



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**Privação de sono durante a gestação em ratas: Efeitos sobre o
comportamento maternal e desenvolvimento inicial da prole**

Grace Violeta Espinoza Pardo

Porto Alegre-RS

2014

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Privação de sono durante a gestação em ratas: Efeitos sobre o comportamento maternal e desenvolvimento inicial da prole

Grace Violeta Espinoza Pardo

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Porto Alegre-RS

2014

A Magna Pardo, mi madre

AGRADECIMENTOS

Faz dois anos que eu cheguei a estas terras gaúchas com muitas motivações nas costas e muitas ganas de aprender algo novo para mim. Achei que não seria fácil aprender a língua, entender as aulas, aprender a viver com pessoas novas e que não suportaria a saudade da minha família. Mas não foi bem assim, neste lugar eu encontrei pessoas maravilhosas que me fizeram sentir “*como en casa*” e graças a elas eu estou concluindo esta etapa da minha vida, por isso eu quero agradecer a todas elas, por confiarem em mim, pelos seus ensinamentos, por ter-me dado apoio em momentos difíceis e por ter-me ensinado a ser melhor pessoa.

Primeiramente quisera agradecer a meu orientador o Prof. Aldo Lucion. Eu estou muito grata pela oportunidade que ele me deu para vir a esta Universidade a estudar o mestrado e pela sua confiança para desenvolver esta pesquisa que é nova na sua linha. Agradeço lhe também pela sua paciência, pela sua disponibilidade e dedicação para me orientar, e também pela sua preocupação e interesse na minha formação.

Agradeço à Organização dos Estados Americanos (OEA) por ter me outorgado uma bolsa de estudos de mestrado aqui no Brasil e a Capes por ter financiado este trabalho de pesquisa.

Agradeço aos membros da Banca Prof. Dra. Marcia Giovenardi da UFSCPA, a Prof. Dra. Marta Antonelli da Universidade de Buenos Aires e ao Prof. Dr. Marcos Emilio Frizzo da UFRGS por aceitar avaliar esta dissertação e as suas importantes sugestões.

O desenvolvimento desta pesquisa tem sido muito motivador graças às inestimáveis aportes do professor Luiz Sanvitto. O desenho experimental desta pesquisa se tornou ainda mais interessante e desafiador após as discussões com ele.

Sendo uma linha nova para o nosso grupo de pesquisa foi importante aprender as técnicas de privação de sono para modelos animais. Assim, conseguimos a vênua da professora Dra. Mónica Andersen para fazer um estágio no seu laboratório na Universidade Federal de São Paulo. Estou muito agradecida com ela pela oportunidade e com Gabriel Natan Pires, seu aluno de doutorado, com quem aprendi estas técnicas e com quem tive a oportunidade de discutir os seus achados na mesma linha de pesquisa, os quais para mim foram muito motivadores.

Estou muito agradecida com o apoio do professor Luiz Carlos Kucharski nas análises metabólicas desta pesquisa. A sua participação pessoal na fase de coleta animou a todos os colaboradores e fez mais ameno o trabalho. Agradeço também a sua estudante de doutorado Ana Lucia Hoelfeld, com quem aprendi interessantes procedimentos bioquímicos.

Agradeço ao professor Alexandre La Rosa quem me permitiu fazer as análises de ROS no seu laboratório e agradeço ainda mais a seu aluno de doutorado Alexandre Luz Castro, pela sua paciência e amabilidade para me ensinar e acompanhar nos procedimentos destes ensaios.

Agradeço também à Professora Ilma Simoni Brum e seus alunos Patrícia Borba Martiny e Diego Duarte Alcoba por disponibilizarem o seu laboratório para fazer as extrações de ocitocina plasmática.

Quero expressar meu agradecimento aos meus colegas do Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, pela sua solidariedade e gentileza para me favorecer o uso de espaços no biotério e das áreas do laboratório nos momentos em que todos nós estávamos correndo as nossas pesquisas. Assim também lhes agradeço pelos importantes aprendizados no estudo do comportamento e análise

bioquímico, e também pelas importantes sugestões no avanço deste trabalho. Eu me levo as melhores impressões deles.

Quero agradecer infinitamente aos colaboradores deste estudo e também amigos, que contribuíram para que este trabalho conseguisse um bom porto. Agradeço de maneira muito especial a Thiago Henrique por suas importantes sugestões para o desenho experimental e pela sua inestimável colaboração nas microdissecções dos encéfalos, a Cátia Correa pela sua ajuda no registro do comportamento materno e na revisão da escrita de esta dissertação, a Rafael Correa pela sua ajuda durante o experimento e pela sua colaboração na análise dos comportamentos de preferência olfatória. Agradeço também a Ana Carla da Cunha e Amanda Brondani pela sua ajuda durante a fase de coleta deste trabalho. Agradeço a Samir de Souza pelos importantes ensinamentos em bioquímica e a Bettega Lopes pela sua gentileza e disposição constante em colaborar durante a fase experimental desta pesquisa.

Agradeço infinitamente a Jéferson Ferraz, meu colega de trabalho e amigo. Esta pesquisa não teria este final se não fosse pela sua inestimável ajuda e constante disposição e comprometimento no desenvolvimento deste trabalho, desde o início com a construção dos materiais para a privação de sono, o planejamento, a coleta de dados, a assessoria na análise estatística até o final, com as discussões dos resultados.

Provavelmente meu português escrito ainda não é muito bom, mas faz um ano ele ainda era pior e eu tive dificuldade para plasmar as minhas ideias no projeto de pesquisa. Neste momento eu tive o auxílio de Marcia Scherem. Nesta mesma linha agradeço ao PPG Fisiologia, especialmente a Sílvia M^a Zanette Guimarães, pela sua gentileza em ler esta dissertação e corrigir meu português nesta dissertação.

A minha estância neste lugar tem sido muito confortável e feliz durante estes dois anos. Quando cheguei a Porto Alegre eu caí em boas mãos, fui muito bem recebida por uma pessoa a quem aprendi a querer bem, e quem me ofereceu a sua casa e a sua amizade. Ela e a sua família fizeram que eu não sintesse saudade do meu lar. Estou eternamente agradecida com Amanda Brondani Mucellini e a sua família em Santa Maria e seus nonos Guiseppi e Clarita aqui em Porto Alegre. Todos eles têm-me cuidado e querido como a um membro mais da sua família.

Finalmente quero agradecer a Enver Oruro, meu companheiro de mais de uma década, por acreditar em mim, pelo seu carinho e pelos seus ânimos constantes para o início e o desenvolvimento deste trabalho.

INDICE

Resumo	
Abstract	
Resumen	
Lista de abreviaturas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 O sono durante a gravidez	13
1.2 Distúrbios do sono durante a gravidez.....	15
1.3 Privação do sono	15
1.4 Comportamento maternal, prolactina, corticosterona e ocitocina	16
1.5 Ambiente pré-natal e desenvolvimento da prole	17
2 HIPÓTESE	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos:.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Animais	22
4.2 Desenho experimental	22
4.3 Ciclo estral.....	24
4.4 Gestação.....	24
4.5 Parto e Pós-parto	24
4.6 Peso corporal.....	25
4.7 Ingesta alimentar.....	25
4.8 Privação de sono paradoxal	26
4.9 Análise hormonal	27
4.10 Análises Teciduais das mães	30
4.11 Análises Teciduais dos fetos	31
4.12 Análise de Espécies Reativas de oxigênio Total (ROS).....	32
4.13 Análise de BDNF de estruturas encefálicas dos filhotes.....	32
4.14 Análises comportamentais	33
4.14.1 Comportamento maternal	33
4.14.2 Preferência olfatória pelo odor das mães	34
4.15 Análise estatística	36
5 RESULTADOS.....	37
5.1 Ganho de peso durante a gravidez	37
5.2 Ingesta diária de ração padrão durante a gravidez	38
5.3 Peso de tecido adiposo visceral e glândulas adrenais na gravidez e no pós-parto.....	40
5.4 Dados da prole durante o desenvolvimento pré-natal e pós-natal	41
5.5 Duração da Gestação e sucesso de sobrevivência da prole	43
5.6 Resultados bioquímicos	44
5.6.1 Perfil hormonal das mães no período gestacional e no pós-parto	44

5.6.2	Perfil metabólico das mães no 20º dia da gestação	46
5.7	Concentração de espécies reativas de oxigênio totais no sistema nervoso dos fetos.....	47
5.8	Níveis de BDNF no córtex, cerebelo e hipocampo dos fetos.....	48
5.9	Resultados Comportamentais.....	49
5.9.1	Comportamento materno acumulado no pós-parto.	49
5.9.1.1	Comportamento materno acumulado em diferentes períodos de registro diário	51
5.9.2	Preferência olfatória de filhotes no dia 7 pós-natal.....	54
6	DISCUSSÃO.....	56
6.1	Efeitos sobre o metabolismo durante a gravidez	56
6.2	Efeito da privação de sono sobre o eixo HPA e os hormônios das mães	62
6.3	Desenvolvimento e sucesso da gravidez	65
6.4	Desenvolvimento do SNC dos fetos	66
6.5	Eixo HPA e hormônios das mães no pós-parto	67
6.6	Efeitos sobre o comportamento materno	68
6.7	Efeitos sobre o desenvolvimento cognitivo inicial dos filhotes	70
7	CONCLUSÕES.....	72
8	PERSPECTIVAS.....	73
9	REFERENCIAS.....	74

RESUMO

O sono das mulheres é continuamente alterado por mudanças fisiológicas durante o seu desenvolvimento. O incremento de atividade laboral da mulher na sociedade atual aumenta a propensão para sofrer alterações no seu padrão de sono. A alteração do sono é mais comum durante a gravidez, principalmente devido a mudanças neuroendócrinas características desta etapa. A interrupção ou perda parcial ou total do sono durante a gravidez é considerado um fator de risco para as complicações no trabalho de parto e o desenvolvimento emocional materno no pós-parto, influenciando respectivamente a sobrevivência do neonato e a relação mãe-filho. Por outro lado, a perda de sono durante a gravidez em roedores tem efeitos negativos sobre aspectos morfológicos, fisiológicos e comportamentais da prole. Considerando que os fatores ambientais podem ser mais bem controlados em modelos experimentais, realizamos um estudo de privação de sono paradoxal durante a última semana da gravidez. Ratas Wistar foram submetidas a privação de sono paradoxal durante vinte horas diárias com quatro horas de recuperação de sono por seis dias consecutivos, entre o dia 14 e 20 da gravidez, utilizando a técnica de plataformas múltiplas. Foram implementados dois grupos controles. Um grupo controle caixa que não foi submetido a nenhum tipo de manipulação e outro grupo controle plataforma foi submetido a um ambiente semelhante ao grupo privado de sono com exceção da água circundante das plataformas. Ambos os grupos controles permaneceram na sala de privação de sono durante as sessões o tempo que durou o experimento. Desde o início da gravidez o peso corporal e a ingesta alimentar foram diariamente registrados nos três grupos. O último dia da privação de sono (dia 20 da gestação) seis animais de cada grupo foram sacrificados para estudos de parâmetros metabólicos e hormonais maternos e fetais. O resto dos animais foi colocado em caixas transparentes individuais, onde pariram e permaneceram até o dia sete do pós-parto. Um dia depois do parto todas as ninhadas foram padronizadas a oito filhotes (4 machos e 4 fêmeas). Durante os seis primeiros dias do pós-parto foi registrado o comportamento materno em quatro sessões diárias. Pela manhã do sétimo dia pós-parto as mães foram sacrificadas e os filhotes, após serem submetidos no teste de preferência olfatória, foram também sacrificados. Nossos resultados mostraram que a privação de sono paradoxal na última semana de gravidez em ratas não afetou os níveis plasmáticos de corticosterona e o peso relativo das glândulas adrenais maternos, mas inibiu de maneira importante o ganho de peso corporal e incrementou as concentrações de prolactina e ocitocina maternos. Além disso, o desenvolvimento da gestação resultou em abortos e complicações no parto espontâneo e afetou o desenvolvimento do sistema nervoso fetal resultando no incremento da concentração de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) hipocampal, mas não da concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes efeitos foram observados, de modo mais leve, no grupo controle plataforma, indicando que estes resultados refletem tanto os efeitos da falta de sono quanto os efeitos do ambiente do protocolo de privação de sono. Por outro lado, no pós-parto o peso corporal e o perfil hormonal materno se mostraram sem alterações; da mesma maneira o desempenho do comportamento materno e a preferência olfatória dos filhotes pelo odor da mãe não foram afetados. Concluímos que a falta de sono no final da gravidez afeta dramaticamente os processos fisiológicos relacionados ao metabolismo ao ganho de peso corporal e os sistemas da prolactina e ocitocina maternos, assim como o desenvolvimento e sucesso da gravidez, que afetam o desenvolvimento do hipocampo fetal. Entanto, no pós-parto, a privação de sono paradoxal, não afetou o desempenho do cuidado materno nem o aprendizado olfatório dos filhotes ao odor da mãe, indicando que a relação mãe-filhote não foi alterada.

ABSTRACT

The sleep of women is continuously altered by physiological changes during their development. The increase of labor activity of women in modern society increases the propensity of suffer alterations in their sleep pattern. The sleep disturbance is more common during pregnancy, mainly due to neuroendocrine changes characteristic of this phase. Interruption or total or partial lost sleep during pregnancy is considered a risk factor for complications during labor and maternal emotional development in postpartum, respectively influencing the survival of the newborn and the mother-child relationship. Moreover, sleep loss in rodents during pregnancy has negative effects on morphological, physiological and behavioral aspects of the offspring. Whereas environmental factors can be better controlled in experimental models, we conducted a study of deprivation of paradoxical sleep during the last week of pregnancy. Wistar rats were subjected to deprivation of paradoxical sleep for twenty hours a day with four hours of recovery sleep for six consecutive days, between the 14th and 20 of pregnancy, using the technique of multiple platforms. Two control groups were implemented. A control group box that was not subjected to any manipulation and another control group was subject a platform similar to sleep-deprived group with the exception of the platforms surrounding water environment. Both control groups remained in the room of sleep deprivation during the sessions until the experiment lasted. Since the beginning of pregnancy body weight and food intake were recorded daily in the three groups. The last day of sleep deprivation (day 20 of gestation) six animals from each group were sacrificed for studies of parameter metabolic and hormonal maternal, and fetal. The rest of the animals were placed in individual transparent boxes where calved and stayed until seven days postpartum. One day after birth all litters were standardized to eight pups (4 males and 4 females). During the first six days of postpartum maternal behavior was recorded in four daily sessions. In the morning of the postpartum seventh day, the mothers were sacrificed and, after being subjected to the olfactory preference test, the pups were also killed. Our results showed that paradoxical sleep deprivation in the last week of pregnancy in rats did not affect the plasma levels of corticosterone and the relative weight of the maternal adrenal glands, but inhibited considerably the body weight gain and increased concentrations of prolactin and maternal oxytocin. Furthermore, the development of pregnancy resulted in miscarriages and complications in delivery and affected the development of the fetal nervous system resulting in increased concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) hippocampal, but not the concentration of reactive oxygen species (ROS). These effects were observed in lighter mode in the platform control group, indicating that these results reflect both the effects of lack of sleep as the environmental effects of sleep deprivation protocol. On the other hand, the postpartum body weight and the maternal hormonal profile is shown without change; just as the performance of maternal behavior and the olfactory preference of pups for the odor mother's were not affected. We concluded that lack of sleep in late pregnancy dramatically affects the physiological processes related to metabolism to gain weight and the systems of maternal prolactin and oxytocin, as well as the development and success of pregnancy, affecting the development of the fetal hippocampus. However, the paradoxical sleep deprivation in postpartum, did not affect the performance of maternal care, nor olfactory learning of pups for the odor of the mother, indicating that the mother-cub relationship has not altered.

RESUMEN

El sueño de las mujeres es alterado continuamente por cambios fisiológicos durante todo su desarrollo. El incremento de la actividad laboral de la mujer en la sociedad actual la hace más propensa a sufrir alteraciones en su patrón de sueño. La alteración del sueño es más común durante el embarazo, principalmente debido a cambios neuroendocrinos característicos de esta etapa. La interrupción o pérdida parcial o total del sueño durante el embarazo es considerado un factor de riesgo para complicaciones del trabajo de parto y el estado emocional materno en el posparto, influenciando de esta manera en la sobrevivencia del neonato y la relación madre-hijo, respectivamente. Por otro lado, la pérdida de sueño durante la gravidez en roedores tiene efectos negativos sobre aspectos morfológicos, fisiológicos y comportamentales de la descendencia. Considerando que los factores ambientales pueden ser mejor controlados en modelos experimentales, realizamos un estudio de privación de sueño paradójico durante la última semana de la gravidez. Ratas Wistar fueron sometidas a privación de sueño paradójico por veinte horas diarias con cuatro horas de recuperación por seis días consecutivos, entre el día 14 y 20 de la gravidez, utilizando la técnica de plataformas múltiples. Fueron implementados dos grupos controles. Un grupo control caja que no fue sometido a ningún tipo de manipulación y un grupo control plataforma fue sometido a un ambiente similar al del grupo privado de sueño con excepción del agua circundante a las plataformas. Ambos grupos controles permanecieron en la sala de privación de sueño durante las sesiones que duró el experimento. Desde el inicio de la gravidez el peso corporal y la ingesta de alimentos fueron diariamente registrados en los tres grupos. El último día de la privación de sueño (día 20 de la gestación) seis animales de cada grupo fueron sacrificados para estudios de parámetros metabólicos y hormonales maternos y fetales. El resto de los animales fueron colocados en cajas transparentes individuales, donde parieron y permanecieron hasta el día siete del posparto. Un día después del parto todas las camadas fueron uniformizadas a ocho crías (4 machos e 4 hembras). Durante los primeros seis días posparto fue registrado el comportamiento materno en cuatro sesiones diarias. Por la mañana del séptimo día posparto las madres fueron sacrificadas y las crías, luego de ser sometidas al test de preferencia olfatoria, también fueron sacrificadas. Nuestros resultados mostraron que la privación de sueño paradójico durante la última semana de gravidez en ratas no afectó los niveles plasmáticos de corticosterona y el peso relativo de las glándulas adrenales maternas, pero inhibió de manera importante la ganancia de peso corporal e incrementó las concentraciones plasmáticas de prolactina y oxitocina maternas. Además, el desarrollo de la gestación resultó en abortos y complicaciones del parto espontáneo e afectó el desarrollo del sistema nervioso fetal resultando en incremento de la concentración del factor de crecimiento cerebral trófico (BDNF) hipocampal, pero no de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos efectos también fueron observados, de modo más leve en el grupo control plataforma, indicando que estos resultados reflejan tanto los efectos de la falta de sueño como los efectos del ambiente de privación de sueño. Por otro lado, en el postparto el peso corporal y el perfil hormonal maternos se mostraron sin alteraciones; de la misma forma, el desempeño del comportamiento materno, la preferencia olfatoria de las crías por el olor de la madre no fueron afectados. Concluimos que la falta de sueño al final de la gestación afecta dramáticamente los procesos fisiológicos relacionados al metabolismo y los sistemas de la prolactina y oxitocina maternas, así como el desarrollo del éxito de la gestación, que afecta el desarrollo del hipocampo fetal. Entre tanto, en el postparto, la privación de sueño paradójico no afectó el desempeño del cuidado materno y el aprendizaje inicial de las crías del olor de la madre, indicando también que la relación madre-cría no fue alterada.

Lista de Abreviaturas

ACTH: adenocorticotropina
ATP: Adenosina tri fosfato
AVP: arginina vasopressina
BDNF: Fator de crescimento trófico derivado do cérebro
CA3: região da formação hipocampal Corno de Amon 3
EEG: Eletroencefalograma
Fos: fator de transcrição de genes de expressão rápida
GABA: Gamma amino butírico
HPA: Hipotálamo Hipofisiário
IL-6: interleucina 6
LTD: Depressão de longa duração
LTP: Potenciação de longa duração
mRNA: ácido ribonucleico mensageiro
NMDA: N-Metil-D aspartato
NR2B: receptor de glutamato do subtipo NMDA
NREM: movimentos não rápidos dos olhos
PVN: Nucleo paraventricular
REM: movimentos rápidos dos olhos
ROS: Espécies reativas de oxigênio
SNA: sistema nervoso autônomo
SNC: Sistema Nervoso Central
SNS: sistema nervoso simpático
SON: Núcleo supraóptico
SWS: sono de ondas lentas
t-PA: Plasminogenio ativador de tecido

Listade figuras

Figura 1: Desenho Experimental.....	23
Figura 2. Privação de sono paradoxal por método de plataformas múltiplas.....	28
Figura 3. Comportamento Maternal.....	34
Figura 4. Teste de preferencia olfatória.....	35
Figura 5. Percentagem do Ganho de peso corporal durante a gravidez de ratas.....	37
Figura 6. Ingesta diária de ração padrão por animal.....	39
Figura 7. Ingesta diária de ração padrão por animal durante a recuperação de sono.....	40
Figura 8. Cuidado materno e lambida total acumulado.....	50
Figura 9. Cuidado materno acumulado diário.....	51
Figura 10. Cuidado materno acumulado nos dias 1, 2,3,4,5 e 6 em diferentes períodos de registro.....	52
Figura 11. Parâmetros de comportamento não materno diário.....	53
Figura 12. Preferencia olfatória dos filhotes no dia 7 pós-natal.....	54

Lista de Tabelas

Tabela 1. - Peso corporal das mães durante a gravidez e no pós-parto.....	38
Tabela 2. Efeitos da privação de sono sobre o peso da glândula adrenal e o tecido adiposo visceral durante a gestação e no pós-parto.....	41
Tabela 3: efeitos da privação de sono gestacional sobre dados dos filhotes no dia 20 pré-natal e dia 7 pós-natal.....	42
Tabela 4. Duração da gestação e sucesso de sobrevivência da prole	44
Tabela 5. Efeitos da privação de sono sobre os níveis plasmáticos de corticosterona, progesterona, prolactina e ocitocina no 20o dia gestacional.....	45
Tabela 6. Efeitos da privação de sono sobre o nível de triglicerídeos e glicogênio no fígado e músculo soleo das ratas no dia 20 da gestação.....	46
Tabela 7. Níveis de ROS total no Córtex, Cerebelo e Hipocampo dos fetos no dia 20 pré-natal.....	47
Tabela 8. Concentrações de BDNF no Córtex, Cerebelo e Hipocampo de fetos no dia 20 pré-natal.....	48
Tabela 9: Comportamento materno acumulado durante os dias 1, 2, 3, 4,5 e 6 do pós-parto.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sono durante a gravidez

O sono é considerado um estado fisiológico reversível de resposta reduzida aos estímulos externos, que se caracteriza pela diminuição do tônus e a atividade muscular assim como do metabolismo e do gasto energético do corpo (Hirshkowitz, 2004; Carskadon and Dement, 2005; Colten and Altevogt, 2006; Banks and Dinges, 2007; Lesku et al., 2009; Siegel, 2009;).

Nos seres humanos e na maioria dos mamíferos são claramente distinguidos três estados comportamentais de sono-vigília: vigília, sono de ondas lentas (Tortero and Vanini, 2010) e sono REM (Movimento Rápido dos Olhos) ou sono paradoxal, os quais têm sido caracterizados por registros eletrofisiológicos. Em humanos, o sono REM é caracterizado principalmente pela atividade do eletroencefalograma (EEG) dessincronizado, com ondas de alta frequência e baixa amplitude, acompanhadas de movimentos oculares rápidos e fraqueza muscular, enquanto o sono de ondas lentas caracteriza-se por uma sucessão de três fases em que aparecem ondas lentas sincronizadas de baixa frequência e amplitude alta. Ambos aparecem alternadamente durante uma noite de sono (Hirshkowitz, 2004; Carskadon and Dement, 2005; Colten and Altevogt, 2006).

Várias mudanças fisiológicas ocorrem durante o sono. O ritmo cardíaco incrementa a pressão sanguínea (determinado pela ativação do Sistema Nervoso Autônomo-SNA), devido aos despertares nas fases iniciais do sono NREM, desaparece no sono de ondas lentas (SWS), e no REM aumenta novamente comparado com a vigília. A ventilação e fluxo respiratório também se alteram especialmente durante o sono REM, e o fluxo sanguíneo cerebral se reduz significativamente durante o sono NREM, em quanto que no REM se incrementa em algumas regiões cerebrais semelhantes à vigília (p.e. o sistema límbico e as áreas visuais). A secreção do hormônio de crescimento ocorre nas primeiras horas do sono SWS, enquanto que a secreção da hormona tiroide ocorre no final da noite, assim como a melatonina (Carskadon and Dement, 2005; Colten and Altevogt, 2006).

A população adulta atual apresenta diferenças entre os sexos em relação ao sono normal e seus distúrbios. As mulheres têm maior qualidade de sono do que os homens, entretanto, quando questionadas, elas relatam problemas frequentes no seu sono (Regal, Amigo and Cebrián, 2009; National Sleep Foundation, 2007). Ao longo da vida, as mulheres passam por diversas mudanças fisiológicas, como puberdade, ciclo menstrual, gravidez e menopausa,

apresentando uma maior alteração em seu padrão normal de sono (Moline et al., 2003). Estas mudanças fisiológicas aumentam a propensão para que as mulheres desenvolvam obesidade (Vorona, 2005; Knutson et al., 2007; Markwald et al., 2013) e distúrbios do sono (National Sleep Foundation, 2007).

Durante a gravidez, os distúrbios do sono estão associados a mudanças hormonais que ocorrem ao longo desta fase. O primeiro trimestre da gravidez de uma mulher (0-14 semanas) é caracterizado pelo aumento da progesterona e do estrogênio (Lopes et al., 2004; Parry et al., 2006; Regal, Amigo and Cebrián, 2009; Bei et al., 2010; Baquedano et al., 2011). Nesta fase é comum a diminuição do sono lento eficiente, levando à fragmentação do sono e ao aumento da sonolência diurna, além de mudanças físicas como noctúria, lombalgia, náuseas ou vômitos que podem contribuir a maior fragmentação do sono durante a noite (Hedman et al., 2002; Bei et al., 2010) e aumentando a sonolência diurna. Isto faz com que as horas do sono total aumentem para 8,2 horas (Pien and Schwab, 2004; Lee, 1998). No segundo trimestre (14-27 semanas), os distúrbios do sono são menos comuns e o sono de ondas lentas e a sonolência aumentam, mas as horas de sono total permanecem em 8 horas por dia. No terceiro trimestre de gestação (27-35 semanas), as mudanças físicas, hormonais e psicológicas aumentam. Nesta fase, o sono é mais superficial e os despertares aumentam devido a mudanças físicas (noctúria, lombalgia, refluxos gastroesofágico, movimentos fetais, calambres noturnos, etc) (Bei et al., 2010); assim o sono é mais superficial e o sono REM diminui significativamente, com a consequente redução das horas de sono total para 7,8 horas (Pien and Schwab, 2004; Attarian and Schuman, 2010; Lee, Zaffke and MacEnany, 2000; Regal, Amigo and Cebrián, 2009; Bei et al., 2010). Por outro lado, a eficiência do sono também piora durante a gravidez, devido a aumentos de despertares noturnos que se inicia no primeiro trimestre e aumenta progressivamente até o final da gravidez (Hedman et al., 2002; Ward, 2010) e permanece durante os três primeiros meses após o parto (Bei et al., 2010).

O sono durante a gravidez em outros mamíferos tais como os ratos, ocorre com uma redução da duração e um aumento no número de episódios do sono de ondas lentas, mas com pouca alteração na quantidade total deste tipo de sono durante toda a gestação. No entanto, com o avanço da gestação, ocorre um declínio gradual no sono REM e durante a última semana de gestação ocorre uma redução significativa neste tipo de sono (Nishina et al., 1996).

1.2 Distúrbios do sono durante a gravidez

Durante a gravidez várias alterações físicas e hormonais podem afetar o sono normal e o sistema respiratório que predispõem ao desenvolvimento de distúrbios do sono (Kapsimalis and Kryger, 2007; Sloan, 2008). Assim, de acordo com o relatório publicado pela National Sleep Foundation (2007), de um total de 1012 mulheres, 70% delas, com idade entre 30 e 60 anos, relataram algum distúrbio do sono sofrido durante a gravidez.

Os distúrbios do sono como o ronco ou a síndrome das pernas inquietas, intensificam-se durante a gravidez, tendo uma prevalência 7,4 vezes maior no último trimestre (Lee et al., 2001; Hedman et al., 2002; Lopes et al., 2004; Hensley, 2009). Um estudo com população brasileira mostrou que a síndrome de pernas inquietas se encontra com mais frequência em mulheres grávidas que na população em geral, principalmente no terceiro trimestre da gravidez de forma mais severa (Alves et al., 2010).

