



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDREY SALINET DA SILVA

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE
GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO NA MODULAÇÃO DA
ANSIEDADE EM RATOS**

ANDREY SALINET DA SILVA

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE
GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO NA MODULAÇÃO DA
ANSIEDADE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina - PR), para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gislaïne Garcia Pelosi Gomes.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586e Silva, Andrey Salinet da.
Efeito da exposição à fluoxetina durante gestação e amamentação na modulação da ansiedade em ratos / Andrey Salinet da Silva. – Londrina, 2013.
39 f. : il.

Orientador: Gislaine Garcia Pelosi Gomes.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) □ Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Fluoxetina– Teses. 2. Comportamento – Efeito das drogas – Teses. 3. Ansiedade – Teses. 4. Lactação – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Gomes, Gislaine Garcia Pelosi.. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612:615.214

ANDREY SALINET DA SILVA

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE GESTAÇÃO E
AMAMENTAÇÃO NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina - PR), para obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gislaíne Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Célio Roberto Estanislau
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Londrina, 06 de Março de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por permitir e sustentar minha vida e a vida dos meus familiares em todos os momentos ou situações, pois “(...) Até aqui nos ajudou o Senhor.” (I SAMUEL 7:12).

Agradeço à toda equipe do laboratório de neurofarmacologia e farmacologia cardiovascular e à equipe do Laboratório de Análises Farmacológicas e Toxicológicas da UEL pela contribuição ou participação para o desenvolvimento, efetivação e concretização do projeto cujos resultados apresentamos aqui, mas os frutos colheremos por toda nossa vida.

Agradeço aos funcionários da UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, pois participaram indispensavelmente dos bastidores de toda equipe.

Aos professores do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas tanto das universidades nucleadoras quanto das associadas pela contribuição na minha formação durante o mestrado e por me ajudarem a ser uma pessoa e um profissional mais qualificado.

Agradeço aos meus amigos, que me ensinaram, participaram e me deram suporte no mais amplo sentido durante todo o tempo do antes, durante e depois do mestrado. Um grande abraço!

Agradeço aos professores e colegas da UNIVERSIDADE NORTE DO PARANÁ (UNOPAR), de Londrina, e da UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP), de Ribeirão Preto, pela participação indelével e de suma importância na realização desse projeto.

Agradeço aos colegas da UEL pela vivência, aprendizado e companheirismo durante as disciplinas, congressos e pelos vários momentos de alegria que tivemos.

Agradeço à Fundação Araucária e à CAPES pelo suporte financeiro para realização desse projeto e demais atividades essenciais à minha formação durante o mestrado.

As abelhas voam de flor em flor roubando-lhes parte dos delicados sucos que contêm, que não são o próprio mel; este as abelhas formam depois e é inteiramente seu. Da mesma forma devem os discípulos recolher idéias e conhecimentos dos demais, não para reproduzi-los como os recebem, mas para transformá-los e fundi-los em obra própria. Guarde em boa hora o que recebeu emprestado, mas revele ao mesmo tempo o que fez por sua parte. (Montaigne 1533 – 1592)

SILVA, Andrey Salinet da. **Efeito da exposição à fluoxetina durante gestação e amamentação na modulação da ansiedade em ratos**. 2013. 39f. Dissertação (Mestrado pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina – PR.

RESUMO

A caracterização da ansiedade se apresenta como uma resposta comportamental de um indivíduo diante de um conflito de adaptação em um ambiente novo ou sua tentativa de defesa em um ambiente hostil. O sistema límbico se destaca na percepção, no processamento e na resposta comportamental do indivíduo. O tratamento farmacológico empregado para remissão dos sintomas ocorre pela utilização de fármacos inibidores da recaptura de serotonina, entre eles, a fluoxetina. No entanto, a exposição de animais à fluoxetina durante fases críticas do neurodesenvolvimento (gestação e amamentação) pode produzir efeitos duradouros, os quais podem se manifestar em diferentes idades (adolescência ou maturidade) devido a alterações nos mecanismos epigenéticos. No presente trabalho, investigamos se a exposição à fluoxetina durante gestação e amamentação poderia alterar o comportamento dos filhotes em diferentes idades. A exposição à fluoxetina durante a gestação e amamentação não alterou os parâmetros comportamentais nos animais submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado, entretanto, um efeito ansiogênico foi observado no teste da interação social, sugerindo uma interferência do tratamento na modulação da ansiedade durante situações específicas na idade adulta. Por outro lado, não evidenciamos efeito da exposição à fluoxetina nos níveis de corticosterona plasmática após o estresse de contenção repetido, assim como na análise do perfil global de metilação de DNA da Substância Cinzenta Periaquedutal. Diante disso, nossos resultados demonstram que a exposição à fluoxetina durante as fases iniciais do neurodesenvolvimento pode interferir na modulação da ansiedade dos descendentes na idade adulta.

Palavras-chave: Ansiedade. Fluoxetina. Neurodesenvolvimento. Comportamento. Corticosterona.

SILVA, Andrey Salinet da. **Efeito da exposição à fluoxetina durante gestação e amamentação na modulação da ansiedade em ratos**. 2013. 39f. Dissertação (Mestrado pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina – PR.

ABSTRACT

The characterization of anxiety presents as a behavioral response of an individual in a conflict adaptation in a new environment or attempted defense in a hostile environment. The limbic system stands in the perception, processing and behavioral response of the individual. Pharmacological treatment employed to remission occurs by the use of inhibitors of serotonin reuptake, including, fluoxetine. However, exposure of animals to fluoxetine during critical stages of brain development (gestation and lactation) may produce lasting effects, which can manifest itself in different age (adolescence or maturity) due to changes in epigenetic mechanisms. In this study, we investigated if maternal exposure to fluoxetine during pregnancy and lactation would change the behavior of pups in different ages. Exposure to fluoxetine did not change behavioral parameters of animals on elevated plus maze test, however, an anxiogenic effect was observed in social interaction suggesting that fluoxetine exposure modify anxiety modulation during specific situations. On the other hand, no changes were observed on serum levels of corticosterone after restraint stress session and global DNA methylation profile in the periaqueductal gray area. In conclusion, our results suggest that fluoxetine exposure during pregnancy and lactation interfere in anxiety modulation in adult descendants.

Keywords: Anxiety. Fluoxetine. Neurodevelopment. Behavior. Corticosterone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Curva de peso materno	24
Figura 2 – Curva de peso das ninhadas	25
Figura 3 – Desempenho de machos e fêmeas no LCE	26
Figura 4 – Tempo de interação social	27
Figura 5 – Níveis plasmáticos de corticosterona	28
Figura 6 – Perfil de metilação global de DNA na SCP de machos	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	serotonina, 5 – hidroxitriptamina.
cm	centímetro.
CON	grupo controle.
com	contagem por minuto.
dL	decilitro.
DNA	ácido desoxirribonucleico.
DPN	dia pós-natal.
EPM	erro padrão da média.
FLX	fluoxetina, grupo fluoxetina
g	gramas.
GD	dia gestacional.
H	hora.
HPA	hipotálamo – hipófise – adrenal.
IS	interação social.
ISRS	inibidores seletivos de recaptação de serotonina.
LCE	labirinto em cruz elevado.
µL	microlitro.
min.	minuto(s).
nm	nanômetro.
s	segundos.
SCP	substância cinzenta periaquedutal.
SNC	sistema nervoso central.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.2	Objetivos.....	14
2	METODOLOGIA	15
2.1	Acasalamento.....	15
2.2	Tratamento.....	15
2.3	Teste de labirinto em cruz elevado (LCE).....	16
2.4	Teste de interação social (IS).....	17
2.5	Teste de estresse de restrição repetido.....	18
2.6	Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona.....	19
2.7	Análise do perfil de metilação global do DNA na SCP.....	20
2.8	Análise estatística.....	22
3	RESULTADOS	24
3.1	Avaliação toxicológica geral.....	24
3.2	Efeito comportamental dos animais submetidos ao teste do LCE.....	25
3.3	Efeito na interação social da prole.....	27
3.4	Efeito nos níveis plasmáticos de corticosterona após o estresse repetido.....	27
3.5	Efeito no perfil de metilação global do DNA da SCP.....	29
4	DISCUSSÃO	30
5	CONCLUSÕES	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

A ansiedade se caracteriza como uma emoção básica presente desde a infância e adolescência considerada essencial à sobrevivência (PINE et al., 2009).

O medo e a ansiedade apresentam claro valor adaptativo e suas raízes estão nas reações comportamentais e de defesa dos animais diante de diferentes estímulos ameaçadores ou situações de perigo sendo importante como estratégia de sobrevivência (BLANCHARD et al., 1993; HALLER, 2001; MINEKA; OHMAN, 2002; ROSEN; SCHULKIN, 1998). Tais estados de ansiedade são controlados por um sistema cerebral altamente complexo que, quando alterado por fatores genéticos, ambientais ou durante o desenvolvimento, podem desencadear as desordens de ansiedade (HEIM; NEMEROFF, 1999; HOLMES, 2001).

Os transtornos de ansiedade têm uma frequência elevada entre pacientes ambulatoriais (75%), principalmente, a fobia específica e o transtorno de ansiedade generalizada, as quais constituem os principais problemas de saúde mental da população brasileira, com prevalências globais variando de 8% a 18% (MUNARETTI; TERRA, 2007).

