



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINA MATIAS HIGASHI

**ÓLEO DE PEIXE E ÁCIDO FÓLICO NÃO PREVINEM, NA
PROGÊNIE, AS ALTERAÇÕES VASCULARES INDUZIDAS
PELA EXPOSIÇÃO MATERNA À FLUOXETINA**



Sociedade Brasileira de Fisiologia
SBFis



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Carolina Matias Higashi

**Óleo de peixe e ácido fólico não previnem, na progênie, as
alterações vasculares induzidas pela exposição materna à
fluoxetina**

Londrina

2016

CAROLINA MATIAS HIGASHI

**ÓLEO DE PEIXE E ÁCIDO FÓLICO NÃO PREVINEM, NA
PROGÊNIE, AS ALTERAÇÕES VASCULARES INDUZIDAS
PELA EXPOSIÇÃO MATERNA À FLUOXETINA**

Dissertação de apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Graziela Scaliante Ceravolo

Londrina
2016

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

Higashi, Carlolina Matias.

Óleo de peixe e ácido fólico não previnem, na progênie, as alterações vasculares induzidas pela exposição materna à fluoxetina / Carlolina Matias Higashi. - Londrina, 2016.

43 f. : il.

Orientador: Graziela Scialanti Ceravolo.

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

Inclui bibliografia.

1. Reatividade da Aorta - Teses. 2. Endotélio - Teses. 3. Óxido nítrico - Teses. 4. Gestação - Teses. I. Ceravolo, Graziela Scialanti. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico. III. Título.

CAROLINA MATIAS HIGASHI

**ÓLEO DE PEIXE E ÁCIDO FÓLICO NÃO PREVINEM, NA PROGÊNIE,
AS ALTERAÇÕES VASCULARES INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO
MATERNA À FLUOXETINA**

Dissertação de apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Graziela Scaliante
Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de fevereiro de 2016.

DEDICA

A Deus, que por sua graça, ofereceu esta oportunidade e supriu cada necessidade ao longo do caminho.

A minha família, aos meus amigos e a minha orientadora pela compreensão e confiança.

Aos animais que, por meio de suas vidas, contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que com seu amor, me ofereceu uma vida repleta de oportunidades, encontrando em mim alguém que poderia servi-lo neste exercício, pela companhia diária em cada desafio e pelo auxílio em cada decisão.

Ao meu pai Tsuguio e aos meus tios Toshico e Tadao pelo amor, confiança e fé depositados em mim, pelo apoio em cada dificuldade e pela união em cada vitória.

A minha segunda família, Cristina, Nelson, Ariane, Marcos, Vivian, Eric, Massako, Toshio e Setsuyo, com cujo apoio e amor sei que posso contar.

Aos meus amigos Ane, Maria Thereza, Keiko, Carol, Luiza, Milton e Lays, com quem convivo, seja diariamente ou não, estão presentes em cada conquista desde o nosso primeiro encontro, e que me dão a alegria de partilhar com eles as suas conquistas.

Aos amigos da célula, que em pouco tempo se mostraram tão generosos, tornando-se uma família, ajudando-me a crescer a cada dia.

A minha querida orientadora, Professora Graziela, que me acolheu e me orientou, mostrando como ser uma profissional de excelência, não somente no aspecto profissional, mas também como pessoa, tornando-se um exemplo que desejo seguir e alguém cuja companhia estimo cada dia mais.

Aos amigos de laboratório Ana Flávia, Bruno, Camila, Daniella, Guilherme, Juliana, Kawane, Letícia, Rafaela e Thais, com cujo auxílio pude contar nos grandes desafios e com quem pude comemorar as conquistas; e aos amigos do programa Luiz, André, Vinícius, Dênis, Matheus, Guilherme, Bruno, Nathália, Simone, Jaqueline, Hiviny, Viviane, Deborah, Fernanda, Karine pela colaboração e companhia.

Ao Professor Décio Sabbatini Barbosa pelo apoio na execução das dosagens de metabólitos do óxido nítrico e homocisteína e à sua orientanda Luciana Higachi, pela parceria profissional e pela amizade.

A Fujiko, Thialla, aos professores, funcionários e colegas de departamento, pela convivência e partilha de conhecimentos.

Por fim, a todos que me ajudaram nessa caminhada, pois sei que mesmo que por pouco tempo, contribuiram para a conclusão desta etapa.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação Araucária e à Universidade Estadual de Londrina pelo apoio financeiro.

É melhor ter companhia do que estar sozinho, porque maior é a recompensa do trabalho de duas pessoas. Se um cair, o amigo pode ajudá-lo a levantar-se. [...]

Um homem sozinho pode ser vencido, mas dois conseguem defender-se.

HIGASHI, Carolina Matias. **Óleo de peixe e ácido fólico não previnem, na progênie, as alterações vasculares induzidas pela exposição materna à fluoxetina.** 2016. 43f. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A Fluoxetina (FLX) é um antidepressivo prescrito por todo o mundo. Esta droga pode atravessar a barreira placentária e ser excretada no leite materno, podendo causar alterações funcionais em órgãos e sistemas da prole exposta. Fora do período gestacional, a combinação de FLX com óleo de peixe (OP) ou ácido fólico (AF) é realizada para aumentar a ação terapêutica e reduzir os efeitos indesejáveis dos antidepressivos. Durante a gravidez, o OP e o AF têm sido utilizados para promover o desenvolvimento do feto e reduzir, na mãe, o risco de depressão gestacional e pós-gestacional. O objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição materna, via oral, à FLX durante a gravidez e lactação, associada com OP ou AF impediria os efeitos colaterais do antidepressivo na reatividade da aorta e nos níveis de metabólitos do óxido nítrico (NO) plasmáticos da prole feminina adulta (dados não publicados). Buscou-se também entender os efeitos vasculares isolados decorrentes da exposição intrauterina e lactacional ao OP e AF em monoterapia sobre a prole feminina. Ratas Wistar foram tratadas, por gavagem, com água (controle), FLX (5 mg/kg/dia), OP (400 mg/kg/dia), AF (3 mg/kg/dia), FLX + OP e FLX + AF, ao longo toda a gravidez e lactação. Foram avaliados na prole feminina adulta a reatividade de anéis de aorta para fenilefrina (Fe), os níveis plasmáticos de NO e homocisteína (HCY). Os resultados demonstraram que a associação de FLX com OP ou AF não corrigiu a hiporreatividade aórtica à Fe e manteve o aumento de NO induzidos pela exposição intrauterina e lactacional à FLX. Além disso, a monoterapia com OP e AF durante o período não interferiu sobre a contração aórtica induzida por Fe, assim como não alterou os níveis plasmáticos de NO e HCY. Dessa forma, é possível concluir que a exposição ao AF ou OP é segura para a função vascular da prole feminina exposta durante a gestação e lactação e que a associação destes compostos com a FLX não previne os efeitos vasculares causados pelo antidepressivo na prole feminina adulta.

Palavras-chave: Reatividade da Aorta. Inibidor seletivo da receptação de serotonina. Endotélio. Óxido nítrico. Gestação.

HIGASHI, Carolina Matias. **Fish oil and folic acid do not prevent, in progeny, vascular changes caused by maternal exposure to fluoxetine.** 2016. 43p. Dissertation (Master's Degree in Multicentric in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Fluoxetine (FLX) is an antidepressant worldwide prescribed. This drug can cross the placental barrier and be excreted in breast milk and it might cause functional changes in organs and systems of exposed offspring. Out of gestation period, the combination of FLX with fish oil (FO) or folic acid (FA) is used to enhance the therapeutic activity and to reduce the side effects of antidepressants. During pregnancy, FO and FA have been used to promote fetal development, and to reduce, in the mother, the risk of gestational and post-partum depression. The aim of this study was to evaluate if maternal exposure, via oral administration, during pregnancy and lactation to FLX associated with FO or FA would prevent the antidepressant side effects in aorta reactivity and plasmatic NO metabolites production in adult female offspring (not published data). We also thought to understand in female offspring the isolated vascular effects of intrauterine and lactation exposure to FO and FA isolated therapy. Wistar rats were treated, by gavage, with water (control), FLX (5 mg/kg/day), FO (400 mg/kg/day), FA (3 mg/kg/day), FLX+FO and FLX+FA, throughout the entire pregnancy and lactation. During adulthood, female offspring was evaluated in vascular reactivity to phenylephrine (Phe), nitric oxide (NO) and homocysteine (HCY) plasmatic levels. Nevertheless, isolated exposure to FO or FA during gestational and lactational period did not interfere with Phe-induced aortic contraction and neither altered NO and HCY plasmatic levels. Altogether, it is possible to conclude that the intrauterine and lactational exposure to FO or FA is safe for vascular function of female offspring and also that FLX association with FO or FA did not prevent the aortic hyporeactivity and the increased NO levels induced by intrauterine and lactation exposure to the antidepressant.

