



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GUILHERME BRACARENSE FILGUEIRAS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SEXO, DA IDADE E DA
EXPOSIÇÃO PERINATAL Á FLUOXETINA EM MODELOS
COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE MODIFICADOS**

Londrina
2016



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

GUILHERME BRACARENSE FILGUEIRAS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA IDADE, DO SEXO E DA
EXPOSIÇÃO PERINATAL À FLUOXETINA EM MODELOS
COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE MODIFICADOS**

GUILHERME BRACARENSE FILGUEIRAS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA IDADE, DO SEXO E DA
EXPOSIÇÃO PERINATAL À FLUOXETINA EM MODELOS
COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE MODIFICADOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada: Universidade Estadual de Londrina), como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Estefânia Gastaldello Moreira

Londrina
2016

GUILHERME BRACARENSE FILGUEIRAS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA IDADE, DO SEXO E DA
EXPOSIÇÃO PERINATAL À FLUOXETINA EM MODELOS
COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE MODIFICADOS**

BANCA EXAMINADORA

Titulares

Prof^ª Dr^ª Estefânia Gastaldello Moreira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª Dr^ª Daniela Cristina Ceccatto Gerardin
Cantamessa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª Dr^ª Elisabeth Audi
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof^ª Dr^ª Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof Dr Célio Estanislau
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Suplentes

Prof Dr Ernane Uchoa
Universidade de São Paulo - USP

Prof Dr Marcus Vinicius Gomes
Universidade do Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 29 de julho de 2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Filgueiras, Guilherme Bracarense.

Avaliação da influência da idade, do sexo e da exposição perinatal à fluoxetina em modelos comportamentais de ansiedade modificados / Guilherme Bracarense Filgueiras. - Londrina, 2016.
61 f. : il.

Orientador: Estefânia Gastaldello Moreira.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Fluoxetina - Tese. 2. Neurotoxicidade do desenvolvimento - Tese. 3. Modelos animais de ansiedade - Tese. 4. Grooming - Tese. I. Moreira, Estefânia Gastaldello. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

aos meus pais por terem me provido, mesmo que não soubessem, importantes características para um cientista: senso crítico e possibilidade de questionamentos. Mãe e pai, não há distância e tempo que tire de mim tudo aquilo que aprendi com vocês.

aos meus colegas de laboratório da fisiologia e da psicologia pela ajuda na execução deste trabalho e também pelas ricas discussões acadêmicas (ou não) nos momentos de lazer.

ao Célio, por sempre contribuir com o meu crescimento acadêmico e pessoal. Nesses momentos de reflexões a frase “não existe *ex-orientador*” é melhor compreendida.

à Estefânia, por quem tenho imensa admiração. Estefânia, com você aprendi o verdadeiro significado da palavra “orientar”. Tive o gigantesco prazer de tê-la conhecido. Sem dúvidas, além de uma excelente profissional, é uma pessoa por quem tenho muito orgulho de ter compartilhado alguns momentos e pensamentos.

especialmente à minha namorada, amor e eterna amiga, Glisiane. Meu amor, você, sem dúvidas, é a pessoa mais importante a quem devo agradecer. Você é a melhor companheira que alguém poderia ter. Sinto o calor do seu afeto em todos os segundos da minha vida. Muito obrigado por estar sendo meu amor, amiga e conselheira nesses últimos 5 anos.

FILGUEIRAS, Guilherme Bracarense. **Avaliação da influência da idade, do sexo e da exposição perinatal à fluoxetina em modelos comportamentais de ansiedade modificados**. 2016. 61 f. Tese (Doutorado do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR – Brasil

RESUMO

A fluoxetina (FLX) é um dos fármacos mais utilizados no mundo para o tratamento de distúrbios afetivos durante a gestação e/ou lactação. Estudos experimentais com roedores têm sugerido que a exposição à FLX durante o desenvolvimento está associada a algumas alterações neurofuncionais e comportamentais na prole. As alterações comportamentais nos animais são avaliadas principalmente com a utilização de modelos animais de ansiedade e os resultados obtidos nos estudos se mostram divergentes em diferentes testes. A modificação desses modelos quanto à duração da sessão e aos parâmetros avaliados tem se mostrado útil para detectar diferenças muitas vezes não detectáveis em uma sessão tradicional. Nesse sentido, o comportamento de *grooming* tem sido sugerido como um possível indicador comportamental de emocionalidade. Visando ampliar os estudos sobre os efeitos da exposição à FLX durante a gestação e amamentação, este estudo foi elaborado com base em dois diferentes experimentos. O experimento 1 avaliou a influência do sexo e idade (animais com 35 e 75-90 dias) em 3 modelos de ansiedade: campo aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE) e medo condicionado ao contexto (MCC) e a influência da duração da sessão (5 ou 20 minutos) nos parâmetros comportamentais avaliados. Por fim, um último objetivo desse experimento foi avaliar se o comportamento de *grooming*, dividido em seus componentes rostral e corporal, é capaz de detectar diferenças nos estados emocionais dos animais. As fêmeas se mostraram mais ativas e menos ansiosas que os machos, e os animais púberes apresentaram maiores níveis de ansiedade. Nos 3 testes, o comportamento de *grooming* apresentou concordância com as medidas convencionalmente utilizadas para a avaliação da emocionalidade. No CA a duração de 20 minutos se mostrou útil, porém, no LCE e MCC os primeiros 5 minutos de sessão foram suficientes para detectar diferenças entre os grupos. A partir dos resultados obtidos no primeiro experimento, foram estabelecidos os procedimentos do experimento 2: avaliar se o comportamento de *grooming* pode ser um indicador capaz de detectar possíveis efeitos da exposição à FLX durante o desenvolvimento. Fêmeas prenhes receberam FLX (5 mg/Kg) ou água durante toda a gestação e lactação e os seus filhotes, machos e fêmeas, foram testados com 35 dias de idade nos 3 modelos animais utilizados no experimento 1. Os resultados mostraram que a exposição à FLX reduziu o *grooming* somente no teste MCC. O comportamento de *grooming*, que é modulado por estruturas encefálicas relacionadas às emoções corticomesolímbicas, possibilitou detectar, junto com outros estudos produzidos no laboratório, possíveis alterações funcionais no eixo hipocampo-amígdala-núcleo leito da estria terminal. O comportamento de *grooming* se mostrou sensível para o estudo das emoções e um indicador útil para inferir sobre alterações funcionais de estruturas encefálicas. Dessa forma, este trabalho possibilitou avançar o conhecimento sobre a neurotoxicidade do desenvolvimento da FLX.

Palavras-chave: Fluoxetina. Neurotoxicidade do desenvolvimento. Modelos animais de ansiedade. *Grooming*. Hipocampo. Amígdala. Núcleo leito da estria terminal.

FILGUEIRAS, Guilherme Bracarense. **Evaluation of the influence of age, sex and perinatal exposure to fluoxetine in modified behavioral models of anxiety**. 2016. 61 p. Thesis (Doctorate degree at the Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR – Brazil

ABSTRACT

Fluoxetine (FLX) is one of the most commonly used drugs in the world to treat mood disorders during gestation and/or lactation. Experimental studies with rodents have suggested that exposure to FLX during development is associated with neurofunctional and behavioral alterations in the offspring. Behavioral alterations in these animals are generally evaluated using animal models of anxiety; however the results of these tests have presented discrepancies depending on the test used. Modifications related to the session duration and parameters assessed in each model are useful for detecting changes which are undetectable in traditional sessions. In this sense, grooming behavior has been suggested as a possible behavioral marker of emotionality. In order to expand the studies on the effects of FLX exposure during gestation and lactation, this study was elaborated based on two different experiments. Experiment 1 aimed to evaluate the sex and age (animals of 35 and 75-90 days-old) influences in three different animal models of anxiety: open field (OF), elevated plus-maze (EPM) and contextual fear conditioning (CFC). The second objective of experiment 1 was to investigate the effects of the session duration (5 or 20 minutes) on behavioral parameters. Lastly, it was evaluated whether grooming behavior divided into rostral and body components is able to detect the emotional state of the animals. Results showed that female rats were more active and less anxious than males, and younger rats presented higher levels of anxiety. In all 3 tests the grooming behavior agreed with the conventional measures of emotionality. In the OF, the 20 min duration was shown to be useful, while in the EPM and CFC, 5 min was sufficient to detect differences between groups. From the results obtained in the first experiment, the objective and procedures of experiment 2 were established: to evaluate if grooming behavior is an index capable of detecting the effects of FLX exposure during development. Pregnant rats received FLX (5mg/Kg) or tap water during the entire gestation and lactation period, and their offspring, male and female, were tested at 35 days-old in the 3 animal models used in experiment 1. Results showed that FLX exposure produced a grooming decrease only in the CFC test. The grooming behavior, insofar as its control is mediated by corticomesolimbic brain structures related to emotions, was able to detect, together with other studies produced in the laboratory, possible functional changes in the hippocampus-amygdala-bed nucleus of the stria terminalis axis. Grooming behavior was shown to be sensitive to the study of emotions and a useful indicator to infer functional alterations in brain structures. Thus, this work advanced the knowledge on the developmental neurotoxicity of FLX.

Key-words: Fluoxetine, Developmental neurotoxicity. Animal models of anxiety. Grooming. Hippocampus. Amygdala. Bed nucleus of the stria terminalis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Padrão de cadeia de <i>grooming</i> exibida por camundongo	14
Figura 2 –	A constatação do dia gestacional zero ocorreu na presença de células anucleadas disformes e espermatozoides	17
Figura 3 –	Delineamento dos experimentos 1 e 2 utilizados neste estudo	9
Figura 4 –	Vista superior do campo aberto utilizado neste estudo.....	21
Figura 5 –	Vista superior do labirinto em cruz elevado utilizado neste estudo.....	22
Figura 6 –	Vista frontal do aparato utilizado para o estudo do medo condicionado.....	23
Figura 7 –	Layout do programa X-plo-Rat representando um labirinto em cruz elevado e um campo aberto	24
Figura 8 –	Box plot ilustrando a duração do <i>grooming</i> total em 20 minutos de sessão no campo aberto, em 5 minutos do labirinto em cruz elevado e em 5 minutos do medo condicionado ao contexto.....	35
Figura 9 –	Comparação de parâmetros da atividade locomotora nos primeiros 5 minutos e durante os 20 minutos dos 3 testes utilizados	37
Figura 10 –	Comparação de alguns parâmetros de emocionalidade nos primeiros 5 minutos e durante os 20 minutos dos 3 testes utilizados	38
Figura 11 –	Efeitos observados em cada um dos componentes de <i>grooming</i> e no <i>grooming</i> total nos primeiros 5 minutos e durante os 20 minutos dos 3 testes utilizados	40
Figura 12 –	Comparação de alguns parâmetros de emocionalidade com os de <i>grooming</i> rostral nos primeiros 5 minutos e durante os 20 minutos dos 3 testes utilizados	42
Figura 13 –	Representação esquemática simplificada da circuitaria envolvida no condicionamento de medo ao contexto.....	45
Figura 14 –	Modelo esquemático das principais vias e estruturas envolvidas nas emoções e na sequência e execução do comportamento de <i>grooming</i>	47
Figura 15 –	Número de neurônios c-Fos positivos/mm ² nos grupos de ratos DPN35 estressados e não-estressados na região do núcleo leito da estria terminal	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Análise de machos e fêmeas, púberes e adultos, em 5 minutos de sessão no campo aberto.....	26
Tabela 2	– Análise de machos e fêmeas, púberes e adultos, em 20 minutos de sessão no campo aberto.....	27
Tabela 3	– Resultados de machos e fêmeas, púberes e adultos, em 5 minutos de sessão no labirinto em cruz elevado	28
Tabela 4	– Resultados de machos e fêmeas, púberes e adultos, em 20 minutos de sessão no labirinto em cruz elevado	29
Tabela 5	– Resultados de machos e fêmeas, púberes e adultos, em 5 minutos de sessão no medo condicionado ao contexto	30
Tabela 6	– Resultados de machos e fêmeas, púberes e adultos, em 20 minutos de sessão no medo condicionado ao contexto	31
Tabela 7	– Resultados de machos e fêmeas tratadas e controle em 20 minutos de sessão no campo aberto	32
Tabela 8	– Resultados de machos e fêmeas tratadas e controle em 5 minutos de sessão no Labirinto em Cruz Elevado	33
Tabela 9	– Resultados de machos e fêmeas tratadas e controles em 5 minutos de sessão no medo condicionado ao contexto	34
Tabela 10	– Fotomicrografia representando neurônios fos-positivos na região do núcleo leito da estria terminal	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLa	Amígdala Basolateral
CA	Campo Aberto
CON	Controle
DG	Dia Gestacional
DPN	Dia Pós-Natal
EPM	Erro Padrão da Média
FLX	Fluoxetina
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptura de Serotonina
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LTP	Potenciação de Longa Duração
MCC	Medo Condicionado ao Contexto
NLET	Núcleo Leito da Estria Terminal
SAP	<i>Stretched Attend Posture</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. ANIMAIS E TRATAMENTO	17
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	18
3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	19
3.3.1. Procedimentos comuns	19
3.3.2. Experimento 1: avaliação da influência do sexo, idade e tempo da sessão no comportamento de ratos em 3 modelos de ansiedade	20
3.3.2.1. <i>Campo aberto</i>	20
3.3.2.2. <i>Labirinto em cruz elevado</i>	21
3.3.2.3. <i>Medo condicionado ao contexto</i>	22
3.3.2.4. <i>Avaliação do comportamento de grooming</i>	23
3.3.2.5 <i>Registro do comportamento</i>	23
3.3.3. Experimento 2: Avaliação do efeito da exposição à FLX durante a gestação e amamentação no comportamento de ratos machos e fêmeas em três modelos animais de ansiedade	24
3.3.4. Análises estatísticas	25
4. RESULTADOS	26
4.1. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SEXO, IDADE E TEMPO DA SESSÃO NO COMPORTAMENTO DE RATOS EM 3 MODELOS DE ANSIEDADE	26
4.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLX DURANTE A GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO NO COMPORTAMENTO DE RATOS MACHOS E FÊMEAS EM 3 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE	31
5. DISCUSSÃO	36
5.1. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SEXO, IDADE E DURACÃO DA SESSÃO (5 E 20 MINUTOS) EM 3 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE	36
5.2. AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA NO PERÍODO PERINATAL	43
6. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO A	60

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 450 milhões de pessoas sofrem atualmente de algum transtorno mental (WHO, 2016). Os transtornos mais comuns são dependentes do sexo, sendo os de ansiedade e humor mais prevalentes em mulheres e os relacionados à dependência química, em homens (DONNER; LOWRY, 2013; STEEL et al., 2014). Em se tratando dos transtornos de humor, as mulheres apresentam 50 a 70% maior probabilidade de apresentarem algum episódio ou transtorno depressivo ao longo da vida (DAYAN et al., 2002; KESSLER et al., 2005, 2010). Devido à sua alta prevalência em mulheres, o desenvolvimento e a evolução de transtornos depressivos podem acontecer concomitantemente à gestação ou no período pós-parto (lactação). Apesar da depressão pós-parto ser geralmente o foco da atenção e preocupação de profissionais da saúde, a incidência desse transtorno é semelhante à de depressão durante a gravidez – estimada em 10-16% (BENNETT et al., 2004; EVANS et al., 2001; O'HARA; SWAIN, 1996).

A FLX é um antidepressivo da classe dos inibidores seletivos da recaptura de serotonina (ISRS). Devido à sua relativa seletividade de ação, eficácia e reduzidos efeitos indesejáveis, os ISRSs são os fármacos mais prescritos no mundo todo para o tratamento de distúrbios afetivos, inclusive durante a gestação (FORSBERG et al., 2014; ZOEGA et al., 2015). Apesar de o ISRS específico usado durante a gestação variar de acordo com o país e o período da coleta de dados, a FLX está entre uma das mais prescritas nessas condições (FORSBERG et al., 2014; NONACS; COHEN, 2003; ZOEGA et al., 2015). Embora se saiba que a FLX e seu metabólito ativo, norfluoxetina, atravessem a barreira hematoplacentária (HEIKKINEN et al., 2003; HENDRICK et al., 2003; POHLAND et al., 1989) e sejam excretados no leite (HENDRICK et al., 2001), a maioria das mulheres não pode deixar de receber o tratamento durante a gestação e amamentação. Assim, fetos e neonatos acabam sendo expostos a esse fármaco durante um período crítico do neurodesenvolvimento (RICE; BARONE, 2000). Sabe-se que nesse período, a serotonina exerce influência trófica para a migração e sinaptogênese dos neurônios monoaminérgicos (LAUDER, 1990; WHITAKER-AZMITIA et al., 1996).

Alguns estudos já sugeriram que a exposição intrauterina à FLX está associada a aumento do risco do desenvolvimento de algumas alterações cognitivo-comportamentais em humanos, como por exemplo, o aumento da probabilidade de desenvolvimento de depressão e ansiedade e anormalidades no comportamento social (KLINGER et al., 2011; MALM et al., 2016; OBERLANDER et al., 2010). Entretanto, os efeitos da exposição à FLX e a outros ISRS

na função encefálica de fetos e neonatos que podem estar associados a essas alterações cognitivo-comportamentais ainda são pouco conhecidos.

