



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO

**CO-EXPOSIÇÃO A ÓLEO DE PEIXE OU ÁCIDO FÓLICO NÃO  
REVERTE EFEITOS NA PROGÊNIE INDUZIDOS PELA  
EXPOSIÇÃO MATERNAL À FLUOXETINA**



Sociedade Brasileira de Fisiologia  
SBFis



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS

**ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO**

---

Londrina  
2016

ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO

**CO-EXPOSIÇÃO A ÓLEO DE PEIXE OU ÁCIDO FÓLICO NÃO  
REVERTE EFEITOS NA PROGÊNIE INDUZIDOS PELA  
EXPOSIÇÃO MATERNAL À FLUOXETINA**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Estefânia Gastaldello  
Moreira

Londrina  
2016

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

Matsumoto, Andressa Keiko.

Co-exposição a óleo de peixe ou ácido fólico não reverte efeitos na progênie induzidos pela exposição maternal à fluoxetina / Andressa Keiko Matsumoto. - Londrina, 2016.  
44 f.:il.

Orientador: Estefânia Gastaldello Moreira.

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. Ácido fólico - Tese. 2. Comportamento - Tese. 3. Fator neutrófico derivado do cérebro - Tese. 4. Fluoxetina - Tese. I. Moreira, Estefânia Gastaldello . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico. III. Título.

ANDRESSA KEIKO MATSUMOTO

**CO-EXPOSIÇÃO A ÓLEO DE PEIXE OU ÁCIDO FÓLICO NÃO  
REVERTE EFEITOS NA PROGÊNIE INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO  
MATERNAL À FLUOXETINA**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Estefânia Gastaldello  
Moreira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Graziela Scaliante Ceravolo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Marcus Vinícius Gomes  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 24 de fevereiro de 2016.

## **DEDICO**

Dedico este trabalho a todos aqueles que, assim como eu, acreditam que através de seu esforço podem mudar o mundo e as pessoas ao redor.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Estefânia G. Moreira, por estar sempre presente durante todo o desenvolvimento deste trabalho, e o conduzi-lo com excelência, além de ser uma excelente cientista.

Aos colegas do Laboratório de Análises Farmacológicas e Toxicológicas e do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Universidade Estadual de Londrina, pelo constante trabalho em equipe e utilização do espaço dos dois laboratórios.

A minha família, pelo apoio geral durante a execução deste projeto.

Aos meus amigos do Programa Multicêntrico na UEL, pelo apoio mútuo em nossos experimentos no Departamento de Ciências Fisiológicas e pela constante troca de ideias e experiências; e aos professores do Programa Multicêntrico na UEL, por todas as orientações e conselhos.

Aos colegas do Laboratório de Pós Graduação do Hospital Universitário e ao Prof. Décio Sabbatini Barbosa, por conceder espaço, tempo e recursos para a execução de parte essencial deste trabalho, por proporcionar um ambiente estimulante para trabalhar, pela troca de idéias e pelos laços de amizade formados, e às alunas de pós graduação: Kamila Landucci, Luciane Higashi e Carine Coneglian, pelo apoio e colaboração para a realização da parte experimental desse trabalho.

A todos os técnicos de laboratório que conheci durante este trabalho, pela excelência nas instruções de técnicas de laboratório e pelo auxílio na execução dos experimentos.

Agradeço a Deus por ter colocado tantas pessoas maravilhosas na minha vida durante a execução deste trabalho, e estendo estes agradecimentos a todos aqueles que podem não estar citados aqui, mas que sabem que fizeram parte deste trabalho. Por fim, agradeço todo o apoio financeiro da Fundação Araucária e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Não tenham dúvida, a hora chega quando Deus quer. Ajam, que Deus agirá!"*

*(Joana D'Arc)*

MATSUMOTO, Andressa Keiko. **Co-exposição a óleo de peixe ou ácido fólico não reverte efeitos na progênie induzidos pela exposição materna à fluoxetina.** 2016. 44 f. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