Keywords: Aorta reactivity. Selective serotonin reuptake inhibitor. Endothelium. Nitric oxide. Pregnancy.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Parâmetros biológicos avaliados nas fêmeas e filhotes expostos à água (CON), OP e AF, em monoterapia ou associados à FLX. Do DG 0 ao dia DPN 18 para as mães e ao DPN 21 para os filhotes24
- Tabela 2** - Resposta máxima e pD2 (log negativo da concentração do agonista resultando em 50%) em anéis de aorta com ou sem endotélio.....27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Reatividade vascular em anéis de aorta isolados	22
Figura 2	–	Acompanhamento do peso materno durante a gestação.....	25
Figura 3	–	Acompanhamento do peso materno durante a lactação.....	25
Figura 4	–	Acompanhamento do peso dos filhotes durante a lactação.....	26
Figura 5	–	Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100µmol/L) obtida em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio.....	28
Figura 6	–	Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100µmol/L) obtida em anéis de aorta com endotélio (E+)	29
Figura 7	–	Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100µmol/L) obtida em anéis de aorta sem endotélio (E-).....	30
Figura 8	–	Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100µmol/L) obtida em anéis de aorta com endotélio (E+)	31
Figura 9	–	Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100µmol/L) obtida em anéis de aorta sem endotélio.....	32
Figura 10	–	Níveis plasmáticos de metabólitos do NO (NOx) na prole feminina adulta exposta à água (CON), ao óleo de peixe (OP), ao ácido fólico (AF), à fluoxetina (FLX), FLX+OP e FLX+AF durante gestação e lactação	33
Figura 11	–	Concentração de homocisteína plasmática na prole feminina adulta exposta à água (CON), ao óleo de peixe (OP), ao ácido fólico (AF), à fluoxetina (FLX), FLX+OP e FLX+AF durante gestação e lactação	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
AF	Ácido fólico
CON	Controle
DG	Dia gestacional
DPN	Dia pós-natal
E+	Endotélio preservado
E-	Endotélio removido
EDCF	Fatores contráteis derivados do endotélio
EDRF	Fatores relaxantes derivados do endotélio
FA	Folic acid
Fe	Fenilefrina
FLX	Fluoxetina/fluoxetine
FO	Fish oil
HCY	Homocisteína
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
n	Número de animais por grupo
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
OP	Óleo de peixe
pD2	Logaritmo negativo da concentração efetiva de 50% (EC 50)
Phe	Phenylephrine
Rmax	Reposta máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.1.2	Objetivos específicos	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Animais e tratamento	19
3.2	Avaliação da reatividade da aorta isolada ao agente vasoconstritor Fenilefrina	21
3.3	Dosagem plasmática de metabólitos do óxido nítrico – (NOx)	22
3.4	Dosagem de homocisteína (HCY) plasmática	23
3.5	Análise estatística	23
4	RESULTADOS	24
4.1	Avaliação da toxicidade dos tratamentos e peso da prole adulta	24
4.2	Exposição à FLX durante gestação e lactação reduz a resposta aórtica a Fe na presença do endotélio	26
4.3	As associações de FLX com OP e AF não previnem a redução na resposta da aorta para Fe	29
4.4	Níveis plasmáticos de óxido nítrico e homocisteína	33
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÃO	38
7	REFERÊNCIAS	39
	ANEXOS	43
	ANEXOS A - Parecer do comitê de ética e uso de animais	43

1 INTRODUÇÃO

Amplamente prescritos por todo o mundo, os antidepressivos são indicados não somente para o tratamento de depressão, mas também para outros transtornos afetivos (ZOHAR; WESTENBERG, 2000), assim como para o tratamento da dor (MCQUAY et al., 1996). Como a ação terapêutica dos antidepressivos resulta de neuroadaptações, o tratamento com estas drogas normalmente é crônico (STAHL, 2011).

Mulheres que usam antidepressivos, por exemplo, no tratamento da depressão, e ficam grávidas, frequentemente devem manter o tratamento farmacológico, considerando que a depressão não tratada pode aumentar o risco de parto prematuro e causar na prole baixo peso ao nascer, retardo do desenvolvimento neuromotor, transtornos de ansiedade e depressão (PEARLSTEIN, 2015). Devido à seletividade de ação, eficácia e menores efeitos indesejáveis em relação aos antidepressivos das classes dos tricíclicos e dos inibidores da monoaminoxidase, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) estão entre os medicamentos antidepressivos mais prescritos (NONACS; COHEN, 2003).

A fluoxetina (FLX), um ISRS, é um dos principais fármacos de escolha durante a gravidez para o tratamento de distúrbios afetivos e transtornos de ansiedade (NONACS; COHEN, 2003). Os ISRS aumentam, no tratamento a curto prazo, a disponibilidade de serotonina (5-HT - 5-hidroxitriptamina) na fenda sináptica. Entretanto, são os efeitos secundários, decorrentes do tratamento crônico, os responsáveis pela ação antidepressiva, como alterações na densidade e na função dos receptores serotoninérgicos (KRISHNAN; NESTLER, 2008). A FLX e seu metabólito ativo norfluoxetina cruzam a barreira placentária, atingindo até a 60% dos valores observados no plasma materno (BELIK, 2008). Além disso, também são secretados no leite materno (FAVARO; COSTA; MOREIRA, 2008) expondo fetos e neonatos em fases importantes do desenvolvimento a este fármaco (BOURKE; STOWE; OWENS, 2014).

Frente a estas observações, fetos e recém-nascidos de mulheres tratadas com FLX na gestação e lactação podem ser expostos a altos níveis de FLX e conseqüentemente de serotonina, levantando questões acerca do risco

de ocorrência de malformações estruturais, funcionais em órgãos, além de modificações comportamentais (SACKETT; WELLER; WELLER, 2009).

De fato, estudos em roedores descrevem que a exposição intrauterina e lactacional aos ISRS pode causar alterações comportamentais e fisiológicas em fases posteriores do desenvolvimento. Dentre estas alterações, destacam-se a ausência de preferência sexual em camundongos machos (GOUVÊA et al., 2008), alteração estrutural do túbulo seminífero e do número de espermatozoides em ratos adultos (VIEIRA et al., 2013) e alteração da motivação e da resposta ao estresse em ratos adolescentes (FRANCIS-OLIVEIRA et al., 2013).

A serotonina está envolvida com o controle fisiológico do sistema cardiovascular por controlar a atividade parassimpática através da ativação de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₃ e 5-HT₇ (BOURKE; STOWE; OWENS, 2014). Nebigil et al. (2001) apresentaram, através da manipulação genética, evidências de que a serotonina, pelo receptor 5-HT_{2B}, regula a função e a estrutura cardíaca. Dessa forma, tem sido aventada a hipótese de que interferências no sistema serotoninérgico *in utero*, como as causadas pelo uso de ISRS, poderiam levar ao desenvolvimento anormal do sistema cardiovascular (NOORLANDER et al., 2008).

Sobre o sistema vascular, a exposição a ISRS durante o desenvolvimento fetal pode aumentar (ALVAREZ; EMORY, 2006) ou diminuir (CHOW et al., 2011) o fluxo sanguíneo da artéria cerebral média e levar a hipertensão pulmonar persistente (BOURKE; STOWE; OWENS, 2014). Recentemente em nosso laboratório foi demonstrado que a exposição materna à FLX, durante a gestação e lactação, diminui na prole feminina na vida adulta a resposta da aorta a agentes contráteis, por mecanismo dependente de endotélio e óxido nítrico (NO) (dados não publicados), confirmando que a exposição à FLX durante o desenvolvimento pode induzir alterações no sistema vascular que persistem na vida adulta.

Portanto, apesar de ser considerada uma droga segura, a FLX pode causar efeitos indesejáveis sobre o sistema vascular da prole, tornando importante o desenvolvimento de estratégias para prevenir ou minimizá-los.

Desse modo, vem sendo proposta a associação de FLX com óleo de peixe (OP) (ômega 3) ou ácido fólico (AF) para potencializar o efeito

terapêutico e reduzir os efeitos adversos do antidepressivo, já que estes compostos favorecem a produção de aminas biogênicas, como serotonina, dopamina, norepinefrina e protegem as células nervosas do processo inflamatório presente nas doenças afetivas (DELIGIANNIDIS; FREEMAN, 2010; PRIOR, PEDRO LUIS; FERNANDES, 2012).

Durante a gestação, a suplementação com OP e AF vem sendo utilizada para favorecer o crescimento e o desenvolvimento fetal (SKILTON et al., 2013), além de reduzir, na mãe, o risco de depressão gestacional e pós-gestacional (PRIOR, PEDRO LUIS; FERNANDES, 2012).

Estudos correlacionam baixas concentrações de ômega 3 e inflamação a estados de depressão, apresentando dados de melhora no tratamento de pacientes refratários a ISRS, com seu uso (PRIOR, PEDRO LUIS; FERNANDES, 2012). O ômega 3 é constituído por ácidos graxos insaturados de cadeias longas eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), é encontrado em altas concentrações no OP e sua suplementação é importante durante a gestação e amamentação, pois o DHA atua na maturação cortical, na sinaptogênese e diferenciação neuronal do feto em desenvolvimento (MCNAMARA; CARLSON, 2006).

Por sua vez, o micronutriente AF é obtido na dieta a partir de frutas e vegetais, mas em períodos de grande necessidade metabólica, como durante a gestação, é necessária a suplementação (WILSON et al., 2012). O AF está envolvido no metabolismo da homocisteína (HCY) para metionina, e baixos níveis de AF reduzem a síntese de metionina, aumentando o nível plasmático de HCY, relacionada ao aumento do risco de doenças como cardiovasculares e transtornos do humor (REFSUM et al., 2004). Também se reconhece a HCY como um fator de risco independente para aterosclerose (BOUSHEY et al., 1995) e níveis elevados causam prejuízo na vasodilatação endotélio-dependente por diminuir a biodisponibilidade NO e também está envolvida diretamente à senescência vascular (SACHDEV, 2004).

No Brasil, o Ministério da Saúde apoia a suplementação profilática de gestantes com AF na dose de 400µg/dia, 30 dias antes da concepção até o fim da gestação. Ainda, há a fortificação obrigatória das farinhas de trigo e de milho com AF desde 2002 (BRASIL, 2013). Apesar do uso de AF estar consolidado durante a gravidez para prevenir defeitos no fechamento do tubo neural fetal

(LAURENCE et al., 1981), o uso do AF, sozinho ou em associação com antidepressivos, no tratamento da depressão gestacional ainda necessita ser melhor compreendido.

Dessa forma, apesar do OP e AF serem utilizados em associação com antidepressivos fora dos períodos de gestação e amamentação, ainda não existem estudos que estabeleçam a segurança do tratamento materno com estes nutrientes sobre o sistema vascular da prole exposta. Menores ainda são as informações acerca da segurança do tratamento materno com FLX associada ao OP e AF sobre o sistema vascular da prole exposta durante gestação e lactação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição materna à FLX durante a gestação e lactação, associada com OP ou AF, impediria os efeitos indesejáveis do antidepressivo sobre reatividade da aorta e sobre níveis de NO plasmático na prole feminina adulta. Buscou-se também entender os efeitos vasculares, na prole feminina, decorrentes da exposição intrauterina e lactacional ao OP e AF em monoterapia.

2.1.2 Objetivos específicos

Para tanto, os objetivos específicos foram avaliar:

- A reatividade da aorta ao agente constritor Fenilefrina (Fe).
- O papel do endotélio sobre a resposta contrátil da aorta.
- Os níveis plasmáticos de NO e HCY.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e tratamento

Para este trabalho, foram utilizados ratos e ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, adaptados e mantidos em ambiente controlado, na temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 06:00 am) e livre acesso à água e ração (Nuvital®) para roedores.