A prevalência dos distúrbios do sono durante a gravidez estaria também associada a aspectos comportamentais e culturais da população. Os distúrbios de sono prévios à gravidez se incrementam durante o avanço da gravidez (Parry et al., 2006; Hensley, 2009). Estes resultados indicam que as mulheres são mais sensíveis a alterações no padrão do sono durante a gravidez, sendo que os distúrbios de sono durante este período são fatores de risco para o aumento de sintomas depressivos no pós-parto (Sloan, 2008; Skouteris et al., 2009; Chang et al., 2010). Há evidências de que a pobre qualidade sono na gravidez aumenta o risco de parto prematuro (Okun et al., 2011; Micheli et al., 2011), afeta o tipo de parto e aumenta as etapas do trabalho de parto (Zafarghandi et al., 2012), pré-eclâmpsia (Ekholm, 1992); restrição do crescimento fetal (Ursavas and Karadag, 2009; Micheli et al., 2011) e altera o sistema imunológico da mãe (Wilkie and Shapiro, 1992; Dørheim et al., 2009; Chang et al., 2010).

1.3 Privação do sono

A privação do sono é considerada um caso extremo de redução de sono em que um organismo é despertado ou privado de seu sono por um longo tempo (Boonstra et al., 2007). O principal sintoma da perda de sono em humanos é a sonolência diurna excessiva, outros sintomas incluem depressão, pobre estado de ânimo, memória e concentração (Banks and Dinges, 2007; Clark and Golshan, 2007); além de alterações de vários componentes vitais do organismo: metabólico, endócrino, imune, cardiovascular e nervoso (Banks and Dinges, 2007; Knutson et al., 2007; Krueger, Rector and Churchill, 2007; AIDabal and BaHammam, 2011; Kamdar, Needham, and Collop, 2012).

Estudos experimentais em modelos animais de privação de sono também relatam importantes alterações metabólicas, imunes, nervosas, hormonais, principalmente na atividade do Hipotálamo Hipofisário Adrenal (HPA), no comportamento e na cognição (Rechtschaffen et al., 1989; Suchecki, Palmaand Tufik, 2000; Papakonstantinou et al., 2003; Suchecki, Antunes, and Tufik, 2003; Andersen et al., 2004; Koban and Swinson, 2005; Christie et al., 2010; Schulz et al., 2011; Barf et al., 2012; Hajali et al., 2012; Alkadhi et al., 2013).

A privação do sono em roedores é capaz de afetar a sobrevivência e a diferenciação de células no giro denteado (van Praag et al., 1999; Guzman-Marin et al., 2003), reduzir a expressão do Fator neutrófico derivado do cérebro (BDNF) (Guzman-Marin et al., 2006), alterar a expressão dos receptores de N-Metil-D aspartato (NMDA) no hipocampo, alterando a plasticidade sináptica desta estrutura durante a idade adulta do animal (Tadavarty et al., 2011) e induzir estresse oxidativo em regiões do córtex cerebral e hipocampo de ratos adultos e seus efeitos são capazes de inibir a atividade da Na⁺/K⁺ ATPase e conseqüentemente a excitabilidade neuronal (Khadrawy et al., 2011). O hipocampo é uma das regiões do encéfalo mais sensíveis à privação de sono, e com maior plasticidade envolvida nas funções cognitivas (McEwen, 2006), principalmente na codificação e consolidação da memória espacial em humanos e em roedores (O'Keefe and Nadel, 1979; Morris, Rawlins and O'Keefe, 1982; Squire, 1992; Morris, 2006). Por outro lado, estes processos de memória dependem da ativação do BDNF (Scharfman and MacLusky, 2006) e dos processos de plasticidade sináptica conhecidos como potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD) (Marham et al., 2010; Tadavarty et al., 2011).

1.4 Comportamento maternal, prolactina, corticosterona e ocitocina

No final da gestação e durante a lactação, os ratos mostram tanto adaptações endócrinas quanto comportamentais ao estresse, o que assegura o desenvolvimento saudável da prole. Estas adaptações que ocorrem na mãe incluem a ativação dos sistemas cerebrais de ocitocina e prolactina, que agem atenuando a atividade do eixo HPA e, conseqüentemente, sua resposta emocional no momento do parto. Os sistemas opioides e adrenérgicos, entradas que excitam ou ativam o eixo HPA, também estão suprimidos (Slattery and Neumann, 2008).

A ativação rápida da resposta materna no momento do parto é desencadeada pela ação de hormônios tais como estradiol e progesterona, que são sintetizados nos ovários e liberados para a circulação sanguínea. Ocorre também a ativação do eixo HPA que aumenta os níveis periféricos de corticosteroides no momento do parto. Além disso, existem mudanças importantes

nos neurohormônios, associadas à gravidez ou ao parto, como alterações nos níveis de endorfinas, e nos neurotransmissores como a dopamina, noradrenalina, glutamato e GABA, que são parte das adaptações centrais que ocorrem durante a gravidez, no parto e que persistem no pós-parto (Numan, Fleming and Levy, 2006; Gregerson, 2006).

A ocitocina é sintetizada nos neurônios magnocelulares do núcleo paraventricular e supraóptico do hipotálamo, depois é transportada para a glândula hipófise posterior onde é liberada para a circulação periférica. Este neurohormônio está envolvido na contração uterina durante o parto e também na regulação de muitos comportamentos dos mamíferos (Lee et al., 2009; Yu et al., 1996; Numan and Woodside, 2010) incluindo a amamentação e o comportamento maternal (Nagasawa et al., 2012), que permitem facilitar a redução da ansiedade materna (Lancel, Kromer and Neumann, 2003; Febo et al., 2009; Vilela, Melo and Giusti-Paiva, 2012), conjuntamente com adaptações da liberação da prolactina e da ocitocina centrais lactação (Burbach and Russell, 2006; Numan and Woodside, 2010).

Durante o final da gravidez em ratos, a ativação do eixo HPA por estímulos estressantes permanece reduzida até o final da lactação (Brunton, Russell and Douglas, 2008; Russell, Douglas and Brunton, 2008). Esta atenuação seria uma adaptação para reduzir a exposição fetal ao excesso de corticosteroides maternos, minimizando assim o risco de prejudicar o desenvolvimento da prole (Welberg and Seckl, 2001). A qualidade do cuidado maternal durante a lactação também pode ser alterada por fatores que aumentam os corticosteroides no plasma em resposta a estímulos estressantes (Weaver et al., 2004), sendo capaz de afetar o desenvolvimento normal do sistema nervoso e o desenvolvimento cognitivo dos filhotes (Bagot et al., 2009; de Souza et al., 2012).

1.5 Ambiente pré-natal e desenvolvimento da prole

Os fatores ambientais podem afetar o desenvolvimento no início da vida e alterar permanentemente o funcionamento de vários sistemas do organismo (Johnston, 1995). O ambiente pré-natal tem uma profunda influência sobre a função endócrina da prole. Por exemplo, o estresse pré-natal, dependendo do tempo de exposição, causa significativas alterações renais, endócrinas, neuroquímicas, neuronais e comportamentais (Hayashi et al., 1998; Lemaire et al., 2000; Reznikov et al., 2001; Bosch et al., 2007), sendo que o sistema nervoso é mais suscetível à exposição dos corticosteroides durante seu desenvolvimento (Weinstok, 2001; Kapoor et al., 2006; Baquedano et al., 2011). O estresse pré-natal durante a última semana de gestação em ratos também pode causar alterações na formação do hipocampo dos filhotes (Szuran et al.,

1994; Hayashi et al., 1998; Lemaire et al., 2000; Szuran et al., 2000; Weinstock, 2001; Zhu et al., 2004; Barros et al., 2006; Song et al., 2009; Mychasiuk, Gibb and Kolb, 2012; Yeh, Huang and Hsu, 2012). Em quanto os efeitos da privação de sono durante a gravidez, estudados em roedores, também relatam graves alterações estruturais e funcionais na prole em idade juvenil (Thomal et al., 2010) e na idade adulta (Suchecki and Palermo Neto, 1991) e recentemente tem mostrado que estas alterações já são evidentes na expressão de aspectos emocionais dos filhotes quando neonatos (Gulia et al., 2014).

O estresse pré-natal variado durante a última semana de gravidez em ratos, leva ao incremento dos níveis basais de mRNA BDNF no hipocampo no segundo mês de vida pós-natal (Neely et al., 2011) e os componentes específicos de plasticidade sináptica no hipocampo (NR2B, sinaptofisina, Bintegrina e t-PA) (Lui et al., 2011). Estas alterações estariam fortemente associadas com um incremento da expressão fos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) dos fetos e as mães submetidas a estresse durante a gravidez (Fujioka et al., 2003). Assim, o BDNF seria um marcador trófico neuroprotetor que é expresso no hipocampo em condições associadas tanto ao aumento como à diminuição de corticosterona na prole (Hairston et al., 2004; Velisek, 2005; Mogi, Nagakawa and Kikusui, 2011).

Por outro lado, o estresse pré-natal em ratas durante a gravidez, teria efeitos deletérios no sistema oxidante no cérebro da prole jovem. O incremento de corticosterona elevada nos filhotes suprime a eficiência antioxidante cerebral, levando a um aumento de radicais livres (Sahu et al., 2012). Enquanto que o estresse materno na gravidez é capaz de afetar o sistema oxidante do cérebro em desenvolvimento pós-natal inicial. Os níveis de glicocorticoides aumentados por estresse materno levariam a incrementar o aumento cálcio intracelulares e ROS na região CA3 do hipocampo dos filhotes (Zhu et al., 2004).

O cuidado materno é também capaz de manter baixos os níveis de corticosterona na prole durante o período sensível para a aprendizagem olfatória (Moriceau and Sullivan, 2004), pois na falta de estímulos maternos os níveis de corticosterona aumentam sendo capazes de alterar o desenvolvimento do sistema nervoso da prole (Sullivan, 2001; Moriceau and Sullivan, 2004; Sullivan and Holman, 2010). Assim, o estresse pré-natal é capaz de afetar a capacidade de aprendizagem olfatória dos filhotes (Harmon et al., 2009).

Durante os primeiros dias após o nascimento, os filhotes apresentam um período sensível para aprender os odores da mãe; este aprendizado é evidenciado pelos comportamentos de aproximação dos filhotes até a mãe ou ao seu ninho (Moriceau and Sullivan,

2004). Várias espécies de mamíferos mostram esta capacidade o período pós-natal como uma estratégia adaptativa para a sobrevivência nesta fase da vida (Miller and Spear, 2008). O sistema olfativo destes animais se desenvolve muito cedo na ontogenia, o que permite que o feto seja capaz de aprender sobre seu ambiente pré-natal (Francis et al., 1996) e quando nascem assegura a formação de repertórios condutais de procura da proximidade da mãe, independentemente da qualidade do cuidado que recebam (Hofer and Sullivan, 2001). Nos roedores como os ratos este aprendizado inicial é crucial para a sobrevivência. Neste período inicial os filhotes têm uma alta capacidade para aprender a reconhecer odores em associação com os estímulos providos pela mãe (León, 1992, Landers and Sullivan, 2012). Esta capacidade é coincidente com a inibição da atividade amígdala e o período denominado hiporresponsivo (Hairston et al., 2001), em que o eixo HPA em ratos se encontra pouco desenvolvido, tendo seus níveis basais de corticosterona reduzidos (Van den Hove et al., 2006), o que pode explicar a resposta diminuída a estímulos estressores dos animais neste período do desenvolvimento (Sapolsky and Meaney, 1986), mecanismo importante para proteção do sistema nervoso em desenvolvimento, conjuntamente com a forte regulação materna do eixo HPA em resposta a estressores (Okimoto et al., 2002).

Um dos fatores responsáveis pela aprendizagem olfatória seria a ocitocina, a qual é liberada no bulbo olfatório do filhote enquanto ele mama (Nowak, Keller and Levy, 2011; Nagasawa et al., 2012). Outro fator seria a noradrenalina (Brennan and Keverne, 1997; Moriceau and Sullivan, 2004), um neurotransmissor liberado pelo *locus coeruleus*, que junto com a serotonina exercem um efeito estimulante sobre os neurônios do bulbo olfatório para facilitar o processo de aprendizagem olfatória (Rainecki et al., 2009).

2 HIPÓTESE

Tendo em vista a estreita relação entre o sono e a gravidez, e suas consequências no desenvolvimento fetal, no trabalho de parto e no estado emocional da mãe durante o pós-parto, torna-se importante estudar os efeitos da privação de sono durante a gravidez sobre o estabelecimento do vínculo mãe-filho e sobre o desenvolvimento do sistema nervoso do filhote. Trabalhos experimentais prévios do grupo da Dra. Monica Andersen (UNIFESP) têm mostrado os efeitos deletérios da privação de sono paradoxal durante a gravidez sobre os filhotes (Thomal et al., 2010) e efeitos sobre a regulação da emocionalidade das mães (Pires et al., 2012). Assim, este trabalho utiliza um modelo animal em ratos e pretende testar a hipótese de que a privação de sono paradoxal no final da gestação é capaz de afetar o

desenvolvimento normal da gravidez, da prole no período fetal e no pós-natal inicial, afetando o vínculo mãe-filhote e os mecanismos hormonais subjacentes a estes processos. Este trabalho contribui de forma original para o entendimento do comportamento maternal, o vínculo mãe-filhote e os hormônios plasmáticos maternos interrompidos pela falta de sono paradoxal, assim como seus efeitos sobre o sucesso da gravidez, o desenvolvimento da gravidez dos fetos no dia no 20º dia gestacional e dos filhotes no 7º dia pós-natal. Realizamos um registro do comportamento mais detalhado e amplo, e avaliamos também a preferência pelo odor da mãe dos filhotes e, considerando que o ambiente da privação é muito diferente das caixas padrões onde as ratas são mantidas, utilizamos um segundo controle com ambiente mais próximo ao da privação de sono.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Estudar os efeitos da privação de sono paradoxal na última semana de gestação sobre o desenvolvimento da gravidez, o comportamento materno e as implicações no desenvolvimento inicial da prole.

3.2 Objetivos Específicos:

- Investigar os efeitos da privação de sono paradoxal na última semana de gestação sobre:
 - Nas mães
 - O sucesso da gravidez
 - Peso corporal no 20º dia gestacional e 7º dia pós-parto
 - Ingesta alimentar
 - Peso das glândulas adrenais no 20º dia gestacional e 7º dia pós-parto
 - Peso do tecido adiposo visceral no 20º dia gestacional
 - As concentrações de glicogênio no fígado e músculo soleo no 20º dia gestacional
 - As concentrações de triglicerídeos e colesterol no fígado no no 20º dia gestacional

- Concentrações plasmáticas de corticosterona, ocitocina, prolactina e progesterona no 20º dia gestacional e 7º dia pós-parto.
 - Comportamento materno durante os dias 1, 2, 3, 4, 5, e 6 no pós-parto
- Na prole
- Desenvolvimento fetal no dia 20º pré-natal e 7º dia pós-natal
 - Concentrações de BDNF e ROS no córtex, cerebelo e hipocampo fetal.
 - Preferência olfatória pelo odor da mãe no 7º dia pós-natal

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas (n= 64) e machos (n=12), provenientes do Centro de Criação e Experimentação de Laboratório (CREAL) da UFRGS, os quais foram alojados com 70 dias de idade no biotério setorial do Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento no ICBS. Os animais foram mantidos a temperatura (20°C- 22 ° C), umidade controlada (60%) e com ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo o início do ciclo claro às 06h00min até as 18h00min horas. As ratas fêmeas foram distribuídas em número de quatro animais por caixa até o dia 20 da gestação. Do 20º dia gestacional até o 7º dia pós-parto, os animais foram alojados em caixas individuais transparentes. Os machos (quais machos os reprodutores ou os filhotes) foram alojados em três animais por caixa. Todos os animais tiveram livre acesso à comida e a água durante todo o período da pesquisa.

Todos os procedimentos com os animais neste experimento foram realizados em conformidade com as diretrizes do *Guidelines for Animal Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health* e com as recomendações para utilização de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNec) e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais da UFRGS N°: 23948.

4.2 Desenho experimental

No dia 12 de gravidez, todas as caixas alojando 04 animais em cada uma foram distribuídas aleatoriamente em três grupos: Grupo privadas de sono paradoxal (EX), Grupo Controle Caixa (C-C) e Grupo Controle Plataforma (C-P). Às 14h00min do mesmo dia, todas as prenhas foram transladadas para a sala de privação de sono onde permaneceram durante 30 minutos no período de habituação. Os animais dos grupos EX e C-P foram colocados nas plataformas dos tanques de água e os animais do grupo C-C permaneceram nas suas caixas sem manipulação. Após o final deste período, os animais do grupo EX e C-P foram devolvidos para suas caixas-moradia e transladados para o biotério. Este procedimento se repetiu até o dia 13 de gravidez. Às 14h00min do dia 14, todos os animais foram transladados para a sala de privação de sono. Os animais do grupo EX foram colocados nas plataformas de tanques de água, e os animais do grupo C-P foram colocados nas plataformas de tanques com maravalha, enquanto que os animais do grupo C-C foram colocadas em prateleiras da mesma sala nas suas próprias caixas-moradia. Estes animais permaneceram nessas condições até as 10h do dia

seguinte, quando foram devolvidos para suas caixas-moradia no biotério. Esse procedimento se repetiu até as 10h00min dia 20 da gravidez. Nesse dia foram tomadas aleatoriamente 6-7 ratas prenhas de cada grupo e sacrificadas por decapitação. Os fetos, imediatamente após, foram extraídos por cesárea e mantidos vivos para as avaliações gerais de desenvolvimento. Foram coletados sangue e tecido para futuras análise bioquímicas.

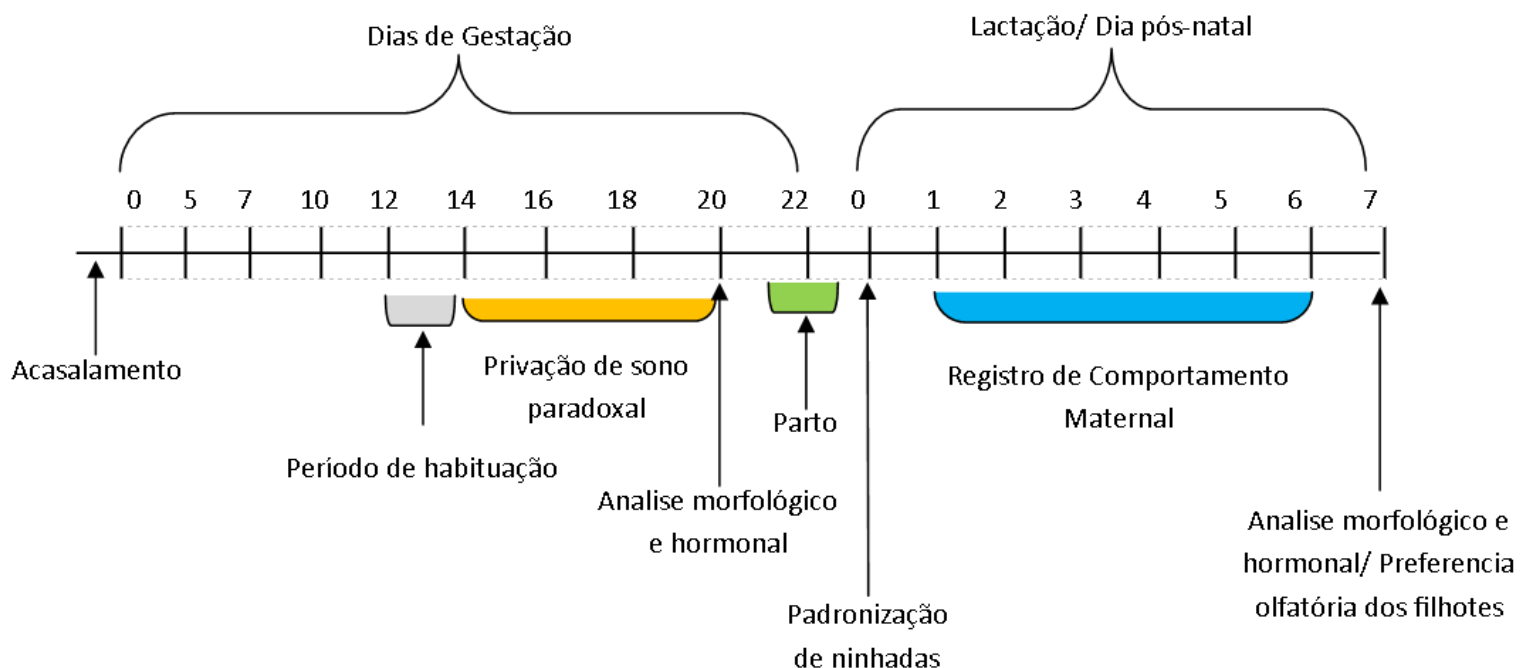


Figura 1. **Desenho experimental**

As outras prenhas restantes foram individualizadas em caixas transparentes com maravalha, onde pariram e permaneceram até o dia 7 pós-parto. Após o nascimento dos filhotes, o comportamento materno das mães de todos os grupos foi observado e registrado do dia 1º até o 6º dia do período pós-parto. Na manhã do dia 7 pós-parto, as mães e seus filhotes foram pesados três horas antes da decapitação. A partir das 10h00min, todos os animais foram sacrificados por decapitação, e simultaneamente os filhotes das mães sacrificadas foram submetidos à avaliação do teste de preferência aleatória. Um filhote macho e um filhote fêmea de cada ninhada de todos os grupos foram avaliados e sacrificados após a testagem. As estruturas encefálicas dos filhotes foram dissecadas para avaliar os parâmetros bioquímicos do desenvolvimento.

4.3 Ciclo estral

Aos 90 dias de idade, após 20 dias de habituação dos animais, foi iniciada a coleta do lavado vaginal das fêmeas. O epitélio vaginal das ratas foi lavado com auxílio de um conta-gotas e soro fisiológico para logo determinar a fase do ciclo estral mediante microscópio óptico. Este procedimento foi realizado diariamente entre as 15h-16h até estabelecer quatro ciclos estrais regulares completos de cada fêmea. Apenas as ratas que apresentaram quatro ciclos estrais consecutivos regulares foram acasaladas com os machos.

4.4 Gestação

Na noite da fase do proestro, as fêmeas foram colocadas com um macho sexualmente ativo e, após a observação do comportamento sexual de monta do macho e de receptividade das fêmeas, permaneceram juntos em uma mesma caixa até o dia seguinte. Na manhã seguinte, foi coletado o lavado vaginal das fêmeas e verificado ao microscópio a presença de espermatozoides. A confirmação da presença de espermatozoides foi considerada um indicador de início de gravidez, sendo determinado como dia zero (0) da gestação. Todas as fêmeas acasaladas e, com a mesma idade gestacional, foram distribuídas aleatoriamente quatro animais por caixa e permaneceram assim até o 20º dia de gestação.

O avanço da gestação foi diariamente conferido pelo peso corporal. No dia 20 da gestação, após finalizar o período de privação de sono, um grupo de ratas grávidas, 6-7 animais de cada grupo, foram escolhidos aleatoriamente e mortos por decapitação. Imediatamente após, os fetos foram retirados por cesárea, foram limpos e mantidos durante 10 minutos num ambiente aquecido a 37 graus centígrados.

Os numero de fetos foi observado, o sexo foi determinado pela distancia anogenital, foram medidos e pesados. A média do peso e tamanho dos fetos de cada grupo de estudo foi determinada a partir da média de peso e tamanho dos fetos de cada ninhada.

4.5 Parto e Pós-parto

No 20º dia de gestação, as ratas foram individualizadas em caixas transparentes com maravalha, onde pariram seus filhotes. O dia do parto foi considerado o dia zero (0) do pós-parto. Na manhã do dia 1º dia pós-parto, foi verificado a número e o sexo dos filhotes, sendo padronizações a um numero de 8 filhotes por ninhada, 4 machos e 4 fêmeas. Os filhotes rejeitados foram descartados.

Do 1º até o 7º dia pós-parto, as ninhadas permaneceram sem alteração, nem manipulação e a maravalha das suas caixas não foi trocada nesse período. Durante nesse período pós-parto, foi registrado o comportamento materno das mães dos três grupos. .

4.6 Peso corporal

No período de habituação ao biotério, as fêmeas foram pesadas uma vez por semana. A partir do início da gestação, dia 0, até o dia 20, o peso corporal de cada animal foi registrado diariamente. Na manhã do dia 7 pós-parto, 3 horas antes da decapitação, as fêmeas foram igualmente pesadas.

As pesagens, tanto durante o período pré-gestacional quanto no período gestacional das fêmeas, foram realizadas pela manhã entre 10h e 11h. O peso corporal total foi expresso em gramas, para a representação do ganho de peso corporal durante a gravidez foi considerado o peso do dia 2 de gravidez como peso basal (100%), respeito ao qual foi estimado em percentagem o ganho do peso nos dias 5, 7, 10, 12, 14, 16,18 e 20. Por exemplo, o ganho de peso do dia 5 foi estimado assim: *peso corporal dia 5 (g) /peso corporal dia 2 (g) x 100*.

4.7 Ingesta alimentar

Durante a gravidez, a ingesta de ração padrão consumida pelos animais foi pesada diariamente para cada caixa, tanto a quantidade de alimento ofertado quanto o resto de alimento encontrado. A ingesta alimentar diária para cada caixa foi determinado da seguinte maneira:

$$\text{A ração ofertada} - (\text{ração restante na grade} + \text{resto de ração caída dentro de caixa}) = \text{Ingesta alimentar diária}$$

Para estimar a ração consumida por cada animal, o valor em gramas da ingesta alimentar diária foi dividido pelo número de animais em cada caixa. A oferta alimentar foi iniciada às 10h00min do dia 0 de gestação, e a primeira mensuração da ingesta alimentar foi realizada às 10h00min do dia 1 da gravidez, sendo este valor correspondente às 24 horas de ingesta alimentar. Esse procedimento também foi seguido durante o período de privação de sono paradoxal. A quantidade de alimento ofertado ao início da privação de sono (às 14h00min) menos a ração restante na grade no final da privação de sono (às 10h00min do dia seguinte) foi dividida pelo número de animais no tanque de privação de sono (04). A ração padrão que caiu dentro do tanque de água não foi possível mensurar, assim para discutir os nossos resultados sobre quantidade da ingesta alimentar durante a privação de sono se considerou também a ingesta alimentar durante o período de recuperação de sono.

Para a determinação da quantidade total de ingesta alimentar durante 24 horas no período de privação de sono (dia 14 – 20 de gravidez), o resultado da quantidade de alimento ingerido durante o período de privação de sono foi somado à quantidade da ingesta alimentar durante o período de recuperação de sono (10h00min- 14h00min).

4.8 Privação de sono paradoxal

A técnica da privação do sono paradoxal fundamenta-se na atonia muscular que acompanha este tipo de sono. O método de privação do sono por plataformas múltiplas impede que os ratos, mantidos sobre plataformas circulares com água circundante, durmam o sono paradoxal. Quando os ratos entram neste tipo de sono, caracterizado pela atonia muscular, acabam molhando o focinho ou caindo dentro da água, interrompendo o sono. A técnica utilizada para a privação do sono de ratas prenhas foi feita de acordo com o protocolo descrito por Thomal et al (2010), que consiste em colocar 4 ratas da mesma caixa em um tanque de água (90cm x 50cm x50cm, adaptação feita por Hajali et al (2012) para este número animais), contendo plataformas circulares de 7,5 cm de diâmetro e 10 cm de altura, as quais sobressaem dois centímetros acima da superfície da água (ver Figura 2). Foi colocado um maior número de plataformas do que de ratas nos tanques de água, dispostas a uma distância de 11 centímetros uma da outra a fim de que os animais possam mover-se livremente saltando de uma plataforma a outra, atenuando o estresse por imobilização.

Antes de iniciar a privação de sono no dia 14 de gravidez, os animais do grupo EX e do grupo C-P foram habituados aos tanques de água e plataformas durante 30 minutos no dia 12 e 13 de gravidez. Este procedimento foi considerado para que os animais reconhecessem o ambiente novo e a disposição das plataformas no tanque para evitar quedas na água nos dias seguintes. Esse procedimento foi igualmente considerado para homogeneizar a queda na água dos animais neste período prévio ao experimento, uma vez que havíamos observado nos experimentos pilotos que, durante o período de habituação, os animais caíam na água mais vezes que durante o período propriamente de privação. No dia 14 de gravidez, as ratas do grupo EX foram trasladadas à sala de privação de sono às 14h00min e foram colocadas nas plataformas do tanque de água, onde permaneceram até às 10h00min do dia seguinte. As ratas dos grupos controles também foram trasladadas do biotério até a sala de privação ao mesmo tempo em que o grupo EX. Os animais do grupo C-C foram mantidos nas suas caixas moradia e colocados em estantes na sala de privação de sono com acesso livre a água e ração. Enquanto o grupo CP foi colocado nas plataformas de tanques com maravalha (Fig. 2). Esse grupo foi implementado para controlar algumas variáveis na plataforma de privação de sono, tais como: o

efeito do uso das plataformas do tanque de água para conseguir a comida e o efeito do estresse pela exposição a um ambiente novo diariamente durante o tempo da privação de sono (o qual que inclui ambiente com espaço maior para se locomover, a diferença do ambiente oferecido pela caixa-moradia).