A maior parte dos estudos que buscam elucidar os efeitos da exposição à FLX durante o neurodesenvolvimento são realizados com animais experimentais. Alguns trabalhos conduzidos no nosso laboratório mostraram que a exposição à FLX durante a gestação e amamentação pode levar a alterações comportamentais, como por exemplo diminuição da motivação sexual de camundongos machos (GOUVÊA et al., 2008), comportamentos similares aos de depressão em camundongos fêmeas (LISBOA et al., 2007), aumento (MATSUMOTO et al., 2016) ou diminuição (FRANCIS-OLIVEIRA et al., 2013) de comportamentos ansiedade-símiles em ratos. Especificamente em relação aos resultados controversos da ansiedade, outros estudos também apresentam esses resultados, sendo relatados, por exemplo, aumento (NOORLANDER et al., 2008), diminuição (MCALLISTER; KIRYANOVA; DYCK, 2012), ou mesmo ausência de efeito (FORCELLI; HEINRICHS, 2008; HANSEN; SÁNCHEZ; MEIER, 1997; LEE; LEE, 2012; LISBOA et al., 2007; OLIVIER et al., 2011; POPA et al., 2008; RIBAS et al., 2008) da exposição à FLX no período perinatal. Essas discrepâncias podem ser explicadas por diferenças no desenho experimental, como por exemplo, o período de exposição à droga (perinatal, gestacional ou gestacional e lactacional), idade de avaliação dos comportamentos (púberes ou adultos), espécie (ratos ou camundongos), sexo e a dose de FLX administrada às mães (para uma revisão ver GLOVER; CLINTON, 2016).

Ainda sobre os diferentes arranjos experimentais, outro fator que pode contribuir para os resultados controversos são os tipos de testes utilizados. Existe uma série de modelos animais que podem ser utilizados para o estudo da ansiedade e geralmente os incondicionados (ou etológicos) são os mais escolhidos para esse propósito (CANTERAS, 2008). O campo aberto (CA) e o labirinto em cruz elevado (LCE) são os dois principais representantes dos modelos incondicionados (RAMOS; MORMÈDE, 1997). Esses testes são baseados no conflito entre exploração e aversão à novidade (MONTGOMERY, 1955) e a principal medida utilizada para a avaliação da ansiedade é a exploração da região central no CA e dos braços abertos no LCE, uma vez que os roedores tendem a evitar espaços abertos (LAMPREA et al., 2008; TREIT; MENARD; ROYAN, 1993). Essa medida tende a ser sensível a drogas ansiolíticas e ansiogênicas, produzindo, respectivamente, aumento e diminuição na exploração dessas zonas abertas (PELLOW et al., 1985; PRUT; BELZUNG, 2003). Porém, a detecção da ansiedade nesses testes é dependente da atividade locomotora, o que pode produzir falsos positivos ou negativos – ex., uma droga conhecidamente ansiogênica pode aumentar a atividade locomotora

e conseqüentemente a exploração de espaços abertos nesses aparatos, o que poderia ser interpretado equivocadamente como efeito ansiolítico (WEISS et al., 1998).

Menos dependente da atividade locomotora, outra categoria de modelos é composta pelos testes de condicionamento de respostas emocionais (CAMPOS et al., 2013). Esses testes são pautados em procedimentos de condicionamento Pavloviano (associação de estímulos incondicionados com condicionados). Um dos testes mais utilizados para o estudo do comportamento emocional é o medo condicionado ao contexto (MCC). Esse teste foi amplamente usado para o estudo das funções da amígdala e hipocampo nas respostas emocionais (LEDOUX, 2000). Diferentemente dos testes incondicionados, o paradigma de MCC envolve principalmente a avaliação de respostas defensivas dos animais em contextos previamente pareados a estímulos naturalmente aversivos, como por exemplo, choques elétricos ou predadores (CURZON; RUSTAY; BROWMAN, 2009).

Diferentes modelos animais de medo e ansiedade são conhecidamente distintos em termos de aversividade (RAMOS, 2008; RAMOS et al., 1997). A aversividade, nesse caso, pode ser definida enquanto características dos aparatos que estão relacionadas a produções de diferentes respostas emocionais nos animais. Discute-se que essa diversidade de respostas emocionais produzidas nos diferentes modelos de ansiedade possa estar relacionada aos diferentes transtornos de ansiedade presentes em humanos (RAMOS; MORMÈDE, 1997). Outra evidência dessa multiplicidade de respostas emocionais se dá na investigação da ação de drogas. Fármacos que habitualmente produzem respostas ansiolíticas em modelos incondicionados – como o LCE – falham em produzir a atenuação de respostas emocionais em modelos de condicionamento de medo (SMITH et al., 2012). Esses efeitos – ou a falta de – nos dois tipos de testes sugerem o envolvimento de diferentes substratos biológicos.

Um único modelo dificilmente consegue abarcar toda essa multiplicidade de respostas relacionadas ao medo e ansiedade e, por esse motivo, os pesquisadores da área de experimentação animal sugerem a realização de estudos que procurem o desenvolvimento de modelos mais completos – i.e., que consigam avaliar, ao mesmo tempo, diferentes facetas das respostas emocionais (RAMOS, 2008). O desenvolvimento desses novos modelos animais pode ocorrer: (a) pelo o desenvolvimento de novos aparatos; (b) por novas formas de se analisar o comportamento dos animais nos aparatos já consagrados na literatura.

Nos últimos anos têm crescido as evidências de que uma análise detalhada do comportamento de *grooming* pode ser útil em pesquisas de estresse e ansiedade (DENMARK

et al., 2010; ESTANISLAU, 2012; ESTANISLAU et al., 2013; KALUEFF et al., 2016; VELOSO et al., 2016). Esse comportamento está presente em diversas espécies – inclusive em humanos – e parece ter uma função adaptativa prioritária de cuidados com a superfície corporal (para uma revisão ver: SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992). O *grooming* é um comportamento estereotipado e complexo que pode ser dividido em pelo menos dois grupos principais: encadeado e flexível (ALDRIDGE; BERRIDGE; ROSEN, 2004; KALUEFF et al., 2016). O *grooming* encadeado é evidenciado pela ocorrência das chamadas cadeias sintáticas estereotipadas (Figura 1). Essas cadeias são padrões fixos de ação, compostos por uma série de movimentos rígidos e ritmados, com mais de 25 microcomponentes distintos, que acontecem espontaneamente entre episódios de *grooming* na região rostral e corporal. Essas cadeias têm uma duração média de 5 segundos e tendem a seguir uma sequência rígida no sentido céfalocaudal (ALDRIDGE; BERRIDGE; ROSEN, 2004). O padrão flexível, como o próprio nome já sugere, não tem uma sequência rígida de ocorrência, tendo duração variável e uma sequência não organizada. O padrão flexível, que acontece durante mais de 90% do tempo total de *grooming*, pode ser dividido em rostral e corporal (Figura 1). Os *groomings* encadeados e flexíveis são compostos pelos mesmos movimentos, porém, são diferentes em relação à rigidez e velocidade dos movimentos (ALDRIDGE; BERRIDGE; ROSEN, 2004).

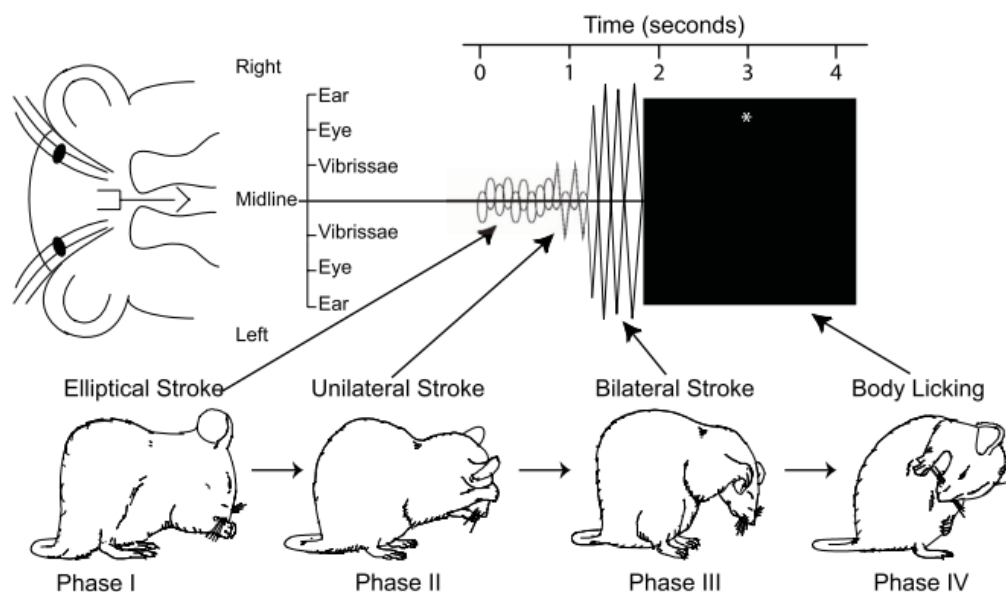


Figura 1 – Padrão de cadeia sintática exibida por um camundongo em uma sequência de movimentos no sentido cefalocaudal (sequência cronológica da esquerda para a direita). As diferentes fases mostram: (1) movimentos elípticos ao redor do focinho; (2) movimentos unilaterais na região dos olhos e vibrissas mistaciais; (3) movimentos amplos bilaterais e simultâneos na região da cabeça; (4) movimentos de fricção com a boca ou patas dianteiras ou traseiras a região ventrolateral do tronco, da área genital e/ou o rabo. O *grooming* flexível, por outro lado, é principalmente dividido em rostral (movimentos menos rígidos e estereotipados das fases 1, 2 e 3) e corporal (fase 4). (imagem retirada de BERRIDGE et al., 2005).

A execução e sequência do *grooming* envolve principalmente estruturas cerebrais relacionadas ao controle motor e à emocionalidade (CROMWELL; BERRIDGE, 1996a; KALUEFF et al., 2016; SMITH et al., 2009). Por essas estruturas serem principalmente moduladas pela dopamina (BERRIDGE; ALDRIDGE, 2000; BERRIDGE, 1989; BERRIDGE et al., 2005), esse comportamento tem sido sugerido como um importante fenótipo para a compreensão de duas das principais vias dopaminérgicas do cérebro, a nigro-estriatal e a corticomesolímbica (para uma revisão do controle neural do *grooming*, ver KALUEFF et al., 2016). Coincidentemente, algumas evidências têm sugerido que possíveis deficiências em vias dopaminérgicas podem estar associadas à exposição à FLX durante o neurodesenvolvimento (BACCHI, 2016; FAVARO; COSTA; MOREIRA, 2008). Dessa forma, o *grooming* aparenta ser um importante comportamento para o estudo dos possíveis efeitos neurotóxicos da exposição à FLX no período perinatal.

Existem diferenças conhecidas entre machos e fêmeas em modelos animais (para uma revisão ver KOKRAS; DALLA, 2014), porém, o efeito do sexo nas diferenças quantitativas e

qualitativas do comportamento de *grooming* (rostral e corporal) ainda não foi explorado. Da mesma forma, apesar de existirem estudos que avaliaram o comportamento de *grooming* em diferentes períodos da fase adulta de roedores (e.g. SCIMONELLI; MARUCCO; CELIS, 1999), a influência da idade nos componentes rostral e corporal ainda não foi estudada. Geralmente sessões curtas (de 3 ou 5 minutos) são utilizadas para a avaliação comportamental nesses testes. Porém, na medida em que os primeiros minutos das sessões podem ser marcados pela mudança ambiental (gaiola-aparato) e/ou manuseio do animal (ARCHER, 1973; KALUEFF; TUOHIMAA, 2005), tem sido sugerido que sessões mais longas podem ser melhores para detectar diferenças no *grooming* (ESTANISLAU, 2012; VAN ERP et al., 1994; VELOSO et al., 2016).

Dessa forma, um primeiro experimento deste trabalho foi delineado para avaliar a influência do sexo, idade e duração da sessão no comportamento de *grooming* dividido em seus componentes rostral e corporal, em 3 modelos animais de ansiedade: CA, LCE e MCC. A partir dos resultados obtidos nesse primeiro experimento, houve a seleção de animais púberes e a definição de diferentes durações de sessão para a avaliação dos efeitos da exposição à FLX durante o desenvolvimento nos mesmos 3 modelos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o a influência da idade, do sexo e da exposição à FLX durante a gestação e amamentação no comportamento da prole em três modelos animais de ansiedade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar, inicialmente, a influência:

- do sexo e idade nos parâmetros comportamentais de animais controle expostos a diferentes modelos de ansiedade;
- do tempo de sessão (5 ou 20 minutos) nos parâmetros comportamentais avaliados;
- da divisão do comportamento de *grooming* em seus componentes rostral e corporal, como indicadora de ansiedade.

A partir dos resultados obtidos no primeiro experimento objetivou-se investigar, em ratos expostos à FLX durante a gestação e amamentação:

- os parâmetros comportamentais convencionais no campo aberto, labirinto em cruz elevado e medo condicionado ao contexto.
- o *grooming*, dividido em seus componentes rostral e corporal, em cada um desses modelos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

Ratos *Wistar* machos e fêmeas, com aproximadamente 80 dias de idade, oriundos do biotério central da Universidade Estadual de Londrina foram utilizados como geração parental. Todos os animais foram mantidos em condições controladas de luminosidade (ciclo claro-escuro de 12:12, com luzes acesas às 6:00), temperatura em $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de $55\pm 5\%$. Água e ração foram livremente disponibilizados durante todo o período dos experimentos. Para o acasalamento, um macho foi colocado em uma gaiola com 2 ou 3 fêmeas no início do período noturno. Na manhã seguinte, os machos foram retirados das caixas das fêmeas, e essas foram submetidas a um esfregaço vaginal. Se na observação da lâmina houvesse a predominância de células anucleadas disformes (características da fase estro) e espermatozoides, o dia gestacional (DG) zero era estabelecido (Figura 2).

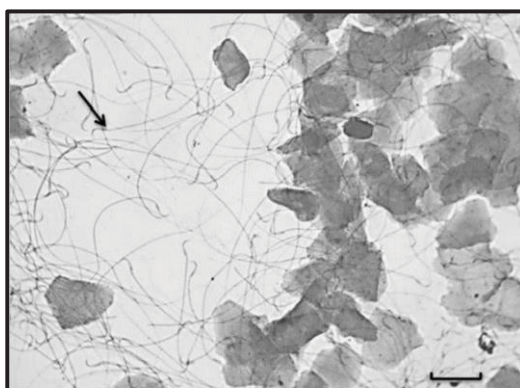


Figura 2 – O diagnóstico do dia gestacional zero (DG0) ocorreu na presença de células anucleadas disformes e espermatozoides (indicados pela seta). Imagem retirada e adaptada de BOTELHO et al., (2015).

As ratas consideradas prenhes (DG0) foram separadas e mantidas individualmente em gaiolas de polipropileno com 40 cm x 34 cm x 17 cm (comprimento x largura x altura). Logo que constatada a prenhez as fêmeas foram aleatoriamente distribuídas no grupo controle (CON, n=36) e experimental (FLX, n=36) e foi iniciado o tratamento. O tratamento foi feito diariamente por gavagem com água (CON) ou FLX a 5 mg/kg (Daforin®, EMS, Brasil), no volume de 10ml/kg, e durou até o desmame da ninhada (no dia pós-natal 21 – DPN21). Esse regime de tratamento adotado no laboratório (BACCHI, 2016; FRANCIS-OLIVEIRA et al., 2013; MATSUMOTO et al., 2016) segue as diretrizes da OECD 426 (“OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study*”, [s.d.]).

As ratas prenhes e lactantes foram pesadas a cada 3 dias para a correção do volume de administração. No DPN4, as ninhadas foram reduzidas para 10 animais (5 de cada sexo, sempre que possível), de modo a evitar que os filhotes pertencentes a ninhadas maiores recebessem menor quantidade de droga que filhotes de ninhadas menores. Como procedimento padrão, a unidade experimental foi a ninhada. Por esse motivo, apenas um filhote de cada sexo foi utilizado para cada teste.

Todos os procedimentos adotados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL, 12199.2014.14).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No experimento 1, os animais testados com 35 dias de idade eram todos experimentalmente ingênuos, separados em grupos independentes. Porém, os animais testados no CA foram mantidos no biotério até os 75 dias de idade, quando foram novamente colocados sequencialmente nos 3 modelos animais por 20 minutos (Figura 3a). Esse primeiro experimento objetivou destacar os principais fatores a serem considerados no segundo experimento (sexo e idade), e a melhor duração de sessão (5 ou 20 minutos).