Dados provenientes de ambulatórios psiquiátricos sugerem uma alta frequência de comorbidade de sintomas característicos de depressão e ansiedade (NARDI, 2001). Quando a depressão se instala durante a gestação, ou quando há a ocorrência da síndrome chamada de depressão pós-parto, os cuidados e a terapia medicamentosa devem ser iniciados imediatamente, visto que a paciente pode apresentar um quadro grave de anedonia e lentidão, os quais, por sua vez, teriam implicações nos cuidados maternos durante o desenvolvimento pré e pós - termo.

Dentre os fármacos usados para o tratamento de distúrbios afetivos e transtornos de ansiedade, a fluoxetina é um dos mais prescritos no mundo todo, sendo a droga de escolha para uso durante a gravidez devido a sua relativa seletividade de ação, eficácia e reduzidos efeitos indesejáveis em relação aos demais antidepressivos (LOBATO et al., 2001; MARCUS, 2001; NONACS; COHEN, 2003). Além disso, esse medicamento não apresenta efeito teratogênico relevante (NONACS; COHEN, 2003; STOKES; HOLTZ, 1997).

A fluoxetina se apresenta como um antidepressivo da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e seu pico de concentração plasmática

é alcançado entre 6 e 8 horas após início do tratamento. A administração aguda de fluoxetina aumenta a disponibilidade de serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) na fenda sináptica, mas são os efeitos secundários decorrentes da administração prolongada, os responsáveis pelo efeito antidepressivo. Entre estes efeitos secundários, estão alterações na densidade e função dos receptores serotoninérgicos, na transcrição gênica e na translação (KRISHNAN; NESTLER, 2008).

O sistema serotoninérgico se configura como essencial e preponderante na regulação e manutenção de estratégias afetivas dos indivíduos para enfrentamento ou vivência de situações dos mais variados níveis de complexidade durante o curso de sua vida. A 5-HT apresenta papel indispensável no crescimento neuronal, na formação de conexões entre as projeções colaterais de neurônios serotoninérgicos, além de estimular a diferenciação celular nos tecidos alvos ou ainda, estimular a liberação de fatores tróficos por astrócitos, tal como a proteína cálcio-dependente S100b, o qual favorece o crescimento de neurônios serotoninérgicos. Estudos indicam que a alteração nos níveis de serotonina em roedores durante estágios de neurodesenvolvimento pré-natal podem alterar a formação e o desenvolvimento de neurônios no sistema serotoninérgico (WHITAKER - AZMITIA, 1996).

Embora se saiba que a fluoxetina e seu metabólito ativo, a norfluoxetina, atravessem a barreira hematoplacentária de humanos e de animais experimentais (HEIKKINEN et al., 2003; HENDRIK et al., 2001; POHLAND et al., 1989) e são excretados no leite (HENDRICK et al., 2001), a maioria das mulheres com diagnóstico de depressão não pode deixar de receber o tratamento durante a gestação e lactação. Assim, fetos e neonatos acabam sendo expostos a esse fármaco em fases críticas do desenvolvimento do organismo. Embora a exposição a esse fármaco e a outros ISRS seja considerada segura, se considerada a probabilidade de ocorrência de malformações estruturais, pouco se sabe sobre o impacto que a exposição durante o desenvolvimento poderia ter na função de diferentes sistemas.

Estudos mostram que a administração de fluoxetina a ratos neonatos (2 a 3 primeiras semanas de vida) induz ansiedade que persiste até a fase adulta (ANSORGE et al., 2004; HANSEN et al., 1997; LISBOA, 2007; POPA et al., 2008). Entretanto, pouco se conhece a respeito da influência que a exposição à fluoxetina e

a outros ISRS durante a gestação e a amamentação poderia ter na função encefálica de ratos e humanos e, conseqüentemente, no surgimento na idade adulta de transtornos de ansiedade. Alguns estudos indicam a influência da serotonina sobre a atividade trófica para a migração e sinaptogênese dos neurônios monoaminérgicos (HALBREICH; KARKUN, 2006; LOBATO et al., 2011).

O teste do labirinto em cruz elevado (FILE, 1992) e da interação social (FILE; HYDE, 1978) apresentam-se como modelos animais amplamente utilizados como indicativos para o estudo de ansiedade. O LCE é um teste baseado no comportamento natural dos roedores de evitarem locais abertos e elevados (FILE, 1992; GRAEFF; ZANGROSSI JR., 2003). Quando submetidos ao teste, os animais experimentam uma situação de conflito produzida por motivações opostas: comportamento exploratório inato versus ambiente novo e espaço aberto. O teste de interação social fundamenta-se na resposta comportamental do animal macho adulto na exploração de um parceiro desconhecido (FILE; HYDE, 1978). Durante o teste, os animais são colocados no campo aberto com parceiro desconhecido e analisa-se a interação entre ambos.

A modulação da ansiedade envolve sistemas neurais distintos, ativados com maior ou menor intensidade, dependendo da distância do animal ao estímulo desencadeante (BLANCHARD et al., 1993; GRAEFF et al., 1996). Dentre as estruturas cerebrais envolvidas no medo e na ansiedade, o hipotálamo medial, a amígdala e a substância cinzenta periaquedutal (SCP) dorsal, que compõem o chamado sistema cerebral de luta/fuga ou sistema cerebral aversivo, configuram-se como circuito fundamental e indispensável na resposta aos estímulos estressores ou ansiogênicos e, além disso, a participação de estruturas centrais, como o septo e o hipocampo, compõem o sistema de inibição comportamental. O sistema cerebral aversivo responde a estímulos incondicionados de medo com comportamento de fuga ou luta acompanhado de respostas neurovegetativas como aumento de pressão arterial, da frequência cardíaca e sudorese. A inibição comportamental pode ser consequência da ativação de mecanismos serotoninérgicos, provenientes do núcleo mediano da rafe, enquanto que o alerta e a atenção exacerbados (hipervigilância) podem resultar da estimulação de vias noradrenérgicas, provenientes do *locus coeruleus*. A amígdala parece integrar esses dois sistemas (BRANDÃO et al., 1994a, 1999b, 2003c)

Durante uma situação de estresse, regiões encefálicas específicas são ativadas provocando respostas comportamentais e fisiológicas com o intuito de controlar tal agente estressor e manter a homeostase. Tanto o estresse agudo quanto o repetido interferem na circuitaria neural que modula o medo e a ansiedade o que pode gerar o estado de ansiedade (McEWEN et al., 2012).

A percepção de que eventos ocorridos durante o desenvolvimento do organismo, como a exposição materna a fármacos, podem influenciar tardiamente a saúde do indivíduo levou ao desenvolvimento de uma área de pesquisa em ascensão denominada “Origem Desenvolvimentista da Saúde e Doença” ou DOHaD (“Developmental Origins of Health and Disease”). O paradigma da DOHaD está baseado na influência do ambiente nas fases iniciais do desenvolvimento fetal e pós-natal sobre o desenvolvimento morfológico e funcional de órgãos e sua associação com a origem de doenças tardias (GLUCKMAN; HANSON, 2004; SINCLAIR et al., 2007).

A regulação da expressão gênica a longo-prazo, via mecanismos epigenéticos, tem sido apontada como um dos mecanismos moleculares que medeiam modificações permanentes na fisiologia do organismo e contribui para a patogênese de doenças em fases posteriores do desenvolvimento, incluindo doenças psiquiátricas (TSANKOVA et al., 2007). Considera-se epigenético modificações herdáveis que controlam a expressão gênica sem afetar a sequência da molécula de DNA (JABLONKA; LAMB, 2002)

Entre as principais modificações epigenéticas conhecidas estão a metilação do DNA e as modificações pós-transcricionais de histonas (JENUWEIN; ALLIS, 2001; JONES; TAKAI, 2001). Muitos estudos têm focado a elucidação dos processos que envolvem a metilação do DNA devido ao seu importante papel no controle da expressão gênica nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário e na diferenciação celular (fenômeno denominado reprogramação epigenética) e seu papel na etiologia de doenças. (JENUWEIN; ALLIS, 2001; JONES; TAKAI, 2001).

Dados recentes têm revelado uma vulnerabilidade das marcações epigenéticas a fatores externos, principalmente durante a fase de desenvolvimento embrião-fetal. Estudos demonstraram que a exposição de camundongos ao metilmercúrio entre o 7º dia gestacional e o 7º dia pós - natal induziu hipermetilação do DNA e deacetilação de histonas, com conseqüente supressão do gene para o

fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no hipocampo, o que poderia estar associado à predisposição tardia à depressão observada nesses animais. Além disso, houve reversibilidade dos efeitos comportamentais e epigenéticos desses animais após tratamento com fluoxetina por 21 dias a partir das 9 semanas de idade (ONISHCHENKO et al., 2008) sugerindo que as mudanças epigenéticas que ocorrem após a exposição a um xenobiótico durante o desenvolvimento não são permanentes e podem ser moduladas em fases posteriores do desenvolvimento e que o mecanismo de ação da fluoxetina poderia envolver um componente epigenético.

Diante do exposto acima, o presente trabalho avaliou se a exposição à fluoxetina durante o período de gestação e amamentação pode interferir na modulação da ansiedade e da resposta ao estresse na prole em diferentes idades (fase de adolescência ou adulta) do neurodesenvolvimento.

1.2 Objetivos

O presente trabalho objetivou avaliar em ratos expostos à fluoxetina durante a gestação e amamentação:

1.2.1. O comportamento de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado de machos e fêmeas de diferentes idades;

1.2.2. O comportamento de ansiedade no teste de interação social em machos adultos;

1.2.3. Os níveis plasmáticos de corticosterona basais e após a exposição repetida ao estresse de contenção em machos e fêmeas de diferentes idades;

1.2.4. O perfil de metilação global do DNA na substância cinzenta periaquedutal de machos de diferentes idades.

2 METODOLOGIA

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), protocolo de autorização nº 17142/2011.