Os animais do grupo CP, durante o período de privação de sono, foram colocados nos tanques com maravalha e logo foram transladados às suas caixas habituais, seguindo o procedimento similar aplicado aos animais do grupo EX no mesmo período. Às 10h00min do dia seguinte, tanto as ratas do grupo EX quanto as do grupo CP foram retiradas das plataformas e colocadas novamente nas suas respectivas caixas e, conjuntamente com o grupo CC, foram devolvidas para o biotério onde permaneceram durante 4 horas de recuperação de sono. Esse procedimento foi repetido diariamente até o dia 20 da gestação. Nesse mesmo dia, às 10h00min, após a serem pesadas, as ratas dos três grupos foram alojadas em caixas transparentes com maravalha e mantidas assim até o dia 7 pós-parto.

Durante a privação de sono, a ração e água foram ofertadas *ad libitum*, sendo estes pesados e medidos ao início e ao final do período de privação para as análises de ingesta alimentar nos grupos EX e CP. A ração e a água foram colocadas na parte superior das plataformas, acima da grade, tal como pode ser visto na Figura 2, a uma distância de aproximadamente de 15 cm acima as plataformas.

As condições ambientais da sala de privação de sono foram mantidas estáveis, com temperatura e ciclo claro escuro, similares ao ambiente do biotério.

4.9 Análise hormonal

Para todas as análises hormonais das mães, tanto no período gestacional quanto no período pós-parto, o sangue foi coletado após decapitação, centrifugado com 25 uL de EDTA (0.5M) a 1000 g por 15 minutos a 4° C., seguido da extração e armazenamento do plasma a -80 ° C. Os níveis de hormônios foram determinados pelo método de ELISA. Os procedimentos para o análise de cada hormônio foi seguido de acordo ao manual da casa comercial de cada kit.



B



C

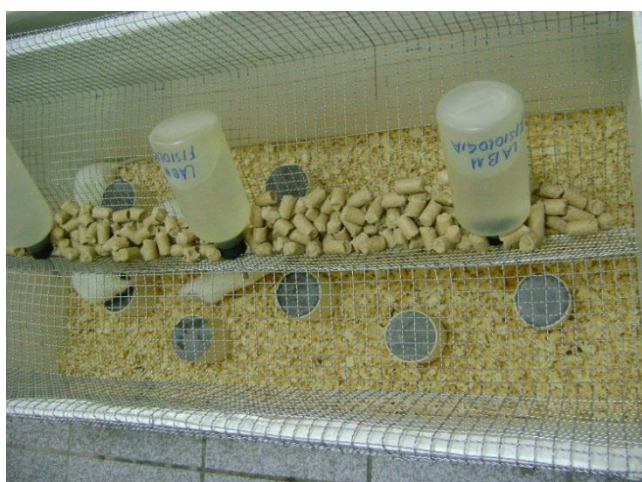


Figura 2. Privação de sono paradoxal por método de plataformas múltiplas. Na figura A se mostra a disposição das plataformas circundadas de água e quatro ratas do grupo EX, colocadas nas plataformas, transitam de plataforma em plataforma. Na figura B observa-se a plataforma com maravalha e quatro ratas do grupo CP que transitam dentro dela. Na figura C se observa a disposição da ração padrão e a água sobre as plataformas. Os animais do grupo EX e CP acessaram a ração padrão e à água subindo em cima das plataformas.

A determinação dos níveis de prolactina nos plasma foi analisada com o SPIBio, Rat prolactin enzyme immunoassay kit, A05101 seguindo as instruções do protocolo do kit comercial. No dia do ensaio, após descongelar, as amostras de plasma armazenadas -80°C foram colocadas no vortex e centrifugadas a 1 600 g durante 20 minutos, para eliminar a fibrina. Imediatamente após, foram analisadas de acordo com o procedimento indicado pelo protocolo do Kit. A preparação da curva padrão foi determinada com diluições seriais de prolactina provida pelo kit (0.39-50 ng/mL), diluídos com o próprio reagente do kit. A absorbância dos poços foi lida entre 405 and 414 nm com leitora de placa marca Asys Expert Plus. A curva padrão gerada

pelas diluições padrões, e as concentrações de prolactina nas amostras foram interpoladas diretamente da curva padrão.

Os níveis de ocitocina foram analisados com o kit comercial Enzo Life Sciences Oxytocin EIA kit Catalog No. ADI-901-153. Prévio ao ensaio, 200 uL de plasma foi extraído, adicionando 2 volumes de acetona fria e agitado no vortex, seguidamente foi centrifugado a 12 000 g por 20 minutos a 4 ° C. Os sobrenadantes foram removidos, transferidos a microtubos limpos, e foi adicionado 5 volumes de éter de petróleo gelado e levados novamente foi agitado no vortex e centrifugado a 10 000 g por 10 minutos a 4 ° C. O sobrenadante foi descartado e o restante no microtubo foi colocado a uma centrifuga vacum durante 55 minutos a 30 ° C, seguidamente as amostras foram armazenadas no freezer a -80 ° C. No dia do ensaio as amostras extraídas foram reconstituídas com 250 uL de Standar Solution do próprio kit comercial da ocitocina. A preparação da curva padrão foi realizada com diluições seriadas de ocitocina provida pelo kit (15.6 -1,000 pg/mL). A curva padrão e as amostras foram ensaiadas em duplicata e as absorbâncias dos poços foram lidas com leitora de placa Asys Expert Plus. As concentrações de ocitocina foram determinadas por interpolação dos valores das absorbâncias da curva padrão do ensaio.

Os níveis plasmáticos de progesterona foram determinados pelo método ELISA (Progesterona Cayman Chemical's ACE™ EIA Kit, item N° 582601). No dia do ensaio, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente. As amostras correspondentes à coleta do dia 20 gestacional foram diluídas 1:10 e as correspondentes ao dia 7 pós-parto foram diluídas a 1:1000, usando o tampão proporcionado pelo kit comercial, sendo ensaiadas seguindo as instruções do Kit. A curva padrão foi preparada usando as concentrações seriadas de progesterona (7.8- 1,000 pg/mL) , proporcionada pelo Kit. Tanto a curva padrão quanto as amostras foram ensaiadas em duplicata e lidas em 405 nm com a leitora de placa Asys Expert Plus. As concentrações de progesterona foram interpoladas a partir dos valores das absorbâncias da curva padrão do ensaio e logo multiplicadas pelo fator de diluição correspondente para cada grupo experimental das amostras.

Os níveis de concentração de corticosterona plasmáticos foram determinados usando o kit comercial Arbor Assays, The DetectX® CorticosteroneImmunoassay kit. No dia do ensaio, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, diluídas a 1:100 com o Dissociation Reagent (DR) (5uL de plasma diluído em 1mL de DR), agitada no vortex e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação, todas as amostras foram ensaiadas de acordo com as instruções do manual do kit. A curva padrão foi determinada por diluições

seriadas de corticosterona provida pelo kit comercial (78.125-5,000 pg/mL). Tanto a curva padrão como as amostras foram ensaiadas em duplicata e lidas a 450 nm na leitora de placa Asys Expert Plus. As concentrações de corticosterona foram interpoladas a partir dos valores das absorbâncias da curva padrão do ensaio e logo multiplicadas pelo fator de diluição correspondente para cada grupo experimental para estimar a concentração real da progesterona nas amostras.

4.10 Análises Teciduais das mães

Após a decapitação e a realização da cesárea das ratas no dia 20 gestacional, o tecido adiposo visceral, o fígado, o músculo, baço, glândulas adrenais, timo e o encéfalo foram dissecados. Porém, neste estudo apenas o tecido adiposo visceral, o fígado, o músculo glândulas adrenais maternos foram analisados. No dia 7 pós-parto, somente foram dissecados o encéfalo e as glândulas adrenais maternas.

O tecido adiposo visceral e as glândulas adrenais foram pesados após a dissecação. Os valores do peso são expressos tanto em peso absoluto (gramas) como em peso relativo: peso absoluto (g) / peso corporal (g) x 100

Triglicerídeos no fígado. Após a decapitação e a histerectomia, o fígado foi dissecado e armazenado a 20 °C. Posteriormente, para as determinações de triglicerídeos, estes foram descongelados e homogeneizados com salina (x 4 o peso de tecido) e a seguir as concentrações de triglicerídeos foram dosadas com um kit comercial. A curva padrão foi preparada com diluições seriadas de triglicerídeos de quantidades conhecidas proporcionado pelo kit (2ul, 4ul, 6ul e 8ul). As amostras e a curva padrão foram pipetadas em placas de 96 poços, incubadas na estufa a 37 °C e imediatamente foram lidas a 505 nm. O cálculo das concentrações de tecido foi determinado pelo seguinte: $\text{absorbancias das amostras} \times 200 \times 100 / \text{padrão} \times 500$. Os valores são expressos em ug /100g de tecido.

Glicogênio no músculo soleo e fígado. A extração do glicogênio foi realizada de acordo com o método de Van Handel (1965). Após descongelar os tecidos, este foram colocados em tubos cónicos com 2 ml de KOH 30% (para \pm 50 - 100 mg de tecido) e seguidamente fervidos durante 45 minutos em água a 100 °C. Na sequência, eles foram agitados no vortex, foi acrescentada 5 gotas de Na₂SO₄ saturado e foram agitados novamente no vortex. Seguidamente acrescentou-se 2 mL de álcool etílico a cada amostra, agitou-se e a seguir levou-se as amostras a centrifugação a temperatura ambiente a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado foi lavado com 500uL de água destilada quente para dissolvê-lo,

e se acrescentou 4mL de álcool etílico seguida de agitação no vortex e nova centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante ao final. Os tubos foram deixados invertidos para o líquido sair. Posteriormente as amostras foram resuspendidas com 1ml de água destilada, logo fervidas durante 45 minutos a 100 °C e agitados em vortex até quebrar o pellet. Em seguida foi acrescentado 150 uL de Na₂ CO₃ a 2M nas amostras, e 300 uL na curva padrão. O padrão de glicogênio foi preparado com diluições seriadas de glicogênio a 1 mL/mL de 150 uL., 200 uL, 250 uL, e 300 uL. Foi preparada uma curva para a glicose, na mesma placa para a medição do glicogênio, nas seguintes concentrações: 5uL, 10uL, 15uL, 20 uL e 25 uL. Um kit comercial de glicose foi usado para medir as concentrações de glicemia e, determinar, a partir destes valores, os níveis de glicogênio. A placa foi lida em 500nm imediatamente após a incubação de 5 minutos a 37 °C na estufa. O cálculo das concentrações de glicogênio foi da forma seguinte:

$$\text{Glicogenio (ug glicose / g de tecido)} = \text{Glicemia da amostra [(mg/dL)/ Factor de Correção X Diluição]/ 100 x Padrão de glicogênio (g) x 10}$$

Colesterol no fígado. Após a homogeneização do tecido para a dosagem de triglicerídeos, 300 ul de amostra foi coletada e transferida a tubos de vidro, onde foi acrescentado com 250 ul de TCA a 50% e logo centrifugado a 15 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Retirou-se o sobrenadante e se deixou secar o pellet por 24 horas. Foi acrescentado clorofórmio e metanol aos pellets em proporção de 1:2, e se deixou no gelo, levando-os a centrífuga novamente a 15 000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e transferido a Beckers de 5ml e deixado secar a temperatura ambiente até o líquido evaporar completamente. O pellet foi resuspendido com uma solução de 50 uL (salina com 1% de albumina) e levado a estufa por 10 minutos a 72° C . A curva padrão e as amostras foram dosadas usando reagente comercial de colesterol (20 uL de padrão ou amostra mais 200 uL de reagente). Incubadas a 37 °C durante 5 minutos e imediatamente lidas a 500 nm. O cálculo das concentrações do colesterol se realizou da seguinte forma:

$$\text{Colesterol (mg/mL)} = (\text{Absorbancia do teste/Absorbancia do Padrão}) \times 100/ [x] \text{ mg (peso da fatia de tecido)}$$

4.11 Análises Teciduais dos fetos

No dia 20 pré-natal após as pesagens e as observações gerais dos fetos, dois machos de cada ninhada foram pegos aleatoriamente e decapitados. Seguidamente foi dissecado o cerebelo, hipocampo, córtex e o bulbo olfatório de ambos os hemisférios. No dia 7 pós-natal

foram dissecados hipocampo e bulbo olfatório. As estruturas foram microdissecadas em salina fisiológica fria, imediatamente foram congeladas em nitrogênio líquido e, depois armazenadas em -80 ° C para análise de ROS total e BDNF. Todas as microdissecções foram realizadas por um mesmo pesquisador para evitar variantes no procedimento.

4.12 Análise de Espécies Reativas de oxigênio Total (ROS)

Após serem descongeladas, as estruturas encefálicas dos fetos foram pesadas, homogeneizadas em microtubos, usando homogeneizador mantido em gelo, com 5 volumes de tampão fosfato de sódio a 20mmol, KCl a 120mmol e PMSF 1:100 (por peso de tecido) e centrifugadas a 1000 g, em 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes imediatamente foram pipetados e armazenados em microtubos de plástico e guardados em freezer a -80 °C para futuras análises.

O ensaio para a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizado seguindo o método que permite quantificar um produto oxidado. Após descongelar os homogeneizados, uma parte da alíquota foi tratado com KCl 120mmol e tampão fosfato, seguidamente foi incubado com 100uM de DCF-DA (2,7- diclorodihidrofluoresceína diacetado) por 30 minutos a 37 °C. O DCF-DA é um produto fluorescente que é permeável à membrana celular. Em meio básico o DCF-DA é deacetilado a DCFH (2,7 diclorodihidrofluoresceína), sendo que esse produto, não fluorescente, é convertido pelos ROS em DCF (2,7 diclorofluoresceína), um produto altamente fluorescente. A formação do derivado fluorescente DCF foi monitorada no comprimento de onda de 488nm (excitação) e 525nm (emissão). Todos os procedimentos foram realizados no escuro. A curva de calibração foi realizada com DCF padrão (0-2 nM) e tampão KCl 140mM. A quantidade proteína por tecido foi determinada pelo método de Bradford e usada para determinar a concentração de DCF. A produção de ROS foi calculada da forma seguinte:

$$\text{DCF (ng/mg)} = \frac{[\text{intensidade de absorbância da amostra X volume final (300uL)}]}{\text{Inclinação da curva padrão X volume da amostra (30uL) X [proteína]}}$$

4.13 Análise de BDNF de estruturas encefálicas dos filhotes

O córtex, o cerebelo e o hipocampo dos filhotes foram descongelados, e homogeneizados em 10, 20 e 50 volumes respectivamente por peso de tecido, usando tampão de lise frio (100mM Tris-HCl, pH 7,4 contendo 0.6 M NaCl; 0.5 % de albumina sérica bovina; 1mM EDTA; 0,2 % Triton X-10; 0.1mM PMSF e 0.1mM pepstatina). Os homogenatos foram

centrifugados a 14 000 g por 30 minutos a 4 °C em microtubos, e os sobrenadantes foram coletados e guardados em freezer a -80 °C, para futuras análises.

Os níveis de BDNF foram determinados com o Kit comercial Sandwich Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) de 96 poços (ChemiKine BDNF Sandwich ELISA Kit CYT306; Chemicon International, Temecula, CA). Os homogeneizados de cada estrutura encefálica foram descongelados e diluídos a 1:25 com Assay Buffer do Kit comercial, seguidamente analisados seguindo o procedimento indicado no protocolo do Kit. Para a curva padrão foram feitas uma diluição seriada de proteína BDNF com Assay buffer (inclusos no kit) (7.82-500 pg/mL). Todas as amostras e os padrões foram preparados em duplicata. A incubação, a lavagem e a agitação das amostras foram desenvolvidas de acordo às instruções do protocolo comercial com os reagentes providos com o kit, a temperatura ambiente. A densidade ótica dos poços foi analisada com leitora de microplacas a 450nm. A curva padrão, gerada pelas diluições padrões, e as concentrações de proteína BDNF nas amostras foram extrapoladas diretamente da curva padrão do ensaio e multiplicadas pelo fator de diluição.

4.14 Análises comportamentais

4.14.1 Comportamento maternal

A partir do dia 1 ao dia 7 pós-parto, foi registrado o comportamento materno, em quatro períodos diários, três no ciclo claro e um no ciclo escuro (9h00min, 12h00min, 15h00min, 18h00min). As observações do comportamento maternal foram registradas a cada três minutos (25 observações para 4 períodos por dia = 100 observações totais/mãe/dia). Foram observados e analisados os seguintes parâmetros: *a mãe no ninho sem mostrar outro comportamento maternal, a mãe fora do ninho (dormindo, comendo e ou bebendo água ou construindo ninho), mãe em self grooming, a mãe construindo ninho, mãe lambendo os filhotes (lambida da superfície do corpo e da região anogenital), mãe amamentado com dorso bem arqueado, mãe amamentando com dorso pouco arqueado, mãe em postura passiva de amamentação, mãe amamentando em posição supina* (Champagne et al., 2003; Rees and Lovic, 2005; Uriarte et al., 2007).

Os diferentes parâmetros comportamentais foram quantificados para o total dos seis dias de registro e expressados como frequência acumulada. O comportamento materno total foi considerado como a somatória de todos os parâmetros comportamentais que desenvolve a mãe com o filhote (*mãe lambendo os filhotes, mãe lambendo os filhotes e amamentando ao mesmo tempo com dorso bem arqueado, mãe amamentando com dorso pouco arqueado, mãe*

amamentando em posição passiva ou supina, mãe lambendo o filhote independente da postura de amamentação).

O desenvolvimento do comportamento materno total durante os 6 dias foi analisado para cada período de registro.



Figura 3. **Comportamento Maternal.** Na figura **A** se mostra o comportamento de lambida da mãe para com seu filhote, ao mesmo tempo em que ela amamenta o resto dos filhotes com o dorso bem arqueado. **B.** Mãe lambendo aos seus filhotes sem postura de amamentação, nesta posição a mãe desenvolve também o comportamento de self grooming. **C.** Postura de amamentação com dorso bem arqueado, sem lambida. **D.** Postura de amamentação passiva.

4.14.2 Preferência olfatória pelo odor das mães

O teste de preferência olfatória pelo odor da mãe foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Rainecki et al., 2009. Este teste foi realizado em uma caixa retangular de 34cm largura X 40cm de comprimento x 24cm de altura, tal como se mostra na figura 4. A caixa

foi dividida por uma linha média vermelha, dividida em duas metades de 19 centímetros cada. Ao início do experimento, foi colocada maravalha de duas procedências nos extremos equidistantes da caixa. Num extremo foi colocada uma porção de maravalha do ninho da mãe (NM) e no outro extremo foi colocada uma porção semelhante de maravalha limpa (NL).

No dia 7 pós-natal, um filhote macho e fêmea de cada ninhada foram tomados aleatoriamente do ninho (ao tempo que a mãe foi sacrificada). Os filhotes, um a cada vez, foram colocados sobre a linha vermelha que determina a zona neutra, a dois centímetros a partir da extremidade da caixa e com a cabeça em direção à área oposta as com a maravalha. O desempenho do filhote foi registado durante 1 minuto com uma filmadora. O teste foi realizado em cinco sessões consecutivas, com duração de 1 minuto cada sessão e intervalo de 2 minutos entre cada sessão. Ao final de cada sessão a caixa foi limpa com álcool a 70% e a posição da maravalha NL e NM foi trocada em cada sessão.

NL

NM

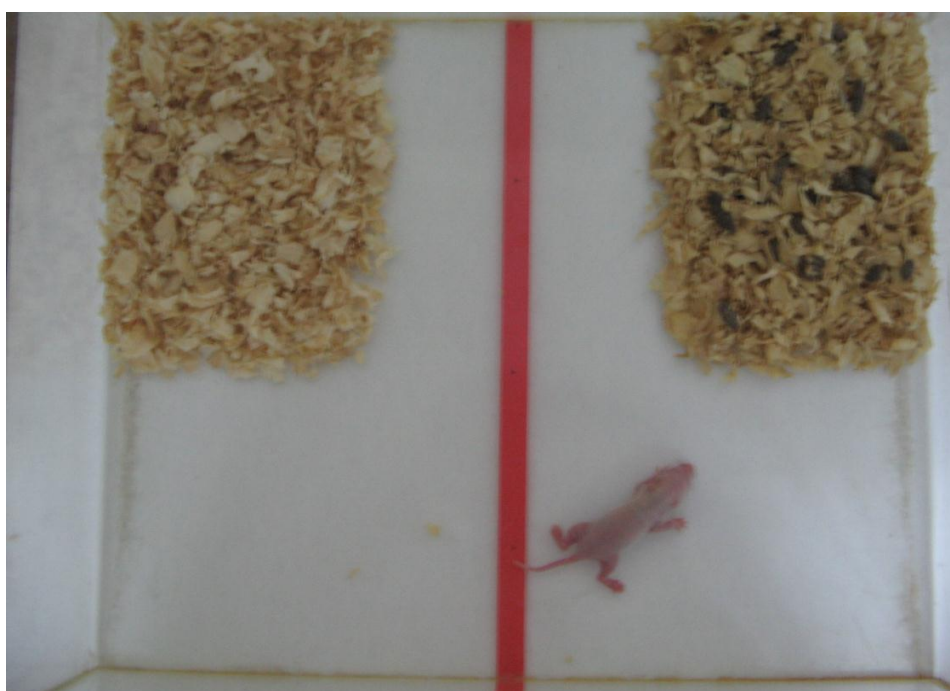


Figura 4. Teste de preferência olfatória. Na figura se mostra a posição das maravalhas na caixa de acrílico. Nos dois quadrantes superiores encontram-se a maravalha NL e NM. A linha média vermelha marca uma área linha média equidistante das duas áreas. Vemos a filhote locomovendo-se na área do NM.

Para evitar as manipulações da maravalha nas sessões foi usada uma caixa extra com tais disposições das maravalha (NL, NM). Assim, a avaliação do desempenho foi realizada em

cinco sessões consecutivas com um intervalo de 2 minutos cada uma, alternando a posição das maravalhas para cada sessão.

Posteriormente, os registros de vídeo foram analisados com auxílio do programa Noldus The Observer (Noldus Tecnologia da Informação, Holanda), os seguintes parâmetros: tempo de permanência realizando qualquer comportamento na área da NL e NM, tempo de latência para chegar ao NL e NM, tempo de locomoção nas áreas NL ou NM, o tempo de locomoção nas áreas NL ou NM.

O tempo total de permanência na área NM foi expresso em percentagem (%) do tempo total que os filhotes permaneceram nas cinco sessões tanto na área NL quanto na área NM (tempo de permanência na área NM/ tempo de permanência na área NL x 100). A frequência total de chegada ao NM e o tempo de latência (s) ao NM foram somadas das cinco sessões para cada animal, assim com o tempo total de locomoção (s) nas duas áreas NL e NM. O tempo de latência (s) de chegada ao NM em cada ensaio de todos os animais por cada grupo foi analisado. Os dados destes parâmetros foram analisados independentemente para os filhotes machos e fêmeas.

4.15 Análise estatística

Os dados foram analisados com o software estatístico GraphPad Prism 5.0.0.288 (© Graph Pad Software. Inc). Para dados paramétricos as análises onde se comparou uma variável em mais de um grupo, foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Para a análise de duas variáveis em mais de um grupo foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni. A análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni, também foi usado para análise de duas variáveis, em três grupos, a través do tempo.

Para dados não paramétricos, a análise para comparar mais de uma variável em tres grupos realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com o teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

Todos os dados foram submetidos a um teste prévio de normalidade Kolmogorov-Smirnov, quando $p > 0,05$ se considerou os dados com distribuição normal.

Para todas as análises, as diferenças entre as variáveis foram consideradas significativas quando o nível de significação estatística foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Ganho de peso durante a gravidez

O ganho de peso corporal a partir do início da gravidez até o dia 14 não foram significativamente diferentes entre os grupos. Mas a partir do início da privação de sono paradoxal (dia 14 de gravidez) em diante se evidenciou uma diminuição significativa do ganho de peso corporal do grupo EX respeito aos grupos C-P e C-C.

Na análise do ganho de peso corporal, estimado pela porcentagem (%) de ganho respeito ao peso corporal no dia 2 de gravidez (neste dia o peso corporal em gramas foi considerado como 100%) mostrou um efeito da interação dos fatores [$F(14,378) = 24,51$, $p < 0,0001$] (Figura 4). A análise pos hoc mostrou que o ganho de peso corporal do grupo EX ($n=12$) foi significativamente menor respeito ao grupo C-C ($n=17$) nos dias 16, 18 e 20 da gravidez; e nos dias 18 e 20 da gravidez respeito ao grupo C-P ($n=9$) ($p < 0,05$), sendo que o grupo C-P também mostrou ganho de peso corporal menor significativo no dia 20 da gravidez respeito do grupo C-C ($p < 0,05$).

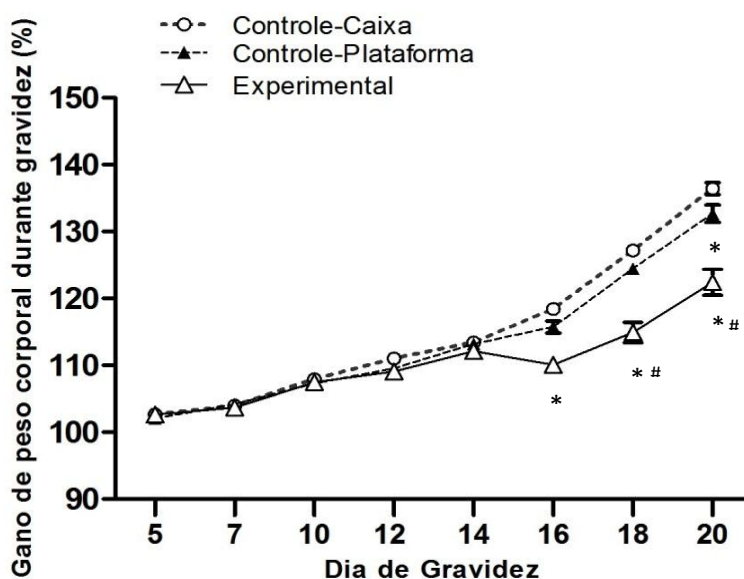


Figura 5. Percentagem do Ganho de peso corporal durante a gravidez de ratas. Os valores são Média± EP representados pelas barras verticais de incrementos percentuais respeito ao peso no dia 2 de gravidez (100%). A linha cinza claro sobre o período de tempo corresponde ao período de habituação, a linha em cinza escura corresponde ao período de privação de sono. Os dados foram analisados usando ANOVA de 2 duas vias com medidas repetidas seguido do *post hoc* teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ (diferente do C-C); # $p < 0,05$ (diferente do C-P). ($n=9-17$ por grupo).

No dia 7 pós-parto o ganho de peso corporal (g) dos grupos controles diminuiu em quase 50 gramas respeito à média do peso corporal no dia 20 da gravidez, em quanto que o grupo EX diminuiu em quase 26 gramas respeito ao peso do mesmo grupo no dia 20 de gravidez (ver Tabela 1). Mas, a média de peso corporal nos tres grupos no dia 7 pós-parto não foram significativamente diferentes [$F(2,34) = 1,851$; $p = 0,1734$], indicando uma recuperação do ganho de peso diminuído observado no dia 20° da gravidez.

Tabela 1. - Peso corporal das mães durante a gravidez e no pós-parto

Peso Corporal das mães (g)				
	Grupos			Valor de p
	C-C	C-P	EX	
Gestação (n=17-21), Média ± EP				
Dia 2	260,9 ± 3,653	260,2 ± 3,043	260,7 ± 4,013	0,9896
Dia 5	267,9 ± 3,826	265,4 ± 2,900	267,5 ± 4,068	0,8772
Dia 10	281,5 ± 3,799	279,1 ± 3,164	278,0 ± 3,875	0,8271
Dia 14	296,0 ± 4,276	294,5 ± 3,832	292,3 ± 4,563	0,8271
Dia 16	308,9 ± 4,607	301,0 ± 3,957	287,0 ± 5,038*	0,0044
Dia 18	331,7 ± 4,995	323,6 ± 3,996	299,6 ± 6,062*#	0,0001
Dia 20	355,9 ± 5,501	345,1 ± 4,870	318,9 ± 6,392*#	<0,0001
Pós-parto (n=9-16), Média ± EP				
Dia 7	305,3 ± 3,422	301,2 ± 4,749	292,0 ± 7,430	0,1734

Peso corporal das mães. Os dados são apresentados em Média ± EP e foram analisados usando ANOVA de 1 via, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. * $p < 0,05$ (diferente de C-C e CP); # $p < 0,05$ (diferente de C-P). C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

5.2 Ingesta diária de ração padrão durante a gravidez

A ingestão diária de ração padrão mediada durante o dia 1 e o dia 14 da gravidez foi afetada pelo avanço da gravidez $F(13,39) = 1,029$; $p < 0,0001$, e durante os dias 15, 16, 17, 18, 19, e 20 a ingestão diária de ração padrão foi afetada pela privação de sono $F(2,15) = 24,86$; $p < 0,05$, independente do avanço de gravidez, $F(5,15) = 1,932$; $p > 0,05$; e da interação destes fatores $F(10,15) = 0,683$; $p > 0,05$. Análise *pos hoc* com teste de Bonferroni evidenciou uma maior ingestão alimentar significativa de ração padrão do grupo EX respeito ao grupo C-P nos dias 16,

17, 18, 19 e 20 da gravidez, e nos dias 15, 16, 17, 18, 19, e 20 respeito ao grupo C-C ($p < 0,01$) (Figura 6). Em quanto que a ingesta de ração padrão diário entre os grupos C-C e C-P avançam durante este período de gravidez sem variações significativas entre eles ($p > 0,05$).