Duas ratas virgens foram colocadas na mesma gaiola com um rato durante todo o período escuro, e na manhã do dia seguinte, a prenhez foi diagnosticada por esfregaço vaginal, observando ao microscópio óptico a presença da fase estro do ciclo estral e de espermatozoides. Neste dia, denominado dia gestacional 0 (DG 0), as ratas foram separadas em caixas individuais e divididas, aleatoriamente, em 6 grupos experimentais, que receberam diariamente os seguintes tratamentos por via oral (gavagem):

- Controle (CON): água; (n=13);
- Óleo de peixe (OP): 1,3 g/kg OP contendo 400 mg/kg de ômega 3 (12% de ácido eicosapentaenóico e 18% de docosahexaenóico (Laboratório Herbarium Botânico S/A, Brasil); (n=12);
- Ácido fólico (AF): 3 mg/kg/dia de ácido fólico (Phloraceae® Farmácia de Manipulação); (n=10);
- Fluoxetina (FLX): 5 mg/Kg/dia de FLX (Daforin® solução oral, EMS, Brasil); (n=17);
- FLX + óleo de peixe (FLX+OP): associação dos tratamentos descritos anteriormente, com 1 hora de intervalo entre as drogas; (n=12);
- FLX + ácido fólico (FLX+AF): associação dos tratamentos descritos anteriormente, com 1 hora de intervalo entre as drogas; (n=9).

O tratamento foi iniciado no DG 0 e seguiu até o dia lactacional pós-natal 21 (DPN 21), abrangendo toda a gestação e lactação.

A dose escolhida de FLX (5mg/Kg) foi baseada em estudos prévios de nosso grupo, onde foi observado que em roedores esta dose não tem efeitos tóxicos na mãe e na prole (FRANCIS-OLIVEIRA et al., 2013; LISBOA et al., 2007).

A prescrição recomendada de OP é 900 mg/dia de ômega 3, correspondendo aproximadamente a 13 mg/kg/dia (humano de 70 kg) e aplicando o método da dosimetria, a dose correspondente é de 53 mg/kg/dia em ratos, e considerando a variação interespecie e o metabolismo do rato dez vezes mais rápido que o humano (SAWADA et al., 1985), adotou-se 400 mg/kg/dia de ômega 3, que corresponde a 1,3 g/kg de OP.

As doses recomendadas de AF para humanos variam de 0,4 a 15 mg/dia. Para gestantes com risco de defeito no fechamento do tubo neural fetal, a dose costuma ser de 5mg/dia, sendo esta a dose escolhida no presente estudo. Em um indivíduo de 70 Kg esta dose equivale a 0,071 mg/kg/dia. Convertendo a dose humana para a dose em ratos por dosimetria $BW^{3/4}$ (EPA, 2006), foi obtido 0,3 mg/kg/dia. Portanto, a dose escolhida foi de 3 mg/kg/dia considerando a proximidade com alguns estudos da literatura (BIENENGRÄBER et al., 2001; FIRAT; KUNTSAL; SIRIN, 2005) e a variação interespecie.

Para eliminar possíveis interferências relacionadas ao tratamento, os grupos CON, FLX, OP e AF receberam, após 1 hora do primeiro tratamento, uma segunda gavagem com água, seguindo o padrão dos grupos FLX+OP e FLX+AF. As fêmeas foram pesadas a cada três dias para acompanhamento do ganho de peso e para correção do volume de droga a ser administrado.

No dia do nascimento, denominado dia pós-natal (DPN) 0, as ninhadas foram pesadas e o número de filhotes vivos e mortos, assim como o número de machos e fêmeas, foi contabilizado. No DPN 4, as ninhadas foram reduzidas, por decapitação, a 10 filhotes (5 machos e 5 fêmeas, quando possível), a fim de que a quantidade de droga recebida pelo filhote através do leite fosse semelhante entre cada prole.

O desmame ocorreu no DPN 21, quando os filhotes foram separados da mãe e mantidos em gaiolas coletivas com 5 animais.

Cada ninhada constituiu uma unidade experimental, e para os experimentos foi utilizada a prole feminina em idade adulta (DPN 75-90), em estro fisiológico, determinado por esfregaço vaginal.

Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 3058.2014.58).

3.2 Avaliação da reatividade da aorta isolada ao agente vasoconstritor Fenilefrina

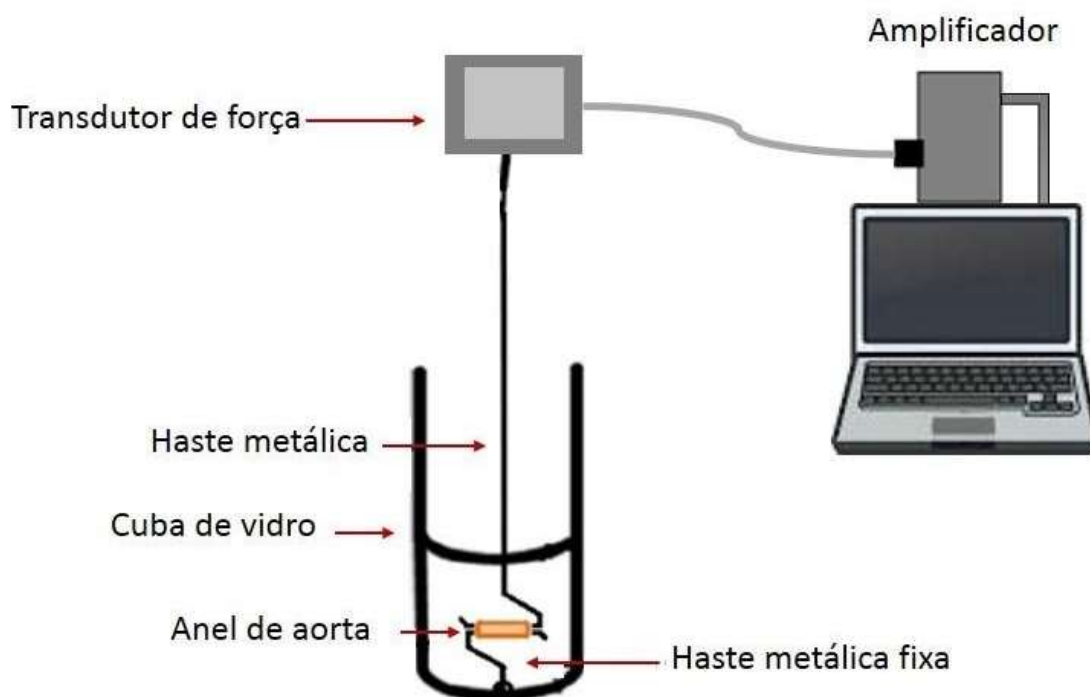
As ratas foram anestesiadas com tiopental sódico (40 mg/kg, ip), e por meio de toracotomia a aorta foi removida, dissecada e seccionada em dois anéis transversais de 5 mm, como descrito por Carvalho et al., 1987 (CARVALHO et al., 1987). De um dos anéis o endotélio (E-) foi removido, com uma haste fina de algodão e no outro o endotélio (E+) foi preservado. Ambos os anéis foram suspensos por um par de ganchos de aço inoxidável, um fixo a base da cuba para órgãos isolados e o outro conectado a um transdutor isométrico (FT03, Grass), acoplado a um amplificador de sinal (AECAD 04, AVS Projetos) e este a um computador (Figura 1). Os seguimentos de aorta permaneceram sob tensão de 1,5 g em solução nutriente de Krebs-Henseleit modificada (concentrações em mM: 118 NaCl; 25 NaHCO₃; 4,7 KCl; 1,2 KH₂PO₄; 1,2 MgSO₄.7 H₂O; 11 glicose; 2,5 CaCl₂.2 H₂O e 0,01 EDTA), gaseificada com mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂, mantidos aquecidos a 37°C durante todo o protocolo experimental.

A avaliação da viabilidade do músculo liso vascular foi feita pela adição às preparações de aorta de cloreto de potássio (KCl) 90 mM, que, através da despolarização da membrana, leva a um influxo de Ca²⁺ pelos canais de cálcio voltagem-dependentes induzindo contração no músculo liso vascular (BRAUNSTEIN et al., 2009). Os anéis que não responderam ao KCl foram descartados.

Para a avaliação da capacidade contrátil nos anéis de aorta com e sem endotélio, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas (CEC) (1 nM a 100 µM) para Fe, agonista α1-adrenérgico. Para comprovação da

presença ou correta remoção do endotélio, ao final de cada curva CEC, às preparações dos anéis de aorta foi aplicada acetilcolina (ACh) ($0,1 \mu\text{M}$), agente vasodilatador dependente do endotélio. O endotélio foi considerado viável quando a ACh causou relaxamento de 70-80% da pré-contracção induzida pela Fe e ausente quando a vasodilatação foi inferior a 5% da pré-contracção.

Figura 1. Reatividade vascular em anéis de aorta isolados.



3.3 Dosagem plasmática de metabólitos do óxido nítrico – (NOx)

As ratas foram anestesiadas com tiopental (40 mg/kg , ip); após toracotomia coletou-se o sangue, por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado (3000 rpm , 10 minutos , 4°C), o soro coletado e armazenado a -80°C . Os níveis NOx foram avaliados indiretamente por meio da determinação da concentração de nitritos plasmáticos, utilizando uma adaptação da técnica descrita por Navarro-González et al. (1998). O método de detecção baseia-se na redução de nitrato a nitrito, mediada por reações de óxido-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotização e detecção colorimétrica do azo composto formado pela adição do reagente de Griess. A quantificação de NOx foi realizada a 550

nm em uma leitora de microplacas (Perkin Elmer®, Waltham, MA, EUA), A concentração de NOx foi expressa em μM .

3.4 Dosagem de homocisteína (HCY) plasmática

Após anestesia e toracotomia das ratas de cada grupo experimental, o sangue foi coletado em tubos com heparina de lítio, centrifugado (3000 rpm, 10 minutos, 4°C) e o plasma coletado e armazenado a -80°C. A dosagem foi feita pelo método de imunoenensaio por quimioluminescência (SHIPCHANDLER; MOORE, 1995), com o kit Reagente ARCHITECT Homocysteine. O método envolve a redução da HCY ligada ou dimerizada (oxidada) da amostra pelo ditiotreitol a HCY livre, conversão enzimática desta a S-adenosil homocisteína, quantificada com anticorpos monoclonais específicos marcados com fluorescência. A reação quimioluminescente resultante foi detectada pela ótica do ARCHITECT System e o resultado expresso em μM .

