

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia celular

Thaís de Mérci Domingues e Paula

**EFEITOS DA CAFEÍNA NA FOLICULOGÊNESE, DESENVOLVIMENTO
PLACENTÁRIO E EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS, BIOMÉTRICOS E
COMPORTAMENTAIS TRANSGERACIONAIS EM MODELO MURINO.**

Belo Horizonte
2023

Thaís de Mérci Domingues e Paula

**EFEITOS DA CAFEÍNA NA FOLICULOGÊNESE, DESENVOLVIMENTO
PLACENTÁRIO E EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS, BIOMÉTRICOS E
COMPORTAMENTAIS TRANSGERACIONAIS EM MODELO MURINO.**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Orientadora: Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Coorientador: Dr. Enrrico Bloise

Belo Horizonte
2023

043

Paula, Thaís de Mérci Domingues e.

Efeitos da cafeína na foliculogenese, desenvolvimento placentário e em parâmetros reprodutivos, biométricos e comportamentais transgeracionais em modelo murino [manuscrito] / Thaís de Mérci Domingues e Paula. – 2023.
109 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida.
Coorientador: Dr. Enrico Bloise.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Cafeína. 3. Placenta. 4. Ovário. 5. Gravidez. 6. Lactação. 7. Reprodução. 8. Cognição. I. Almeida, Fernanda Radicchi Campos Lobato de. II. Bloise, Enrico. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 Instituto de Ciências Biológicas
 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE THAÍS DE MÉRICI DOMINGUES E PAULA

Às **nove horas** do dia **03 de março de 2023**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**EFEITOS DA CAFEÍNA NA FOLICULOGENESE, DESENVOLVIMENTO PLACENTÁRIO E EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS, BIOMÉTRICOS E COMPORTAMENTAIS TRANSGÊNICOS EM MODELO MURINO**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	Aprovada
Dr. Enrico Bloise	UFMG	Aprovada
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	Aprovada
Dr. Paulo Henrique de Almeida Campos Júnior	UFSJ	Aprovada
Dra. Dirce Ribeiro de Oliveira	UFJF Campus GV	Aprovada
Dr. Juneo Freitas Silva	UESC	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 03 de março de 2023

Drª. Fernanda Radicchi C. Lobato de Almeida (Orientadora)

Dr. Enrico Bloise (Coorientador)

Drª. Gleide Fernandes de Avelar

Dr. Paulo Henrique de Almeida Campos Júnior

Drª. Dirce Ribeiro de Oliveira

Dr. Juneo Freitas Silva

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Enrico Bloise, Professor do Magistério Superior**, em 06/03/2023, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gleide Fernandes de Avelar, Professora do Magistério Superior**, em 06/03/2023, às 15:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juneo Freitas Silva, Usuário Externo**, em 06/03/2023, às 17:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 06/03/2023, às 22:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Henrique de Almeida Campos Junior, Usuário Externo**, em 10/03/2023, às 15:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dirce Ribeiro de Oliveira, Usuária Externa**, em 15/03/2023, às 15:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Professor do Magistério Superior**, em 16/03/2023, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2121025** e o código CRC **C30A15B6**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à espiritualidade, por sempre guiarem meus caminhos, nos bons e maus momentos.

Aos meus pais, Rosaura e Geraldo, pela dedicação integral, amor, carinho, preocupação, e por se doarem inteiramente para que eu pudesse conquistar tudo o que já consegui. Vocês são meu porto seguro sempre.

Ao amor da minha vida, marido e melhor amigo Daniel Dionysio, por seu carinho, amor e dedicação em todos os momentos da minha vida.

À minha querida orientadora, professora, “mãe científica” e eterna madrinha de casamento, Fernanda Almeida, por ter me aceitado em 2015 com tanto carinho e por cuidar de mim e me incentivar por tanto tempo, sempre com zelo e compreensão em todos os momentos e projetos da minha vida.

Ao “Quarteto Fantástico”, formado pelos meus queridos e eternos irmãos científicos Thaís, Fernando, André e eu, por sempre estarem junto comigo dentro e fora do laboratório durante todo esse tempo.

À banca avaliadora deste trabalho, a minha “banca dos sonhos”, mas que eu julgava impossível de conseguir reunir... Mas sim, consegui fazer com que cada um tirasse um tempo do seu dia para ler este projeto, assistir à minha apresentação e ainda trazer ideias e aprofundamentos fundamentais para a minha formação profissional.

Aos meus amigos e familiares de Sete Lagoas, de Belo Horizonte, de Igarapé, de Bom Despacho e de outros cantos do Brasil, pelos dias leves e pelo sorriso fácil.

Aos meus sócios, amigos e também aos estagiários da clínica Athletica, um sonho antigo que só foi possível realizar junto a vocês, que sempre me trouxeram de volta a minha confiança nos momentos mais difíceis do meu doutorado.

Aos meus alunos da UFMG e dos campi Una durante os meus anos de docência, que me fizeram perceber o que eu mais amo fazer nesta vida: ensinar.

Ao professor Hélio Chiarini e aos amigos queridos do LABER, que levarei com carinho por toda a vida, pela ajuda nos dias úteis e nos sábados domingos e feriados também. Pelo apoio e participação neste trabalho, que com certeza não seria o mesmo sem a ajuda de vocês. Um agradecimento especial para Lucas e Izabelle, peças-chave durante todo o meu doutorado.

Aos professores e alunos de outros laboratórios, que também me ajudaram a realizar este projeto, dentre eles Prof. Enrrico, Profa. Aline, Profa. Gleide; Prof. Raphael, Bruna e Carol: vocês sempre estiveram prontos para me ajudar em qualquer momento de necessidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, ao qual tenho muito orgulho de pertencer, e um agradecimento especial pelo apoio no momento mais difícil da minha vida profissional.

A todos os colegas, professores e funcionários do ICB, mais especificamente do Departamento de Morfologia.

Às agências de fomento deste projeto e de tantos outros que participei, cujo apoio financeiro foi imprescindível para que tudo ocorresse da melhor maneira possível.

Às meninas da limpeza, que às vezes passam despercebidas pelos corredores do ICB, mas cuidam com muito zelo deste patrimônio. Em especial à Nely, nosso sorriso e simpatia diários pelos corredores.

Não menos importante, aos animais com os quais trabalhei: devo-lhes grande respeito e admiração pela existência e aprendizado adquirido através deles.

Enfim, agradeço a todos que estiveram comigo e me auxiliaram tanto durante este período, seja com um simples sorriso de “você consegue”, seja com aprendizado e cumplicidade.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

RESUMO

A cafeína é uma substância comumente consumida por gestantes e lactantes e, em função da sua capacidade de atravessar a membrana placentária e se acumular no organismo do feto, bem como de ser secretada no leite materno, seu consumo tem sido contraindicado ou sugerido em doses mínimas durante a gestação e a lactação. Estudos em humanos e roedores relacionam o consumo de cafeína a menores índices de fertilização, de implantação embrionária, alterações na estrutura placentária, aumento da ocorrência de baixo peso fetal e placentário, abortos e natimortos. Embora apresente tais efeitos deletérios, até o momento há uma escassez de dados descrevendo os mecanismos das alterações reprodutivas, comportamentais e funcionais consequentes do consumo materno crônico de cafeína durante a gestação e a lactação. Adicionalmente, torna-se necessário investigar se tais efeitos irão também se manifestar nas gerações subsequentes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações biométricas, reprodutivas, morfofuncionais e comportamentais em duas gerações de camundongos iso e heterogênicos, decorrentes do consumo materno diário de cafeína durante a gestação e/ou lactação. Cento e vinte fêmeas adultas de camundongos Swiss e 15 fêmeas de camundongos Black-6 foram submetidas a quatro experimentos distintos, envolvendo o consumo de doses variadas de cafeína (0, 60, 120 ou 240 mg/cafeína/dia) antes e durante a gestação e/ou a lactação das proles F1 e F2. Foram feitas análises histológicas, hormonais, imunohistoquímicas e comportamentais dos diferentes grupos de camundongos e de sua prole ao longo do crescimento e da sua vida adulta. Os resultados mostraram que, mesmo nas doses recomendadas atualmente, a cafeína causou alterações no ciclo estral e na reserva folicular dos animais; restrição intrauterina de crescimento, alterações na morfologia e morfometria placentárias; comprometimento do desenvolvimento biométrico e sexual das proles F1 e F2; e alterações cognitivas e comportamentais das proles F1 e F2, especialmente de fêmeas. Tais resultados indicam que as atuais doses de consumo recomendadas de cafeína precisam ser revistas e atualizadas em humanos, especialmente as relativas à lactação, que são pouco discutidas e referenciadas.

Palavras-chave: cafeína, placenta, ovários, nutrição, gestação, lactação, reprodução, comportamento transgeracional, cognição.

ABSTRACT

Caffeine is a substance commonly consumed by pregnant and lactating women and, due to its ability to cross the placental membrane and accumulate in the fetal body, as well as to be secreted into breast milk, its consumption has been contraindicated or suggested in minimal doses during pregnancy and lactation. Studies in humans and rodents have linked caffeine consumption to lower rates of fertilization, embryo implantation, alterations in placental structure, increased occurrence of low fetal and placental weight, abortions, and stillbirths. Although it presents such deleterious effects, to date there is a paucity of data describing the mechanisms of reproductive, behavioral, and functional changes consequent to chronic maternal caffeine consumption during pregnancy and lactation. Additionally, it becomes necessary to investigate whether such effects will also manifest in subsequent generations. Therefore, the objective of this study was to evaluate the biometric, reproductive, morphofunctional, and behavioral changes in two generations of iso- and heterozygous mice, resulting from daily maternal consumption of caffeine during gestation and/or lactation. One hundred and twenty adult female Swiss mice and 15 female Black-6 mice were subjected to four separate experiments involving the consumption of varying doses of caffeine (0, 60, 120 or 240 mg/caffeine/day) before and during gestation and/or lactation of F1 and F2 offspring. Histological, hormonal, immunohistochemical and behavioral analyses were performed on the different groups of mice and their offspring throughout their growth and adult life. The results showed that, even at currently recommended doses, caffeine caused alterations in the estrous cycle and follicular reserve of the animals; intrauterine growth restriction, alterations in placental morphology and morphometry; impaired biometric and sexual development of F1 and F2 offspring; and cognitive and behavioral alterations of F1 and F2 offspring, especially of females. These results indicate that the current recommended doses of caffeine consumption need to be reviewed and updated in humans, especially those related to lactation, which are little discussed and referenced.

Keywords: caffeine, placenta, ovaries, nutrition, gestation, lactation, reproduction, transgenerational behavior, cognition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fases do ciclo estral de roedores. (A) Hormônios envolvidos em cada fase do ciclo estral, figura extraída de Bertolin & Murphy, 2014; (B) Citologias vaginais com o aspecto de cada fase do ciclo estral: A – Proestro; B – Estro; C – Metaestro; D – Diestro. Imagens do Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (Laber).....18

Figura 2: Fotomicrografias dos tipos foliculares encontrados nos ovários de camundongos. A: Seta à esquerda: primordial quiescente; Seta à direita: primordial ativado; B: Seta à esquerda: primário multilaminar (pré-antral); seta à direita: primário unilaminar; C: secundário ou antral com menos de 5 camadas de CG; D: secundário ou antral com mais de 5 camadas de CG; E: terciário ou de Graaf; F: atresico; G: corpo lúteo; H: corpo albicans. Créditos da imagem: adaptado de Carvalho et al, dados não publicados.....23

Figura 3: Desenho esquemático mostrando a disposição das regiões placentárias comparativamente entre camundongos e humanos. Fonte: elaborado pela autora, adaptado de Croy et al, 2014.....26

Figura 4: Fotomicrografia de corte de placenta de camundongo no terço final da gestação (17,5 dias gestacionais-DG), mostrando as diferentes regionais da placenta. A: decídua materna, B: zona juncional, C: labirinto e D: placa coriônica. Os vasos da placa coriônica irão formar o cordão umbilical. Barra: 416,7µm.....28

Figura 5: Resumo das metodologias utilizadas nos experimentos deste trabalho. Imagem da autora.....42

Figura 6: Esquema explicativo da metodologia utilizada para a determinação e diferenciação de vasos maternos e fetais, bem como a classificação de suas categorias a partir do calibre destes vasos. Cabeça de seta branca: grandes vasos, dentre os quais encontramos também vasos extragrandes; Cabeça de seta cinza: vasos de calibre intermediários; Cabeça de seta preta: vasos de pequeno calibre, dentre os quais também se encontram vasos extra pequenos; Asteriscos: núcleos das células sinusoidais fetais que compõem tais vasos sanguíneos.....45

Figura 7: Duração (em dias) das fases do ciclo estral de camundongos decorrentes do consumo de cafeína, durante trinta dias, em diferentes doses. CC: controle (água); C60: 60 mg/cafeína/dia; C120: 120 mg/cafeína/dia; C240: 240 mg/cafeína/dia; ^{a, b} P < 0,05.....54

Figura 8: Microscopia intravital confocal comparando a largura de luz dos vasos fetais da placenta no Labirinto dependente da dose no modelo de camundongo GFP C57BL/6. Em verde: fluorescência GFP de vasos fetais na placenta. Em vermelho: tecido materno com autofluorescência. Em amarelo: controle negativo. Vasos sanguíneos definidos em categorias quantitativas (valores na tabela atual) e qualitativas: “Pequeno” (setas pretas): larguras menores que 80 µm; “Intermediário” (setas de cabeça cinza): larguras entre 80,1 e 120,0 µm; e “Grande”(setas de cabeça branca): larguras superiores a 120,1 µm. Barras = 55,0 µm. Aumentos: 20x.....59

Figura 9: Imunofluorescência do labirintotrofoblasto para investigar e comparar a morte celular através da expressão de Casp-3 em cada tratamento, em 17,5 DG. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre a contagem de células nem a porcentagem de células que expressam Casp-3 (P > 0,05). A: Núcleo marcado DAPI em azul; B: Citoplasma marcado com Trit-C em vermelho; C: Imagens mescladas. Barras = 55,0 µm. Aumento: 20x.60

Figura 10: Expressão de KI-67 no labirinto placentário em 11,5 DG. (A) Fotomicrografia panorâmica aumentada em 20x evidenciando a expressão de DAB marrom ou coloração nuclear de células Ki-67 positivas (cabeça de seta amarela). (B) Aumento de 40x para destacar a coloração nuclear (cabeça de seta amarela). (C): Tabela quantitativa de contagem de expressão de KI-67 mostrando aumento significativo da proliferação celular no

grupo C60 evidenciado por maior número de células sinusoidais, bem como maior percentual de células marcadas com KI-67 ($P < 0,05$). Barras = 55,0 μm62

Figura 11: Biometria da prole (F1). A – Curva de crescimento (comprimento em centímetros) dos filhotes fêmea F1 de camundongo cuja mãe consumiu ou não cafeína cronicamente durante a gestação e/ou a lactação. B – Curva de peso (em gramas) dos filhotes fêmea F1 de camundongo cuja mãe consumiu ou não cafeína cronicamente durante a gestação e/ou a lactação. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação; Asterisco: idade do desmame. ^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).....66

Figura 12: Representação dos dias pós-gestacionais em fêmeas F1 até a abertura vaginal. A: Dias corridos contados até a detecção da abertura. B: Fotografia autoral de uma fêmea apresentando abertura vaginal, um dos indicadores de puberdade em fêmeas de camundongo. ^{a,b} Médias com letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).68

Figura 13: Parâmetros reprodutivos das fêmeas F1. Duração das fases lútea e folicular dos ciclos estrais ao longo de 30 dias, de fêmeas F1 submetidas ou não consumo indireto de cafeína. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação. ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).....68

Figura 14: Biometria da prole (F1). A - Curva de crescimento (comprimento em centímetros) das proles de fêmeas da geração F1 de camundongos cujas mães consumiram ou não cafeína de forma crônica durante a gestação e/ou a lactação. B - Curva de peso (em gramas) dos filhotes fêmea F1 de camundongo cuja mãe consumiu ou não cafeína cronicamente durante a gestação.73

Figura 15: Parâmetros reprodutivos das fêmeas F2. Duração das fases lútea e folicular dos ciclos estrais ao longo de 30 dias, de fêmeas F1 submetidas ou não consumo indireto de cafeína. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).74

Figura 16: Testes de comportamento relativos a comportamento ansioso e compulsão das fêmeas F1. A – Campo aberto (Open field) com fêmeas e machos da geração F1; B – Y-maze; C – Labirinto em cruz elevado; D – Marble burried. Tratamentos: CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação; A-B: tempo de permanência no centro do campo aberto, em segundos; C-D: distância total percorrida no teste de campo aberto; Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais do mesmo gráfico ($P < 0,05$).77

Figura 17: Testes de comportamento relativos a comportamento ansioso e compulsão dos machos F1. A – Campo aberto (Open field) com fêmeas e machos da geração F1; B – Y-maze; C – Labirinto em cruz elevado; D – Marble burried. Tratamentos: CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação; A-B: tempo de permanência no centro do campo aberto, em segundos; C-D: distância total percorrida no teste de campo aberto; Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais do mesmo gráfico ($P < 0,05$).78

Figura 18: Teste Rotarod de coordenação a aprendizado motor realizado com fêmeas da geração F1. Latency to fall: tempo de permanência no aparato durante os giros até a queda, em três dias de teste. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$). CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação.....80

Figura 19: Teste de reconhecimento social e memória de curto prazo. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).....81

Figura 20: Teste do nado forçado de machos e fêmeas. A e C: tempo de imobilidade diante do desafio de afogamento; B e D: tempo decorrido até a imobilidade apresentada pelo indivíduo. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação.....82

Figura 21: Testes de comportamento relativos a comportamento ansioso e compulsão das fêmeas F2. A – Campo aberto (Open field) com fêmeas e machos da geração F1; B – Y-maze; C – Labirinto em cruz elevado; D – Marble burried. Tratamentos: CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação; A-B: tempo de permanência no centro do campo aberto, em segundos; C-D: distância total percorrida no teste de campo aberto; Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais do mesmo gráfico ($P < 0,05$).....83

Figura 22: Testes de comportamento relativos a comportamento ansioso e compulsão dos machos F2. A – Campo aberto (Open field) com fêmeas e machos da geração F1; B – Y-maze; C – Labirinto em cruz elevado; D – Marble burried. Tratamentos: CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação; A-B: tempo de permanência no centro do campo aberto, em segundos; C-D: distância total percorrida no teste de campo aberto; Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais do mesmo gráfico ($P < 0,05$).84

Figura 23: Teste Rotarod de coordenação a aprendizado motor realizado com fêmeas da geração F2. Latency to fall: tempo de permanência no aparato durante os giros até a queda, em três dias de teste. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$). CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação.....85

Figura 24: Reconhecimento social em fêmeas e machos da geração F2. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$). CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação.....86

Figura 25: nado forçado em fêmeas e machos da geração F2. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação.....86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudo comparativo das principais estruturas morfológicas presentes em placentas de humanos e camundongos.26

Tabela 2 – Contagem e proporção das diferentes categorias de folículos em ovários de fêmeas nulíparas de camundongos Swiss, após consumo crônico, ou não (CC), de diferentes doses de cafeína (C60, C120, C240)55

Tabela 3 – Níveis plasmáticos de Prolactina (PRL) e Hormônio Luteinizante (LH) em fêmeas nulíparas de camundongos após consumo crônico, ou não (CC), de diferentes doses de cafeína (C60, C120, C240)56

Tabela 4 - Parâmetros reprodutivos de fêmeas das gerações parental e F1, cujo contato indireto com cafeína se deu durante a gestação (TC), a lactação (CT) ou ambos (TT).....64

Tabela 5 – Contagem e proporção das diferentes categorias de folículos em ovários de fêmeas F1 de camundongos Swiss, após consumo crônico de suas mães, de 120 mg/caf/dia durante a gestação (TC), lactação (CT), ou ambas (TT).69

Tabela 6 – Contagem e proporção das diferentes categorias de folículos em ovários de fêmeas F2 de camundongos Swiss, após consumo crônico, ou não (CC), de suas avós, de 120 mg/caf/dia durante a gestação (TC), lactação (CT), ou ambas (TT).75

LISTA DE ABREVIATURAS

AR – receptores de adenosina

BCL2 – linfoma de células B2

Casp3 – caspase 3

CG – células da granulosa

CL – corpo lúteo

CP – placa coriônica

CT – células trofoblásticas

CTG – células trofoblásticas gigantes (-C: de canal; -S: sunisoidais; -P: parietais)

CYP1A2 – enzima hepática citocromo P450 1A2

DG – dias gestacionais

EP – eficiência placentária

ERC – Estudo randomizado controlado

FSH – hormônio folículo-estimulante

FIV – fertilização in vitro

IGF – fator de crescimento semelhante à insulina

GDF9 – fator de diferenciação e crescimento

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofina

Jz – zona juncional

LH – hormônio luteinizante

Lt – labirintotrofoblasto

uNK – natural killer uterinas

PGC – células germinativas primordiais

PIGF ou PGF – fator de crescimento placentário

PRL – prolactina

RIUC – restrição intrauterina de crescimento

VEGF – fator endotelial vascular de crescimento

RPM – rotações por minuto

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
REVISÃO DE LITERATURA.....	18
Cafeína: ação e metabolismo.....	18
Ciclo estral: o ciclo hormonal e sexual do camundongo.....	19
Os ovários: descrição, morfofuncionalidade, endocrinologia e importância para a concepção.....	22
A fertilização.....	27
Placenta: estrutura e função.....	28
Restrição intrauterina de crescimento e suas consequências.....	29
Cafeína: impactos sobre o ciclo reprodutivo da fêmea.....	33
Humanos e roedores: uma comparação entre espécies.....	41
Comportamento, cognição e estudos relacionados.....	42
HIPÓTESE.....	43
OBJETIVOS.....	43
OBJETIVO GERAL.....	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
METODOLOGIA.....	44
Comitê de ética.....	44
Determinação dos experimentos.....	44
Grupo experimental de análise ovariana sob consumo de cafeína: apenas fêmeas nulíparas.....	46
Grupo experimental de análise fetal, placentária e transgeracional: fêmeas gestantes e lactantes.....	47
Análise estatística.....	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
Experimento 1 – estudo da fertilidade de fêmeas após o consumo crônico de cafeína abordando aspectos morfofuncionais ovarianos.....	56
Experimento 2 – Impacto do consumo crônico da cafeína sobre o desenvolvimento placentário e fetal em modelo murino.....	60
Experimento 3 – Avaliação dos padrões biométricos e reprodutivos em duas gerações subsequentes à exposição pré-natal e neonatal de cafeína.....	67
Geração F1.....	67
Geração F2.....	74
Experimento 4 – Avaliação cognitiva e comportamental da prole adulta das gerações F1 e F2 subsequentes à exposição pré-natal e neonatal de cafeína.....	79
Geração F1.....	79
Geração F2.....	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
REFERÊNCIAS.....	92

INTRODUÇÃO

A cafeína é uma substância estimulante do grupo das xantinas, consumida em todo o mundo sob a forma não apenas de café, mas também de algumas variedades de chá, como o chá mate, o chá verde e o chá branco (Paula et al, 2017). Refrigerantes de guaraná e cola, alimentos à base de cacau, bebidas energéticas e alguns medicamentos também perfazem a lista de alimentos que possuem cafeína como constituinte (Paula et al, 2017). Estima-se que 89% das mulheres entre 18 e 24 anos consumam alimentos cafeinados, em uma média de 166 mg/dia (Paula et al, 2017; Frary et al, 2005). Com o objetivo de combater a sonolência e/ou fadiga, ou simplesmente como um hábito previamente existente, seu consumo durante a gestação também é comum, especialmente a partir do segundo trimestre gestacional e após o nascimento do bebê (Dews, 2011; Butt & Sultan, 2011; Grosso & Bracken, 2005).

Devido a alterações fisiológicas na degradação de cafeína, diferentes doses são recomendadas ao longo do tempo de gestação e lactação (Paula et al, 2017; EFSA, 2015; Grosso & Bracken, 2005). Por exemplo, em mulheres não grávidas, recomenda-se um consumo máximo de 400 mg diários, enquanto em gestantes, a recomendação de ingestão varia de 100 a 300 mg, sendo tal quantidade inversamente proporcional ao tempo de gestação (Partosch et al, 2015; Ree et al, 2015; Momoi et al, 2008; FDA, 2002). Estudos epidemiológicos mostraram que grávidas e lactantes consomem menos cafeína que as demais mulheres, apesar de este consumo variar entre 120 e 300 mg por dia, doses estas estabelecidas pelos respectivos países e suas recomendações (Barone & Roberts, 1996). No Brasil, o Ministério da Saúde (2016) determina que a cafeína tem um “uso compatível com a amamentação. Contudo, o consumo de altas doses pela nutriz tem sido associado à irritabilidade e insônia no lactente”. Outros órgãos são mais específicos nesta recomendação para lactantes, e preconizam o consumo habitual de 200 mg/dia como seguro (EFSA, 2015) ou um consumo máximo de 300 mg/dia (NHS, 2016). Todas as recomendações

sobre o consumo durante a lactação se baseiam em doses associadas ao aparecimento de irritabilidade e insônia em bebês, mas as evidências por trás destas recomendações ainda não são claras (Aimee et al, 2018). Revisões sistemáticas e do tipo “umbrella” recentes sobre a segurança do consumo de cafeína por lactantes são de cunho observacional, e os resultados não consideraram os dados demográficos, fisiológicos ou do desenvolvimento dos bebês que consumiram cafeína via aleitamento materno (Poole et al, 2018; Wikoff et al, 2017).

Uma vez tendo minha formação como Nutricionista, iniciei os trabalhos de atendimento ambulatorial de gestantes e nutrizes em estágios de iniciação científica ainda durante a graduação. Sempre questioneei mentalmente o fato de se variarem tanto as doses recomendadas, ou melhor, o fato de se recomendar cafeína para estes grupos específicos da população. Com tantos questionamentos e dúvidas, decidi fazer no meu mestrado, em 2015, um estudo sobre como a cafeína poderia afetar do ponto de vista histológico e biométrico as placentas e os fetos de camundongos submetidos às atuais doses recomendadas. Resultados surpreendentes e inéditos mostraram que a cafeína, nas doses de 120 mg/kg/dia em camundongos (moderados 300 mg/dia em humanos), pode afetar toda a vascularização placentária, causando uma menor irrigação por sangue materno, uma tentativa fetal de compensação e, conseqüentemente, a ocorrência de restrição intrauterina de crescimento (RIUC).

Após obtidos tantos dados interessantes, demos prosseguimento aos estudos durante o meu doutorado, já que mais questionamentos surgiram diante dos achados: Como se dá a nova distribuição sanguínea na interface materno-fetal da placenta, e qual(is) mecanismo(s) pode(m) ser determinante(s) de tais alterações vasculares? A cafeína também pode trazer conseqüências negativas oriundas de um consumo durante a lactação? Quais serão estas conseqüências? Os descendentes de consumidoras de cafeína podem sofrer alguma conseqüência relacionada à cognição, comportamento ou desenvolvimento pós-natal? O que ocorre nos ovários de fêmeas consumidoras crônicas desta substância? Como está se desenvolvendo o seu ciclo reprodutivo?

Uma vez determinadas as perguntas, tem-se o trabalho a seguir. Ele foi dividido em quatro experimentos distintos para trazer algumas respostas e talvez endossar a necessidade imprescindível de se repensar sobre as doses realmente seguras de se recomendar o consumo de cafeína durante a concepção, a gestação e a lactação.

REVISÃO DE LITERATURA

Cafeína: ação e metabolismo

A cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina) é uma substância alcaloide cuja meia-vida, em humanos, pode variar de duas a 4,5 horas, podendo alcançar até 12 horas. Uma vez ingerida, ela é quase totalmente metabolizada por enzimas hepáticas – especialmente a citocromo P450 1A2 (CYP1A2) - as dimetilxantinas. Dentre as principais dimetilxantinas originadas, encontram-se a paraxantina, a teobromina e a teofilina (Grosso & Bracken, 2005).

A paraxantina, metabólito primário, corresponde a cerca de 80% do metabolismo final da cafeína em humanos e em roedores (Grosso & Bracken, 2005; Klebanoff, 1998). Esta substância é considerada um antagonista de adenosina, uma vez que é capaz de se ligar aos receptores de adenosina do sistema nervoso central e periférico. A adenosina se liga a receptores de adenosina (ARs) acoplados à proteína G, que controlam diversos estímulos excitatórios, promovem redução de atividade motora e frequência cardíaca, aumentam a sensação de sono e reduzem a liberação de neurotransmissores e hormônios. Uma vez impedida de se ligar aos seus receptores pela ação antagonista da paraxantina, ocorre uma diminuição dos efeitos fisiológicos da adenosina, enquanto há um aumento da liberação de neurotransmissores na circulação, como epinefrina e norepinefrina (Grosso & Bracken, 2005; Harland, 2000). Esta é a razão pela qual a cafeína é usualmente consumida como estimulante: para aumentar a vigília, reduzindo a sonolência e a fadiga (Burke et al, 2013).

Tanto a cafeína quanto os seus metabólitos são moléculas muito pequenas, altamente

lipofílicas. Sendo assim, possuem extrema facilidade de se difundir através dos tecidos por difusão passiva, atravessando, inclusive, membranas biológicas de alta seletividade e baixa permeabilidade, como a hematotesticular, a hematoencefálica e a placentária (Mose et al, 2008; Christian & Brent, 2001).

Durante a gestação, ocorre uma redução hepática da atividade das enzimas P450 citocromo-oxigenases, e conseqüente redução no metabolismo e na excreção de cafeína, teofilina, teobromina e paraxantina. Isso leva à deposição destas substâncias nos tecidos maternos e fetais, dada a sua facilidade de difusão total através da placenta (Yadegari et al, 2016; Jahanfar & Jaafar, 2015; Sesardic et al, 1990). Com a evolução da gravidez proporcional à redução da atividade enzimática, pode-se observar um aumento da meia-vida destes metabólitos para até 18 horas em tecidos maternos e fetais no último trimestre gestacional (Tsutsumi et al, 2001). Uma vez que fetos e bebês até os dois anos de idade são incapazes de metabolizar estas substâncias, sua eliminação fica totalmente dependente de um sistema renal ainda em desenvolvimento (Klebanoff et al, 2002). Durante a lactação, toda a cafeína consumida pela mãe se difunde para o leite materno e, devido à incapacidade do recém-nascido de degradá-la, sua meia-vida é mais longa na infância, sendo seu o consumo contraindicado até os seis anos de idade (Jawa, 2017; Billon, 1987).

Pelo exposto acima, torna-se evidente que o acúmulo de cafeína, tanto em fetos quanto em bebês pode acometer o desenvolvimento de sistemas orgânicos. Entretanto, estudos abordando os efeitos da cafeína sobre a fertilidade feminina são escassos. Assim sendo, faz-se necessário discorrer sobre a morfofuncionalidade das gônadas femininas, bem como sobre o desenvolvimento placentário e fetal para uma melhor compreensão dos efeitos epigenéticos da cafeína.