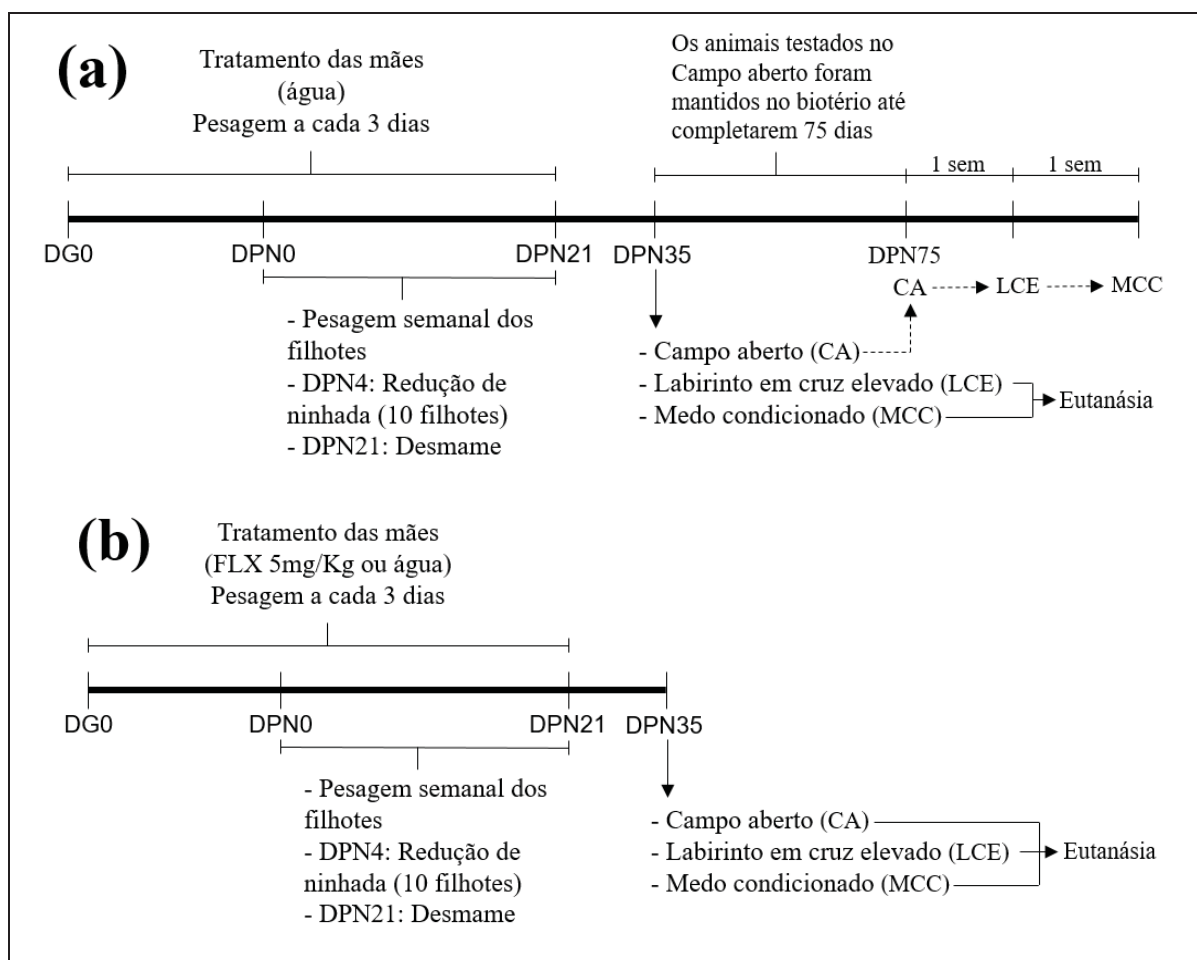


Figura 3 – Delineamento dos experimentos 1 (painel a) e 2 (painel b) utilizados neste estudo. FLX, fluoxetina; DG, dia gestacional; DPN, dia pós-natal.

No segundo experimento somente os animais com 35 dias de idade foram utilizados na comparação dos animais do grupo exposto à FLX (ver tópico 3.2) com os do grupo CON (Figura 3b). A execução do experimento 2 ocorreu concomitantemente ao experimento 1 – e por isso os animais controle do segundo experimento são os que foram testados no primeiro experimento.

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Procedimentos comuns

Os testes comportamentais ocorreram entre as 10 e 14 horas, em uma sala iluminada com uma lâmpada incandescente de 60W, fixada a aproximadamente 2,5m sobre os aparatos. Os animais eram levados ao laboratório de análise comportamental pelo menos 1 hora antes do início de cada teste para que se habituassem ao ambiente. Após cada teste, os animais eram

colocados em caixas distintas das dos ratos não-testados. Entre as sessões, os aparatos foram limpos com solução etílica a 5% e secos com toalhas de papel. As sessões foram gravadas por 20 minutos e posteriormente analisadas por um observador treinado (índice de concordância intra-observador > 80% quando comparado com um observador experiente).

3.3.2. Experimento 1: Avaliação da influência do sexo, idade e tempo da sessão no comportamento de ratos em 3 modelos de ansiedade

Os animais púberes (DPN35) e adultos (DPN75-90) foram colocados em 3 diferentes modelos animais por 20 minutos cada. Como já descrito no Tópico 3.1 (e representado na Figura 2a), todos os animais púberes eram experimentalmente ingênuos. Aqueles testados no CA foram mantidos no biotério até a idade adulta, e então foram sequencialmente colocados nos outros modelos animais com intervalo de 1 semana entre cada teste.

3.3.2.1 *Campo aberto*

Uma arena de madeira de 110 x 110 cm foi dividida em 4 arenas menores (54 x 54 cm), com paredes de 54 cm, o que permitiu a análise concomitante de 2 a 4 animais do mesmo sexo por vez (Figura 4). Cada um dos animais foi colocado individualmente no centro de cada arena menor por 20 minutos. Cada uma dessas pequenas arenas foi virtualmente dividida em 16 quadrantes de aproximadamente 13,5 x 13,5 cm (sendo 12 periféricos e 4 centrais – Figura 4, letras p e c, respectivamente). As medidas comportamentais avaliadas foram: quadrados cruzados (quando os ratos colocaram as 4 patas no interior de um desses quadrantes virtuais); entradas e tempo gasto na região central do aparato; *grooming* (ver seção 3.3.2.4).

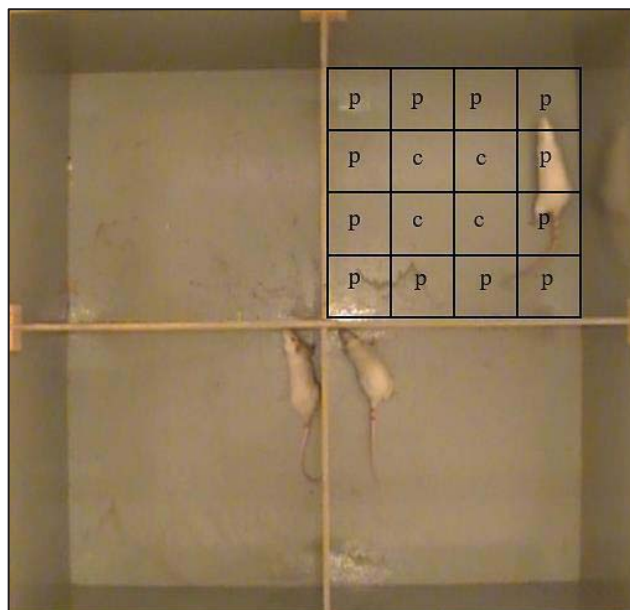


Figura 4 – Vista superior do campo aberto utilizado neste estudo. A letra “p” representa os quadrantes da região periférica e a letra “c” a região central de cada arena menor. **Fonte:** o próprio autor.

3.3.2.2 *Labirinto em cruz elevado*

Foi utilizado um aparato padrão de labirinto em cruz elevado com 2 braços abertos (50 cm x 10 cm) perpendiculares a dois braços fechados (50 cm x 10 cm x 40 cm), conectados por uma plataforma central (10 cm x 10 cm – Figura 5, letras a, f e c, respectivamente). Para prevenir quedas, os braços abertos eram cercados com uma borda acrílica de 1 cm de altura. Os ratos foram colocados individualmente no centro do aparato com o focinho voltado para um dos braços fechados e foram filmados por 20 minutos. Os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados: frequência e duração das entradas nos braços – uma entrada foi contada quando os ratos colocavam as 4 patas dentro dos braços abertos ou fechados; *stretched-attend postures* (SAP) nas áreas protegidas (braços fechados + quadrante central) - quando o animal esticou o corpo sem retirar as patas traseiras da posição inicial; mergulhos de cabeça - quando o animal explorou a região inferior do aparato; e *grooming* (ver seção 3.3.2.4).

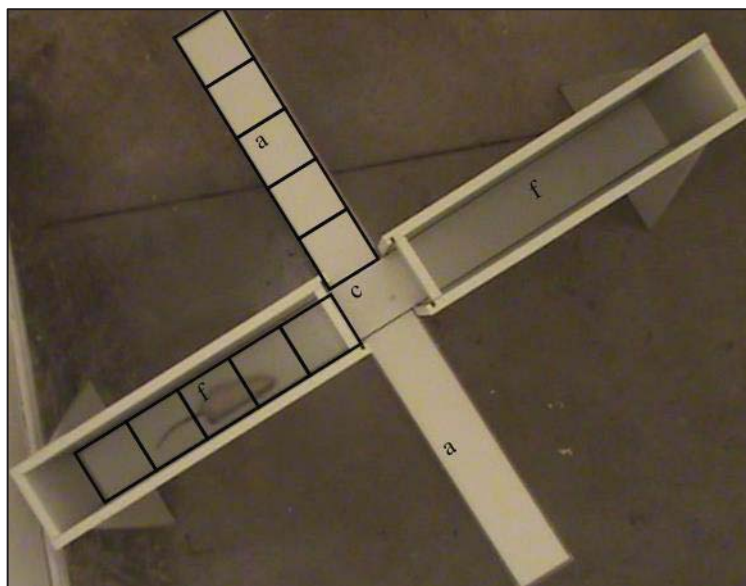


Figura 5 – Vista superior do labirinto em cruz elevado utilizado neste estudo. A letra “f” representa os braços fechados; a letra “a” os braços abertos; e a letra “c” o quadrante central. As linhas pretas demarcam os quadrantes virtuais de 10 cm x 10 cm. **Fonte:** o próprio autor.

3.3.2.3 Medo condicionado ao contexto

O aparato utilizado nesse procedimento consistiu em uma câmara de metal com área de 20 cm x 20 cm, paredes de 25 cm de altura, e uma tampa frontal de vidro transparente (Figura 6). O assoalho da câmara era composto de uma grade de metal (com barras de aproximadamente 0,2 cm espaçadas em 0,5 cm uma da outra), por onde foi dado os choques da primeira sessão. O aparato era elevado a aproximadamente 40 cm sobre um espelho inclinado (utilizado para auxiliar nas análises dos vídeos quando o animal estava virado para o fundo da caixa).

O procedimento deste modelo consistiu em duas sessões, com 24 horas de intervalo entre elas. Na primeira sessão (treino) os animais foram colocados individualmente no interior do aparato e foi permitido que o explorassem por 20 minutos. Por volta do 7º minuto, um choque elétrico de 1 segundo (e 0,6 mA) foi liberado no assoalho. O choque foi repetido por volta do 15º minuto. O medo condicionado ao contexto se caracteriza pela ausência de uma pista ambiental – como um tom ou uma luz – que anteceda a ocorrência dos choques (modelos denominados “medo condicionado sinalizado”). Na segunda sessão (teste) os ratos foram individualmente colocados no aparato e filmados por 20 minutos. Na segunda sessão não houve a liberação de choque. Os comportamentos avaliados foram: tempo de *freezing* (quando o animal permaneceu imóvel, exceto pelos movimentos relacionados à respiração); quadrados

cruzados (quando os animais se deslocaram colocando as 4 patas no interior de cada um dos 4 quadrantes de 10 cm x 10 cm) (Figura 6); e *grooming* (ver seção 3.3.2.4).

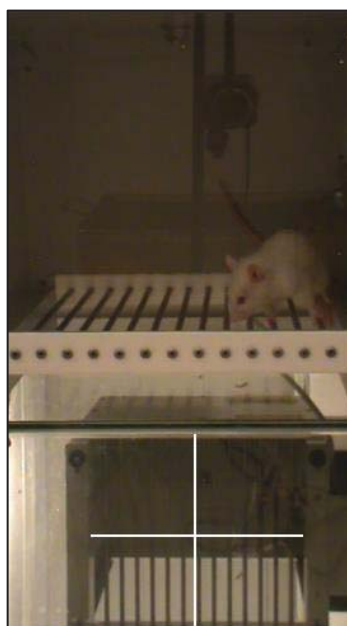


Figura 6 – Vista frontal do aparato utilizado para o estudo do medo condicionado ao contexto. O espelho inclinado abaixo do aparato auxiliou tanto na quantificação da locomoção dentro do aparato, quanto na visualização dos comportamentos que ocorriam dentro da câmara (uma vez que quando o animal se virava para o fundo da caixa, a visualização frontal dos comportamentos era comprometida). **Fonte:** o próprio autor.

3.3.2.4 Avaliação do comportamento de *grooming*

O tempo gasto no comportamento de *grooming* flexível foi dividido em duas categorias: rostral e corporal. O *grooming* rostral foi registrado quando o animal realizou movimentos de fricção com as patas dianteiras na região do focinho, cabeça e orelhas (fases 1 a 3, Figura 1). O *grooming* corporal foi registrado quando o animal friccionou com as patas traseiras ou dianteiras, a região ventrolateral do tronco, a área genital e a cauda (fase 4, Figura 1). As coçadas do corpo com as patas traseiras também foram consideradas *grooming* corporal. Em nosso laboratório, as cadeias sintáticas (Figura 1) não têm se mostrado informativas nas análises do *grooming* flexível e, por isso, não foram consideradas neste trabalho.

3.3.2.5 Registro do comportamento

Todos os comportamentos deste estudo foram registrados com a utilização do programa X-plo-rat, desenvolvido por MORATO; CHAIM (2005), obtido no endereço:

<http://scotty.ffclrp.usp.br/page.php?6>. O programa permite registrar simultaneamente os comportamentos exibidos em vídeo. Na Figura 7 pode-se ver exemplos de *layouts* do CA e do LEC no programa.

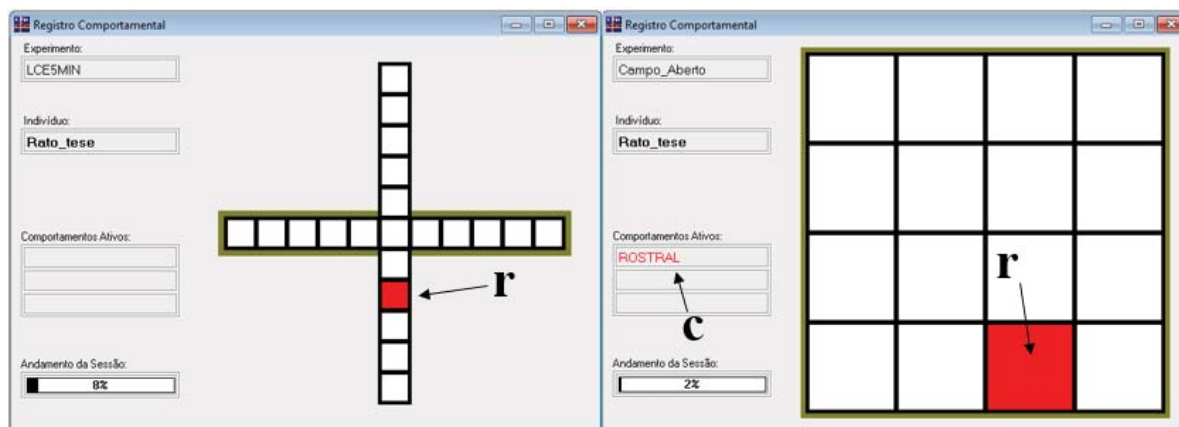


Figura 7 – Layout do programa X-plo-Rat (MORATO; CHAIM, 2005) representando um labirinto em cruz elevado (esquerda) e um campo aberto (direita). No programa é possível avaliar os quadrados cruzados pelo rato (r), e registrar os diferentes comportamentos (c) simultaneamente à sua exibição em um vídeo. **Fonte:** o próprio autor.

3.3.3. Experimento 2: Avaliação do efeito da exposição à FLX durante a gestação e amamentação no comportamento de ratos machos e fêmeas em três modelos animais de ansiedade

Após analisarmos os dados do experimento 1, selecionamos os animais púberes para serem comparados com os animais expostos à FLX durante o desenvolvimento e as durações das sessões para cada modelo: CA, 20 minutos; LCE e MCC, 5 minutos. Diferentes animais, com exatos 35 dias de idade, passaram por cada um dos testes seguindo os mesmos procedimentos de teste e análise descritos em 3.3.2.1 a 3.3.2.5.

3.3.4 Análises estatísticas

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória (testes de Levene e Shapiro-Wilk) dos dados obtidos em cada um dos testes ($p < 0,05$). Variáveis com variância homogênea e distribuição normal foram analisadas por Análise de Variância de duas vias (*two-way* ANOVA), considerando os fatores sexo e idade (experimento 1) e sexo e tratamento (experimento 2). Como cada fator continha somente 2 níveis, teste *post-hoc* (Fisher-LSD) foi feito somente quando a ANOVA apontou interação. Variáveis que não atenderam o critério de normalidade e homogeneidade foram analisadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn.

As diferenças foram consideradas somente se $p \leq 0,05$. Dados paramétricos foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e os dados não-paramétricos, como mediana (valores mínimo-máximo).

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SEXO, IDADE E TEMPO DA SESSÃO NO COMPORTAMENTO DE RATOS EM 3 MODELOS DE ANSIEDADE

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos com 5 minutos de sessão no CA. ANOVA apontou uma tendência de aumento da atividade locomotora das fêmeas, independente da idade, quando comparadas com os machos ($F_{[1,39]}=3,41$; $p=0,07$). Os grupos não diferiram ($p>0,05$) quanto ao número de entradas na região central (ANOVA), ao tempo gasto na região central e às categorias de *grooming* (Kruskal-Wallis).