3.5 Análise estatística

Inicialmente, uma análise exploratória foi conduzida para avaliar a normalidade e homogeneidade de cada variável (teste de Bartlett). As variáveis que apresentaram normalidade de distribuição e homogeneidade foram analisadas por ANOVA de uma ou duas vias seguido do Teste de Bonferroni. Para as outras variáveis, foi usado o teste de Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn. Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M. (Prism 6 for Windows, version 6.0, GraphPad Software, Inc). Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

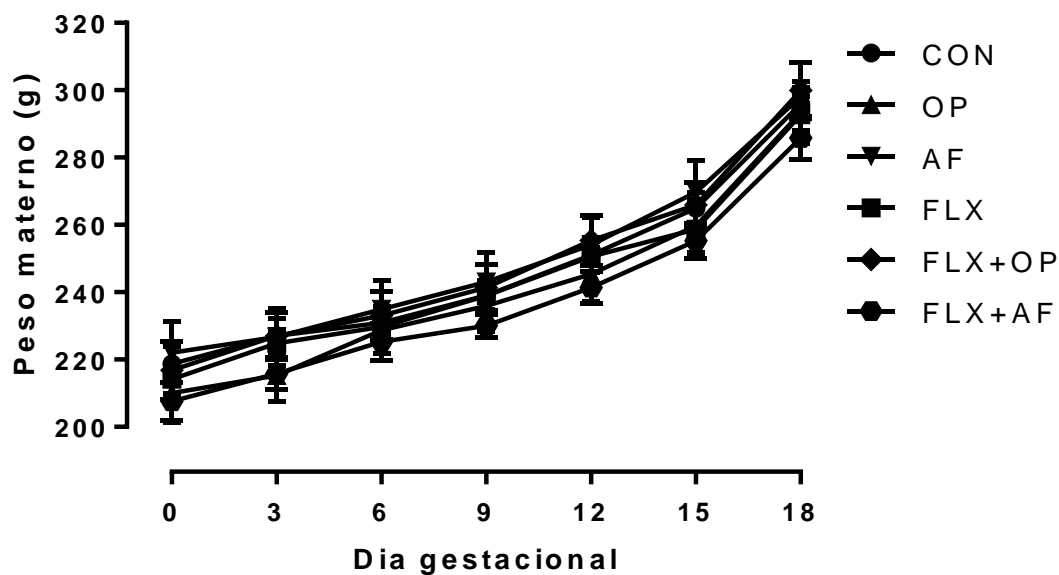
4.1 Avaliação da toxicidade dos tratamentos e peso da prole adulta

As fêmeas tratadas com FLX, OP, AF e associações durante a gestação e amamentação e a prole exposta não apresentaram alterações no ganho de peso durante a gestação e a lactação, tampouco no tamanho das ninhadas (Tabela 1; Figura 1; Figura 2; Figura 3). Na vida adulta, a massa corpórea de ratas FLX ($202,0 \text{ g} \pm 5,0$ (17)), FLX+OP ($202,6 \pm 5,3$ (12)), FLX+AF ($201,3 \pm 7,0$ (9)), OP ($210,0 \pm 3,7$ (12)) e AF ($215,6 \pm 4,3$ (10)) foi semelhante a das ratas controle ($208,4 \text{ g} \pm 5,2$ (13)).

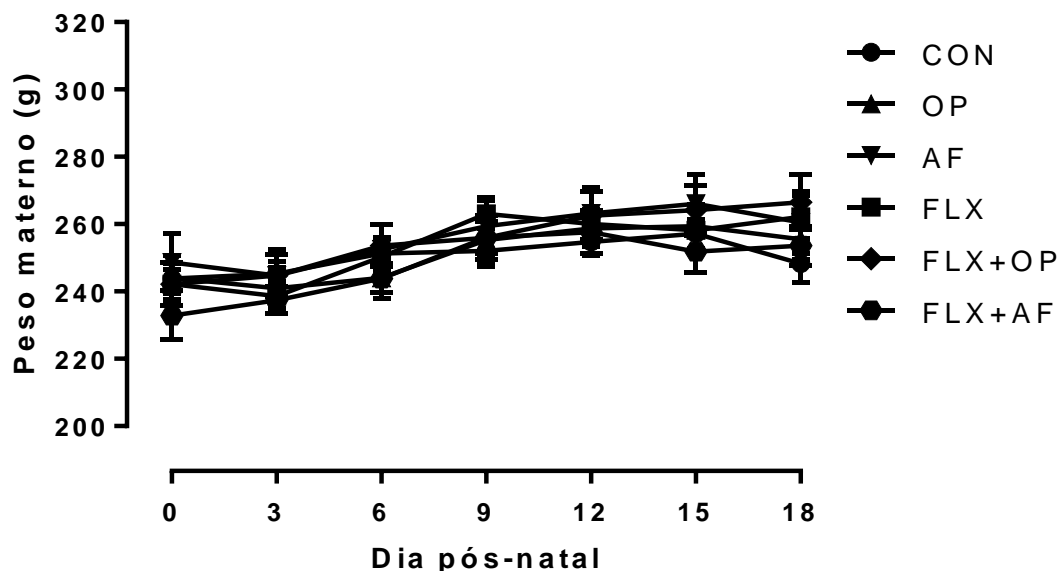
Tabela 1: Parâmetros biológicos avaliados nas ratas prenhes e filhotes expostos à água (CON), OP e AF, em monoterapia ou associados à FLX. Do DG 0 ao dia DPN 18 para as mães e ao DPN 21 para os filhotes.

Grupos	Ganho de peso materno durante a gestação (g)	Peso da ninhada ao nascer (g)	Número de filhotes/ninhada
CON	$77,15 \pm 5,0$ (13)	$64,0 \pm 1,8$ (13)	$11,17 \pm 0,38$ (13)
OP	$83,33 \pm 4,57$ (12)	$71,9 \pm 3,5$ (12)	$12,0 \pm 0,47$ (12)
AF	$76,0 \pm 4,24$ (10)	$66,5 \pm 1,6$ (10)	$11,1 \pm 0,31$ (10)
FLX	$78,65 \pm 3,62$ (17)	$68,13 \pm 1,8$ (17)	$11,65 \pm 0,24$ (17)
FLX+OP	$83,08 \pm 4,2$ (12)	$67,4 \pm 3,9$ (12)	$11,83 \pm 0,62$ (12)
FLX+AF	$78,33 \pm 2,9$ (9)	$67,8 \pm 2,14$ (9)	$11,11 \pm 0,45$ (9)

Entre parênteses está o número de animais por grupo (n). ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni.

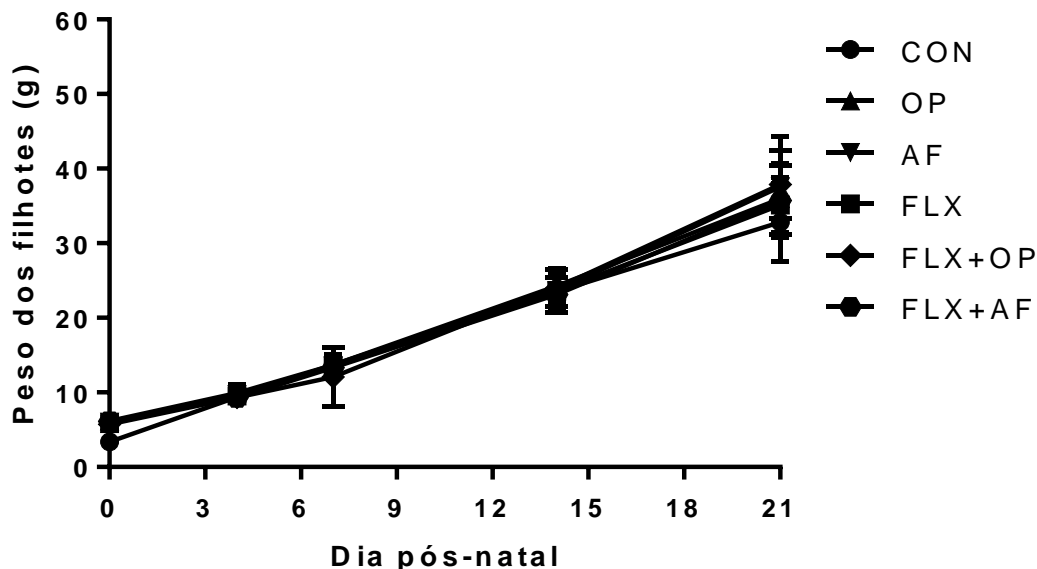
Figura 2: Acompanhamento do peso materno durante a gestação.

Ratas expostas à água (CON, n=13), à fluoxetina (FLX, n=17), ao óleo de peixe (OP, n=12) e ao ácido fólico (AF, n=10), FLX+OP (n=12) e FLX+AF (n=9) durante a gestação. ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni.

Figura 3: Acompanhamento do peso materno durante a lactação.

Ratas expostas à água (CON, n=13), à fluoxetina (FLX, n=17), ao óleo de peixe (OP, n=12) e ao ácido fólico (AF, n=10), FLX+OP (n=12) e FLX+AF (n=9) durante a lactação. ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni.

Figura 4: Acompanhamento do peso dos filhotes durante a lactação.



Filhotes expostos à água (CON, n=13), à fluoxetina (FLX, n=17), ao óleo de peixe (OP, n=12) e ao ácido fólico (AF, n=10), FLX+OP (n=12) e FLX+AF (n=9) pela exposição materna durante gestação e lactação. ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni.