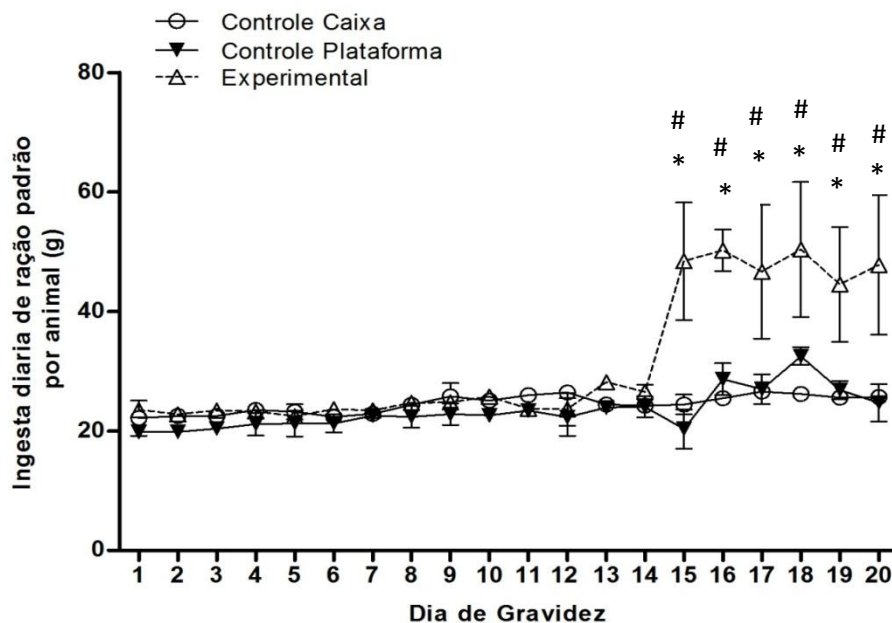


Figura 6. Ingesta diária de ração padrão por animal Os valores são média com erro padrão representados pelas barras verticais. A linha cinza claro sobre o período de tempo corresponde ao período de habituação, a linha em cinza escura corresponde ao período de privação de sono. Os dados foram analisados usando ANOVA de duas vias s com medidas repetidas seguido do post hoc teste de Bonferroni; * $p < 0,001$ (diferente do C-C) # $p < 0,001$ (diferente de C-P), ($n=6-8$ por grupo).

Este dado pode-nos levar a cair no erro se considerarmos que verdadeiramente acontece um incremento na ingestão diária de ração padrão no grupo EX devido à privação de sono paradoxal, tal como é mostrado na Figura 6. Mas, devemos indicar que os dados não indicam fidedignamente a ingestão de ração padrão diária dos animais privados de sono, porque a mensuração diária do resto de alimentos foi enviesada pela caída de comida na água durante este período, o qual não foi possível controlar.

Assim, nos consideramos comparar a ingestão de ração padrão durante o período de recuperação de sono (10h00-14h00) entre o grupo EX e o C-P, o qual é mostrado na Figura 7. A ingestão neste período foi afetado pelo avanço da gravidez, [$F(5,10)= 3,643$; $p=0,039$], mas não pelo privação de sono [$F(1,10)= 0,029$; $p=0,88$] ou pela interação de ambos [$F(5,10)= 1,28$; $p=0,345$]. Mas, na figura 7 podemos observar que o padrão de ingestão diária de ração foi afetado no grupo EX, comparado com o grupo C-P nos dias 15 e 16.

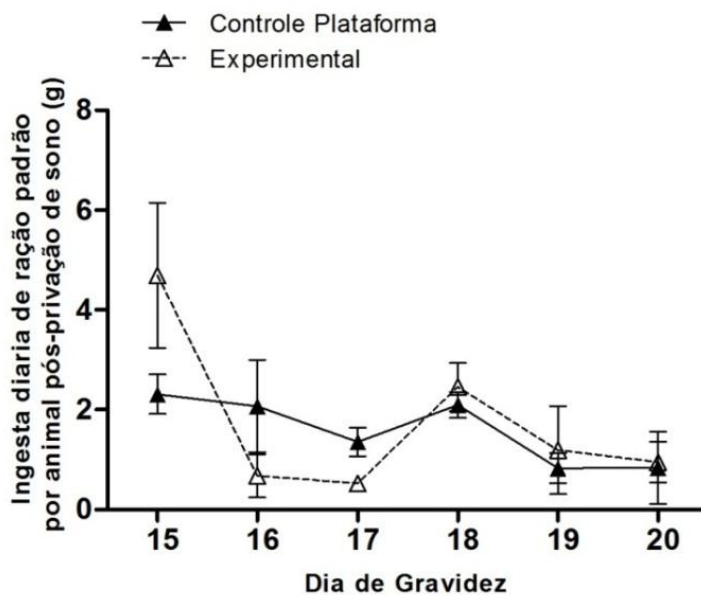


Figura 7. Ingesta diária de ração padrão por animal durante a recuperação de sono. Os valores são Média \pm EP representados pelas barras verticais. Os dados foram analisados usando ANOVA de 2 duas vias com medidas repetidas. (n=6-8 por grupo). C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

5.3 Peso de tecido adiposo visceral e glândulas adrenais na gravidez e no pós-parto

No dia 20 de gravidez não se encontrou diferença significativa no peso de tecido adiposo visceral materno entre os grupos, embora os grupos EX e C-P mostraram aproximadamente dois gramas a menos que o grupo C-C, [F(2,18)=2,685, p= 0,099].

Os pesos absolutos [F(2,18)=0,1338; p= 0,876] e relativos [F(2,18)= 1,580; P=0,237] das glândulas adrenais das mães não foram significativamente diferentes entre os grupos.

No dia 7 pós-parto os pesos relativos das glândulas adrenais mostraram-se significativamente diferentes [F(2,34)= 4,940; p= 0,0135] (Ver Tabela 2). Uma análise pós hoc com teste de comparações múltiplas de Tukey mostrou que o peso relativo de glândulas adrenais do grupo EX foi significativamente maior comparado com o grupo C-P (p<0,05), mas não comparado com o grupo C-C (p>0,05).

Tabela 2. Efeitos da privação de sono sobre o peso da glândula adrenal e o tecido adiposo visceral durante a gestação (medidas realizadas no 20º dia gestacional imediatamente após o retorno dos animais da última sessão de privação) e no 7º dia pós-parto. Todas das medidas foram realizadas no período da manhã (em torno das 10 horas).

Peso Corporal das mães (g)				
	Grupos			
	C-C	C-P	EX	Valor de p
Dia 20 da Gestação (n=6-7), Média ±EP				
Peso de glândula adrenal absoluto (g)	0,1087± 0,009	0,1118± 0,006	0,1146± 0,008	0,8757
Peso adrenal relativo (% de peso corporal)	0,0285 ± 0,0029	0,0318 ± 0,0013	0,0347 ± 0,0028	0,2365
Peso tecido adiposo visceral absoluto (g)	7,648± 2,502	5,591± 0,5065	5,853± 0,3843	0,0987
Dia 7 Pós-parto (n=9-16), Média ± EP				
Peso de glândula adrenal absoluto (g) (n=9-16)	0,0867± 0,002	0,079±0,003	0,0889± 0,003	0,0720
Peso de glândulaadrenal relativo (% de peso corporal)	0,02863 ± 0,0008	0,02556 ± 0,0018	0,0310 ± 0,0010 [#]	0,0135

Peso das glândulas adrenais e tecido adiposo visceral das mães. Os dados são apresentados em Média ± EP e foram analisados usando ANOVA de 1 via, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. * p<0,05 (diferente de C-P). C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

5.4 Dados da prole durante o desenvolvimento pré-natal e pós-natal

A privação de sono paradoxal durante a gravidez afetou a gestação. O número de fetos encontrados por cada ninhada no dia 20 da gravidez foi significativamente menor no grupo EX respeito ao grupo C-C, mas não em relação ao C-P, e também foram encontrados fetos com uma média de peso corporal ligeiramente menor do que o grupo EX respeito aos outros grupos, mas o tamanho médio deste grupo foi significativamente maior que o grupo C-C, mas não respeito ao grupo C-P(Ver Tabela 3).

A análise de variância ANOVA de 1 via (teste de Kruskal Wallis) do número de filhotes encontrados no dia 20 pré-natal entre os grupos foi significativamente diferente (K= 7,34;

$p=0,026$). O teste pos hoc de comparações múltiplas de Dunn mostrou um número de fetos significativamente maior que do grupo C-C ($p<0,05$). Em quanto que na proporção de fetos machos [$F(2,18) = 0,210$; $p=0,812$] e fêmeas [$F(2,18) = 0,222$; $p=0,805$] não se encontrou diferenças significativas.

Tabela 3: Efeitos da privação de sono gestacional sobre dados dos filhotes no dia 20 pré-natal e dia 7 pós-natal.

		Dia 20 pré-natal (n=5-7 ninhadas)			Valor de p
		C-C	Grupos		
		C-C	C-P	EX	
Numero total de fetos	Mediana (IQ)	13(12-14)	12(12-13)	11(9-12)*	0,026
Ração de Macho	Média ± EP	0,5783 ± 0,044	0,5417 ± 0,042	0,5400 ± 0,051	0,812
Ração Fêmea	Média ± EP	0,4217 ± 0,044	0,4217 ± 0,044	0,4583 ± 0,042	0,805
<i>Peso corporal dos fetos (g)</i>					
Média de Peso Total	Média ± EP	3,571 ± 0,038	3,668 ± 0,067	3,445 ± 0,109	0,179
Média de peso de fetos machos	Média ± EP	3,669 ± 0,026	3,761 ± 0,071	3,525 ± 0,107	0,134
Média de peso de fetos fêmeas	Média ± EP	3,445 ± 0,005	3,544 ± 0,089	3,356 ± 0,112	0,366
<i>Tamanho dos fetos (cm)</i>					
Média do tamanho dos fetos	Média ± EP	3,210 ± 0,027	3,391 ± 0,062	3,310 ± 0,098	0,232
Média do tamanho de fetos macho	Média ± EP	3,312 ± 0,031	3,482 ± 0,087	3,315 ± 0,104	0,283
Média do tamanho de fetos fêmea	Média ± EP	3,063 ± 0,037	3,300 ± 0,062	3,323 ± 0,095*	0,033
<i>Dia 7 pós-natal (9-16 ninhadas)</i>					
Peso corporal médio dos filhotes(g)	Média ± EP	15,45 ± 0,315	14,69 ± 0,601	14,32 ± 0,384	0,132

Dados dos filhotes no período pré e pós-natal. Os dados paramétricos são apresentados em Média ± EP e foram analisados usando ANOVA de 1 via, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados não paramétricos são apresentados em Mediana (IQ) e foram analisados usando o teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. * $p<0,05$ (diferente de C-C). C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

A média do peso corporal dos fetos não foi significativamente diferente entre os grupos [F(2,18)= 1,918; p=0,179], assim como a média de peso dos fetos machos [F(2,18)= 2,285; p= 0,134] e fêmeas [F(2,18)= 1,072; p=0,366] não foram estatisticamente significativas.

A análise da média do tamanho dos fetos [F(2,16) = 1,626; p=0,232] não mostrou diferenças estatisticamente significativas. No mesmo sentido, a análise da média do tamanho dos fetos machos [F(2,16) =1,385; p=0,283] não mostrou diferenças significativas. Porém, a análise da média do tamanho dos fetos fêmeas mostrou diferenças significativas [F(2,16)=4,401; p=0,033]. A análise pos hoc com o teste de comparações múltiplas de Tukey mostrou que o EX foi significativamente maior que o grupo C-C (P<0,05).

O peso corporal dos filhotes no dia 7 pós-natal não foi significativamente diferentes entre os grupos estudados [F(2,34) = 2,160; p= 0,132].

5.5 Duração da Gestação e sucesso de sobrevivência da prole

A duração da gestação e o sucesso de sobrevivência da prole não foram significativamente diferentes entre os grupos estudados, embora um número maior de abortos e natimortos foi observado no grupo EX (ver Tabela 4).

A duração da gestação das mães dos três grupos entre foi 21 e 23 dias, não sendo significativamente diferentes (K=1,413; p=0,493). A Tabela 3 mostra os valores detalhados das medianas para cada grupo.

O número de filhotes nascidos vivos por cada ninhada quando comparado entre os grupos não mostram diferenças significativas (K=2,565; p=0,277), assim como a proporção de filhotes fêmea [F(2,34)= 0,337; p= 0,717)] e machos [F(2,34)= 0,575; p= 0,569)].

Por outro lado, foi incluído neste ponto dados sobre a sobrevivência da prole. O grupo EX e C-P apresentaram natimortos (até 10 natimortos), correspondentes a duas ninhadas com complicações no parto, comparado com o grupo C-C que não apresentou natimortos no parto. Também foram observados dois abortos no dia 16 da gravidez para o grupo EX e nenhum para os outros dois grupos. Estes dados qualitativos são importantes para o nosso análise posterior, embora sejam menores os casos, estes indicam que a privação de sono afetou o desenvolvimento da gravidez e o sucesso da mesma.

Tabela 4. Duração da gestação e sucesso de sobrevivência da prole

	Grupos			Valor de p
	C-C	C-P	EX	
Duração da gestação (dias)				
Mediana (IQ)	22(21-22)	22(21-23)	21,5(21-22)	0,493
Número de crias nascidas vivas por ninhada				
Mediana (IQ)	11(9,25-12)	9 (6-12)	9,5 (7,25- 11)	0,277
Ração de crias nascidas vivas (♂)				
Média ± EP	0,47 ± 0,03	0,46 ± 0,06	0,53 ± 0,04	0,569
Ração de crias nascidas vivas (♀)				
Média ± EP	0,48 ± 0,03	0,51± 0,08	0,45 ± 0,04	0,717
Número de crias mortas no parto por ninhada	0	Ninhada 223: do total de 10 crias, 10 mortas. Ninhada 222: do total de 5 crias, 3 crias mortas	Ninhada 211: do um total de 5 crias, 4 mortas Ninhada 23: de um total de 4 crias, 3 mortas	
Abortos durante a gestação	0	0	2 (dia 16)	

Duração da gestação e Sobrevivência da prole. Os dados são apresentados em Mediana (IQ) e foram analisados com o teste não paramétrico Kruskal- Wallis. Significância $p < 0,05$. C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental). O tempo de gestação das ratas que tiveram filhotes natimortos nos grupos C-P e Ex foi de 23 dias e essas ninhadas foram sacrificadas juntamente com as mães.

5.6 Resultados bioquímicos

5.6.1 Perfil hormonal das mães no período gestacional e no pós-parto

No dia 20 gestacional, após finalizar o período de privação de sono, as concentrações de corticosterona materna não mostraram diferenças entre os grupos estudados, mas os níveis de ocitocina foram maiores no grupo EX respeito ao grupo C-C e C-P, e as concentrações de ocitocina respeito ao grupo C-C. No dia 7 pós-parto os níveis de corticosterona, progesterona e ocitocina materna não foram diferentes entre os grupos (ver tabela 5). As concentrações de progesterona na gravidez e a prolactina no pós-parto foram dosadas, mas não os ensaios não foram bem sucedidos. Os valores das absorbâncias da prolactina estiveram muito abaixo do menor valor menor da curva do ensaio, e as absorbâncias da progesterona estiveram muito

acima do maior valor da curva padrão, porem não foi possível interpolar as concentrações destes hormônios para os períodos indicados.

As concentrações de corticosterona plasmática materna (ng/mL) tanto no dia 20 gestacional [F(2,16) = 0,088; p= 0,916] quanto no pós-parto [F(2,16) = 1,153; p= 0,344] não foram significativamente diferentes entre os grupos, mas as concentrações deste hormônio foram maiores no período pós-parto que no período gestacional para o grupo Controle-Plataforma.

Tabela 5. Efeito da privação do sono paradoxal de ratas sobre os níveis plasmáticos de Corticosterona, progesterona, prolactina e ocitocina no dia gestacional 20, imediatamente após o retorno da última sessão de privação de sono; e no dia 7 pós-parto (aproximadamente às 10 horas)

Perfil hormonal materno na gravidez e o pós-parto								
	Dia 20 da gravidez(n=5-6)				Dia 7 pós-parto (n=5-6)			
	Grupos			Valor de P	Grupos			Valor de P
	C-C	C-P	EX		C-C	C-P	EX	
Corticosterona (ng/mL) Média± EP	264,5 ± 41,02	247,6± 22,82	269,7± 52,18	0,916	318,9± 52,16	376,7± 41,38	408,8± 19,15	0,344
Progesterona (ng/mL) Média± EP	n.m	n.m	n.m	-	374,5±57,55	400,5±94,29	236,4 ± 45,93	0,229
Prolactina (ng/mL) Média± EP	1,944±0,6712	4,732±1,869	13,04±2,254* #	0,002	n.m	n.m	n.m	-
Ocitocina (pg/mL) Média± EP)	17,70 ± 1,580	34,82 ± 7,315	36,67 ± 4,112*	0,014	29,23 ± 5,390	39,05 ± 4,023	26,29 ± 3,141	0,100

Perfil hormonal das mães no dia 20 de gravidez e no dia 7 pós-parto. Os dados paramétricos são apresentados em Média ± EP e foram analisados usando ANOVA de 1 via, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. * p<0,05 (diferente de C-C), # p<0,05 (diferente de C-P). *n.m* (não medido). C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

As concentrações plasmáticas de prolactina (ng/mL) no 20º dia gestacional foram significativamente diferentes entre os grupos estudados [F(2,16)= 9,924; p=0,002]. O teste pos hoc de comparações múltiplas de Tukey evidenciou que o grupo EX apresentou concentrações plasmáticas de prolactina significativamente maior respeito ao grupo C-C e C-P (p<0,05).

As concentrações plasmáticas de ocitona também mostraram diferenças significativas no 20º dia gestacional [F(2,16) = 5,832; p=0,014], e a análise com o teste de comparações

múltiplas de Tukey mostrou que o grupo EX apresentou concentrações significativamente maiores que o grupo C-C ($p < 0,05$). No dia 7 pós-parto os níveis deste hormônio não foram significativamente diferentes entre os grupos [$F(2,16) = 2,726$; $p = 0,100$], assim como as concentrações de progesterona plasmática [$F(2,17) = 1,631$; $p = 0,229$] não foram significativamente diferentes entre os três grupos estudados no 7º dia pós-parto.

5.6.2 Perfil metabólico das mães no 20º dia da gestação

A privação de sono na gravidez em ratas não afetou as concentrações de glicogênio no músculo soleo e no fígado. As concentrações de triglicerídeos e de colesterol no fígado também não foram afetadas.

Tabela 6. Efeitos da privação de sono sobre o nível de triglicerídeos e glicogênio no fígado e músculo soleo das ratas no 20º dia da gestação.

		Grupos			Valor de P
		C-C (n=6)	C-P (n=6)	EX (n=6-7)	
Triglicerídeos no fígado (ug/100 g tecido)					
	Média ± EP	936,4± 84,51	1162± 65,09	1098± 80,17	0,1504
Glicogênio (ug glicose/ g de tecido)					
Fígado					
	Média ± EP	492,3± 53,70	449,6± 40,24	548,5± 82,58	0,5356
Músculo Soleo					
	Média ± EP	31,83± 6,871	33,91± 6,858	17,14± 5,454	0,1464
Colesterol no Fígado (ug/ g tecido)					
	Média ± EP	173,6± 28,64	190,8 ± 34,64	211,1 ± 41,65	0,7585

Perfil metabólico mães no 20º dia de gravidez. Os dados são apresentados como Média ± EP e foram analisados usando ANOVA de 1 via. Significância estatística quando $p < 0,05$. C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

As concentrações de glicogênio no músculo soleo não foram significativamente diferentes entre os grupos [$F(2, 18) = 2,172$; $p = 0,146$], apesar de que o grupo EX mostrou concentrações ligeiramente menores que os outros grupos esta não foram significativamente diferentes dos outros (ver os valores das médias na Tabela 6). Embora, as concentrações de glicogênio no fígado foram menores no grupo EX, estas não foram estatisticamente significativas dos grupos controles [$F(2, 17) = 0,651$; $p = 0,536$].

Os níveis de triglicérides no fígado foram muito semelhantes entre os grupos [F(2, 18) = 2,137; p= 0,1504], em tanto que as concentrações de colesterol no fígado foram ligeiramente maiores no grupo EX respeito ao outros grupos, mas estas diferenças não mostraram significância estatística [F(2, 17)= 0,2816; p= 0,759].

5.7 Concentração de espécies reativas de oxigênio totais no sistema nervoso dos fetos

As concentrações de ROS total medidas no córtex, cerebelo e hipocampo dos fetos machos no 20º dia pré-natal não foram afetados pela privação de sono da mãe durante a última semana da gravidez, porém as concentrações de ROS nestas estruturas encefálicas foram muito semelhantes. (ver Tabela 7).

A análise de variância ANOVA de 1 via (Tests de Kruskal Wallis) do ROS total (pmol/mg) encontrado no Córtex cerebral (K=0,9932; p=0,6086), no Cerebelo (K= 1,309; p=0,5197) e no Hipocampo (K=2,209; p=0,3314) dos fetos no 20º dia pré-natal mostrou diferenças significativas entre os grupos (p>0,05).

Tabela 7. Níveis de ROS total no Córtex, Cerebelo e Hipocampo dos fetos no 20º dia pré-natal.

Dia 20 pré-natal (pmol/mg)				
	Grupos			Valor de P
	C-C (n=5-6)	C-P(n=6)	EX (n=6)	
CORTEX Mediana (IQ)	6,950 (4,650-9,250)	6,786 (5,808-8,537)	5,775 (5,584-6,799)	0,6086
CEREBELO Mediana (IQ)	6,926(4,979-8,206)	5,859(4,880-7,221)	4,076 (2,861-9,807)	0,5197
HIPOCAMPO Mediana (IQ)	5,361 (4,193-8,110)	6,675 (5,038-8,117)	4,797 (2,956-6,557)	0,3314

ROS total no sistema nervoso central dos fetos. Os dados são apresentados em Mediana (IQ) e foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Significância p<0,05. C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

5.8 Níveis de BDNF no córtex, cerebelo e hipocampo dos fetos.

A concentração de BDNF no hipocampo fetal no 20º dia gestacional foi afetada pela privação de sono materno na última semana de gravidez, mas este resultado não foi observado para o córtex e o cerebelo dos fetos. A análise de variância (ANOVA de 1 via) do BDNF no hipocampo dos fetos machos mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos [F(2,16) = 4,102; p= 0,0396]; uma análise post hoc com o teste comparações múltiplas de Tukey mostrou que as concentrações de BDNF no hipocampo fetal do grupo EX foram significativamente maiores em comparação com o grupo C-C (p<0,05). Embora, as concentrações BDNF do grupo C-P são maiores comprado com o grupo C-C, esta não foi estatisticamente significativa (p>0,05) (ver Tabela 8).

A análise de variância (ANOVA de 1 via) da concentração do BDNF no córtex não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos [F(2,16) =1,958; p= 0,1779]. No mesmo sentido, a concentração de BDNF no cerebelo fetal, não foi encontrado diferenças significativas entre os grupos [F(2,18)= 0,4543; p= 0,6429].

Tabela 8. Concentrações de BDNF no Córtex, Cerebelo e Hipocampo de fetos no 20º dia pré-natal

Dia 20 pré-natal (pg/mL)				
	Grupos			Valor de P
	C-C (n=5-7)	C-P(n=5)	EX (n=7)	
CORTEX Média ± EP	47,83± 11,43	102,7± 26,08	81,99±16,45	0,1779
CEREBELO Média ± EP	70,47±10,47	85,42±13,72	88,20 ±16,22	0,6429
HIPOCAMPO Média ± EP	29,26 ±8,135	73,91 ±15,00	94,47 ± 23,21*	0,0396

Concentrações de BDNF no sistema nervoso central dos fetos. Os dados são apresentados como Média ± EP e foram analisados usando ANOVA DE 1 vias seguido do teste Tukey. * p<0,05 (diferente de C-C). C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

5.9 Resultados Comportamentais

5.9.1 Comportamento materno acumulado no pós-parto.

O cuidado materno total não foi alterado pela privação de sono durante a gravidez. Mas, alguns comportamentos maternos dirigidos hacia as crias como a amamentação na postura high Crouch maio + Lambida foi menor no grupo EX e C-C respeito do grupo C-P, e o comportamento não diretamente dirigido hacia os filhotes como selfgrooming foi menor no grupo C-P respeito ao grupo C-C e, mas não respeito ao grupo EX (ver Tabela 9).

Tabela 9: Comportamento maternal acumulado durante os dias 1, 2, 3, 4,5 e 6 do pós-parto

Parâmetros comportamentais (Número de observações)	Grupos			Valor de P
	C-C (n=12)	C-P (n=9)	EX (n=10)	
Cuidado Materno Total Média ± EP	304,9 ± 10,50	300,2 ± 11,60	292,3 ± 20,25	0,8196
Amamentação High Crouch Média ± EP	220,8 ± 9,852	237,3 ± 12,06	204,5 ± 17,15	0,2544
Amamentação Low Crouch Mediana (IQ)	39(30,75-45,50)	38(29,50-48,50)	44(27-94,5)	0,6238
Amamentação posição supina Mediana (IQ)	24(11,25- 40,75)	15(2-18)	26(9,5-42,25)	0,1069
Amamentação High Crouch + Lambida dos filhotes Mediana(IQ)	33(27,75-40,75)	57(45-61)*	32(4,25-50,50)#	0,0141
Lambida dos filhotes Média ± EP	50,25 ± 4,310	65,78 ± 3,632	52,50 ± 7,618	0,1267
Construção do ninho Média ± EP	29,58 ± 4,792	22,22 ± 3,244	32,20 ± 6,432	0,4027
Mãe fora do ninho Mediana (IQ)	260,5 (234,5-301,8)	245(240-295,5)	269(208,5-352,5)	0,9237
Self grooming Média ± EP	68,58 ± 3,368	54,78 ± 2,962*	60,80 ± 4,224	0,0357
Comer e /ou Beber Média ± EP	86,33 ± 4,985	92,33 ± 5,874	82,30 ± 7,544	0,5462
Sono Mediana (IQ)	294,5(265,3- 337,5)	288,0(275,5-321,0)	316,0(297,8-357,8)	0,1603

Comportamento maternal acumulado. Os dados paramétricos são apresentados em Média ± EP e foram analisados usando ANOVA de 1 via, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados não paramétricos são apresentados em Mediana (IQ) e foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. # p<0,05 (diferente de C-P),* p<0,05 (diferente de C-C). C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

A análise do número de observações do cuidado materno total acumulado não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos [$F(2,30)= 0,2004$; $p=0,8196$] (Figura 8A).

No parâmetro comportamental postura de amamentação na postura com dorso vem arqueado (High Crouch)[$F(2,30)= 1,438$; $p=0,2544$] e pouco arqueado (Low Crouch) [$K= 0.6238$; $p=0,7321$]os grupos não mostraram diferenças. Porém, na postura de High Crouch +Lambida mostraram diferenças ($K=8,523$; $p= 0,0141$); o teste *pos hoc* de comparações múltiplas de Dunn evidenciou que o grupo EX teve menor número desse comportamento respeito ao grupo C-P ($p<0,05$), e por sua vez no grupo C-P foi maior do que no grupo C-C ($p<0,05$). A postura de amamentação supina não mostrou diferenças entre os grupos ($K=4,472$; $p= 0,1069$). A lambida dos filhotes não foi significativamente diferente entre os grupos [$F(2,30)= 2,226$; $p=0,1267$] (Figura 8B), assim como a frequência de construção de ninho [$F(2,30)=0,9399$; $p=0,4027$].