2.1 Acasalamento

Machos e fêmeas Wistar foram retiradas do biotério central do Centro de Ciências Biológicas da UEL com entre 75 e 90 dias de vida. Cada caixa de polipropileno (40 x 33 x 17 cm) recebeu até 5 machos ou até 5 fêmeas, nunca com os 2 gêneros numa mesma caixa, para período de adaptação de cinco dias no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL, com temperatura controlada, em torno de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, com luzes acesas às 6:00 h, e água e ração à vontade.

Ao final do período vespertino dos dias subsequentes ao período de adaptação, cada caixa, com duas ou três fêmeas, recebeu um macho, o qual foi retirado no começo da manhã seguinte, durante os dias do acasalamento.

O acasalamento foi executado no período de sete dias e os esfregaços vaginais diários entre 7:00 h e 8:30 h. A fêmea foi considerada prenhe quando havia leitura de lâmina, em microscopia óptica, com predomínio de células queratinizadas (fase estro) (GOLDMAN et al., 2007), juntamente com a presença de espermatozoides. Nesse dia, a fêmea prenhe foi individualizada e direcionada para o grupo que recebia água (GRUPO CON) ou para o grupo que recebia fluoxetina (GRUPO FLX).

2.2 Tratamento

Após a constatação de prenhez, cada fêmea prenhe foi pesada e individualizada em caixa de polipropileno (40 x 33 x 17 cm) sendo esse o dia gestacional zero (DG 0). O tratamento por gavagem (água ou fluoxetina, na dose de 5 mg/kg/dia) (KNAEPEN et al., 2013; MOHAMMAD-HOSSEIN DOOSTI et al., 2012) durante o período de prenhez e lactação ocorria entre 12:30 h e 14:30 h.

A solução com fluoxetina foi preparada a partir de um frasco de Daforin® (20 mg/ml, solução oral, EMS, Brasil) e água poucos minutos antes do tratamento.

Durante o período gestacional (21 dias, aproximadamente), a fêmea foi pesada diariamente, para posterior avaliação de possível toxicidade provocada pelo tratamento com a fluoxetina. Após o nascimento (dia pós-natal zero ou DPN 0), os filhotes foram contados, segundo o gênero, e o peso da ninhada, registrado. Esse procedimento foi feito no menor tempo possível, estando a mãe sempre próxima dos filhotes para evitar o estresse provocado pela separação da ninhada. (CLAESSENS et al., 2011). Ninhadas com número de filhotes inferior a 8 foram sacrificadas.

No DPN 4 de cada ninhada houve redução aleatória para 5 filhotes machos e 5 filhotes fêmeas, sempre que possível, dando prioridade de permanência para o gênero em desvantagem numérica, quando a ninhada apresentava diferença na relação macho:fêmea. Cada ninhada foi pesada antes e depois da redução.

Todas as ninhadas foram novamente pesados nos respectivos DPN 7, DPN 14 e DPN 21 para posterior avaliação de possível toxicidade provocada pelo tratamento. No dia do desmame (DPN 21) os filhotes foram separados em caixas (máximo de 5 animais), segundo o gênero e o teste experimental, e alojados no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL para posterior realização dos procedimentos experimentais. Cada animal passou por um único teste.

2.3 Teste de labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste foi conduzido no período entre 8:00 h e 12:00 h em uma sala com iluminação (60 W), colocada a aproximadamente 1,50 metro de altura acima do aparelho, temperatura de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e exaustor ligado para retirar possíveis odores e produzir ruído de fundo para o animal. Para o teste foi usado um aparelho de madeira, elevado 50 cm do chão, com quatro braços de iguais dimensões (50 x 10 cm) sendo dois braços fechados por paredes de 40 cm de altura arranjados perpendicularmente a dois braços abertos opostos. Para prevenir quedas, os braços abertos foram cercados por uma margem de madeira de 1 cm de altura. Cada animal foi colocado no centro do labirinto (espaço morto) de medidas 10 x 10 cm, com o focinho virado para o braço aberto oposto ao experimentador. Cada animal passou uma única vez pelo teste.

O comportamento espontâneo aparente do animal foi gravado com auxílio de uma câmera instalada a 1 metro de distância, aproximadamente, do aparelho por 5 min. A partir das imagens visualizadas pelo experimentador com auxílio de um televisor instalado numa sala adjacente a sala em que se encontrava o aparelho, foram analisados o número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos braços fechados. No intervalo entre cada teste, o aparelho foi limpo com algodão levemente embebido com álcool 5% v/v.

A exploração dos braços abertos do labirinto, analisada em função do número de entradas e tempo despendido nestes braços, ambos em relação ao total do respectivo parâmetro, é utilizada para avaliar a ansiedade animal neste modelo. Da mesma forma, a frequência de exploração dos braços fechados do LCE tem sido usada como índice que reflete a atividade exploratória geral dos animais (FILE, 1992).

Nos DPN 35 e 75, animais de ambos os gêneros e não irmãos foram submetidos ao teste do LCE. Nas fêmeas com a idade de 75 dias houve padronização da fase do ciclo estral (fase estro) previamente ao teste do LCE, pois nessa idade, o ciclo estral se manifesta com frequência de 4 ou 5 dias (GOLDMAN et al., 2007) e a fase estro, cujo nível de progesterona se mostra máximo, caracteriza-se como o momento hormonal do ciclo em que as fêmeas apresentam a menor responsividade ao agente estressor braço aberto do labirinto, com maior % de entradas no braço aberto e maior % de tempo nos braços abertos, já que esse hormônio apresenta efeito ansiolítico, o que permitiu avaliar possíveis sinais de ansiedade-símile provocados devido à exposição a fluoxetina (MORA et al., 1996).

O objetivo do experimentador com a padronização da fase do ciclo estral foi minimizar possíveis interferências das oscilações hormonais no desempenho da fêmea durante o teste (IMHOF et al., 1993).

2.4 Teste de interação social (IS)

O teste foi conduzido no período entre 8:00 h e 12:00 h em uma sala com iluminação (60 W, luz branca), temperatura de 25 °C ± 1 °C e exaustor ligado para retirar possíveis odores e produzir ruído de fundo para o animal e uma arena de

campo aberto rente ao chão. Essa intensidade de luz foi usada para mimetizar o ambiente do biotério onde os animais destinados a esse teste foram alojados.

No DPN 75, ratos machos foram colocados em uma arena circular de campo aberto cercado por lâmina de plástico opaco de 72 cm de diâmetro para o registro e coleta de dados a partir do tempo de interação social entre pares de animais não irmãos sob o mesmo tratamento.

Os animais foram colocados aos pares em caixas de polipropileno (40 x 33 x 17 cm), 10 dias antes do teste e, por 7 dias, interagiram apenas entre si, na caixa em que estavam. No 8º e 9º dias de pareamento, o par foi colocado na arena do campo aberto durante 8 minutos para habituação no ambiente e devolvido à respectiva caixa. No décimo dia, um animal da caixa foi pareado com outro animal de caixa diferente, ambos do mesmo grupo de tratamento. Durante 5 min. foram contados quantas vezes cada animal farejou, escalou, arrastou-se, seguiu ou andou ao redor e explorou a genitália do outro e esse comportamento foi considerado interação social entre os animais (FILE; HYDE, 1978). No intervalo entre cada teste, a arena foi limpa com algodão levemente embebido com álcool 5% v/v.

2.5 Teste de estresse de restrição repetido

Com esse protocolo objetivou-se verificar, pela análise dos níveis plasmáticos de corticosterona, se a exposição à fluoxetina poderia alterar a resposta neuroendócrina de ratos ao estímulo estressor por restrição.

O teste do estresse repetido constitui-se pela introdução dos animais no interior de um tubo cônico de metal, deixando-o restrito ao mesmo por 1 hora, com o intuito de produzir um estímulo estressor do tipo psicológico (CHAOULOFF et al., 1999). Esse protocolo foi repetido durante cinco dias consecutivos.

Animais machos ou fêmeas (DPN 28 ou DPN 68) foram individualizados em caixas de polipropileno (30 x 19 x 13 cm). A partir do terceiro dia, o animal foi submetido ao estresse por restrição durante 1 hora, por 5 dias consecutivos. Os animais de cada grupo de tratamento que não passaram pela restrição (controle) permaneceram em suas caixas no biotério do Departamento. Os animais foram imobilizados por uma hora sempre pelo mesmo experimentador no período entre 8:00 h e 12:00 h.

No DPN 35 ou DPN 75, imediatamente após a 5^a. sessão de estresse por restrição, os animais foram guilhotinados para coleta do sangue e posterior dosagem dos níveis de corticosterona. Os animais de ambos os gêneros do grupo CON ou do grupo FLX que não passaram pela restrição foram guilhotinados alternadamente com os animais restringidos, dando preferência primeiramente para machos não restringidos, seguido de fêmeas não restringidas, sempre que possível. O sangue foi coletado através de funis acoplados a tubos de ensaios, ambos previamente heparinizados (Heptar, 5.000 UI/mL, solução injetável, Eurofarma, Brasil). O tubo foi então centrifugado a 3000 rpm e 4 °C, por um período de 15 min. Em seguida, uma alíquota de plasma foi separada (1mL) e congelada a - 8°C, em eppendorf estéril.

As concentrações de corticosterona variam durante o ciclo circadiano dos roedores. Como os níveis de corticosterona se apresentam em concentrações menores no início da fase clara, o horário para coleta das amostras foi estabelecido das 9:00 h às 11:00 h para evidenciar com maior contundência possíveis variações nos níveis do hormônio induzidas pela exposição dos animais à fluoxetina.