Tabela 1 – Análise de machos e fêmeas, púberes e adultos, em 5 minutos de sessão no campo aberto.

Parâmetro	Machos		Fêmeas	
	Púberes (n=11)	Adultos (n=11)	Púberes (n=10)	Adultas (n=11)
Entradas região central	4,6 ± 0,9	5,3 ± 0,8	4,0 ± 0,8	5,1 ± 0,9
Tempo região central (s)	10,2 (1,1-29,6)	14,4 (1,1-33,7)	11,0 (2,1-46,2)	13,4 (1,2-53,4)
Quadrados cruzados	63,5 ± 6,8	67,3 ± 6,4	74,5 ± 5,1 ^s	80,7 ± 7,6 ^s
<i>Grooming</i> rostral (s)	14,0 (0,0-25,0)	10,0 (5,0-19,0)	13,5 (6,0-19,0)	6,0 (1,0-15,0)
<i>Grooming</i> corporal (s)	0,0 (0,0-7,0)	2,0 (0,0-5,0)	2,0 (0,0-5,0)	1,0 (0,0-5,0)
<i>Grooming</i> total (s)	34,4 (0,0-148,1)	46,7 (12,9-103,8)	36,8 (23,1-66,0)	22,4 (8,1-87,3)

Os dados analisados pela Análise de Variância (ANOVA, considerando os fatores sexo e idade) estão apresentados como média ± EPM, e os dados analisados pelo Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn estão apresentados como mediana (mínimo-máximo); ^s $p\leq 0,07$ quando comparadas com machos da mesma idade.

Na sessão de 20 minutos (Tabela 2), algumas significâncias estatísticas foram detectadas. Os animais adultos (de ambos os sexos) apresentaram aumento do número de entradas na região central ($F_{[1,39]}=4,72$; $p<0,05$) e na atividade locomotora ($F_{[1,39]}=4,87$; $p<0,05$) quando comparados com os púberes. As fêmeas púberes e adultas apresentaram maior atividade locomotora ($F_{[1,39]}=12,54$; $p<0,05$) e uma tendência de entrar mais na região central ($F_{[1,39]}=3,79$; $p=0,06$) quando foram comparadas com os machos. Em relação às medidas de *grooming*, o prolongamento da sessão foi útil para a detecção de diferenças no componente rostral: o teste de Kruskal-Wallis indicou diferenças entre os grupos ($H=9,52$; $p<0,05$). O teste *post-hoc* (Dunn) revelou que as fêmeas adultas gastaram menos tempo em *grooming* rostral

que os machos adultos. O tempo gasto na região central, o tempo gasto em *grooming* corporal e total não foram diferentes entre os grupos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

Tabela 2 – Análise de machos e fêmeas, púberes e adultos, em 20 minutos de sessão no campo aberto.

Parâmetro	Machos		Fêmeas	
	Púberes (n=11)	Adultos (n=11)	Púberes (n=10)	Adultas (n=11)
Entradas região central	6,7 ± 1,7	8,7 ± 1,5*	8,7 ± 1,6 ^s	13,8 ± 2,1* ^s
Tempo região central (s)	12,4 (1,1-90,9)	33,2 (1,1-55,1)	19,5 (2,1-65,5)	41,9 (11,1-165,6)
Quadrados cruzados	91,6 ± 14,2	118,9 ± 11,9*	137,4 ± 9,7 [#]	171,3 ± 17,7 ^{#*}
<i>Grooming</i> rostral (s)	99,4 (7,0-306,8)	137,5 (79,6-232,2)	103,8 (86,8-140,6)	80,9 [#] (65,6-117,5)
<i>Grooming</i> corporal (s)	58,8 (11,4-154,5)	140,9 (38,1-304,0)	102,5 (48,6-165,6)	76,2 (44,7-210,3)
<i>Grooming</i> total (s)	167,9 (18,3-433,2)	290,0 (123,6-576,4)	244,2 (175,0-277,7)	173,9 (129,1-338,1)

Os dados analisados pela Análise de Variância (ANOVA, considerando os fatores sexo e idade) estão apresentados como média ± EPM e os dados analisados pelo Kruskal-Wallis, complementado com o teste de Dunn estão apresentados como mediana (mínimo-máximo); * $p < 0,05$ quando comparados com púberes do mesmo sexo; [#] $p < 0,05$ quando comparadas com machos da mesma idade; ^s $p \leq 0,07$ quando comparadas com machos da mesma idade.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos nos primeiros 5 minutos de sessão no LCE. O teste de Kruskal-Wallis mostrou que, quando comparadas com fêmeas púberes, as adultas apresentaram maior número de entradas nos braços abertos ($H=12,51$, $p < 0,05$); aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos ($H=11,21$, $p < 0,05$); aumento no tempo gasto nos braços abertos ($H=11,94$, $p < 0,05$); diminuição no tempo gasto nos braços fechados ($H=14,05$, $p < 0,05$); e aumento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos ($H=12,13$, $p < 0,05$). Esses resultados sugerem que as fêmeas adultas apresentaram menos ansiedade que as púberes. Em relação à frequência de SAP, a ANOVA apontou que as fêmeas tiveram menores escores que os machos ($F_{[1,40]}=8,39$; $p < 0,05$). Esse resultado sinaliza menor comportamento do tipo ansioso em fêmeas. Quanto ao número de entradas nos braços fechados, uma medida relacionada à atividade locomotora, ANOVA indicou interação entre os fatores sexo e idade ($F_{[1,40]}=11,22$; $p < 0,05$) e o teste *post-hoc* mostrou que fêmeas adultas apresentaram maiores escores que as púberes e os machos adultos.

Para o comportamento de *grooming* o teste de Kruskal-Wallis ($H=9,52$, $p<0,05$) complementado com o teste de Dunn indicou que os machos adultos gastaram mais tempo no componente rostral quando comparados com os púberes e com as fêmeas adultas. Kruskal-Wallis ($H=10,66$, $p<0,05$) também apontou que os machos adultos gastaram mais tempo em *grooming* total quando comparados com os púberes. Nenhuma diferença estatística foi encontrada nos parâmetros de mergulho de cabeça e de *grooming* corporal ($p>0,05$).

Tabela 3 – Resultados de machos e fêmeas, púberes e adultos, em 5 minutos de sessão no labirinto em cruz elevado.

Parâmetro	Machos		Fêmeas	
	Púberes (n=10)	Adultos (n=11)	Púberes (n=11)	Adultas (n=12)
Entradas nos abertos	1,0 (0,0-6,0)	2,0 (0,0-4,0)	0,0 (0,0-2,0)	5,0 (0,0-14,0)*
Entradas nos fechados	8,5 ± 1,1	7,7 ± 1,0 [§]	5,6 ± 0,9 [§]	12,2 ± 1,3
% entradas nos abertos	11,1 (0,0-35,3)	14,3 (0,0-28,6)	0,0 (0,0-22,2)	29,8 (0,0-47,1)*
Tempo nos abertos (s)	8,6 (0,0-56,7)	15,3 (0,0-43,8)	0,0 (0,0-21,8)	38,1 (0,0-104,1)*
Tempo nos fechados (s)	236,7 (178,6-294,5)	249,0 (212,0-299,2)	281,7 (227,3-298,8)	211,1* (121,3-292,1)
% tempo nos abertos	3,5 (0,0-24,1)	5,8 (0,0-16,1)	0,0 (0,0-8,7)	14,8 (0,0-45,5)*
SAP	3,5 ± 0,7	3,6 ± 0,8	2,8 ± 0,6 [#]	0,7 ± 0,2 [#]
Mergulho de cabeça	0,5 (0,0-2,0)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-1,0)	1,0 (0,0-6,0)
<i>Grooming</i> rostral (s)	8,3 (0,7-17,1)	22,8* (10,8-128,2)	16,6 (4,0-37,2)	11,7 [#] (0,0-19,0)
<i>Grooming</i> corporal (s)	0,0 (0,0-4,2)	2,7 (0,0-41,7)	0,6 (0,0-11,4)	2,7 (0,0-19,0)
<i>Grooming</i> total (s)	8,3 (0,7-23,8)	29,5* (12,7-167,6)	21,7 (4,0-47,8)	14,8 (0,0-37,9)

Os dados analisados pela Análise de Variância (ANOVA, considerando os fatores sexo e idade) estão apresentados como média ± EPM, e os dados analisados pelo Kruskal-Wallis, complementado com o teste de Dunn estão apresentados como mediana (mínimo-máximo); * $p<0,05$ quando comparados com púberes do mesmo sexo; [#] $p<0,05$ quando comparadas com machos da mesma idade; [§] $p\leq 0,05$ quando comparados com fêmeas adultas.

A Tabela 4 apresenta os dados da sessão de 20 minutos no LCE. Com o aumento da duração da sessão, os comportamentos sofreram maior influência do fator sexo e da interação

entre sexo e idade do que somente pela idade (o fator idade pareceu surtir maior impacto nos valores na sessão de 5 minutos). Em 20 minutos as fêmeas adultas se comportaram de forma menos ansiosa que os machos adultos, e apresentaram maiores escores de exploração, como evidenciado pelo número de entradas nos abertos ($H=13,77$, $p<0,05$); e nos fechados ($F_{[1,40]}=4,61$; $p<0,05$); no aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos ($H=14,34$, $p<0,05$); diminuição no tempo gasto nos braços fechados ($F_{[1,40]}=5,43$; $p<0,05$); aumento no número de mergulhos de cabeça ($H=8,32$, $p<0,05$); e diminuição no tempo gasto no componente rostral do *grooming* ($H=12,02$, $p<0,05$).

Tabela 4 – Resultados de machos e fêmeas, púberes e adultos, em 20 minutos de sessão no labirinto em cruz elevado.

Parâmetro	Machos		Fêmeas	
	Púberes (n=10)	Adultos (n=11)	Púberes (n=11)	Adultas (n=12)
Entradas nos abertos	2,0 (0,0-17,0)	5,0 (0,0-15,0)	6,0 (1,0-13,0)	18,5 (1,0-36,0) [#]
Entradas nos fechados	17,6 ± 2,5	17,7 ± 3,1 [§]	19,7 ± 1,5 [§]	30,3 ± 2,4
% entradas nos abertos	9,6 (0,0-43,6)	20,8 (0,0-36,6)	23,3 (8,3-33,3)	36,6 (2,6-50,0) [#]
Tempo nos abertos (s)	28,4 (0,0-210,9)	51,5 (0,0-187,1)	80,1 (11,0-178,8)	165,8 (5,6-394,6)
Tempo nos fechados (s)	999,2 ± 52,4	1035,4 ± 46,5 [§]	1009,6 ± 25,5 [§]	824,9 ± 56,9
% tempo nos abertos	2,8 (0,0-22,5)	4,8 (0,0-18,2)	7,3 (1,0-16,6)	15,9 (0,5-41,2)
SAP	4,5 ± 0,8	7,8 ± 2,0	4,8 ± 0,9	4,1 ± 0,8
Mergulho de cabeça	2,0 (0,0-13,0)	1,0 (0,0-8,0)	3,0 (1,0-8,0)	7,5 (0,0-23,0) [#]
<i>Grooming</i> rostral (s)	48,2 (12,7-68,8)	80,5* (26,9-313,9)	56,9 (28,2-115,4)	46,7 [#] (15,3-93,3)
<i>Grooming</i> corporal (s)	33,9 (15,9-131,4)	78,7 (18,9-149,3)	80,4 (1,5-245,9)	37,6 (6,5-103,9)
<i>Grooming</i> total (s)	95,9 (29,2-180,4)	180,8 (72,2-464,9)	156,5 (41,3-403,5)	87,3 (21,8-177,6)

Os dados analisados pela Análise de Variância (ANOVA, considerando os fatores sexo e idade) estão apresentados como média ± EPM e os dados analisados pelo Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn estão representados por mediana (mínimo-máximo); * $p<0,05$ quando comparados com púberes do mesmo sexo; [#] $p<0,05$ quando comparadas com machos da mesma idade; [§] $p\leq 0,05$ quando comparados com fêmeas adultas.

Em relação ao efeito do fator idade, as análises estatísticas mostraram que: os machos adultos gastaram mais tempo em *grooming* rostral que os púberes ($H=12,02$, $p<0,05$); as fêmeas adultas apresentaram maiores escores de entradas nos braços fechados ($F_{[1,39]}=4,61$; $p<0,05$) e menor tempo gasto nesses braços quando comparadas com as púberes ($F_{[1,39]}=5,43$; $p<0,05$). Esses resultados indicam que machos adultos apresentam mais comportamentos do tipo ansioso que os púberes e que as fêmeas adultas são mais ativas que as púberes.

Nenhuma diferença estatística foi encontrada para o tempo gasto nos braços abertos, porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, SAP, *grooming* corporal e total.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos nos primeiros 5 minutos da sessão de MCC. As fêmeas apresentaram maiores escores de cruzamentos de quadrados quando comparadas com os machos ($F_{[1,35]}=4,36$; $p<0,05$). O teste de Kruskal-Wallis complementado com Dunn indicou que os machos adultos gastaram menos tempo em *freezing* que os púberes ($H=8,43$, $p<0,05$) e gastaram mais tempo em *grooming* rostral que as fêmeas adultas ($H=8,28$, $p<0,05$). A quantidade de *grooming* corporal e total não se diferenciou entre os grupos.

Tabela 5 – Resultados de machos e fêmeas, púberes e adultos, em 5 minutos de sessão no medo condicionado ao contexto.

Parâmetro	Machos		Fêmeas	
	Púberes (n=8)	Adultos (n=10)	Púberes (n=10)	Adultas (n=11)
Quadrados cruzados	11,5 ± 1,7	9,5 ± 2,1	17,5 ± 3,9 [#]	14,3 ± 1,7 [#]
<i>Freezing</i> (s)	15,2 (2,4-46,1)	4,6* (0,0-26,4)	20,2 (0,7-126,4)	13,3 (0,0-83,5)
<i>Grooming</i> rostral (s)	12,6 (0,0-19,0)	22,5 (0,0-40,5)	12,5 (5,1-29,1)	5,4 (0,0-18,3) [#]
<i>Grooming</i> corporal (s)	0,0 (0,0-7,0)	0,7 (0,0-5,3)	0,0 (0,0-2,3)	0,2 (0,0-3,6)
<i>Grooming</i> total (s)	13,4 (0,0-26,7)	34,1 (0,0-60,8)	17,5 (5,3-34,7)	6,0 (0,0-23,9)

Os dados analisados por Análise de Variância (ANOVA, considerando os fatores sexo e idade) estão apresentados como média ± EPM e os analisados com Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn estão representados como mediana (mínimo-máximo); * $p<0,05$ quando comparados com púberes do mesmo sexo; [#] $p<0,05$ quando comparadas com machos da mesma idade.

Na Tabela 6 estão apresentados os dados relativos à sessão de 20 minutos no MCC. Kruskal-Wallis ($H=17,84$, $p<0,05$) complementado com Dunn indicou que os machos adultos

gastaram menos tempo em *freezing* que os púberes. Nenhuma diferença foi encontrada para o cruzamento de quadrados e nem para medidas de *grooming* (rostral, corporal e total).

Tabela 6 – Resultados de machos e fêmeas, púberes e adultos, em 20 minutos de sessão no medo condicionado ao contexto.

Parâmetro	Machos		Fêmeas	
	Púberes (n=8)	Adultos (n=10)	Púberes (n=10)	Adultas (n=11)
Quadrados cruzados	32,4 ± 6,2	19,7 ± 5,2	37,8 ± 6,8	31,2 ± 6,5
<i>Freezing</i> (s)	73,7 (26,1-161,6)	5,8* (0,0-26,4)	110,2 (25,9-215,1)	23,1(0,7-307,3)
<i>Grooming</i> rostral (s)	53,3 (25,3-121,3)	74,1 (2,5-151,3)	81,8 (31,6-122,6)	51,5 (24,3-119,2)
<i>Grooming</i> corporal (s)	4,3 (0,0-24,7)	6,3 (0,0-102,2)	9,5 (0,0-56,3)	3,0 (0,0-28,6)
<i>Grooming</i> total (s)	73,0 (29,0-153,1)	107,6 (2,8-291,5)	106,9 (42,8-184,3)	64,1 (34,8-191,0)

Os dados analisados por Análise de Variância (ANOVA, considerando os fatores sexo e idade) estão apresentados como média ± EPM e os dados analisados pelo Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn estão representados por mediana (mínimo-máximo); *p<0,05 quando comparados com púberes do mesmo sexo.

4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLX DURANTE A GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO NO COMPORTAMENTO DE RATOS MACHOS E FÊMEAS EM 3 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE

Na Tabela 7 são apresentados os resultados obtidos nos 20 minutos de sessão do CA. A ANOVA apontou que as fêmeas foram mais ativas, obtendo maiores escores quanto ao número de quadrados cruzados quando comparadas com os machos ($F_{[1,35]}=5,03$; $p \leq 0,05$). A ANOVA não encontrou efeito significativo quanto ao número de entradas na região central e ao tempo gasto em *grooming* corporal ($p > 0,05$). Kruskal-Wallis também não encontrou diferenças no tempo gasto na região central ($p > 0,05$).

Tabela 7 – Resultados de machos e fêmeas púberes (DPN35) expostos ou não à FLX, em 20 minutos de sessão no campo aberto.