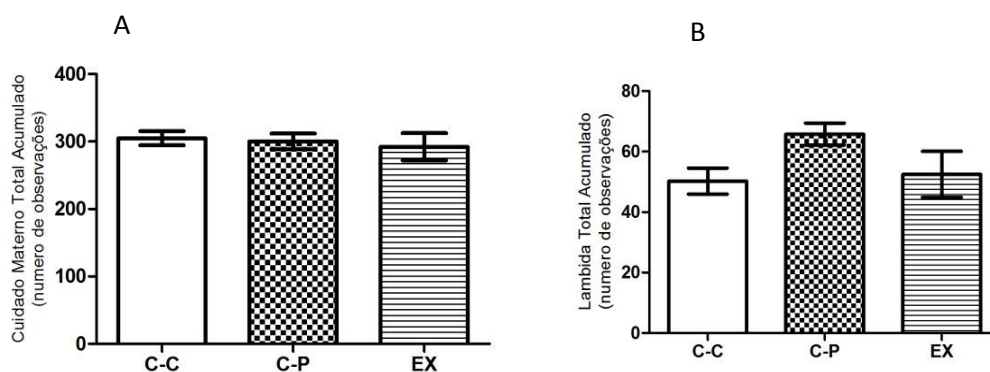


Figura 8. Cuidado materno e lambida total acumulado. Os valores são médias com erro padrão, representados pelas barras verticais. A. Numero total acumulado de observações de cuidado materno registrado nos dias 1, 2, 3, 4, 5 e 6 pós-parto. B. Numero total de observações de lambida total acumulada nos dias 1, 2, 3, 4, 5 e 6 pós-parto. Os dados foram analisados usando ANOVA de 1 via ; ($n=9-12$ por grupo). C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

Outros parâmetros comportamentais maternos não dirigidos aos filhotes foram analisados. O numero de vezes que a mãe fica fora do ninho ($K=0,1587$; $p= 0,9237$), as vezes que a mãe come ou bebe [$F(2,30)=0,6181$; $p=0,5462$], e as vezes que foi observada a mãe dormindo [$F(2,30)=1,956$; $p=0,1603$] não mostrou diferenças entre os grupos. Por outro lado, às vezes em que a mãe desenvolve comportamentos de autocuidado (self grooming) mostrou diferenças significativas entre os grupos [$F(2,30)=3,764$; $p=0,0357$]. Um posterior análise aplicado com teste *pos hoc* de comparações múltiplas de Tukey mostrou que o grupo C-P desenvolveu menos vezes este comportamento do que o grupo C-C ($p<0,05$). Estes dados não indicariam

propriamente os efeitos da privação de sono, mas se os efeitos de outras variáveis não controladas ao que os animais do grupo C-P teriam sido expostos durante a privação de sono.

5.9.1.1 Comportamento materno acumulado em diferentes períodos de registro diário

Apresenta-se a continuação os resultados da análise do Cuidado materno total acumulado durante os dias 1, 2, 3, 4,5 e 6 pós-parto em quatro períodos de registro diário: 09h00, 12h00, 15h00 e 18h00.

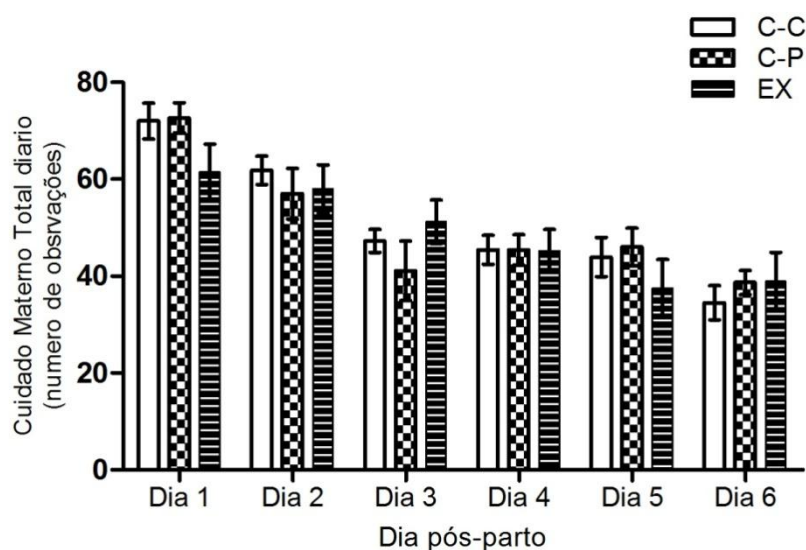


Figura 9. Cuidado materno acumulado diário. Os valores são média com erro padrão representados pelas barras verticais. A. cuidado materno total registrado nos dias 1, 2, 3, 4, 5 e 6 pós-parto. Os dados foram analisados usando ANOVA de 2 vias com medidas repetidas, (n=9-12 por grupo). C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

O cuidado materno total observado diariamente mostrou um efeito do fator tempo [$F(2,140)= 27,22$; $p<0,0001$], mas não mostrou efeito do tratamento (privação de sono na gravidez) [$F(5,140)= 0,2046$; $p=0,8161$] nem o efeito da interação destas variáveis [$F(10,140)= 1,171$; $p=0,3151$] (Figura 9).

Quando o cuidado materno total foi analisado nos diferentes períodos de registro diário também mostrou variação conforme o avanço do pós-parto. No registro das 09h00 a cuidado materno é afetado mostrou efeito principal do fator tempo [$F(5,140)= 8,044$; $P<0,0001$], mas não do tratamento [$F(2,140)= 0,2240$; $p=0,8008$], nem da interação entre ambos os fatores [$F(10,140)= 0,7098$; $p=0,7141$] (Figura 10 A).

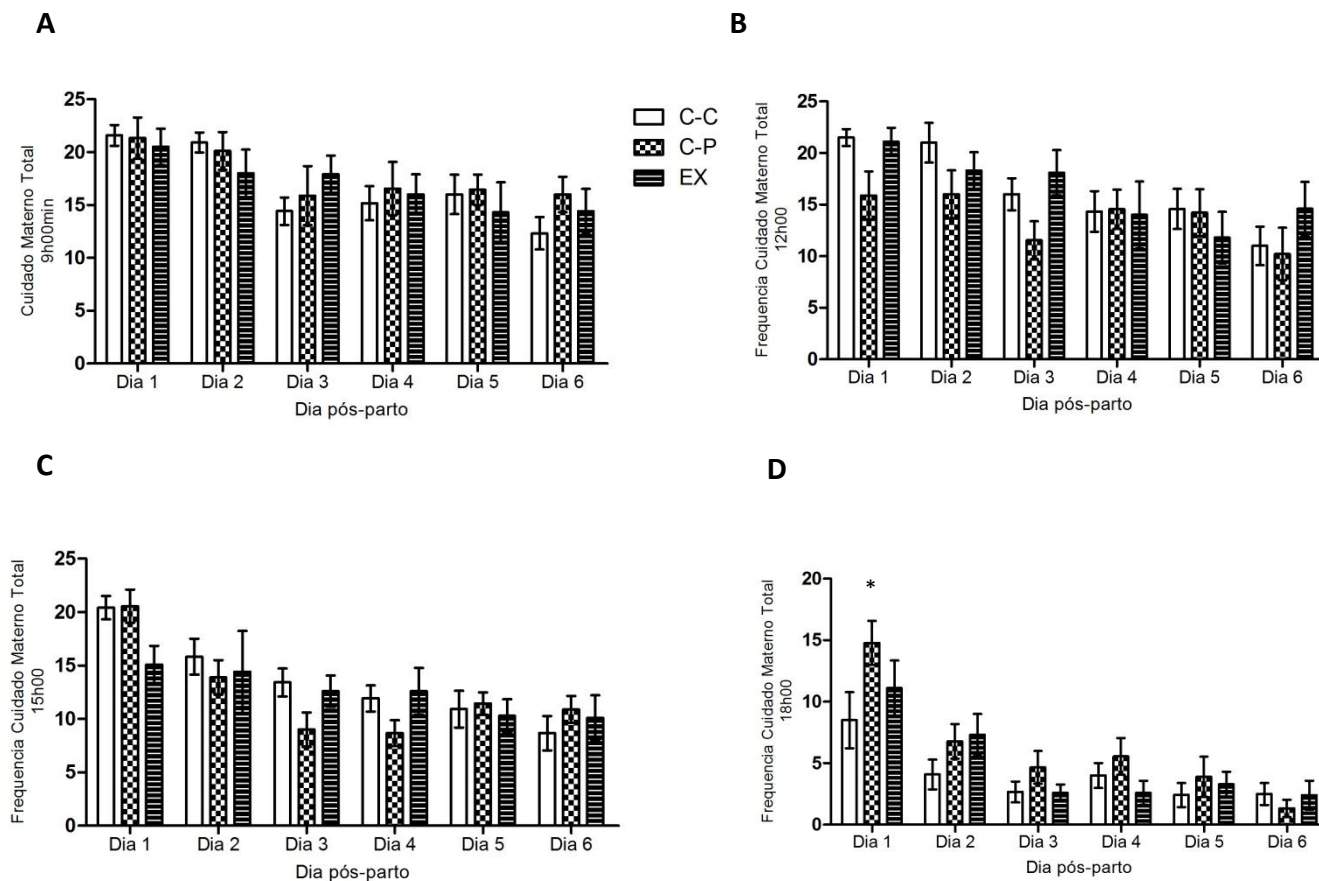


Figura 10. Comportamento materno acumulado nos dias 1, 2,3,4,5 e 6 em diferentes períodos de registro. Os valores são médias, com erro padrão representados pelas barras verticais. A. cuidado materno total registrado às 09h00. B. Cuidado materno total registrado às 12h00. C. Cuidado materno total registrado às 15h00. D. Cuidado Materno total registrado às 18h00. Os dados foram analisados usando ANOVA de 2 vias com medidas repetidas seguido do post hoc teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ (diferente de C-C no mesmo dia), (n=9-12 por grupo). C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

No registro das 12h00 o cuidado materno total mostrou também efeito principal do fator tempo [$F(5,140) = 7,580$; $p < 0,0001$, e não do tratamento [$F(2,140) = 1,398$; $p = 0,2639$] nem da interação de ambos os fatores [$F(10,140) = 1,230$; $p = 0,2767$] (Figura 10 B)

No período de registro das 15h00min foi observada também o efeito principal do fator tempo [$F(2,140) = 11,90$; $p < 0,0001$], mas não do tratamento [$F(2,140) = 0,4871$; $p = 0,6195$] nem da interação [$F(10,140) = 1,395$; $p = 0,1885$] (Figura 10 C). No período de registro do ciclo escuro, 18h00, foi observado também uma progressiva diminuição do cuidado materno total ao avanço do pós-parto, isto é o efeito principal do fator tempo [$F(2,140) = 19,62$; $P < 0,0001$], mas não do efeito do tratamento [$F(2,140) = 2,696$; $p = 0,0850$], nem da interação de ambos os fatores [$F(10,140) = 1,182$; $p = 0,3077$] (Figura 9D). Uma análise pos hoc com o teste de Bonferroni

mostrou que no primeiro dia de registro o numero de observações do cuidado materno total foi significativamente maior no grupo C-P respeito ao grupo C-C ($p < 0,05$), mas estas diferenças não foram observadas nos seguintes dias do pós-parto.

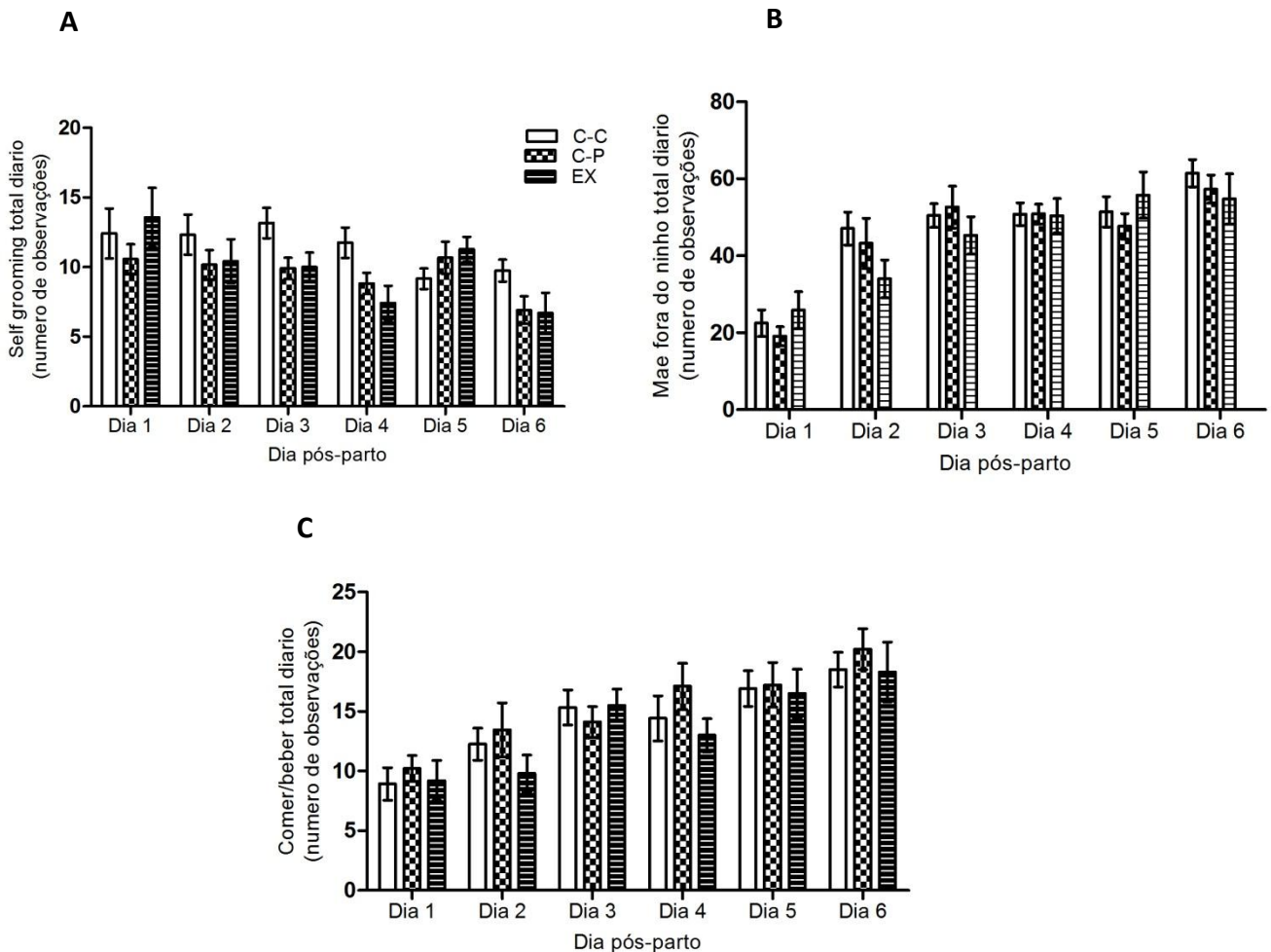


Figura 11. Parâmetros de comportamento não materno diário. Os valores são médias, com erro padrão representados pelas barras verticais. A. frequência Selfgrooming total diário. B. Frequência diária de mãe fora do ninho. C. Frequência diária de comer e beber das mães. Os dados foram analisados usando ANOVA de 2 vias com medidas repetidas, ($n=9-12$ por grupo). C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental).

Por outro lado, também foi analisado também o numero de observações totais diárias alguns comportamentos maternos não dirigidos aos filhotes, mas sim dirigidos hacia o mantimento do estado emocional e alimentação das mães. O self grooming mostrou um efeito principal do fator tempo, isto é conforma avança o pós-parto se observa maior numero de vezes [$F(5,140)= 5,321$; $p= 0,0002$], não mostrou efeito do tratamento [$F(2,140)= 3,089$; $p=0,0614$], nem da interação de ambos os fatores [$F(10,140)= 1,479$; $p= 0,1533$] (Figura 11A). O numero de

vezes que mãe fica fora do ninho mostrou também o efeito principal do fator tempo [F(5,140)= 33,18; $p < 0,0001$], e não foi afetado pelo tratamento [F(2,140)= 0,3273; $p = 0,7236$] nem pela interação de ambas [F(10,140)= 1,197; $p = 0,2983$] (Figura 11B). Neste mesmo sentido o número de vezes que a mãe bebe água e ou come ração padrão também mostrou o efeito do fator tempo [F(5,140)= 16,67; $p < 0,0001$], mas não foi afetado pelo tratamento [F(2,140)= 0,6181; $p = 0,5462$], ou pela interação de ambas variáveis [F(10,140)= 0,5209; $p = 0,8732$] (Figura 11C).

Estes dados indicam que tanto o comportamento materno dirigido às crias quanto os dirigidos ao cuidado da própria mãe não foram afetados pela privação de sono durante a última semana da gravidez. Por outro, as variações observadas no grupo C-P evidenciará o efeito de fatores ambientais não controlados, sendo que este grupo foi um grupo controle e não submetido a privação de sono.

5.9.2 Preferencia olfatória de filhotes no dia 7 pós-natal

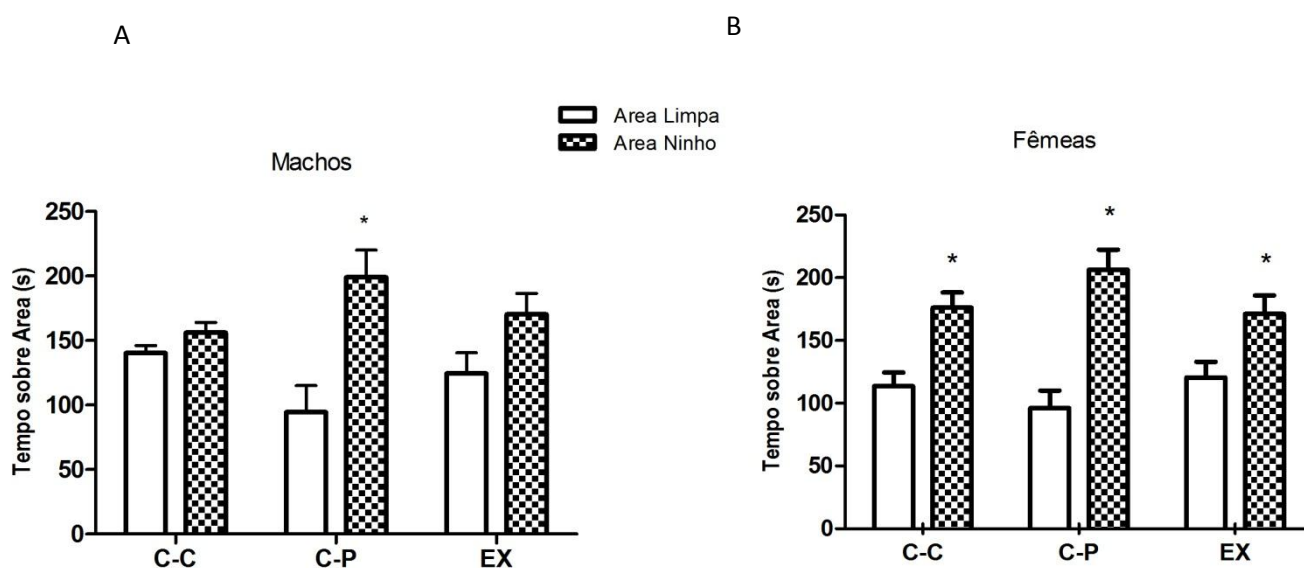


Figura 12. Preferencia olfatória dos filhotes no dia 7 pós-natal. Os valores são média com erro padrão representados pelas barras verticais. A. tempo de permanência na área filhotes fêmeas. B. Tempo de permanência na área filhotes machos. * $p < 0,05$ (diferente de Área Limpa no mesmo grupo). ANOVA de 2 via seguida pelo teste de *post hoc* de Bonferroni. C-C (Controle-Caixa), C-P (Controle-Plataforma), EX (Experimental), $n = 9-12$ por grupo.

Para estabelecer a preferencia olfatória dos filhotes foi analisado o tempo de permanência na área de maravalha limpa ou do ninho da mãe. Uma análise de variância de dois fatores ANOVA mostrou o efeito principal da Área nos filhotes machos [F(1,28)= 10,90; $p =$

0,0026], mas não do efeito do grupo [$F(2,28) = 0,5134$; $p = 0,604$], nem da interação de ambos os fatores [$F(2,28) = 2,377$; $p = 0,1113$]. O teste *pos hoc* de Bonferroni mostrou que os tres grupos passam maior tempo na área do ninho da mãe do que na área limpa, mas esta diferença foi estatisticamente significativa apenas para o grupo C-P ($p < 0,05$).

Semelhante resultado mostrou a análise da preferência olfatória dos filhotes fêmeas. A análise mostrou um efeito principal da Área [$F(1,53) = 46,71$; $p < 0,0001$], mas não efeito do grupo [$F(2,53) = 0,1229$; $p = 0,885$], nem da interação de ambos os fatores [$F(2,53) = 2,495$; $p = 0,092$]. Quando comparado o tempo de permanência na área do ninho e na área limpa intragrupo pelo teste de Bonferroni as fêmeas, dos tres grupos, mostraram maior preferência pela área do ninho da mãe do que pela área limpa, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (figura 12).

6 DISCUSSÃO

A seguir, serão discutidos os resultados dos efeitos da privação de sono paradoxal durante a última semana da gravidez em ratas de acordo com parâmetros metabólicos e hormonais, desenvolvimento da gravidez e dos fetos no 20º dia de gravidez.

6.1 Efeitos sobre o metabolismo durante a gravidez

A privação de sono na última semana de gravidez em ratas levou a uma diminuição drástica no ganho de peso corporal a partir do segundo dia de privação de sono paradoxal. Desse dia em diante, o ganho de peso ocorre de forma progressiva, não alcançando, porém, os controles até o final da privação. Nesse mesmo período, o grupo Controle Plataforma mostra uma perda no ganho de peso diário com relação ao Controle Caixa; mas, a partir do 16º dia de gravidez começa a aumentar progressivamente, e a curva segue em paralelo, porém menor.

Estudos prévios que usam os protocolos clássicos ou das plataformas múltiplas de privação crônica ou aguda de sono, relatam também a inibição no ganho de peso corporal em roedores machos (Elomaa, 1979; Everson, Bergmann, and Rechtschaffen, 1989; Kushida, Bergmann, and Rechtschaffen, 1989; Suchecki, Palma, and Tufik, 2000; Brock et al., 1994; Hoshino, 1996; Papakonstantinou et al., 2003; Suchecki, Antunes, and Tufik, 2003; Andersen et al., 2004; Machado, Suchecki, Tufik, 2005; Koban and Swinson, 2005; Hipolide et al., 2006; Christie et al., 2010; Barf et al., 2012). Nesses estudos, há controvérsia para determinar se a diminuição no ganho de peso se deve a efeitos próprios da privação de sono, ou a efeitos de variáveis associadas aos protocolos de privação que impedem que os animais se alimentem eficientemente, ou a variáveis que afetam o metabolismo dos animais (Koban et al., 2008).

A primeira questão é discutir se a inibição no ganho de peso seria devido a uma diminuição na ingestão de alimentos. Vários estudos demonstram que ratos machos submetidos à privação de sono incrementam sua ingestão alimentar, a ponto de serem considerados hiperfágicos, querem ser submetidos à privação crônica ou aguda crônica de sono, e independentemente do método utilizado (Elomaa, 1979; Everson, Bergmann, and Rechtschaffen, 1989; Kushida, Bergmann, and Rechtschaffen, 1989; Suchecki, Palma, and Tufik, 2000; Brock et al., 1994; Suchecki, Antunes, and Tufik, 2003; Andersen et al., 2004; Koban and Swinson, 2005; Hipolide et al., 2006; Christie et al., 2010). Enquanto alguns estudos mostram apenas um ligeiro incremento na ingestão alimentar (Hanlon et al., 2005), outros não verificam mudanças com respeito ao controle (Martins et al., 2006; Barf et al., 2012), e outros, ainda, demonstram uma redução na ingestão alimentar (Papakonstantinou et al., 2003), mesmo com o uso da técnica de

privação crônica de sono por lesão do núcleo ventrolateral preoptico do hipotálamo (Vetrivalan et al., 2012).

A hiperfagia observada nesses estudos estaria condicionada ao tempo em que os animais são privados de sono. Assim, a hiperfagia manifesta-se só a partir do 5º dia da privação de sono em diante, e antes desse dia o que ocorre é uma inibição na ingesta alimentar, que corresponde à diminuição no ganho de peso observada nesse período (Koban et al., 2008). Se a hiperfagia se manifesta apenas a partir do 5º dia da privação de sono, não é clara a explicação para o aumento súbito da ingesta alimentar dos nossos animais 24 horas após a privação de sono, que logo se mantém constante até o final da privação; porém, nesse período, a ingesta alimentar dos controles mantém um padrão progressivo (Figura 7).

Antes de continuar com a discussão destes dados, devemos indicar que as medições da ingesta alimentar para este grupo não contemplaram as quantidades de alimento que caíram n'água. Porém, nossos dados não demonstram apenas a ingesta alimentar neste período, mas demonstram também fatores que levaram ao aumento de alimentos caídos n'água. Contudo, é importante considerar a ingesta alimentar durante o período de recuperação de sono (10h-14h) (Figura 7), que, no primeiro dia, é ligeiramente maior que o Controle, e no dia seguinte diminui subitamente, ficando abaixo deste, e a curva padrão de ingesta de ambos grupos assemelhando-se apenas no terceiro dia de recuperação de sono (17º. de gravidez). Estes dados analisados em conjunto evidenciam que o ganho de peso progressivo observado durante a privação de sono a partir do 16º dia ao 20º dia corresponde à ingesta alimentar constante evidenciada nos respectivos gráficos, indicando que os fatores que afetam o ganho de peso corporal e a ingesta alimentar das ratas durante a privação de sono exercem maior pressão durante as primeiras 48 horas. Levando-se em conta os achados de Koban et al (2008) de que a hiperfagia só começa a se manifestar depois do 5º dia de privação, consideramos que os animais de nosso estudo privados de sono por seis dias consecutivos podem ter manifestado hiperfagia nos últimos dias da privação, da mesma forma que podem ter diminuído a ingesta alimentar durante os primeiros dias. Contudo, o que se observa nos nossos dados é um súbito incremento na ingesta 24 horas após o início da privação, o que não se correlaciona com a diminuição súbita do ganho de peso corporal nas 48 horas seguintes à privação de sono. Nos primeiros dias da privação, outras variáveis estariam afetando este aumento na aparente ingesta alimentar nos animais, que se mantém constante até o final da privação de sono.

Como nosso estudo trata de ratas grávidas, podemos também supor que a hiperfagia característica deste estado fisiológico pode ter aumentado no início da privação de sono. Mas, a

hiperfagia que acompanha a gravidez incrementa-se no primeiro e no segundo trimestre da gravidez em ratos, permitindo estoques de energia no tecido adiposo, de modo que nesse período e na última semana de gravidez, a rata atinge um equilíbrio positivo de energia, importante para enfrentar as demandas metabólicas dos fetos em desenvolvimento, o parto e a lactação (Morrison, 1956; Douglas, Johnstone and Leng, 2007). Porém, durante a última semana de gravidez, as ratas aumentam mais rapidamente o ganho de peso corporal, em contraste à ingesta de líquidos e alimento que diminui, voltando aos níveis anteriores à gravidez (Crips and Williams, 1975; Morgan and Winick, 1981; Rocha et al., 2003; Douglas Johnstone and Leng, 2007). Assim, o aparente aumento na ingesta alimentar e a queda de alimentos na água não poderiam ter sido decorrentes da hiperfagia.

O comportamento de roer está entre as variáveis que podem ter incrementado a aparente ingesta de alimento. Este comportamento estereotipado seria manifestado em roedores expostos a situações muito excitantes, como condições inadequadas de moradia, e o roer seria um mecanismo comportamental de defesa para reduzir o estresse (Würbel and Stauffacher, 1996). Durante a privação de sono em ratos machos, tem-se observado o roer após 48 horas do início da privação de sono, tornando-se intenso durante as 72 e 96 horas de privação, voltando para níveis basais durante o período de recuperação, independente do objeto a ser roído, ração ou madeira (Martins et al., 2008). Apesar de evitar os efeitos estressantes do isolamento social e a restrição da locomoção com respeito aos métodos clássicos, o método de plataformas múltiplas que foi usado em nosso experimento induz maior estresse do que os métodos clássicos (Suchecki and Tufik, 2000; Suchecki, Tiba and Tufik, 2002). Não foi registrado se os nossos animais apresentaram o comportamento de roer, o que explicaria a súbita diminuição de comida nas grades e aumento de alimento na água dentro das plataformas.

Entretanto, este comportamento pode ter sido exacerbado no início da privação devido a uma demanda natural de alimento que foi dificultada pelo esforço para conseguir comida através das grades, isto é subir nas plataformas, esticar-se até as grades e roer a comida cuidando para não cair na água. Nessas condições, a probabilidade de ingerir toda a comida roída teria-se tornado difícil com a presença da água circundante nas plataformas (Toshino, 1996); porém também roer mais vezes para satisfazer as quantidades de alimento de que necessitam (Koban et al., 2008). Por outro lado, o fato de que, a partir do aumento súbito na ingesta, esta se manter constante até o final da privação de sono indicaria que o fator que levou à diminuição da ração da grade (e aumento da queda de ração na água) também se manteve constante. Consideramos que os animais do nosso experimento poderiam ter exacerbado o comportamento

de roer nos primeiros dias da privação, mantendo-se constante até final do protocolo, ou também poderiam ter aumentado os episódios de alimentação, permitindo deixar cair pedaços de alimento antes de consumi-los completamente (Hanlon et al., 2005). No caso dos animais do grupo Controle Plataforma, possivelmente o comportamento de roer também aumentou inicialmente, mas a caixa circundada de maravalha permitiu que a ração caída fosse consumida pelos animais, e, assim, a satisfação da demanda de alimento foi rápida e a quantidade de ingesta alimentar foi mantida semelhante ao grupo Controle Caixa.