## RESUMO

O antidepressivo Fluoxetina (FLX) inibidor da recaptura de serotonina tem sido amplamente prescrito para o tratamento de algumas doenças durante gestação e lactação. Apesar dos possíveis efeitos indesejáveis observados na progênie após a exposição materna à FLX, reconhece-se que o não tratar vamente ento da mãe que apresenta indicação clínica de antidepressivo também pode impactar negatiseu bem-estar e o desenvolvimento fetal/recém-nascido. O presente estudo investigou se dois suplementos já usados por mulheres grávidas, por exemplo, o ácido fólico (AF) e óleo de peixe (OP) poderiam minimizar os efeitos em ratos púberes induzidos pela exposição materna à FLX. Ratos Wistar foram tratadas por gavage com FLX (5mg/kg) ou água de torneira associada ou não à AF (3 mg/kg) ou OP (1,3 g/kg) durante a gravidez e lactação. No dia pós-natal 35, os filhotes machos e fêmeas foram submetidos a testes comportamentais (hipofagia induzida pela novidade e labirinto em cruz elevado) ou utilizados para quantificar os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo. Filhotes expostos à FLX apresentaram comportamento similar a ansiedade e menores níveis hipocampais de BDNF que não foram influenciados pela co-exposição com AF ou OP. A exposição à OP resultou em resposta ansiogênica, diminuição dos níveis de BDNF e comportamento alimentar. Considerando que a exposição à AF aumentou BDNF e induziu hiperatividade. Em conclusão, este estudo descreve dados adicionais para ajudar a compreender a neurotoxicidade da FLX no desenvolvimento e avalia a eficácia de dois suplementos para contrariar os efeitos induzidos por FLX. Todavia, AF e OP não foram eficazes como empregue no presente estudo, mas é garantida a busca de alternativas para gerenciar o risco de exposição aos antidepressivos durante a gravidez e/ou lactação.

**Palavras-chave:** Ácido fólico. Comportamento. Fator neurotrófico derivado do cérebro. Fluoxetina. Gestação. Óleo de peixe.

MATSUMOTO, Andressa Keiko. **Co-exposure to fish oil or folic acid does not revert effects in the progeny induced by maternal exposure to fluoxetine.** 2016. 44 p. Dissertation (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

### ABSTRACT

The serotonin reuptake inhibitor antidepressant fluoxetine (FLX) has been widely prescribed for the treatment of some diseases during pregnancy and/or lactation. Despite possible negative effects observed in the progeny after maternal exposure to FLX, it is recognized that not treating a mother who has clinical indication for antidepressants may also impact negatively her well being and the fetal/newborn development. The present study investigated if two supplements already used by pregnant women, i.e., folic acid (FA) and fish oil (FO) could minimize effects in pubertal rats induced by maternal exposure to FLX. Wistar rats were gavaged with FLX (5mg/kg) or tap water associated or not with FA (3mg/kg) or FO (1.3mg/kg) during pregnancy and lactation. At postnatal day 35, male and female pups were submitted to behavioral tests (novelty-suppressed feeding and elevated plus maze) or used to quantify the levels of hippocampal brain derived neurotrophic factor (BDNF). Pups exposed to FLX presented anxiety-like behavior and decreased hippocampal BDNF levels that were not influenced by co-exposure with FA or FO. FO exposure resulted in anxiogenic-like response, decreased BDNF levels and eating behavior whereas FA exposure increased BDNF and induced hyperactivity. In conclusion, this study describes additional data to help understanding the developmental neurotoxicity of FLX and evaluates the efficacy of two supplements to counteract FLX-induced effects. Nevertheless FA and FO were not effective as employed in the present study but the search for alternatives to manage the risk of antidepressant exposure during pregnancy and/or lactation is guaranteed.

**Key Words:** Behavior. Brain derived neurotrophic factor. Fish oil. Fluoxetine. Folic acid. Pregnancy,

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
AA	ácido araquidônico
AF	Ácido Fólico
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i> (Fator Neurtotrófico Derivado do Cérebro)
DHA	ácido docosahexaenóico
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino com Dulbecco)
DPN	Dia Pós Natal
DG	Dia Gestacional
EPA	ácido eicosapentaenoico
FLX	Fluoxetina
HIN	Hipofagia Induzida pela Novidade
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptura de Serotonina
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
OP	Óleo de Peixe
p75NTR	receptor de neurotrofina p75
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i> (Fluoreto de Fenilmetilsulfonila)
PUFAs	<i>Polyunsaturated fatty acid</i> (Ácido graxos poliinsaturados)
SAP	<i>Stretched Attend Posture</i> (Postura Estendida de Atenção)
SERT	Serotonina
TBST	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i> (Tampão Salina Tris com Tween-20)
TMB	<i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i> (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina)
TrkB	receptor de quinases relacionadas com a tropomiosina B