Parâmetro	Machos		Fêmeas	
	Controle (n=11)	Fluoxetina (n=9)	Controle (n=10)	Fluoxetina (n=9)
Entradas região central	6,7 ± 1,7	8,0 ± 2,2	8,7 ± 1,6	9,4 ± 1,2
Tempo área central (s)	12,4 (1,1-90,9)	18,4 (3,8-82,4)	19,5 (2,1-65,5)	25,6 (8,9-73,3)
Quadrados cruzados	91,4 ± 14,2	107,6 ± 14,4	137,4 ± 9,7*	123,7 ± 16,3*
<i>Grooming</i> rostral (s)	99,4 (7,0-306,8)	103,3 (52,8-149,7)	103,8 (86,8-140,6)	113,3 (60,4-223,0)
<i>Grooming</i> corporal (s)	68,9 ± 11,4	89,0 ± 21,8	101,2 ± 11,2	106,5 ± 22,3

Os dados analisados por Análise de Variância (ANOVA, considerando os fatores sexo e tratamento) estão apresentados como média ± EPM, e os dados analisados pelo Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn estão representados por mediana (mínimo-máximo); * $p \leq 0,05$ quando comparados com machos do mesmo tratamento.

Os resultados do LCE são apresentados na Tabela 8. Os machos apresentaram maior número de entradas nos braços fechados quando comparados com as fêmeas, indicando aumento da atividade locomotora ($F_{[1,40]}=9,25$; $p \leq 0,05$). Uma tendência de aumento na quantidade de entradas nos braços fechados foi encontrada nos animais expostos à FLX, quando comparados com o grupo controle ($F_{[1,40]}=3,63$; $p=0,06$). Em relação à quantidade de entradas nos braços abertos, ao tempo gasto nos braços abertos e fechados, à porcentagem de tempo nos abertos, à frequência de SAP e ao tempo gasto em *grooming* corporal, o teste de Kruskal-Wallis não apontou nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$).

Tabela 8 – Resultados de machos e fêmeas expostos ou não à FLX em 5 minutos de sessão no Labirinto em Cruz Elevado.

Parâmetro	Machos		Fêmeas	
	Controle (n=10)	Fluoxetina (n=11)	Controle (n=11)	Fluoxetina (n=12)
Entradas nos abertos	1,0 (0,0-6,0)	2,0 (0,0-7,0)	0,0 (0,0-2,0)	0,0 (0,0-4,0)
Entradas nos fechados	8,5 ± 1,1	11,1 ± 1,3 ^Δ	5,6 ± 0,9*	7,3 ± 1,1* ^Δ
Tempo nos abertos	8,6 (0,0-56,7)	10,3 (0,0-64,7)	0,0 (0,0-21,8)	0,0 (0,0-49,1)
Tempo nos fechados	236,7 (178,6-294,5)	208,9 (136,3-297,7)	281,7 (227,3-298,8)	263,9 (211,1-298,0)
% tempo nos abertos	3,5 (0,0-24,1)	4,4 (0,0-25,3)	0,0 (0,0-8,7)	0,0 (0,0-18,9)
SAP	2,0 (1,0-9,0)	2,0 (1,0-7,0)	1,0 (0,0-5,0)	1,0 (0,0-5,0)
<i>Grooming</i> rostral (s)	9,4 ± 1,7	12,6 ± 2,4	16,5 ± 2,6	14,4 ± 2,8
<i>Grooming</i> corporal (s)	0,0 (0,0-4,2)	1,0 (0,0-3,9)	0,6 (0,0-11,4)	1,1 (0,0-4,9)

Os dados analisados pela Análise de Variância (ANOVA, considerando os fatores sexo e tratamento) estão apresentados como média ± EPM, e os dados analisados pelo Kruskal-Wallis, complementado com o teste de Dunn estão apresentados como mediana (mínimo-máximo); * $p \leq 0,05$ quando comparados com machos com o mesmo tratamento; ^Δ $p = 0,06$ quando comparados com o grupo controle do mesmo sexo;

Na Tabela 9 são apresentados os resultados obtidos nos 5 minutos de sessão do medo condicionado ao contexto. ANOVA revelou menor tempo de *grooming* rostral nos animais expostos à FLX, quando comparados com os grupos controles ($F_{[1,35]} = 4,04$; $p \leq 0,05$). ANOVA não apontou diferenças quanto ao número de quadrados cruzados entre os grupos ($p > 0,05$). Da mesma forma, Kruskal-Wallis não indicou nenhuma diferença significativa quanto ao tempo gasto em *freezing* e nem na duração de *grooming* corporal ($p > 0,05$).

Tabela 9 – Resultados de machos e fêmeas expostos ou não à FLX em 5 minutos de sessão no medo condicionado ao contexto.

Parâmetro	Machos		Fêmeas	
	Controle (n=8)	Fluoxetina (n=11)	Controle (n=10)	Fluoxetina (n=10)
Quadrados cruzados	11,5 ± 1,7	11,7 ± 2,0	17,5 ± 3,9	13,3 ± 2,0
<i>Freezing</i> (s)	15,2 (2,4-46,1)	17,6 (1,5-136,4)	20,2 (0,7-126,4)	26,9 (1,1-82,9)
<i>Grooming</i> rostral (s)	10,2 ± 2,6	6,0 ± 2,1 [#]	15,8 ± 2,8	9,7 ± 2,6 [#]
<i>Grooming</i> corporal (s)	0,0 (0,0-7,0)	0,0 (0,0-0,9)	0,0 (0,0-2,3)	0,0 (0,0-0,0)

Os dados analisados por Análise de Variância (ANOVA, considerando os fatores sexo e tratamento) estão apresentados como média ± EPM e os dados analisados por Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn estão apresentados como mediana (mínimo-máximo); [#]p ≤ 0,05 quando comparados com o grupo controle do mesmo sexo.

A duração total de *grooming* está apresentada na Figura 8. No CA não houve diferenças entre os grupos (Kruskal-Wallis, p>0,05). No LCE, a ANOVA apontou efeito do fator sexo, sinalizando um aumento do *grooming* total nas fêmeas ($F_{[1,40]}=4,03$; p≤0,05). No MCC, ANOVA apontou efeito do fator tratamento. Os animais expostos à FLX apresentaram redução na quantidade total de *grooming* quando comparados com o grupo controle ($F_{[1,35]}=4,59$; p≤0,05).

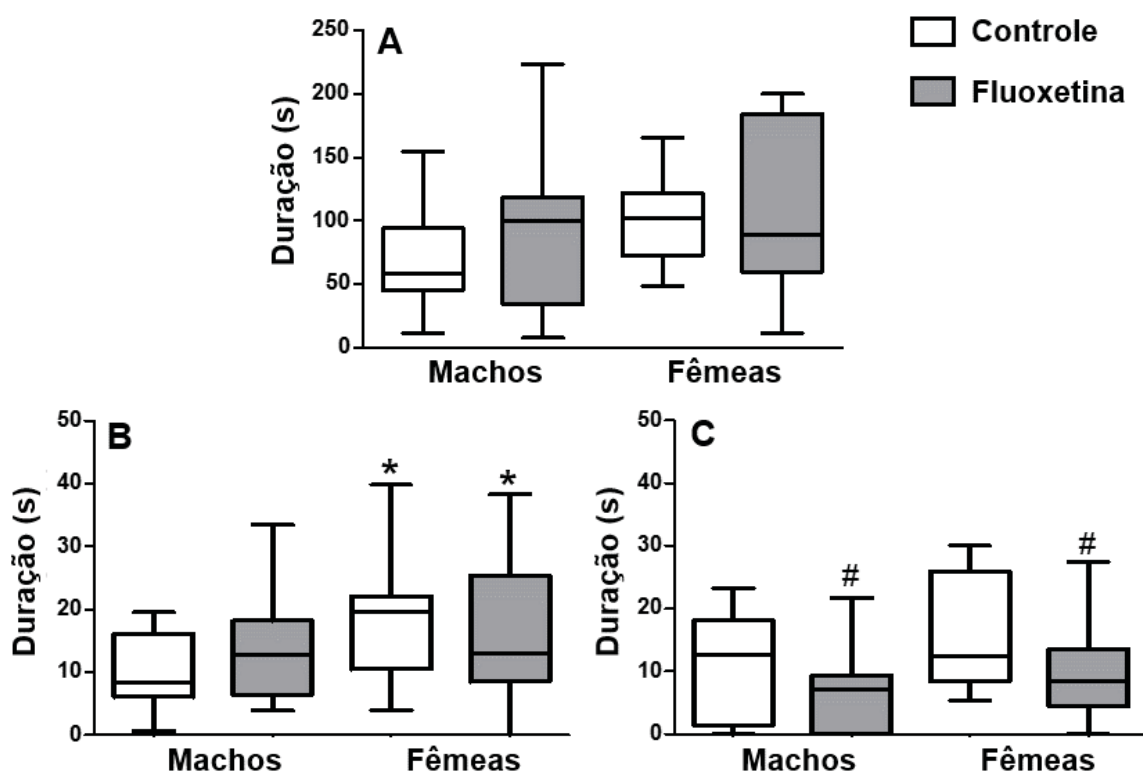


Figura 8 – Box plot ilustrando a duração do *grooming* total (em segundos) em 20 minutos de sessão no campo aberto (A), em 5 minutos do labirinto em cruz elevado (B) e em 5 minutos do medo condicionado ao contexto (C). Os dados do campo aberto foram analisados pelo Kruskal-Wallis complementado com Dunn e os do labirinto em cruz elevado e medo condicionado ao contexto por ANOVA de duas vias (considerando os fatores sexo e tratamento); * $p \leq 0,05$ quando comparados com machos com o mesmo tratamento; # $p \leq 0,05$ quando comparados com o grupo controle do mesmo sexo.

5. DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SEXO, IDADE E DURACÃO DA SESSÃO (5 E 20 MINUTOS) EM 3 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE

O primeiro experimento teve como objetivo avaliar a influência dos fatores sexo e idade sobre os comportamentos avaliados em 3 modelos animais de ansiedade: CA, LCE e MCC. Objetivou-se avaliar também a diferença do período de sessão utilizado (5 ou 20 minutos), bem como a utilidade da divisão do comportamento de *grooming* em seus componentes rostral e corporal para a avaliação da emocionalidade.

No presente estudo, apenas a atividade locomotora se mostrou influenciada por um dos fatores nos primeiros 5 minutos no CA, com as fêmeas sendo mais ativas que os machos. Esse resultado corrobora dados da literatura (BROTTO; BARR; GORZALKA, 2000; MENG; DRUGAN, 1993; MOORE, 1986; OLIVIER et al., 2008). Essa mesma influência do sexo foi observada na sessão prolongada do CA (20 minutos) e também nos testes subsequentes: em 5 minutos no LCE e no MCC; e em 20 minutos no LCE. Existem evidências de que a atividade locomotora tenha correlação positiva com níveis plasmáticos de estrogênio (e.g., OGAWA et al., 2003) o que poderia explicar não só a diferença de sexo, mas também o aumento da locomoção observada em adultas quando comparadas com as púberes. Esse aumento da locomoção em adultos também foi observado em outro estudo (MARIN et al., 2011) em que machos de 70-74 dias apresentaram aumento de atividade locomotora quando comparados com os púberes de 37-40 dias. Porém, esses dados não parecem ser muito consistentes na literatura, uma vez que em outros estudos há evidências de diminuição da atividade locomotora de adultos quando comparados com púberes (e.g., MASUR; SCHUTZ; BOERNGEN, 1980; TANAKA et al., 1984).

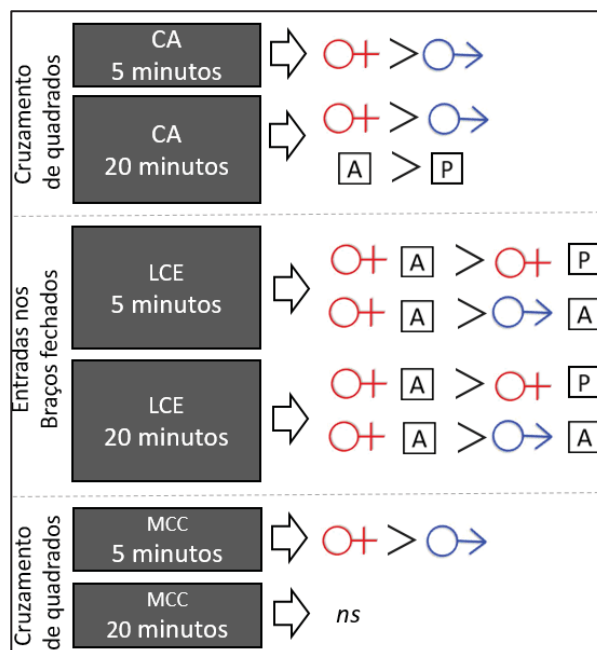


Figura 9 – Comparação de parâmetros indicativos de **atividade locomotora** nos 3 testes utilizados. CA, campo aberto; LCE, labirinto em cruz elevado; MCC, medo condicionado a contexto; A, animais adultos; P, animais púberes; *ns*, sem diferenças significativas nos testes estatísticos.

Em relação ao tempo da sessão para a avaliação da atividade locomotora, a duração de 20 minutos pareceu ser útil somente para o teste no CA. No LCE os resultados dos 20 minutos não diferiram dos obtidos nos primeiros 5 minutos; e no MCC não houve efeito do fator sexo na sessão prolongada. Embora avaliação da atividade locomotora não seja o maior interesse na utilização do LCE, o número de entradas nos braços fechados geralmente é o parâmetro utilizado para esse intuito (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). Curiosamente, os resultados obtidos nos primeiros 5 minutos de teste no LCE apontaram os mesmos efeitos obtidos nos 20 minutos no CA. Essa maior atividade locomotora de fêmeas no LCE também vai de acordo com os achados na literatura (IMHOF et al., 1993).

Embora majoritariamente utilizado para a avaliação da atividade locomotora, o CA também permite o estudo da emocionalidade (ARCHER, 1973; LAMPREA et al., 2008; WALSH; CUMMINS, 1976). Alguns estudos já investigaram o efeito da manipulação de estressores na exploração dos roedores na região central do aparato, observando uma relação negativa dessa medida com o uso desses estressores (como exemplo, ver BOUWKNECHT et al., 2007; HIRSJÄRVI; JUNNILA, 1986). Neste estudo, os parâmetros convencionais de emocionalidade no CA se mostraram sensíveis ao fator sexo e idade somente na sessão de 20 minutos. Esse dado é interessante ao se considerar que nos primeiros 5 minutos a novidade

pode intensificar o conflito entre curiosidade e medo de explorar. A ausência de efeitos nos primeiros 5 minutos pode ter relação com essa maior intensidade do conflito nos momentos iniciais do teste. Esse pode ser um motivo também para que o uso do CA na avaliação da ansiedade seja questionado por alguns autores devido à sua baixa validade preditiva (PRUT; BELZUNG, 2003). Nos 20 minutos de sessão no CA, as fêmeas se mostraram menos ansiosas que os machos e os adultos tiveram menores escores de ansiedade do que os púberes. Esse mesmo padrão emocional foi observado nos testes subsequentes, porém, sem a necessidade de utilização dos 20 minutos (Figura 10).

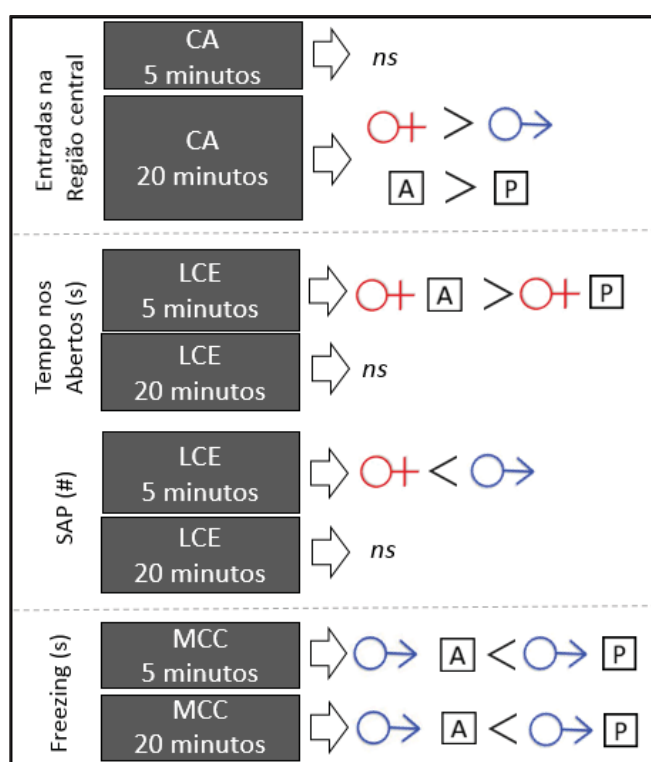


Figura 10 – Comparação de alguns parâmetros de **emocionalidade** nos primeiros 5 minutos e durante os 20 minutos dos 3 testes utilizados. CA, campo aberto; LCE, labirinto em cruz elevado; MCC, medo condicionado a contexto; SAP, Stretched Attend Posture; A, animais adultos; P, animais púberes; *ns*, sem diferenças significantes nos testes estatísticos.