Estudos prévios de privação de sono paradoxal com o método de plataformas múltiplas demonstram que um maior episódio de recuperação de sono paradoxal começa a se manifestar apenas após o final do segundo dia da privação de sono (Medeiros et al., 1998), indicando que a pressão da falta de sono nos primeiros dias de privação não seria tão forte. Isto reforça a explicação de que os efeitos observados nos primeiros dias da privação de sono de nossos animais seriam mais por efeito de estímulos estressores do ambiente de privação do que pela falta de sono per se. Na literatura, já se considera que as alterações metabólicas observadas em animais após 24 horas de privação de sono seriam devidas aos efeitos do estresse da exposição dos animais ao ambiente, além da exposição à temperatura da água e à redução da locomoção dos animais (Medeiros et al., 1998).

Neste trabalho, o grupo Controle Plataforma foi introduzido no desenho experimental para controlar os efeitos de variáveis estressoras associadas ao ambiente (um tanque quatro vezes maior do que as caixas moradia, com plataformas e circundado de água ou maravalha, com disposição da comida e água a uma altura maior do que nas caixas moradia), o efeito do uso das plataformas do tanque de água para conseguir a comida e a locomoção dos animais, mas não a temperatura da água. O controle de estas variáveis não foi considerado em outros estudos, que também verificaram dados semelhantes na redução do ganho de peso durante a privação de sono paradoxal de ratas usando o mesmo método de plataformas múltiplas durante a gravidez (Thomal et al., 2010). Assim, os dados no ganho de peso corporal do grupo Controle Plataforma reforçam a discussão de que, nos primeiros dias da privação de sono, outros fatores estressores associados ao ambiente de privação afetam significativamente o metabolismo dos animais.

Estudos prévios mostram que a mudança do ambiente das ratas tem um forte efeito sobre o ganho do peso corporal. Harris et al. (2002) relatam que o estresse por restrição em ratas limitadas a comer só no período escuro inibe o ganho de peso corporal a partir do segundo dia do experimento, e se mantém assim até o final, independente da hora de o estresse ser

aplicado. Portanto, consideramos que a exposição a um ambiente novo para os animais teria significado um estresse maior no início da privação, sendo ainda mais intenso para o grupo EX, pois o ambiente deste grupo não ofereceu segurança para a locomoção, exigindo maior restrição de locomoção para a procura de uma plataforma onde pudessem reiniciar o sono toda vez que acordado por outro animal da mesma caixa, exigindo, principalmente, um maior estado de alerta para evitar a caída na água nos despertares contínuos e na vigília durante a alimentação

Para o grupo Controle Plataforma, em contraste, este estressor não foi muito intenso, significando apenas uma queda no ganho de peso corporal observado nas 48 horas seguintes ao início da privação de sono, embora não se igualando ao ganho progressivo mostrado antes do início da privação, diminuindo significativamente no final.

Neste estudo, a temperatura da água foi similar à temperatura ambiente (21-22°C) durante a privação de sono, o que, para efeitos de nossa discussão sobre os fatores estressores do ambiente, pode ser descartado, já que este parâmetro não levaria a alterações do metabolismo, que ocorreria apenas quando a exposição ocorrer a temperaturas extremas (Osorio et al., 2003).

Assim, os animais deste experimento privados de sono foram expostos a um ambiente com fatores estressantes próprios do protocolo, sendo alguns desses fatores controlados no grupo Controle Plataforma, levando, no início da privação de sono, a um aumento do comportamento estereotipado de roer, que, por sua vez, aumentou a comida caída na água, sem aumento na ingesta alimentar, que pode ter diminuído nas primeiras 48 horas da privação de sono, correspondendo à diminuição no ganho de peso neste período nos animais privados de sono, e à queda no ganho de peso corporal do grupo Controle Plataforma. A partir desse momento, até o final da privação, a curva da ingesta alimentar constante correlaciona-se ao aumento progressivo no ganho de peso. Por outro lado, a diminuição no ganho de peso no início da privação de sono implica uma demanda alta de gasto metabólico que não foi possível restituir com a ingesta de energia. Nos estudos de privação de sono evidencia-se uma diminuição no peso corporal progressivo dos animais durante a privação de sono e aumentam quando a privação de sono termina e o sono se recupera (Elomaa, 1979; Everson, Bergmann, and Rechtschaffen, 1989; Kushida, Bergmann, and Rechtschaffen, 1989; Suchecki, Palma, and Tufik, 2000; Brock et al., 1994; Hoshino, 1996; Papakonstantinou et al., 2003; Suchecki, Antunes, and Tufik, 2003; Andersen et al., 2004; Machado, Suchecki, Tufik, 2005; Koban and Swinson, 2005; Hipolide et al., 2006; Christie et al., 2010; Barf et al., 2012); já em nosso estudo, os animais tiveram 4 horas diárias de recuperação de sono, sendo uma oportunidade para o organismo

melhorar os efeitos metabólicos impostos tanto pela exposição a um ambiente novo quanto pela falta de sono propriamente (Aimee, Caron & Richard, 2010). Além disso, o ganho de peso que ocorre neste período da gravidez, se deve ao fato de um maior desenvolvimento dos fetos neste período.

Algumas pesquisas demonstram que, após 96 horas de privação de sono os níveis de noradrenalina plasmática são aumentados, indicando uma forte ativação do SNS (Andersen et al., 2005). A ativação do SNS estimula não só a lipólise durante o exercício por ativação de receptores beta adrenérgicos no tecido adiposo, mas também a liberação de IL-6 pelo músculo (Frayn, 2010). Estas respostas também ocorrem durante a privação crônica de sono em ratos (Everson and Crowley, 2004). A privação de sono paradoxal em ratos machos também reduz os estoques de glicogênio no fígado após 24 horas de privação de sono paradoxal (Martins et al., 2010), o que é geralmente associado à ativação de processos catabólicos que promovem a quebra de glicogênio e reservas de gordura, e disponibilizam a glicose e ácidos graxos como energia para o organismo (Baviera et al., 2008), assim incrementa-se o colesterol total e triglicérides plasmáticos respeito ao controle (Meihua et al 2014). Durante a gravidez os requerimentos de energia assim como a necessidade de glicose também aumentam. Porém, apesar destas demandas, o metabolismo do glicogênio muscular altera-se quando as ratas grávidas são expostas a uma situação de gasto energético ainda maior (Phelps et al., 1981). Por exemplo, quando estas são expostas a exercício físico durante a última semana de gravidez, as concentrações de glicogênio hepático diminuem, os ácidos graxos livres aumentam, mas permanecem inalterados os níveis circulantes de insulina e glucagon (Carlson et al., 1985). Porém, quando a rata nesse mesmo período é submetida a um jejum prolongado, os níveis de glicogênio se reduzem nos músculos das patas posteriores em aproximadamente 50% após 24 h, mas logo se estabilizando, só sendo afetado o metabolismo dos triglicérides (Nowacka and Gorski, 1988). Nas fêmeas grávidas de nosso estudo o tecido adiposo permanece sem variações nos tres grupos, assim como as concentrações de colesterol, triglicérides e glicogênio no fígado, e este ultimo também no músculo soleo, medidos no último dia de privação de sono, não refletem os efeitos da privação de sono. Nós não medimos a atividade do SNS, provavelmente a ativação deste sistema nos animais privados de sono poderia explicar a diminuição do ganho de peso durante a privação que foi observada neste estudo.

Durante o período de lactação, a ingesta de alimento aumenta duas vezes mais do que ao final da gravidez (Cripps and Williams, 1975). Este aumento da ingesta contribuiu para uma rápida recuperação do peso corporal menor observado no 20º dia de gravidez observado nos

animais privados de sono e Controle Plataforma respeito ao grupo Controle Caixa, indicando que os fatores que levaram a uma inibição do ganho de peso corporal durante a privação de sono foram restaurados após o término deste e por fatores metabólicos próprios da lactação.

6.2 Efeito da privação de sono sobre o eixo HPA e os hormônios das mães

Em estudos de privação com ratos machos, os níveis de ACTH e corticosterona aumentam após 24 horas de privação, mantendo-se altos em até 96 horas de privação, e logo diminuem para níveis basais após 24 horas de recuperação (Andersen et al., 2005; Machado, Tufik and Suchecki, 2008). Trabalhos prévios também mostraram aumento relativo do peso da glândula adrenal das fêmeas submetidas à privação de sono paradoxal durante a última semana de gravidez quando comparadas com as ratas que permaneceram em caixas padrão (Thomal et al., 2010); mas, os nossos resultados mostram uma tendência ao aumento no peso relativo das glândulas adrenais que não atinge significância no mesmo sentido. No entanto, o peso da adrenal relativo das ratas no 20º dia gestacional privadas de sono paradoxal não é diferente do peso relativo das glândulas adrenais das ratas que foram submetidas a um ambiente semelhante ao da privação de sono (Controle Plataforma) e que não sofreram privação de sono. Por tanto, o peso relativo da adrenal parece refletir mais uma alteração do ambiente que da privação de sono.

As medidas dos hormônios plasmáticos e a adrenal foram realizadas cinco dias após o início da privação de sono, é possível que as alterações destas variáveis tenham ocorrido nos primeiros dias de privação de sono. No entanto, com os resultados deste trabalho, nós não podemos afirmar que a privação de sono paradoxal foi um estímulo estressante para as fêmeas; pelo menos analisando a corticosterona e o peso da adrenal. Nós não analisamos o Sistema Nervoso Simpático (SNS), mas é possível que a privação de sono ou a mudança de ambiente tenha aumentado a atividade do SNS, o qual poderia estar relacionado com as alterações do peso corporal.

No pós-parto, as concentrações de corticosterona e o peso relativo das glândulas adrenais também se mostram sem alterações para o grupo privados de sono comparado como o Controle Caixa, mas comparado com o grupo Controle Plataforma, se encontra significativamente incrementada. Quando comparamos o peso relativo das adrenais no 20º dia gestacional e no 7º dia pós-parto, temos que os pesos se mantêm sem mudanças significativas para o grupo privado de sono e Controle Caixa, mas não para o grupo Controle Plataforma. Os animais deste grupo têm uma tendência a aumentar a adrenal quando estão expostos a um

ambiente novo e quando voltam a um ambiente habitual o peso relativo das adrenais diminuem. Mas estas mudanças não foram observadas para a corticosterona.

Por outro lado, durante a gravidez a corticosterona periférica se mantém sem alteração em resposta a estímulos estressores, indicando uma forte inibição no hipocampo e na hipófise para regular a liberação de ACTH e conseqüentemente de corticosterona (Neumann et al., 1998; Douglas et al., 2003; Brunton et al., 2008; Russel et al., 2008; Brunton and Russell, 2008; Brunton, 2010; Brunton and Russell, 2011), o qual é biologicamente importante para os fetos (Welberg and Seckl, 2001). Assim, os nossos resultados estariam refletindo estas adaptações fisiológicas próprias da gravidez.

Estudos em ratos machos tem mostrado que a injeção de prolactina externa no sistema circulatório aumenta a duração de sono paradoxal (Rachida, Valaty and Jouvét, 1993; Shi-Qing Zhang et al., 1999). Assim, roedores que são geneticamente deficientes de prolactina tem menos sono paradoxal espontâneo e a injeção de prolactina exógena o aumenta (Óbal et al., 2005). Em estudos com ratos machos, a privação de sono paradoxal com métodos de plataformas, incrementa os níveis plasmáticos de prolactina após 24 horas de privação de sono (Andersen et al., 2005; Machado, Tufik and Suchecki, 2008). Em quanto que em estudo de privação de sono total, os níveis plasmáticos de prolactina se encontram profundamente diminuídos (Everson and Crowley, 2003). O qual é interessante, porque mostra que o incremento da prolactina está fortemente relacionado como o sono paradoxal (REM). Assim, a relação entre o aumento do sono paradoxal e a prolactina seria mediada pela ativação das vias colinérgicas no tronco encefálico. A prolactina estimula a piruvato desidrogenase nos neurônios colinérgicos quando o sono paradoxal se produz, incrementando assim a quantidade liberada de acetilcolina, facilitando um maior tempo de sono paradoxal (Óbal et al., 2005). No nosso estudo observamos um significativo incremento da prolactina plasmática nos animais que foram privados de sono, o qual estaria mostrando uma resposta homeostática devido à falta de sono paradoxal.

Por outro lado, a secreção de prolactina em roedores durante o final da gravidez é fortemente inibida na hipófise anterior pelos neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos, embora os níveis circulantes de prolactina encontram-se elevados devido à contribuição dos lactogênos placentários (Andrews et al., 2001; Andrews and Gratan, 2002, Yang et al., 2002). Assim, a prolactina que observamos no nosso estudo provavelmente tem uma fonte periférica, já que a privação de sono em roedores machos leva a um aumento de dopamina no hipotálamo (Asikainen, et al., 1995), indicando uma forte atividade dos neurônios dopaminérgicos nesta

região, o que conseqüentemente exercem uma inibição maior para a liberação de prolactina dos lactotrofos da hipófise.

Sabe-se que a concentração elevada de prolactina materna durante a gravidez tem efeitos deletérios no desenvolvimento dos fetos. Assim, a administração de prolactina exógena periférica no final da gravidez em ratos afeta o desenvolvimento dos timocitos fetais, levando a um incremento do apoptose destas células (Yang et al., 2002). No nosso estudo não foram avaliados o desenvolvimento dos órgãos viscerais, porém, não descartamos que o incremento de prolactina observada nas mães no 20º gestacional tenha causado efeitos deletérios nos órgãos viscerais dos fetos. Pois, em modelos de privação de sono paradoxal durante a última semana de gravidez já se tem mostrado diminuição do peso do rim e redução do número de glomérulos nos filhotes no período pós-natal (Thomal et al., 2010).

A ocitocina plasmática em ratos aumenta em resposta a diferentes estímulos estressores, tanto em ratos machos (Gibbs, 1986; Wotjak et al., 1996; Nishioka et al., 1998) como em fêmeas virgens (Carter and Lightman, 1987), e este aumento está correlacionado ao aumento da ocitocina no PVN do hipotálamo (Hisano et al., 1992; Landgraf, 1995; Onaka, 2004). A estimulação de neurônios ocitocinérgicos por estressores em ratas envolve projeções noradrenérgicas a partir do tronco encefálico (Burbach et al., 2006), indicando um efeito da ativação do SNS mais do que do eixo HPA. Por outro lado, seis horas de privação de sono paradoxal em ratos machos não afeta os níveis de mRNA de ocitocina no PVN e no SON do hipotálamo (Fujihara et al., 2003), o qual indica que a falta de sono paradoxal não incrementa a liberação de ocitocina periférica, ao menos para seis horas de privação de sono, pois não se sabe a resposta da ocitocina para tempos prolongados de privação de sono paradoxal, como é o caso de nosso estudo. Contudo, os elevados níveis de ocitocina observado nos animais privados de sono paradoxal de nosso estudo estariam refletindo tanto os efeitos da falta de sono quanto os efeitos do ambiente de privação, pois o grupo Controle Plataforma mostrou um ligeiro aumento das concentrações de ocitocina plasmática, embora não significativo em comparação com o grupo Controle Caixa. Durante a última semana de gravidez a fonte de liberação hipotalâmica de ocitocina materna se encontra reduzida até o momento do parto (Morishige, Pepe and Rothchild, 1973; Ota et al., 1974; Garland et al., 1986; Neumann et al., 1998a; Andrews et al., 2001; Burbach et al., 2006). Assim, o desequilíbrio destes hormônios, tanto pela falta de sono propriamente, assim como pelo ambiente de privação, desencadearam efeitos deletérios no desenvolvimento e o sucesso da gravidez, assim como os efeitos sobre a prole, que nos seguintes pontos se discute.

6.3 Desenvolvimento e sucesso da gravidez

O estresse crônico durante a gravidez pode provocar abortos bem como reduzir o número das ninhadas em uma variedade de espécies de mamíferos (Euker and Riegle, 1973; Lordi et al., 1997; Mastorakos and Ilias, 2003). Foi mostrado que a privação de sono na última semana de gravidez é capaz de alterar o desenvolvimento e sucesso da gravidez e o desenvolvimento dos fetos. Após dois dias de privação de sono, foram observados dois abortos em um total de quatorze fêmeas prenhas no 16º dia de gravidez no grupo privado de sono. A duração da gravidez foi em semelhante para os três grupos, entre os 21º e 22º dia, embora duas ratas dos grupos privado de sono e Controle Plataforma tenham iniciado o trabalho de parto no 23º dia da gravidez, com subsequentes consequências para os fetos. A média de fetos vivos no 20º dia de gravidez foi menor no grupo privados de sono em comparação com o grupo Controle Caixa, mas não em comparação com o grupo Controle Plataforma, o que indica que fatores de estresse relacionados ao ambiente de privação de sono também influenciou no desenvolvimento da gravidez deste grupo, mas sem gravidade. Estudos prévios de estresse pré-natal durante a última semana de gravidez também apresentam resultados semelhantes para os parâmetros mencionados (Schulz et al., 2011), porém outros estudos relatam diminuição de peso dos filhotes de ratas sob estresse agudo no 21º dia da gravidez, efeito este que desaparece na idade adulta (Lui et al., 2011). Não se sabe se, no momento do nascimento, o peso dos filhotes de mães privadas de sono no nosso estudo foi diferente dos grupos controle. Estes parâmetros não foram medidos para não interferir com o início da relação mãe-filhote que se observou no pós-parto; os filhotes foram, apenas, manipulados para padronizar a quantidade da ninhada. Contudo, com os dados do peso médio dos filhotes no 20º dia do período pré-natal e no 7º dia pós-parto, pode-se deduzir que o peso dos filhotes foi minimamente afetado pela privação de sono.

Durante o parto, também foram observadas anormalidades nos recém-nascidos no grupo privado de sono e no grupo Controle Plataforma. No grupo privado de sono, observou-se o nascimento de uma ninhada com natimortos e uma cria viva muito pequena, que horas depois foi devorada pela mãe devorou. O mesmo foi observado com outra rata do mesmo grupo, tendo duas crias mortas e uma viva no ninho. Estas mães foram eutanasiadas e, após histerectomia, não foram achadas mais crias, provavelmente por as mães terem comido as suas crias após o nascimento. No grupo Controle Plataforma, observou-se que uma rata pariu duas crias vivas e uma morta, e, após a histerectomia, foram encontradas uma cria morta e uma viva no ovário esquerdo. Outra rata do mesmo grupo pariu 10 crias mortas, e, no ovário, não foi encontrada

nenhuma outra cria. Estas complicações não foram observadas no grupo Controle Caixa. Nossos dados corroboram aqueles apresentados para modelos de estresse pré-natal durante a última semana de gravidez sobre o desenvolvimento e o sucesso da gravidez (Euker and Riegle, 1973), que já ficam evidentes no 20º dia de gestação.

As ratas privadas de sono na última semana da gravidez têm menor número de fetos em comparação com o grupo Controle Caixa, mas a proporção de machos e fêmeas é semelhante nos três grupos, e o peso corporal não é afetado, mas o comprimento dos fetos fêmeas do grupo privado de sono é ligeiramente maior do que os controles. Assim, os resultados obtidos, mostram que a privação de sono e estressores associados ao protocolo têm um forte impacto no desenvolvimento e sucesso da gravidez.

6.4 Desenvolvimento do SNC dos fetos

A privação de sono durante a gravidez em ratos também afeta o desenvolvimento emocional dos filhotes no período pós-natal inicial (Gulia et al., 2014) e, na idade adulta, os aspectos emocionais (Sucheki and Palermo Neto, 1991; Alkadhi et al., 2013), processos reprodutivos (Bosch et al., 2007; Alvarenga et al., 2013) e nos processos cognitivos dependentes do hipocampo (Schulz et al., 2011).

Os dados deste estudo mostram um incremento significativo das concentrações de BDNF no hipocampo dos fetos de mães submetidas à privação de sono no 20º dia da gestação. Dados semelhantes são verificados em ratas grávidas expostas a estressores na segunda semana (Almeida et al. 2014) e na última semana da gravidez (Fujioka et al., 2003; Neeley et al., 2011), e a elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias (Gilmore et al., 2003; Gilmore et al., 2005). Sabe-se que o BDNF é uma neurotina importante do SNC, que participa na formação de conexões sinápticas, desenvolvimento e maturação dos circuitos neurais no SNC onde a neurogênese já ocorreu (Maisonpierre et al. 1990; Cohen-Cory et al., 2010), sendo importante para a formação das sinapses e para a plasticidade sináptica nestes circuitos (Vouimba et al., 2004; Cohen-Cory et al., 2010).

No cerebelo e córtex fetal dos ratos não foram encontradas alterações nas concentrações de BDNF nos grupos, possivelmente porque, nestas estruturas, o período de neurogênese inicia-se na segunda semana de gestação, enquanto que, no hipocampo, a neurogênese inicia-se na terceira semana da gestação (Rice and Baron Jr, 2000). Assim, o hipocampo, nesse período, foi mais vulnerável aos efeitos decorrentes da privação de sono, momento em que a neurogênese desta estrutura estava começando e quando o papel do BDNF

é crucial para estabelecer, fortalecer e manter a sinaptogenese que se inicia. Entretanto, não se sabe se os efeitos encontrados no hipocampo são manifestados na idade pós-natal como foram observados em modelos de estresse pré-natal (Gilmore et al., 2005; Neely et al., 2011; Chung Lui et al., 2011); bem como não se sabe se o cérebro e o cerebelo podem ter sido alterados em outras fases, alterações estas decorrentes da privação de sono na gestação que se poderiam manifestar- na idade pós-natal

A privação de sono paradoxal materno na última semana de gravidez, não alterou as concentrações de ROS total em córtex, cerebelo e hipocampo fetal. Esperávamos que a privação de sono paradoxal materno induzisse estresse oxidativo no SNC dos fetos, e fosse expresso no incremento das concentrações de ROS no córtex, cerebelo e hipocampo por incremento de glicocorticoides maternos, pois se sabe que o ROS compromete a utilização de glicose e altera a atividade excitatória no cérebro fetal, como o glutamato. Assim, o aumento da estimulação excitatória pós-sinápticos compromete à respiração mitocondrial e a regulação de cálcio intracelular dos neurônios, levando à produção de ROS e o dano celular por sobreprodução de oxidantes (Zhu et al., 2004). Porém, neste estudo não foi observado incremento da corticosterona materna após a privação de sono paradoxal, como já foi discutido acima, o qual é consistente com as concentrações de ROS total observada nas estruturas encefálicas fetais.

Por outro lado, o incremento significativo de BDNF no hipocampo dos fetos de mães privadas de sono paradoxal, indica que esta estrutura foi mais vulnerável que o córtex e cerebelo aos efeitos decorrentes da privação de sono. Assim, esperava-se que o hipocampo mostrasse alterações nas concentrações de ROS total, pois se conhece que o incremento de BDNF estimula o incremento das proteínas antioxidantes e diminui o ROS em neurônios em desenvolvimento em resposta ao estresse oxidativo (Boyadjieva and Sarkar, 2013). Contudo, o aumento do BDNF observado no hipocampo, provavelmente signifique uma resposta a estresse oxidativo nesta estrutura em desenvolvimento. Nós não medimos marcadores antioxidantes nas estruturas encefálicas fetais, estas sem dúvida nos dariam uma melhor perspectiva sobre este ponto.

6.5 Eixo HPA e hormônios das mães no pós-parto

A privação de sono durante a última semana de gravidez não alterou a funcionalidade do eixo HPA das mães no pós-parto, isto a partir de nossas observações das concentrações de corticosterona plasmática e o peso relativo das glândulas adrenais. Assim, embora se observe

um ligeiro aumento nas concentrações de corticosterona no pós-parto com relação aos níveis basais na gravidez, este incremento é observado nos três grupos, o que seria próprio da funcionalidade do eixo observada durante a última semana de gravidez (Atkinson and Waddell, 1995; Shuaike et al., 2005; Brunton, Russell and Douglas, 2008), os quais persistem também no pós-parto, permitindo uma resposta hiporresponsiva do eixo HPA a diferentes tipos de estressores (Walker et al., 1992; Windle et al., 1997; Neumann et al., 1998; Douglas et al., 2003; Brunton et al., 2008; Russel et al., 2008; Brunton, 2010; Brunton and Russell, 2011).

As concentrações de progesterona e ocitocina não foram alteradas pela privação de sono paradoxal durante a gravidez, ficando estáveis durante o pós-parto, sendo importantes para a regulação do comportamento materno (Nagasawa et al., 2012). Os efeitos da privação de sono paradoxal e estressores associados durante a gravidez não impediram a organização hormonal chave para a lactação e o comportamento materno no pós-parto, podendo indicar que as adaptações do eixo HPA e outros sistemas hormonais no pós-parto foram satisfatórios frente às demandas metabólicas e comportamentais deste período.

6.6 Efeitos sobre o comportamento materno

A frequência do cuidado materno total durante o pós-parto não foi afetada pela privação de sono paradoxal durante a gravidez. Para os três grupos de estudo, todos os parâmetros do comportamento materno dirigido aos filhotes diminuem progressivamente à medida que o pós-parto avança, principalmente no período noturno de registro; enquanto que outros parâmetros comportamentais maternos não diretamente dirigidos aos filhotes aumentam (frequência de comer/beber e de fora do ninho), o que mostra as variações naturais do comportamento materno neste período pós-parto (Champagne et al., 2003). A manutenção eficiente do comportamento materno se deve a uma estreita interação mãe-filhote; em primeiro lugar, a capacidade de resposta fisiológica das mães aos estímulos das crias, e, em segundo, a capacidade das crias de estimular as mães e de as crias responderem aos estímulos delas (Brunton and Russel, 2008). A adequada resposta fisiológica das mães dependeria de fatores que elicitam condutas dirigidas às crias, e a si próprias. (Numan, Fleming and Levy, 2006). Esta interação orquestrada, sincrônica é que permite uma eficiente relação mãe-filhote no caso das ratas.

Consideramos que a privação de sono paradoxal e seus efeitos do ambiente da privação de sono na última semana de gravidez não foram prolongados nas mães, pois, enquanto a privação do sono acabou, os sistemas fisiológicos alterados foram restaurados pela homeostase do sono e deram conta das demandas metabólicas e comportamentais no pós-parto. Em

modelos de estresse por restrição, no final da gravidez em ratos, a frequência da postura de amamentação com dorso arqueado e recuperação de crias são reduzidas (Patin et al., 2002; Smith et al., 2004, Baker et al., 2008), assim como a frequência de lambida aos filhotes, e, portanto, aumentando a frequência de mães fora do ninho (de Souza et al., 2012). Por outro lado, a privação de sono durante toda a gravidez não afeta os parâmetros comportamentais direcionados aos filhotes, mas, sim, diminui os comportamentos defensivos, levando à inibição do comportamento de selfgrooming das mães (Pires et al., 2012).

A observação dos parâmetros comportamentais maternos no pós-parto tem sido realizada sem perturbações ao ambiente materno; assim, pode-se dizer que, em condições invariáveis e sem estressores, estas mães conseguem desempenhar de modo eficiente o cuidado da prole. Contudo, não se sabe a resposta destas mães quando são expostas a ambientes mais desfavoráveis ou estressantes. Seria de significativa importância aplicativa conhecer estas respostas adaptativas das mães privadas de sono paradoxal durante a gravidez a um novo estressor no pós-parto. As comunicações epidemiológicas de mulheres grávidas expostas a períodos de restrição de sono têm um alto risco de desenvolver transtornos de ânimo durante o período pós-parto (Swain et al., 1997; Ross, Murray, Steiner, 2005; Dørheim et al., 2009; Chang et al., 2010; Bei et al., 2010) o que pode prejudicar a relação mãe-filho. Porém, deve-se de ter em conta que as condições ambientais das mulheres não são, por completo, estáveis, estando sempre expostas a desafios contínuos, e os transtornos observados nestas mulheres no pós-parto são desenvolvidos nestes contextos. Entretanto, considera-se que, se o ambiente destes animais se tornassem variáveis no pós-parto, possivelmente os mecanismos adaptativos desajustados por alterações acontecidas na gravidez seriam evidenciados.

Por outro lado, é interessante salientar os dados a respeito do grupo Controle Plataforma. Alguns parâmetros do comportamento, como aumento significativo na postura de amamentação com lambida aos filhotes, encontram-se significativamente aumentados em relação aos grupos privados de sono e Controle Caixa, assim como a frequência de cuidado materno total no 1º dia pós-parto no período noturno; no entanto, a frequência de selfgrooming encontra-se significativamente diminuída em relação ao grupo Controle Caixa. Como foi discutido acima, verifica-se que estas respostas melhoradas em alguns dos parâmetros comportamentais maternos evidenciam os efeitos de outras variáveis não contempladas neste estudo, inerentes ao ambiente ao qual foi submetido ao grupo Controle Plataforma.