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	11
<b>1 OBJETIVOS</b>	16
<b>2 METODOLOGIA</b>	17
2.1 ANIMAIS	17
2.2 HIPOFAGIA INDUZIDA PELA NOVIDADE	18
2.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	19
2.4 QUANTIFICAÇÃO DO BDNF HIPOCAMPAL - IMUNOENSAIO ELISA	21
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
<b>3 RESULTADOS</b>	24
3.1 ANÁLISE DA TOXICIDADE DO TRATAMENTO	24
3.2 INFLUÊNCIA DA CO-EXPOSIÇÃO AO ÁCIDO FÓLICO E FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO	26
3.2.1 Análise Comportamental	26
3.2.2 Quantificação do BDNF hipocampal dos animais expostos a ácido fólico	29
3.3 INFLUÊNCIA DA CO-EXPOSIÇÃO A ÓLEO DE PEIXE E FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO	30
3.3.1 Análise Comportamental	30
3.3.2 Quantificação do BDNF hipocampal dos animais expostos a óleo de peixe	33
<b>4 DISCUSSÃO</b>	34
<b>5 CONCLUSÕES</b>	38
<b>REFERÊNCIAS</b>	39

## INTRODUÇÃO

Entre os antidepressivos atualmente comercializados, a fluoxetina (FLX), pertencente à classe dos inibidores seletivos da recaptura de serotonina (ISRS), é o antidepressivo mais prescrito no mundo todo sendo a droga de escolha para uso durante o período gestacional (NONACS and COHEN, 2003).

Os ISRS agem inibindo o transportador de serotonina (5-HT) e, com isso, aumentam a disponibilidade desse neurotransmissor no terminal pré-sináptico. Os ISRS têm sido usados com sucesso para o tratamento de depressão em adultos, síndrome pré-menstrual, comportamento obsessivo compulsivo, desordem de pânico, transtorno de ansiedade e estresse pós-traumático (VORHEES *et al.*, 2011).

Mulheres podem fazer uso de antidepressivos durante a gravidez e/ou amamentação por motivos como: já faziam uso do medicamento antes de engravidarem ou adoeceram durante a gravidez ou amamentação e necessitam ser tratadas com o medicamento. Estima-se que 2 a 3% das mulheres grávidas usem antidepressivos (LATTIMORE *et al.*, 2005).

Sabe-se que a FLX atravessa a barreira placentária em humanos e roedores (HENDRICK *et al.*, 2003; POHLAND *et al.*, 1989) e é excretada no leite (HENDRICK *et al.*, 2001; HEIKKINEN *et al.*, 2003; SURI *et al.*, 2002). O uso materno leva a exposição fetal e neonatal a níveis elevados de 5-HT em fases críticas do desenvolvimento do cérebro, sabe-se 5-HT é um regulador chave de vários processos do neurodesenvolvimento, como migração celular, crescimento axonal, potenciação de longo prazo, sinaptogênese, formação de circuitos neurais e neurogênese (HOMBERG *et al.*, 2010; LAUDER, 1990; WHITAKER-AZMITIA, *et al.*, 1995). Além disto, a formação dos núcleos da rafe, que são os principais núcleos serotoninérgicos no encéfalo, é um processo complexo e de múltiplas etapas, sujeito a alterações por várias substâncias que podem entrar em contato com o feto durante a sua formação (KIYASOVA and GASPARG, 2011). Estudos demonstraram que a 5-HT influencia o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central desde a sua ontogenia inicial. Mesmo quando o feto ainda é incapaz de sintetizar 5-HT, receptores serotoninérgicos já estão presentes no córtex cerebral em formação e a placenta produz e supre o feto com 5-HT durante este período, até que a formação dos

núcleos da rafe esteja completa e o feto passe a produzir sua própria 5-HT (BONNIN and LEVITT, 2011).

Lisboa *et al.* (2007) mostraram que exposição à FLX durante a gravidez e amamentação resulta em reduzida atividade locomotora de ratos machos no dia pós-natal 40 (DPN 40) e comportamento similar à depressão em camundongos fêmeas nos DPN 30 e 70. Estudos de Olivier *et al.* (2011) com ratas Wistar expostas a 12mg/kg de FLX do dia gestacional 11 (DG 11) até o nascimento relataram que os filhotes apresentaram comportamento similar à ansiedade.

Ao estudarem a comparação da exposição fetal à fluvoxamina e à FLX entre ratos e humanos, em termos de transferência placentária, Noorlander *et al.* (2008) observaram que a transferência placentária dessas drogas da mãe para o filhote é comparável com a transferência placentária encontrada em humanos.