No LCE, o período de 5 minutos mostrou-se mais sensível para a avaliação do comportamento emocional do que o de 20 minutos. Diferentes parâmetros emocionais podem ser avaliados no LCE, porém, as entradas e o tempo nos braços abertos são os índices mais utilizados para esse propósito (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; HOGG, 1996). Nos primeiros 5 minutos da sessão, as fêmeas adultas comportaram-se de forma menos ansiosa do que as púberes. Na sessão de 20 minutos, somente o número de entradas nos abertos atingiu

significância e repetiu o efeito já observado em 5 minutos, i.e., fêmeas adultas menos ansiosas que as púberes. O SAP é outro parâmetro utilizado para o estudo da ansiedade (RODGERS et al., 1997). É um comportamento sensível a ansiolíticos e ansiogênicos (RODGERS; COLE, 1993) e modulado por manipulações de condições ambientais estressogênicas (FILGUEIRAS; CARVALHO-NETTO; ESTANISLAU, 2014). Os resultados do SAP tiveram efeito de sexo: as fêmeas exibiram-se menos ansiosas do que os machos – sendo os primeiros 5 minutos suficientes para essa detecção. Essa influência do sexo na modulação do comportamento do tipo ansioso no LCE está de acordo com o observado em outros estudos que avaliaram diferenças sexuais nesse aparato (IMHOF et al., 1993; JOHNSTON; FILE, 1991). Além disso, os resultados do SAP acompanharam os já observados nos 20 minutos do CA.

No MCC, o principal parâmetro utilizado para a avaliação emocional é o comportamento de *freezing* (CURZON; RUSTAY; BROWMAN, 2009). As diferenças observadas em relação a esse comportamento foram as mesmas tanto no período de 5 quanto no de 20 minutos: machos púberes apresentaram mais *freezing* do que os adultos. A maior quantidade de *freezing* nos púberes indica maior resposta de medo, corroborando os resultados obtidos no CA e no LCE. No MCC, vários estudos sugerem uma dependência da idade para a expressão da emocionalidade, o que pode explicar os resultados obtidos (BURMAN et al., 2014; ESMORÍS-ARRANZ; MÉNDEZ; SPEAR, 2008; FOSTER; BURMAN, 2010; RUDY, 1993). Apesar de alguns estudos indicarem que fêmeas exibem menos *freezing* no MCC do que machos (e.g., GRESACK et al., 2009; MAREN; DE OCA; FANSELOW, 1994), em nosso estudo essa diferença não foi observada.

Em relação ao comportamento de *grooming*, a divisão em seus componentes rostral e corporal mostrou-se útil em todos os testes (Figura 11). Apesar de sessões mais longas serem sugeridas para a avaliação do *grooming* (ESTANISLAU, 2012; VELOSO et al., 2016), os primeiros 5 minutos das sessões de LCE e MCC se mostraram mais sensíveis para detectar diferenças entre os grupos do que a avaliação por 20 minutos. Possivelmente a maior complexidade ambiental do LCE e de procedimento do MCC – quando comparados com o CA – tenham intensificado as respostas emocionais nos primeiros minutos das sessões nesses aparatos, o que contribuiu para que o *grooming* rostral fosse diferente entre os grupos.

		Rostral	Corporal	Total
CA 5 minutos	⇒	—	—	—
CA 20 minutos	⇒	Sexo	—	—
LCE 5 minutos	⇒	Sexo Idade	—	Idade
LCE 20 minutos	⇒	Sexo Idade	—	—
MCC 5 minutos	⇒	Sexo	—	—
MCC 20 minutos	⇒	—	—	—

Figura 11 – Efeitos observados em cada um dos componentes do *grooming* (rostral e corporal) e no *grooming* total nos primeiros 5 minutos e durante os 20 minutos dos 3 testes utilizados. CA, campo aberto; LCE, labirinto em cruz elevado; MCC, medo condicionado a contexto.

O componente rostral mostrou-se bastante sensível e um marcador confiável de emocionalidade, como será apresentado a seguir. O uso do *grooming* rostral como um índice de estresse ou ansiedade já foi sugerido em outros estudos (DENMARK et al., 2010; ESTANISLAU, 2012; HOMBERG et al., 2002; KALUEFF; TUOHIMAA, 2005; KOMOROWSKA; PISULA, 2003). De acordo com VELOSO et al. (2016), o *grooming* corporal parece refletir habituação à novidade, já que há o seu aumento ao longo da sessão. Nesse sentido, esse componente pode inserir um “ruído” à utilização do *grooming* total enquanto um marcador de emocionalidade, impactando negativamente essa medida. Possivelmente por esse motivo, o *grooming* total é tido como sendo um comportamento de menor relevância em alguns estudos (e.g., em ARCHER, 1973; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994), ou sem relação com parâmetros convencionais de ansiedade (REIMER et al., 2015).

Nos 3 testes utilizados neste estudo o *grooming* rostral apresentou concordância parcial ou total com as medidas convencionalmente utilizadas para a avaliação da emocionalidade (Figura 12). No CA as fêmeas apresentaram menores índices de ansiedade do que os machos, e estes, por sua vez, apresentaram maior tempo de *grooming* rostral. No LCE, as fêmeas exibiram menos SAP – como já explicitado anteriormente, um indicativo de menor ansiedade – e os machos gastaram mais tempo em *grooming* rostral do que as fêmeas (o mesmo resultado observado no CA). No MCC, apesar de a medida convencional de *freezing* não ter sido diferente na comparação de sexo, os machos exibiram mais *grooming* rostral do que as fêmeas. Essa maior quantidade de *grooming* rostral demonstra uma concordância com o observado no

CA e LCE, indicando maior resposta emocional dos machos nesse teste e corroborando estudos da literatura (GRESACK et al., 2009; MAREN; DE OCA; FANSELOW, 1994).

Além disso, o MCC se diferencia dos outros testes utilizados em alguns aspectos de procedimento, como por exemplo, na utilização de choques elétricos. Alguns estudos mostram que existem diferenças de sexo em relação às estratégias comportamentais de lidar com estímulos aversivos dolorosos – como o choque. As fêmeas tendem a apresentar comportamentos mais ativos, se deslocando ou saltando, enquanto os machos apresentam maiores escores de comportamentos passivos, como o *freezing* (DONNER; LOWRY, 2013; KEMBLE; ENGER, 1984; KOKRAS; DALLA, 2014; VAN HAAREN; VAN HEST; HEINSBROEK, 1990). Neste estudo, apesar de não se observar diferenças sexuais no tempo de *freezing*, pôde-se observar uma maior atividade locomotora das fêmeas (Figura 9). Não foram encontrados estudos que avaliaram o *grooming* de forma sistematizada nesse teste com enfoque em diferenças de sexo e idade. Porém, somados aos resultados obtidos nos outros testes, propõe-se que o *grooming* rostral pode ser considerado um bom marcador de emocionalidade no MCC.

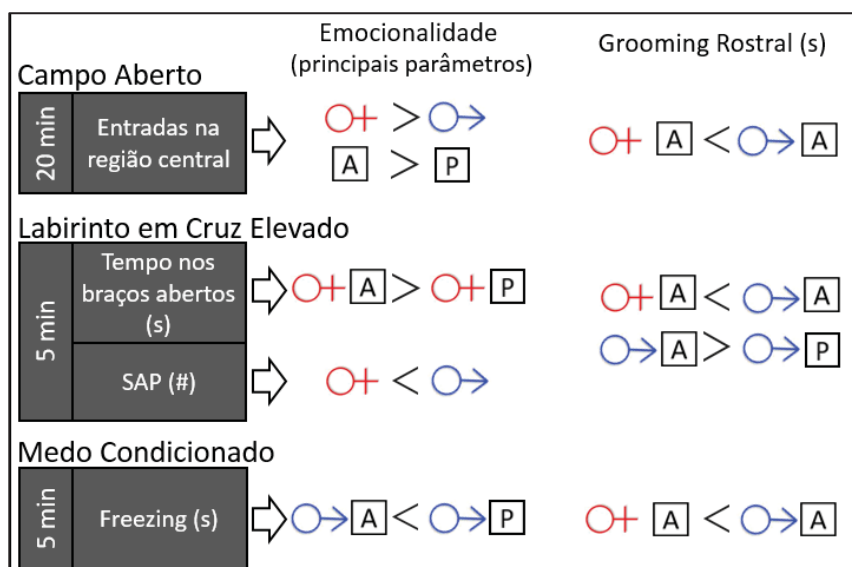


Figura 12 – Comparação de alguns parâmetros de emocionalidade com os de *grooming* rostral nos primeiros 5 minutos e durante os 20 minutos dos 3 testes utilizados. CA, campo aberto; LCE, labirinto em cruz elevado; MCC, medo condicionado ao contexto; SAP, *Stretched Attend Posture*; A, animais adultos; P, animais púberes.

Por fim, ao se considerar os objetivos desse primeiro experimento pôde-se constatar: 1) maior atividade locomotora e menores índices de comportamentos do tipo ansioso nas fêmeas em todos os testes utilizados; 2) maior atividade locomotora dos adultos quando comparados com os púberes no CA e LCE; 3) uma possível relação negativa entre os níveis de ansiedade e a idade: os adultos se comportaram de forma menos ansiosa que os púberes, sugerindo que a adolescência pode ser uma janela de vulnerabilidade para o desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso; 4) em relação ao *grooming*, a divisão nos componentes rostral e corporal foi útil e o *grooming* rostral acompanhou parâmetros convencionais de emocionalidade nos 3 testes; 5) o prolongamento da duração da sessão foi útil somente para as avaliações no CA. No LCE, os 5 minutos convencionalmente utilizados e validados (PELLOW et al., 1985) foram suficientes. No MCC, apesar de na literatura existirem estudos com diferentes durações da segunda sessão (e.g., 8 minutos em MAREN; DE OCA; FANSELOW, 1994; 5 minutos em SHOJI et al., 2014; 4 minutos em SAXE et al., 2006; e 30 minutos em VELOSO et al., 2016), os primeiros 5 minutos pareceram ser suficientes para detectar o efeito dos diferentes fatores (tanto nos parâmetros convencionais quanto para o *grooming*).

5.2 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA NO PERÍODO PERINATAL

Este segundo experimento objetivou investigar o comportamento de ratos expostos à FLX durante a gestação e amamentação nos três diferentes modelos animais de ansiedade utilizados no primeiro experimento. Além dos parâmetros convencionais de cada teste, o comportamento de *grooming* foi analisado considerando os seus componentes rostral e corporal. Optamos por utilizar somente animais com 35 dias de idade uma vez que no primeiro experimento essa idade mostrou-se sensível à manipulação de variáveis ambientais na expressão de emocionalidade. A escolha por essa idade também está de acordo com os outros achados do laboratório que mostraram efeitos comportamentais da exposição à FLX no período perinatal principalmente em animais púberes (como por exemplo, em FAVARO; COSTA; MOREIRA, 2008; FRANCIS-OLIVEIRA et al., 2013; LISBOA et al., 2007; MATSUMOTO et al., 2016).

Na avaliação da atividade locomotora foi encontrado efeito do fator sexo no CA, com as fêmeas se mostrando mais ativas que os machos. Esse resultado, como já discutido no experimento 1, está de acordo com alguns estudos que compararam o efeito de sexo na atividade locomotora (BROTTO; BARR; GORZALKA, 2000; MENG; DRUGAN, 1993; MOORE, 1986; OLIVIER et al., 2008). No LCE, os machos apresentaram maiores índices de entradas nos fechados – indicando maior atividade locomotora. Esse resultado possivelmente foi encontrado devido à inserção dos machos FLX na análise – esse grupo apresentou elevados índices de entradas nos fechados, inclusive diferenciando-se do grupo CON. De qualquer forma, esse efeito não corrobora outros estudos com animais expostos à FLX no LCE, em que as fêmeas apresentaram maiores índices de atividade locomotora (MATSUMOTO et al., 2016; OLIVIER et al., 2008).

Em relação à emocionalidade, foi encontrado efeito somente no MCC. O grupo FLX apresentou menos *grooming rostral* do que o grupo CON, indicando menor resposta emocional nesse teste. De maneira similar ao observado nesse estudo, outros autores também não relataram diferenças no tempo de *freezing* em animais expostos à FLX durante o desenvolvimento e submetidos a testes de condicionamento de medo (MCALLISTER; KIRYANOVA; DYCK, 2012; OLIVIER et al., 2011).

O surgimento de diferenças emocionais entre os grupos CON e FLX somente no MCC pode estar relacionado às diferentes características de cada teste. O MCC é um teste baseado no paradigma de condicionamento Pavloviano, diferente, portanto, do CA e LCE que são

baseados na ansiedade natural (*inata*) dos roedores (KUMAR; BHAT; KUMAR, 2013; NUNES; HALLAK, 2014; RODGERS et al., 1997). Esses modelos podem ser diferenciados em alguns aspectos, como por exemplo, em relação ao contexto eliciador do medo/ansiedade, ao tipo de comportamento exibido e às bases neurais envolvidas na expressão comportamental no aparato (BRANDÃO et al., 2003; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012). No LCE e CA, o contexto sinaliza um perigo em potencial e o comportamento ansioso é principalmente relacionado à avaliação de risco. No MCC os animais recebem choques elétricos, que são incondicionalmente aversivos. Dessa forma, os principais comportamentos exibidos nesse modelo estão relacionados à reação defensiva, uma vez que um perigo real (choque) foi apresentado 24 horas antes no mesmo ambiente (BRANDÃO et al., 2003; GRAEFF, 2014).

Em relação às bases neurobiológicas envolvidas na modulação das respostas de ansiedade e medo em cada um desses modelos (incondicionados e condicionados), observa-se que, apesar de as principais estruturas serem praticamente as mesmas, há a participação de diferentes subnúcleos e/ou projeções mediando respostas ansiolíticas ou ansiogênicas (ADHIKARI, 2014; KIM et al., 2013). Na amígdala, por exemplo, enquanto a estimulação optogenética da região basolateral (BLa) aumenta a ansiedade no LCE e CA, a estimulação da projeção neuronal do BLa para a região centromedial diminui a ansiedade (MAREN et al., 2007; TYE et al., 2011). Da mesma forma, a inibição de diferentes regiões do hipocampo é capaz de aumentar ou diminuir a ansiedade de ratos em distintos modelos de medo/ansiedade. Enquanto a inibição da porção ventral está associada a um efeito ansiolítico no LCE, a inibição da região dorsal produz efeito ansiogênico (ZHANG et al., 2014). No MCC, tanto a inibição da porção ventral quanto da dorsal é capaz de impedir respostas de medo na sessão de teste (ZHANG et al., 2014). Esses resultados ressaltam a fundamental importância que o hipocampo exerce principalmente no MCC – mas não nos modelos de condicionamento de medo sinalizado por um estímulo específico, como uma luz ou um som, uma vez que as respostas desencadeadas são contexto-dependentes (CAIN; LEDOUX, 2008; LEDOUX, 2000 – Figura 13). Outros estudos mostram que a lesão do hipocampo logo após a sessão de treino no MCC é capaz de extinguir as respostas características de emocionalidade dos animais submetidos ao teste (KIM; FANSELOW, 1992; KIM; JUNG, 2006). Além disso, existem evidências demonstrando que a plasticidade hipocampal – principalmente a neurogênese na região do giro denteado – parece ser crucial para a formação das respostas de medo no MCC (SAXE et al., 2006), já que a ablação específica dessa região provoca redução na duração do *freezing*. Sendo uma estrutura do sistema límbico com amplas conexões com a amígdala, o hipocampo tem

importante participação na modulação de respostas emocionais em animais submetidos a diferentes modelos animais, sobretudo em modelos contexto-dependentes, como é o caso do MCC (BANNERMAN et al., 2003; BELZUNG, 1992; CAIN; LEDOUX, 2008; LEDOUX, 2000). Dadas as considerações sobre o MCC e as suas bases neurobiológicas, é possível hipotetizar sobre os resultados obtidos no segundo experimento.

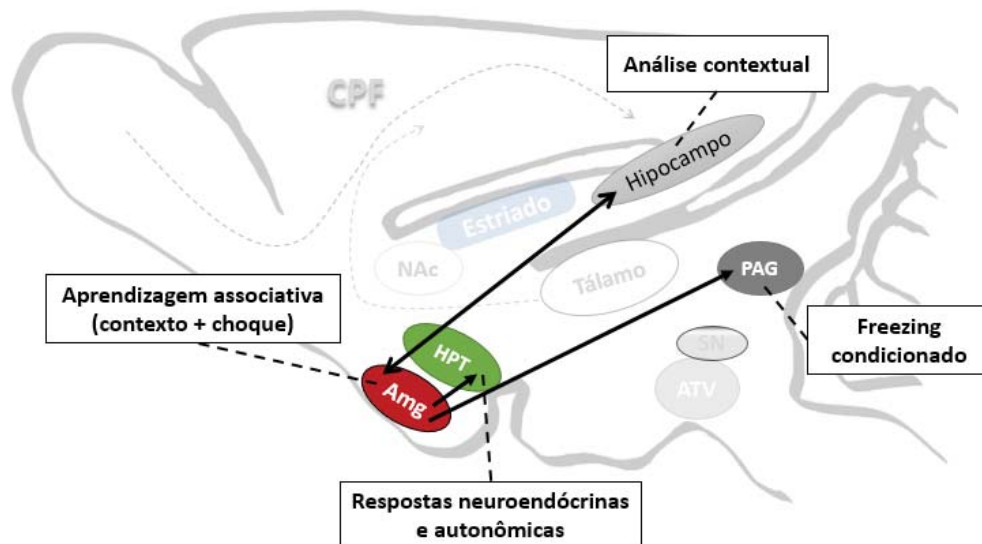


Figura 13 – Representação esquemática simplificada da circuitaria envolvida no condicionamento de medo ao contexto. Amg: amígdala; HPT: hipotálamo; PAG: substância cinzenta periaquedutal. **Fonte:** o próprio autor.