Ciclo estral: o ciclo hormonal e sexual do camundongo

De todos os mamíferos não-humanos, o camundongo tem uma longa história como um

modelo experimental para a investigação de doenças e eventos reprodutivos relacionados à espécie humana, além de possuir um pequeno tamanho corporal e uma boa taxa de fecundidade (Bertolin & Murphy, 2014; Freeman, 2006). O camundongo ovula espontaneamente, em intervalos curtos, a cada 4-5 dias, e este ciclo ovulatório é denominado ciclo estral. O ciclo estral do camundongo é um evento interativo manifestado em mudanças na anatomia, endocrinologia, fisiologia e comportamento, todos culminando em quatro fases distintas: proestro, estro, metaestro e diestro (Bertolin & Murphy, 2014).

Hormônios específicos conduzem as mudanças que ocorrem durante cada fase do ciclo e induzem variações anatômicas e celulares que permitem a identificação de cada uma das fases, seja através do exame da aparência da abertura vaginal, seja através das células vaginais esfoliadas e visualizadas em microscópio óptico de luz (Bertolin & Murphy, 2014). Dentre os hormônios envolvidos no ciclo estral, destacam-se (Figura 2): o FSH, que atua principalmente para promover o crescimento e maturação folicular; o LH, necessário para o crescimento folicular, indução da ovulação e manutenção do corpo lúteo; a prolactina, um estímulo luteotrópico que inicia e mantém a secreção de progesterona pelo CL; a progesterona, secretada pelo corpo lúteo durante a fase de diestro; e o estrogênio (estradiol), que promove angiogênese e divisão celular das CG, a formação de junções comunicantes intercelulares e age sinergicamente com as gonadotrofinas em vários níveis, incluindo a promoção do crescimento ovariano (Chou & Chein, 2018).

Durante o proestro, os folículos antrais crescem exponencialmente sob a influência das gonadotrofinas (FSH e LH), culminado em elevadas concentrações plasmáticas de estrogênio, seguido por um pico de LH (pico pré-ovulatório), o que caracteriza a fase folicular do ciclo estral (Freeman, 2006). A ovulação do camundongo ocorre aproximadamente 12 a 14 horas após este pico de LH, coincidindo com a fase do estro bem como com o período durante o qual a fêmea estará sexualmente receptiva ao macho (Bertolin & Murphy, 2014). Com a diferenciação dos folículos ovulados em corpos lúteos, tem-se a predominância de secreção de progesterona,

caracterizando a fase lútea do ciclo estral, composta pelo metaestro e pelo diestro (Bertolin & Murphy, 2014). Durante o metaestro e o diestro, a progesterona inibe a secreção de LH e consequentemente impede uma nova ovulação. Com a evolução do ciclo, caso não haja fertilização, o corpo lúteo deixa de ser funcional, resultando na redução da síntese de progesterona ao final do metaestro e durante o diestro. Tal declínio de progesterona deixa de inibir, por sua vez, um novo pico de LH, fazendo com que o ciclo continue e novo proestro seja iniciado (Bertolin & Murphy, 2014) (Figura 1A).

As fases do ciclo estral podem ser identificadas através de lavados vaginais com ou sem coloração histológica (Figura 1B). O proestro é caracterizado por grandes células escamosas/pavimentosas, com núcleos visíveis, aglomeradas em clusters ou isoladas entre si; o estro apresenta-se com células escamosas/pavimentosas queratinizadas, fazendo com que os núcleos não sejam visíveis; o metaestro traz uma mescla de células escamosas nucleadas e anucleadas, e também leucócitos polimorfonucleares, com predominância de neutrófilos; por fim, no diestro, há uma prevalência de leucócitos e algumas células epiteliais fusiformes em processo de morte podem ser visíveis ao microscópio óptico (Figura 2. Shaw et al, 2020; Bertolin & Murphy, 2014).

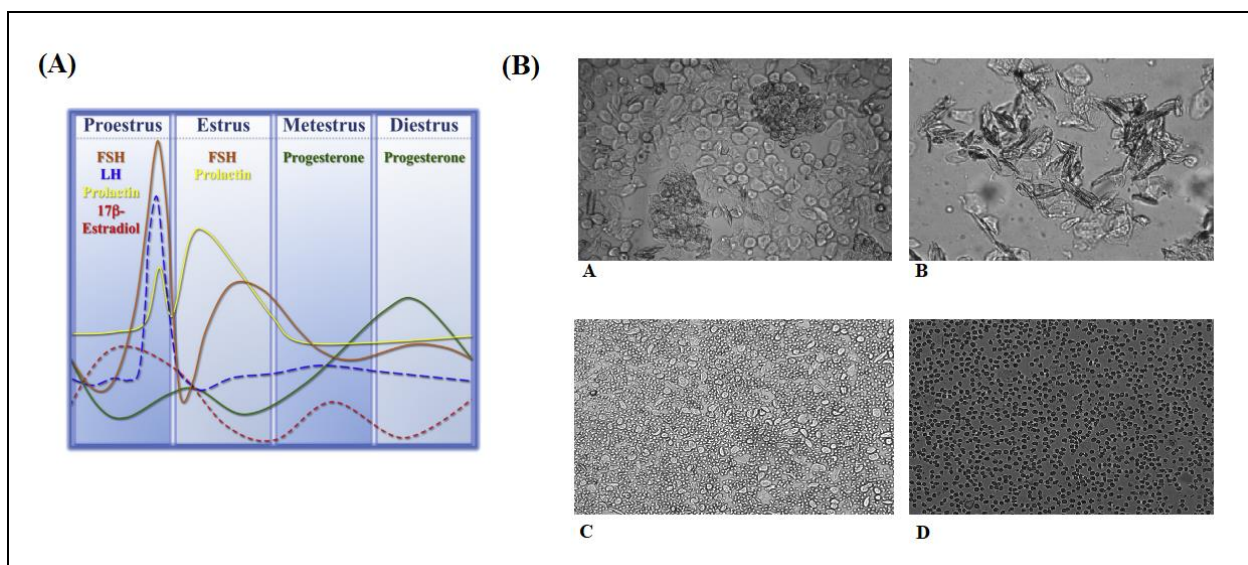


Figura 1: Fases do ciclo estral de roedores. (A) Hormônios envolvidos em cada fase do ciclo estral, figura extraída de Bertolin & Murphy, 2014; (B) Citologias vaginais com o aspecto de cada fase do ciclo estral: A – Proestro; B – Estro; C – Metaestro; D – Diestro. Imagens do Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (Laber).

Os ovários: descrição, morfofuncionalidade, endocrinologia e importância para a concepção.

Os ovários são estruturas ovaladas, pares, e responsáveis pela produção de gametas (oócitos), bem como de hormônios esteroides (estrógeno e progesterona). Estes hormônios são necessários para o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários femininos e atuam sobre as tubas uterinas e o útero, favorecendo o desenvolvimento embrionário inicial e a implantação, respectivamente (Costerman et al, 2019; Saraiva, 2010).

Histologicamente, cada ovário é constituído por uma região cortical e uma medular. Esta segunda contém tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Por sua vez, na região cortical encontram-se folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento em seu tecido conjuntivo, sendo estes responsáveis por proporcionar o microambiente adequado para o oócito em desenvolvimento (Ross, 2016). Cada folículo abriga um único oócito e seu tamanho indica o estado de desenvolvimento deste oócito. As fêmeas já nascem com o seu número de folículos definido em sua vida fetal, e estes irão se desenvolver ou entrar em processo de atresia até a menopausa (Sanchez et al, 2012).

O ovário requer nutrientes, hormônios e sinais regulatórios para produzir folículos saudáveis e viáveis, especialmente o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1) e o fator endotelial vascular de crescimento (VEGF), que estão diretamente envolvidos no desenvolvimento dos oócitos (Cardoso et al, 2021). O IGF1 promove a proliferação das células da granulosa e participa dos eventos que controlam a produção de hormônios foliculares, enquanto o VEGF tem

importante atividade pró-angiogênica, com efeitos mitogênicos e antiapoptóticos sobre células endoteliais (Cardoso et al, 2021).

Antes do início da puberdade, todos os folículos do córtex ovariano estão em estágio de folículo primordial, e abrigam um oócito primário. Os oócitos se originam das células germinativas primordiais (PGCs). As PGCs têm origem ainda durante o desenvolvimento embrionário da fêmea, e passam por uma fase proliferativa de mitoses que irão se estender até o evento de formação dos folículos primordiais, quando então as divisões mitóticas param e as células germinativas iniciam a meiose, tornando-se oócitos primários (Sánchez & Smiths, 2012). A meiose se inicia com um estágio de prófase, uma fase complexa que é subdividida em cinco estágios: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. No primeiro período da prófase, uma série de eventos ocorre, dentre eles o “crossing over”, fenômeno caracterizado pela troca de material genético entre os cromossomos homólogos. Subsequentemente, os oócitos progridem para o estágio de diplóteno, onde entram em uma fase de repouso prolongado. Eles ficarão estagnados em diplóteno (da meiose I) até que, na puberdade da fêmea, o LH induza a maturação final do oócito (Ross, 2014; Sánchez & Smiths, 2012).

A secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo dá início à puberdade, é um pré-requisito para a indução da menarca e resulta em uma liberação de FSH e LH por parte da hipófise. A liberação dessas gonadotrofinas culminará no início do desenvolvimento folicular e dos ciclos ovulatórios da fêmea. O FSH atua principalmente para promover o crescimento folicular, a proliferação de células da granulosa, a aromatização de andrógenos a estrógenos e a expressão dos receptores de LH (Sánchez & Smiths, 2012). O LH é necessário para o crescimento folicular, particularmente nos estágios finais, e indução da ovulação. Ambas as gonadotrofinas promovem a secreção de hormônios gonadais, ou seja, estrogênio e progesterona, necessárias à execução adequada do programa de desenvolvimento

folicular, para a manutenção das características sexuais secundárias e para a ciclicidade reprodutiva (Sánchez & Smitz, 2012).

De acordo com o seu estágio de desenvolvimento, os folículos ovarianos podem ser classificados conforme as características morfológicas, tais como formato e estratificação das células foliculares e aparecimento do antro (Ross, 2016; Saraiva, 2010). As diferentes classes de folículos ovarianos serão descritas a seguir (Ross, 2016; Kastelic, 2004 - Figura 2):

1. *Primordiais*: tipo predominante nos ovários, estes folículos possuem um oócito com cerca de 30 µm de diâmetro, contendo um grande núcleo central, circundado por uma única camada de células foliculares pavimentosas. Os oócitos desses folículos primordiais permanecem quiescentes até serem estimulados para o crescimento. Quando as células se tornam cuboidais, os folículos são então ativados. Assim, esta fase pode ser histologicamente subdividida em “primordial quiescente” e “primordial ativado”. O desenvolvimento dos folículos primordiais é independente do estímulo de gonadotrofinas.

2. *Primários*: divididos em uni ou multilaminares, caracterizam-se pelo aumento de tamanho do oócito e da proliferação das células cúbicas que dão origem a um epitélio estratificado composto por células da granulosa (CG). À medida que o folículo continua seu crescimento, forma-se a zona pelúcida, um revestimento extracelular oriundo da secreção de glicoproteínas ácidas sulfatadas. Ainda nesta fase, formam-se a teca interna e externa, camadas de tecido conjuntivo que circundam um oócito em crescimento e desenvolvimento. Uma única camada de CG caracteriza um “folículo primário unilaminar”, enquanto mais de duas camadas de CG o denominam como “folículo multilaminar ou pré-antral”. O desenvolvimento dos folículos primários também é independente de gonadotrofinas.

3. *Secundários*: a continuação da proliferação das células da granulosa depende do FSH liberado pela adenohipófise. Sob esta ação, quando as CG alcançam uma espessura de seis a 12 camadas,

aparecem cavidades repletas de líquido folicular rico em ácido hialurônico entre estas células. As cavidades então se coalescem e formam o antro ao redor de um oócito de posição excêntrica e com um diâmetro de aproximadamente 125 μm . O antro é aumentado ao redor do oócito, que fica ligado ao cúmulo oóforo, região espessada de CG. As células do cúmulo oóforo que circundam imediatamente o oócito e ao qual permanecem associadas no momento da ovulação, denominam-se coroa radiada.

4. *Terciários ou de Graaf*: estes folículos contêm um oócito secundário maduro, também chamado de Graaf, com diâmetro de 10 mm ou mais, tamanho este que provoca abaulamento na superfície do ovário. Em resposta a um pico de LH, a primeira divisão meiótica iniciada durante o período embrionário nos folículos primários é então reiniciada, e ocorre a ruptura do folículo com liberação do oócito (ovulação). As CG e a teca sofrem luteinização e passam a produzir progesterona, dando origem ao chamado corpo lúteo (CL).

Durante a fase folicular do ciclo estral (em mamíferos) ou menstrual (em mulheres), folículos selecionados para prosseguirem até os estágios mais avançados de desenvolvimento, irão liberar o oócito por um processo denominado ovulação ou oocitação, o qual ocorre em resposta ao pico de LH pré-ovulatório (Saraiva, 2010). Neste processo, as células da granulosa desempenham um papel essencial no desenvolvimento folicular, uma vez que são responsáveis pela produção de hormônios esteroides e fatores para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência folicular (Matsuda et al., 2012; Jiang et al., 2010; Sugiura et al., 2005). A quantificação do número e do tamanho de folículos antrais, bem como sua correlação com as células da granulosa, são foco de estudos que investigam a qualidade reprodutiva e fertilidade de animais e até de oócitos humanos submetidos à fertilização *in vitro* (FIV) (Costermans et al, 2019; Schumacher et al., 2018; Lai et al., 2013; Knopman et al., 2012).

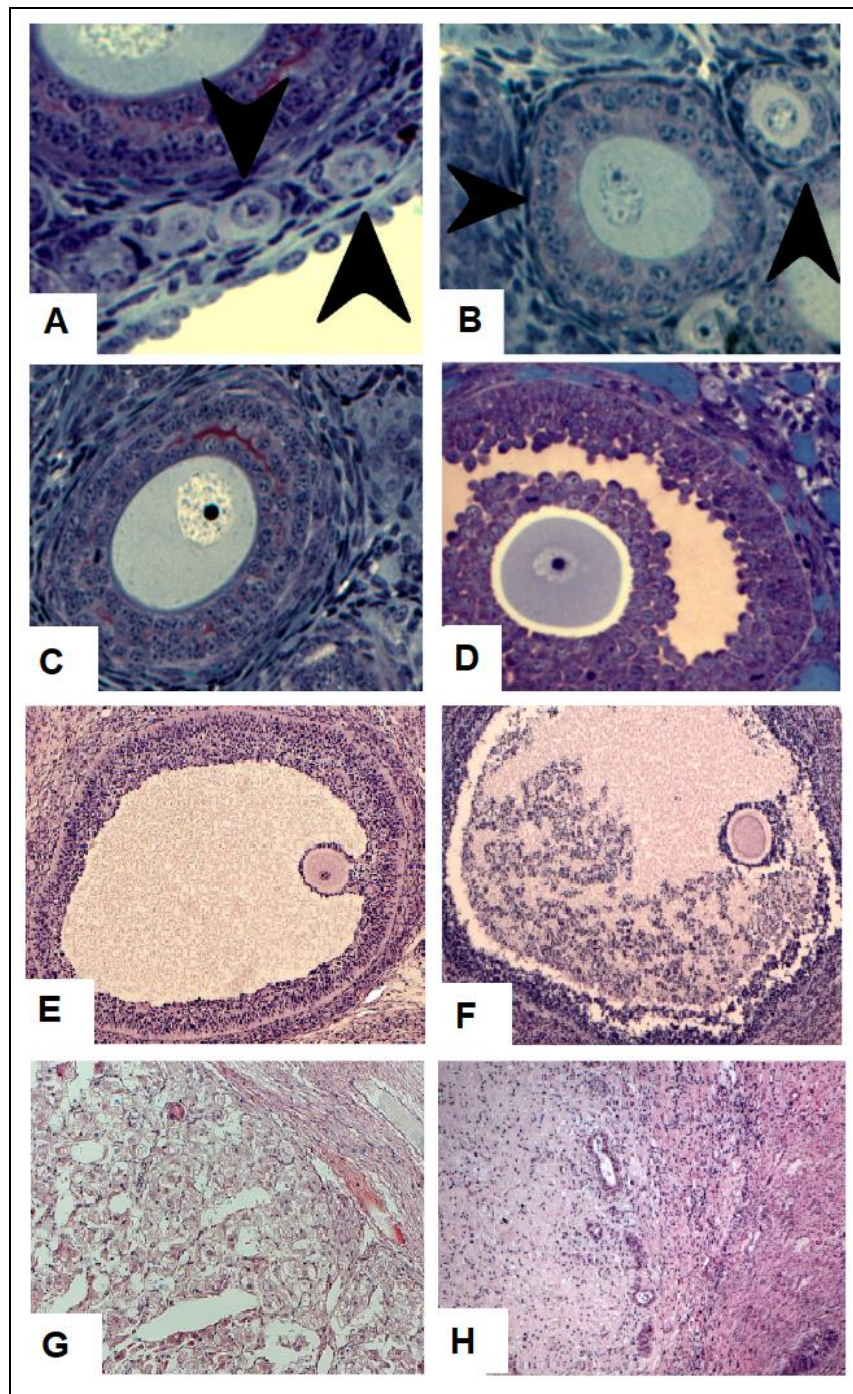


Figura 2: Fotomicrografias dos tipos foliculares encontrados nos ovários de camundongos. A: Seta à esquerda: primordial quiescente; Seta à direita: primordial ativado; B: Seta à esquerda: primário multilaminar (pré-antral); seta à direita: primário unilaminar; C: secundário ou antral com menos de 5 camadas de CG; D: secundário ou antral com mais de 5 camadas de CG; E: terciário ou de Graaf; F: atrésico; G: corpo lúteo; H: corpo albicans. Créditos da imagem: adaptado de Carvalho et al, dados não publicados.

A fertilização.

Caso o óocito liberado após a ovulação seja fertilizado, o embrião formado sofrerá várias divisões mitóticas ainda no interior da tuba uterina, até o estágio de mórula, quando adentra o útero. Neste local, o embrião evolui para o estágio de blástula ou blastocisto, apresentando duas populações celulares distintas: a massa celular interna e o trofoblasto (camada externa) (Florman e Ducibella, 2006). A implantação do embrião ocorre em função da interação entre o útero (endométrio) e o blastocisto, permitindo o desenvolvimento fetal subsequente. Dessa forma, a implantação possibilitará a interação vascular entre as interfaces materna e fetal e posterior formação da placenta, que terá início no oitavo dia de gestação em camundongos. O período gestacional total em camundongos varia de 18 a 21 dias (Florman e Ducibella, 2006). Aos 11,5 dias de gestação (DG) em camundongos, há placentas completamente formadas, mas ainda com tamanho reduzido; já aos 17,5 DG, placentas em seu estágio máximo de desenvolvimento e tamanho poderão ser encontradas (Crow et al., 2014). Em humanos, o período gestacional médio varia entre 37 a 41 semanas, sendo a placenta funcional a partir da 12^a semana (Moore, 2013).

Se não ocorrer a fertilização, os folículos de Graaf prosseguem para a formação do corpo lúteo (CL) (Figura 1). O CL é formado a partir do folículo terciário após ovulação e é constituído pelas CG e da teca remanescentes. À medida que o CL começa a se formar, vasos sanguíneos e linfáticos crescem dentro da camada da granulosa e secretam progesterona e estrogênios. Tal secreção estimula o crescimento do endométrio, que irá se preparar para a implantação do zigoto, caso ocorra uma fertilização do óocito secundário. Mesmo não havendo fertilização, o CL se mantém ativo por 14 dias, quando então degenera e sofre involução, formando uma cicatriz de aspecto amarelado denominada corpo *albicans* (Ross, 2016; Matsuda et al., 2012).

Conforme previamente mencionado, a maioria dos folículos em todas as fases de desenvolvimento sofre processo de apoptose das CG ao longo da vida, desaparecendo por meio de

um processo denominado atresia folicular ovariana (Figura 1). Este processo é caracterizado por parada de mitoses nas CG, separação dessas CG da lâmina basal e morte do oócito que anteriormente era circundado por elas. Os folículos atrésicos encolhem e, por fim, desaparecem do estroma do ovário, em consequência de fagocitose via macrófagos. Seu espaço é então ocupado pelas células do estroma circundante (Ross, 2016, Sugiura et al., 2005).

Embora a atresia folicular ocorra desde a vida fetal até a menopausa, ela é grandemente acentuada ao nascimento da fêmea, e durante a sua puberdade e gestação (Sugiura et al, 2005). Na atresia de folículos em crescimento, pode-se descrever, em sequência (Ross, 2016): início da apoptose nas células da granulosa; invasão da camada da granulosa por neutrófilos e macrófagos; invasão da camada granulosa por filamentos de tecido conjuntivo vascularizado; descamação das células da granulosa no antro do folículo; hipertrofia das células da teca interna; colapso do folículo à medida que a degeneração continua; e invasão do tecido conjuntivo na cavidade do folículo.

Placenta: estrutura e função.

A placenta é a interface de troca entre mãe e feto, sendo responsável pelo transporte de nutrientes, gases e substratos energéticos que permitem o desenvolvimento fetal adequado nos mamíferos eutérios. Tanto em humanos quanto em roedores, a placenta é do tipo discoidal, pois apresenta formato discoide, sendo a interação materno-fetal restrita a esta área circular em comum denominada cotilédone (Burton et al, 2006). Roedores apresentam um único cotilédone por feto, enquanto humanos possuem um grupo de cotilédones formando sua estrutura discoide. Do ponto de vista desta interação, as placentas de primatas e roedores caracterizam-se tipicamente por uma invasão dos tecidos maternos pelos vasos fetais, sendo o trofoblasto (camada externa do blastocisto) diretamente banhado pelo sangue da mãe. A este tipo de barreira materno-fetal em íntimo contato, dá-se o nome de placentação hemocorial (Burton et al, 2006) (Figura 3; Quadro 1).

Comparando-se os números de camadas placentárias, as placentas de roedores são tricoriais, com três regiões distintas de células trofoblásticas (duas camadas de células sinciciais - synt I e synt II - e a célula endotelial voltada para o lúmen do vaso de circulação sanguínea fetal), enquanto as humanas possuem apenas duas (células mesenquimais fetais e endotélio fetal).

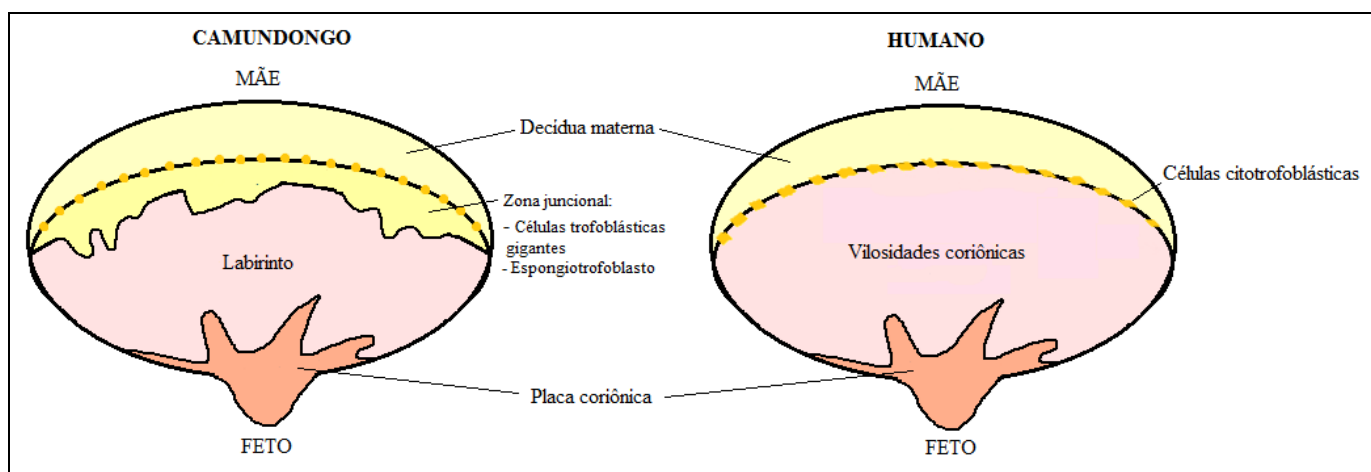


Figura 3: Desenho esquemático mostrando a disposição das regiões placentárias comparativamente entre camundongos e humanos. Fonte: elaborado pela autora, adaptado de Croy et al, 2014.

Tabela 1: Estudo comparativo das principais estruturas morfológicas presentes em placentas de humanos e camundongos.

Camundongo	Humano	Localização da estrutura	Função geral
Células trofoblásticas (CT) Gigantes	Células citotrofoblásticas	Componente da camada mais externa da placenta (CT gigantes) ou entre o sincício e o mesênquima fetal placentário (citotrofoblasto).	Mediar a implantação e invasão uterina; regulação do fluxo sanguíneo placentário.
Espongiotrofoblasto	Não possui	Camada estrutural que forma a zona juncional da placenta do roedor; ausente em humanos.	Suporte nutricional até o crescimento do labirintotrofoblasto.
Labirintotrofoblasto	Vilosidades coriônicas	Camada interna da placenta, recoberta por sinciciotrofoblasto.	Troca direta entre sangue fetal e materno.

Adaptado de Rossant & Cross, 2001

Morfológicamente, a formação da placenta (humana e de roedores) inicia-se quando ocorre a implantação do blastocisto no endométrio uterino. Células do trofoblasto fetal inserem-se no

endométrio e se diferenciam em dois subtipos de tecidos: o sinciciotroblasto, formado por células multinucleadas em contato com os tecidos maternos, envolvendo o conceito pré-formado; e o citotroblasto, composto por células uninucleadas originalmente formadas na parede do blastocisto, em rápida divisão celular. O crescimento de cito e sinciciotroblasto levam à invasão dos tecidos maternos, seguindo-se a formação de vacúolos que coalescem em lacunas dentro do sinciciotroblasto. Quando a implantação é dita completa, o feto está totalmente incorporado à parede uterina, e recoberto pelo epitélio endometrial (Crow et al, 2014; Burton et al, 2006). Em camundongos, entre os dias 10,5 e 11,5 de gestação, tem-se uma estrutura placentária definitiva (Burton et al, 2006).

A estrutura placentária de camundongos é histologicamente dividida em três regiões distintas, que se iniciam a partir da decídua materna: zona juncional, labirintotroblasto e placa coriônica (Figura 4). Mais distal ao feto, a decídua materna ou basal é composta por células endometriais modificadas com núcleos basofílicos pálidos, citoplasma eosinofílico e bordas celulares indistintas. Estas células servem como fagócitos durante o remodelamento placentário e secretam fatores de crescimento, hormônios e citocinas. Células *natural killer* uterinas (uNK) também compõem a decídua, e são responsáveis por função imunológica e angiogênica (Croy et al, 2014). Na decídua, também são encontrados os vasos maternos sob a forma de artérias espiraladas e seios venosos, que formam uma rede vascular. Esta rede vascular está inserida na placenta sob a forma de um canal envolvido por células trofoblásticas gigantes de canal (CTG-C) e atravessa todo o tecido em direção ao labirintotroblasto.

O primeiro compartimento fetal inferior à decídua é estreito e avascular, denominado zona juncional. Ele é composto por células trofoblásticas gigantes parietais (CTG-P) e espongiotroblasto. As células gigantes parietais são grandes e possuem núcleo bem destacado e basofílico, rodeado por um abundante citoplasma eosinofílico. Já o espongiotroblasto é um tecido rico em depósitos de glicogênio e inúmeras células ovais pequenas com núcleos basofílicos

e citoplasma escasso. Entre a placa coriônica e a zona juncional, observa-se o labirintotrofoblasto, formado por células de origem tanto materna, quanto embrionária. Esta região é composta por uma rica rede de capilares fetais banhados por sangue materno oriundos das artérias espiraladas maternas que adentraram a zona juncional. É no labirinto que ocorrem as trocas efetivas de nutrientes, gases e metabólitos materno-fetais. Estes canais fetais, que são caracterizados pela ausência de tecido endotelial, são envolvidos e separados do sangue materno por uma barreira celular composta de células trofoblásticas gigantes mononucleadas denominadas sinusoidais (CTG-S). Durante o desenvolvimento fetal, pode-se diferenciar hemácias não-nucleadas maternas espalhadas por espaços denominados sinusoides e grandes hemácias fetais, nucleadas, dentro dos canais. A porção placentária final é formada pela placa coriônica, composta por grandes vasos sanguíneos que penetram nesta placa e são conectados aos vasos do cordão umbilical (Croy et al, 2014).

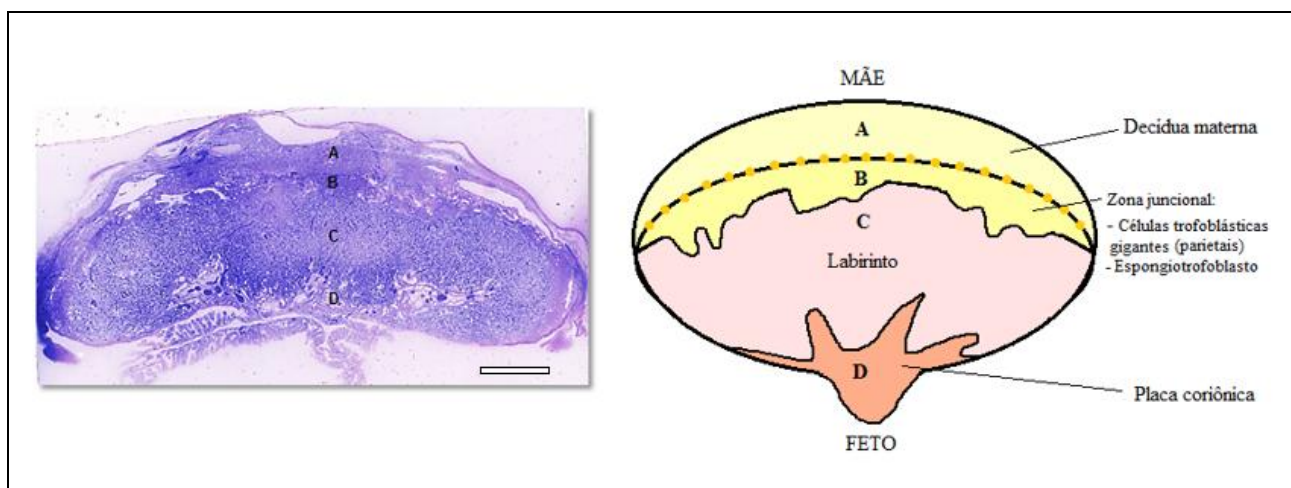


Figura 4: Fotomicrografia de corte de placenta de camundongo no terço final da gestação (17,5 dias gestacionais-DG), mostrando as diferentes regionais da placenta. A: decídua materna, B: zona juncional, C: labirinto e D: placa coriônica. Os vasos da placa coriônica irão formar o cordão umbilical. Barra: 416,7 μ m

A angiogênese placentária é fundamental para a manutenção da gestação (Reynolds et al,

2010). Alguns fatores de crescimento e fatores reguladores do fluxo sanguíneo participam ativamente do processo de formação dos vasos sanguíneos placentários desde a implantação até a maturação completa da placenta. Dentre eles, destaca-se o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) placentário, sintetizado pelas células trofoblásticas gigantes. Ao interagir com um de seus receptores, como o Flk1, o VEGF promove a migração celular, a proliferação de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular (Plaisier et al, 2007), o que permitirá a formação adequada dos vasos sanguíneos placentários que participarão das trocas materno-fetais durante a gestação.