O ambiente onde foram alojadas as ratas do grupo Controle Plataforma, durante o final da gravidez apresentou todas as condições materiais para ser considerado um ambiente

enriquecido (espaço amplo, rodeado de elementos que estimulam a exploração e maior atividade locomotora dos animais) (Ver Cymerblit-Sabba et al., 2013). É demonstrado na literatura, que as ratas expostas a um ambiente enriquecido durante a gravidez não apresentam mudanças consistentes no comportamento materno, mostrando-se menos ativas durante o período pós-parto inicial, passam mais tempo desenvolvendo comportamentos mais maternos em relação aos filhotes em vários períodos, mas, passam menos tempo desenvolvendo comportamentos para regulação das emoções (selfgrooming) (Rosenfeld and Weller, 2012). Assim, consideramos que o grupo Controle plataforma teria sido influenciado favoravelmente por fatores ambientais durante a gravidez, o que se reflete no melhoramento do desempenho de alguns parâmetros comportamentais maternos e do controle da ansiedade próprios do pós-parto.

6.7 Efeitos sobre o desenvolvimento cognitivo inicial dos filhotes

O desempenho dos filhotes no teste de preferência olfatória no 7º dia pós-natal não foi alterado pela privação de sono das mães, indicando que os filhotes aprenderam a associar o odor da mãe aos estímulos táteis proporcionados pelas mães (León, 1992), o que é reforçado por um ótimo desempenho do comportamento materno que já foi discutido acima.

O teste de preferência olfatória avalia nos filhotes o reconhecimento do odor de suas mães. Nos primeiros dias após o nascimento, estabelece-se uma associação inicial ao odor da mãe e ao ninho com o contato físico das mães. Neste período inicial, os filhotes apresentam uma alta capacidade de aprender a associar odores; é esta capacidade que lhes permite estabelecer uma forte conexão com a mãe, reconhecê-la e procurá-la pelo seu odor (León, 1992, Lander and Sullivan, 2012). Neste importante aprendizado dos filhotes, é crucial o desenvolvimento oportuno do sistema olfatório deles e também uma oportuna estimulação materna. Em condições em que o comportamento materno e bulbo olfatório dos fetos ficam alterados, em decorrência de estresse pré-natal, o desempenho no teste de preferência olfatória também é alterado, principalmente o das fêmeas (de Souza et al., 2012).

Não foram avaliados os parâmetros neuroquímicos e morfológicos do desenvolvimento do bulbo olfatório dos filhotes, mas, com os dados do desempenho da sua função de reconhecimento do odor das mães, pode-se indicar que não ocorreram alterações neste sistema. Os filhotes de mães privadas de sono paradoxal durante a gravidez apresentam um ótimo desempenho no teste de preferência olfatória, indicando que provavelmente este sistema não foi susceptível à alteração pela falta de sono materno durante o desenvolvimento pré-natal. Embora

neste período o hipocampo tenha sido alterado, não foi possível avaliar, no período pós-natal, a função hipocampal.

7 CONCLUSÕES

Utilizando ratas prenhas, conclui-se que a privação de sono paradoxal e a exposição ao ambiente de privação durante a última semana de gravidez provocam redução do ganho peso corporal durante a gestação, no entanto não há alterações de parâmetros metabólicos relacionados ao peso de gordura visceral, glicogênio hepático e muscular, assim como colesterol hepático. Além disso, a privação de sono provocou aumento das concentrações plasmáticas de prolactina e ocitocina maternos nas fêmeas gestantes no 20º dia gestacional, imediatamente após o último dia de privação de sono. No entanto, neste mesmo dia os níveis de corticosterona e o peso relativo das glândulas adrenais não são diferentes entre os grupos. A privação de sono também reduziu negativamente o sucesso da gravidez, com ocorrência de abortos e fetos natimortos. Contudo, o peso corporal das fêmeas submetidas à privação de sono não é diferente dos grupos controles no 7º dia pós-parto. Além disso, a privação de sono não afetou o comportamento maternal.

Por outro lado, a privação de sono paradoxal das mães no período gestacional não afeta o peso corporal dos fetos no 20º dia gestacional, nem os parâmetros de estresse oxidativo em córtex, hipocampo e cerebelo. No entanto, neste mesmo dia, a concentração de BDNF no hipocampo destes fetos, cujas mães foram submetidas à privação de sono paradoxal, é maior. Quando analisados os filhotes no 7º dia pós-natal, não houve alterações de peso corporal nem comprometimento da preferência olfatória pelo odor da mãe.

Os efeitos da privação de sono paradoxal em fêmeas gestantes não são tão pronunciados como aqueles descritos para machos na literatura. Podemos inferir que as fêmeas gestantes e lactantes possuem mecanismos compensatórios à privação de sono paradoxal. Embora, os efeitos analisados da privação de sono paradoxal sobre as fêmeas gestantes não terem induzido alterações muito pronunciadas sobre as variáveis analisadas, aquela intervenção comprometeu a gestação com aumento de abortos e filhotes natimortos. Sugerimos que o aumento expressivo das concentrações plasmáticas da ocitona seja uma das causas para esses efeitos. Por outro lado, as variáveis ambientais inerentes ao protocolo de privação de sono paradoxal mediante a técnica de plataformas múltiplas, são melhor controlados pelo controle plataforma que foi usando neste estudo, que pelo controle caixa, o qual é mais usado na literatura para o estudo dos efeitos da privação de sono paradoxal.

8 PERSPECTIVAS

- Para conhecer tanto os mecanismos fisiológicos que levam a alterações metabólicas nos primeiros dois dias da privação de sono, seria importante estudar o sistema do estresse (eixo HPA e SNS), assim como a dinâmica dos sistemas de prolactina e ocitocina, após cada sessão de privação de sono, e após o período de recuperação de sono, isto para conhecer o efeito da homeostase do sono nestas variáveis.
- Para conhecer os mecanismos pelos quais a privação de sono materno na gravidez afeta o sistema nervoso dos fetos, especialmente o hipocampo, seria interessante considerar marcadores de resposta inflamatórios maternos.
- Na mesma linha, para conhecer os mecanismos que levam a uma resposta incrementada do BDNF no hipocampo fetal, seria importante considerar marcadores antioxidantes no sistema nervoso central e a expressão de receptores centrais fetais para os marcadores periféricos maternos decorrentes da privação de sono. Estudar estes parâmetros a partir do primeiro dia da privação de sono permitiria conhecer em que momento do desenvolvimento fetal estas estruturas cerebrais são mais vulneráveis e como se evidenciam estes mecanismos.
- Após completar os tres primeiros pontos, seria pertinente estudar o desenvolvimento da prole até a idade adulta para conhecer em que momentos da vida e sob que condições ambientais, os efeitos fisiológicos e cognitivos decorrentes da privação de sono são manifestos.
- Para conhecer os efeitos da privação de sono na mãe no pós-parto, seria pertinente uma abordagem do comportamento materno e não materno considerando um maior número de repertórios condutais, tanto em condições ambientais invariantes como variantes. Assim, se poderia contar com uma análise mais fina do desempenho materno neste período.

9 REFERENCIAS

- Aldabal, L., and A. S. Bahammam. "Metabolic, Endocrine, and Immune Consequences of Sleep Deprivation." *Open Respir Med J* 5, (2011): 31-43.
- Alkadhi, K., M. Zagaar, I. Alhaider, S. Salim, and A. Aleisa. "Neurobiological Consequences of Sleep Deprivation." *Curr Neuropharmacol* 11, no. 3 (2013): 231-49.
- Almeida, L. E., C. D. Roby, and B. K. Krueger. "Increased Bdnf Expression in Fetal Brain in the Valproic Acid Model of Autism." *Mol Cell Neurosci* 28, (2014): 57-62.
- Alvarenga, T. A., M. F. Aguiar, R. Mazaro-Costa, S. Tufik, and M. L. Andersen. "Effects of Sleep Deprivation During Pregnancy on the Reproductive Capability of the Offspring." *Fertil Steril* 100, no. 6 (2013): 1752-7.
- Alves, D. A., L. B. Carvalho, J. F. Morais, and G. F. Prado. "Restless Legs Syndrome During Pregnancy in Brazilian Women." *Sleep Medicine* 11, no. 10 (2010): 1049-54.
- Andersen, M. L., P. J. Martins, V. D'Almeida, M. Bignotto, and S. Tufik. "Endocrinological and Catecholaminergic Alterations During Sleep Deprivation and Recovery in Male Rats." *Journal of Sleep Research* 14, no. 1 (2005): 83-90.
- Andersen, M. L., P. J. Martins, V. D'Almeida, R. F. Santos, M. Bignotto, and S. Tufik. "Effects of Paradoxical Sleep Deprivation on Blood Parameters Associated with Cardiovascular Risk in Aged Rats." *Exp Gerontol* 39, no. 5 (2004): 817-24.
- Andrews, Z. B., and D. R. Grattan. "Opioid Control of Prolactin Secretion in Late Pregnant Rats Is Mediated by Tuberoinfundibular Dopamine Neurons." *Neurosci Lett* 328, no. 1 (2002): 60-4.
- Andrews, Z. B., I. C. Kokay, and D. R. Grattan. "Dissociation of Prolactin Secretion from Tuberoinfundibular Dopamine Activity in Late Pregnant Rats." *Endocrinology* 142, no. 6 (2001): 2719-24.
- Asikainen, M. "Sleep Deprivation Increases Brain Serotonin Turnover in the Djungarian Hamster." *Neuroscience Letters* 198 (1995): 21-24.
- Atkinson, H. C., and B. J. Waddell. "The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Rat Pregnancy and Lactation: Circadian Variation and Interrelationship of Plasma Adrenocorticotropin and Corticosterone." *Endocrinology* 136, no. 2 (1995): 512-20.
- Attarian, H., and C. Schuman. "Excessive Daytime Sleepiness among Practicing Physicians." *J Clin Sleep Med* 3, no. 1 (2007): 87.
- Bagot, R. C., F. N. van Hasselt, D. L. Champagne, M. J. Meaney, H. J. Krugers, and M. Joels. "Maternal Care Determines Rapid Effects of Stress Mediators on Synaptic Plasticity in Adult Rat Hippocampal Dentate Gyrus." *Neurobiol Learn Mem* 92, no. 3 (2009): 292-300.
- Baker, S., M. Chebli, S. Rees, N. Lemarec, R. Godbout, and C. Bielajew. "Effects of Gestational Stress: 1. Evaluation of Maternal and Juvenile Offspring Behavior." *Brain Res* 5, (2008): 98-110.
- Banks, S., and D. F. Dinges. "Behavioral and Physiological Consequences of Sleep Restriction." *J Clin Sleep Med* 3, no. 5 (2007): 519-28.
- Baquedano, E., C. Garcia-Caceres, Y. Diz-Chaves, N. Lagunas, I. Calmarza-Font, I. Azcoitia, L. M. Garcia-Segura, J. Argente, J. A. Chowen, and L. M. Frago. "Prenatal Stress Induces Long-Term Effects in Cell Turnover in the Hippocampus-Hypothalamus-Pituitary Axis in Adult Male Rats." *Plos One* 6, no. 11 (2011).
- Barf, R. P., G. Van Dijk, A. J. Scheurink, K. Hoffmann, A. Novati, H. J. Hulshof, E. Fuchs, and P. Meerlo. "Metabolic Consequences of Chronic Sleep Restriction in Rats: Changes in Body Weight Regulation and Energy Expenditure." *Physiol Behav* 107, no. 3 (2012): 322-8.
- Barros, V. G., M. Duhalde-Vega, L. Caltana, A. Brusco, and M. C. Antonelli. "Astrocyte-Neuron Vulnerability to Prenatal Stress in the Adult Rat Brain." *J Neurosci Res* 83, no. 5 (2006): 787-800.
- Baviera, A. M., N. M. Zanon, L. C. Navegantes, R. H. Migliorini, and I. C. Kettelhut. "Chemical Sympathectomy Further Increases Muscle Protein Degradation of Acutely Diabetic Rats." *Muscle Nerve* 38, no. 2 (2008): 1027-35.
- Bei, B., J. Milgrom, J. Ericksen, and J. Trinder. "Subjective Perception of Sleep, but Not Its Objective Quality, Is Associated with Immediate Postpartum Mood Disturbances in Healthy Women." *Sleep* 33, no. 4 (2010): 531-8.

- Boonstra, T. W., J. F. Stins, A. Daffertshofer, and P. J. Beek. "Effects of Sleep Deprivation on Neural Functioning: An Integrative Review." *Cell Mol Life Sci* 64, no. 7-8 (2007): 934-46.
- Bosch, Oliver J., Werner Müsch, Remco Bredewold, David A. Slattery, and Inga D. Neumann. "Prenatal Stress Increases HPA Axis Activity and Impairs Maternal Care in Lactating Female Offspring: Implications for Postpartum Mood Disorder." *Psychoneuroendocrinology* 32, no. 3 (2007): 267-278.
- Boyadjieva, N. I., and D. K. Sarkar. "Cyclic Adenosine Monophosphate and Brain-Derived Neurotrophic Factor Decreased Oxidative Stress and Apoptosis in Developing Hypothalamic Neuronal Cells: Role of Microglia." *Alcohol Clin Exp Res* 37, no. 8 (2013): 1370-9.
- Brennan, P. A., and E. B. Keverne. "Neural Mechanisms of Mammalian Olfactory Learning." *Prog Neurobiol* 51, no. 4 (1997): 457-81.
- Brock, J. W., S. M. Farooqui, K. D. Ross, S. Payne, and C. Prasad. "Stress-Related Behavior and Central Norepinephrine Concentrations in the Rem Sleep-Deprived Rat." *Physiol Behav* 55, no. 6 (1994): 997-1003.
- Brunton, P. J. "Resetting the Dynamic Range of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Stress Responses through Pregnancy." *J Neuroendocrinol* 22, no. 11 (2010): 1198-213.
- Brunton, P. J., and J. A. Russell. "Allopregnanolone and Suppressed Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Stress Responses in Late Pregnancy in the Rat." *Stress* 14, no. 1 (2011): 6-12.
- Brunton, P. J., and J. A. Russell. "Attenuated Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Responses to Immune Challenge During Pregnancy: The Neurosteroid Opioid Connection." *J Physiol* 586, no. 2 (2008): 369-75.
- Brunton, P. J., J. A. Russell, and A. J. Douglas. "Adaptive Responses of the Maternal Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis During Pregnancy and Lactation." *J Neuroendocrinol* 20, no. 6 (2008): 764-76
- Burbach, J. Peter H., Larry J. Young, and John A. Russell. "Chapter 58 - Oxytocin: Synthesis, Secretion, and Reproductive Functions." In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*, edited by Jimmy D. Neill, Tony M. Plant, Donald W. Pfaff, John R. G. Challis, David M. de Kretser, JoAnne S. Richards and Paul M. Wassarman, 3055-3128. St Louis: Academic Press, 2006.
- Carlson, K. I., H. T. Yang, W. S. Bradshaw, R. K. Conlee, and W. W. Winder. "Effect of Maternal Exercise on Fetal Liver Glycogen Late in Gestation in the Rat." *J Appl Physiol* 60, no. 4 (1985): 1254-8.
- Carskadon M, Dement W. Normal human sleep: An overview. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC, editors. *Principles and Practice of Sleep Medicine*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. pp. 13-23.
- Carter, D. A., and S. L. Lightman. "Oxytocin Responses to Stress in Lactating and Hyperprolactinaemic Rats." *Neuroendocrinology* 46, no. 6 (1987): 532-7.
- Champagne, F. A., I. C. Weaver, J. Diorio, S. Sharma, and M. J. Meaney. "Natural Variations in Maternal Care Are Associated with Estrogen Receptor Alpha Expression and Estrogen Sensitivity in the Medial Preoptic Area." *Endocrinology* 144, no. 11 (2003): 4720-4.
- Chang, J. J., G. W. Pien, S. P. Duntley, and G. A. Macones. "Sleep Deprivation During Pregnancy and Maternal and Fetal Outcomes: Is There a Relationship?" *Sleep Medicine Reviews* 14, no. 2 (2010): 107-14.
- Christie, M. A., R. W. McCarley, and R. E. Strecker. "Twenty-Four Hours, or Five Days, of Continuous Sleep Deprivation or Experimental Sleep Fragmentation Do Not Alter Thirst or Motivation for Water Reward in Rats." *Behav Brain Res* 214, no. 2 (2010): 180-6.
- Clark, C. P., and S. Golshan. "Polysomnography and Criteria for the Antidepressant Response to Sleep Deprivation." *Journal of Affective Disorders* 101, no. 1-3 (2007): 195-200.
- Cohen-Cory, S., A. H. Kidane, N. J. Shirkey, and S. Marshak. "Brain-Derived Neurotrophic Factor and the Development of Structural Neuronal Connectivity." *Dev Neurobiol* 70, no. 5 (2010): 271-88.
- Cripps, A. W., and V. J. Williams. "The Effect of Pregnancy and Lactation on Food Intake, Gastrointestinal Anatomy and the Absorptive Capacity of the Small Intestine in the Albino Rat." *Br J Nutr* 33, no. 1 (1975): 17-32.
- Cymerblit-Sabba, A., T. Lasri, M. Gruper, S. Aga-Mizrachi, S. Zubedat, and A. Avital. "Prenatal Enriched Environment Improves Emotional and Attentional Reactivity to Adulthood Stress." *Behav Brain Res* 241, (2013): 185-90.

- de Souza, M. A., R. E. Szawka, L. A. Centenaro, L. A. Diehl, and A. B. Lucion. "Prenatal Stress Produces Sex Differences in Nest Odor Preference." *Physiol Behav* 105, no. 3 (2012): 850-5.
- Dorheim, S. K., G. T. Bondevik, M. Eberhard-Gran, and B. Bjorvatn. "Sleep and Depression in Postpartum Women: A Population-Based Study." *Sleep* 32, no. 7 (2009): 847-55.
- Douglas, A. J., L. E. Johnstone, and G. Leng. "Neuroendocrine Mechanisms of Change in Food Intake During Pregnancy: A Potential Role for Brain Oxytocin." *Physiol Behav* 91, no. 4 (2007): 352-65.
- Douglas, A. J., P. J. Brunton, O. J. Bosch, J. A. Russell, and I. D. Neumann. "Neuroendocrine Responses to Stress in Mice: Hyporesponsiveness in Pregnancy and Parturition." *Endocrinology* 144, no. 12 (2003): 5268-76.
- Ekholm, E. M., O. Polo, E. R. Rauhala, and U. U. Ekblad. "Sleep Quality in Preeclampsia." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 167, no. 5 (1992): 1262-6.
- Elomaa, E. "The Cuff Pedestal: An Alternative to Flowerpots?" *Physiol Behav* 23, no. 4 (1979): 669-72.
- Euker, J. S., and G. D. Riegle. "Effects of Stress on Pregnancy in the Rat." *J Reprod Fertil* 34, no. 2 (1973): 343-6.
- Everson, C. A., and W. R. Crowley. "Reductions in Circulating Anabolic Hormones Induced by Sustained Sleep Deprivation in Rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, no. 6 (2004): 10.
- Everson, C. A., B. M. Bergmann, and A. Rechtschaffen. "Sleep Deprivation in the Rat: Iii. Total Sleep Deprivation." *Sleep* 12, no. 1 (1989): 13-21.
- Febo, M., J. Shields, C. F. Ferris, and J. A. King. "Oxytocin Modulates Unconditioned Fear Response in Lactating Dams: An Fmri Study." *Brain Res* 11, (2009): 183-93.
- Francis, D., J. Diorio, P. LaPlante, S. Weaver, J. R. Seckl, and M. J. Meaney. "The Role of Early Environmental Events in Regulating Neuroendocrine Development. Moms, Pups, Stress, and Glucocorticoid Receptors." *Ann N Y Acad Sci* 794, (1996): 136-52.
- Fujihara, Hiroaki, Ryota Serino, Yoichi Ueta, Hiroyoshi Sei, and Yusuke Morita. "Six-Hour Selective REM Sleep Deprivation Increases the Expression of the Galanin Gene in the Hypothalamus of Rats." *Molecular Brain Research* 119 (2003): 152-159.
- Fujioka, T., A. Fujioka, H. Endoh, Y. Sakata, S. Furukawa, and S. Nakamura. "Materno-Fetal Coordination of Stress-Induced Fos Expression in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus During Pregnancy." *Neuroscience* 118, no. 2 (2003): 409-15.
- Garland, H. O., J. C. Atherton, C. Baylis, M. R. Morgan, and C. M. Milne. "Hormone Profiles for Progesterone, Oestradiol, Prolactin, Plasma Renin Activity, Aldosterone and Corticosterone During Pregnancy and Pseudopregnancy in Two Strains of Rat: Correlation with Renal Studies." *J Endocrinol* 113, no. 3 (1987): 435-44.
- Gibbs, D. M. "Vasopressin and Oxytocin: Hypothalamic Modulators of the Stress Response: A Review." *Psychoneuroendocrinology* 11, no. 2 (1986): 131-9.
- Gilmore, J. H., L. F. Jarskog, and S. Vadlamudi. "Maternal Infection Regulates Bdnf and Ngf Expression in Fetal and Neonatal Brain and Maternal-Fetal Unit of the Rat." *J Neuroimmunol* 138, no. 1-2 (2003): 49-55.
- Gilmore, J. H., L. F. Jarskog, and S. Vadlamudi. "Maternal Poly I:C Exposure During Pregnancy Regulates Tnf Alpha, Bdnf, and Ngf Expression in Neonatal Brain and the Maternal-Fetal Unit of the Rat." *J Neuroimmunol* 159, no. 1-2 (2005): 106-12.
- Gregerson, Karen A. "Chapter 32 - Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion." In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*, edited by Jimmy D. Neill, Tony M. Plant, Donald W. Pfaff, John R. G. Challis, David M. de Kretser, JoAnne S. Richards and Paul M. Wassarman, 1703-1726. St Louis: Academic Press, 2006.
- Gulia, K. K., N. Patel, A. Radhakrishnan, and V. M. Kumar. "Reduction in Ultrasonic Vocalizations in Pups Born to Rapid Eye Movement Sleep Restricted Mothers in Rat Model." *Plos One* 9, no. 1 (2014): e84948.
- Guzman-Marin, R., N. Suntsova, D. R. Stewart, H. Gong, R. Szymusiak, and D. McGinty. "Sleep Deprivation Reduces Proliferation of Cells in the Dentate Gyrus of the Hippocampus in Rats." *J Physiol* 549, no. Pt 2 (2003): 563-71.
- Guzman-Marin, R., Z. Ying, N. Suntsova, M. Methippara, T. Bashir, R. Szymusiak, F. Gomez-Pinilla, and D. McGinty. "Suppression of Hippocampal Plasticity-Related Gene Expression by Sleep Deprivation in Rats." *J Physiol* 575, no. Pt 3 (2006): 807-19.

- Hairston, I. S., C. Peyron, D. P. Denning, N. F. Ruby, J. Flores, R. M. Sapolsky, H. C. Heller, and B. F. O'Hara. "Sleep Deprivation Effects on Growth Factor Expression in Neonatal Rats: A Potential Role for Bdnf in the Mediation of Delta Power." *J Neurophysiol* 91, no. 4 (2004): 1586-95.
- Hajali, V., V. Sheibani, S. Esmaeili-Mahani, and M. Shabani. "Female Rats Are More Susceptible to the Deleterious Effects of Paradoxical Sleep Deprivation on Cognitive Performance." *Behav Brain Res* 228, no. 2 (2012): 311-8.
- Hanlon, E. C., M. E. Andrzejewski, B. K. Harder, A. E. Kelley, and R. M. Benca. "The Effect of Rem Sleep Deprivation on Motivation for Food Reward." *Behav Brain Res* 163, no. 1 (2005): 58-69.
- Harmon, K. M., M. L. Greenwald, A. McFarland, T. Beckwith, and H. C. Cromwell. "The Effects of Prenatal Stress on Motivation in the Rat Pup." *Stress* 12, no. 3 (2009): 250-8.
- Harris, R. B., J. Zhou, T. Mitchell, S. Hebert, and D. H. Ryan. "Rats Fed Only During the Light Period Are Resistant to Stress-Induced Weight Loss." *Physiol Behav* 76, no. 4-5 (2002): 543-50.
- Hayashi, A., M. Nagaoka, K. Yamada, Y. Ichitani, Y. Miake, and N. Okado. "Maternal Stress Induces Synaptic Loss and Developmental Disabilities of Offspring." *Int J Dev Neurosci* 16, no. 3-4 (1998): 209-16.
- Hedman, C., T. Pohjasvaara, U. Tolonen, A. S. Suhonen-Malm, and V. V. Myllyla. "Effects of Pregnancy on Mothers' Sleep." *Sleep Medicine* 3, no. 1 (2002): 37-42.
- Hensley, J. G. "Leg Cramps and Restless Legs Syndrome During Pregnancy." *J Midwifery Womens Health* 54, no. 3 (2009): 211-8.
- Hipolide, D. C., D. Suchecki, A. Pimentel de Carvalho Pinto, E. Chiconelli Faria, S. Tufik, and J. Luz. "Paradoxical Sleep Deprivation and Sleep Recovery: Effects on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity, Energy Balance and Body Composition of Rats." *J Neuroendocrinol* 18, no. 4 (2006): 231-8.
- Hirshkowitz, M. "Normal Human Sleep: An Overview." *Medical Clinics of North America* 88, no. 3 (2004): 551.
- Hisano, S., S. Li, Y. Kagotani, and S. Daikoku. "Synaptic Associations between Oxytocin-Containing Magnocellular Neurons and Neurons Containing Corticotropin-Releasing Factor in the Rat Magnocellular Paraventricular Nucleus." *Brain Res* 576, no. 2 (1992): 311-8.
- Hofer, M. A. Sullivan, R. M. (2001). *Toward a neurobiology of attachment*. In C. A. Nelson M. Luciana (Eds.), *Handbook of developmental cognitive neuroscience* (pp. 599-616). Cambridge, MA: MIT Press.
- Hoshino, K. "Food Deprivation and Hypothermia in Desynchronized Sleep-Deprived Rats." *Braz J Med Biol Res* 29, no. 1 (1996): 41-6.
- In *Sleep Disorders and Sleep Deprivation: An Unmet Public Health Problem*, edited by H. R. Colten and B. M. Altevogt. The National Academies
- Johnston, M V. "Neurotransmitters and Vulnerability of the Developing Brain." *Brain & Development* 17, no.5 (1995): 301-6.
- Kamdar, B. B., D. M. Needham, and N. A. Collop. "Sleep Deprivation in Critical Illness: Its Role in Physical and Psychological Recovery." *J Intensive Care Med* 27, no. 2 (2012): 97-111.
- Kapoor, A., E. Dunn, A. Kostaki, M. H. Andrews, and S. G. Matthews. "Fetal Programming of Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Function: Prenatal Stress and Glucocorticoids." *J Physiol* 572, no. Pt 1 (2006): 31-44.
- Kapsimalis, Fotis, and Meir Kryger. "Obstructive Sleep Apnea in Pregnancy." *Sleep Medicine Clinics* 2, no. 4 (2007): 603-613.
- Khadrawy, Y. A., N. A. Nour, and H. S. A. Ezz. "Effect of Oxidative Stress Induced by Paradoxical Sleep Deprivation on the Activities of Na⁺, K⁺-Atpase and Acetylcholinesterase in the Cortex and Hippocampus of Rat." *Translational Research* 157, no. 2 (2011): 100-107.
- Knutson, K. L., K. Spiegel, P. Penev, and E. Van Cauter. "The Metabolic Consequences of Sleep Deprivation." *Sleep Medicine Reviews* 11, no. 3 (2007): 163-178.
- Koban, M., and K. L. Swinson. "Chronic Rem-Sleep Deprivation of Rats Elevates Metabolic Rate and Increases Ucp1 Gene Expression in Brown Adipose Tissue." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, no. 1 (2005): E68-74.
- Koban, M., L. V. Sita, W. W. Le, and G. E. Hoffman. "Sleep Deprivation of Rats: The Hyperphagic Response Is Real." *Sleep* 31, no. 7 (2008): 927-33.