4.2 Exposição à FLX durante gestação e lactação reduz a resposta aórtica a Fe na presença do endotélio

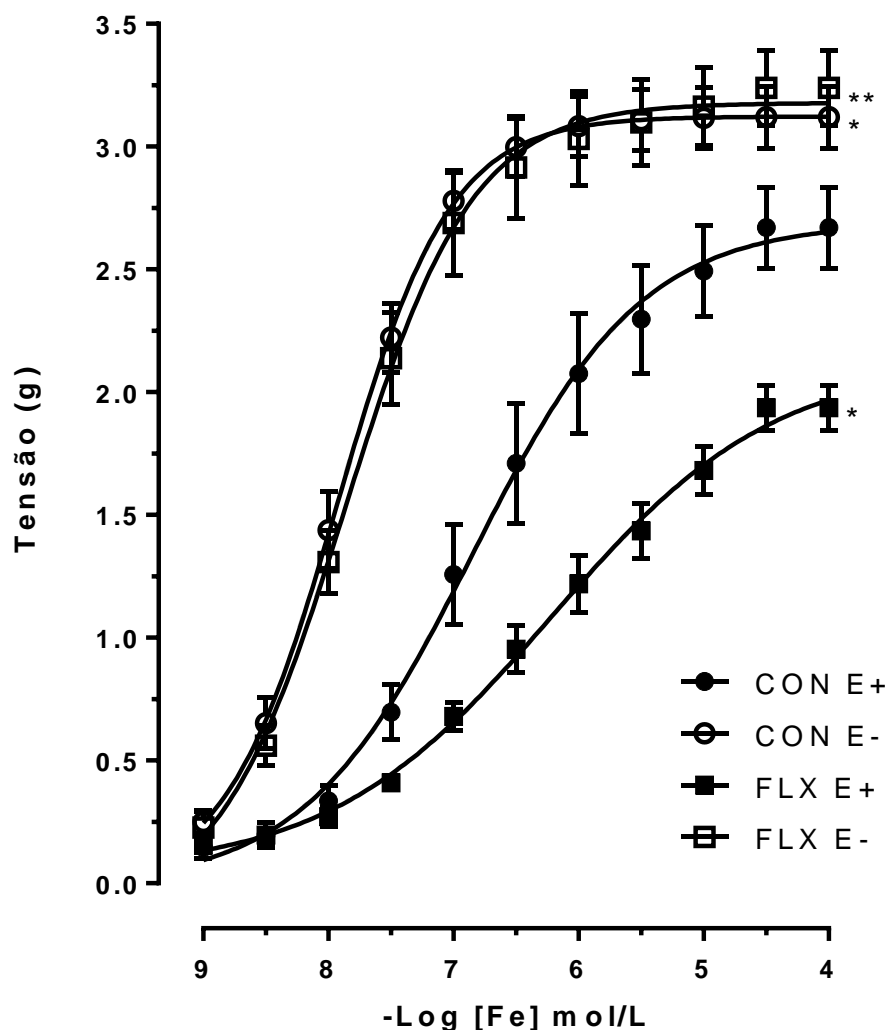
A Fe promoveu contração concentração-dependente nos anéis de aorta E+ e E- de ratas CON e FLX (Figura 4). Anéis de aorta E+ isolados de ratas FLX apresentaram redução na Rmax para Fe, quando comparados aos anéis E+ de ratas CON (Figura 4). Os anéis E- apresentaram maior Rmax e pD2 para Fe em comparação com anéis E+ de ratas CON e FLX. Nenhuma diferença foi observada entre CON e FLX em relação à contração dos anéis E- (Figura 4). Rmax e pD2 para Fe em anéis E+ e E- estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Resposta máxima e pD2 (log negativo da concentração do agonista resultando em 50%) em anéis de aorta com ou sem endotélio.

Grupo	Com endotélio (E+)		Sem endotélio (E-)	
	Rmax	pD2	Rmax	pD2
CON	2,60 ± 0,15 (10)	6,37 ± 0,22 (13)	3,20 ± 0,14 (13)*	7,91 ± 0,07 (10)*
OP	2,38 ± 0,13 (10)	6,17 ± 0,27 (9)	2,96 ± 0,12 (12)#	7,11 ± 0,27 (11)#
AF	2,17 ± 0,14 (10)	6,26 ± 0,23 (8)	2,86 ± 0,24 (10)\$	7,11 ± 0,33 (8)\$
FLX	1,96 ± 0,09 (17)*	6,24 ± 0,21 (15)	3,16 ± 0,14 (17)**	7,62 ± 0,25(15)**
FLX+OP	2,13 ± 0,08 (12)*	6,06 ± 0,24 (12)	2,89 ± 0,09 (11)@	7,57 ± 0,16 (11)@
FLX+AF	2,10 ± 0,14 (8)*	6,85 ± 0,24 (9)	2,80 ± 0,12 (8)%	6,91 ± 0,39 (8)%

Contração induzida por fenilefrina (Fe) em anéis de aorta isolados de ratas expostas à água (CON), à fluoxetina (FLX), ao óleo de peixe (OP) e ao ácido fólico (AF) associados ou não à FLX durante exposição maternal. Rmax é a resposta máxima (g de tensão) para Fe e pD2 é o log negativo da concentração do agonista resultando em 50% da Rmax. A contração induzida por Fe foi avaliada em anéis de aorta com endotélio (E+) ou sem (E-). Os valores expressos como média ± E.P.M. (n) é o número de ratas/grupo. * $p < 0,05$ vs CON E+; ** $p < 0,05$ vs FLX E+; # $p < 0,05$ vs OP E+; \$ $p < 0,05$ vs AF E+; @ $p < 0,05$ vs FLX+OP E+; % $p < 0,05$ vs FLX+AF E+. ANOVA duas vias seguida do teste de Bonferroni. (n) é o número de ratas/grupo.

Figura 5: Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100 μ mol/L) obtida em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio.

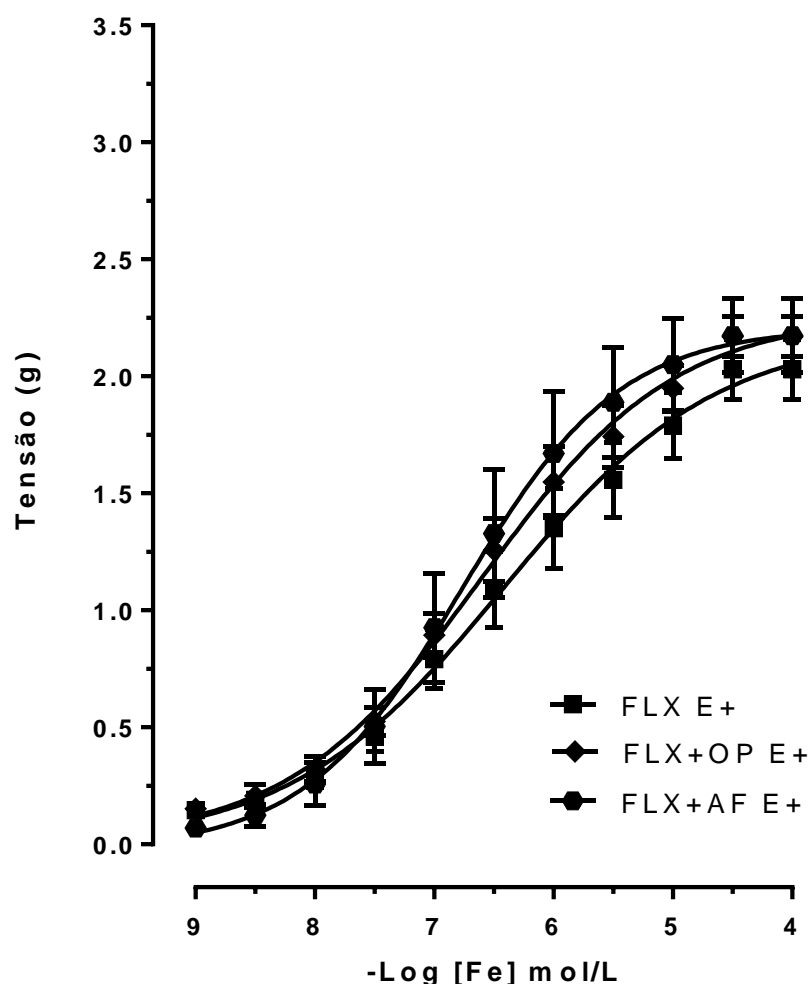


Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100 μ mol/L) obtida em anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio isolados da prole feminina adulta de mães tratadas durante gestação e lactação com água (CON: E+ (n=10); E- (n=13)) ou fluoxetina (FLX: E+ e E- (n=17)). Valores expressos como média \pm E.P.M. * p <0,05 vs resposta máxima do CON E+; ** p <0,05 vs resposta máxima do FLX E+. ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni.

4.3 As associações de FLX com OP e AF não previnem a redução na resposta da aorta para Fe

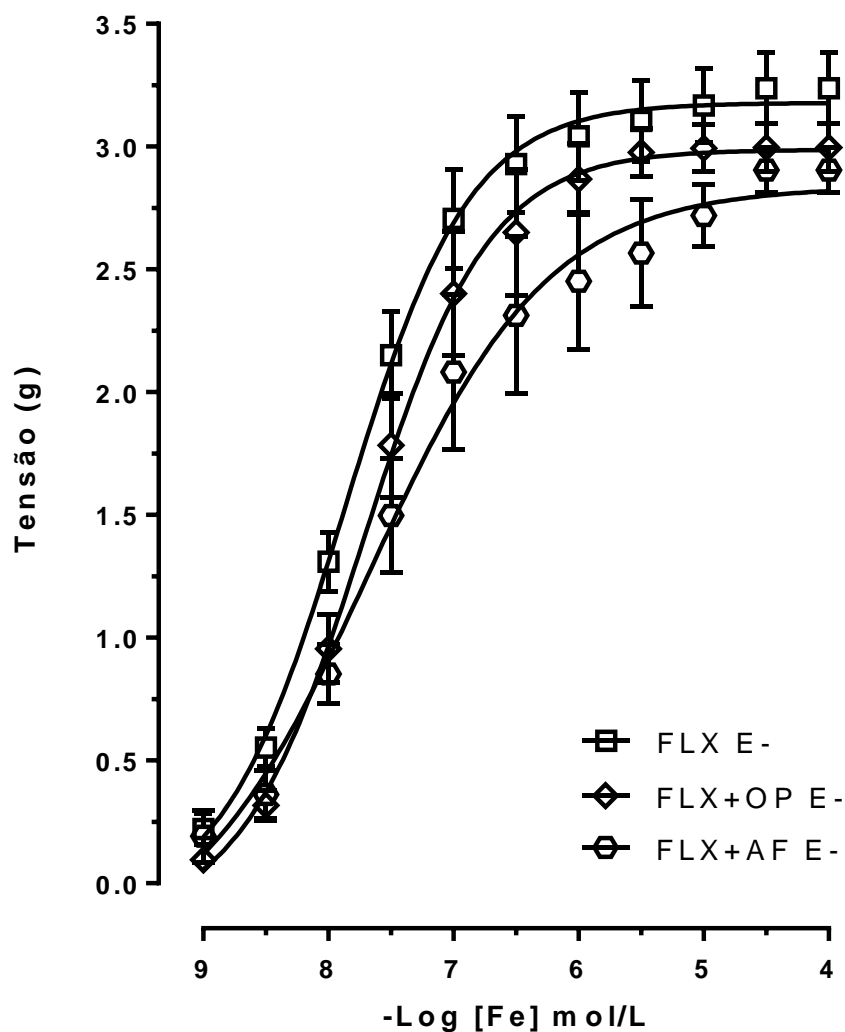
A Rmax e a pD2 para Fe foram similares entre os anéis E+ (Figura 5) e E- (Figura 6) isolados de ratas FLX+OP, FLX+AF e FLX. Rmax e pD2 a Fe também foram similares entre os anéis E+ (Figura 7) e E- (Figura 8) isolados de ratas OP, AF e CON (Tabela 2).