2.6 Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona

As dosagens de corticosterona plasmática foram realizadas por radioimunoensaio segundo a técnica descrita por Elias et al. (ELIAS et al., 2004), que utiliza extração do esteróide com etanol. A corticosterona foi extraída das amostras de plasma congelado utilizando etanol (25 µL de plasma + 1 mL de etanol) e depois liofilizadas. Foram então ressuspensas com 2,5 mL de tampão de diluição (Tris-HCl 0,05 M, Sigma®; NaCl 0,1 M, Sigma®; soroalbumina bovina 0,1%, Sigma®; azida sódica 0,1%, Merck®; pH 8,0).

Foram tomados 500 µL das amostras ressuspensas, em duplicata, aos quais foram adicionados 100 µL de anticorpo anti-corticosterona (rabbit anti-rat IgG, Sigma®), na diluição de 1:8, e 100 µL de corticosterona triciada ([1,2-3H(N)] – Corticosterona), com período de incubação de 15 h.

Após a incubação, as amostras foram agitadas com 200 µL de solução de carvão ativado e dextrana (carvão ativado 0,5% - Sigma®; Dextran T70 0,5%, Sigma®) e incubadas por 15 min. a 4 °C, sendo então centrifugadas a 3000 rpm e a 4 °C por 15 min. Após a centrifugação, 600 µL do sobrenadante foram transferidos

para os frascos de cintilação, contendo 5 mL de líquido de cintilação (ScintiSafe Econo 1 SX20-5, Fischer®) e a radiação (cpm) da corticosterona triciada foi determinada em espectrofotômetro de cintilação líquida (contador beta LS 6500 – Beckman®, Beckmann Instruments Inc., Fullerton, CA, USA).

Concomitantemente à determinação da concentração de corticosterona plasmática foram determinadas a concentração total da corticosterona triciada adicionada em cada tubo (Total) e as ligações inespecíficas (Branco). Essas concentrações foram determinadas seguindo o mesmo procedimento descrito para as amostras. Para a determinação das reações inespecíficas foram adicionados 600 µL do tampão de diluição no lugar do plasma, enquanto que para a determinação da concentração total de corticosterona triciada, foram adicionados 600 µL do tampão de diluição no lugar do plasma e, ao invés da utilização da suspensão de carvão ativado, foram adicionados 200 µL do tampão de diluição.

Foi feita uma curva padrão de corticosterona nas concentrações de 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 µL/dL. A curva foi submetida ao mesmo procedimento para a determinação da concentração da corticosterona descrito para as amostras de plasma, e foi plotada usando o logaritmo natural (ln) da concentração de corticosterona no eixo x, e no eixo y o resultado do seguinte cálculo:

$$\frac{\ln [\text{cpm da amostra}]}{\ln [\text{cpm do branco} - \text{cpm da amostra}]}$$

As concentrações da corticosterona presentes nas amostras foram calculadas interpolando-se as leituras obtidas das amostras (valores do eixo y) na curva padrão e expressos em µg/dL de corticosterona plasmática.

2.7 Análise do perfil de metilação global do DNA na substância cinzenta periaquedutal (SCP)

Considerando o envolvimento da metilação do DNA no processo natural de inativação aleatória do cromossomo X e formação do corpúsculo de Baar, apenas nas células somáticas de fêmeas de mamíferos, e o potencial desse fenômeno em gerar um viés metodológico em nossas análises do efeito do tratamento com

fluoxetina sobre a metilação global do DNA na SCP de ratos, optamos pela realização da análise apenas na prole de machos.

Nos DPN 22 e 75, filhotes machos do grupo CON e do grupo FLX foram eutanasiados com auxílio de uma guilhotina. Após a decaptação, o cérebro de cada animal foi retirado para coleta da substância cinzenta periaquedutal (SCP) seguindo como referência o atlas de cérebro de rato de Paxinos e Watson (2009).

O tecido foi imediatamente colocado em gelo seco e, posteriormente, armazenado em freezer - 86°C. O tempo para retirada e armazenagem em gelo seco não ultrapassou os 10 minutos para o tecido coletado.

Posteriormente, foi realizada a extração de DNA. Para tanto, aproximadamente 5 mg de tecido foram macerados em um graal de porcelana com auxílio de pistilo em meio a aproximadamente 10 mL de nitrogênio líquido. A seguir, o material macerado foi recapturado com 1.000 µL de solução de lise (0,32 M Sucrose, 12 mM Tris HCl pH 7.5, 5.0 mM MgCl₂, 1% Triton) e centrifugado a 13.000 rpm por 20 segundos.

Subsequentemente, o sobrenadante foi eliminado com o auxílio de uma pipeta e o pellet transferido para outro tubo contendo 8 µL de Proteinase K (25 mg), 80 µL de Tampão de Proteinase K, 280 µL de Água Milli-Q e 10 µL de SDS 20%.

Após incubação a 55 °C, por 3 h, foi acrescentado 500 µL de fenol na solução já existente, o tubo foi agitado vigorosamente por inversão e centrifugado a 13.000 rpm por 10 min. A parte superior foi transferida para outro eppendorf ao qual foi acrescentado 500 µL da solução clorofórmio - álcool isoamílico (24:1). Este tubo foi então vigorosamente agitado por inversão e centrifugado a 13.000 rpm por 10 min. A parte superior foi transferida para outro eppendorf ao qual foi acrescentado 1000 µL de etanol 100% e 50 µL de acetato de sódio 3 M.

Após mistura por inversão, o tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 min., descartado todo o sobrenadante e acrescentado 1000 µL de etanol 70% (para lavagem). A seguir as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min., o sobrenadante descartado e o eppendorf mantido invertido para secagem.

O pellet foi então dissolvido com 50 µL de Milli-Q e estocado a - 20 °C até o momento da análise.

A análise do perfil global de metilação do DNA foi realizada a partir da dosagem de radical metil (-CH₃) pela metodologia *Imprint Methylated DNA Quantification Kit* (Sigma-Aldrich).

Para estas análises 50 µL de DNA obtidos da SCP de cada animal foram diluídos em Solução de Ligação ao DNA (*DNA Binding Solution*), transferidos para a microplaca e incubados a 37 °C por 60 min. para a ligação. A seguir, foram adicionados 150 µL da Solução de Bloqueio (*Block Solution*) diretamente a cada poço e a placa incubada a 37 °C por 30 min. A solução foi então removida e os poços lavados com 150 µL do Tampão de Lavagem.

Na etapa seguinte, denominada captura do DNA, foram adicionados 50 µL do Anticorpo de Captura (*Capture Antibody*) e a placa incubada à temperatura ambiente (22 a 25 °C) por 60 min. O anticorpo de captura foi então removido e os poços lavados com 150 µL do Tampão de Lavagem. A seguir a cada poço foi adicionado 50 µL do Anticorpo de Detecção (*Detection Antibody*), a placa incubada à temperatura ambiente por 30 min. e lavada com 150 µL do Tampão de Lavagem.

A seguir, iniciou-se a etapa de detecção da metilação, para a qual foram adicionados 100 µL da Solução de Desenvolvimento (*Developing Solution*) em cada poço e a placa incubada a temperatura ambiente no escuro por 1 – 10 min. Foram adicionados 50 µL da Solução de Parada (*Stop Solution*) em cada poço e a absorbância lida a 450 nm em leitor de microplaca. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e os níveis de metilação global de cada animal foram obtidos a partir da porcentagem de metilação relativa ao DNA controle 100% metilado, sendo utilizada a seguinte fórmula:

$$[(A_{450\text{med}} \text{ Amostra} - A_{450\text{med}} \text{ Branco}) / (A_{450\text{med}} \text{ DNA Controle Metilado} - A_{450\text{med}} \text{ Branco})] \times 100$$
, sendo $A_{450\text{med}}$ = Média da Absorbância a 450 nm.

2.8 Análise estatística

Inicialmente, os dados foram submetidos a uma análise estatística exploratória para avaliar a distribuição normal de cada variável e a homogeneidade de variâncias. Dados que apresentaram homogeneidade e normalidade da amostra foram analisados pelo teste paramétrico (teste t de Student, ANOVA para medidas repetidas). No caso das variáveis que não apresentaram esses dois critérios, foram

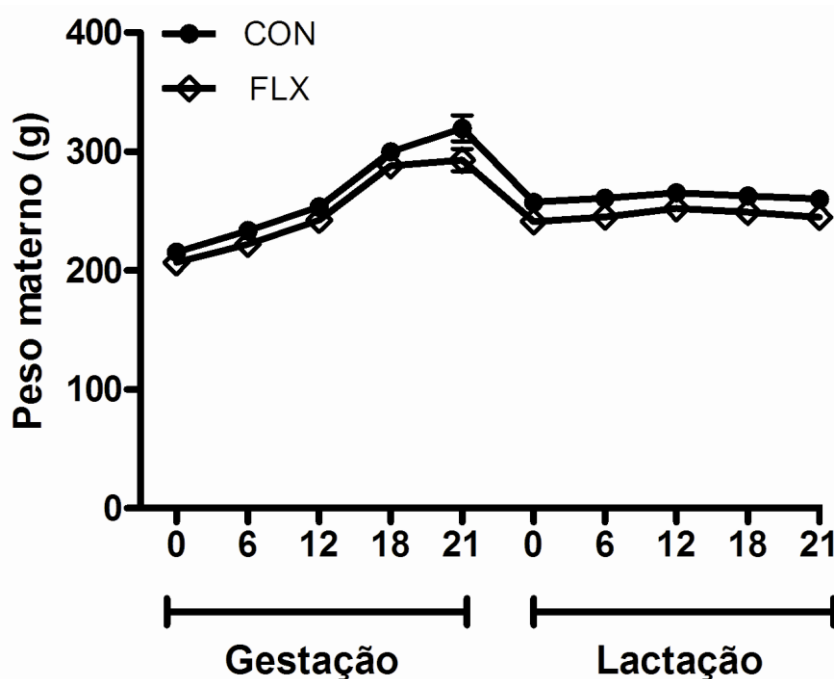
utilizados testes estatísticos não paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney). Em todos os testes, o nível de significância considerado crítico para diferenças significativas entre os grupos foi de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação toxicológica geral