Restrição intrauterina de crescimento e suas consequências.

No decorrer da gestação, os tecidos que compõem a interface materno-fetal possibilitam que os nutrientes ingeridos pela mãe sejam direcionados ao embrião/feto para sua ontogênese. Em contrapartida, metabólitos fetais são direcionados da circulação fetal à materna para serem excretados pela mãe. Uma nutrição inadequada ou intercorrências neste processo de troca poderão interferir negativamente no desenvolvimento embrionário/fetal, repercutindo na saúde do indivíduo até mesmo na sua idade adulta.

Um exemplo de intercorrência negativa neste processo é a restrição intrauterina de crescimento (RIUC), também conhecida como “hipótese do fenótipo econômico” (Hales e Barker; 2001). Esta hipótese propõe que um ambiente intrauterino precário levaria a uma resposta adaptativa fetal, favorecendo o crescimento de órgãos-chave como o cérebro, em detrimento de outros, como as vísceras, provocando uma restrição de crescimento fetal assimétrica (Almeida e Dias, 2022). Desta forma, a priorização de “órgãos-chave” teria como objetivo aumentar as chances de sobrevivência do embrião, mas resultaria em um metabolismo pós-natal alterado que poderá perdurar durante toda a vida deste indivíduo, uma vez que órgãos metabólicos importantes como fígado, pulmões e intestinos tiveram seu desenvolvimento

prejudicado durante a fase intrauterina (Almeida e Dias, 2022; Gottlieb et al., 2008).

A cafeína e seus metabólitos, por atravessarem facilmente as membranas placentárias, pode estar relacionada à ocorrência de RIUC e futuras complicações metabólicas (resistência à insulina, hipertensão, obesidade, dislipidemias e outras doenças crônicas não-transmissíveis) em indivíduos de qualquer idade. Experimentos realizados por nosso grupo de pesquisa, que inclusive serviram de base para o presente trabalho, alertam para uma menor irrigação por sangue materno na placenta e fetos com menores proporções peso hepático em relação ao peso cerebral: um indicador claro de ocorrência de RIUC em dosagens consideradas seguras do consumo de cafeína por gestantes.

Cafeína: impactos sobre o ciclo reprodutivo da fêmea.

A cafeína é uma molécula capaz de atravessar as membranas placentárias e glândulas mamárias, atingindo rapidamente a circulação fetal e do bebê (Dews, 2011). Como o feto/criança é incapaz de metabolizá-la adequadamente em seus tecidos hepáticos, é exposto ao mesmo nível de cafeína ingerido pela mãe durante várias horas pós-exposição (Mose et al, 2008; Leon et al, 2002; Arnaud, 1987).

Nos animais, o consumo de cafeína durante a gestação está negativamente associado a alterações, tais como redução da implantação embrionária, baixos pesos placentário e do recém-nascido, restrição intrauterina de crescimento, maior incidência de abortamentos e natimortalidade, aumento da expressão de marcadores apoptóticos e alteração da formação dos tecidos placentário, nervoso, articular e ósseo (Paula et al, 2017; Ma et al, 2015; Reis et al, 2015; Huang et al, 2012; Ballesteros-Yanez et al, 2012; Momoi et al, 2008).

Huang et al. (2012) relataram alterações reprodutivas em camundongos fêmeas tratadas com cafeína. Todos os animais tratados não só reduziram a taxa de concepção total, mas também tiveram um ganho de peso materno inferior durante a prenhez. Yadegari et al. (2016), utilizando

doses intraperitoneais de 150 mg/kg/dia de cafeína em ratos albinos fêmeas durante os cinco primeiros dias gestacionais (DG), relataram que o grupo tratado apresentou uma diminuição significativa dos sítios de implantação, bem como do número de nascidos vivos, sugerindo que a cafeína poderia causar efeitos antifertilidade.

Silva et al (2013), após exposição de ratas a doses orais de 0,3 g / L de cafeína (diluída em água), sugeriram que a exposição da ninhada à cafeína durante a gestação e lactação teve efeitos deletérios sobre o desenvolvimento neuronal, hiperativação hipocampal, susceptibilidade a convulsões e déficits cognitivos que poderiam permanecer mesmo na vida adulta. Serapiao-Moraes et al. (2013) relataram que a prole de camundongos gestantes C57BL/6 tratados com doses diárias de cafeína subcutânea de 20 mg/kg durante a gestação, tiveram menor ganho de peso durante o crescimento e diminuição da taxa metabólica basal. Os animais adultos também apresentaram aumento no tamanho dos cardiomiócitos e menor vascularização do tecido cardíaco.

Adicionalmente, anormalidades ósseas são descritas em fetos de mães tratadas com cafeína. Olchowik et al. (2011) relataram que a ingestão de 30 mg/dia de cafeína durante a gestação afetou negativamente o tecido ósseo em ratos. Tomaszewski et al. (2012), utilizando microsonda de raios-X para examinar fêmeas de fetos de ratos tratados com 30 mg/dia de cafeína, observaram que a diminuição da mineralização óssea era dominante no grupo tratado.

Mesmo havendo diversos estudos que investigam o nascimento e desenvolvimento da prole, estudos descrevendo alterações histomorfológicas e fisiológicas placentárias pós-exposição à cafeína ainda são escassos. Huang et al (2012), avaliando um consumo de 180 mg/kg de cafeína durante a gestação em ratos Wistar, observaram regiões edematosas no retículo endoplasmático, expansão das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, degranulação dos ribossomos e condensação da heterocromatina em células trofoblásticas. Além disso, foi demonstrado no estudo de Ma et al (2015) um aumento da apoptose e inibição da angiogênese após exposição à cafeína. É importante notar que a maioria dos estudos com animais aponta para um provável

comprometimento da formação do labirinto placentário, provavelmente causado por anormalidades circulatórias (Bolon, 2014).

Muito já foi concluído sobre o efeito da cafeína em animais, embora os mecanismos mediadores desses efeitos ainda permaneçam obscuros. Mais estudos são necessários para demonstrar as alterações estruturais causadas pela cafeína durante o desenvolvimento placentário, e se tais alterações também poderiam ocorrer em seres humanos.

Uma vez que em humanos a maior parte das informações obtidas é resultante de estudos epidemiológicos, a quantificação de cafeína ingerida tem sido feita a partir de biomarcadores sanguíneos ou urinários na tentativa de se obter um resultado mais preciso. No entanto, todos esses biomarcadores são influenciados pela meia-vida dos metabólitos e o tempo em que a amostragem foi realizada. Outros fatores como tabagismo, idade gestacional e vômitos exacerbados também influenciam os resultados (Greenwood et al, 2014; Grosso et al, 2008; Grosso & Bracken, 2005). Neste sentido, um estudo tentou estabelecer uma associação entre a quantificação de cafeína ingerida e a análise de urina materna, do sangue do cordão umbilical e do autorrelato de consumo materno (Grosso et al, 2008). Os autores concluíram que os biomarcadores de soro e urina não refletem a real exposição à cafeína durante a gestação, sugerindo que o autorrelato materno seria a melhor maneira de estimar o consumo diário de alimentos ricos em cafeína. Portanto, um estudo em humanos envolvendo o consumo de cafeína autorrelatado durante a gestação torna-se susceptível a vários tipos de vieses, tais como: seleção, desempenho, detecção, relato e outros (Jahanfar & Jaafar, 2015).

Embora estudos utilizando roedores mostrem evidências sobre os efeitos deletérios do consumo de cafeína durante a gestação, estudos realizados em humanos envolvendo ingestão de cafeína e a gestação são inconclusivos desde 1970. Vários destes não encontraram qualquer relação entre o consumo de cafeína e anormalidades fetais: esta relação foi encontrada apenas em gestantes fumantes e/ou etilistas que consumiam altas doses de café (Olsen, 1991; Peacock et al,

1991; Linn et al, 1982). Neste sentido, Bech et al (2005) realizaram um estudo de coorte para determinar se o consumo de cafeína durante a gravidez estaria associado à morte fetal no terço final da gestação. Os resultados mostraram que o consumo materno de mais de 8 xícaras/dia de café aumentou a mortalidade fetal, especialmente após 20 semanas de gestação. No entanto, o mesmo grupo em 2007, realizou um estudo randomizado duplo-cego, comparando a duração da gestação e o peso ao nascer de 1207 mulheres grávidas que consumiram café instantâneo com cafeína ou descafeinado. Eles concluíram que uma redução moderada no consumo de cafeína no segundo trimestre gestacional não fez efeito algum sobre as características avaliadas.

Del Castillo et al (2015), usando um estudo transversal com 1175 mulheres, investigaram se a ingestão de cafeína durante a primeira metade da gestação prejudicaria o desenvolvimento fetal. Embora tenham encontrado redução de peso no recém-nascido de mães que consumiram altas doses de cafeína, não foram encontradas relações entre a ingestão de cafeína, o baixo peso ao nascer (definido como peso ao nascer inferior a 2.500 g) e a prematuridade.

Em contraste, outros estudos sugeriram a ocorrência de efeitos nocivos pelo consumo excessivo de cafeína em mulheres durante a gestação. Alguns autores demonstraram uma maior frequência de atraso do crescimento fetal intrauterino de mães que consumiram cafeína no terceiro trimestre de gestação (Gaskins et al, 2016; Del Castillo et al, 2015; Martin & Bracken, 1987; Stein & Susser, 1991). Os abortos espontâneos e/ou as malformações fetais também estiveram associados ao consumo desta substância, embora a complexidade metodológica e a dificuldade para medir a ingestão de cafeína limitassem uma conclusão mais precisa (Browne et al, 2007; Van 't, 1982). Gaskins et al (2016), utilizando um estudo prospectivo de coorte, identificaram uma tendência linear entre o consumo de mais de 400 mg de cafeína/dia (aproximadamente 4 doses de café) antes da gestação e a ocorrência de aborto espontâneo (AE) até 20 semanas de gestação em mulheres sem história de AE. Em comparação com as mulheres que não consumiram café durante o período pré-gestacional, o risco de AE aumentou em 20%. Outras bebidas cafeinadas relatadas

pelos pacientes não foram associadas a este risco. Resultados semelhantes foram previamente descritos por Weng et al (2008), que observaram em seu estudo de coorte prospectivo que mulheres grávidas que ingeriram mais de 200 mg de cafeína durante a gestação aumentaram o risco de aborto em até 25%.

Modelos de perfusão *in vitro* e *ex vivo*, como células cultivadas de placenta humana, também foram explorados na tentativa de estabelecer uma dose segura de consumo de cafeína durante a gestação (Partosch et al, 2015; Grant, 2012; Poulsen et al, 2009). Em 2014, uma perfusão *ex vivo* da placenta humana provou que a cafeína atravessa livremente o tecido por difusão passiva, conforme relatado anteriormente, independentemente da dose utilizada (Poulsen et al, 2009). Utilizando um modelo *in vitro*, Grant et al (2012) observaram que a cafeína inibe a invasão e a motilidade do trofoblasto, o que poderia levar a distúrbios na gestação, como aborto e pré-eclâmpsia. Assim, de acordo com esses autores, o consumo de cafeína na gestação deveria ser desencorajado. Além disso, Partosch et al (2015), usando um modelo cinético fisiologicamente baseado para simular a concentração de cafeína no sangue de mulheres não grávidas e grávidas, recomendou que as doses diárias de cafeína ingerida devessem ser inferiores a 200 mg, sempre divididas em porções separadas ao longo do dia.

Muitas metanálises foram realizadas associando-se ingestão de cafeína e desfechos adversos durante a gestação. No entanto, até agora, apenas resultados inconclusivos foram encontrados. Em suas metanálises atualizadas periodicamente com ensaios clínicos randomizados em humanos, Jahanfar e Jaafar (2015; 2013; 2009) declararam que não há evidências suficientes para apoiar alterações na ingestão máxima de recomendação de cafeína pela mãe em transtornos gerais de gestação, sendo também confirmado por Greenwood e colegas (2014). Por outro lado, outras metanálises de estudos observacionais associaram o consumo de cafeína a vários resultados negativos durante a gestação. Li e cols (2015) avaliaram o consumo de café e cafeína com o aborto espontâneo e encontraram uma associação dose-dependente que apontava para um risco

potencial do término gestacional precoce. Rhee et al (2015) focaram sua metanálise em estudos de coorte e de casos-controle que relacionaram o consumo dependente da dose de cafeína durante a gestação e a ocorrência de recém-nascidos de baixo peso ao nascer (baixo peso ao nascer – BPN). Os resultados mostraram que, para cada aumento de 100 mg de cafeína consumida durante a gestação, a incidência de BPN aumentou em 3%, sendo este aumento linear de acordo com a dose consumida.

Após o nascimento do bebê, o tempo de meia-vida da cafeína no organismo materno retorna aos níveis fisiológicos em até uma semana (Knutti et al, 1981). Entretanto, sua capacidade de rápida difusão através dos tecidos permanece inalterada, e a substância, se consumida na lactação, passa a ter livre passagem via ductos lactíferos até o organismo do recém-nascido, atingindo o seu pico em torno de 1h após o consumo da substância pela mãe. O *clearance* de cafeína do recém-nascido a termo ou prematuro, por sua vez, é mais lento até os cinco meses de idade, fazendo com que a substância circule e se difunda pelos seus tecidos por mais tempo que o esperado (McCreedy et al, 2018; Mc Namara et al, 2004).

Apesar desta constatação de passagem de cafeína através do leite materno, a maioria dos estudos não mediu a atividade ou consequência metabólica de tal fato (Lactmed, 2022). Berlin e colaboradores, em 1984, detectou a presença de cafeína em leite materno de 11 mulheres que consumiram acima de 100 mg, sendo que a os níveis detectáveis permaneceram por 6,1h após a ingestão. Em 2021, Musatadi e equipe constataram a presença de quantidades variáveis de cafeína em nutrizas anônimas que doaram voluntariamente amostras de leite materno, sem, entretanto, um relato de seu consumo prévio de cafeína. Em 1985, em um estudo onde onze nutrizas consumiram aleatoriamente 5 xícaras de café comum ou descafeinado com um total de 500 mg de cafeína adicionada diariamente, por 5 dias, seus bebês de 45 dias receberam em média uma dose de leite contendo pelo menos 3,1mg/L de cafeína, para os casos não-controle (Ryu et al, 1985). Vale lembrar que a dose recomendada para recém-nascidos é de zero miligramas de ingestão diária

(LactMed, 2022).

Um estudo polonês recente feito com 100 nutrizes que relataram consumo prévio de cafeína através de inquéritos alimentares, encontrou uma forte correlação entre a ingestão de cafeína com base na alimentação de 3 dias e o conteúdo desta substância no leite. Paraxantina, teobromina e teofilina, os metabólitos derivados, foram encontradas. Neste estudo, a maior quantidade de cafeína no leite foi detectada após quatro semanas de lactação (Purkiewicz et al, 2022). Estudos feitos com bebês de 14 dias a 19 semanas de vida, cujas mães ingeriram de uma a três xícaras de café por dia, detectaram a presença de cafeína na saliva e urina dessas crianças entre 1 e 6h após a amamentação, sugerindo a livre passagem da substância para o corpo do bebê (Vohra et al, 2019; Berlin et al, 1984; Hildebrandt et al, 1983).

Quanto às consequências deste consumo de cafeína maternal para os bebês amamentados, os estudos disponíveis são antigos, escassos e as revisões sistemáticas, inconclusivas. Em sua revisão sistemática em 2018, McCreed define os atuais dados disponíveis sobre o assunto como “de qualidade limitada, com amostras muito pequenas, grupos-controle inadequados e elevado riscos de fatores de confusão”.

Isoladamente, os artigos relacionam o consumo de cafeína por nutrizes a um aumento de inquietação dos bebês, além de alterações no seu tônus muscular, aumento de tremores, cólicas, irritabilidade, baixa qualidade do sono anemia (devido ao fato de a cafeína impedir a absorção do ferro presente no leite materno) (Martín, 2007; Rivera-Calimlim, 1977; Clement, 1989. Rustin 1989). Em seu estudo de coorte, Santos et al (2012) relacionou a baixa qualidade de sono de bebês com os relatos de consumo de cafeína por parte de suas mães, e sugeriu que uma dose de até 300 mg de cafeína não prejudicaria o sono destes recém-nascidos. Em um estudo na Costa Rica com mães de baixa renda, estas foram divididas entre consumidoras pesadas de cafeína (mais de 450 mL/café/dia), ou não-consumidoras (menos de 450 mL/café/dia). Os resultados demonstraram não apenas uma baixa qualidade do sono dos filhos, mas também um menor conteúdo de ferro no leite

materno, além de hematócritos e hemoglobinas baixas nos hemogramas das crianças estudadas em um mês pós-parto (Muñoz et al, 1988).

Uma vez que não existem provas conclusivas o suficiente para se estabelecer uma dose segura de cafeína, a atual indicação da FDA, de 200 a 300 mg/dia, ainda é utilizada na prática clínica e aplicada na maioria dos estudos que avaliam a segurança desta quantidade de cafeína durante a gravidez.

Neste contexto, estudos recentes desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, utilizando fêmeas de camundongos Swiss submetidas ao consumo diário de cafeína antes e durante a gestação, revelaram que o consumo desta substância alterou a duração do ciclo estral (fases lúteas mais prolongadas), bem como reduziu a taxa de prenhez e o número de fetos por fêmea (Paula et al, 2017). Portanto, estes resultados apontaram para um possível efeito antifertilidade da cafeína. Além disso, foi demonstrado que o consumo moderado (120 mg/kg) de cafeína afetou os pesos dos fetos e placentas, com redução dos mesmos, além de provocar uma menor eficiência placentária. Quanto ao aspecto morfológico, não foram observadas alterações nas áreas das diferentes regiões placentárias (zona juncional, labirintotrofoblasto e placa coriônica), tampouco nos grandes vasos que irrigam o labirinto. Entretanto, foi observada no labirinto placentário uma menor irrigação por sangue materno, em detrimento de um aumento do número de vasos fetais e células sinusoidais constituintes desta região placentária (Paula et al, 2017). Este seria o primeiro relato de alterações morfológicas no labirinto placentário decorrente de consumo diário de cafeína.

Alterações na duração do ciclo estral bem como no número de fetos sugerem que a própria função ovariana possa estar comprometida pelo consumo diário desta substância, apresentando efeitos antifertilidade. Estudos acerca dos mecanismos determinantes das alterações reprodutivas decorrentes ao consumo elevado de cafeína durante a gestação ainda são escassos. No entanto, relatos sugerem a contraindicação ou redução desta substância neste período.

Humanos e roedores: uma comparação entre espécies.

Vieses metodológicos são classicamente encontrados em estudos relacionados ao consumo humano de cafeína durante a gravidez. Estudos observacionais de coorte, bem como transversais, evidenciaram resultados variados, embora ainda não tenham conseguido mostrar associação entre a ingestão de cafeína e efeitos adversos na gestação (Jahanfar & Jaafar, 2015; Bracken et al, 2002). Além disso, ensaios clínicos controlados randomizados seriam os mais indicados, mas se revelam difíceis ou mesmo antiéticos. Por outro lado, os estudos com animais mostraram-se mais acessíveis e com resultados fidedignos, que poderiam ser aplicáveis a humanos, embora algumas particularidades devam ser consideradas (Croy et al, 2014).

A placenta é a principal interface de troca entre mãe e feto durante a gestação. Contudo, outras interfaces como as membranas fetais (córion, âmnio e saco vitelino) também devem ser consideradas mesmo que comumente negligenciadas. Considerando que a placenta visa nutrir e controlar a passagem de várias substâncias para o feto, estudos utilizando modelos animais direcionados à aplicação clínica requerem um modelo placentário compatível com características humanas (Silva & Serakides, 2016). Neste contexto, roedores e primatas não humanos parecem representar os melhores modelos experimentais associados à gestação e ao desenvolvimento fetal (Christian & Brent, 2001).

Tanto roedores quanto humanos apresentam o tipo placentário discoide, sendo a interação materno-fetal restrita a uma área circular comum denominada cotilédone (Burton et al, 2006). Placentas de primatas e roedores são caracterizadas por vasos fetais diretamente banhados por sangue materno (placenta hemocorial) (Reynolds et al, 2010; Burton et al, 2006). No entanto, comparando-se a barreira celular formada entre sangue materno e vasos fetais, o número de camadas placentárias de roedores (três camadas) é superior ao de humanos (duas camadas), o que confere ao roedor uma maior resistência a substâncias tais como a cafeína (Rossant & Cross, 2001). Tal resistência resulta em um fator de conversão que extrapola as doses de consumo

humano em modelos de estudos de cafeína utilizando camundongos e ratos, e fatores de correção se tornam necessários para o estabelecimento de uma dose comparável entre estas espécies (Huang et al, 2012; Reagan-Shaw, 2007; Christian & Brent, 2001; Wang, 1999).

A degradação da cafeína e a formação de seus metabólitos também variam de acordo com as espécies estudadas. No entanto, investigações prévias comparando farmacocinética da cafeína em humanos e muitas espécies de animais demonstraram algumas semelhanças (Christian & Brent, 2001). Por exemplo, a absorção de cafeína no trato gastrointestinal atinge 99% em humanos e animais aproximadamente 45 minutos após a sua ingestão (Nehig, 1999). Tanto em humanos como em roedores, a cafeína é metabolizada a três dimetilxantinas. Embora os primatas não-humanos possam inicialmente ser um modelo apropriado que forneça dados valiosos para a extrapolação para seres humanos, o principal metabólito originado pós-metabolização é a teofilina. Conseqüentemente, primatas não-humanos não seriam um bom modelo experimental para avaliar os efeitos da cafeína sobre a reprodução, pois a paraxantina é o metabólito predominante na degradação em humanos e sua função e meia-vida são diferentes da teofilina (Christian & Brent, 2001).

Sendo assim, os roedores – camundongos e ratos – são considerados um bom modelo experimental para estudos em humanos com base nas semelhanças de biodegradação da cafeína (meia-vida similar, além de a paraxantina ser o principal metabólito de degradação da cafeína) e morfologia placentária semelhante, permitindo comparações mais fidedignas (Bracken et al, 2002).

Comportamento, cognição e estudos relacionados.

Estudos comportamentais em animais têm sido cada vez mais utilizados em pesquisas de medicamentos, drogas e substâncias a título de comparação de sua provável ação no organismo humano (Hernier, 2016). Estes testes incluem habilidades de aprendizado, atenção, memória de

curto e longo prazos, cognição, dentre outros. Por cognição, entende-se os processos mentais associados à atenção, à memória, ao aprendizado, ao raciocínio e ao poder de julgamento de um indivíduo (Hernier, 2016). A atenção, por sua vez, consiste em uma maior interatividade e seletividade, incluindo vigilância, e resulta na capacidade de selecionar aspectos pertinentes de uma entrada sensorial (Muir, 1996). O aprendizado se trata da aquisição de um novo comportamento como consequência de uma experiência, seja ela positiva ou negativa (Hernier, 2016). Já a memória é a preservação de determinado comportamento aprendido durante um tempo especificado e com a reprodução desse comportamento aprendido (Millan et al., 2012).

A avaliação dessas funções cognitivas em roedores pode ser relativamente ambiciosa, complexa e demorada. Inúmeros testes são feitos em ambientes obrigatoriamente controlados e por profissionais treinados para tal (Hernier, 2016). De fato, qualquer efeito prejudicial de uma substância farmacológica na atenção, aprendizado, memória ou funções executivas podem ter consequências dramáticas para o indivíduo tratado, e cafeína é uma das substâncias que tem mostrado tais consequências a curto e longo prazo nos testes cognitivos aos quais os roedores são submetidos.

HIPÓTESE

O consumo materno de cafeína durante a gestação e a lactação compromete o desenvolvimento pré e pós-natal, afetando parâmetros reprodutivos e comportamentais na prole, que perduram por gerações subsequentes.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar os efeitos do consumo crônico de cafeína sobre a morfofuncionalidade ovariana, bem como os efeitos transgeracionais do consumo materno diário de doses recomendadas durante a gestação e/ou lactação sobre os desenvolvimentos pré e pós-natal, a morfologia ovariana e os

aspectos cognitivos e comportamentais da prole de camundongos.

Objetivos Específicos

Sempre comparando o consumo crônico de diferentes doses de cafeína (baixo, moderado, alto) à ausência da cafeína (controle), bem como o consumo materno de doses moderadas durante a gestação e/ou lactação, os objetivos específicos foram:

- Avaliar a fertilidade por meio de determinação do ciclo estral, da foliculogênese e de dosagens hormonais de fêmeas nulíparas;
- Avaliar parâmetros reprodutivos tais como duração do ciclo estral, taxa de prenhez, número de implantações e de fetos viáveis das fêmeas das gerações parental, F1 e F2;
- Avaliar o desenvolvimento biométrico pós-natal das proles das gerações F1 e F2;
- Investigar a vascularização placentária por meio de quantificação de vasos e mensuração dos respectivos calibres;
- Investigar a capacidade de proliferação e existência de morte celular placentárias em diferentes estágios gestacionais (terços médio e final);
- Investigar os aspectos comportamentais e cognitivos nas gerações F1 e F2.

METODOLOGIA

Comitê de ética

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA), protocolo nº 395/2015.

Determinação dos experimentos

Ao longo deste trabalho, foram desenvolvidos quatro experimentos: i) Experimento 1 – Estudo da fertilidade de fêmeas nulíparas após o consumo crônico de cafeína abordando aspectos morfofuncionais ovarianos; ii) Experimento 2 - Impacto do consumo crônico da cafeína sobre o desenvolvimento placentário e fetal em modelo murino; iii) Experimento 3 – Avaliação de parâmetros biométricos e reprodutivos em duas gerações subsequentes à exposição pré-natal e neonatal de cafeína; iv) Experimento 4 – Avaliação cognitiva e comportamental da prole adulta das gerações F1 e F2 subsequentes à exposição pré-natal e neonatal de cafeína. Um resumo dos grupos experimentais, bem como das doses de cafeína e análises feitas está esquematizado na Figura 5.

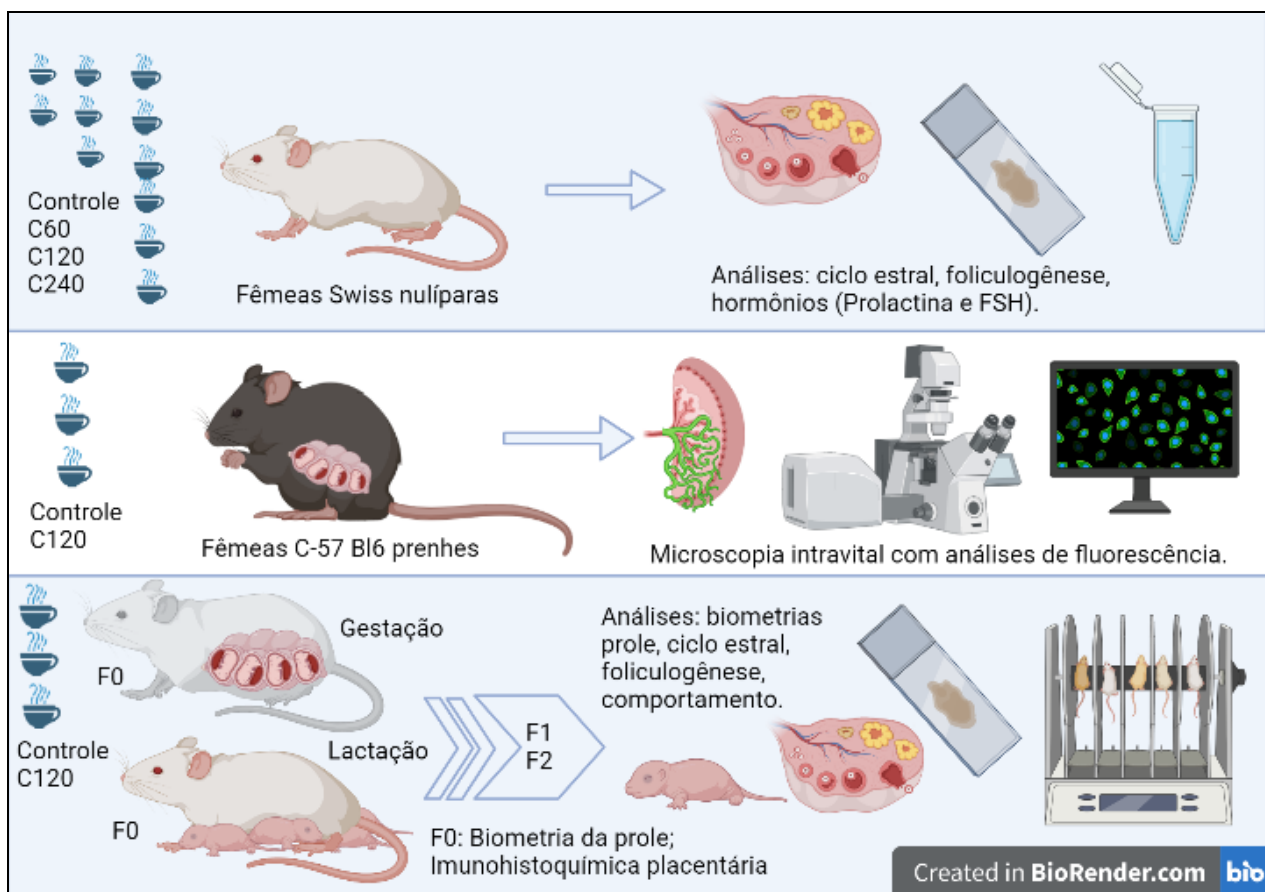


Figura 5: Resumo das metodologias utilizadas nos experimentos deste trabalho. Imagem da autora.

Grupo experimental de análise ovariana sob consumo de cafeína: apenas fêmeas nulíparas (Experimento 1).

Resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa mostraram que o ciclo estral de fêmeas que consomem cafeína de forma crônica mostra-se com maior duração da fase lútea (diestro e metaestro). Para investigar se o desenvolvimento folicular estaria comprometido decorrente ao consumo de cafeína, 20 fêmeas adultas de camundongo Swiss e em idade reprodutiva (oito semanas, média de peso corporal: 30 ± 3 g) foram adquiridas junto ao Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG e mantidas na sala de experimentação animal do departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG em condições padrão de claro-escuro (12h de luz: 12h de escuridão) e temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). Após o período de ambientação, estas fêmeas passaram por lavados vaginais diários para a identificação da respectiva fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro ou diestro), e foram divididas aleatoriamente em quatro grupos experimentais, os quais receberam, via gavagem, água (CC) ou cafeína diluída em água (com um auxílio de um processador ultrassônico) durante trinta dias conforme esquema a seguir:

- Grupo CC (n = 5) – Controle: água via gavagem.
- Grupo C60 (n = 5) – 60 mg/kg de cafeína diluída em água via gavagem.
- Grupo C120 (n = 5) – 120 mg/kg de cafeína diluída em água via gavagem, após sonicação para diluição.
- Grupo 240 (n = 5) – 240 mg/kg de cafeína diluída em água via gavagem, após sonicação para diluição.

Estas doses de cafeína equivalem, respectivamente, a 0, 200, 300 e 600 mg/dia de consumo em humanos, de acordo com o fator de correção para camundongos estabelecido por Wang (2005) e posteriormente aplicado por Huang et al. (2012). Tais doses se referem às duas indicações entre entidades americanas, canadenses e europeias (200 e 300 mg/dia) e a um consumo em excesso, superior às doses recomendadas para adultos normais (600 mg/dia). A cafeína (Sigma-Aldrich -

Reagent Plus®, C0750) foi diluída em água considerando a dose correspondente, sendo a gavagem realizada diariamente em horários fixos, próximos ao período escuro dos animais. Durante o experimento, todos os animais receberam água e ração peletizada (Nuvilab®) *ad libitum*.

Após trinta dias, as fêmeas foram eutanasiadas por decapitação, na fase de diestro do ciclo estral, tendo sido coletados sangue e ovários para posteriores análises. Os ovários foram fixados por imersão em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,05 M por 24 horas a temperatura de 4°C. Posteriormente, foram incluídos em paraplast e cortes histológicos semi-seriados de 5 µm de espessura foram obtidos, resultando numa média de quarenta lâminas para cada ovário. Após coloração em hematoxilina-eosina, procedeu-se a contagem e classificação dos tipos de folículos ovarianos, incluindo os atrésicos. Calculou-se a taxa de recrutamento de acordo com Campos-Junior et al. (2012) e Santos et al. (2020), em que: Taxa de atresia = $[(n^{\circ} \text{ folículos atrésicos} / \text{total folículos}) \times 100]$ e Taxa de recrutamento = $\{[(n^{\circ} \text{ primários} + \text{pré-antrais} + \text{secundários}) / \text{total folículos}] \times 100\}$. O sangue, por sua vez, foi centrifugado e passou por análise do tipo ELISA para detecção dos níveis hormonais de prolactina (PRL) e hormônio luteinizante (LH).

Grupo experimental de análise fetal, placentária e transgeracional: fêmeas gestantes e lactantes (Experimentos 2, 3 e 4).

Oitenta fêmeas adultas de camundongo Swiss e 15 fêmeas C-57 Black-6 em idade reprodutiva (oito semanas, média de peso corporal: 30 ± 3 g) foram adquiridas junto ao Centro de Bioterismo (CEBIO) sob as mesmas condições da metodologia anterior. Elas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos experimentais, os quais receberam, via gavagem, água (CC) ou 120 mg/kg de cafeína (Sigma-Aldrich - Reagent Plus®, C0750) diluída em água.

Esta dose de cafeína equivale a 300 mg/dia de consumo em humanos, sendo considerada

segura por algumas organizações internacionais e de uso indicado durante a gestação e lactação (NHS, 2016; EFSA, 2015). Durante o experimento, todos os animais receberam água e ração peletizada (Nuvilab®) *ad libitum*. A gavagem foi realizada diariamente em horários fixos, próximos ao período escuro dos animais.

As fêmeas C-57 receberam, via gavagem, 0, 60 ou 120 mg de cafeína pelo mesmo intervalo de tempo e, no 8º dia, foram colocadas para acasalamento com machos transgênicos fluorescentes dominantes para a beta-actina-GFP. Uma vez prenhes de 17,5 dias, as fêmeas foram anestesiadas, laparotomizadas e tiveram suas placentas expostas e submetidas à microscopia confocal intravital (Nikon Ti Eclipse® acoplada a um confocal A1R).

Fotomicrografias de tecidos placentários com aumento de 20x foram obtidas usando o software NIS Elements® (Nikon®) e a expressão da proteína GFP foi avaliada pelo software Volocity®. O diâmetro dos vasos fetais de cada grupo experimental foi determinado pelo software Image J® e dividido em cinco categorias comparáveis entre si: 1) < 40 µm (vasos extra pequenos); 2) > 40 < 80 µm (vasos pequenos); 3) >80 <120 µm (vasos médios); 4) >120 < 160 µm (vasos grandes); 5) > 160 µm (vasos extragrandes). Todos os animais foram eutanasiados após o procedimento (Figura 6).

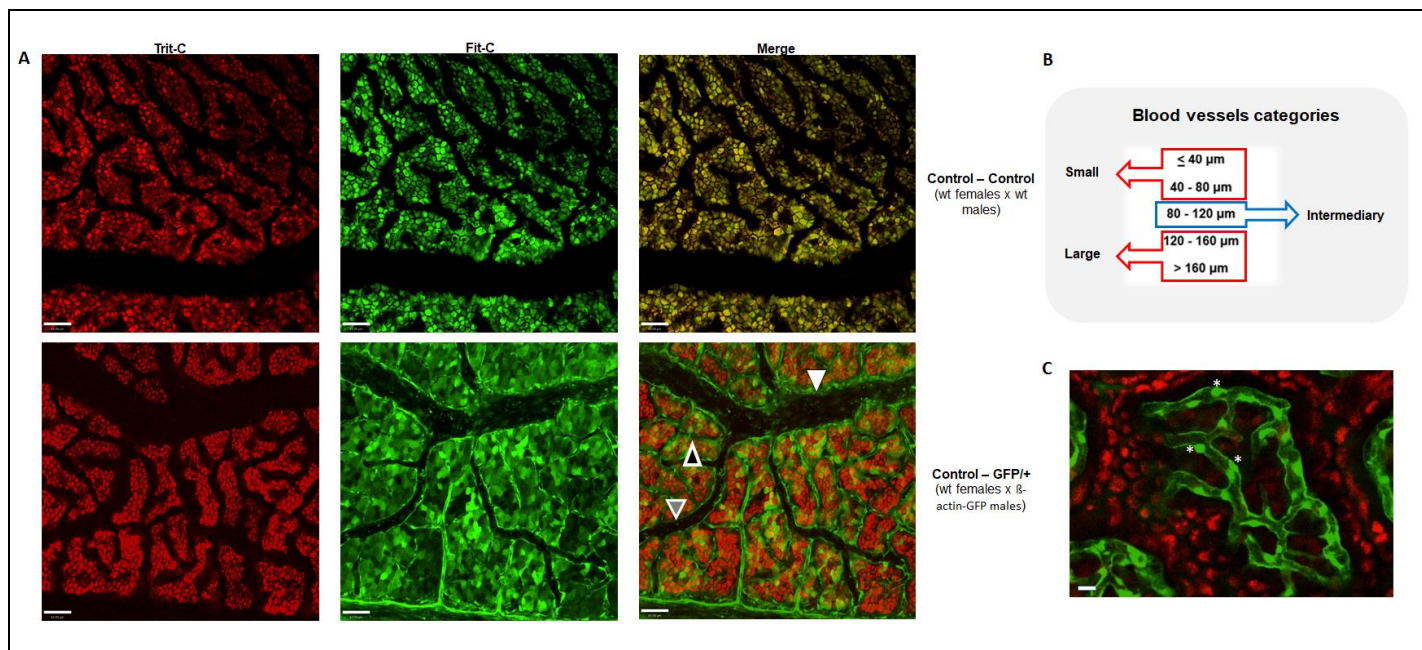


Figura 6: Esquema explicativo da metodologia utilizada para a determinação e diferenciação de vasos maternos e fetais, bem como a classificação de suas categorias a partir do calibre destes vasos. Cabeça de seta branca: grandes vasos, dentre os quais encontramos também vasos extragrandes; Cabeça de seta cinza: vasos de calibre intermediários; Cabeça de seta preta: vasos de pequeno calibre, dentre os quais também se encontram vasos extra pequenos; Asteriscos: núcleos das células sinusoidais fetais que compõem tais vasos sanguíneos. Barras: 55,0 μm.

Em se tratando das fêmeas Swiss, estas receberam cafeína ou água durante sete dias antes do início do acasalamento, seguindo posteriormente o esquema abaixo de divisão de grupos experimentais:

- Grupo CC (n = 20) – Controle/Controle: água durante a gestação (20 dias) e a lactação (30 dias).
- Grupo CT (n = 20) – Controle/Tratado: água durante a gestação (20 dias) e cafeína (120 mg/kg/dia) durante a lactação (30 dias).
- Grupo TC (n = 20) – Tratado/Controle: cafeína (120 mg/kg/dia) durante a gestação (20 dias) e a lactação (30 dias).
- Grupo TT (n = 20) – Tratado/Tratado: cafeína (120 mg/kg/dia) durante a gestação (20 dias) e a lactação (30 dias).

Cinco fêmeas gestantes de 11,5 DG e cinco gestantes de 17,5 DG foram eutanasiadas por

anestesia e deslocamento cervical, laparatomizadas e tiveram suas placentas coletadas e fixadas em paraformaldeído (PFA) a 4% de concentração para posterior análise de imunohistoquímica. As placentas de 11,5 DG foram processadas para a identificação de proliferação celular e angiogênese. Resumidamente, as secções de 5µm foram desparafinizadas, reidratadas e submetidas a aquecimento em micro-ondas por 3 x 5 min em tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 6) para recuperação antigênica, resfriadas à temperatura ambiente e enxaguadas com solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) em solução de metanol por 30 min. Os cortes foram pré-incubados com 5% (p/v) de soro normal de coelho em PBS por 30 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as seções foram incubadas (overnight) a 4°C em uma câmara úmida com o anticorpo marcador de proliferação Ki-67 (1:100, Soro Anti-coelho policlonal (Abcam) 10% em PBS/BSA 1%) e anticorpo secundário 1:200, Soro de Cabra anti-coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) 10% em PBS/BSA 1%. Seguiu-se a incubação com o complexo avidina-biotina (ABC, diluído 1:500 (v/v) em PBS-BSAc (Vector stain kit Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 60 min à temperatura ambiente e a visualização o kit DAB (Sigma-Aldrich). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer. Nos controles negativos, o anticorpo primário foi omitido, e nos controles positivos, utilizou-se tecido de tumor da glândula mamária canina.

A coloração nuclear de cor marrom do Ki-67 foi considerada positiva. O percentual de proliferação celular foi calculado considerando a seguinte equação: núcleos positivos divididos pelos núcleos totais (positivos e negativos) multiplicados por 100. O resultado foi expresso como percentual de células Ki-67 positivas (Chiarini-Garcia et al, 2011).

Para detectar possíveis alterações na angiogênese placentária nessa idade gestacional, foi realizada análise de imunofluorescência para detectar marcadores de fator de crescimento placentário (PIGF ou PGF). A coloração de todas as lâminas foi realizada simultaneamente em

uma única sessão. As secções histológicas foram desparafinizadas, reidratadas e submetidas a aquecimento em micro-ondas por 3 x 5 minutos em tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 6) para recuperação de antigênica, resfriadas até a temperatura ambiente e enxaguadas com solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS). As análises foram realizadas na região do labirinto placentário e os cortes histológicos foram incubados durante a noite a 4° C em câmara úmida com o anticorpo primário anti-PGF1 anti-camundongo (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Posteriormente, os cortes foram tratados com biotina secundária em PBS-BSAc por 90 minutos a 4°C e anticorpo secundário 1:200 anti-camundongo (Abcam). O DAPI (Sigma-Aldrich – D9564; diluição 1:1000 (v/v) em PBS) foi utilizado para a identificação do núcleo. Os controles positivos foram obtidos usando tecido tumoral de mama e nos controles negativos, o anticorpo primário foi omitido.

Fotomicrografias de tecidos placentários foram obtidas usando o software Zen® (edição azul, microscopia Carl Zeiss®) e o microscópio Zeiss Imager Z2 equipado com o sistema de aprimoramento de imagem Apotome Z2. As células fluorescentes foram contadas usando a ferramenta “Cell Counting” do software Image J®. A porcentagem de células expressando o marcador angiogênico foi calculada considerando a seguinte equação: células positivas (coradas com citoplasma) divididas por núcleos totais (com citoplasma positivo e negativo) multiplicado por 100. Os resultados foram expressos como porcentagem de células positivas (Chiarini-Garcia et al, 2011).

Para identificar a morte celular, os cortes histológicos de placentas de 17,5 DG foram incubados durante a noite a 4° C em câmara úmida com o anticorpo primário anti-caspase-3 produzido em coelho, policlonal, na diluição 1:600 em tampão PBS). Posteriormente, os cortes foram tratados com anticorpo secundário de cabra anti-coelho marcado com biotina 1:200 (v/v) em PBS-BSAc por 90 minutos a 4°C. DAPI (Sigma-Aldrich – D9564; diluição 1:1000 (v/v) em PBS) foi utilizado para a identificação do núcleo. A solução Sudan Black B foi utilizada para

bloquear a autofluorescência das hemácias presentes no labirinto placentário. Os controles positivos foram obtidos usando tecido de baço de camundongos e nos controles negativos, o anticorpo primário foi omitido.

A porcentagem de morte celular foi calculada considerando a seguinte equação: núcleos positivos divididos por núcleos totais (positivos e negativos) multiplicados por 100. O resultado foi expresso como porcentagem de células apoptóticas (Chiarini-Garcia et al, 2011).

Os animais não utilizados nos procedimentos anteriores (n = 40) tiveram sua gestação levada a termo, com obtenção de filhotes nos dias 20,5 (± 1 dia). Tais proles, caracterizadas aqui como geração F1, foram pesadas e seu comprimento (distância entre focinho – inserção da cauda) mensurado ao nascimento, bem como a determinação do sexo realizada por meio de mensuração da distância ano-genital. Os filhotes de ambos os sexos, padronizados como um máximo de 6 por ninhada, permaneceram junto às mães, sendo pesados e tendo seu comprimento determinado a cada cinco dias até os 30 dias de vida, quando foram desmamadas e as mães, eutanasiadas. Posteriormente, as aferições foram feitas a cada sete dias até que completassem 60 dias de vida. A partir dos 20 dias de vida, a presença ou não de abertura vaginal nas fêmeas (um dos sinais indicativos de puberdade) foi monitorada diariamente. Após 60 dias de idade, estas fêmeas foram submetidas à técnica de lavado vaginal diário durante 15 dias, para determinação das fases do ciclo estral.

Aos 60 dias de idade, os machos F1 foram encaminhados para o Laboratório de Neurobiologia Conceição Machado, sob supervisão da Professora Dra. Aline Miranda, para testes comportamentais e posteriormente eutanasiados para coleta e análise de sangue e cérebro. Os testes avaliaram a motricidade do animal em campo aberto e, em caso de adequação a este teste, subsequentemente houve investigação dos seguintes componentes comportamentais: testes de hiperatividade; de comportamentos ansioso, depressivo e compulsivo; avaliação da memória de curta e de longa duração; e avaliação da capacidade de aprendizado a curto prazo. Os testes

escolhidos foram: Open field, Y-maze, Marble burying, Teste de reconhecimento social, Labirinto em cruz elevado e nado forçado.

Metade da prole fêmea F1 de cada grupo experimental foi eutanasiada (n = 3 a 5 por grupo), sendo os ovários coletados e preparados para análises histomorfométricas posteriores, de modo semelhante ao realizado com as mães. As demais fêmeas adultas da geração F1 continuaram submetidas a lavados vaginais diários para acompanhamento do ciclo estral, sendo posteriormente também encaminhadas para análises comportamentais. Após estas análises, elas foram então acasaladas, dando origem à geração F2. Esta passou pelos mesmos procedimentos da F1, com separação de filhotes machos para eutanásia e biometria posterior, e as fêmeas direcionadas para avaliação de parâmetros reprodutivos com posterior coleta de ovários para análises histomorfométricas.

Seguem-se breves descrições dos testes de comportamento aos quais os animais foram submetidos. Destaca-se que as gerações F1 e F2 não consumiram cafeína em nenhum momento de suas vidas, sendo o contato com a cafeína realizado pela via transplacentária e/ou ingestão de leite materno.

Open field: os efeitos da cafeína foram avaliados colocando-se, separadamente, cada animal em uma caixa quadrada de polipropileno (dimensões 50 x 50 x 22 cm – largura x comprimento x altura). Avaliou-se, através do registro de câmeras por 30 minutos, os movimentos do animal pelo campo aberto e laterais da caixa.

Marble Burying: em uma caixa contendo maravalha e 12 bolas de gude organizadas sobre a cobertura, colocou-se isoladamente cada animal por 20 minutos. Após decorrido o tempo do teste, contabilizou-se quantas bolas de gude foram completamente enterradas pelo animal.

Rotarod: os camundongos foram inicialmente treinados para permanecer no eixo rotativo do aparato em uma velocidade de 4 r.p.m. (rotações por minuto) por 3 min. Dois camundongos foram testados simultaneamente, e cada animal foi envolvido em três ensaios consecutivos, cada

um separado por um período de descanso de um dia. As latências (tempo decorrido) de cada queda foram registradas.

Y-maze: utilizou-se um aparato em formato de “Y” com três braços idêntidos (40 cm comprimento cada). Cada camundongo foi individualmente colocado na área central, e contabilizou-se o número de entradas nos braços, bem como as alternâncias entre cada um deles por 10 minutos.

Elevated plus-maze: colocou-se, individualmente, o animal no centro do aparato contendo 4 braços (30cm x 5cm) de 50 cm. Dois dos braços opostos eram completamente abertos, e dois continham paredes por toda a sua extensão. Durante 10 minutos, observou-se o deslocamento deste animal, registrando-se suas passagens e permanência por cada tipo de braço do labirinto.

Nado forçado: cada animal foi colocado em um tanque plástico cilíndrico (30 cm de altura x 20 cm de diâmetro) com um nível da água de 15 cm do fundo, de forma que o animal permaneça em movimentos de natação para sobrevivência sem conseguir escalar pelas bordas ou tocar o fundo do tanque com os pés ou a cauda.

Reconhecimento social: de acordo com a técnica de Hernier et al (2016), primeiramente o animal em estudo foi colocado por algumas horas para ambientação em um aparato contendo duas câmaras idênticas e vazias: direita (right) e esquerda (left). Durante este tempo, monitorou-se o seu movimento exploratório, que deve ser semelhante entre as duas câmaras. Em seguida, adicionou-se em uma das câmaras um animal “estranho” (outro camundongo, desconhecido), denominado S1, e esperou-se que o comportamento social e exploratório fosse aumentado na câmara contendo o novo animal. Por fim, um segundo animal “estranho”, o S2, foi adicionado após algum tempo na outra câmara vazia, por já ter tido um contato com S1, é esperado que o camundongo estudado passe mais tempo em fase de reconhecimento do S2.

2. Análise estatística

Todos os parâmetros avaliados foram testados quanto à normalidade usando-se o procedimento univariado do programa *Statistical Analysis System*® (SAS Institute, Cary, NC, EUA), sendo os dados analisados como um delineamento experimental inteiramente ao acaso. Os efeitos da cafeína sobre os parâmetros biométricos e histomorfométricos foram avaliados utilizando-se o modelo linear geral (GLM) do SAS. Nos eventos nos quais os tratamentos mostraram-se significativos, comparações múltiplas foram realizadas utilizando-se a probabilidade de diferenças (pdiff) entre médias de quadrados mínimos, ajustadas pelo teste Tukey-Kramer (SAS, 2001), onde $P < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A história da cafeína e sua relação com a gestação e a lactação é controversa e tendenciosa (James, 2020). Na década de 80, surgiram os primeiros estudos com animais e sua provável teratogênese, que levaram a FDA a publicar uma carta de recomendação que proibia o consumo desta substância por gestantes em qualquer dose ou quantidade (U.S. Food and Drug Administration, 1980). Em consequência, na mesma época, foi fundado o International Life Sciences Institute (ILSI), criado pelo Caffeine Working Group em associação com a American Beverage Association and the National Coffee Association: um instituto de pesquisas formado por associações cafeicultoras e produtoras de refrigerantes que passou a desenvolver pesquisas com resultados sempre favoráveis ao consumo de cafeína pela população gestante (James, 2020). Os conflitos de interesse e as pesquisas altamente rentáveis do novo instituto pressionaram, então, a FDA a liberar um novo comunicado indicando um consumo consciente de cafeína e, posteriormente, em 2018, um novo documento indicando uma ingestão máxima de até 400

mg/dia para todos os grupos consumidores (homens, mulheres, gestantes, lactantes, idosos), desde que se levasse em conta a sensibilidade individual e especialmente a tolerância infantil (James, 2020).

Ao longo das últimas quatro décadas, diversas associações se mantiveram variáveis em suas recomendações, que vão de um máximo de 200 mg/dia (American College of Obstetricians and Gynecologists – ACOG e European Food Safety Authority – EFSA) a até 400 mg/dia (James, 2020). Entretanto, cada vez mais estudos têm surgido com resultados que levam ao total desencorajamento do consumo de cafeína por crianças, gestantes e lactantes, e o presente trabalho, mesmo obtendo resultados utilizando modelos murinos, teve como objetivo endossar tais recomendações, além de trazer, de forma inédita, alguns resultados contundentes em relação às atuais doses recomendadas de cafeína na gestação e na lactação.

Experimento 1 – Estudo da fertilidade de fêmeas após o consumo crônico de cafeína abordando aspectos morfofuncionais ovarianos.

Experimentos prévios do nosso grupo de pesquisa com animais gestantes consumidores de cafeína sempre apontaram uma grande dificuldade em estabelecer a gestação de fêmeas tratadas com esta substância, especialmente em doses mais elevadas. Portanto, este experimento foi feito com o objetivo de avaliar se há alguma alteração na foliculogênese, bem como nas diferentes fases do ciclo estral de animais que consomem variadas doses de cafeína de forma crônica.

Inicialmente, foi avaliada a duração da fase lútea do ciclo estral das fêmeas que consumiram cafeína durante trinta dias. Considerado como a fase lútea, o diestro e o metaestro apresentam duração média de 1 a 3 dias em condições fisiológicas normais (Freeman, 2006). Entretanto, o consumo de cafeína, independente da dose, prolongou a duração desta fase, que apresentou uma variação de 3 até 11 dias entre as doses mais elevadas (C120 e C240) ($P < 0,05$; Figura 7). Assim sendo, concluiu-se que a cafeína tanto em doses baixas, quanto nas moderadas e

altas, pode alterar a frequência ovulatória de fêmeas murinas. Para se investigar a causa de tal alteração, procedeu-se ao estudo da hipótese de que a população folicular ovariana estaria alterada e/ou que houvesse alteração hormonal que justificasse tais características do ciclo estral.

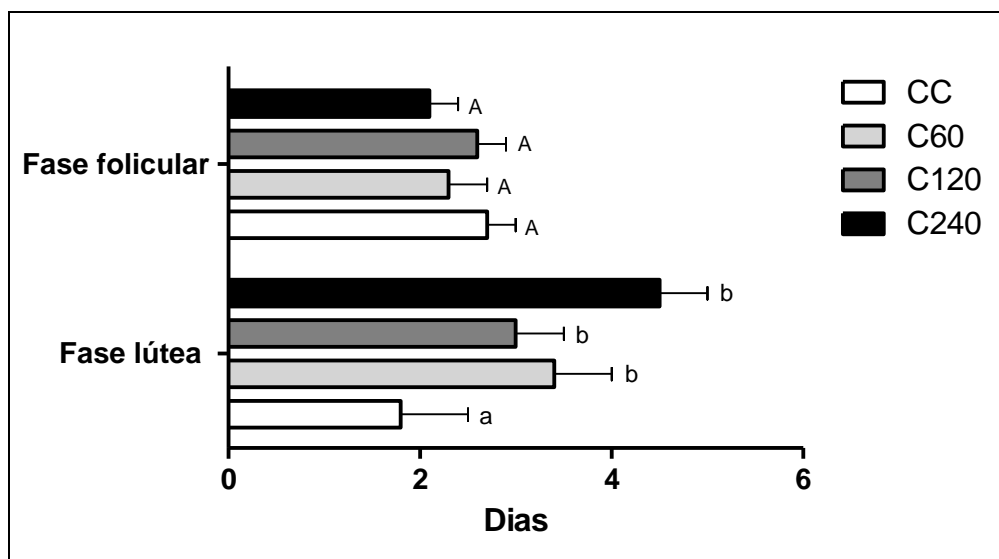


Figura 7: Duração (em dias) das fases do ciclo estral de camundongos decorrentes do consumo de cafeína, durante trinta dias, em diferentes doses. CC: controle (água); C60: 60 mg/cafeína/dia; C120: 120 mg/cafeína/dia; C240: 240 mg/cafeína/dia; ^{a, b} P < 0,05.

A contagem da população folicular das fêmeas nulíparas foi notavelmente comprometida em função do consumo de cafeína ($P < 0,05$; Tabela 2). Em toda a população folicular, os animais do grupo de consumo elevado (C240) apresentaram uma depleção destes folículos totais, que se mostrou inferior também nos primordiais ativados ($P < 0,05$). Houve uma maior proporção de folículos primários em C240, em detrimento de uma menor quantidade em T60. Quanto à população de folículos primários multilaminares (pré-antrais) e secundários, essa diferença populacional deixou de existir, voltando a se mostrar significativa na análise de atresia folicular: de forma dose-dependente, C60 e C120 exibiram folículos atrésicos em maior quantidade que CC

($P < 0,05$). Não foram observados folículos terciários em nenhum animal das amostras recolhidas, daí o motivo da sua não-representação nestas análises.

Tabela 2 – Contagem e proporção das diferentes categorias de folículos em ovários de fêmeas nulíparas de camundongos Swiss, após consumo crônico, ou não (CC), de diferentes doses de cafeína (C60, C120, C240)

Folículo/Tratamento	Controle	C60	C120	C240
Primordial quiescente	73,7 ± 6,1 ^a	54,0 ± 6,5 ^{ab}	56,0 ± 6,5 ^a	30,0 ± 7,0 ^b
Primordial quiescente (%)	28,4 ± 2,2 ^a	21,6 ± 2,3 ^a	22,1 ± 2,3 ^a	21,3 ± 2,5 ^a
Primordial ativado	80,4 ± 5,3 ^a	70,0 ± 5,6 ^a	48,8 ± 5,6 ^b	32,7 ± 6,0 ^b
Primordial ativado (%)	32,5 ± 4,7 ^a	27,5 ± 7,2 ^c	20,3 ± 5,8 ^b	22,4 ± 2,6 ^{bc}
Primário unilaminar	71,6 ± 7,7 ^a	54,8 ± 8,2 ^a	84,6 ± 8,2 ^a	53,3 ± 8,8 ^a
Primário unilaminar (%)	27,0 ± 2,4 ^{bc}	21,9 ± 2,5 ^c	32,4 ± 2,5 ^{ab}	38,4 ± 2,7 ^a
Primário multilaminar	1,8 ± 0,8 ^a	3,8 ± 0,8 ^a	4,3 ± 0,8 ^a	2,7 ± 0,9 ^a
Primário multilaminar (%)	0,8 ± 0,5 ^a	1,6 ± 0,5 ^a	1,6 ± 0,5 ^a	2,0 ± 0,5 ^a
Secundário	25,3 ± 5,0 ^a	32,0 ± 5,3 ^a	20,5 ± 5,3 ^a	13,4 ± 5,7 ^a
Secundário (%)	9,1 ± 2,0 ^a	12,6 ± 2,1 ^a	8,2 ± 2,1 ^a	10,1 ± 2,3 ^a
Atrésicos	31,9 ± 4,3 ^a	84,4 ± 4,6 ^b	103,6 ± 4,6 ^c	19,7 ± 4,9 ^a
Taxa de atresia folicular (%)	11,7 ± 4,2 ^a	33,4 ± 4,4 ^b	44,9 ± 4,4 ^b	11,8 ± 4,8 ^a
Taxa de recrutamento folicular (%)	36,8 ± 3,1 ^a	36,4 ± 3,3 ^a	42,1 ± 3,3 ^{ab}	50,3 ± 3,6 ^b
Total de folículos	267,4 ± 22,2 ^a	258,7 ± 23,5 ^a	265,2 ± 23,5 ^a	142,0 ± 25,1 ^b

^{a,b,c} Médias com diferentes sobrescritos na mesma linha diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

Curiosamente, C240 não apresentou diferença na contagem de atresia folicular em relação ao grupo controle ($P > 0,05$), o que nos levou a duas hipóteses a serem elucidadas: 1) C240 apresentou menos atresia por ter recrutado e ativado mais folículos; ou 2) C240 apresentou menos

atresia por ter tido, desde o início, uma menor reserva folicular ovariana. Para investigar tais hipóteses, calculou-se a taxa de recrutamento e de atresia foliculares. Os resultados mostraram que, mesmo possuindo menos folículos que todos os demais grupos experimentais ($P < 0,05$), T240 também apresentou uma maior taxa de recrutamento (em relação, inclusive, aos animais do grupo controle), indicando uma provável tentativa de compensação devido ao excesso de cafeína ingerido. Já os grupos C60 e C120 apresentaram com uma maior taxa de atresia. Assim sendo, partiu-se para a análise hormonal de hormônio luteinizante (LH) e prolactina (PRL) dos animais em estudo.

Durante o ciclo estral da fêmea adulta, os níveis de FSH, LH e PRL estão baixos até que ocorra o proestro, e permanecem elevados até o fim deste período (Croy et al, 2014; Smith et al. 1975). Durante os dias 1 e 2 do diestro, estágio em que se coletaram as amostras séricas dos animais, espera-se uma taxa basal destes hormônios (Croy et al, 2014). Ao se avaliar as dosagens de prolactina e LH nas fêmeas em estudo, observou-se que o consumo de cafeína não alterou as concentrações plasmáticas daqueles hormônios ($P > 0,05$; Tabela 3). Tais resultados podem indicar que as alterações no ciclo estral das fêmeas, mesmo se caracterizando por um período prolongado de sua fase lútea, não parecem estar associadas seleção de folículos, tampouco a momento de ovulação. Estes resultados vão ainda ao encontro das contagens foliculares feitas nos ovários, uma vez que não houve diferença nas populações gonadotrofina-dependentes (folículos secundários) ($P > 0,05$).