Alguns estudos sugerem que a exposição à FLX durante o desenvolvimento pode impactar negativamente na neuroplasticidade hipocampal, diminuindo os níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (MATSUMOTO et al., 2016), e também o perfil de metilação de DNA nessa estrutura (GEMMEL et al., 2016; TOFFOLI et al., 2014). Dessa forma, uma hipótese inicial é que alterações no hipocampo, na medida em que essa é uma importante estrutura na modulação do comportamento emocional relacionado ao contexto (Figura 13), podem estar relacionadas a uma menor resposta aversiva dos ratos expostos à FLX. Porém, como será discutido a seguir, as conexões do hipocampo com outras áreas possibilitam fazer algumas importantes considerações.

Como já abordado anteriormente, dentre as principais conexões do hipocampo com estruturas límbicas destacam-se as projeções para e advindas da amígdala BLA (FELIX-ORTIZ; TYE, 2014). Apesar de o hipocampo ser geralmente a estrutura mais associada à

memória e aprendizagem a BLA parece ter importante função na formação e consolidação de memórias hipocampo-dependentes (BLANK et al., 2014; ROOZENDAAL et al., 2001). Algumas evidências sugerem que a BLA pode afetar a ocorrência de potenciação de longo prazo (LTP) no hipocampo (AKIRAV; RICHTER-LEVIN, 2002). Além da aprendizagem, a conexão BLA-hipocampo parece ser importante também para a expressão emocional. A inibição e estimulação optogenética de feixes axonais do BLA para o hipocampo produz, respectivamente, diminuição e aumento de ansiedade (FELIX-ORTIZ et al., 2013). Curiosamente, a estimulação optogenética desses terminais também é capaz de aumentar a quantidade de *grooming* exibida por camundongos (FELIX-ORTIZ; TYE, 2014). Esses resultados em conjunto possibilitam relacionar positivamente a emocionalidade com o *grooming* (corroborando com os achados do experimento 1). Indiretamente, esses resultados também permitem hipotetizar que a redução de *grooming* do grupo FLX no MCC neste estudo ocorreu não só por uma possível alteração do hipocampo, mas também por possíveis alterações na BLA ou na conexão BLA-hipocampo. Ademais, uma melhor compreensão da diminuição do tempo de *grooming* no grupo FLX ocorrerá com uma análise das bases biológicas da relação emocionalidade-*grooming*. Porém, antes de explorar as bases dessa relação, será feita uma explanação do que se conhece especificamente sobre a neurobiologia do comportamento de *grooming*.

Os dois tipos de *grooming* – encadeados e flexíveis (Figura 1) – apresentam diferentes substratos neurais. Lesões dos tratos nigroestriatais dopaminérgicos ou ablação do estriado dorsal (input da substância negra – Figura 14) são suficientes para perturbar a sequência ou diminuir a ocorrência de cadeias sintáticas, mas não para a diminuir a execução do *grooming* flexível e seus componentes (BERRIDGE; ALDRIDGE, 2000; BERRIDGE; WHISHAW, 1992; BERRIDGE, 1989; BERRIDGE et al., 2005). Durante a sequência de movimentos das cadeias sintáticas observa-se aumento de disparos de neurônios da região dorsolateral do estriado (input da via nigro-estriatal), mas esse aumento de disparos não é observado na ocorrência do *grooming* mais flexível (BERRIDGE et al., 2005). As bases neurais do *grooming* flexível, por outro lado, têm sido associadas ao estriado ventral (especificamente o pálido ventral e globo pálido) e também ao núcleo leito da estria terminal (NLET) e núcleo accumbens (Figura 14). Lesões nessas áreas diminuem a ocorrência de *grooming* sem alterar a frequência e sequência das cadeias sintáticas (CROMWELL; BERRIDGE, 1996b; KALUEFF et al., 2016). A alta ocorrência do *grooming*, inclusive, é um preditor positivo de auto-administração intravenosa de cocaína (HOMBERG et al., 2002). Isso ocorre justamente porque essas áreas, além de exercerem o controle sobre o *grooming* flexível, também estão associadas à motivação

e recompensa (SMITH et al., 2009), além de possuírem importante papel na aprendizagem (ADINOFF, 2004).

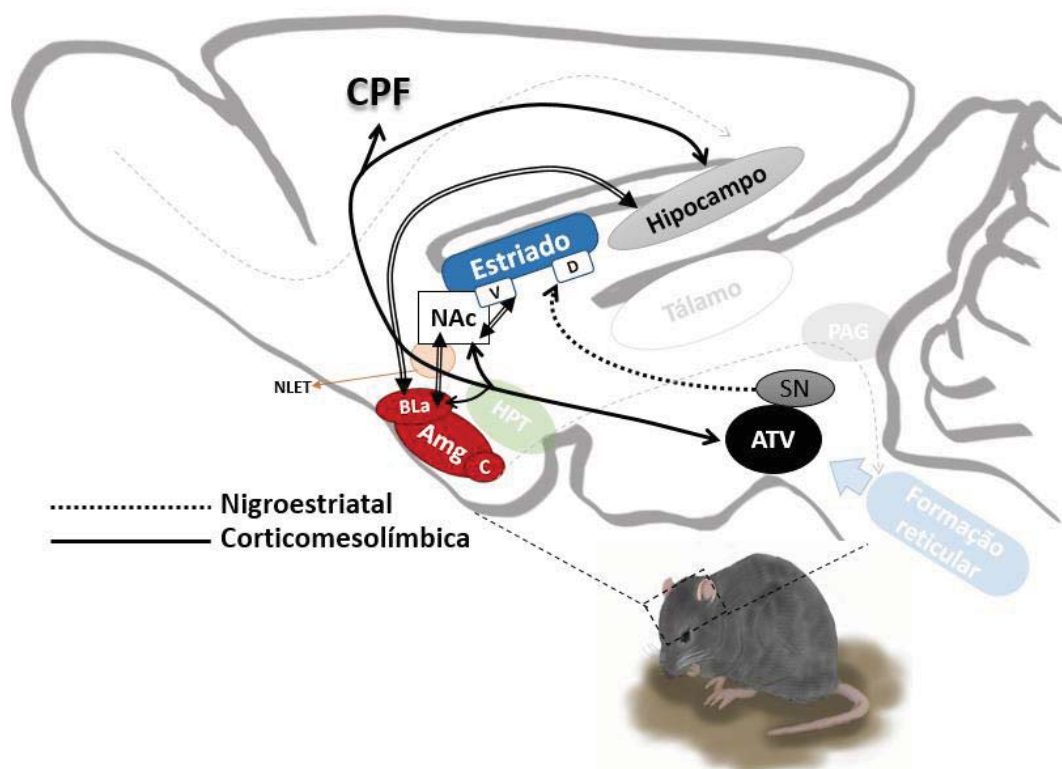


Figura 14 – Modelo esquemático das principais vias e estruturas envolvidas nas emoções e na sequência e execução do comportamento de *grooming*. Amg, BLa e C: núcleo basolateral e central da amígdala; NAc: núcleo accumbens; ATV: área tegmental ventral; SN: substância negra; Estriado V: ventral [pálido ventral, globo pálido] e e D: dorsal [putamen e caudado]; CPF: córtex pré-frontal; NLET: núcleo leito da estria terminal. As linhas contínua e pontilhada são referentes às 3 principais vias dopaminérgicas: corticomesolímbica (mesocortical + mesolímbica) e nigroestriatal. As linhas duplicadas são importantes projeções que conectam estruturas encefálicas envolvidas na expressão das emoções. **Fonte:** o próprio autor.

Um dos principais inputs da região ventral do estriado é oriundo da BLa e essa conexão se dá principalmente através do NLET – núcleo considerado parte importante da amígdala estendida e fundamental na expressão das emoções (HABER, 2011; JENNINGS et al., 2013; KALUEFF et al., 2016; KIM et al., 2013; LEBOW; CHEN, 2016; SAH et al., 2003; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015; WALKER; TOUFEXIS; DAVIS, 2003). Além disso, a BLa também se projeta para a área tegmental ventral, o que sugere uma participação dessa estrutura na modulação das vias dopaminérgicas corticomesolímbicas (NAZARI-SERENJEH; REZAYOF, 2013). Essa participação da BLa na modulação de estruturas corticomesolímbicas, inclusive, é

sugerida como responsável pela expressão emotivo-dependente do *grooming* flexível (KALUEFF et al., 2016). Dessa forma, a diminuição do tempo de *grooming* (rostral e total) no MCC observada nos animais expostos à FLX pode também estar associada a alterações de estruturas ou conexões do eixo BLa-NLET. Uma evidência que fortalece essa hipótese foi encontrada no estudo de FRANCIS-OLIVEIRA, et al (2013). Nesse estudo – que seguiu o mesmo protocolo de exposição perinatal utilizado neste trabalho – animais expostos à FLX e que foram submetidos a estressor agudo de imobilização aos 35 dias de idade, apresentaram menor expressão de c-FOS nos neurônios da BLa do que animais do grupo CON, sugerindo menor ativação dessa estrutura nesses animais.

A amígdala geralmente é a estrutura de principal interesse dos pesquisadores que visam compreender as bases do medo e ansiedade, porém, nos últimos anos tem crescido o número de evidências que sobrelevam a importância do NLET nessas e em outras emoções (para uma revisão, ver LEBOW; CHEN, 2016). Por ter uma localização estratégica e ser parte importante na comunicação BLa-estriado ventral, levantamos a hipótese de que a redução do *grooming* poderia decorrer de menor ativação do NLET. Buscando investigar essa hipótese revisitamos as lâminas imunomarcadas utilizadas no trabalho de FRANCIS-OLIVEIRA et al. (2013) e fizemos a quantificação dos neurônios c-Fos positivos no NLET, que não havia sido avaliado anteriormente. Os resultados (Anexo A) mostram que houve, de fato, menor expressão de neurônios c-Fos positivos nos machos do grupo exposto à FLX após estresse agudo de imobilização quando comparados com o grupo CON estressado. Esses resultados sugerem que a exposição à FLX também pode influenciar na ativação do NLET quando o animal é colocado em uma condição aversiva – o que pode explicar a redução do *grooming* no MCC observada nesses animais.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do primeiro experimento indicaram que fêmeas são mais ativas e apresentam menos comportamento tipo ansioso do que machos e, assim, podem ser mais adequadas em estudos que investigam fatores ambientais que induzem efeitos sedativos ou ansiogênicos; por outro lado, os machos adultos podem ser mais indicados em estudos que investiguem fatores que induzam à diminuição da ansiedade ou efeitos estimulantes. Curiosamente, a adolescência parece ser uma janela de vulnerabilidade quando considerado o comportamento do tipo ansioso e os animais púberes podem ser adequados para a investigação da ansiedade e sua modulação por fatores ambientais.

O comportamento de *grooming*, principalmente quando dividido em seus componentes rostral e corporal, mostrou-se uma medida sensível para o estudo das emoções e um indicador útil para inferir sobre o funcionamento de estruturas encefálicas. Foi evidenciado também que a duração da sessão mais útil para se constatar as diferenças nos parâmetros convencionais e no *grooming* depende do tipo de teste utilizado.

Ainda mais, este trabalho possibilitou avançar o conhecimento sobre a neurotoxicidade do desenvolvimento da FLX. Animais expostos à FLX apresentaram redução de *grooming* no MCC e menor expressão de c-Fos no NLET após exposição a estressor agudo de imobilização. Analisados em conjunto com dados prévios do laboratório pode-se sugerir que a exposição à FLX durante a gestação e amamentação leva a alteração funcional do eixo hipocampo-BLa-NLET.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, A. Distributed circuits underlying anxiety. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 112. 2014.
- ADINOFF, B. Neurobiologic processes in drug reward and addiction. **Harvard Review of Psychiatry**, v. 12, n. 6, p. 305–20. 2004.
- AKIRAV, I.; RICHTER-LEVIN, G. Mechanisms of amygdala modulation of hippocampal plasticity. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 22, p. 9912–21. 2002.
- ALDRIDGE, J. W.; BERRIDGE, K. C.; ROSEN, A. R. Basal ganglia neural mechanisms of natural movement sequences. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 82, n. 8-9, p. 732–9. 2004.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–35. 1973.
- BACCHI, A. D. **Efeito da exposição à fluoxetina durante a gestação e amamentação sobre o eixo corticotrófico e vias dopaminérgicas em ratos**. 2016. 56 páginas. Tese (doutorado multicêntrico em ciências fisiológicas). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.
- BANNERMAN, D. . et al. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. **Behavioural Brain Research**, v. 139, n. 1-2, p. 197–213. 2003.
- BELZUNG, C. Hippocampal mossy fibres: implication in novelty reactions or in anxiety behaviours? **Behavioural Brain Research**, v. 51, n. 2, p. 149–155. 1992.
- BENNETT, H. A. et al. Prevalence of depression during pregnancy: systematic review. **Obstetrics and gynecology**, v. 103, n. 4, p. 698–709. 2004.
- BERRIDGE, K. C. Substantia nigra 6-OHDA lesions mimic striatopallidal disruption of syntactic grooming chains: A neural systems analysis of sequence control. **Psychobiology**, v. 17, n. 4, p. 377–385. 1989.
- BERRIDGE, K. C. et al. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. **BMC biology**, v. 3, p. 4. 2005.
- BERRIDGE, K. C.; ALDRIDGE, J. W. Super-stereotypy I: enhancement of a complex movement sequence by systemic dopamine D1 agonists. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 37, n. 3, p. 194–204. 2000.
- BERRIDGE, K. C.; WHISHAW, I. Q. Cortex, striatum and cerebellum: control of serial order in a grooming sequence. **Experimental brain research**, v. 90, n. 2, p. 275–90. 1992.
- BLANK, M. et al. Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 111, p. 1–8. 2014.
- BOTELHO, A. F. M. et al. Efeitos da ingestão de cafeína durante a gestação e a lactação sobre

a pele de ratas e de filhotes e sua relação com as concentrações séricas do cortisol materno. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 4, p. 1045–1055. 2015.

BOUWKNECHT, J. A. et al. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: Relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Brain Research Bulletin**, v. 72, n. 1, p. 32–43. 2007.

BRANDÃO, M. L. et al. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p. 36–41. 2003.

BROTTO, L. A.; BARR, A. M.; GORZALKA, B. B. Sex differences in forced-swim and open-field test behaviours after chronic administration of melatonin. **European Journal of Pharmacology**, v. 402, n. 1-2, p. 87–93. 2000.

BURMAN, M. A. et al. Contextual and auditory fear conditioning continue to emerge during the periweaning period in rats. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. 1-10. 2014.

CAIN, C. K.; LEDOUX, J. E. **Handbook of Anxiety and Fear**. Elsevier, 2008.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35 Suppl 2, p. S101–11. 2013.

CANTERAS, N. S. **Handbook of Anxiety and Fear**. Elsevier, 2008.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193–205. 2005.

CROMWELL, H. C.; BERRIDGE, K. C. Implementation of action sequences by a neostriatal site: a lesion mapping study of grooming syntax. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, n. 10, p. 3444–58. 1996a.

CROMWELL, H. C.; BERRIDGE, K. C. Implementation of Action Sequences by a Neostriatal Site: A Lesion Mapping Study of Grooming Syntax. **J. Neurosci.**, v. 16, n. 10, p. 3444–3458. 1996b.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171–176. 1994.

CURZON, P.; RUSTAY, N. R.; BROWMAN, K. E. **Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents**. CRC Press/Taylor & Francis, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5223/>>. Acesso em: 7 jan. 2016

DAYAN, J. et al. Role of Anxiety and Depression in the Onset of Spontaneous Preterm Labor. **American Journal of Epidemiology**, v. 155, n. 4, p. 293–301. 2002.

DENMARK, A. et al. The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 2, p. 553–9. 2010.

DONNER, N. C.; LOWRY, C. A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. **Pflügers**

Archiv : European Journal of Physiology, v. 465, n. 5, p. 601–26. 2013.

ESMORÍS-ARRANZ, F. J.; MÉNDEZ, C.; SPEAR, N. E. Contextual fear conditioning differs for infant, adolescent, and adult rats. **Behavioural Processes**, v. 78, n. 3, p. 340–50. 2008.

ESTANISLAU, C. Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. **Psychology & Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 105–112. 2012.

ESTANISLAU, C. et al. Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high- and low-avoidance rats. **Neuroscience Research**, v. 77, p. 187–201. 2013.

EVANS, J. et al. Cohort study of depressed mood during pregnancy and after childbirth. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 323, n. 7307, p. 257–60. 2001.

FAVARO, P. DAS N.; COSTA, L. C.; MOREIRA, E. G. Maternal fluoxetine treatment decreases behavioral response to dopaminergic drugs in female pups. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 30, n. 6, p. 487–94. 2008.

FELIX-ORTIZ, A. C. et al. BLA to vHPC Inputs Modulate Anxiety-Related Behaviors. **Neuron**, v. 79, n. 4, p. 658–664. 2013.

FELIX-ORTIZ, A. C.; TYE, K. M. Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 2, p. 586–95. 2014.