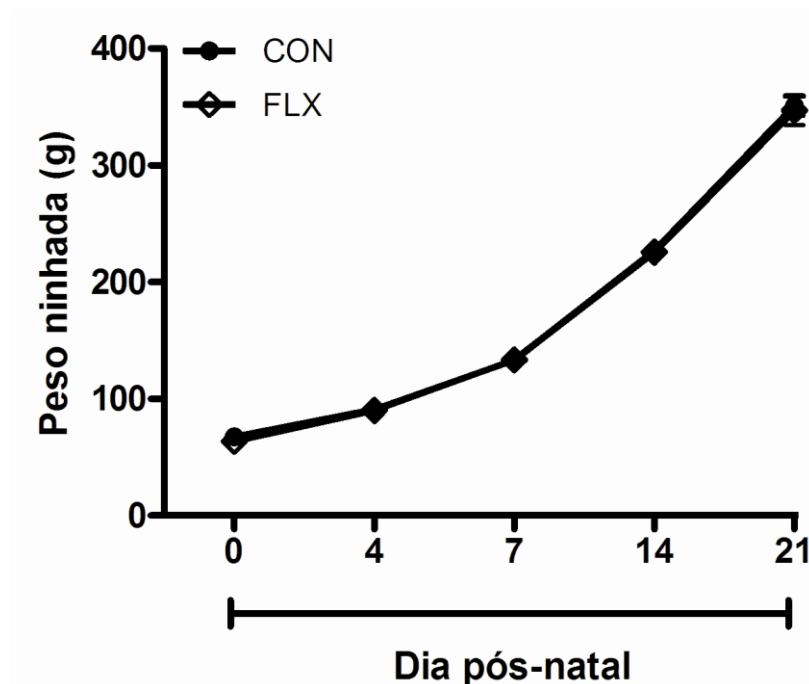
O regime de exposição à fluoxetina adotado não influenciou no ganho de peso materno durante a gestação e amamentação (Figura 1), no ganho de peso da ninhada (Figura 2) e número de filhotes nascidos vivos (dados não apresentados) quando comparado ao grupo controle (ANOVA para medidas repetidas, $p > 0,05$).

Figura 1 - Curva de peso de ratas durante a gestação e amamentação do grupo controle (CON, $n = 21$) e fluoxetina (FLX, $n = 18$). Dados são médias \pm EPM. ANOVA para medidas repetidas, $p > 0,05$.



Fonte: o autor.

Figura 2 - Curva de peso das ninhadas durante o período de amamentação do grupo controle (CON, n = 21) e fluoxetina (FLX, n = 18). Dados são médias \pm EPM. ANOVA para medidas repetidas, $p > 0,05$.



Fonte: o autor.

3.2 Efeito comportamental dos animais submetidos ao teste do LCE

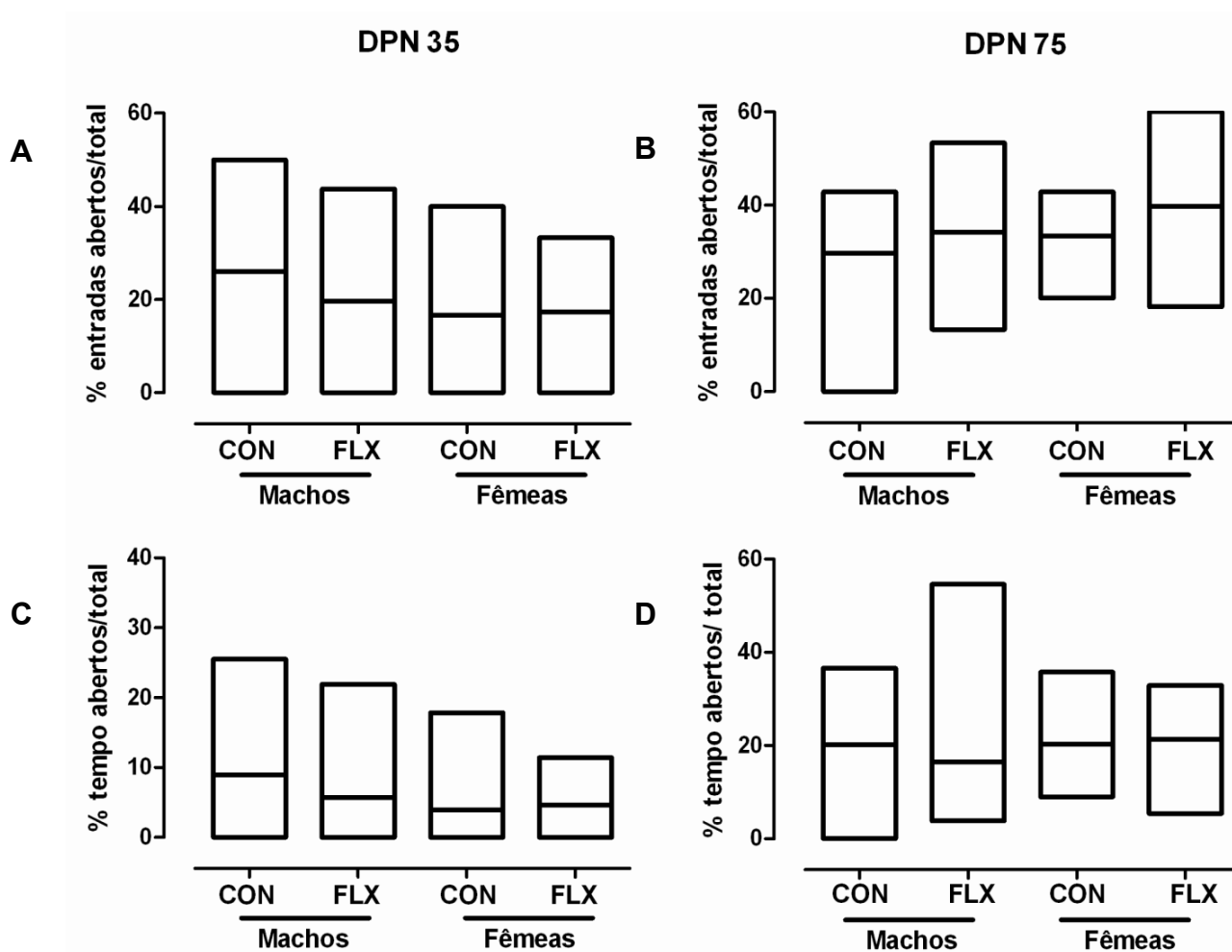
A prole de machos e fêmeas dos grupos CON e FLX foi submetida ao teste do LCE em diferentes idades (35 e 75 dias de nascimento).

DPN35: Em ambos os gêneros, a exposição à fluoxetina na gestação e amamentação não alterou a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE (Kruskal - Wallis, $p = 0,64$; Figura 3A), assim como, no tempo despendido nos mesmos quando comparados ao grupo controle (Kruskal - Wallis, $p = 0,4$; Figura 3C). Além disso, o número de entradas dos animais nos braços fechados não foi diferente em ambos os grupos (Kruskal - Wallis, $p = 0,26$).

DPN75: Em machos e fêmeas adultos, a exposição à fluoxetina durante o período de gestação e amamentação também não modificou a porcentagem de entradas nos

braços abertos do LCE (Kruskal - Wallis, $p = 0,41$; Figura 3B), assim como, o tempo de permanência nos mesmos quando comparados ao grupo CON (Kruskal - Wallis, $p = 0,42$; Figura 3D). Além disso, o número de entradas dos animais nos braços fechados não foi diferente em ambos os grupos (Kruskal - Wallis, $p = 0,23$).

Figura 3 - Efeito da exposição à fluoxetina no comportamento de machos e fêmeas adolescentes (DPN 35: A e C) e adultos (DPN 75: B e D) submetidos ao teste do LCE. CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. Dados são expressos como mediana \pm mínimo/máximo (n = 8 - 12 animais por grupo). Kruskal - Wallis, $p > 0,05$.