Tabela 3 – Níveis plasmáticos de Prolactina (PRL) e Hormônio Luteinizante (LH) em fêmeas nulíparas de camundongos após consumo crônico, ou não (CC), de diferentes doses de cafeína (C60, C120, C240)

Tratamento	LH (ng/mL)	PRL (ng/mL)
CC	$0,7 \pm 0,3^a$	$7,0 \pm 1,8^a$

C60	0,3 ± 0,3 ^a	7,8 ± 2,0 ^a
C120	0,5 ± 0,3 ^a	7,6 ± 1,9 ^a
C240	0,3 ± 0,3 ^a	8,2 ± 1,8 ^a

Yadegari e colaboradores (2020) estudaram ovários de fêmeas de ratos Wistar e encontraram resultados muito semelhantes, com redução do número de folículos primordiais, primários e até secundários. Kren et al (2004) cultivaram oócitos suínos *in vitro* e os trataram com cafeína, assim como Prather & Racowsky (1992), com oócitos de hamsters: ambos os estudos encontraram um atraso no desenvolvimento folicular, descrito como uma pausa momentânea (de aproximadamente 24h) no processo meiótico envolvido no desenvolvimento folicular. Jagiello e cols (1972) relataram que a administração subcutânea de 25 mg/kg por dia de cafeína preveniu a meiose de uma superovulação induzida por hormônios em ratas adultas em estudos *in vitro* e *in vivo*. Tais observações sugerem, em conjunto, que a redução da fertilidade observada possa ser devido a um atraso na retomada da meiose dos oócitos com número prévio já reduzido pela cafeína.

Kwak e colaboradores (2017) trataram fêmeas de ratas pré-púberes com dosagens de 120 ou 180 mg de cafeína/kg/dia, e encontraram resultados semelhantes de atraso na abertura vaginal em todos os animais tratados com cafeína, além de detectarem doses elevadas de estrogênio sérico. Eles sugerem que a exposição pré e peripúbere à cafeína aumenta a produção de estradiol no ovário, o que poderia perturbar a regulação coordenada do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, interferindo assim na maturação sexual e, conseqüentemente, no ciclo estral e recrutamento folicular dos animais.

Experimento 2 – Impacto do consumo crônico da cafeína sobre o desenvolvimento placentário e fetal em modelo murino.

Durante o seguimento da fase inicial deste projeto, ainda em fase de desenvolvimento de uma dissertação de mestrado, placentas de 17,5 DG foram escaneadas e passaram por análises histomorfométricas de áreas das diferentes regiões e populações celulares. Nenhuma alteração relativa às áreas ou à sua proporção volumétrica dos diferentes constituintes foi detectada na zona labiríntica (Lz), zona juncional (Jz) ou placa coriônica (Cp). Entretanto, quando avaliados os componentes celulares do labirinto placentário, pôde-se detectar uma alteração grave e inédita: o grupo C120 (dose moderada relativa a um consumo humano de 300 mg/caf/dia) apresentou um aumento significativo dos componentes fetais (sangue e células sinusoidais) em contraste com uma redução na irrigação pelo sangue materno na região. A partir deste resultado, questionou-se se estaria havendo um aumento no número de vasos sinusoides fetais na placenta, ou se eles estavam em mesmo número, entretanto com algum tipo de dilatação. Assim, durante os experimentos já do projeto de doutorado, procedeu-se experimentos de microscopia confocal intravital e imunohistoquímicos para marcadores de proliferação, angiogênese e morte celular.

A Figura 8 resume o método de microscopia confocal intravital usado para comparar os grupos experimentais, além de apresentar os resultados obtidos através deste processo. As medidas dos tamanhos dos vasos sanguíneos fetais, evidenciadas pelo filtro Fit-C ou autofluorescência verde transgênica no labirinto, mostraram que o número de pequenos vasos foi semelhante nos três grupos experimentais (Controle, C60 e C120-P > 0,05). Os animais do grupo Controle (CC) apresentaram apenas vasos pequenos e intermediários e ausência de vasos de grande calibre (P < 0,05). No entanto, os animais C60 e C120 apresentaram contagens semelhantes de vasos menores (P > 0,05), mas os vasos intermediários e de grande calibre apareceram em contagem dose-dependente nesses grupos tratados (P < 0,05).

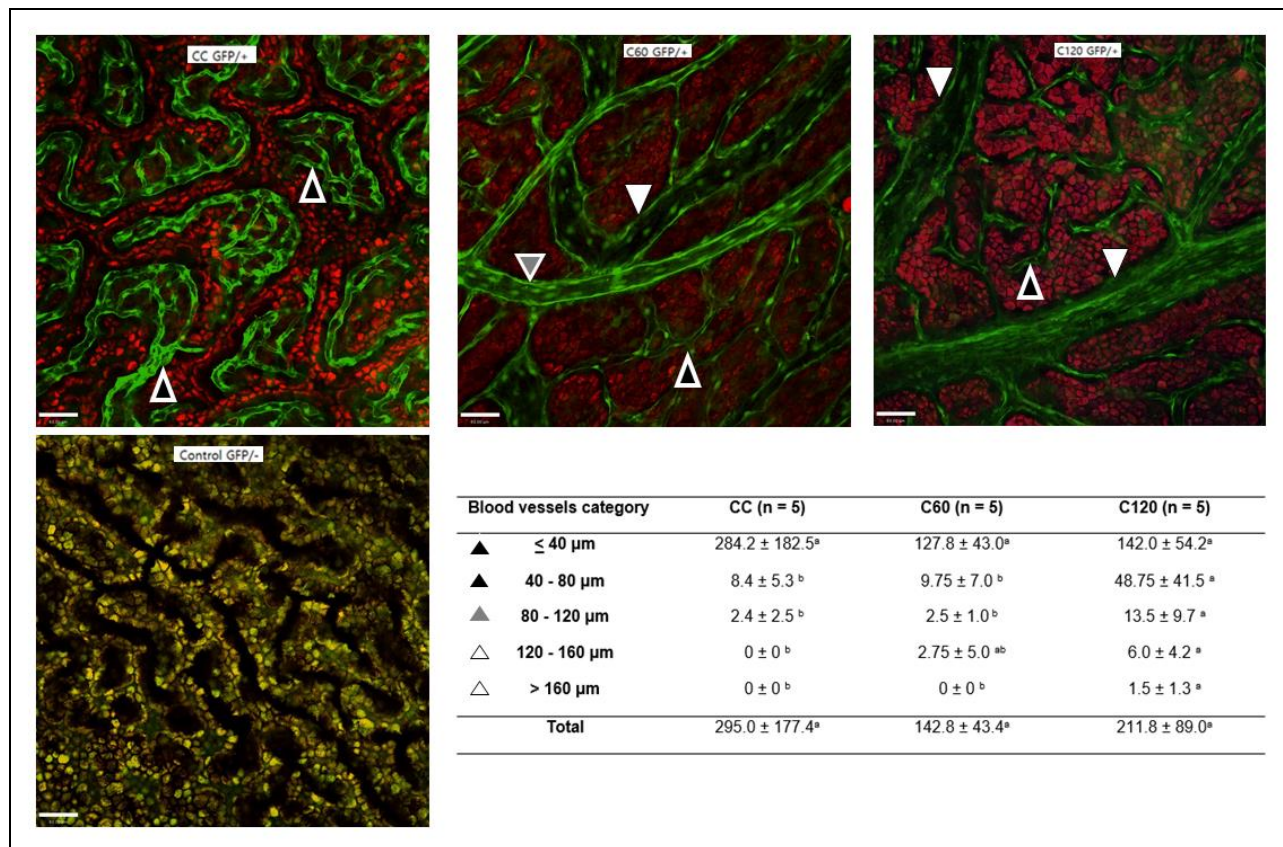


Figura 8: Microscopia intravital confocal comparando a largura de luz dos vasos fetais da placenta no Labirinto dependente da dose no modelo de camundongo GFP C57BL/6. Em verde: fluorescência GFP de vasos fetais na placenta. Em vermelho: tecido materno com autofluorescência. Em amarelo: controle negativo. Vasos sanguíneos definidos em categorias quantitativas (valores na tabela atual) e qualitativas: “Pequeno” (setas pretas): larguras menores que 80 μm; “Intermediário” (setas de cabeça cinza): larguras entre 80,1 e 120,0 μm; e “Grande”(setas de cabeça branca): larguras superiores a 120,1 μm. Barras = 55,0 μm. Aumentos: 20x.

Sabe-se que em doses moderadas (três xícaras de 100 mL por dia), devido ao efeito de vasoconstrição periférica, a cafeína aumenta a pressão arterial (5-10 mm Hg) e diminui levemente a frequência cardíaca (Iriyama et al, 2015). Entretanto, alguns estudos associam o consumo de cafeína a hipotensão cerebral e vasodilatação periférica causada pelo aumento do fluxo livre de adenosina e pela presença de teobromina, um vasodilatador fisiológico (Kolahdouzan & Hamadeh, 2017; Uddin et al, 2017; Kurlak et al, 2015). Portanto, a explicação mais plausível seria de que a cafeína consumida em doses moderadas pelas fêmeas gestantes causou uma

vasodilatação generalizada nos capilares fetais do labirinto placentário sem, entretanto, aumentar o número de células dos filhotes na região.

A análise da expressão de Caspase-3 (Casp3), um indicador de morte celular no labirinto placentário, revelou que o processo de morte celular resultante deste marcador não foi afetado pela ingestão de cafeína, independentemente das doses no DG 17,5 ($P > 0,05$; Figura 8). No entanto, a expressão do Ki-67, um marcador de proliferação celular, apresentou diferenças significativas no DG 11,5, indicando que baixas doses de cafeína (C60) aumentaram a proliferação celular durante o processo de placentação, mas não em doses moderadas (C120) (Figura 9).

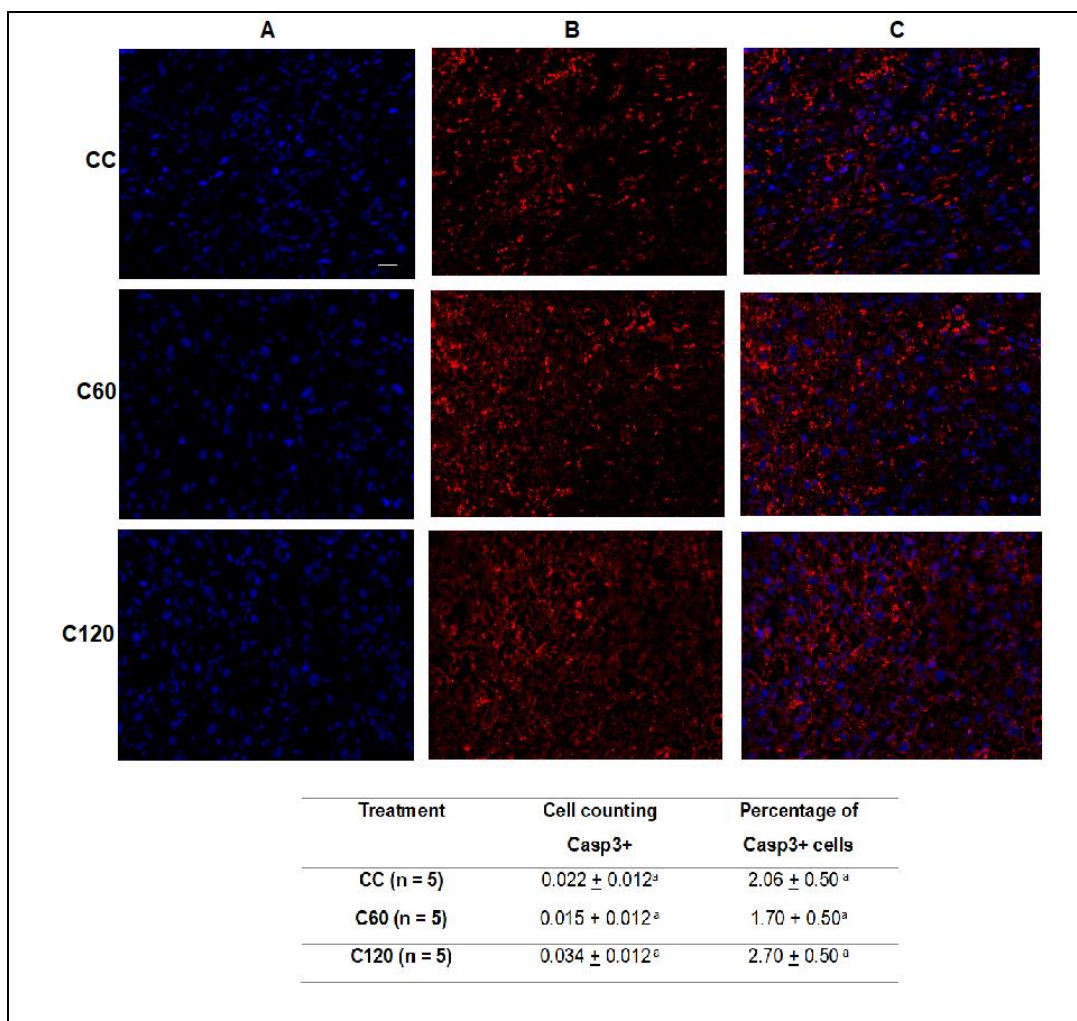


Figura 9: Imunofluorescência do labirintotrofoblasto para investigar e comparar a morte celular através da expressão de Casp-3 em cada tratamento, em 17,5 DG. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre a contagem de células nem a

porcentagem de células que expressam Casp-3 ($P > 0,05$). A: Núcleo marcado DAPI em azul; B: Citoplasma marcado com Trit-C em vermelho; C: Imagens mescladas. Barras = 55,0 μm . Aumento: 20x.

Resultados prévios obtidos durante o trabalho realizado no mestrado mostraram que os fetos e placentas obtidos de fêmeas consumidoras de cafeína apresentaram um menor peso próximo ao seu dia de nascimento (DG 17,5). As placentas C60 e C120 eram mais eficientes, inclusive, que as do grupo controle. Maior eficiência placentária (EP) e placentas menores são capazes de manter o desenvolvimento e a viabilidade fetal, ou seja, possuem um melhor fluxo sanguíneo em direção ao feto. Por outro lado, a baixa eficiência placentária é responsável por altas taxas de mortalidade pré-natal (Wilson & Ford, 2001; Wilson et al, 1998). Apesar da maior EP, os fetos C120 apresentaram restrição intrauterina de crescimento (RIUC). Como o grupo C60 apresentou uma maior expressão de KI67, este fato mostra uma tentativa de compensação: a cafeína provavelmente alterou o fluxo sanguíneo placentário, que por sua vez aumentou o calibre dos vasos fetais na tentativa de suprir essa necessidade, evitando a morte fetal e até mesmo a RIUC neste grupo específico.

Ainda na análise do *turnover* celular, sabe-se que a morte celular por apoptose é um processo fisiológico que contribui para a manutenção da homeostase tecidual (Melo, 2018). Para promover esse processo finamente regulado, as proteínas atuam como iniciadores ou efetores. Nesse sentido, as proteínas caspases são divididas em iniciadores (8 e 9) e efetores (3 e 7) (Berenguer et al., 2019; Kameshima et al., 2019; Kassan et al., 2016). Neste estudo, portanto, as mudanças na expressão do marcador Caspase-3 não foram encontradas nos DGs 11,5 ou 17,5 ($P > 0,05$). Nenhum tratamento apresentou diferenças na proporção de morte celular ao longo da via caspase-3, sugerindo que, se ocorrer morte de células placentárias, pode ser por outro mecanismo de apoptose ou durante outra fase de desenvolvimento placentário. Nesse contexto, estudos em células trofoblásticas humanas BeWo demonstraram que a exposição à cafeína diminuiu a

expressão do gene regulador da morte celular do linfoma de células B (BCL)-2 e modulou a expressão do sistema renina-angiotensina (RAS) placentário, ou seja, aumentou a eficiência do receptor de angiotensina II (AT2R) e reduziu a expressão gênica do receptor AT1 (Tanuma et al., 2006; Nomura et al., 2004). Esses dois estudos sugeriram que o consumo de cafeína tinha o potencial de alterar o crescimento adequado da placenta e a renovação celular, bem como o sistema de fluxo sanguíneo da placenta. Além disso, os efeitos das metilxantinas na regulação da transferência de nutrientes e do metabolismo hormonal na placenta também foram descritos. A teofilina prejudicou a captação de 3H-2-desoxi-D-glicose pelas células fetais, mostrando que a exposição à cafeína pode diminuir o fluxo de glicose para o compartimento fetal (Araújo et al., 2008). De acordo com esse achado, a cafeína e seus metabólitos podem estar diretamente envolvidos na patogênese da RIUC (Sharmin et al., 2012).

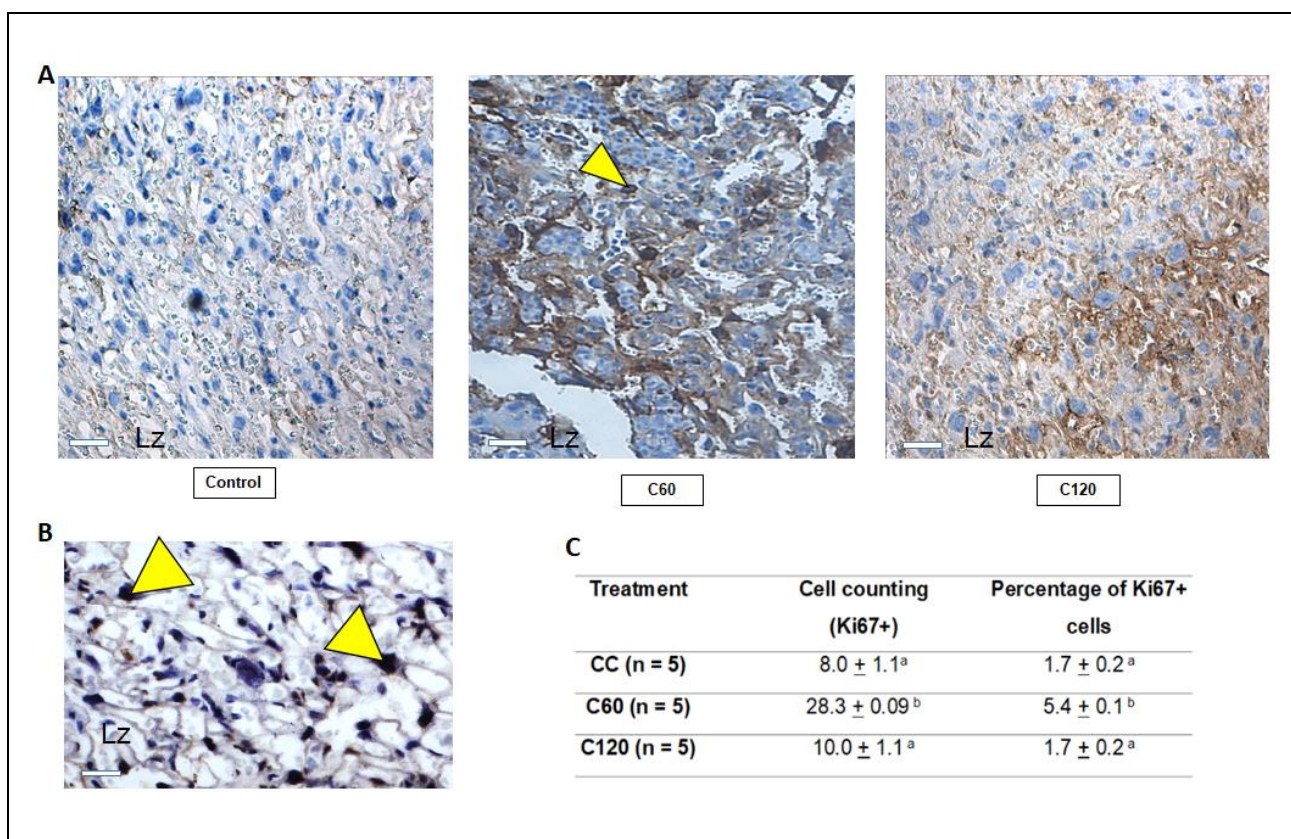


Figura 10: Expressão de KI-67 no labirinto placentário em 11,5 DG. (A) Fotomicrografia panorâmica aumentada em 20x evidenciando a expressão de DAB marrom ou coloração nuclear de células Ki-67 positivas (cabeça de seta amarela). (B) Aumento de 40x para destacar a coloração nuclear (cabeça de seta amarela). (C): Tabela quantitativa de contagem de expressão de KI-67 mostrando aumento significativo da proliferação celular no grupo C60 evidenciado por maior número de células sinusoidais, bem como maior percentual de células marcadas com KI-67 ($P < 0,05$). Barras = 55,0 μm .

Juntamente com o VEGF, o fator de crescimento placentário (PlGF) atua durante o início da embriogênese e, posteriormente, na placenta através de uma atividade quimiotática, mitogênica e angiogênica (Chen & Zeng, 2014). Ambos são críticos para a formação da rede capilar placentária com o desenvolvimento da placenta, sendo o PlGF responsável por vasos mais estáveis e menos permeáveis que os produzidos pelo VEGF (Chen & Zeng, 2014; Carmeliet et al., 2001). Tanto as células decíduais maternas quanto a placenta produzem PlGF, e os níveis de concentração plasmática materna de PlGF são semelhantes em gestações de camundongos e humanas. Sua deficiência precoce está relacionada à pré-eclâmpsia (Rätsep et al, 2014; Levine et al, 2004). A análise de imunofluorescência não mostrou diferenças na expressão de PlGF entre os grupos experimentais, e supõe-se que este fator não alterou a proliferação capilar normal no GD 11,5.

Portanto, apesar da proliferação celular evidenciada no início da formação placentária, a expressão do fator de crescimento placentário (PlGF ou PGF), um marcador de angiogênese placentária, foi semelhante entre os grupos experimentais, reforçando o resultado prévio de que não houve formação de novos vasos fetais no labirinto, e sim uma vasodilatação generalizada no local, sem apoptoses via caspase-3.

Experimento 3 – Avaliação dos padrões biométricos e reprodutivos em duas gerações subsequentes à exposição pré-natal e neonatal de cafeína.

Diversos estudos gestacionais e neonatais foram feitos com animais submetidos à cafeína na gestação e lactação. Entretanto, ainda são escassas as pesquisas relacionadas à prole adulta tanto de filhos, quanto de netos de uma geração parental que consumiu doses recomendadas ao longo da vida, da gestação e da lactação. No presente trabalho, ao se avaliar os efeitos transgeracionais da cafeína, foi possível perceber alterações diversas ao longo do desenvolvimento de todas as proles F1 e F2 tratadas. A seguir, dividiram-se estes resultados e discussões entre as gerações em questão, para que a didática de exposição dos dados se tornasse mais fácil ao leitor.

Geração F1

Dentre as fêmeas da geração parental que engravidaram, o número de nascidos vivos se mostrou inferior em todos os grupos tratados, com ênfase para os animais que receberam cafeína indiretamente durante o período pré-natal, bem como no período neonatal ($P < 0,05$; Tabela 4). A cafeína não afetou a proporção entre machos e fêmeas da prole na geração F1 ($P > 0,05$, Tabela 4), mas as características biométricas sofreram alterações marcantes ao logo do desenvolvimento pós-natal, especialmente os animais cujas mães consumiram cafeína durante a lactação (consumo indireto de cafeína sob a forma de aleitamento materno). Estes animais apresentaram um menor peso e um menor comprimento corporal desde os primeiros dias de vida até as últimas aferições, já realizadas ao longo da vida adulta ($P < 0,05$; Figuras 10 e 11).

Tabela 4 - Parâmetros reprodutivos de fêmeas das gerações parental e F1, cujo contato indireto com cafeína se deu durante a gestação (TC), a lactação (CT) ou ambos (TT)

Características gerais	Tratamento			
	CC	CT	TC	TT
Fêmeas prenhes (n = 22)	6/6	2/5	3/5	4/6

Fêmeas prenhes (%)	100,0	60,0	60,0	66,7
Número de nascidos vivos por fêmea	11,5 ± 1,0 ^a	11,0 ± 0,9 ^{ab}	9,0 ± 0,8 ^{ab}	7,8 ± 0,8 ^b
Número de machos	5,3 ± 1,9 ^a	8,0 ± 1,4 ^a	3,7 ± 1,2 ^a	3,8 ± 1,4 ^a
Número de fêmeas	6,0 ± 2,5 ^a	4,0 ± 2,8 ^a	5,0 ± 2,6 ^a	5,5 ± 1,7 ^a

^{a,b} Médias com diferentes sobrescritos na mesma linha diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

Já ao nascimento, os filhotes dos grupos tratados da geração F1 apresentaram comprimento inferior aos demais do grupo CC (Figura 11). Ao longo do desenvolvimento pós-natal, nota-se um menor tamanho nos indivíduos dos grupos TC e TT até a vida adulta ($P < 0,05$). Destaca-se a idade de 30 dias, que indica o momento do desmame completo, com retirada das mães: esta data aponta que os filhotes cujas mães consumiram cafeína apenas na lactação (CT) ou na gestação e lactação (TT), tiveram um maior prejuízo no desenvolvimento corporal que os demais (CC e TC; $P < 0,05$). Após o término do período de lactação, os valores voltam a se mostrar semelhantes entre os três tratamentos (CC, CT e TC), embora o grupo TT mantenha um comprimento inferior aos demais até o fim das aferições aos 60 dias de vida, ou seja, um fenótipo que perdurou até a vida adulta ($P < 0,05$).

O peso ao nascimento dos filhotes da geração F1 não foi comprometido pelo consumo de cafeína materno na gestação ($P > 0,05$) (Figura 11). Entretanto, pesos corporais inferiores aos do grupo CC foram observados já aos 5 dias de vida, bem como durante todo o desenvolvimento pós-natal destes animais, onde pode ser notado menor peso corporal até a vida adulta, em comparação aos animais CC ($P < 0,05$).

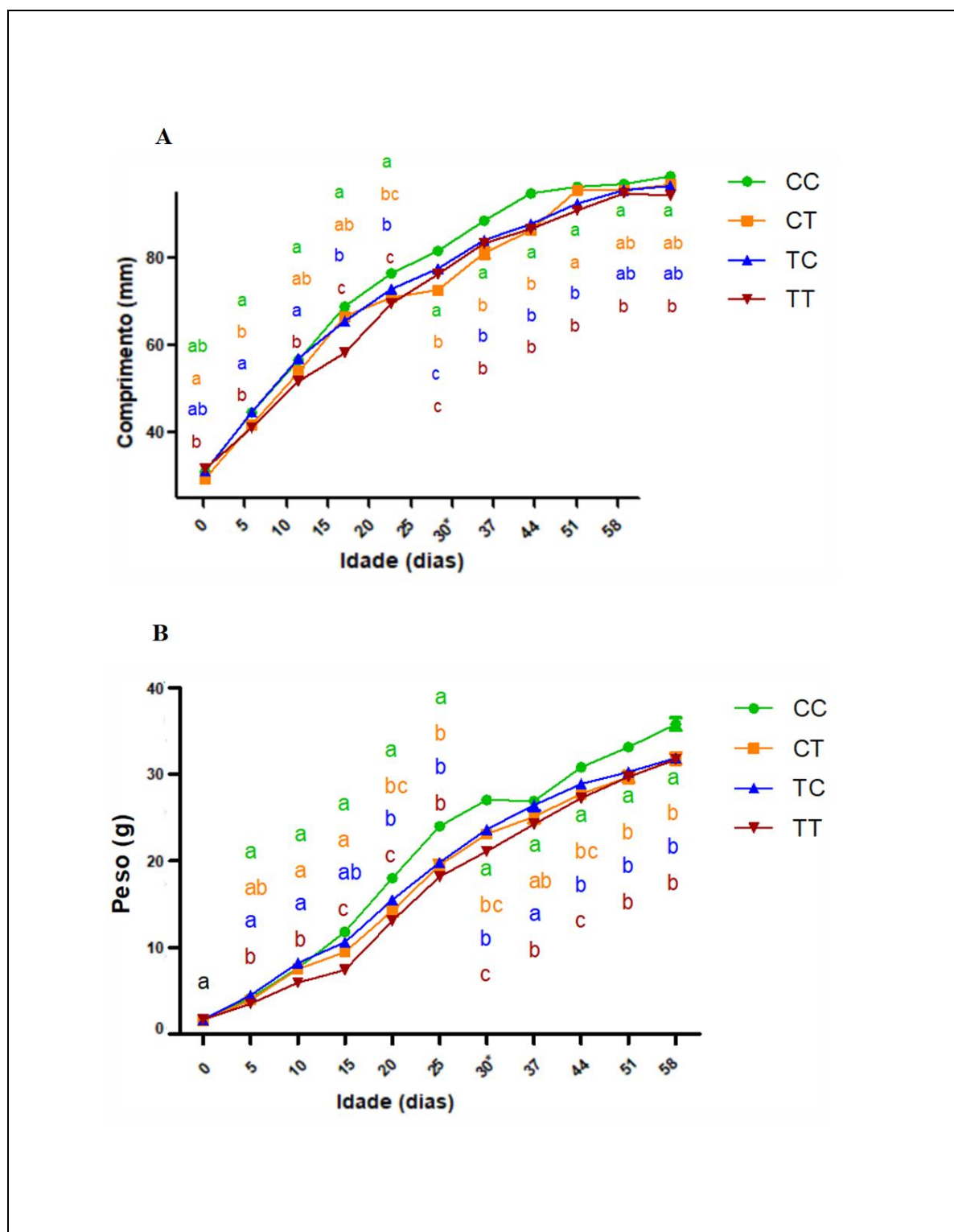


Figura 11: Biometria da prole (F1). A – Curva de crescimento (comprimento em centímetros) dos filhotes fêmea F1 de camundongo cuja mãe consumiu ou não cafeína cronicamente durante a gestação e/ou a lactação. B – Curva de peso (em gramas) dos filhotes fêmea F1 de camundongo cuja mãe consumiu ou não cafeína cronicamente durante a gestação e/ou a lactação. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação; Asterisco: idade do desmame. ^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (P<0,05).

De acordo com dados obtidos previamente no nosso grupo de pesquisa, é provável que os animais F1 em contato com cafeína materna tenham sofrido RIUC, uma vez que se trata de uma dose comprovadamente causadora desta condição (Paula, 2017). Durante as últimas décadas, evidências crescentes associam a exposição intrauterina a determinadas substâncias (como a cafeína), a doenças do adulto, levando à formulação da Hipótese das “origens desenvolvimentistas da saúde e doença” (DOHaD) (Barker, 2007). De acordo com esta hipótese, o organismo exposto a injúrias em sua vida intrauterina desvia os nutrientes, que se encontram restritos, para preservar o crescimento e a função dos órgãos vitais, como o cérebro, em detrimento do crescimento de outros responsáveis metabólicos, como o fígado e o pâncreas (Almeida, 2022; Barker, 2007). Essa adaptação intrauterina é favorável à sobrevivência, mas traz consequências prejudiciais à sua vida pós-natal: o indivíduo pode se predispor ao desenvolvimento de doenças cardiometabólicas na idade adulta, em função de alterações epigenéticas (Almeida, 2022; Deodati, 2020; Barker, 2007). Não foram analisados padrões cardiometabólicos ou epigenéticos dos animais do projeto em questão, entretanto, as análises comportamentais e reprodutivas apontaram para alterações provavelmente epigenéticas importantes na prole F1. Em um estudo de coorte com humanos, pequenas reduções na antropometria neonatal foram observadas com o consumo de cafeína por mães (200 mg/dia) (Gleason, 2021). Os resultados deste trabalho sugerem que o consumo de cafeína durante a gravidez, mesmo em níveis baixos e até mesmo recomendados, estão associados à diminuição do crescimento fetal e uma provável RIUC.