FILGUEIRAS, G. B.; CARVALHO-NETTO, E. F.; ESTANISLAU, C. Aversion in the elevated plus-maze: role of visual and tactile cues. **Behavioural processes**, v. 107, p. 106–11. 2014.

FORCELLI, P. A.; HEINRICHS, S. C. Teratogenic effects of maternal antidepressant exposure on neural substrates of drug-seeking behavior in offspring. **Addiction biology**, v. 13, n. 1, p. 52–62. 2008.

FORSBERG, L. et al. Neonatal Adaptation in Infants Prenatally Exposed to Antidepressants-Clinical Monitoring Using Neonatal Abstinence Score. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p.1-10. 2014.

FOSTER, J. A.; BURMAN, M. A. Evidence for hippocampus-dependent contextual learning at postnatal day 17 in the rat. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 17, n. 5, p. 259–66. 2010.

FRANCIS-OLIVEIRA, J. et al. Fluoxetine exposure during pregnancy and lactation: Effects on acute stress response and behavior in the novelty-suppressed feeding are age and gender-dependent in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 252, p. 195–203. 2013.

GEMMEL, M. et al. Gestational stress and fluoxetine treatment differentially affect plasticity, methylation and serotonin levels in the PFC and hippocampus of rat dams. **Neuroscience**, v. 327, p. 32–43. 2016.

GLOVER, M. E.; CLINTON, S. M. Of rodents and humans: A comparative review of the neurobehavioral effects of early life SSRI exposure in preclinical and clinical research. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 51, p. 50–72. 2016.

GOUVÊA, T. S. et al. Maternal exposure to the antidepressant fluoxetine impairs sexual motivation in adult male mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 90, n. 3, p. 416–9. 2008.

GRAEFF, F. G. Cap 5. Transtornos de ansiedade. In: BRANDÃO, M. L.; GRAEFF, F. G. (Eds.). **Neurobiologia dos transtornos mentais**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2014.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. 2 ed ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2012.

GRESACK, J. E. et al. Sex differences in contextual fear conditioning are associated with differential ventral hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation. **Neuroscience**, v. 159, n. 2, p. 451–67. 2009.

HABER, S. N. **Neuroanatomy of Reward: A View from the Ventral Striatum**. CRC Press/Taylor & Francis, 2011.

HANSEN, H. H.; SÁNCHEZ, C.; MEIER, E. Neonatal administration of the selective serotonin reuptake inhibitor Lu 10-134-C increases forced swimming-induced immobility in adult rats: a putative animal model of depression? **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, n. 3, p. 1333–41. 1997.

HEIKKINEN, T. et al. Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 73, n. 4, p. 330–7. 2003.

HENDRICK, V. et al. Fluoxetine and norfluoxetine concentrations in nursing infants and breast milk. **Biological Psychiatry**, v. 50, n. 10, p. 775–82. 2001.

HENDRICK, V. et al. Placental passage of antidepressant medications. **The American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 5, p. 993–6. 2003.

HIRSJÄRVI, P. A.; JUNNILA, M. A. Effects of light and noise test stimuli on the open-field behavior of Wistar rats. **Scandinavian Journal of Psychology**, v. 27, n. 1, p. 311–319. 1986.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 21–30. 1996.

HOMBERG, J. R. et al. Enhanced motivation to self-administer cocaine is predicted by self-grooming behaviour and relates to dopamine release in the rat medial prefrontal cortex and amygdala. **The European Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 9, p. 1542–50. 2002.

IMHOF, J. et al. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Behavioural Brain Research**, v. 56, n. 2, p. 177–180. 1993.

JABLENSKY, A. V et al. Pregnancy, delivery, and neonatal complications in a population cohort of women with schizophrenia and major affective disorders. **The American journal of psychiatry**, v. 162, n. 1, p. 79–91. 2005.

JENNINGS, J. H. et al. Distinct extended amygdala circuits for divergent motivational states. **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 224–228. 2013.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology &**

Behavior, v. 49, n. 2, p. 245–250. 1991.

KALUEFF, A. V. et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45–59. 2016.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 143, n. 2, p. 169–77. 2005.

KEMBLE, E. D.; ENGER, J. M. Sex differences in shock motivated behaviors, activity, and discrimination learning of northern grasshopper mice (*Onychomys leucogaster*). **Physiology & Behavior**, v. 32, n. 3, p. 375–380. 1984.

KESSLER, R. C. et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 593–602. 2005.

KESSLER, R. C. et al. Age differences in the prevalence and co-morbidity of DSM-IV major depressive episodes: results from the WHO World Mental Health Survey Initiative. **Depression and Anxiety**, v. 27, n. 4, p. 351–64. 2010.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, n. 5057, p. 675–7. 1992.

KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. **Neuroscience and Biobehavioral reviews**, v. 30, n. 2, p. 188–202. 2006.

KIM, S.-Y. et al. Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 219–223. 2013.

KLINGER, G. et al. Long-term outcome following selective serotonin reuptake inhibitor induced neonatal abstinence syndrome. **Journal of Perinatology**, v. 31, n. 9, p. 615–620, 10. 2011.

KOKRAS, N.; DALLA, C. Sex differences in animal models of psychiatric disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 20, p. 4595–619. 2014.

KOMOROWSKA, J.; PISULA, W. Does Changing Levels of Stress Affect the Characteristics of Grooming Behavior in Rats? **International Journal of Comparative Psychology**, v. 16, n. 4. 2003.

KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: A comprehensive review. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, n. 2, p. 175–183. 2013.

LAMPREA, M. R. et al. Thigmotactic responses in an open-field. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 2, p. 135–140. 2008.

LAUDER, J. M. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 600, p. 297–313; discussion 314. 1990.

- LEBOW, M. A.; CHEN, A. Overshadowed by the amygdala: the bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 4, p. 450–463. 2016.
- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, p. 155–84. 2000.
- LEE, L.-J.; LEE, L. J.-H. Neonatal fluoxetine exposure alters motor performances of adolescent rats. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 8, p. 1122–32. 2012.
- LISBOA, S. F. S. et al. Behavioral evaluation of male and female mice pups exposed to fluoxetine during pregnancy and lactation. **Pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 49–56. 2007.
- MALM, H. et al. Gestational Exposure to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Offspring Psychiatric Disorders: A National Register-Based Study. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 55, n. 5, p. 359–366. 2016.
- MAREN, S. et al. Neuroscience. The threatened brain. **Science**, v. 317, n. 5841, p. 1043–4, 24. 2007.
- MAREN, S.; DE OCA, B.; FANSELOW, M. S. Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. **Brain Research**, v. 661, n. 1-2, p. 25–34. 1994.
- MARIN, M. T. et al. Comparison of caffeine-induced locomotor activity between adolescent and adult rats. **European journal of pharmacology**, v. 660, n. 2-3, p. 363–7. 2011.
- MASUR, J.; SCHUTZ, M. T.; BOERNGEN, R. Gender differences in open-field behavior as a function of age. **Developmental Psychobiology**, v. 13, n. 2, p. 107–10. 1980.
- MATSUMOTO, A. K. et al. Co-exposure to fish oil or folic acid does not reverse effects in the progeny induced by maternal exposure to fluoxetine. **Neurotoxicology and Teratology**. 2016.
- MCALLISTER, B. B.; KIRYANOVA, V.; DYCK, R. H. Behavioural outcomes of perinatal maternal fluoxetine treatment. **Neuroscience**, v. 226, p. 356–66. 2012.
- MENG, I. D.; DRUGAN, R. C. Sex differences in open-field behavior in response to the β -carboline FG 7142 in rats. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 4, p. 701–705. 1993.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 48, n. 4, p. 254–60. 1955.
- MOORE, C. L. Sex differences in self-grooming of rats: Effects of gonadal hormones and context. **Physiology & Behavior**, v. 36, n. 3, p. 451–455. 1986.
- MORATO, S.; CHAIM, K. T. **X Plo-rat** (Software), 2005. Disponível em: <<http://scotty.ffclrp.usp.br/page.php?6>>
- NAZARI-SERENJEH, F.; REZAYOF, A. Cooperative interaction between the basolateral amygdala and ventral tegmental area modulates the consolidation of inhibitory avoidance memory. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 40, p. 54–

61. 2013.

NONACS, R.; COHEN, L. S. Assessment and treatment of depression during pregnancy: an update. **The Psychiatric clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 547–62. 2003.

NOORLANDER, C. W. et al. Modulation of serotonin transporter function during fetal development causes dilated heart cardiomyopathy and lifelong behavioral abnormalities. **PLoS one**, v. 3, n. 7, p. 1-10. 2008.

NUNES, E. A.; HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 17, n. 3, p. 528–543. 2014.

O'HARA, M. W.; SWAIN, A. M. Rates and risk of postpartum depression—a meta-analysis. **International Review of Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 37–54. 1996.

OBERLANDER, T. F. et al. Prenatal Effects of Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Antidepressants, Serotonin Transporter Promoter Genotype (SLC6A4), and Maternal Mood on Child Behavior at 3 Years of Age. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 164, n. 5. 2010.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-426-developmental-neurotoxicity-study_9789264067394-en>. Acesso em: 31 maio. 2016

OGAWA, S. et al. Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor alpha: specificity for the type of activity. **Endocrinology**, v. 144, n. 1, p. 230–9. 2003.

OLIVIER, J. D. A. et al. A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders. **Neuroscience**, v. 152, n. 3, p. 573–84. 2008.

OLIVIER, J. D. A. et al. Fluoxetine administration to pregnant rats increases anxiety-related behavior in the offspring. **Psychopharmacology**, v. 217, n. 3, p. 419–32. 2011.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167. 1985.

POHLAND, R. C. et al. Placental transfer and fetal distribution of fluoxetine in the rat. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 98, n. 2, p. 198–205. 1989.

POPA, D. et al. Lasting syndrome of depression produced by reduction in serotonin uptake during postnatal development: evidence from sleep, stress, and behavior. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 14, p. 3546–54. 2008.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3–33. 2003.

RAMOS, A. et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85, n. 1, p. 57–69. 1997.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends in pharmacological**

sciences, v. 29, n. 10, p. 493–8. 2008.

RAMOS, A.; MORMÈDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 1, p. 33–57. 1997.

REIMER, A. E. et al. Rats with differential self-grooming expression in the elevated plus-maze do not differ in anxiety-related behaviors. **Behavioural Brain Research**, v. 292, p. 370–380. 2015.

RIBAS, V. R. et al. Neonatal administration of fluoxetine did not alter the anxiety indicators, but decreased the locomotor activity in adult rats in the elevated plus-maze. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 66, n. 4, p. 844–847. 2008.

RICE, D.; BARONE, S. J. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect**, v. 3, n. 108. 2000.

RODGERS, R. J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 3, p. 289–304. 1997.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 4, p. 729–736. 1993.

ROOZENDAAL, B. et al. Basolateral amygdala-nucleus accumbens interactions in mediating glucocorticoid enhancement of memory consolidation. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 7, p. 2518–25. 2001.

RUDY, J. W. Contextual conditioning and auditory cue conditioning dissociate during development. **Behavioral Neuroscience**, v. 107(5), p.887-891. 1993.

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 803–34. 2003.

SAXE, M. D. et al. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 46, p. 17501–6. 2006.

SCIMONELLI, T.; MARUCCO, M.; CELIS, M. . Age-Related Changes in Grooming Behavior and Motor Activity in Female Rats. **Physiology & Behavior**, v. 66, n. 3, p. 481–484. 1999.

SHOJI, H. et al. Contextual and cued fear conditioning test using a video analyzing system in mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 85. 2014.

SMITH, K. S. et al. Ventral pallidum roles in reward and motivation. **Behavioural Brain Research**, v. 196, n. 2, p. 155–67. 2009.

SMITH, K. S. et al. Benzodiazepine-induced anxiolysis and reduction of conditioned fear are mediated by distinct GABAA receptor subtypes in mice. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 2, p. 250–8. 2012.

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiological reviews**, v. 72, n. 3, p. 825–52. 1992.

- STEEL, Z. et al. The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980-2013. **International journal of epidemiology**, v. 43, n. 2, p. 476–93. 2014.
- TANAKA, K. et al. [The effect of the age factor on open-field behavior in rats]. **Jikken dobutsu. Experimental animals**, v. 33, n. 3, p. 297–305. 1984.
- TOFFOLI, L. V et al. Maternal exposure to fluoxetine during gestation and lactation affects the DNA methylation programming of rat's offspring: modulation by folic acid supplementation. **Behavioural Brain Research**, v. 265, p. 142–7. 2014.
- TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317–331. 2015.
- TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 44, n. 2, p. 463–469. 1993.
- TYE, K. M. et al. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 358–362. 2011.
- VAN ERP, A. M. M. et al. Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: Handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. **Behavioural Brain Research**, v. 65, n. 1, p. 47–55. 1994.
- VAN HAAREN, F.; VAN HEST, A.; HEINSBROEK, R. P. W. Behavioral differences between male and female rats: Effects of gonadal hormones on learning and memory. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 1, p. 23–33. 1990.
- VELOSO, A. W. N. et al. Modulation of Grooming Behavior in Rats by Different Test Situations. **Psychology & Neuroscience**. v. 9(1), 91-104. 2016.
- WALKER, D. L.; TOUFEXIS, D. J.; DAVIS, M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1, p. 199–216. 2003.
- WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482–504. 1976.
- WEISS, S. . et al. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 265–271. 1998.
- WHITAKER-AZMITIA, P. M. et al. Serotonin as a developmental signal. **Behavioural Brain Research**, v. 73, n. 1-2, p. 19–29. 1996.
- ZHANG, W.-N. et al. Temporary inhibition of dorsal or ventral hippocampus by muscimol: Distinct effects on measures of innate anxiety on the elevated plus maze, but similar disruption of contextual fear conditioning. **Behavioural Brain Research**, v. 262, p. 47–56. 2014.
- ZOEGA, H. et al. Use of SSRI and SNRI Antidepressants during Pregnancy: A Population-Based Study from Denmark, Iceland, Norway and Sweden. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1-10. 2015.

ANEXO A – Dados complementares da expressão de c-Fos nos neurônios do NLET

As metodologias utilizadas para os cortes e análises estão descritas em FRANCIS-OLIVEIRA et al. (2013). Na Figura 15 são apresentados os números de neurônios c-Fos positivos em cada um dos grupos. Para a análise estatística foi realizada, inicialmente, análise exploratória para avaliar a homogeneidade e normalidade dos dados. Como apresentaram distribuição normal e homogênea, os dados foram submetidos a uma análise de variância (*three-way* ANOVA) com os fatores sexo, tratamento e estresse, seguido do teste *post-hoc* Fisher-LSD. Na tabela 10 são apresentadas microfotografias representativas das secções do núcleo leito da estria terminal (NLET).

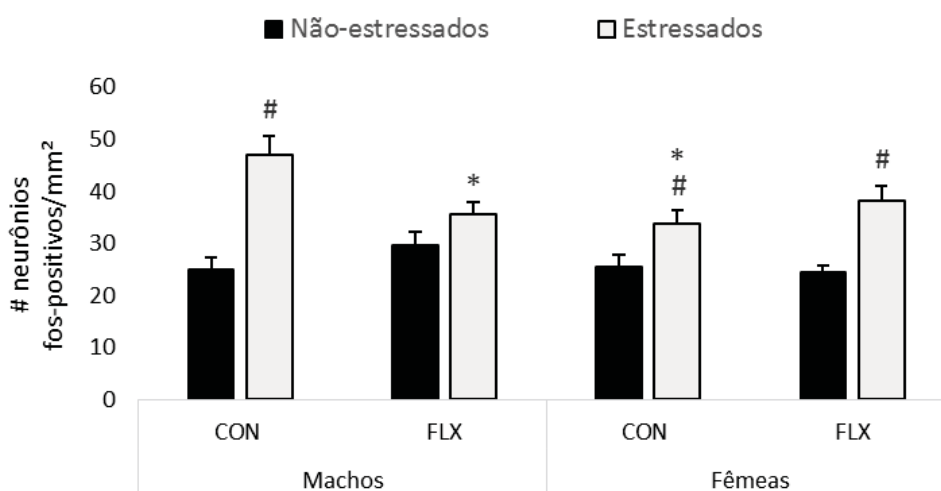
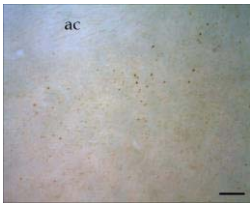


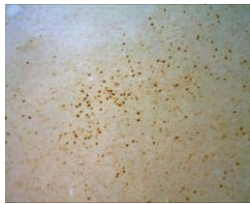


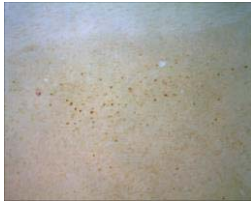



Figura 15 – Número de neurônios c-Fos positivos/mm² nos grupos de ratos DPN35 não-estressados e estressados na região do núcleo leito da estria terminal. Os dados estão apresentados como média ± EPM. CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina; #, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo não-estressado; *, $p < 0,05$ quando comparados com machos CON não-estressado.

Tabela 10 – Fotomicrografia representando neurônios cFos-positivos na região do núcleo leito da estria terminal.

	Machos		Fêmeas	
	NO	ST	NO	ST
CON				
FLX				

CON: grupo controle; FLX: grupo fluoxetina; NO: animais não-estressados; ST: animais estressados; ac, comissura anterior.