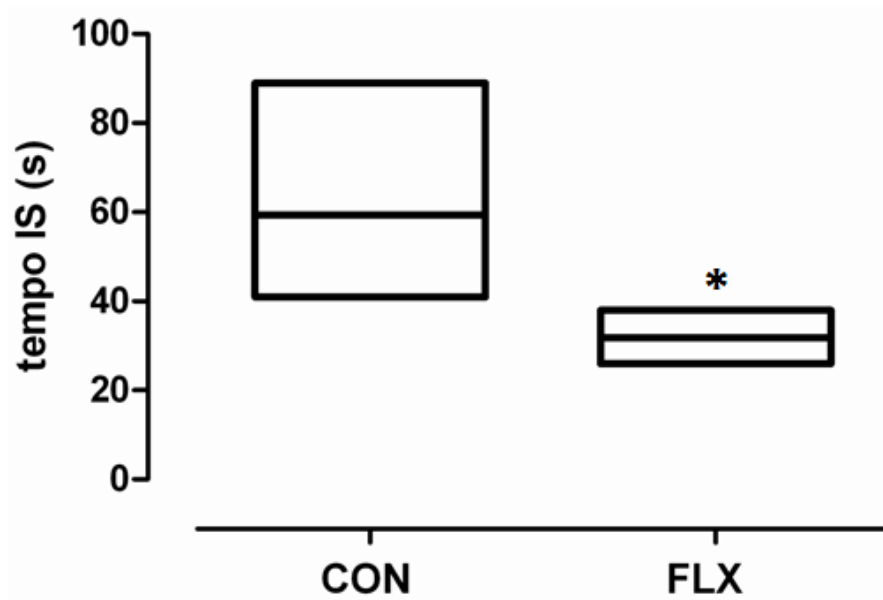


Fonte: o autor.

3.3 Efeito na interação social da prole

O comportamento de interação social foi analisado em animais machos adultos. O tratamento com FLX reduziu significativamente o tempo de interação social entre os animais quando comparado com os animais do grupo controle (Mann - Whitney, $p = 0,006$; Figura 4).

Figura 4 - Efeito da exposição à fluoxetina no tempo de interação social (IS, segundos) de machos adultos. CON, grupo controle ($n = 7$); FLX, grupo fluoxetina ($n = 5$). Dados são expressos como mediana \pm mínimo/máximo. Mann - Whitney, $*p < 0,05$ comparado ao controle.



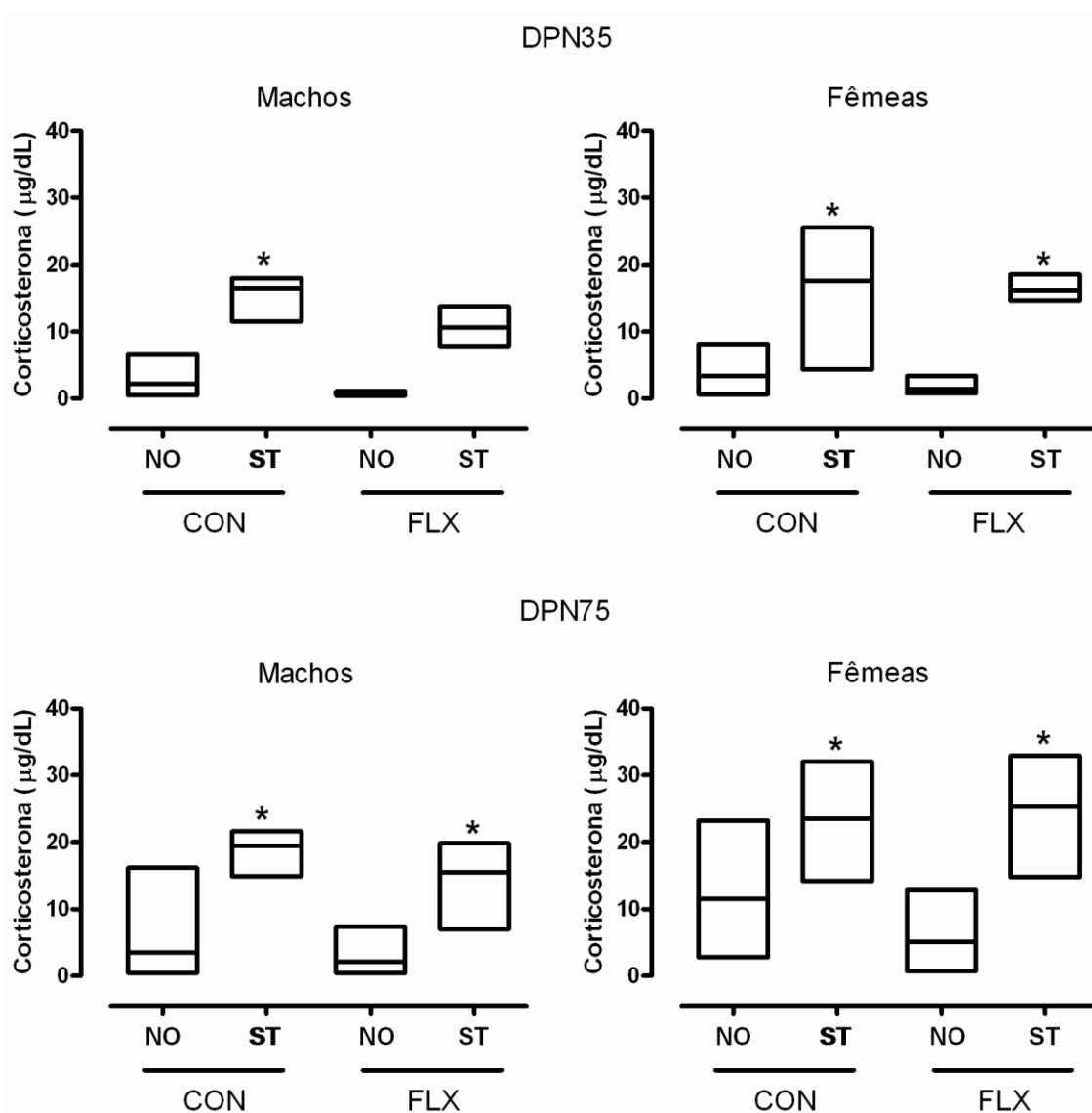
Fonte: o autor.

3.4 Efeito nos níveis plasmáticos de corticosterona após o estresse de restrição repetido

O estresse repetido por restrição foi eficiente em causar aumentos nos níveis plasmáticos de corticosterona nos grupos fluoxetina e controle quando comparados com os animais não submetidos ao estresse (Kruskal - Wallis, $p < 0,0001$; Figura 5), com exceção dos machos DPN 35 do grupo fluoxetina, o que pode atribuir-se à

amostragem reduzida desse grupo experimental. Entretanto não foi observado efeito da exposição à fluoxetina em todos os grupos experimentais.

Figura 5 - Efeito da exposição à fluoxetina nos níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dL}$) de ratos machos e fêmeas, adolescentes (DPN 35) e adultos (DPN 75), em resposta ao estresse repetido por restrição. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. Dados são medianas \pm mínimo/máximo (n = 4 - 12 animais por grupo). Kruskal - Wallis, * $p < 0,05$.

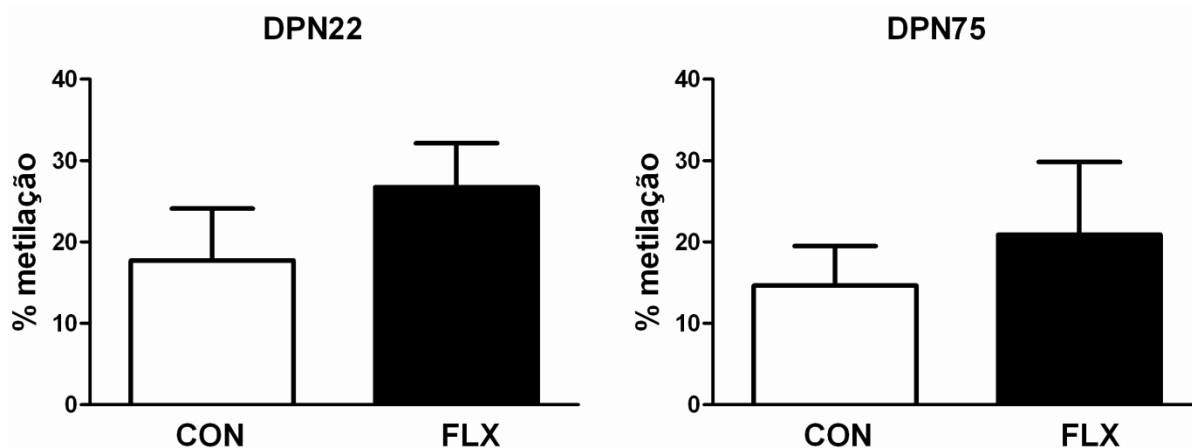


Fonte: o autor.

3.5 Efeito no perfil de metilação global do DNA da SCP

A porcentagem de metilação global de DNA na SCP de animais expostos à fluoxetina durante a gestação e amamentação não foi estatisticamente diferente dos animais controle ($p > 0,05$) nas duas idades analisadas (DPN 22 e DPN 75; Figura 6).

Figura 6 - Efeito da exposição à fluoxetina no perfil de metilação global de DNA na SCP de machos recém-desmamados (DPN 22, $n = 6$) e adultos (DPN 75, $n = 6$). CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. Dados são expressos como média \pm EPM. Teste t de Student, não - pareado, $p > 0,05$.



Fonte: o autor.

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, observamos que a exposição à fluoxetina durante a gestação e amamentação produziu alterações comportamentais na prole em idade adulta.

Dados da literatura demonstram que a exposição a drogas tanto no período pré quanto neonatal produz efeitos duradouros no neurodesenvolvimento da prole. Nesse sentido, a administração de ISRS a ratos neonatos (2 a 3 primeiras semanas de vida) induziu ansiedade a qual persistiu até a fase adulta (ANSORGE et al., 2004). Dessa forma, avaliamos o comportamento dos animais expostos à fluoxetina no período de gestação e amamentação em dois modelos distintos utilizados para o estudo da neurobiologia da ansiedade.

