorecer a resiliência ou mesmo benefício de alguns indivíduos quando expostos ao estresse pré-natal em oposição a outros que são prejudicados quando expostos ao mesmo.

Consequências na vida futura de fetos oriundos de fêmeas expostas ao estresse não podem ser descartadas⁽¹¹⁾, uma vez que o atual estudo teve seu término com a prole em seu 18º dia gestacional, necessitando assim de estudos mais prolongados e

detalhados para análise dos efeitos do estresse sobre o desenvolvimento neuropsicomotor e interferências comportamentais nestes fetos. O mesmo autor anteriormente citado também afirma que o estresse materno durante a gestação pode diminuir a capacidade cognitiva, causar sofrimento psíquico e outros problemas comportamentais aos fetos, o que pode ser sugerido através dos achados de baixa implantação de orelhas nos fetos-alvo deste estudo, que podem estar associadas a problemas neurológicos que somente seriam percebidos durante seu desenvolvimento futuro.

CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu concluir que o estresse não teve efeito prejudicial e/ou teratogênico no desenvolvimento do feto no que diz respeito ao peso, crescimento e morfologia fetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pickering AD. The concept of biological stress. In: Pickering AD. *Stress and fish*. New York: Academic Press, 1981. p.225-55.
- Tanno AP, Marcondes FK. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. *Ver Bras Ciênc Farm*. 2002;38(3):273-89.
- Moraes SNT, Lima JG, Souza MBC, Azevedo GD. Estresse e função reprodutiva feminina. *Ver Rev Bras Saúde Matern Infantil*. 2005;5(1):119-25.
- Douglas AJ. Central noradrenergic mechanisms underlying acute stress responses of the Hypothalamo-pituitary-adrenal axis: adaptations through pregnancy and lactation. *Stress*. 2005;8(1):5-18.
- Abd el Mohsen MM, Fahim AT, Motawi TM, Ismail NA. Nicotine and stress: effect on sex hormones and lipid profile in female rats. *Pharmacol Res*. 1997;35(3):181-7.
- Levine S. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol*. 2000;405(1-3):149-60.
- Lazinski MJ, Shea AK, Steiner M. Effects of maternal prenatal stress on offspring development: a commentary. *Arch Womens Ment Health*. 2008;11(5-6):363-75.
- Fonseca, ESM. Participação do sistema opioide e dos glicocorticóides nas alterações comportamentais e da imunidade inata induzidas na prole pelo estresse pré-natal. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-21092006-144127/>>. Acesso em: 14 dez. 2009.
- Hirst JJ, Yawno T, Nguyen P, Walker DW. Stress in pregnancy activates neurosteroid production in the fetal brain. *Neuroendocrinology*. 2006;84(4):264-74.
- Fujimori K, Takanashi A, Endo C, Sato A. Stress hormone responses during 24-hour hypoxemia in preterm goat fetus. *Tohoku J Exp Med*. 2008;215(2):189-97.
- Knackstedt MK, Hamelmann E, Arck PC. Mothers in stress: consequences for the offspring. *Am J Reprod Immunol*. 2005;54(2):63-9.
- Newton RW, Hunt LP. Psychosocial stress in pregnancy and its relation to low birth weight. *Br Med J*. 1984;288(6425):1191-4.
- Monk C, Fifer WP, Myers MM, Sloan RP, Trien L, Hurtado A. Maternal stress responses and anxiety during pregnancy: effects on fetal heart rate. *Dev Psychobiol*. 2000;36(1):67-77.
- Talge NM, Neal C, Glover V; Early Stress, Translational Research and Prevention Science Network: Fetal and Neonatal Experience on Child and Adolescent Mental Health. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J Child Psychol Psychiatry*. 2007;48(3-4):245-61.
- Salewski E. Farbemethode zum makroskopischen nachweis von implantationsstellen am uterus der ratte. *Arch Exp Path Pharm*. 1964;247:367.
- Yektaei-Karin E, Moshfegh A, Lundahl J, Berggren V, Hansson LO, Marchini G. The stress of birth enhances in vitro spontaneous and IL-8-induced neutrophil chemotaxis in the human newborn. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007;18(8):643-51.
- Wisborg K, Barklin A, Hedegaard M, Henriksen TB. Psychological stress during pregnancy and stillbirth: prospective study. *BJOG*. 2008;115(7):882-5.