Figura 6: Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100 μ mol/L) obtida em anéis de aorta com endotélio (E+).



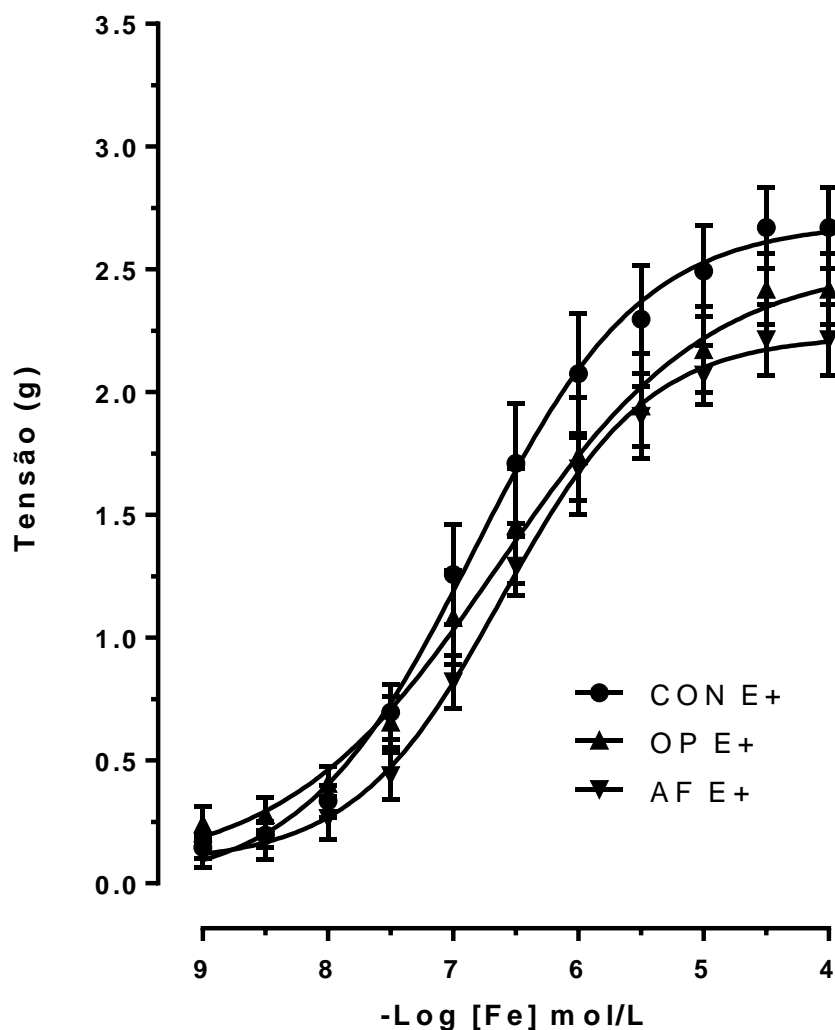
Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100 μ mol/L) obtida em anéis de aorta com (E+) isolados da prole feminina adulta de mães tratadas durante gestação e lactação com fluoxetina (FLX; n=17) em monoterapia ou associada ao óleo de peixe (FLX+OP; n=12) ou ácido fólico (FLX+AF; n=8). Valores expressos como média \pm E.P.M. ANOVA de uma via.

Figura 7: Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100 μ mol/L) obtida em anéis de aorta sem endotélio (E-).



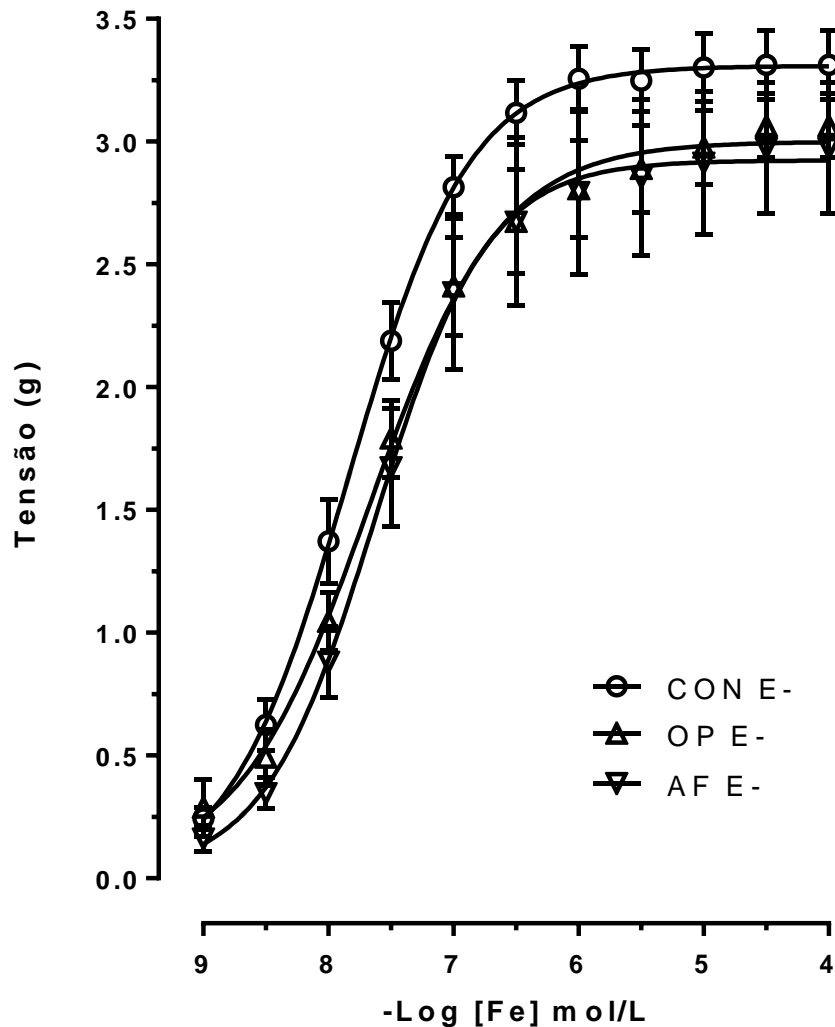
Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100 μ mol/L) obtida em anéis de aorta sem endotélio isolados da prole feminina adulta de mães tratadas durante gestação e lactação com fluoxetina (FLX; n=17) em monoterapia ou associada ao óleo de peixe (FLX+OP; n=11) ou ácido fólico (FLX+AF; n=8). Valores expressos como média \pm E.P.M. ANOVA de uma via.

Figura 8: Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100 μ mol/L) obtida em anéis de aorta com endotélio (E+).



Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100 μ mol/L) obtida em anéis de aorta com endotélio (E+) isolados da prole feminina adulta de mães tratadas durante gestação e lactação com água (CON; n=13), óleo de peixe (OP; n=12) e ácido fólico (AF; n=10). Valores expressos como média \pm E.P.M. ANOVA de uma via.

Figura 9: Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100 μ mol/L) obtida em anéis de aorta sem endotélio.

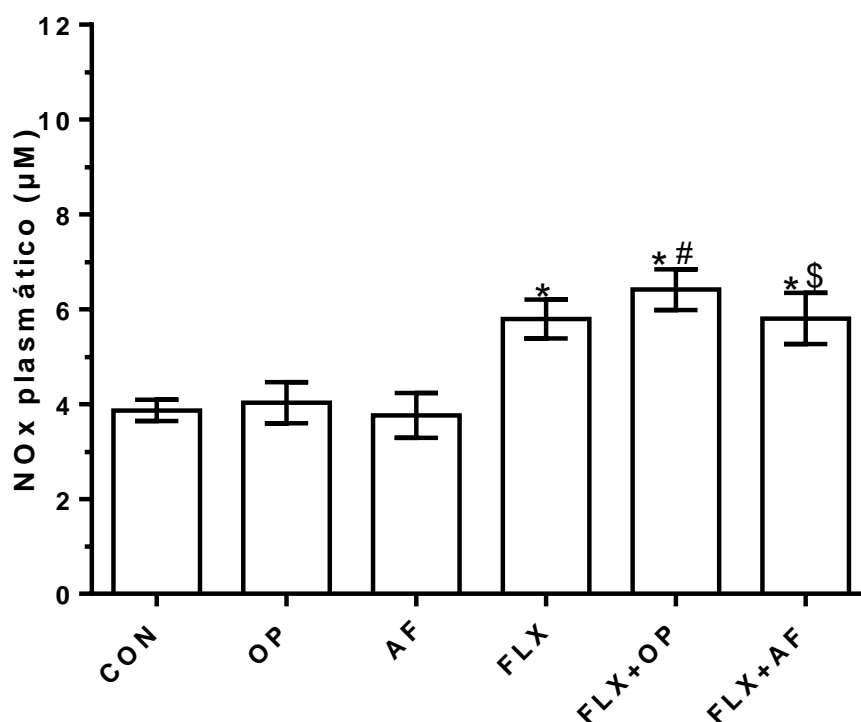


Curva concentração-efeito cumulativa para fenilefrina (Fe - 1nmol/L–100 μ mol/L) obtida em anéis de aorta sem endotélio (E-) isolados da prole feminina adulta de mães tratadas durante gestação e lactação com água (CON; n=10), óleo de peixe (OP; n=11) e ácido fólico (AF; n=10). Valores expressos como média \pm E.P.M. ANOVA de uma via.