A exposição à fluoxetina não alterou os parâmetros comportamentais avaliados no LCE na prole, independentemente da idade e do gênero. Nossos resultados corroboram com estudo prévio em que, apesar da exposição pré - natal (do dia gestacional 11 até o nascimento) à fluoxetina desencadear um comportamento ansiedade-símile em alguns modelos de ansiedade, tal efeito não foi observado com o teste do LCE. Entretanto, quando esses animais foram expostos ao choque nas patas previamente ao teste do LCE foi observado efeito ansiogênico (OLIVIER et al., 2011) sugerindo que a exposição à fluoxetina pode interferir na modulação da ansiedade quando outros fatores externos estão presentes.

Em seguida, analisamos o comportamento da prole de machos adultos no teste de interação social, outro modelo utilizado para estudo da neurobiologia da ansiedade, que reflete a atividade exploratória do animal em um parceiro desconhecido no ambiente familiar (FILE; HYDE, 1978). Esse modelo é validado apenas para animais machos e adultos o que justifica o uso apenas desses animais para a realização do protocolo experimental.

Nossos resultados mostraram que grupos de animais expostos à fluoxetina durante o neurodesenvolvimento embrionário e neonatal apresentou uma diminuição no tempo de interação social, o que sugere um efeito ansiogênico da droga quando comparado ao grupo controle. Tais resultados corroboram com dados da literatura em que a exposição pré - natal de fluoxetina parece diminuir a frequência de interação social de ratos adultos (OLIVIER et al., 2011).

Estudos demonstram que autorreceptores somatodendríticos e pós-sinápticos 5-HT_{1A} medeiam efeito ansiolítico e ansiogênico, respectivamente, em ratos testados na arena para interação social (ANDREWS et al., 1994; FILE et al., 1996). O efeito ansiolítico observado após ativação dos autorreceptores 5-HT_{1A} no núcleo da rafe relaciona-se com a diminuição dos níveis de 5-HT em áreas do sistema límbico como o hipocampo. Por outro lado, estudos relacionam a ativação de receptor 5-HT_{1A} pós-sináptico no hipocampo dorsal ao efeito ansiogênico observado nos animais submetidos ao teste de interação social, sugerindo que o papel da 5-HT na modulação da ansiedade depende da localização neuroanatômica dos receptores 5-HT_{1A} (ANDREWS et al., 1994; FILE et al., 1996; FILE; SETH, 2003).

Resultados apresentados a partir de testes comportamentais com camundongos (LISBOA, 2007) expostos à fluoxetina, pelo mesmo período usado no nosso trabalho, sugerem que o aumento nos níveis de serotonina no sistema nervoso central (SNC) poderia levar à diminuição na comunicação entre os neurônios serotoninérgicos, devida à dessensibilização de receptores do subtipo 5-HT_{1A} e, conseqüentemente, aos efeitos ansiogênicos observados. Nesse sentido, estudos demonstram que altas doses de fármacos agonistas 5-HT_{1A} produzem efeito ansiogênico em ratos testados na arena de interação social (ANDREWS et al., 1994; CHEETA et al., 2000; FILE et al., 1996). Dentre as estruturas cerebrais, o núcleo basolateral da amígdala e o hipocampo dorsal parecem estar relacionados à produção do efeito ansiogênico, via receptor 5-HT_{1A} pós-sináptico, em animais submetidos ao teste de interação social (ANDREWS et al., 1994; FILE; SETH, 2003). Entretanto, a possível via neural, assim como, o receptor envolvido na mediação do efeito ansiogênico observado nos nossos animais não foram explorados no presente trabalho.

O teste de exposição do animal ao aparelho do labirinto permite a análise do comportamento do animal em um ambiente novo (os braços do labirinto), sendo que o comportamento ansiedade-símile verificado ocorre devido à interação do animal com o ambiente dos braços (abertos ou fechados) do labirinto (PELLOW et al., 1985; TREIT et al., 1993). Por outro lado, o teste de interação social permite a verificação do comportamento ansiedade-símile de forma pareada, ou seja, verificamos o comportamento do animal diante de um animal desconhecido, num ambiente previamente habituado. Apesar de ambos os modelos serem validados para o

estudo da neurobiologia da ansiedade, o LCE permite a obtenção de resultados a partir do comportamento exploratório incondicionado de animais em um ambiente novo e com o conflito de curiosidade versus exploração para o ambiente “desprotegido” dos braços abertos (PELLOW et al., 1985; TREIT et al., 1993; CRUZ et al., 1994), enquanto que o teste de interação social permite a avaliação da ansiedade social, em que apenas o animal se mostra como novidade para o outro, já que eles foram previamente habituados ao ambiente durante duas sessões anteriores (FRANKLIN, 2012).

As respostas a agentes estressores envolvem ativação do eixo HPA (FRANKLIN et al., 2012). A restrição se mostra como um modelo experimental amplamente empregado na literatura para o estudo do estresse apresentando aumentos consideráveis nos níveis de corticosterona plasmática (LINO-DE-OLIVEIRA et al. 2001). Além disso, o estresse por restrição ativa neurônios em regiões cerebrais envolvidas na modulação da ansiedade, como amígdala e SCP (LINO-DE-OLIVEIRA et al. 2001).

No presente trabalho, utilizamos o modelo do estresse de restrição repetido (5 dias consecutivos) e observamos aumentos nos níveis plasmáticos basais de corticosterona em todos os grupos experimentais indicando que o modelo foi efetivo em promover o estresse nos animais e que, apesar das sessões repetidas, os animais não se adaptaram ao estresse. No entanto, não evidenciamos efeito da exposição à fluoxetina durante a gestação e amamentação nos níveis de corticosterona plasmática após o estresse de restrição repetido.

A 5-HT desempenha um importante papel na resposta do organismo a um agente estressor (CHAOULOFF et al., 1999). Estudos sugerem uma adaptação dos animais diante de eventos aversivos repetidos. Assim, imobilização realizada diariamente durante 7 dias não interferiu no comportamento dos animais no campo aberto (DEAKIN; GRAEFF, 1991). Tal adaptação parece envolver uma sinalização serotoninérgica via receptores 5-HT_{1A} no hipocampo. Nossos resultados demonstram uma ausência de adaptação dos animais de ambos os grupos experimentais com as sessões de restrição repetidas por 5 dias, entretanto, não realizamos experimentos com estresse de restrição durante 7 dias para sugerirmos que a exposição à fluoxetina durante as fases iniciais do neurodesenvolvimento interfira na adaptação do animal ao estímulo estressor.

Olivier et al. (2011) confirmaram a presença da fluoxetina e do seu metabólito norfluoxetina nos cérebros de filhotes expostos a esse fármaco durante o período pré - natal (OLIVIER et al., 2011) sugerindo que níveis elevados de 5-HT no SNC nesse período poderiam levar a alterações no neurodesenvolvimento, uma vez que esse neurotransmissor age como fator neurotrófico durante as fases iniciais do desenvolvimento (GASPAR et al., 2003; HOMBERG et al., 2010).

Estudos recentes sugerem que as influências epigenéticas na função do SNC relacionam-se com as desordens de ansiedade e depressão (TSANKOVA et al., 2006). Além disso, alterações no cérebro e no comportamento ocasionadas pelo estresse podem ser decorrentes de alterações epigenéticas (McEWEN et al., 2012).

Nesse sentido, o mecanismo de metilação do DNA regula a expressão de genes envolvidos na neurobiologia da ansiedade, como os que codificam os glicocorticóides (McGOWAN et al., 2009) e os receptores GABA-A (POULTER, 2008). Dentre as estruturas cerebrais envolvidas na modulação da ansiedade, a SCP tem apresentado papel relevante (BRANDÃO et al., 2003c; PELOSI et al., 2009).

No presente estudo, não evidenciamos uma variação no perfil de metilação global de DNA na SCP da prole de machos expostos à fluoxetina durante a gestação e amamentação em duas idades distintas do desenvolvimento (22 dias e 75 dias após o nascimento) sugerindo que a fluoxetina parece não interferir no neurodesenvolvimento dessa estrutura mesencefálica.

Experiências traumáticas na fase inicial do desenvolvimento poderiam promover alterações persistentes no eixo HPA, relacionadas com a redução da metilação de genes específicos no encéfalo (YANG et al., 2012), que contribuiriam para o aparecimento futuro dos transtornos de ansiedade, reforçando a teoria DOHaD. No entanto, no presente estudo, não avaliamos o perfil global de metilação do DNA na SCP dos animais expostos à fluoxetina após uma situação estressante.