- Krueger, J. M., D. M. Rector, and L. Churchill. "Sleep and Cytokines." *Sleep Med Clin* 2, no. 2 (2007): 161-169.
- Kushida, C. A., B. M. Bergmann, and A. Rechtschaffen. "Sleep Deprivation in the Rat: Iv. Paradoxical Sleep Deprivation." *Sleep* 12, no. 1 (1989): 22-30.
- Lancel, M., S. Kromer, and I. D. Neumann. "Intracerebral Oxytocin Modulates Sleep-Wake Behaviour in Male Rats." *Regul Pept* 114, no. 2-3 (2003): 145-52.
- Landers, M. S., and R. M. Sullivan. "The Development and Neurobiology of Infant Attachment and Fear." *Dev Neurosci* 34, no. 2-3 (2012): 101-14.
- Landgraf, R. "Mortyn Jones Memorial Lecture. Intracerebrally Released Vasopressin and Oxytocin: Measurement, Mechanisms and Behavioural Consequences." *J Neuroendocrinol* 7, no. 4 (1995): 243-53.
- Lee, H. J., A. H. Macbeth, J. H. Pagani, and W. S. Young, 3rd. "Oxytocin: The Great Facilitator of Life." *Prog Neurobiol* 88, no. 2 (2009): 127-51.
- Lee, K. A. "Alterations in Sleep During Pregnancy and Postpartum: A Review of 30 Years of Research." *Sleep Medicine Reviews* 2, no. 4 (1998): 231-42.
- Lee, K. A., M. E. Zaffke, and G. McEnany. "Parity and Sleep Patterns During and after Pregnancy." *Obstet Gynecol* 95, no. 1 (2000): 14-8.
- Lee, K. A., M. E. Zaffke, and K. Baratte-Beebe. "Restless Legs Syndrome and Sleep Disturbance During Pregnancy: The Role of Folate and Iron." *J Womens Health Gend Based Med* 10, no. 4 (2001): 335-41.
- Lemaire, V., M. Koehl, M. Le Moal, and D. N. Abrous. "Prenatal Stress Produces Learning Deficits Associated with an Inhibition of Neurogenesis in the Hippocampus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, no. 20 (2000): 11032-7.
- Leon, M. "Neuroethology of Olfactory Preference Development." *J Neurobiol* 23, no. 10 (1992): 1557-73.
- Lesku, J. A., T. C. Roth, 2nd, N. C. Rattenborg, C. J. Amlaner, and S. L. Lima. "History and Future of Comparative Analyses in Sleep Research." *Neurosci Biobehav Rev* 33, no. 7 (2009): 1024-36
- Lopes, E. A., L. B. Carvalho, P. B. Seguro, R. Mattar, A. B. Silva, L. B. Prado, and G. F. Prado. "Sleep Disorders in Pregnancy." *Arq Neuropsiquiatr* 62, no. 2A (2004): 217-21.
- Lordi, B., P. Protais, D. Mellier, and J. Caston. "Acute Stress in Pregnant Rats: Effects on Growth Rate, Learning, and Memory Capabilities of the Offspring." *Physiol Behav* 62, no. 5 (1997): 1087-92.
- Lui, C. C., J. Y. Wang, Y. L. Tain, Y. C. Chen, K. A. Chang, M. C. Lai, and L. T. Huang. "Prenatal Stress in Rat Causes Long-Term Spatial Memory Deficit and Hippocampus Mri Abnormality: Differential Effects of Postweaning Enriched Environment." *Neurochem Int* 58, no. 3 (2011): 434-41.
- Machado, R. B., D. Suchecki, and S. Tufik. "Sleep Homeostasis in Rats Assessed by a Long-Term Intermittent Paradoxical Sleep Deprivation Protocol." *Behav Brain Res* 160, no. 2 (2005): 356-64.
- Machado, R. B., S. Tufik, and D. Suchecki. "Chronic stress during paradoxical sleep deprivation increases paradoxical sleep rebound: association with prolactin plasma levels and brain serotonin content". *Psychoneuroendocrinology* 2008 Oct;33(9):1211-24.
- Maisonpierre, P. C., L. Belluscio, B. Friedman, R. F. Alderson, S. J. Wiegand, M. E. Furth, R. M. Lindsay, and G. D. Yancopoulos. "Nt-3, Bdnf, and Ngf in the Developing Rat Nervous System: Parallel as Well as Reciprocal Patterns of Expression." *Neuron* 5, no. 4 (1990): 501-9.
- Markham, J. A., A. R. Taylor, S. B. Taylor, D. B. Bell, and J. I. Koenig. "Characterization of the Cognitive Impairments Induced by Prenatal Exposure to Stress in the Rat." *Front Behav Neurosci* 4, no. 173 (2010).
- Markwald, R. R., E. L. Melanson, M. R. Smith, J. Higgins, L. Perreault, R. H. Eckel, and K. P. Wright. "Impact of Insufficient Sleep on Total Daily Energy Expenditure, Food Intake, and Weight Gain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, no. 14 (2013): 5695-5700.
- Martins, P. J., J. N. Nobrega, S. Tufik, and V. D'Almeida. "Sleep Deprivation-Induced Gnawing-Relationship to Changes in Feeding Behavior in Rats." *Physiol Behav* 93, no. 1-2 (2008): 229-34.
- Martins, P. J., M. S. Marques, S. Tufik, and V. D'Almeida. "Orexin Activation Precedes Increased Npy Expression, Hyperphagia, and Metabolic Changes in Response to Sleep Deprivation." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, no. 3 (2010): E726-34.

- Martins, P. J., V. D'Almeida, J. N. Nobrega, and S. Tufik. "A Reassessment of the Hyperphagia/Weight-Loss Paradox During Sleep Deprivation." *Sleep* 29, no. 9 (2006): 1233-8.
- Mastorakos, G., and I. Ilias. "Maternal and Fetal Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axes During Pregnancy and Postpartum." *Ann N Y Acad Sci* 997, (2003): 136-49.
- McEwen, B. S. "Sleep Deprivation as a Neurobiologic and Physiologic Stressor: Allostasis and Allostatic Load." *Metabolism* 55, no. 10 Suppl 2 (2006): S20-3.
- Medeiros, R., C. Lenneberg-Hoshino, K. Hoshino, and S. Tufik. "Neuroethologic Differences in Sleep Deprivation Induced by the Single- and Multiple-Platform Methods." *Braz J Med Biol Res* 31, no. 5 (1998): 675-80.
- Micheli, K., I. Komninos, E. Bagkeris, T. Roumeliotaki, A. Koutis, M. Kogevinas, and L. Chatzi. "Sleep Patterns in Late Pregnancy and Risk of Preterm Birth and Fetal Growth Restriction." *Epidemiology* 22, no. 5 (2011): 738-44.
- Miller, S. S., and N. E. Spear. "Olfactory Learning in the Rat Neonate Soon after Birth." *Dev Psychobiol* 50, no. 6 (2008): 554-65.
- Mogi, K., M. Nagasawa, and T. Kikusui. "Developmental Consequences and Biological Significance of Mother-Infant Bonding." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, no. 5 (2011): 1232-41.
- Moline, M. L., L. Broch, R. Zak, and V. Gross. "Sleep in Women across the Life Cycle from Adulthood through Menopause." *Sleep Medicine Reviews* 7, no. 2 (2003): 155-177.
- Monasterio, N., E. Vergara, and T. Morales. "Hormonal Influences on Neuroimmune Responses in the Cns of Females." *Front Integr Neurosci* 7, (2013): 110.
- Morgan, B., and M. Winick. "A Possible Control of Food Intake During Pregnancy in the Rat." *Br J Nutr* 46, no. 1 (1981): 29-37.
- Moriceau, S., and R. M. Sullivan. "Corticosterone Influences on Mammalian Neonatal Sensitive-Period Learning." *Behav Neurosci* 118, no. 2 (2004): 274-81.
- Moriceau, S., and R. M. Sullivan. "Unique Neural Circuitry for Neonatal Olfactory Learning." *J Neurosci* 24, no. 5 (2004): 1182-9.
- Morishige, W. K., G. J. Pepe, and I. Rothchild. "Serum Luteinizing Hormone, Prolactin and Progesterone Levels During Pregnancy in the Rat." *Endocrinology* 92, no. 5 (1973): 1527-30.
- Morris, R. G. "Elements of a Neurobiological Theory of Hippocampal Function: The Role of Synaptic Plasticity, Synaptic Tagging and Schemas." *Eur J Neurosci* 23, no. 11 (2006): 2829-46.
- Morris, R. G., P. Garrud, J. N. Rawlins, and J. O'Keefe. "Place Navigation Impaired in Rats with Hippocampal Lesions." *Nature* 297, no. 5868 (1982): 681-3.
- Morrison, S. D. "The Total Energy and Water Metabolism During Pregnancy in the Rat." *J Physiol* 134, no. 3 (1956): 650-64.
- Mychasiuk, R., R. Gibb, and B. Kolb. "Prenatal Stress Alters Dendritic Morphology and Synaptic Connectivity in the Prefrontal Cortex and Hippocampus of Developing Offspring." *Synapse* 66, no. 4 (2012): 308-14.
- Nagasawa, M., S. Okabe, K. Mogi, and T. Kikusui. "Oxytocin and Mutual Communication in Mother-Infant Bonding." *Front Hum Neurosci* 6, no. 31 (2012): 30.
- National Sleep Foundation (2007). *Sleep in America* poll
- Neeley, E. W., R. Berger, J. I. Koenig, and S. Leonard. "Strain Dependent Effects of Prenatal Stress on Gene Expression in the Rat Hippocampus." *Physiol Behav* 104, no. 2 (2011): 334-9.
- Neumann, I. D., A. Wigger, G. Liebsch, F. Holsboer, and R. Landgraf. "Increased Basal Activity of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis During Pregnancy in Rats Bred for High Anxiety-Related Behaviour." *Psychoneuroendocrinology* 23, no. 5 (1998a): 449-63.
- Neumann, I. D., H. A. Johnstone, M. Hatzinger, G. Liebsch, M. Shipston, J. A. Russell, R. Landgraf, and A. J. Douglas. "Attenuated Neuroendocrine Responses to Emotional and Physical Stressors in Pregnant Rats Involve Adenohypophysial Changes." *J Physiol* 508, no. Pt 1 (1998): 289-300.
- Nishina, H., K. Honda, T. Okai, S. Kozuma, S. Inoue, and Y. Taketani. "Characteristic Changes in Sleep Patterns During Pregnancy in Rats." *Neurosci Lett* 203, no. 1 (1996): 5-8.
- Nishioka, T., J. A. Anselmo-Franci, P. Li, M. F. Callahan, and M. Morris. "Stress Increases Oxytocin Release within the Hypothalamic Paraventricular Nucleus." *Brain Res* 781, no. 1-2 (1998): 57-61.
- Nowacka, M., and J. Gorski. "Metabolic Response to Starvation in Late Pregnant Rats. I. Maternal Response." *Acta Physiol Pol* 39, no. 5-6 (1988): 427-34.

- Nowak, R., M. Keller, and F. Levy. "Mother-Young Relationships in Sheep: A Model for a Multidisciplinary Approach of the Study of Attachment in Mammals." *J Neuroendocrinol* 23, no. 11 (2011): 1042-53.
- Numan, M., A. S. Fleming, and F. Levy. "Chapter 35 - Maternal Behavior." In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*, edited by Jimmy D. Neill, Tony M. Plant, Donald W. Pfaff, John R. G. Challis, David M. de Kretser, JoAnne S. Richards and Paul M. Wassarman, 1921-1993. St Louis: Academic Press, 2006.
- Numan, M., and B. Woodside. "Maternity: Neural Mechanisms, Motivational Processes, and Physiological Adaptations." *Behav Neurosci* 124, no. 6 (2010): 715-41.
- Obál F, García-García F, Kacsóh B, Taishi P, Bohnet S, Horseman ND, et al. Rapid eye movement sleep is reduced in prolactin-deficient mice. *J Neurosci* 25 (2005):10282–9.
- Okeefe, J., and L. Nadel. "The Cognitive Map as a Hippocampus." *Behavioral and Brain Sciences* 2, no. 4 (1979): 520-528.
- Okimoto, D. K., A. Blaus, M. V. Schmidt, M. K. Gordon, G. W. Dent, and S. Levine. "Differential Expression of C-Fos and Tyrosine Hydroxylase Mrna in the Adrenal Gland of the Infant Rat: Evidence for an Adrenal Hyporesponsive Period." *Endocrinology* 143, no. 5 (2002): 1717-25.
- Okun, M. L., C. D. Schetter, and L. M. Glynn. "Poor Sleep Quality Is Associated with Preterm Birth." *Sleep* 34, no. 11 (2011): 1493-1498.
- Onaka, T. "Neural Pathways Controlling Central and Peripheral Oxytocin Release During Stress." *J Neuroendocrinol* 16, no. 4 (2004): 308-12.
- Osorio, R. A., V. L. Silveira, S. Maldjian, A. Morales, J. S. Christofani, A. K. Russo, A. C. Silva, and I. C. Picarro. "Swimming of Pregnant Rats at Different Water Temperatures." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 135, no. 4 (2003): 605-11.
- Ota, K., T. Ota, and A. Yokoyama. "Plasma Corticosterone Concentrations and Pituitary Prolactin Content in the Pregnancy and Their within-Day Fluctuations in the Rat." *J Endocrinol* 61, no. 1 (1974): 21-8.
- Papakonstantinou, E., D. H. Ryan, and R. B. Harris. "Dietary Fish Oil Does Not Protect Rats Exposed to Restraint or Sleep Deprivation Stress." *Physiol Behav* 78, no. 4-5 (2003): 759-65.
- Parry, B. L., L. F. Martinez, E. L. Maurer, A. M. Lopez, D. Sorenson, and C. J. Meliska. "Sleep, Rhythms and Women's Mood. Part I. Menstrual Cycle, Pregnancy and Postpartum." *Sleep Medicine Reviews* 10, no. 2 (2006): 129-44.
- Patin, V., B. Lordi, A. Vincent, J. L. Thoumas, H. Vaudry, and J. Caston. "Effects of Prenatal Stress on Maternal Behavior in the Rat." *Brain Res Dev Brain Res* 139, no. 1 (2002): 1-8.
- Phelps, R. L., B. E. Metzger, and N. Freinkel. "Carbohydrate Metabolism in Pregnancy. Xvii. Diurnal Profiles of Plasma Glucose, Insulin, Free Fatty Acids, Triglycerides, Cholesterol, and Individual Amino Acids in Late Normal Pregnancy." *Am J Obstet Gynecol* 140, no. 7 (1981): 730-6.
- Pien, G. W., and R. J. Schwab. "Sleep Disorders During Pregnancy." *Sleep* 27, no. 7 (2004): 1405-1417.
- Pires, G. N., T. A. Alvarenga, L. O. Maia, R. Mazaro-Costa, S. Tufik, and M. L. Andersen. "Inhibition of Self-Grooming Induced by Sleep Restriction in Dam Rats." *Indian J Med Res* 136, no. 6 (2012): 1025-30.
- Raineki, C., M. A. De Souza, R. E. Szawka, M. L. Lutz, L. F. De Vasconcellos, G. L. Sanvitto, I. Izquierdo, L. R. Bevilaqua, M. Cammarota, and A. B. Lucion. "Neonatal Handling and the Maternal Odor Preference in Rat Pups: Involvement of Monoamines and Cyclic Amp Response Element-Binding Protein Pathway in the Olfactory Bulb." *Neuroscience* 159, no. 1 (2009): 31-8.
- Rechtschaffen, A., B. M. Bergmann, C. A. Everson, C. A. Kushida, and M. A. Gilliland. "Sleep Deprivation in the Rat: X. Integration and Discussion of the Findings." *Sleep* 12, no. 1 (1989): 68-87.
- Rees, Stephanie L., Vedran Lovic, and Alison S. Fleming. "Maternal Behavior." In *The Behavior of the Laboratory Rat*. New York: Oxford University Press, 2004.
- Regal, A. R., M. C. Amigo, and E. Cebrian. "Sleep and Women." *Revista De Neurologia* 49, no. 7 (2009): 376-382.
- Reznikov, A. G., N. D. Nosenko, L. V. Tarasenko, P. V. Sinityn, and L. I. Polyakova. "Early and Long-Term Neuroendocrine Effects of Prenatal Stress in Male and Female Rats." *Neurosci Behav Physiol* 31, no. 1 (2001): 1-5.
- Rice, D., and S. Barone, Jr. "Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models." *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3, (2000): 511-33.

- Rocha, M., C. Bing, G. Williams, and M. Puerta. "Pregnancy-Induced Hyperphagia Is Associated with Increased Gene Expression of Hypothalamic Agouti-Related Peptide in Rats." *Regul Pept* 114, no. 2-3 (2003): 159-65.
- Roky, Rachida, Jean Louis Valatx, Luce Paut-Pagano, and Michel Jouvet. "Hypothalamic Injection of Prolactin or Its Antibody Alters the Rat Sleep-Wake Cycle." *Physiology and Behavior* 55 (1994): 1015-1019.
- Rosenfeld, A., and A. Weller. "Behavioral Effects of Environmental Enrichment During Gestation in Wky and Wistar Rats." *Behav Brain Res* 233, no. 2 (2012): 245-55.
- Ross, L. E., B. J. Murray, and M. Steiner. "Sleep and Perinatal Mood Disorders: A Critical Review." *J Psychiatry Neurosci* 30, no. 4 (2005): 247-56.
- Russell, J. A., A. J. Douglas, and P. J. Brunton. "Reduced Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Stress Responses in Late Pregnancy: Central Opioid Inhibition and Noradrenergic Mechanisms." *Ann N Y Acad Sci*, (2008): 032.
- Sahu, S., S. Madhyastha, and G. Rao. "Effect of Prenatal Stress on Expression of Glutathione System in Neonatal Rat Brain." *Turk Neurosurg* 22, no. 5 (2012): 576-82.
- Sapolsky, R. M., and M. J. Meaney. "Maturation of the Adrenocortical Stress Response: Neuroendocrine Control Mechanisms and the Stress Hyporesponsive Period." *Brain Res* 396, no. 1 (1986): 64-76.
- Scharfman, H. E., and N. J. MacLusky. "Estrogen and Brain-Derived Neurotrophic Factor (Bdnf) in Hippocampus: Complexity of Steroid Hormone-Growth Factor Interactions in the Adult Cns." *Front Neuroendocrinol* 27, no. 4 (2006): 415-35.
- Schulz, K. M., J. N. Pearson, E. W. Neeley, R. Berger, S. Leonard, C. E. Adams, and K. E. Stevens. "Maternal Stress During Pregnancy Causes Sex-Specific Alterations in Offspring Memory Performance, Social Interactions, Indices of Anxiety, and Body Mass." *Physiol Behav* 104, no. 2 (2011): 340-7.
- She, Meihua, Xiaobo Hu, Zehong Su, Chi Zhang, Shenghua Yang, Lin Ding, Moshe Laudon, and Weidong Yin. "Piromelatine, a Novel Melatonin Receptor Agonist, Stabilizes Metabolic Profiles and Ameliorates Insulin Resistance in Chronic Sleep Restricted Rats." *European Journal of Pharmacology*. 2014.
- Siegel, J. M. "Sleep Viewed as a State of Adaptive Inactivity." *Nat Rev Neurosci* 10, no. 10 (2009): 747-53.
- Skouteris, H., E. H. Wertheim, C. Germano, S. J. Paxton, and J. Milgrom. "Assessing Sleep During Pregnancy: A Study across Two Time Points Examining the Pittsburgh Sleep Quality Index and Associations with Depressive Symptoms." *Womens Health Issues* 19, no. 1 (2009): 45-51.
- Slattery, D. A., and I. D. Neumann. "No Stress Please! Mechanisms of Stress Hyporesponsiveness of the Maternal Brain." *J Physiol* 586, no. 2 (2008): 377-85.
- Sloan, Eileen P. "Sleep Disruption During Pregnancy." *Sleep Medicine Clinics* 3, no. 1 (2008): 73-80.
- Smith, J. W., J. R. Seckl, A. T. Evans, B. Costall, and J. W. Smythe. "Gestational Stress Induces Post-Partum Depression-Like Behaviour and Alters Maternal Care in Rats." *Psychoneuroendocrinology* 29, no. 2 (2004): 227-44.
- Song, L., J. Zheng, H. Li, N. Jia, Z. Suo, Q. Cai, Z. Bai, D. Cheng, and Z. Zhu. "Prenatal Stress Causes Oxidative Damage to Mitochondrial DNA in Hippocampus of Offspring Rats." *Neurochemical Research* 34, no. 4 (2009): 739-45.
- Squire, L. R. "Memory and the Hippocampus: A Synthesis from Findings with Rats, Monkeys, and Humans." *Psychol Rev* 99, no. 2 (1992): 195-231.
- Suchecki, D., and J. Palermo Neto. "Prenatal Stress and Emotional Response of Adult Offspring." *Physiol Behav* 49, no. 3 (1991): 423-6.
- Suchecki, D., and S. Tufik. "Social Stability Attenuates the Stress in the Modified Multiple Platform Method for Paradoxical Sleep Deprivation in the Rat." *Physiol Behav* 68, no. 3 (2000): 309-16.
- Suchecki, D., B. Duarte Palma, and S. Tufik. "Pituitary-Adrenal Axis and Behavioural Responses of Maternally Deprived Juvenile Rats to the Open Field." *Behav Brain Res* 111, no. 1-2 (2000): 99-106.
- Suchecki, D., J. Antunes, and S. Tufik. "Palatable Solutions During Paradoxical Sleep Deprivation: Reduction of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity and Lack of Effect on Energy Imbalance." *J Neuroendocrinol* 15, no. 9 (2003): 815-21.
- Suchecki, D., P. A. Tiba, and S. Tufik. "Paradoxical Sleep Deprivation Facilitates Subsequent Corticosterone Response to a Mild Stressor in Rats." *Neurosci Lett* 320, no. 1-2 (2002): 45-8.

- Sullivan, R. M. "Unique Characteristics of Neonatal Classical Conditioning: The Role of the Amygdala and Locus Coeruleus." *Integr Physiol Behav Sci* 36, no. 4 (2001): 293-307.
- Sullivan, R. M., and P. J. Holman. "Transitions in Sensitive Period Attachment Learning in Infancy: The Role of Corticosterone." *Neurosci Biobehav Rev* 34, no. 6 (2010): 835-44.
- Swain, A. M., M. W. O'Hara, K. R. Starr, and L. L. Gorman. "A Prospective Study of Sleep, Mood, and Cognitive Function in Postpartum and Nonpostpartum Women." *Obstet Gynecol* 90, no. 3 (1997): 381-6.
- Szuran, T., E. Zimmermann, and H. Welzl. "Water Maze Performance and Hippocampal Weight of Prenatally Stressed Rats." *Behav Brain Res* 65, no. 2 (1994): 153-5.
- Tadavarty, R., P. S. Rajput, J. M. Wong, U. Kumar, and B. R. Sastry. "Sleep-Deprivation Induces Changes in Gaba(B) and Mglu Receptor Expression and Has Consequences for Synaptic Long-Term Depression." *Plos One* 6, no. 9 (2011): e24933.
- Tadavarty, R., P. S. Rajput, J. M. Wong, U. Kumar, and B. R. Sastry. "Sleep-Deprivation Induces Changes in Gaba(B) and Mglu Receptor Expression and Has Consequences for Synaptic Long-Term Depression." *Plos One* 6, no. 9 (2011): 27.
- Thomal, J. T., B. D. Palma, B. F. Ponzio, C. Franco Mdo, F. Zaladek-Gil, Z. B. Fortes, S. Tufik, and G. N. Gomes. "Sleep Restriction During Pregnancy: Hypertension and Renal Abnormalities in Young Offspring Rats." *Sleep* 33, no. 10 (2010): 1357-62.
- Tortorolo, P. and Vanini, G. "Nuevos conceptos sobre la generación y el mantenimiento de la vigilia". *Revista De Neurologia* 50, no. 12 (2010): 0747-758
- Uriarte, N., M. K. Breigeiron, F. Benetti, X. F. Rosa, and A. B. Lucion. "Effects of Maternal Care on the Development, Emotionality, and Reproductive Functions in Male and Female Rats." *Dev Psychobiol* 49, no. 5 (2007): 451-62.
- Ursavas, A., and M. Karadag. "Sleep Breathing Disorders in Pregnancy." *Tuberk Toraks* 57, no. 2 (2009): 237-43.
- Van den Hove, D. L., H. W. Steinbusch, A. Scheepens, W. D. Van de Berg, L. A. Kooiman, B. J. Boosten, J. Prickaerts, and C. E. Blanco. "Prenatal Stress and Neonatal Rat Brain Development." *Neuroscience* 137, no. 1 (2006): 145-55.
- Van Handel, Emile. "Estimation of Glycogen in Small Amounts of Tissue." *Analytical Biochemistry* 11, no. 2 (1965): 256-265.
- van Praag, H., B. R. Christie, T. J. Sejnowski, and F. H. Gage. "Running Enhances Neurogenesis, Learning, and Long-Term Potentiation in Mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, no. 23 (1999): 13427-31.
- Velisek, L. "Prenatal Corticosteroid Impact on Hippocampus: Implications for Postnatal Outcomes." *Epilepsy Behav* 7, no. 1 (2005): 57-67.
- Vettrivelan, R., P. M. Fuller, S. Yokota, J. Lu, and C. B. Saper. "Metabolic Effects of Chronic Sleep Restriction in Rats." *Sleep* 35, no. 11 (2012): 1511-20.
- Vilela, F. C., C. M. Melo, and A. Giusti-Paiva. "Glucocorticoids Impair Maternal Anxiolysis During Lactation." *Neurosci Lett* 509, no. 2 (2012): 121-4.
- Vorona, R. D., M. P. Winn, T. W. Babineau, B. P. Eng, H. R. Feldman, and J. C. Ware. "Overweight and Obese Patients in a Primary Care Population Report Less Sleep Than Patients with a Normal Body Mass Index." *Archives of Internal Medicine* 165, no. 1 (2005): 25-30.
- Vouimba, R. M., D. Yaniv, D. Diamond, and G. Richter-Levin. "Effects of Inescapable Stress on Ltp in the Amygdala Versus the Dentate Gyrus of Freely Behaving Rats." *Eur J Neurosci* 19, no. 7 (2004): 1887-94.
- Walker, C D, S L Lightman, M K Steele, and M F Dallman. "Suckling Is a Persistent Stimulus to the Adrenocortical System of the Rat." *Endocrinology* 130 (1992): 115-125.
- Ward, Beth Ann. "Clinical Handbook of Insomnia." Edited by Hrayr P. Attarian and Catherine Schuman: 2010: 103-115. <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-042-7>.
- Weaver, I. C., N. Cervoni, F. A. Champagne, A. C. D'Alessio, S. Sharma, J. R. Seckl, S. Dymov, M. Szyf, and M. J. Meaney. "Epigenetic Programming by Maternal Behavior." *Nat Neurosci* 7, no. 8 (2004): 847-54.
- Weinstock, M. "Effects of Maternal Stress on Development and Behaviour in Rat Offspring." *Stress* 4, no. 3 (2001): 157-67.

- Welberg, L. A., and J. R. Seckl. "Prenatal Stress, Glucocorticoids and the Programming of the Brain." *J Neuroendocrinol* 13, no. 2 (2001): 113-28.
- Wilkie, G., and C. M. Shapiro. "Sleep Deprivation and the Postnatal Blues." *J Psychosom Res* 36, no. 4 (1992): 309-16.
- Windle, R. J., M. M. Brady, T. Kunanandam, A. P. Da Costa, B. C. Wilson, M. Harbuz, S. L. Lightman, and C. D. Ingram. "Reduced Response of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis to Alpha1-Agonist Stimulation During Lactation." *Endocrinology* 138, no. 9 (1997): 3741-8.
- Wotjak, C. T., M. Kubota, G. Kohl, and R. Landgraf. "Release of Vasopressin from Supraoptic Neurons within the Median Eminence in Vivo. A Combined Microdialysis and Push-Pull Perfusion Study in the Rat." *Brain Res* 726, no. 1-2 (1996): 237-41.
- Wurbel, H., and M. Stauffacher. "Prevention of Stereotypy in Laboratory Mice: Effects on Stress Physiology and Behaviour." *Physiol Behav* 59, no. 6 (1996): 1163-70.
- Yang, Lili, Stella Lii, Benson Kuo, Arthur Buckley, Donna Buckley, Cyndi Chen, Xiaolei Xu, Djurdjica Coss, and Ameae M. Walker. "Maternal Prolactin Composition Can Permanently Affect Epidermal $\gamma\delta$ T Cell Function in the Offspring." *Developmental and Comparative Immunology* 26 (2002): 849-860.
- Yeh, C. M., C. C. Huang, and K. S. Hsu. "Prenatal Stress Alters Hippocampal Synaptic Plasticity in Young Rat Offspring through Preventing the Proteolytic Conversion of Pro-Brain-Derived Neurotrophic Factor (Bdnf) to Mature Bdnf." *J Physiol* 590, no. Pt 4 (2012): 991-1010.
- Yu, G. Z., H. Kaba, F. Okutani, S. Takahashi, and T. Higuchi. "The Olfactory Bulb: A Critical Site of Action for Oxytocin in the Induction of Maternal Behaviour in the Rat." *Neuroscience* 72, no. 4 (1996): 1083-8.
- Zafarghandi, N., S. Hadavand, A. Davati, S. M. Mohseni, F. Kimiaimoghadam, and F. Torkestani. "The Effects of Sleep Quality and Duration in Late Pregnancy on Labor and Fetal Outcome." *J Matern Fetal Neonatal Med* 25, no. 5 (2012): 535-7.
- Zhang, S Q, M Kimura, and S Inoué. "Effects of Prolactin on Sleep in Cyclic Rats." *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 53 (1999): 101-103.
- Zhu, Z., X. Li, W. Chen, Y. Zhao, H. Li, C. Qing, N. Jia, Z. Bai, and J. Liu. "Prenatal Stress Causes Gender-Dependent Neuronal Loss and Oxidative Stress in Rat Hippocampus." *J Neurosci Res* 78, no. 6 (2004): 837-44.