4.4 Níveis plasmáticos de óxido nítrico e homocisteína

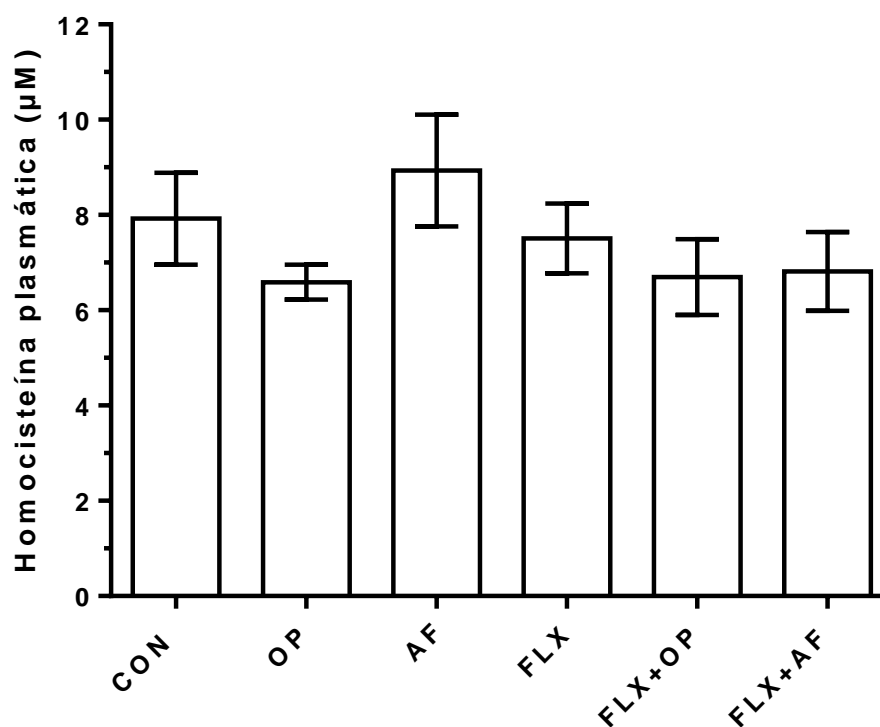
Os níveis plasmáticos de NOx foram similares entre os grupos OP, AF e CON e entre FLX, FLX+OP e FLX+AF. Por outro lado, como demonstrado na Figura 9, o NOx plasmático de ratas expostas à FLX, FLX+OP e FLX+AF durante o desenvolvimento foi maior quando comparado com os de ratas CON. Os níveis plasmáticos de HCY foram similares entre os grupos (Figura 10).

Figura 10: Níveis plasmáticos de metabólitos do NO (NOx) na prole feminina adulta exposta à água (CON), ao óleo de peixe (OP), ao ácido fólico (AF), à fluoxetina (FLX), FLX+OP e FLX+AF durante gestação e lactação.



Prole feminina de mães tratadas durante gestação e lactação com água (CON; n=7), óleo de peixe (OP; n=7), ácido fólico (AF; n=8), fluoxetina (FLX; n=8), FLX+OP (n=8) e FLX+AF (n=9). Valores expressos como média ± E.P.M. * $p < 0.05$ vs ratas CON; # $p < 0.05$ vs OP; \$ $p < 0.05$ vs AF. ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni.

Figura 11: Concentração de homocisteína plasmática na prole feminina adulta exposta à água (CON), ao óleo de peixe (OP), ao ácido fólico (AF), à fluoxetina (FLX), FLX+OP e FLX+AF durante gestação e lactação.



Prole feminina de mães tratadas durante gestação e lactação com água (CON; n=6), óleo de peixe (OP; n=7), ácido fólico (AF; n=9), fluoxetina (FLX; n=6), FLX+OP (n=7) e FLX+AF (n=9). Valores expressos como média \pm E.P.M. ANOVA de uma via.

5 DISCUSSÃO

Apesar da relativa segurança, em humanos, a exposição durante a gestação e lactação à FLX e aos níveis elevados de serotonina, decorrentes do uso deste fármaco, vem sendo associada a prejuízos no desenvolvimento fetal, como nascimento prematuro (OLIVIER et al., 2013), hipertensão pulmonar ao nascer (CHAMBERS et al., 2006) e estenose da valva pulmonar (DIAV-CITRIN et al., 2008).

O presente estudo confirmou estudo prévio de nosso laboratório (HIGASHI, CM; SILVA, MA; FACIO, TG; HIGACHI, L; AKAMINE, EH; CARVALHO, MHC; PELOSI, GG; BARBOSA, DS; GERARDIN, DCC; MOREIRA, EG; CERAVOLO, 2016) (Higashi et al., *submetido para publicação*) demonstrando que a exposição intrauterina e durante a lactação à FLX promoveu diminuição da resposta contrátil na aorta da prole feminina adulta, por mecanismo dependente do endotélio.

O endotélio modula a contração e o relaxamento do músculo liso vascular por meio de substâncias vasoativas, classificadas como fatores relaxantes (EDRFs) e fatores contráteis (EDCFs) (FURCHGOTT, 1989; VANHOUTTE et al., 2009). Dentre os EDRFs, o NO é o melhor caracterizado e o principal responsável pelo relaxamento e modulação da contração da aorta (VANHOUTTE et al., 2009). Neste trabalho, as ratas do grupo FLX apresentaram aumento de NO plasmático. De fato, estudo prévio de nosso laboratório demonstrou que L-NAME, inibidor da NO sintase (NOS), reverte a hiporreatividade da aorta em ratas FLX (dados não publicados). Dessa forma, é possível sugerir que o NO seja responsável pela maior modulação endotelial observada na aorta de ratas FLX. Ao contrário do aqui demonstrado, o trabalho de Fornaro et al. (2007) descreve que a exposição pré-natal de ratos à FLX, durante dos DG 11 a DG 21 não interfere com a contração da artéria pulmonar dos fetos expostos. As divergências entre os estudos podem estar relacionadas à dose utilizada (10 mg/kg), à fase de exposição, à idade em que os ratos foram utilizados: em nosso estudo, as ratas foram avaliadas na idade adulta e no outro, foram avaliados fetos, além de os referidos autores não terem estratificado os animais por sexo.

É interessante destacar que nossos achados, em ratas expostas à FLX durante o desenvolvimento, estão de acordo com os observados em ratos e humanos adultos expostos à FLX. Em aorta de ratos adultos tratados com FLX cronicamente (CRESTANI et al., 2011) e em mulheres adultas o tratamento com FLX aumentou os níveis plasmáticos de NO (HANTSOO et al., 2014), sugerindo que o aumento dos níveis de serotonina, induzido pela FLX, também pode contribuir para a menor contração vascular e para maior produção de NO.

De fato, a serotonina liberada pelas plaquetas, por estímulos fisiológicos, pode desencadear mudanças no tônus vascular ativando a eNOS, por meio dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1D} presentes na membrana das células endoteliais, aumentando assim a produção de NO (FLAVAHAN, 1995; SHIMOKAWA; FLAVAHAN; VANHOUTTE, 1991). Dessa forma, podemos aventar a hipótese de que o aumento da serotonina *in utero* poderia causar modificações no sistema NO que persistiriam até a vida adulta. Entretanto, outros estudos serão necessários para confirmar esta hipótese.

No presente estudo, foi demonstrado, pela primeira vez, que as associações de FLX com OP ou AF não reverteram o prejuízo na contração vascular, nem tampouco tiveram efeito sobre o aumento de NO plasmático, induzidos pela exposição à FLX durante o desenvolvimento. Além disso, foi demonstrado que os tratamentos maternos com OP e AF, nas doses aqui empregadas, foram seguros sobre a contração da aorta isolada da prole adulta.

Em ratos, vem sendo descrito que o OP, ou componentes isolados do OP, podem aumentar os níveis de serotonina e assim, ter atividade antidepressiva e ainda potencializar o efeito antidepressivo da FLX. De fato, Vines et al. (2012) descrevem que a prole masculina, de ratas tratadas com OP durante a gestação e amamentação, apresenta aumento de serotonina no hipocampo, semelhante ao descrito para o uso crônico de FLX em ratos adultos. Em humanos, fora da gestação, a associação de FLX com EPA, um dos ativos do OP, apresenta maior eficácia terapêutica em comparação com as monoterapias de FLX ou EPA (JAZAYERI et al., 2008). No presente estudo foi verificado que o OP não interferiu sobre a hiporreatividade da aorta da prole exposta induzida pela exposição à FLX. Assim, é possível aventar a hipótese de que os efeitos indesejáveis observados na prole estejam relacionados

diretamente com a exposição à FLX e/ou ao aumento dos níveis de serotonina induzidos pelo antidepressivo em fases críticas do desenvolvimento do sistema serotoninérgico, causando alterações que persistiriam por toda a vida da prole. Entretanto, outros estudos serão necessários para confirmar esta hipótese.

No presente estudo, a dose utilizada de AF (3 mg/Kg/dia) em associação com FLX ou sozinha não previne os efeitos vasculares da FLX, porém se apresentou segura para a prole exposta durante o desenvolvimento. Ainda não existem trabalhos que avaliem a função vascular da prole exposta ao AF ou à associação com FLX durante o desenvolvimento. Por outro lado, existem estudos que avaliam diferentes parâmetros consequentes da exposição da associação AF e FLX. Por exemplo, nosso grupo mostrou que na dose de 8mg/Kg/dia, o AF previne em machos as alterações de metilação em áreas específicas do SNC e também previne o aumento da latência na resposta nociceptiva da prole masculina, induzidas pela exposição à FLX durante a gestação e amamentação (TOFFOLI et al., 2014). É interessante destacar, que além das diferenças nos parâmetros avaliados, a dose de AF utilizada neste referido trabalho foi maior do que a utilizada no presente estudo.