Uma vez em fase pré-púbere (a partir dos 30 dias pós-natais), as fêmeas F1 passaram a ser acompanhadas diariamente quanto à presença de abertura vaginal, um dos indicadores de início da puberdade. Além disso, após completos 60 dias de vida, lavados vaginais diários passaram a ser realizados a fim de se monitorar o ciclo estral destas fêmeas ao longo dos próximos 30 dias de vida adulta. A Figura 12 mostra a contagem dos dias até a detecção de abertura vaginal destas fêmeas, bem como o aspecto vaginal a ser observado nesta detecção. Notou-se um atraso nos dias

de abertura em todos os grupos que tiveram algum tipo de contato com a cafeína, sendo o período lactacional determinante de maior atraso na detecção (grupos CT e TT; $P < 0,05$; Figura 12).

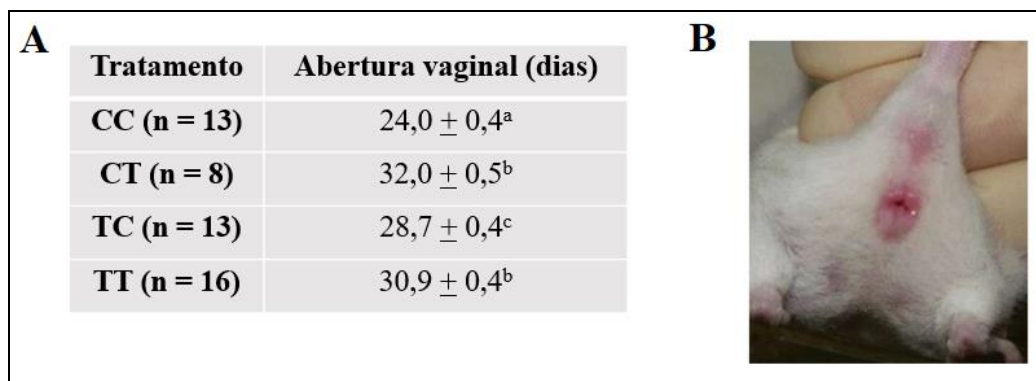


Figura 12: Representação dos dias pós-gestacionais em fêmeas F1 até a abertura vaginal. A: Dias corridos contados até a detecção da abertura. B: Fotografia autoral de uma fêmea apresentando abertura vaginal, um dos indicadores de puberdade em fêmeas de camundongo. ^{a,b} Médias com letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$)

Quanto à análise do ciclo estral das fêmeas desta geração, notou-se novamente um maior período de duração da fase lútea nos animais submetidos ao contato materno com a cafeína ($P < 0,05$), tendo sido esta fase mais pronunciada nos animais TT ($P < 0,05$; Figura 13).

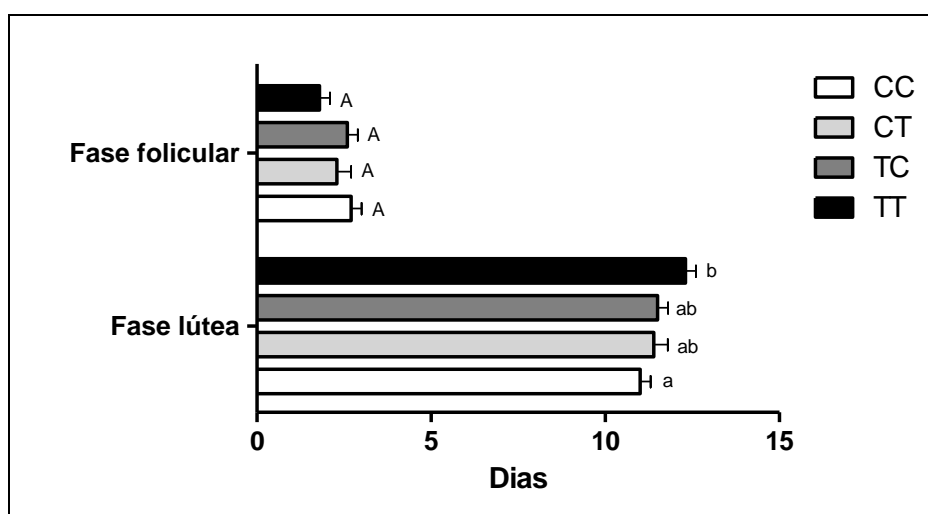


Figura 13: Parâmetros reprodutivos das fêmeas F1. Duração das fases lútea e folicular dos ciclos estrais ao longo de 30 dias, de fêmeas F1 submetidas ou não consumo indireto de cafeína. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC:

cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação. ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).

A análise folicular da F1 mostrou que os animais, desde a sua fase intrauterina e já ao nascimento, apresentaram uma reserva ovariana depletada de folículos primordiais quiescentes, com ênfase nos tratamentos TC e CT ($P < 0,05$; Tabela 5). Já a ocorrência de atresia folicular, pelo contrário, se mostrou elevada em todos os animais cujas mães consumiram cafeína, exibindo pelo menos cinco vezes mais quantidade de folículos atrésicos que os animais do grupo controle, novamente com ênfase na prole lactacional (CT) ($P < 0,05$).

Tabela 5 – Contagem e proporção das diferentes categorias de folículos em ovários de fêmeas F1 de camundongos Swiss, após consumo crônico de suas mães, de 120 mg/caf/dia durante a gestação (TC), lactação (CT), ou ambas (TT).

Folículo/Tratamento	CC (n=3)	CT (n=3)	TC (n=5)	TT (n=4)
Primordial quiescente	15,2 ± 0,95 ^a	2,8 ± 0,95 ^b	2,2 ± 0,74 ^b	4,8 ± 0,83 ^b
Primordial quiescente (%)	15,2 ± 0,95 ^a	2,8 ± 0,95 ^b	2,2 ± 0,74 ^b	4,8 ± 0,83 ^b
Primordial ativado	53,7 ± 2,9 ^a	8,3 ± 2,9 ^c	7,4 ± 2,3 ^c	19,7 ± 2,5 ^b
Primordial ativado (%)	27,3 ± 1,5 ^a	5,3 ± 1,5 ^b	14,1 ± 1,1 ^c	8,1 ± 1,3 ^b
Primário unilaminar	114,0 ± 4,5 ^a	11,7 ± 4,5 ^b	50,8 ± 3,5 ^c	61,0 ± 3,9 ^c
Primário unilaminar (%)	32,3 ± 1,5 ^a	4,2 ± 1,5 ^b	15,5 ± 1,2 ^c	14,7 ± 1,3 ^c
Primário multilaminar	50,3 ± 2,7 ^a	24,0 ± 2,7 ^b	7,6 ± 2,1 ^c	32,0 ± 2,3 ^b
Primário multilaminar (%)	14,3 ± 1,0 ^a	9,4 ± 1,0 ^b	2,3 ± 0,8 ^c	7,5 ± 0,9 ^b
Atrésico	38,3 ± 26,7 ^a	209,3 ± 26,7 ^b	218,8 ± 20,7 ^c	277,5 ± 23,0 ^b
Taxa de atresia folicular (%)	10,8 ± 3,0 ^a	78,3 ± 3,0 ^b	65,9 ± 2,3 ^c	64,8 ± 2,6 ^c
Total folículos	364,7 ± 25,7 ^{ab}	275,0 ± 25,7 ^c	337,2 ± 20,0 ^{bc}	425,7 ± 22,2 ^a

^{a,b,c} Médias com sobrescritos diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).

Há evidências crescentes de que os fatores de crescimento, especialmente o IFG-1, modulam a foliculogênese, mas seu papel preciso nos processos de crescimento folicular, diferenciação e atresia ainda não foi totalmente elucidado (Matsuda et al, 2012). Os fatores de crescimento pertencem a sistemas complexos, incluindo todos os fatores relacionados estrutural e funcionalmente, os seus receptores e as suas proteínas de ligação. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que inúmeros fatores secretados pelas células da granulosa, além do IGF-1, também podem interferir no crescimento e recrutamento folicular, dentre eles o kit-ligand, o GDF-9, o VEGF e o BCL-2 (Matsuda et al, 2012). Os resultados deste estudo indicam uma depleção de folículos que perdurou em todas as classes pré-antrais analisadas (primordial ativado, primário unilaminar e primário multilaminar), indicando uma possível falha dos fatores de crescimento envolvidos no recrutamento folicular, já que estes são categorias gonadotrofina-independentes.

Produtos químicos ou tóxicos que destroem extensivamente os folículos primordiais podem resultar em infertilidade permanente, uma vez que o folículo primordial depletado não pode ser posteriormente substituído (Yadegari et al, 2020). Alguns estudos relataram que a cafeína pode interferir na divisão celular, no número final de células da granulosa, na supressão de meioses e na morte por atresia folicular (Yadegari, 2020; Dorostghoal et al, 2011; McGee and Hsueh, 2000), o que pode relacionar esta substância a uma maior incidência de infertilidade na prole adulta F1.

A atresia folicular é um processo fisiológico de morte e absorção de folículos não-maduros que ocorre em todas as espécies fêmeas (Sanchez et al, 2012). A maioria dos oócitos existentes já ao nascimento irão espontaneamente entrar em processo atrésico, sendo poucos deles levados à fase de maturação e oocitação (Sanchez et al, 2012). O fato de toda a geração F1 já se mostrar com reserva depletada de folículos primordiais, além de apresentar uma maior taxa de atresia folicular em relação às taxas normais do controle, é um fato preocupante que nos leva a refletir sobre a redução da fertilidade destas fêmeas. Já foi descrito que a cafeína afeta a fertilidade de camundongos machos causando alterações hormonais – especialmente redução de testosterona

sérica -, na expressão de proteínas e apoptose do epitélio germinativo (Cavalcante, 2014; Serapiao-Moraes, 2013; Wendler 2009). Já estudos envolvendo ovários e hormônios de fêmeas F1, e especialmente F2, são incipientes, mas já têm mostrado alterações importantes nos aspectos relacionados à sua fertilidade. Yadegari et al (2020) demonstraram, através da análise da geração F1 de ratas, reduções significativas no peso corporal, peso dos ovários, no volume ovariano e no número de folículos primordiais em fêmeas filhas de progenitoras que consumiram de 45 a 100mg/kg de cafeína diariamente. Dorostghoal e colegas (2010) relataram resultados semelhantes ao estudarem ratas gestantes e lactantes e seus folículos ovarianos primordiais, primários uni e multilaminares.

Sabe-se que a cafeína pode atravessar membranas e barreiras biológicas livremente, incluindo os tecidos ovarianos, e que a adenosina estimula angiogênese tecidual (Li et al, 2013). O fato de a cafeína ser uma substância antagônica à adenosina pode ter levado à redução da angiogênese ovariana e consequente alteração do fluxo sanguíneo para os folículos. Além disso, Li e colaboradores já relataram, em 2013, aumento na expressão de caspase-3 e redução de Bcl-2 consequentes do consumo de cafeína. Esses resultados sugerem que o efeito inibitório da cafeína na angiogênese e o aumento da atresia folicular podem estar associados, pelo menos em parte, à indução de apoptose de células endoteliais, provavelmente mediada por um mecanismo dependente de caspase-3.

Geração F2

Desde a década de 80, estudos têm sugerido que a cafeína possui efeitos teratogênicos não apenas nos animais consumidores diretos, mas também por mais de uma geração, tanto do ponto de vista do desenvolvimento pós-natal, quanto de cunho comportamental desta prole (Sinton, 1981). Os dados obtidos no presente estudos demonstraram que a geração F2 não sofreu tanto o impacto do consumo de cafeína por suas avós. Entretanto, resultou em consequências notáveis,

especialmente do ponto de vista reprodutivo das netas cujas avós consumiram cafeína em algum momento pré e/ou pós-natal.

Os resultados demonstraram que o consumo de cafeína pela geração parental não interferiu no número de nascidos vivos ($n = 11 \pm 0,9$), tampouco na proporção entre machos e fêmeas na prole F2 ($P > 0,05$). No que diz respeito às medidas de comprimento iniciais das fêmeas analisadas, estas se mostraram afetadas pela cafeína até o seu desmame ($P < 0,05$; Figura 14), indicando que a cafeína consumida pela geração parental parece influenciar no crescimento da prole até os 37 dias pós-nascimento. O mesmo não ocorreu em sua fase adulta, quando não há diferença estatística entre os comprimentos dos grupos experimentais ($P > 0,05$, Figura 14).

Em relação ao ganho de peso ao longo destas aferições, este também foi afetado ao longo do desenvolvimento da prole, que já nasce com um peso inferior aos animais do grupo controle ($P < 0,05$; Figura 13). Esta característica se inverte logo na primeira de vida dos animais e perdura até o início da vida adulta (aproximadamente aos 40 dias pós-gestacionais). Uma vez adultos, estes animais não apresentam mais diferenças de peso entre os grupos experimentais ($P > 0,05$; Figura 15).

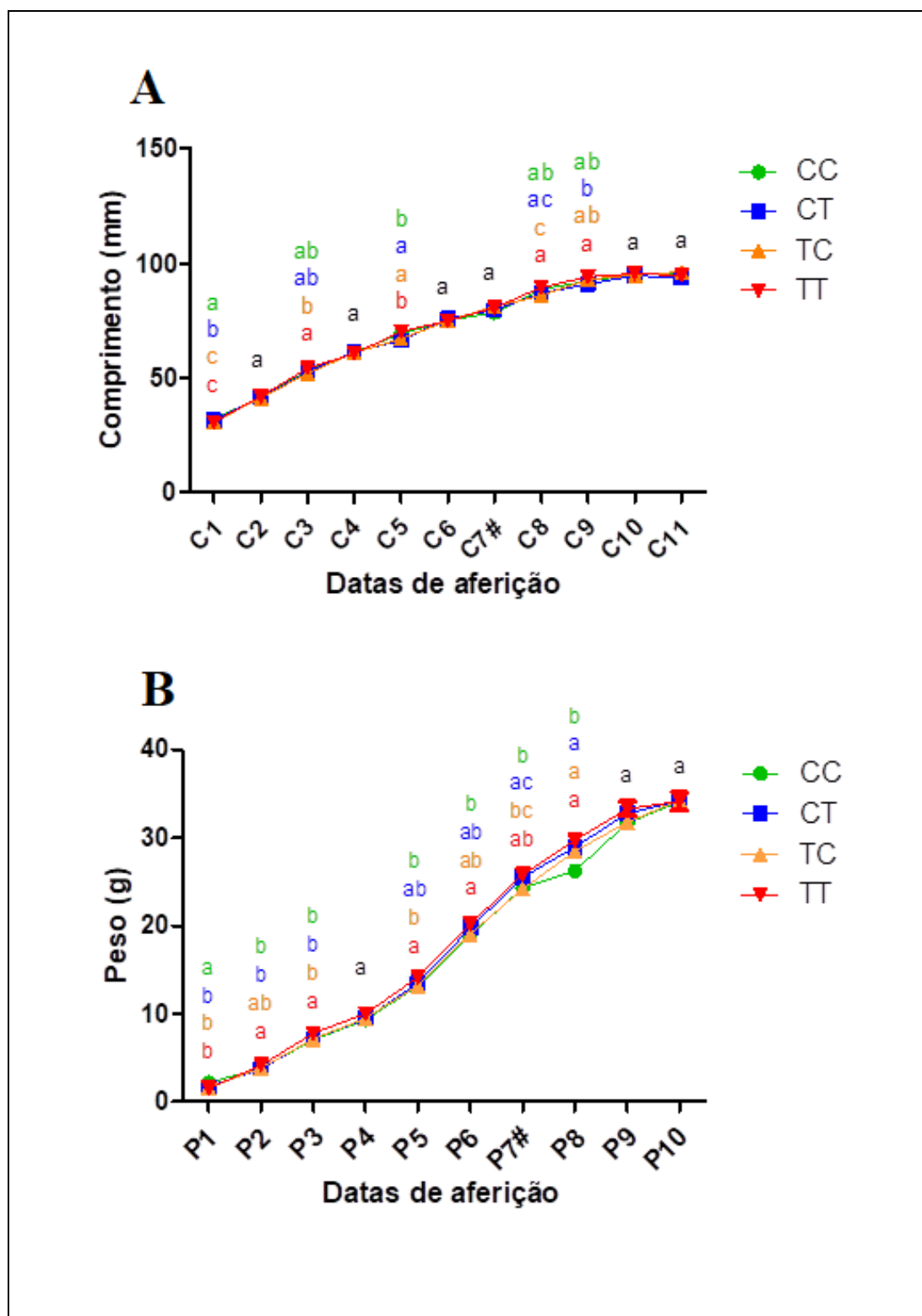


Figura 14: Biometria da prole (F1). A - Curva de crescimento (comprimento em centímetros) das proles de fêmeas da geração F1 de camundongos cujas mães consumiram ou não cafeína de forma crônica durante a gestação e/ou a lactação. B - Curva de peso (em gramas) dos filhotes fêmea F1 de camundongo cuja mãe consumiu ou não cafeína cronicamente durante a gestação.

e/ou a lactação. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação; #: idade do desmame. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).

A detecção de abertura vaginal das fêmeas F2 não mostrou diferença entre os grupos estudados, e se deu no período médio $26,4 \pm 1,2$ dias pós-natais. Uma vez avaliado o ciclo estral desta geração, notou-se novamente um aumento nos dias de fase lútea nos animais que tiveram contato indireto com a cafeína sem, entretanto, se mostrar tão evidente como nas gerações parental e em F1 ($P < 0,05$; Figura 15).

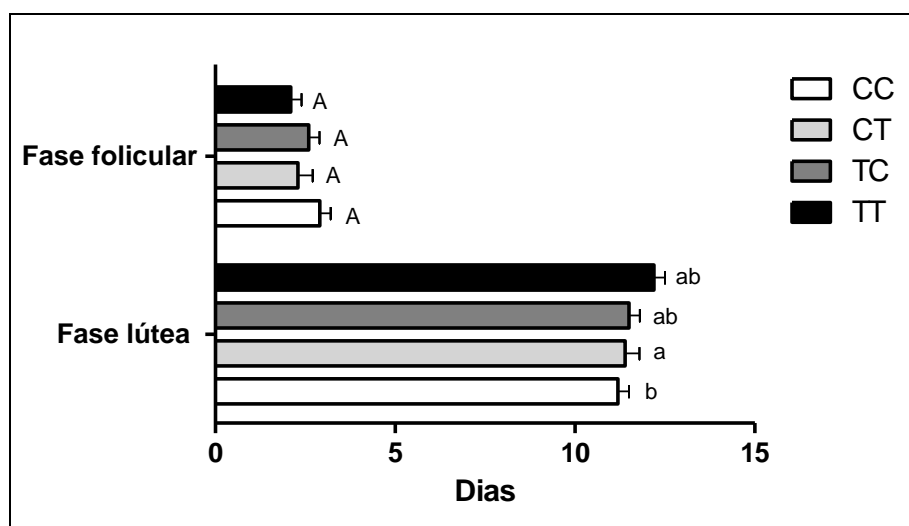


Figura 15: Parâmetros reprodutivos das fêmeas F2. Duração das fases lútea e folicular dos ciclos estrais ao longo de 30 dias, de fêmeas F1 submetidas ou não consumo indireto de cafeína. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).

Conforme previsto na metodologia, os ovários destas fêmeas foram coletados, e sua população folicular, analisada (Tabela 5). Novamente, pôde-se perceber uma menor reserva folicular primordial quiescente em todos os grupos tratados (CT, TC e TT), assim como um menor número de folículos primários, indicando que estes animais já nasceram com uma reserva depletada de folículos primordiais ($P < 0,05$). Todos os animais tratados também apresentaram um

maior número de folículos atrésicos, com uma incidência de pelo menos três vezes o número de folículos atrésicos observados no grupo controle. Tais achados descritos em F1 e F2 remetem à ideia de que seria viável, além de experimentos de detecção de fatores de crescimento ativos nas fases foliculares pré-antrais, como EGF (fator de crescimento epidérmico) e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina), e também experimentos relacionados à apoptose/morte celular, como caspase-3.

Tabela 6 – Contagem e proporção das diferentes categorias de folículos em ovários de fêmeas F2 de camundongos Swiss, após consumo crônico, ou não (CC), de suas avós, de 120 mg/caf/dia durante a gestação (TC), lactação (CT), ou ambas (TT).

Folículo/Tratamento	CC (n=5)	CT (n=5)	TC (n=5)	TT (n=5)
Primordial quiescente	52,0 ± 6,9 ^a	4,2 ± 6,9 ^b	4,8 ± 6,9 ^b	13,0 ± 6,9 ^b
Primordial quiescente (%)	11,4 ± 1,3 ^a	2,2 ± 1,3 ^b	3,0 ± 1,3 ^b	3,6 ± 1,3 ^b
Primordial ativado	134,4 ± 21,0 ^a	70,8 ± 21,0 ^a	73,6 ± 21,0 ^a	116,8 ± 21,0 ^a
Primordial ativado (%)	31,8 ± 0,5 ^a	36,0 ± 0,5 ^a	42,6 ± 0,5 ^a	33,4 ± 0,5 ^a
Primário unilaminar	164,6 ± 11,6 ^a	46,2 ± 11,6 ^b	32,6 ± 11,6 ^b	38,6 ± 11,6 ^b
Primário unilaminar (%)	40,6 ± 4,4 ^a	24,8 ± 4,4 ^{ab}	22,4 ± 4,4 ^b	11,0 ± 4,4 ^b
Primário multilaminar	33,4 ± 11,3 ^a	21,2 ± 11,3 ^a	23,4 ± 11,3 ^a	32,6 ± 11,3 ^a
Primário multilaminar (%)	6,6 ± 4,9 ^a	11,0 ± 4,9 ^a	16,4 ± 4,9 ^a	9,0 ± 4,9 ^a
Atrésicos	34,8 ± 8,9 ^b	45,6 ± 8,9 ^b	17,4 ± 8,9 ^b	143,8 ± 8,9 ^a
Taxa de atresia folicular (%)	9,6 ± 6,3 ^b	25,2 ± 6,3 ^{ab}	15,4 ± 6,3 ^b	42,8 ± 6,3 ^a
Total folículos	419,2 ± 34,0 ^a	188,0 ± 34,0 ^b	151,8 ± 34,0 ^b	344,8 ± 34,0 ^a

Experimento 4 – Avaliação cognitiva e comportamental da prole adulta das gerações F1 e F2 subsequentes à exposição pré-natal e neonatal de cafeína.

Os experimentos, cujos resultados serão descritos a seguir, foram executados em colaboração com o Laboratório de Neurobiologia Professora Conceição Machado, uma vez que esta equipe possui recursos humanos e estruturais especializados em comportamento animal.

Geração F1

Para a avaliação de qualquer aspecto comportamental, é necessário que os testes se iniciem pelo *Open field*, ou “teste do campo aberto”, a fim de se avaliar a capacidade de locomoção espontânea de cada animal (Magenis et al, 2022). Além disso, o teste em questão também avalia o grau de motivação exploratória, ansiedade e hiperatividade dos animais através de seus movimentos e posicionamentos dentro do campo aberto (Magenis et al, 2022). Se o animal apresenta uma maior aversão à região do centro deste campo aberto e priorizar o canto da caixa em que é acondicionado durante o tempo de teste, tem-se um indicativo de maior ansiedade. Por outro lado, o excesso de movimento pelos cantos ou no próprio centro, indica hiperatividade (Magenis et al, 2022). Assim sendo, as figuras 16 e 17 evidenciam os resultados obtidos em machos e fêmeas da geração F1. Todos os animais se deslocaram normalmente e puderam ser avaliados quanto aos demais aspectos comportamentais. Entretanto, o período de permanência no centro do campo e a distância total percorrida apontaram sinais de ansiedade e hipertatividade em todas as fêmeas que tiveram algum contato indireto com a cafeína (gestação e/ou lactação), e os machos também mostraram sinais de ansiedade e hiperatividade motora em CT e TC, respectivamente ($P < 0,05$).

Resultados controversos são encontrados em testes relativos ao open field em camundongos, e os estudos variam bastante entre encontrar ou não hiperatividade e/ou ansiedade relativas ao consumo de cafeína (Magenis et al., 2022; Al-Basher et al, 2018; Laureano-Melo, 2016; Silva et al., 2013). Isso se dá pelo tipo de análise escolhida durante o experimento, como a contagem do número de defecações, de

movimentos de escalada e encolhimento, número de cruzamento pelo centro ou pelos quadrantes abertos do campo, dentre outros (Magenis et al, 2022). Na pesquisa em questão, foram escolhidos dois parâmetros de análise: a distância total explorada pelos animais e o tempo de permanência na área aberta das caixas exploratórias, portanto o resultado positivo para ansiedade motora se deveu a tais tipos de análise.

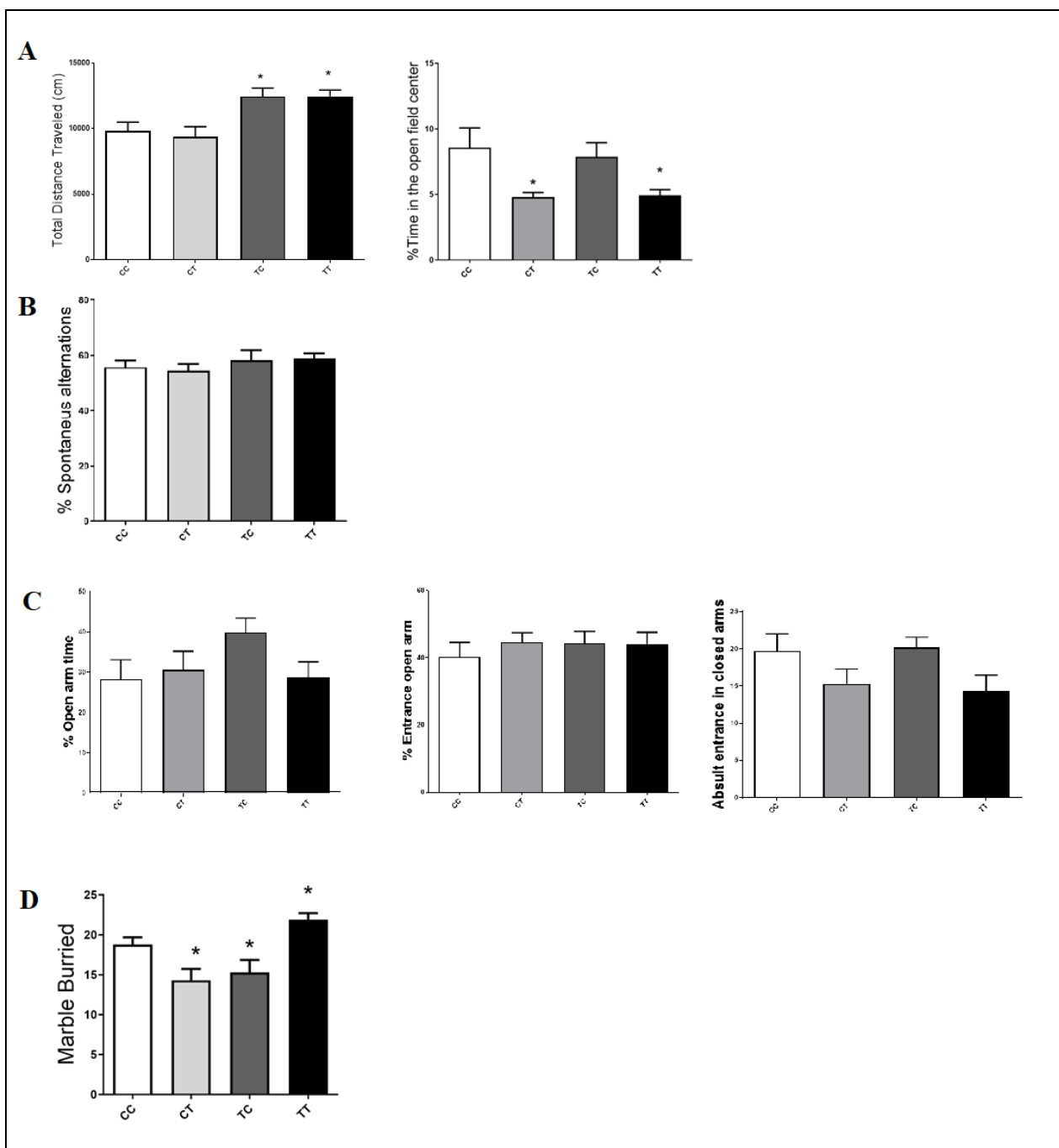


Figura 16: Testes de comportamento relativos a comportamento ansioso e compulsão das fêmeas F1.A – Campo aberto (Open field) com fêmeas e machos da geração F1; B – Y-maze; C – Labirinto em cruz elevado; D – Marble burried. Tratamentos: CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação; A-B: tempo de permanência no centro do campo aberto, em segundos; C-D: distância total percorrida no teste de campo aberto; Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais do mesmo gráfico ($P < 0,05$).