Em suma, nossos resultados demonstram que a exposição à fluoxetina durante as fases iniciais do neurodesenvolvimento pode interferir na modulação da ansiedade de ratos adultos, quando diante de uma situação de estresse emocional em presença de animal desconhecido, favorecendo a teoria de que a ingestão de xenobiótico durante o período de gestação e amamentação pode propiciar alterações comportamentais que se manifestam na idade adulta do indivíduo.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho, concluímos que o tratamento materno com fluoxetina durante a gestação e amamentação:

1. Não interfere no comportamento de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado da prole adolescente e adulta;
2. Evidencia o comportamento ansiogênico no teste de interação social na prole de machos adultos;
3. Não modifica os níveis plasmáticos de corticosterona basais e após a exposição repetida ao estresse de contenção na prole adolescente e adulta;
4. Não interfere no perfil de metilação global do DNA na substância cinzenta periaquedutal de filhotes machos recém - desmamados e adultos.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, N. et al. 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviours respectively. Eur J Pharmacol., v. 264, p. 259 – 264, 1994.
- ANSORGE, M. S. et al. Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behaviour in adult mice. Science, v. 306, p. 879 – 88, 2004.
- BLANCHARD, R. J. et al. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. Behavioural Brain Research, v. 58, p. 155 – 165, 1993.
- BRANDÃO, M.L. et al. Neural Substrate of Defensive Behavior in the Midbrain Tectum. Neuroscience and Biobehavioral Review, v. 18, p. 339 – 346, 1994a.
- BRANDÃO, M.L. et al. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. Neuroscience and Biobehavioral Review, v. 23, p. 863 – 875, 1999b.
- BRANDÃO, M.L. et al. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. Rev. Bras.Psiquiatr., v. 25, p. 36 – 41, 2003c.
- CHAOULOFF, F., BERTON, O., MORMEDE, P. Serotonin and stress. Neuropsychopharmacology, v. 21, p. 28S – 32S, 1999.
- CHEETA, S.,KENNY, P. J., FILE, S. E. The role of 5-HT_{1A} receptors in mediating the anxiogenic effects of nicotine following lateral septal administration. Eur J. Neurosci., v. 12, p. 3797 – 3802, 2000.
- CLAESSENS, S. E. F. et al. Development of individual differences in stress responsiveness: an overview of factors mediating the outcome of early life experiences. Psychopharmacology, v. 214, p. 141 – 154, 2011.
- CRUZ, A. P. M., FREI, F., GRAEFF, F. G. Ethopharmacological Analysis of Rat behaviour on the elevated plus-maze. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 49, p. 171 – 176, 1994.
- DEAKIN, J. F. W., GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. Journal of Psychopharmacology, v. 5, p. 305 – 35, 1991.
- DOOSTI, M-H. et al. Impacts of early intervention with fluoxetine following early neonatal immune activation on depression-like behaviors and body weight in mice. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, v. 43, p. 55 – 65, 2013.

ELIAS, P.C. et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis up-regulation in rats submitted to pituitary stalk compression. J. Endocrinol., v. 180, p. 297 – 302, 2004.

FILE, S. E., HYDE, J. R. G. Can social interaction be used to measure anxiety? Br J Pharmacol, v. 62, p. 19 – 24, 1978.

FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Experimental approaches to anxiety and depression. Elliott J.M., Heal D.J., Marsden C.A. (eds). Wiley, New York, p. 25 – 44, 1992.

FILE, S. E., GONZALEZ, L. E., ANDREWS, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. J. Neurosci., v. 16, p. 4810 – 4815, 1996.

FILE, S. E. SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. Eur. J. Pharmacol., v. 463, p. 35 – 53, 2003.

FRANKLIN, T. B., SAAB, B. J., MANSUY, I. M. Neural Mechanisms of Stress: Resilience and Vulnerability. Neuron., v. 75, p. 747 – 761, 2012.

GASPAR, P., CASES, O., MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. Nat. Rev. Neurosci., v. 4, p. 1002 – 1012, 2003.

GLUCKMAN, P. D., HANSON, M. Developmental Origins of Disease Paradigm: A Mechanistic and Evolutionary Perspective. Pediatric Research, v. 56, p. 311 – 317, 2004.

GOLDMAN, J. M., MURR, A. S., COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol., v. 80, p. 84 – 97, 2007.

GRAEFF, F. G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. Pharmacology Biochemistry and Behaviour, v. 54, p. 129 – 141, 1996.

GRAEFF, F. G., ZANGROSSI, H. Animal Models of Anxiety Disorders. Biological Psychiatry: John Wiley & Sons, Ltd; 2003. p. 877 – 93.

GUERRERO-PRESTON, R. et al. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to nicotine and perfluorinated alkyl compounds. Epigenetics-U.S., v. 5, p. 539 – 546, 2010.

HALBREICH, U., KARKUN, S. Cross-cultural and social diversity of prevalence of postpartum depression and depressive symptoms. Journal of Affective Disorders, v. 91, p. 97 – 111, 2006.

HALLER, J. The link between stress and the efficacy of anxiolytics: A new avenue of research. Physiol. Behav., v. 73, p. 337 – 342, 2001.

HANSEN, H. H., SANCHÉZ, 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, p. 1333 – 1341, 1997.

HEIKKINEN, T. et al. Pharmacokinetics of fluoxetine and Norfluoxetine in pregnancy and lactation. Clin Pharmacol Ther, v. 73, p. 330 – 337, 2003.

HEIM, C.; NEMEROFF, C.B. The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. Biol Psychiatry, v. 46, p. 1509 – 1522, 1999.

HENDRICK, V. et al. Fluoxetine and norfluoxetine concentrations in nursing infants and breast milk. Biol Psychiatry, v. 50, p. 775 – 782, 2001.

HOLMES, A. Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice. Neurosci Biobehav Rev, v. 25, p. 261 – 273, 2001.

HOMBERG, J. R., SHUBERT, D., GASPARD, P. New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. Trends Pharmacol. Sci., v. 31, p. 60 – 65, 2010.

IMHOF, J.T., et al. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. Behav. Brain Res., v. 56, p. 177 – 180, 1993.

JABLONKA, E., LAMB, M. J. The Changing Concept of Epigenetics. ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, v. 981, p. 82 – 96, 2002.

JENUWEIN, T., ALLIS, C.D. Translating the histone code. Science, v. 293, p. 1074 – 1080, 2001.

JONES, P. A.; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. Science, v. 293, p. 1068 – 1070, 2001.

KNAEPEN, L. et al. Developmental Fluoxetine Exposure Normalizes the Long-Term Effects of Maternal Stress on Post-Operative Pain in Sprague-Dawley Rat Offspring. PLoS ONE, v. 8, p. 1 – 9, 2013.

KRISHNAN, V., NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. NATURE, v. 455, p. 894 – 902, 2008.

LINO-DE-OLIVEIRA, C. et al. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. Brain Research Bulletin, v. 55, p. 747 – 754, 2001.

LISBOA, S. F. S. Behavioral evaluation of male and female mice pups exposed to fluoxetine during pregnancy and lactation. Pharmacology, v. 80, p. 49 – 56, 2007.

LOBATO, G., MORAES, C. L., REICHENHEIM, M. E. Magnitude da depressão pós-parto no Brasil: uma revisão sistemática. Revista brasileira de saúde materno infantil, v. 11, p. 369 – 379, 2011.

MARCUS, S. M. et al. Treatment guidelines for depression in pregnancy. International Journal of Gynecology and Obstetrics, v. 72, p. 61 – 70, 2001.

McEWEN, B. S. et al. Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. Neuropharmacology, v. 62, p. 3 – 12, 2012.

McGOWAN, P. O. et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. Nat Neurosci., v. 12, p. 342 – 348, 2009.

MINEKA, S., ÖHMAN, A. Phobias and preparedness: the selective, automatic, and encapsulated nature of fear. Biol. Psychiatry, v. 52, p. 927 – 937, 2002.

MUNARETTI, C.L.; TERRA, M.B. Anxiety disorders: a study of the prevalence and comorbidity with smoking in a psychiatric outpatient clinic. J. Bras. Psiquiatr., v. 56, p. 108 – 115, 2007.

MORA, S., DUSSAUBAT, N., DIAZ-VELIZ, G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. Psychoneuroendocrinology, v. 21, p. 609 – 620, 1996.

NARDI, A. E. Comorbidade: depressão e fobia social. Psiquiatria na prática médica, São Paulo, v. 34, n. 2, 2001. Disponível em http://www.unifesp.br/dpsiq/polbr/ppm/atu3_06.htm. Acesso em: 10 out. 2012.

NONACS, R.; COHEN, L.S. Assessment and treatment of depression during pregnancy: an update. Psychiatr Clin North Am, v. 26, p. 547 – 562, 2003.

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

ONISHCHENKO, N. et al. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. J. Neurochem., v. 106, p. 1378 – 1387, 2008.

PELOSI, G.G. et al. Anxiolytic-like effect of noradrenaline microinjection into the dorsal periaqueductal gray of rats. Behav. Pharmacol., v. 20, p. 252 – 259, 2009.

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, p. 149 – 167, 1985.

- PINE, D. S. et al. Challenges in developing novel treatments for childhood disorders: lessons from research on anxiety. Neuropsychopharmacology. EUA, v. 34, p. 213 – 228, 2009.
- POHLAND, R. C. et al. Placental transfer and fetal distribution of fluoxetine in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacology, v. 98, 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, v. 28, p. 3546 – 3554, 2008.
- POULTER, M. O. GABA-A receptor promoter hypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes. Biol. Psychiatry, v. 64, p. 645 – 652, 2008.
- ROSEN, J. B., SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. Psychopharmacol. Rev., v. 10, p. 325 – 350, 1998.
- SINCLAIR, K. D. et al. The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. Soc. Reprod. Fertil. Suppl., v. 64, p. 425 – 443, 2007.
- STOKES, P. E., HOLTZ, A. Fluoxetine tenth anniversary update: the progress continues. Clin. Ther., v. 19, p. 1135 – 1250, 1997.
- TREIT, D., MENARD, J., ROYAN, C. Anxiogenic Stimuli in the Elevated Plus-Maze. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 44, p. 463 – 469, 1993.
- TSANKOVA, N. M. et al. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. Nat Neurosci., v. 9, p. 519 – 25, 2006.
- TSANKOVA, N. M. et al. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. Nat. Neurosci., v. 8, p. 355 – 367, 2007.
- WHITAKER - AZMITIA, P. M. et al. Serotonin as a developmental signal. Behav. Brain Research, v. 73, p. 19 – 29, 1996.
- YANG, X. et al. Glucocorticoid-induced loss of DNA methylation in non-neuronal cells and potential involvement of DNMT1 in epigenetic regulation of Fkbp5. Biochemical and biophysical research communications, v. 420, p. 570 – 575, 2012.