As doses escolhidas de AF e OP foram baseadas em doses recomendadas para humanos na prevenção de defeitos no tubo neural fetal durante o desenvolvimento embrionário ou como suplementação. As doses de FLX, AF e OP, assim como as associações utilizadas neste estudo foram seguras tanto para as mães como para as ninhadas. Os tratamentos mantiveram os níveis plasmáticos de HCY, que em altas concentrações pode causar danos no endotélio, aumentando o risco para doenças cardiovasculares (SACHDEV, 2004). Portanto, é possível sugerir que o OP e o AF, usados em doses equivalentes às recomendadas a mulheres grávidas sejam seguros para a função vascular da prole exposta, porém não previnem os efeitos adversos da exposição à FLX durante o desenvolvimento.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que as associações de FLX com OP e AF não corrigiram a hiporreatividade da aorta e o aumento dos níveis plasmáticos de metabólitos do NO na prole feminina causada pela exposição à FLX durante a gestação e a lactação. Ainda, que o tratamento isolado com OP e AF não interferiu na contração da aorta induzida por Fe, assim como não alterou os níveis plasmáticos de NO e HCY, sugerindo que a exposição a estes compostos foi segura para a função vascular da prole feminina exposta durante o desenvolvimento.

7 REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, J. A.; EMORY, E. Executive function and the frontal lobes: A meta-analytic review. **Neuropsychology Review**, v. 16, n. 1, p. 17–42, 2006.
- BELIK, J. Fetal and Neonatal Effects of Maternal Drug Treatment for Depression. **Seminars in Perinatology**, v. 32, n. 5, p. 350–354, 2008.
- BIENENGRÄBER, V. et al. Is it possible to prevent cleft palate by prenatal administration of folic acid? An experimental study. **Cleft Palate-Craniofacial Journal**, v. 38, n. 4, p. 393–398, 2001.
- BOURKE, C. H.; STOWE, Z. N.; OWENS, M. J. Prenatal antidepressant exposure: clinical and preclinical findings. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 2, p. 435–65, 2014.
- BOUSHEY, C. J. et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 274, n. 13, p. 1049–1057, 1995.
- BRASIL. Programa Nacional de Suplementação de Ferro: manual de condutas gerais. p. 24, 2013.
- BRAUNSTEIN, T. H. et al. The role of L- and T-type calcium channels in local and remote calcium responses in rat mesenteric terminal arterioles. **Journal of Vascular Research**, v. 46, n. 2, p. 138–151, 2009.
- CARVALHO, M. H. et al. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. **Journal of hypertension**, v. 5, n. 3, p. 377–82, 1987.
- CHAMBERS, C. D. et al. Selective serotonin-reuptake inhibitors and risk of persistent pulmonary hypertension of the newborn. **The New England journal of medicine**, v. 354, n. 6, p. 579–87, 2006.
- CHOW, T. W. et al. A validated enantioselective assay for the simultaneous quantitation of (R)-, (S)-fluoxetine and (R)-, (S)-norfluoxetine in ovine plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 5-6, p. 349–358, 2011.
- CRESTANI, C. C. et al. Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 2-3, p. 527–533, 2011.
- DELIGIANNIDIS, K. M.; FREEMAN, M. P. Complementary and Alternative Medicine for the Treatment of Depressive Disorders in Women. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 441–463, 2010.
- DIAB-CITRIN, O. et al. Paroxetine and fluoxetine in pregnancy: A prospective, multicentre, controlled, observational study. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 695–705, 2008.
- FAVARO, P. D 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. 487–494, 2008.
- FIRAT, D.; KUNTSAL, L.; SIRIN, Y. Protective effects of prenatal administration of folic acid on retinoic acid-induced cellular damages of Meckel's cartilage in rats. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 205, n. 1, p. 27–36, 2005.
- FLAVAHAN, N. Endothelial Cell Signaling and Endothelial Dysfunction. **American Journal of Hypertension**, v. 8, n. 5, p. 28S–41S, 1995.
- FORNARO, E. et al. Prenatal exposure to fluoxetine induces fetal pulmonary hypertension in the rat. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 176, n. 10, p. 1035–1040, 2007.
- 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.
- FURCHGOTT, F. Endothelium-derived factors. **The FASEB Journal**, v. 3, p. 2007–2018, 1989.
- 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. 416–419, 2008.
- HANTSOO, L. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors and endothelial function in women. **Journal of women's health (2002)**, v. 23, n. 7, p. 613–8, 2014.
- JAZAYERI, S. et al. Comparison of therapeutic effects of omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid and fluoxetine, separately and in combination, in major depressive disorder. **The Australian and New Zealand journal of psychiatry**, v. 42, n. 3, p. 192–198, 2008.
- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894–902, 2008.
- LAURENCE, K. M. et al. 1981_Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception. **British medical journal (Clinical research ed.)**, v. 282, n. 6275, p. 1509–1511, 1981.
- 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.
- MCNAMARA, R. K.; CARLSON, S. E. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, n. 4-5, p. 329–349, 2006.
- MCQUAY, H. J. et al. A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. **Pain**, v. 68, n. 2-3, p. 217–227, dez. 1996.
- NAVARRO-GONZÁLVIZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J.

Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 679–681, mar. 1998.

NEBIGIL, C. G. et al. Ablation of serotonin 5-HT(2B) receptors in mice leads to abnormal cardiac structure and function. **Circulation**, v. 103, n. 24, p. 2973–2979, 2001.

NONACS, R.; COHEN, L. S. Assessment and treatment of depression during pregnancy: An update. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 547–562, 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. 2–11, 2008.

OLIVIER, J. D. A. et al. The effects of maternal depression and maternal selective serotonin reuptake inhibitor exposure on offspring. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, n. May, p. 73, 2013.

PEARLSTEIN, T. Depression during Pregnancy. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 29, n. 5, p. 754–764, 2015.

PRIOR, PEDRO LUIS; FERNANDES, J. C. (N-3) Fatty Acids : Molecular Role and Clinical Uses in Psychiatric Disorders. **American Society for Nutrition. Adv. Nutr**, p. 257–265, 2012.

REFSUM, H. et al. Facts and Recommendations about Total Homocysteine Determinations: An Expert Opinion. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 3–32, 2004.

SACHDEV, P. Homocysteine and neuropsychiatric disorders. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 26, n. 1, p. 50–56, 2004.

SACKETT, J. C.; WELLER, R. A; WELLER, E. B. Inhibitor Use During Pregnancy. **Current Psychiatry Reports**, v. 11, p. 253–257, 2009.

SAWADA, Y. et al. Prediction of the disposition of nine weakly acidic and six weakly basic drugs in humans from pharmacokinetic parameters in rats. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 477–492, 1 out. 1985.

SHIMOKAWA, H.; FLAVAHAN, N. A.; VANHOUTTE, P. M. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. **Circulation**, v. 83, n. 2, p. 652–660, 1991.

SHIPCHANDLER, M. T.; MOORE, E. G. Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx?? analyzer. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 991–994, 1995.

SKILTON, M. R. et al. Fetal growth , omega-3 (n 2 3) fatty acids , and progression of subclinical atherosclerosis : preventing fetal origins of disease ? The Cardiovascular Risk in Young Finns Study 1 – 3. **The American Journal of clinical Nutrition**, v. 3, p. 58–65, 2013.

STAHL, S. M. Stahl ' s Essential Psychopharmacology. **Cambridge University**

Press, v. 70, n. 3, p. 421g–421, 1 mar. 2011.

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. 142–147, 2014.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiologica**, v. 196, n. 2, p. 193–222, 2009.

VIEIRA, M. L. et al. Could maternal exposure to the antidepressants fluoxetine and St. John's Wort induce long-term reproductive effects on male rats? **Reproductive Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 102–107, 2013.

VINES, A. et al. The role of 5-HT 1A receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: A possible antidepressant mechanism. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 184–191, 2012.

WILSON, F. A et al. Effects of methyl-deficient diets on methionine and homocysteine metabolism in the pregnant rat. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 302, n. 12, p. E1531–40, 2012.

ZOHAR, J.; WESTENBERG, H. G. Anxiety disorders: a review of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors. **Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum**, v. 403, n. 6, p. 39–49, set. 2000.

ANEXOS

Anexo A – Parecer do comitê de ética e uso de animais



**Universidade
Estadual de Londrina**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 074/2014

Londrina, 15 de Maio de 2014

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 18 de Março de 2014 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação da eficácia do óleo de peixes e do ácido fólico em reverter alterações funcionais induzidas pela exposição à fluoxetina durante o desenvolvimento", registrado sob o processo CEUA nº 3058.2014.58, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados o projeto está **aprovado** para execução, entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 126 ratos Wistar para geração parental, com idade de 75 dias, sendo 32 machos e 94 fêmeas, provenientes do Biotério Central da UEL. Também serão utilizados 816 ratos wistar com idade de 35 e 75 dias, proveniente do acasalamento da geração parental, totalizando 942 ratos. O projeto tem como objetivo avaliar se a associação de ácido fólico ou óleo de peixe com fluoxetina pode prevenir os efeitos indesejáveis do antidepressivo sobre os sistemas cardiovascular e nervoso central da prole exposta durante a gestação e amamentação. Para isto, os ratos serão acasalados e no dia que as fêmeas indicarem prenhez serão divididas em 6 grupos: G1 controle que só receberão água; G2 animais que receberão fluoxetina 3mg/kg por dia; G3 animais que receberão ácido fólico de 3mg/kg por dia; G4 receberão óleo de peixe 1,3g/kg ; G5 fluoxetina + ácido fólico; G6 fluoxetina + óleo de peixe. Os tratamentos estender-se-ão por toda a prenhez e amamentação, após o nascimento os filhotes são monitorados quanto ao peso e desenvolvimento físico. No 75º dia de vida os filhotes serão eutanasiados para avaliação funcional do sistema nervoso central e do sistema cardiovascular. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 24 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo de pesquisa aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordalmente,



Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Vem Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Sma. Sra.
Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira
Coordenadora do projeto
Departamento de Ciência Fisiológicas
Centro de Ciências Biológicas
Com cópia para Sra Egle Maria de Sousa (Chefe de DCA/PROPPG), Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas e Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central do CCB)



Univ. Estadual de Londrina - Rua 5300 - Caixa Postal 6001 - Londrina - Paraná - CEP 86051-900 - Fone: (51) 3371-4000 FAX: (51) 3371-4044 - E-mail: cep@uel.br - Internet: http://www.uel.br
Hospital Universitário/Centro de Ciências de Saúde - Rua Nelson Kubit, 89 - Vila Operária - Fone: (51) 3371-4000 FAX: (51) 3371-4044 e 3371-5000 - Caixa Postal 700 - CEP 86051-900

11/03/14 14:44
02/04/14 10:30
29/04/14