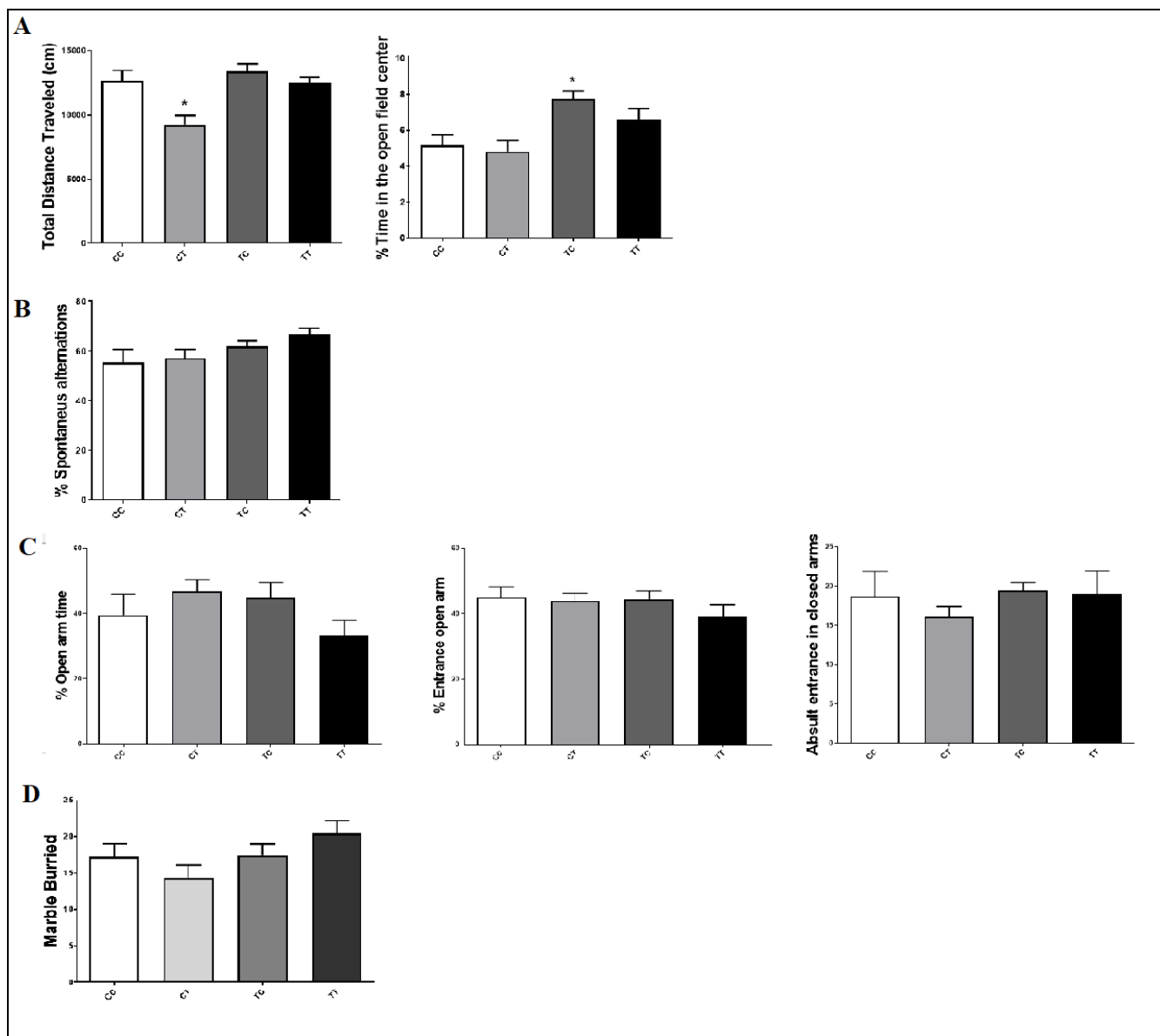


Figura 17: Testes de comportamento relativos a comportamento ansioso e compulsão dos machos F1.A – Campo aberto (Open field) com fêmeas e machos da geração F1; B – Y-maze; C – Labirinto em cruz elevado; D – Marble burried. Tratamentos: CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação; A-B: tempo de permanência no centro do campo aberto, em segundos; C-D: distância total percorrida no teste de campo aberto; Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais do mesmo gráfico ($P < 0,05$).

Ainda em relação aos sinais de ansiedade demonstrados pelos animais da geração F1, procedeu-se ao teste do labirinto em cruz elevado (Elevated plus maze). De acordo com este teste, a aversão exploratória pelo braço elevado aberto do labirinto indicaria sinais de ansiedade por parte do animal estudado, ou seja, quanto menor o tempo de permanência na região aberta do aparato, maior a ansiedade apresentada pelo animal (Laureano-Melo, 2016). Os resultados de tempo de permanência deste teste não evidenciaram diferenças comportamentais entre os grupos estudados, tanto em machos quanto em fêmeas ($P > 0,05$; Figuras 16C e 17C). Resultados semelhantes em relação a sinais de ansiedade aumentada em camundongos Swiss foram obtidos por Laureano-Melo e colaboradores (2016) e Al-Basher e sua equipe (2018): tanto filhotes quanto adultos mostraram comportamento ansioso em teste de campo aberto, embora sem diferenças no labirinto em cruz elevado. Bashkatova e colaboradores (2018) demonstraram resultados semelhantes com ratos F1 em labirinto em cruz elevado: não foi detectado comportamento ansioso em relação à permanência no braço elevado aberto do labirinto, embora os movimentos horizontais dos animais tenham sido estatisticamente significativos e indicadores de aumento de atividade motora em relação ao grupo controle.

Através do teste comportamental denominado “Marble Burying”, em que os animais tendem a se proteger de objetos aversivos (bolas de gude) dentro do seu ambiente de vivência (caixa de PVC com maravalha) e em um tempo cronometrado, é possível avaliar, a partir da profundidade e do número de bolas enterradas, se existe algum tipo de comportamento de tendência compulsiva (Angoa-Perez et al, 2013). Idealmente, o animal deverá iniciar o teste enterrando algumas das bolas, mas, ao perceber que são inofensivas, sua tendência é parar de enterrá-las e permanecer tranquilo no ambiente em questão (Archer et al, 1987). As fêmeas de todos os grupos tratados, com destaque para o grupo TT, mostraram-se mais compulsivas através

do comportamento não apenas de enterrar mais bolas que o necessário (TT), mas também através de profundidades maiores que o habitual (CT e TC) ($P < 0,05$; Figuras 16D e 17D). Os machos tratados, por sua vez, não evidenciaram comportamento diferente do habitual neste teste ($P > 0,05$).

Testes quanto à coordenação motora e capacidade de aprendizado também foram realizados com os animais em questão. O “Rotarod Test Dunhan and Miya” treina, ao longo de três dias consecutivos, a habilidade neuromotora de um animal em se equilibrar em uma haste rotativa motora, e espera-se que esta habilidade seja aprendida e o tempo de latência (tempo até a queda do animal desta haste) esteja reduzido no último dia do teste (Hernier et al, 2016). Os machos da geração F1, mesmo os CC, não desenvolveram aprendizado ou coordenação motora para concluir o experimento, portanto foram excluídos do teste. As fêmeas, por sua vez, mostraram-se mais sensíveis a este teste e o grupo TC mostrou déficit de aprendizado em relação a todos os demais ($P < 0,05$; Figura 18).

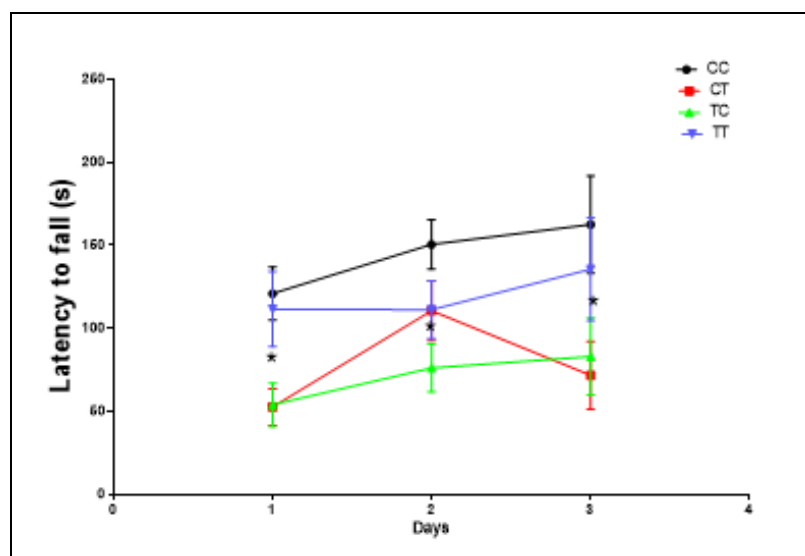


Figura 18: Teste Rotarod de coordenação a aprendizado motor realizado com fêmeas da geração F1. Latency to fall: tempo de permanência no aparato durante os giros até a queda, em três dias de teste. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$). CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação.

Testes relacionados à memória espacial de curto prazo e de reconhecimento social também foram feitos com os animais experimentais. O Y-maze, que diz respeito à memória espontânea ou de trabalho, não mostrou alterações entre os indivíduos, tanto em machos, quanto em fêmeas, sugerindo que a cafeína não tenha relação com alterações relacionadas a este tipo de memória ($P > 0,05$; Figuras 16 e 17B). A alternância espontânea entre os braços do labirinto em “Y” é normalmente esperada devido à curiosidade inata de roedores para explorar novos espaços em detrimento de outros já visitados, e um camundongo com memória espontânea intacta teoricamente reflete áreas corticais pré-frontais também intactas (Kraue et al, 2019).

Ao se avaliar do ponto de vista do reconhecimento social com memórias de curta duração, houve um resultado não-satisfatório para os testes das fêmeas, que não funcionou. Entretanto, os machos que passaram pelo teste de reconhecimento social (TRS), mostraram um prejuízo de memória de curto prazo no tratamento CT ($P < 0,05$; Figura 19). Os machos CT se mostraram menos aptos neste teste pelo fato de passarem um tempo semelhante se alternando entre S1 e a câmara vazia, indicando uma provável memória de curto prazo prejudicada.

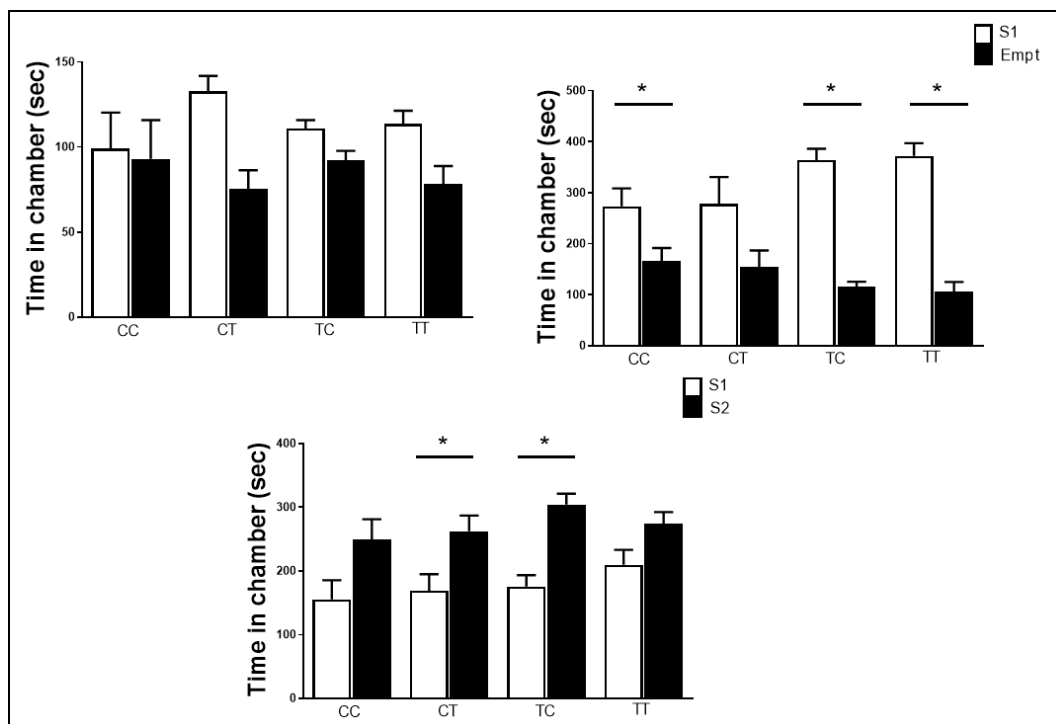


Figura 19: Teste de reconhecimento social e memória de curto prazo. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Por fim, testes relacionados a comportamentos depressivos fecharam as análises comportamentais dos animais. O nado forçado mede em tempo e em tipos de movimento as tendências que um animal tem de se salvar, através do nado em um ambiente de afogamento iminente. Os tempos de latência até inércia e imobilidade definem uma desistência do nado e um efeito depressivo da substância administrada ao animal (Can et al, 2012). Todas as fêmeas, cujas mães consumiram cafeína em sua gestação e/ou lactação, apresentaram comportamento de imobilidade, e os grupos CT e TT (cafeína na lactação), mostraram este comportamento mais precoce que as demais ($P < 0,05$; Figura 20). Quanto aos machos, a característica de imobilidade pôde ser observada nos animais amamentados indiretamente com cafeína (CT e TT) ($P < 0,05$; Figura 21).

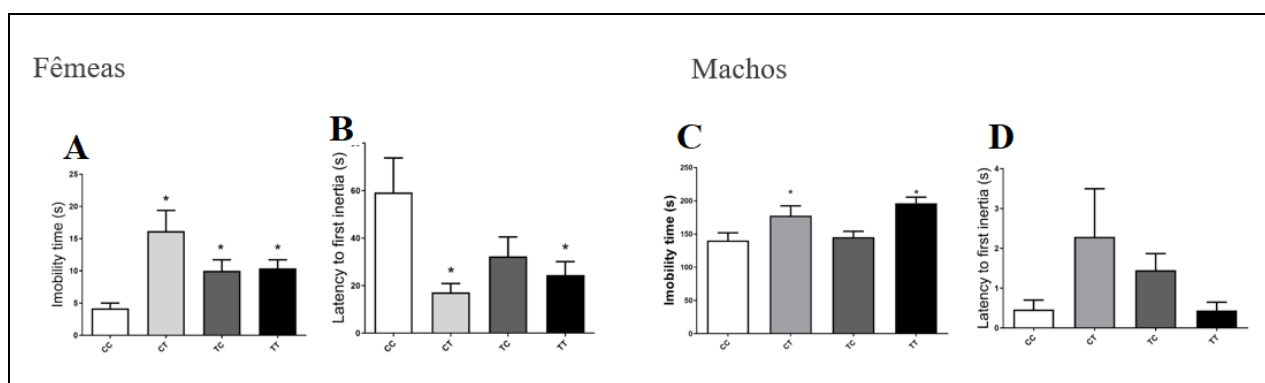


Figura 20: Teste do nado forçado de machos e fêmeas. A e C: tempo de imobilidade diante do desafio de afogamento; B e D: tempo decorrido até a imobilidade apresentada pelo indivíduo. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação.

Geração F2

Os mesmos testes de comportamento aos quais a geração F1 foi submetida, foram feitos com a geração F2, ou seja: os netos e netas das fêmeas que consumiram ou não cafeína durante a sua gestação e/ou lactação. Como será descrito a seguir, as fêmeas F2 foram notavelmente mais afetadas pela cafeína que os machos.

O teste de campo aberto comprovou a motricidade de todos os animais e destacou as fêmeas TC e TT como mais ansiosas e aversivas ao centro do campo que as demais ($P < 0,05$; Figuras 21A e 22A).

Os machos F2 não mostraram diferenças em seu comportamento entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). O labirinto em cruz elevado, por sua vez, destacou o grupo de fêmeas CT como mais ansioso e aversivo ao braço aberto do aparato ($P < 0,05$; Figuras 21C e 22C). Novamente, os machos não apresentaram comportamento atípico neste teste ($P > 0,05$). Quanto ao Marble burriyng, mais uma vez as fêmeas TT apresentaram sinais de compulsão ao enterrar mais bolas de gude que os demais grupos experimentais ($P < 0,05$; Figuras 21D e 22D).

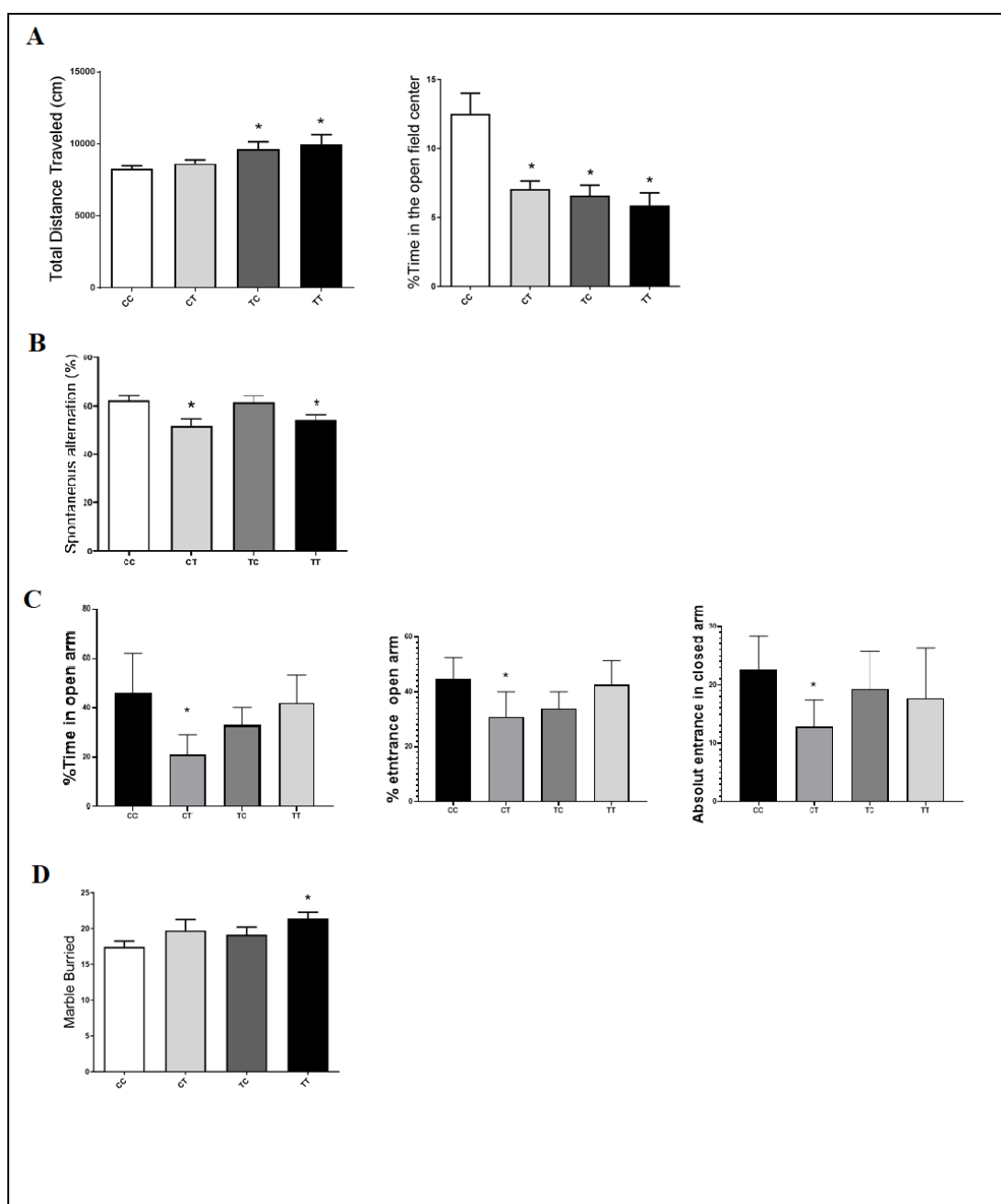


Figura 21: Testes de comportamento relativos a comportamento ansioso e compulsão das fêmeas F2.A – Campo aberto (Open field) com fêmeas e machos da geração F1; B – Y-maze; C – Labirinto em cruz elevado; D – Marble burried. Tratamentos: CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação; A-B: tempo de permanência no centro do campo aberto, em segundos; C-D: distância total percorrida no teste de campo aberto; Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais do mesmo gráfico ($P < 0,05$).

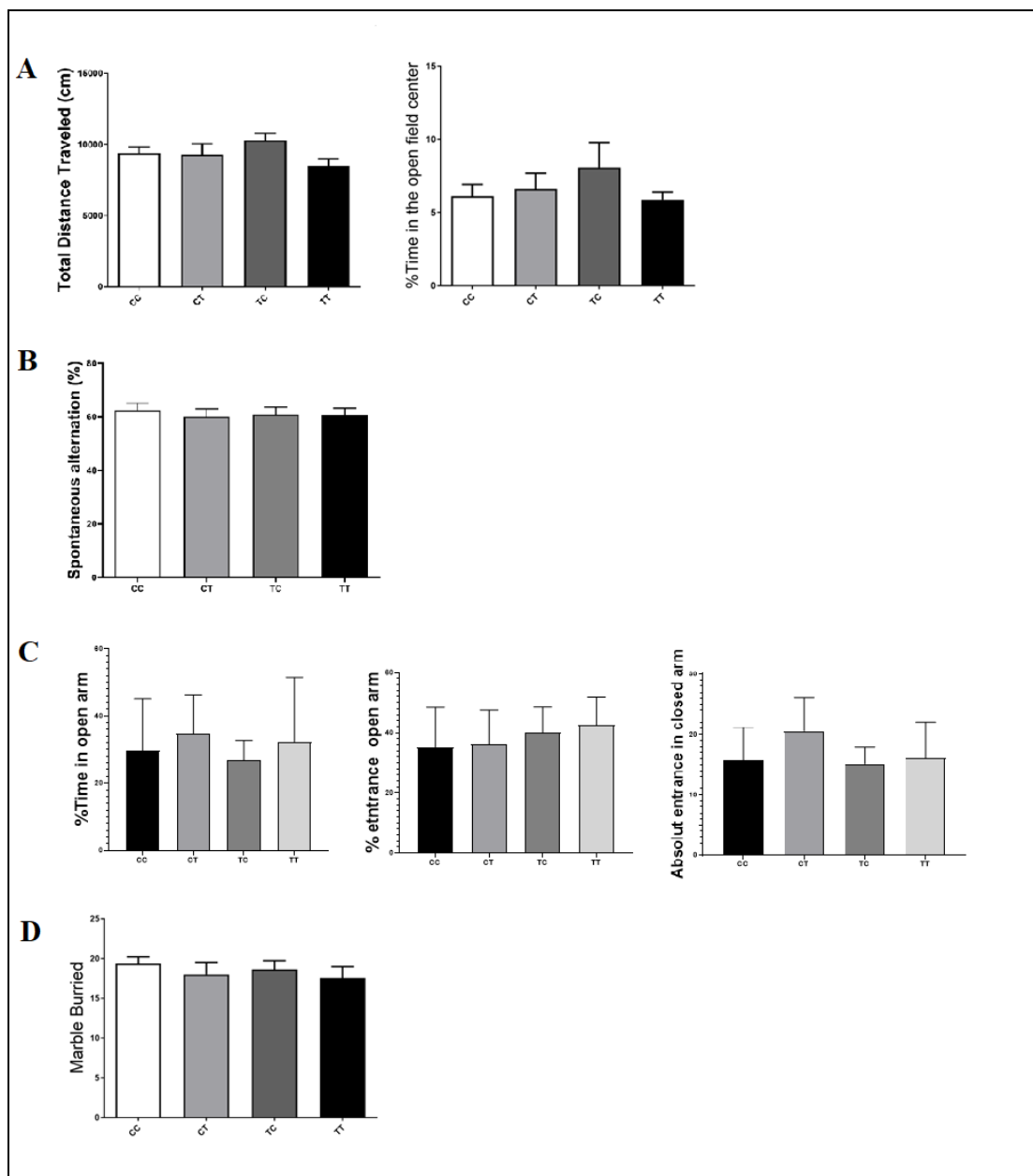


Figura 22: Testes de comportamento relativos a comportamento ansioso e compulsão dos machos F2.A – Campo aberto (Open field) com fêmeas e machos da geração F1; B – Y-maze; C – Labirinto em cruz elevado; D – Marble burried. Tratamentos: CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação; A-B: tempo de permanência no

centro do campo aberto, em segundos; C-D: distância total percorrida no teste de campo aberto; Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais do mesmo gráfico ($P < 0,05$).

O teste Rotarod de aprendizado e coordenação motora mostrou fêmeas CT com um baixo índice de aprendizado e de coordenação motora ($P > 0,05$; Figura 23). Novamente o teste Rotarod não funcionou com os machos e não pôde ser avaliado estatisticamente.

Passando ao Y-maze e aos testes de reconhecimento social, novamente as fêmeas F2 tiveram destaques negativos em seus resultados: CT e TT se mostraram com déficit de memória espontânea e CT tiveram dificuldade em memória de curta duração ($P < 0,05$; Figura 24). Sobre o teste de reconhecimento social, apesar de este não ter funcionado nas fêmeas F2, os machos CT e TC mostraram tal dificuldade em relação aos demais ($P < 0,05$). Já nos testes de nado forçado, nenhum animal de nenhum grupo experimental F2 apresentou particularidades quanto a algum tipo de comportamento depressivo ($P > 0,05$; Figura 25).

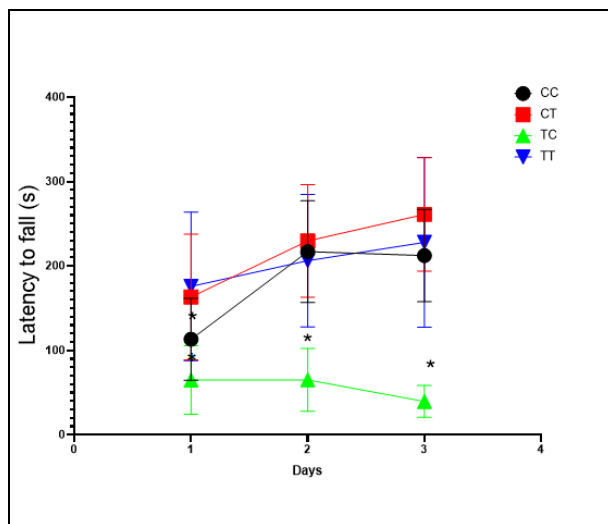


Figura 23: Teste Rotarod de coordenação a aprendizado motor realizado com fêmeas da geração F2. Latency to fall: tempo de permanência no aparato durante os giros até a queda, em três dias de teste. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$). CC: grupo controle; CT: caféina durante a gestação; TC: caféina durante a lactação; TT: caféina durante a gestação e a lactação.

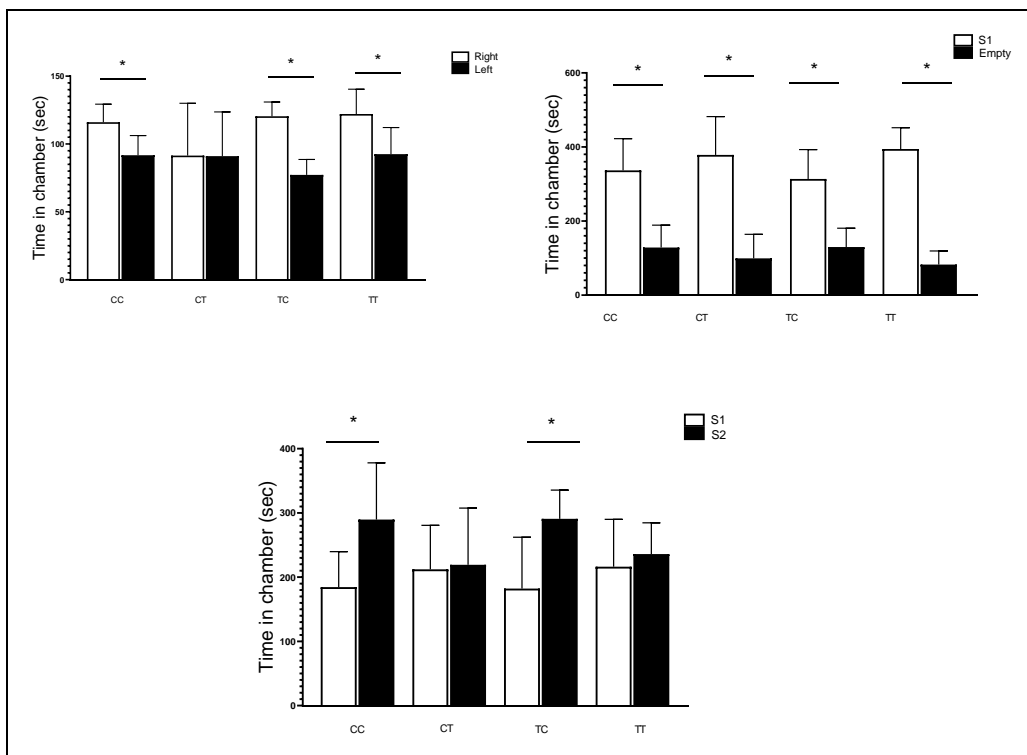


Figura 24: Reconhecimento social em machos da geração F2. Asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$). CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação.

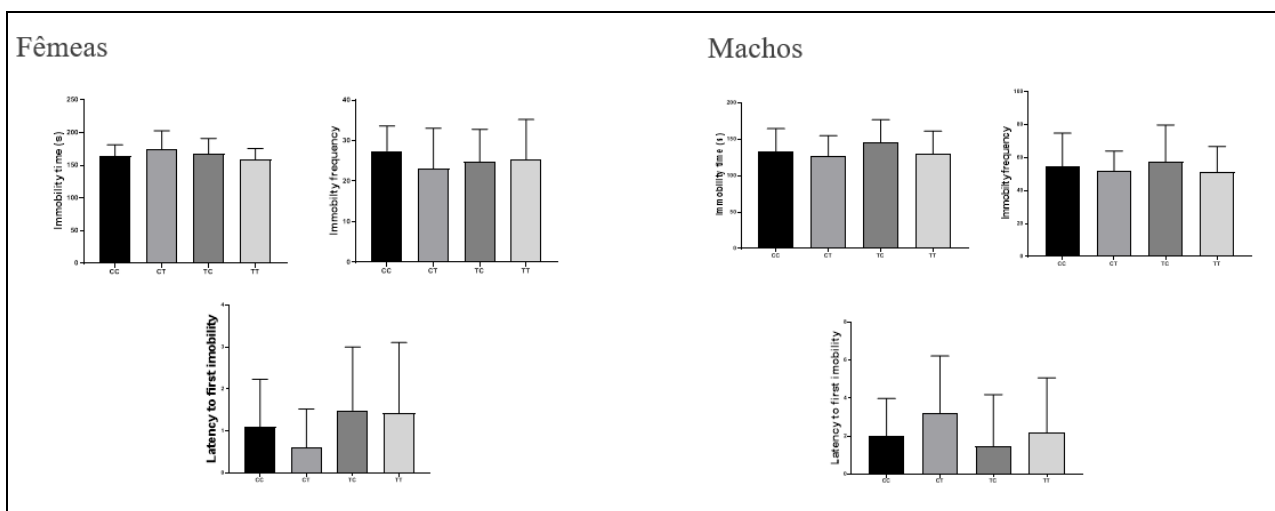


Figura 25: nado forçado em fêmeas e machos da geração F2. CC: grupo controle; CT: cafeína durante a gestação; TC: cafeína durante a lactação; TT: cafeína durante a gestação e a lactação.

Mesmo com menos intensidade nos animais F2, os resultados cognitivos e comportamentais

obtidos nesta geração são preocupantes. Eles indicam que não houve apenas um ambiente intrauterino inadequado à F1, mas sim uma provável alteração epigenética que perdurou por pelo menos um fenótipo seguinte, o da geração F2. Esses processos de passagem transgeracional de mudanças na metilação do DNA genômico podem ocorrer em linhagem feminina e masculina, já que a transmissão é via gametas (Björklund et al, 2008). A regulação epigenética é um mecanismo de reprogramação e é basicamente relacionada ao silenciamento de genes, *imprinting* genômico e à regulação transcricional de genes específicos de tecidos durante diferenciação celular do indivíduo (Deodati et al, 2019). Evidências de reprogramação genômica são principalmente relacionadas uma vida intrauterina com insuficiência de nutrientes e/ou oxigênio e podem alterar a expressão de múltiplos genes no indivíduo, originando doenças ou condições que perduram até a vida adulta (Deodati et al, 2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cafeína é uma das substâncias mais popularmente consumidas no mundo, seja por homens, mulheres gestantes ou não, nutrizes e crianças. Muito já se sabe sobre suas consequências durante o desenvolvimento pré- e pós-natal em animais, embora estudos com humanos sejam ainda inconclusivos, devido a vieses de pesquisa, sensibilidade individual e aspectos éticos. As doses indicadas de cafeína durante os períodos gestacional e lactacional também são constantemente questionadas por novos estudos, e têm variado enormemente entre 0 e 400 mg.

Os achados do presente trabalho reafirmam a necessidade de se evitar a cafeína durante o período gestacional e lactacional, especialmente durante a amamentação, quando a degradação da cafeína se torna muito comprometida por conta do organismo imaturo do bebê.

Estudos complementares relacionados a outros parâmetros reprodutivos se fazem necessários para complementação deste trabalho, especialmente os relacionados à função ovariana pré-concepção. Além disso, estudos funcionais como o uso de marcadores ovarianos (por exemplo, imunohistoquímica com KI-67 e com caspase-3) também são plausíveis, para investigar a fundo o que realmente ocorre na fertilidade diante do consumo crônico de cafeína.

Obviamente, estudos em animais e em particular em roedores não podem prever todos os possíveis efeitos de uma substância na espécie humana, especialmente em gerações subsequentes, com

um curto período de vida testada (60 dias). Entretanto, este tipo de trabalho pode, sim, ajudar a endossar e mitigar o risco associado ao uso de cafeína em mulheres grávidas e lactantes, sugerindo fortemente que as doses consideradas seguras deveriam ser revisadas.

REFERÊNCIAS

- Al-Basher GI, Aljabal H, Almeer RS, Allam AA, Mahmoud AM. Perinatal exposure to energy drink induces oxidative damage in the liver, kidney and brain, and behavioral alterations in mice offspring. *Biomed Pharmacother.* 2018; 102:798-811.
- Aldridge A, Bailey Neims A. The disposition of caffeine during and after pregnancy. *Semin Perinatol.* 1981; 5:310–4.
- Almeida FRCL, Dias ALNA. Pregnancy in pigs: the journey of an early life. *Domest Anim Endocrinol.* 2022; 78:106656.
- Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *J Vis Exp.* 2013 Dec 24;(82):50978.
- Araújo JR, Gonçalves P, Martel F. Modulation of glucose uptake in a human choriocarcinoma cell line (BeWo) by dietary bioactive compounds and drugs of abuse. *J Biochem.* 2008; 144(2).
- Archer T, Freddiksson A, Lewander T, Södeberg U. Marble burying and spontaneous motor activity in mice Marble burying and spontaneous motor activity in mice: interactions over days and the effect of diazepam. *Scandinavian Journal of Psychology.* 1987; 28(3).
- Arnaud MJ. Metabolism of caffeine and other components of coffee. In: Garattini S. *Caffeine, Coffee, and Health.* New York: Raven Press. 1993; 43–95.
- Arnaud MJ. The pharmacology of caffeine. *Prog Drug Res.* 1993; 31:273–313.
- Axelsson G, Rylander R, Molin I. Outcome of pregnancy in relation to irregular and inconvenient work schedules. *Br J Ind Med.* 1989; 46:393–398.
- Barker, DJ. The origins of the developmental origin's theory. *J. Intern. Med.* 2007; 261:412–417.

- Bashkatova VG, et al. Influence of caffeine consumption by pregnant rats on behavior and learning in their offspring. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018; 6:299-301.
- Bauer R, Walter B, Hoppe A, et al. Body weight distribution and organ size in newborn swine (*sus scrofa domestica*): a study describing an animal model for asymmetrical intrauterine growth retardation. *Exp Toxic Pathol*. 1998; 50:59-65.
- Barone JJ, Roberts HR. Caffeine consumption. *Food Chem Toxicol*. 1996; 34:119–29.
- Bech BH, Nohr EA, Vaeth M, Olsen J. Coffee and fetal death: a cohort study with prospective data”. *Am J Epidemiol*. 2005;182(10).
- Bech BH, Obel C, Henriksen TB, Olsen J. Effect of reducing caffeine intake on birth weight and length of gestation: randomised controlled trial. *BMJ*. 2007.
- Benowitz NL. Clinical pharmacology of caffeine. *Annual review of medicine*. 1990;41(1), 277-288.
- Berlin CM Jr, Denson HM, Daniel CH, et al. Disposition of dietary caffeine in milk, saliva, and plasma of lactating women. *Pediatrics*. 1984; 73:59–63.
- Bertolin K, Murphy BD. Mouse estrous cycle. *Pathology Analysis of the Placenta*. In: Croy, A., Yamada, A.T., DeMayo, F.J., Adamson, S.L. 2014. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. London: Elsevier. 829p.
- Bolon B. 2014. *Pathology Analysis of the Placenta*. In: Croy, A., Yamada, A.T., DeMayo, F.J., Adamson, S.L. 2014. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. London: Elsevier.175-88.
- Bowes AD. 1989. Caffeine, Bowes’ and Church’s food values of portions commonly used. Philadelphia: Lippincott, 261p.
- Bracken MB, Triche E, Grosso L, Hellenbrand K, Belanger K, Leaderer BP. Heterogeneity in assessing self-reports of caffeine exposure: implications for studies of health effects. *Epidemiology*. 2002;13(2):165-71.

- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria da Atenção à Saúde. 2016. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Amamentação e uso de medicamentos e outras substâncias / Ministério da Saúde, Secretaria da Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. – 2. ed., 1. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde. 92 p.
- Browne ML, Bell EM, Druschel CM, Gensburg LJ, et al. Maternal caffeine consumption and risk of cardiovascular malformations: Birth Defects Research. Clinical and Molecular Teratology. 2007;79(7):533–43.
- Burton GJ, Kaufmann P, Huppertz B. 2006. Anatomy and Genesis of the Placenta. In: Neill, J.D., et al. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3 ed (Elsevier). New York: Elsevier; 189-243.
- Butt MS, Sultan MT. Coffee and its consumption: Benefits and risks. Crit Rev Food Sci Nutr. 2011.
- Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. Plos One. 2002;7(4):1-5.
- Campos-Junior PHA, Assuncao CM, Carvalho BC, et al. Follicular populations, recruitment, and atresia in the ovaries of different strains of mice. Reproductive Biology. 2012;12, 41–55.
- Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The mouse forced swim test. J Vis Exp. 2012.
- Cardoso LC, Costa BFMD, Felicioni F, et al. Maternal protein restriction before and during pregnancy leads to a gestational day-dependent response of folliculogenesis in outbred mice. Reprod Fertil Dev. 2021.
- Carmeliet, P, Moons, L., Luttun, A. et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. Nat. Med. 2001;7:575–583.

- Cavalcante FS, Aiceles V, Moraes Dde F, Alves-Pereira JL, Faria TS, Ramos Cda F. The testis of the mice C57/BL6 offspring in adulthood have alterations due to maternal caffeine consumption. *Acta Cir Bras.* 2014;29(1):16-23.
- Chatelain P. Children born with intrauterine growth retardation (IUGR) or small for gestational age (SGA): Long term growth and metabolic consequences. *Endocr Regul.* 2000; 34:33–6.
- Chen DB, & Zheng J. Regulation of placental angiogenesis. *Microcirculation.* 2014; 21(1), 15-25.
- Chou CH, Chen MJ. The Effect of Steroid Hormones on Ovarian Follicle Development. *Vitam Horm.* 2018;107:155-175.
- Christian, M.S., Brent, R.L. Teratogen Update: Evaluation of the reproductive and developmental risks of caffeine. *Teratology.* 2001; 64:51–78.
- Costermans NGJ, et al. In ovaries with high or low variation in follicle size, granulosa cells of antral follicles exhibit distinct size-related processes. *Molecular human reproduction.* 2019; 10:614-624.
- Croy, A., Yamada, A.T., DeMayo, F.J., Adamson, S.L. 2014. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy.* London: Elsevier; 808p.
- D'Amicis, A., Viani, R. 1993. The consumption of coffee. In: Garattini S. *Caffeine, coffee and health.* New York: Raven Press;1–16.
- Del Castillo, N., Jiménez-Moleón, J.J., Olmedo-Requena, R., Martínez-Ruiz, V., et al. Perinatal outcomes of prematurity and birth weight according to maternal caffeine consumption. *Nutr Hosp.* 2015; 32:2658-64.
- Deodati A, Inzaghi E, Cianfarani S. Epigenetics and In Utero Acquired Predisposition to Metabolic Disease. *Front. Genet;* 2020.
- Dews, PB. 2011. *Caffeine: Perspectives from recent research.* Berlin: Springer Science & Business Media. 260p.

- Díaz P, et al. The role of placental nutrient sensing in maternal-fetal resource allocation. *Biology of Reproduction*.2014;91(4)1-10.
- Dorostghoal M, Mahabadi MK, Adham S. Effects of maternal caffeine consumption on ovarian follicle development in Wistar rats' offspring. *J Reprod Infertil*. 2011 Jan;12(1):15-22.
- EFSA. Scientific opinion on the safety of caffeine. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *EFSA J*. 2015;13(5),4102.
- Elmazar MMA, McElhatton R, Sullivan FM. Acute Studies to Investigate the Mechanism of Action of Caffeine as a Teratogen in Mice. *Human Toxicology*. 1981; 1:53-63.
- FDA (U. S. Food and Drug Administration). 2002. Center for Science and Public Interest Publisher of Nutrition Action Health. Letter.Frary, C.D., Johnson, R.K., Wang, M.Q.2005. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *J Am Diet Assoc*; 105: 110–113.
- FDA (U.S. Food and Drug Administration). 1980. Caffeine and pregnancy. *FDA Drug Bull*; 10:19–20.
- Florman HM, Ducibella T. Fertilization in Mammals. 2006. In: Neill JD et al. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3 ed (Elsevier). New York: Elsevier;55-112.
- Fujii T, Sasaki H, Nishimura H. Teratogenicity of caffeine in mice related to its model of administration. *Jap J Pharmac*, 1969.
- Gaskins AJ, Rich-Edwards JW, Williams PL, et al. Pre-pregnancy caffeine and caffeinated beverage intake and risk of spontaneous abortion. *Eur J Nutr*, 2016.
- Gilbert EF, Pistey WR. Effect on the offspring of repeated caffeine administration to pregnant rats. *J Reprod Fertil*. 1973;34(3):495-99.
- Gleason, J.L, Tekola-Ayele, F, Sundaram, R., et al. Association Between Maternal Caffeine Consumption and Metabolism and Neonatal Anthropometry: A Secondary Analysis ofthe NICHD Fetal Growth Studies-Singletons, *JAMA Netw Open*. 4. 2021.

- Gottlieb MG, Cruz IBM, Bodanese LC. Origem da síndrome metabólica: aspectos genético-evolutivos e nutricionais. *Scientia Medica*. 2008; 18:31-38.
- Goyan JE. Food and Drug Administration news release number. Washington DC: Food and Drug Administration; 1980.
- Greenwood DC, Thatcher NJ, Ye J, Garrard L, et al. Caffeine intake during pregnancy and adverse birth outcomes: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2014; 29:725-34.
- Grosso LM, Bracken MB. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Ann Epidemiol*. 2005; 15:460-6.
- Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. *Medical Bulletin*. 2001; 60:5-20.
- Harland, B. Caffeine and nutrition. *Nutrition*. 2000;16(7):522-6.
- Hernier AM, Froger-Colléaux C, Castagné V. CNS safety pharmacology: A focus on cognitive functions. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016.
- Hildebrandt R, Gundert-Remy U. Lack of pharmacological active saliva levels of caffeine in breast-fed infants. *Pediatr Pharmacol (New York)*. 1983; 3:237-44.
- Huang J, Zhou S, Ping J, et al. Role of p53-dependent placental apoptosis in the reproductive and developmental toxicities of caffeine in rodents. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012; 39:357-63.
- Iriyama T, et al. Elevated placental adenosine signaling contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Circulation*. 2015;131(8), 730-741.
- Jahanfar S, Jaafar SH. Effects of restricted caffeine intake by mother on fetal, neonatal and pregnancy outcomes. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015; Issue 6.
- Jahanfar S, Jaafar SH. Effects of restricted caffeine intake by mother on fetal, neonatal and pregnancy

outcomes. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(6):CD006965. 2013;Issue 2.

Jahanfar S, Jaafar SH. Effects of restricted caffeine intake by mother on fetal, neonatal and pregnancy outcome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(6):CD006965.

Jagiello G, Ducayen M, Lin JS. Meiosis suppression by caffeine in female mice. *Mol Gen Genet.* 1972;118(3):209-14.

James, Jack E. Maternal caffeine consumption and pregnancy outcomes: a narrative review with implications for advice to mothers and mothers-to-be. *BMJ evidence-based medicine.* 2020.

Jiang J-Y, Xiong H, Cao M, Xia X, Sirard M-A, Tsang BK. Mural granulosa cell gene expression associated with oocyte developmental competence. *Journal of ovarian research,* 2010; 3:6.

Kalow W, Tang B-K. Caffeine as a metabolic probe: Exploration of the enzyme-inducing effect of cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 49:44–48.

Kameshima S. et al. Eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) kinase/eEF2 plays protective roles against glucose deprivation-induced cell death in H9c2 cardiomyoblasts. *Apoptosis.* 2019; 24:359-368.

Kassan A. et al. Caveolin-3 plays a critical role in autophagy after ischemiareperfusion. *Cell Physiology.* 2016;311(6)854-865.

Klebanoff M, Levine RJ, Clemens JD, Wilkins DG. Maternal Serum Caffeine Metabolites and Small-for-Gestational Age Birth. *Am J Epidemiol.* 2002;1:32-37.

Klebanoff M, Levine R, DerSimonian R, Clemens J, Wilkins D. Serum caffeine and paraxanthine as markers for reported caffeine intake in pregnancy. *Ann Epidemiology.* 1998;8(2):107–111.

Knopman JM, Grifo JA, Novetsky AP, Smith MB, Berkeley AS. Is bigger better: the association between follicle size and livebirth rate following IVF? *Open J Obstet Gynecol* 2012;2:361–367.

- Kolahdouzan M & Hamadeh MJ. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2017;23(4), 272-290.
- Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods Mol Biol*. 2019;1916:105-111.
- Kren R, Ogushi S, Miyano T. Effect of caffeine on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*. 2004;12(1):31-38.
- Lai Q, Chen C, Zhang Z, et al. The significance of antral follicle size prior to stimulation in predicting ovarian response in a multiple dose GnRH antagonist protocol. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6:258–266.
- Laureano-Melo R, da Silveira AL, de Azevedo C, et al. Behavioral profile assessment in offspring of Swiss mice treated during pregnancy and lactation with caffeine, *Metab. Brain Dis*. 2016.
- Lechat MF, Borlee I, Bouckaert A, Misson C. Caffeine study. *Science*. 1980; 207:1296–97.
- Le Guennec J.; Billon B. Delay in caffeine elimination in breast-fed infants. *Pediatrics*. 1987.79:264-268.
- Lee AC. National and regional estimates of term and preterm babies born small for gestational age in 138 low-income and middle-income countries in 2010. *The Lancet Global Health* (1): e26 - e36.
- Leon D, Albasanz JL, Ruiz MA, et al. Adenosine A1 receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J Neurochem*. 2002; 82:625–34.
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*.2004;350(7):672-683.
- Li H, Jin SY, Son HJ, Seo JH, Jeong GB. Caffeine-induced endothelial cell death and the inhibition of angiogenesis. *Anat Cell Biol*. 2013 Mar;46(1):57-67.

- Li J, Zhao H, Song JM, et al. A meta-analysis of risk of pregnancy loss and caffeine and coffee consumption during pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015;130(2):116-22.
- Linn S, Schoenbaum SC, Monson, RR, et al. No association between coffee consumption and adverse outcomes of pregnancy. *N Engl J Med*. 1982; 306:141-5.
- Knutti R, Rothweiler H, Schlatter CH. Effect of pregnancy on the pharmacokinetics of caffeine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1981; 21:121–6.
- Kurlak LO, et al. Placental expression of adenosine A2A receptor and hypoxia inducible factor-1 alpha in early pregnancy, term and pre-eclamptic pregnancies: interactions with placental renin-angiotensin system. *Placenta*. 2015; 36:611-613.
- Kwak Y, Choia H, Baeb J, Choic Y, Roh J. Peri-pubertal high caffeine exposure increases ovarian estradiol production in immature rats. *Reproductive Toxicology*. 2017; 69:43-52.
- Drugs and Lactation Database (LactMed®) [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Child Health and Human Development; 2006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501922/>
- Ma ZL, Wan G, Lu W, et al. Investigating the effect of excess caffeine exposure on placental angiogenesis using chicken 'functional' placental blood vessel network. *J. Appl. Toxicol*. 2015; 36(2):285-295.
- Magenis ML, Damiani AP, Franca IB, et al. Behavioral, genetic and biochemical changes in the brain of the offspring of female mice treated with caffeine during pregnancy and lactation. *Reprod Toxicol*. 2022; 112:119-135.
- Martin T, Bracken M. The association between low birth weight and caffeine consumption during pregnancy. *Am J Epidemiol*, 1987.
- Martín I, López-Vilchez MA, Mur A, et al. Neonatal withdrawal syndrome after chronic maternal drinking of mate. *Ther Drug Monit*. 2007.

- Matsubara S, Sato I. Plasma adenosine levels and p-selectin expression on platelets in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2001.
- Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth, and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of reproduction and development,* 2012; 58(1): 44-50.
- McNamara PJ, Abbassi M. Neonatal exposure to drugs in breast milk. *Pharm Res.* 2004;4:555-6.
- McCreedy A, Bird S, Brown LJ, et al. Effects of maternal caffeine consumption on the breastfed child: A systematic review. *Swiss Med Wkly.* 2018; 148:w14665.
- Melo RCN. *Células e Microscopia: princípios e práticas.* 2ª ed. Barueri, SP: Minha Editora, 2018.
- Mi T, Abbasi S, Zhang H, et al. Excess adenosine in murine penile erectile tissues contributes to priapism via a2b adenosine receptor signaling. *J Clin Invest.* 2008; 118:1491–1501.
- Momoi N, Tinney JP, Liu LJ, et al. Modest maternal caffeine exposure affects developing embryonic cardiovascular function and growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294: 2248–56.
- Moore, K. *Embriologia Básica.* 8ª Edição. Elsevier, 2013. 376p.
- Mose T, Kjaerstad MB, Mathiesen L, et al. Placental passage of benzoic acid, caffeine, and glyphosate in an ex vivo human perfusion system. *J Toxicol Environ Health.* 2008; 71: 984–991.
- Muñoz LM, Lönnerdal B, Keen CL, et al. Coffee consumption as a factor in iron deficiency anemia among pregnant women and their infants in Costa Rica. *Am J Clin Nutr.* 1988; 48:645–51.
- Musatadi M, Gonzalez-Gaya B, Irazola M, et al. Multi-target analysis and suspect screening of xenobiotics in milk by UHPLC-HRMS/MS. *Separations.* 2021.
- Nehlig, A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 1999;23: 563–576.

NHS Choices. Breastfeeding and diet. 2016; Available from: [https://www.nhs.uk/conditions/pregnancy- and-baby/breastfeeding-diet/](https://www.nhs.uk/conditions/pregnancy-and-baby/breastfeeding-diet/).

Nishimura H, Nakai K. Congenital malformations in the offspring of mice treated with caffeine. *Proc Soc Exp. Biol Med.* 1960; 104:140-2.

Nomura K, Saito S, Ide K, Kamino Y, Sasahara H, Nakamoto T, Abiko Y. Caffeine suppresses the expression of the Bcl-2 mRNA in BeWo cell culture and rat placenta. *J Nutr Biochem.* 2004;15(6):342-9.

Olchowik G, Chadaj-Polberg E, Tomaszewski M, et al. The influence of caffeine on the biomechanical properties of bone tissue during pregnancy in a population of rats. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011; 49:504–511.

Olsen J. Cigarette smoking, tea and coffee drinking and subfecundity. *Am J Epidemiol.* 1991; 133:734-9.

Pang SC, Pang JJ, Tse MY, Croy A. The Cycling and Pregnant Mouse: Gross Anatomy. In: Croy A, Yamada AT, DeMayo FJ, Adamson SL. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy.* London: Elsevier; 2014.3-19.

Parsons W, Neims A. Effect of smoking on caffeine clearance. *Clin Pharmacol Ther.* 1978; 24:734–739.

Partosch F, Mielkeb H, Stahlmanna R, Gundert-Remy U. Caffeine intake in pregnancy: Relationship between internal intake and effect on birth weight. *Food Chem Toxicology.* 2015; 86: 291–7.

Paula TMD, et al. Caffeine Intake during Pregnancy: What Are the Real Evidences? *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2017; 5:249-260.

Paula TMD, et al. Caffeine consumption during gestation alters placental vascularization and fetal development in mice. *Placenta* 83 (2019) e1- e118.

- Paula TMD. Alterações estruturais placentárias e do desenvolvimento fetal decorrentes do consumo crônico de cafeína durante a gestação em camundongos [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; 2017. 64p.
- Peacock J, Bland J, Anderson H. Effects on birthweight of alcohol and caffeine consumption in smoking women. *J Epidemiol Community Health*. 1991; 45:159–163.
- Prather AL & Racowsky C. Caffeine effects on meiotic maturation in hamster oocytes in vitro. *Reprod. Toxicol.* 1992; 6, 309–18.
- Poole R, et al. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *Bmj*. 2017; 359:j5024.
- Poulsen MS, Rytting E, Mose T, Knudsen LE. Modeling placental transport: Correlation of in vitro BeWo cell permeability and ex vivo human placental perfusion. *Toxicology in Vitro*. 2009;1380–86.
- Priante E, et al. Intrauterine Growth Restriction: New Insight from the Metabolomic Approach. *Metabolites*. 2019; 11:267-80.
- Purkiewicz A, Pietrzak-Fiećko R, Sörgel F, et al. Caffeine, paraxanthine, theophylline, and theobromine content in human milk. *Nutrients*. 2022; 14:2196-211.
- Reagan-Shaw S, Nihao M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal – Life Sciences Forum*. Vol 22. 2007.
- Reynolds LP, Borowicz PP, Cation JS, et al. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int J Dev Biol*. 2010; 54:355-65.
- Rhee J, Kim R, Kim Y, Tam M, Lai Y, Keum N, Oldenburg CE. Maternal Caffeine Consumption during Pregnancy and Risk of Low Birth Weight: A Dose-Response Meta-Analysis of Observational Studies. *Plos One*. 2015; 10(7):1-18.

- Reis, AM, Ribeiro LG, Ocarino M, Boeloni JN, et al. Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy. *BMC Musculoskeletal Disord.* 2015; 16:10-21.
- Reynolds LP, Borowicz PP, Cation JS et al. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int J Dev Biol.* 2010; 54:355-65.
- Rivera-Calimlim L. Drugs in breast milk. *Drug Ther (NY).* 1977; 7:59–63.
- Ross MH, Pawlina W, Barnash TA. Atlas de histologia descritiva. Artmed Editora, 2016.1452p.
- Rossant J, Cross, JC. Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nature Reviews.* 2001; 2:538-48.
- Rustin J. Caffeine and babies. *Br Med J* 1989; 299:121.
- Ryu JE. Effect of maternal caffeine consumption on heart rate and sleep time of breast-fed infants. *Dev Pharmacol Ther.* 1985; 8:355–63.
- Sánchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(12):1896-1912.
- Salsoso R, et al. Adenosine and preeclampsia. *Molecular aspects of medicine.* 2017; 55:126-139.
- Santos IS, Matijasevich A, Domingues MR. Maternal caffeine consumption and infant nighttime waking: prospective cohort study. *Pediatrics.* 2012; 129:860–8.
- Santos AGA, Pereira, LAAC, Viana JHM, Russo RC, Campos-Junior PHA. The CC-chemokine receptor 2 is involved in the control of ovarian folliculogenesis and fertility lifespan in mice. *Journal of Reproductive Immunology.* 2020;141.

- Schumacher BML, Mersereau JE, Steiner AZ. Cycle day, estrogen level, and lead follicle size: analysis of 27,790 in vitro fertilization cycles to determine optimal start criteria for gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Fertil Steril* 2018; 109:633–637.
- Scholzen & Gerdes. The Ki-67 protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology*.2000;182:311-322.
- Serapiao-Moraes DF, Souza-Melo, VS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Faria TS. Maternal caffeine administration leads to adverse effects on adult mice offspring. *Eur J Nutr*. 2013; 52:1891-1900.
- Sesardic D, Pasanen M, Pelkonen O, Boobis AR. Differential expression and regulation of members of the cytochrome P4501A gene subfamily in human tissues. *Carcinogenesis*. 1990; 11:1183–88.
- Shai L, Stephen CS, Richard RM, Bernard R, Phillip GS, Kenneth J. No association between coffee consumption and adverse outcomes of pregnancy. *N Engl J Med*. 1982; 306:141–5.
- Shrestha B, Jawa G. Caffeine citrate - Is it a silver bullet in neonatology? *Pediatr Neonatol*. 2017;58(5):391–7.
- Sharmin S, Guan H, Williams AS, Yang K. Caffeine Reduces 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression in Human Trophoblast Cells through the Adenosine A2B Receptor. *PLOS ONE* 2012;7(6): e38082.
- Shaw S, Kumar U, Bhaumik G, Reddy MPK, Kumar B, Ghosh D. Alterations of estrous cycle, 3 β hydroxysteroid dehydrogenase activity and progesterone synthesis in female rats after exposure to hypobaric hypoxia. *Sci Rep*. 2020;10(1):3458.
- Silva JF. Efeitos dos hormônios tireoidianos na cinética de migração das células trofoblásticas e no

perfil endócrino, angiogênico e imune da placenta de ratas e na expressão gênica das células trofoblásticas de camundongos. 162f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), UFMG, Belo Horizonte, 2014.

Silva JF, Serakides R. Intrauterine trophoblast migration: a comparative view of humans and rodents. *Cell Adhesion & Migration*. 2016.

Silva CG, Métin C, Fazeli W, et al. Adenosine receptor antagonists including caffeine alter fetal brain development in mice, *Sci. Transl. Med.* 5, 2013.

Silva CG, Metín, C Fazeli W, Machado N, Darmopil S, et al. Adenosine receptor antagonists including caffeine alters fetal brain development in mice. *Science Translational Medicine*.2013;5:197.

Sinton, CM, Valatx, JL, Jouvét, M. Gestational Caffeine Modifies Offspring Behaviour in Mice. *Psychopharmacology*. 1981; 75: 69- 74.

Freeman ME, Smith MS, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*.1975;96:219-226.

Souza RAG, Sichieri R. Consumo de cafeína e prematuridade. *Rev. Nutr.*2005;18 (5): 643- 650.

Stein Z, Susser M. Miscarriage, caffeine, and the epiphenomena of pregnancy: The causal model. *Epidemiology*. 1991; 2:163–167.

Stenhouse C., et al. Associations between fetal size, sex and both proliferation and apoptosis at the porcine feto-maternal interface. *Placenta*. 2018;70, 15-24.

Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Developmental biology*, 2005; 279(1): 20-30.

- Sweeney P, Levack R, Watters J, et al. Caffeine increases food intake while reducing anxiety-related behaviors. *Appetite*.2016;101:171-177.
- Tanuma A, Saito S, Ide I, Sasahara H, Yazdani M, Gottschalk S, Nakamoto T, Abiko Y. Caffeine enhances the expression of the angiotensin II Type 2 receptor mRNA in BeWo cell culture and in the rat placenta. *Placenta*. 2003;24(6):638-47.
- Terada M, Nishimura H. Mitigation of caffeine-induced teratogenicity in mice by prior chronic caffeine ingestion. *Teratology*. 1975; 12:79-82.
- Tomaszewski M, Olchowik G, Tomaszewska M, Burdan F. Use of X-ray microprobe to diagnose bone tissue demineralization after caffeine administration. *Folia Histochem Cytobiol*. 2012;436-43.
- Tsutsumi K, Kotegawa T, Matsuki S, Tanaka Y, Ishii Y, Kodama Y, et al. The effect of pregnancy on cytochrome p4501a2, xanthine oxidase, and n-acetyltransferase activities in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2001; 70:121–125.
- Uddin MS, et al. Neuropsychological effects of caffeine: Is caffeine addictive. *J Psychol Psychother*. 2017;7(295), 2161-0487.
- Van't HW. Caffeine in pregnancy. *Lancet*. 1982; 1:10-20.
- Vik T, Bakketeig LS, Trygg KU, Lund-Larsen KL, Jacobsen G. High caffeine consumption in the third trimester of pregnancy: gender-specific effects on fetal growth. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2003; 17:324-31.
- Vohra V, Marraffa JM. Maternal use of acetaminophen-butalbital-caffeine product resulting in neonate butalbital exposure through breast milk. *Clin Toxicol* 2019; 57:549.
- Wang Y. Basic knowledge of functional experiment. In: Hu HZ. *Medical Functional Experimental Tutoria*. Science Press, Beijing. 2005.

- Wendler CC, Busovsky-McNeal M, Ghatpande S, Kalinowski A, Russell KS, Rivkees SA. Embryonic caffeine exposure induces adverse effects in adulthood. *FASEB J.* 2009; 23:1272-8.
- Weng X, Odouli R, Li DK. Maternal caffeine consumption during pregnancy and the risk of miscarriage: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198:279.
- Wikoff D, et al. Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children. *Food and Chemical Toxicology.* 2017;109: 585-648.
- Wilson ME, Wilson ME, Biensen NJ, Youngs CR, Ford SP. Development of meishan and Yorkshire littermate conceptuses in either a meishan or Yorkshire uterine environment to day 90 of gestation and to term. *Biology of Reproduction.* 1998;58(4):905-910.
- Wu G, Bazer F, Cudd TA, et al. Maternal nutrition and fetal development. *J Nut.* 2004; 134:2169-72.
- Yadegari M, Khazaei M, Anvari M, Eskandari M. Prenatal Caffeine exposure impairs pregnancy in rats. *Int J Fertil Steril.* 2016; 9(4):558-62.
- Yadegari Dehnavi, Maryam et al. The effects of caffeine on ovarian tissue in rats. *Naunyn Schmiedeberg's archives of pharmacology.* 2021; 394:307-315
- Zhang Y, Dai Y, Wen J, et al. Detrimental effects of adenosine signaling in sickle cell disease. *Nat Med.* 2011; 17:79–86.
- Zhou Y, Schneider DJ, Blackburn MR. Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease. *Pharmacol Ther.* 2009; 123:105–116.