Embora em sua maioria os ISRS não induzam malformações congênitas, em humanos a exposição pré-natal a esses medicamentos tem sido associada a parto prematuro, baixo peso ao nascimento, menor índice de Apgar ao nascimento e maior frequência de internação em unidade de terapia intensiva neonatal (uma compilação desses estudos pode ser encontrada em GRZESKOWIAK, GILBERT, MORRISON, 2012). Devido às dificuldades inerentes aos estudos epidemiológicos, os estudos sobre possíveis consequências tardias nessas crianças ainda são controversos. Correlações positivas entre uso materno de ISRS e atraso no desenvolvimento motor (CASPER *et al.*, 2003; PEDERSEN, HENRIKSEN, OLSEN, 2010), diminuição da reatividade à dor (OBERLANDER *et al.*, 2005) e aumento do risco de desordens do espectro autista (CROEN *et al.*, 2011) foram descritas, mas existem estudos que não encontraram correlação entre o uso materno de ISRS com o desenvolvimento cognitivo (NULMAN *et al.*, 1997) e neurocomportamental (MATTSON *et al.*, 1999). Entretanto, é interessante notar que nenhum estudo epidemiológico acompanhou as crianças expostas além dos 7 anos de idade e, portanto, desconhecem-se possíveis efeitos tardios decorrentes da exposição materna aos ISRS.

Frente ao acima exposto, pode-se evidenciar a existência de um dilema terapêutico quanto ao tratamento de grávidas e lactantes com antidepressivos. Embora se reconheça a importância do uso desses medicamentos por essa população, é crescente a preocupação quanto às possíveis alterações neurofuncionais tardias na progênie exposta. Assim, a busca por alternativas que

possam minimizar o impacto na progênie torna-se alvo de estudos.

Tanto o ácido fólico (AF) quanto os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) - ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) - presentes no óleo de peixe (OP) parecem influenciar o metabolismo monoaminérgico e produzir efeitos benéficos para a saúde mental: aumento dos níveis cerebrais de BDNF, diminui sintomas de depressão e previne doenças neurológicas (BORSONELO and GALDUROZ, 2008; DA SILVA *et al.*, 2008; MATTSON and SHEA, 2003).

Vale a pena ressaltar que a associação da FLX com AF ou OP já tem sido utilizada na clínica médica para potencializar o efeito antidepressivo dos ISRS em pacientes que não têm uma resposta satisfatória somente com o antidepressivo. Análises epidemiológicas sugerem uma relação inversa entre o nível de consumo de peixe e a prevalência de depressão, analisa-se que a causa para esta relação é o aumento dos níveis séricos de ômega-3. Sobre o folato, estudos encontraram níveis baixos de folato sérico e foi associado com aumento da resistência no tratamento em pacientes com depressão maior resistentes à FLX (SHELTON *et al.*, 2010).

Nos seres humanos, frutas e verduras constituem a principal fonte nutritiva de folato, com ingestão diária recomendada de 400 gramas, mas este requisito é elevado durante os períodos de alta demanda metabólica, por exemplo em caso de gravidez. Muitos países introduziram a política de fortificação da farinha com AF para melhorar o peso de nascimento e prevenir defeitos de formação do tubo neural (RESLER *et al.*, 2008; SABLE *et al.*, 2011).

Sabe-se que o AF participa do metabolismo da homocisteína a S-adenosilmetionina, que influenciará o metabolismo de 5-HT. Ainda mais, ele também é importante para síntese de tetrahidrobiopterina, um co-fator na etapa de hidroxilação da fenilalanina e triptofano para síntese de noradrenalina e 5-HT (MATTSON and SHEA, 2003). A homocisteína é um derivado desmetilado de metionina, e vitaminas do complexo B são necessárias para o seu metabolismo eficiente. Folato e cobalamina (vitamina B12) estão envolvidos na remetilação da homocisteína (NELEN *et al.*, 2000).

Os ácidos graxos presentes no OP administrados durante a gestação e amamentação em ratos influenciam positivamente a maturação cortical, sinaptogênese e mielinização, reduzindo o risco de deficiências cognitivas e psicopatologias durante a fase adulta (BORSONELO and GALDUROZ, 2008;

EILANDER *et al.*, 2007; MCNAMARA and CARLSON, 2006). Tem sido descrito que parte dessa ação positiva dos ácidos graxos poliinsaturados na função encefálica deve-se ao aumento da expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), cuja importância neuroprotetora é bastante conhecida.

O BDNF é um importante regulador no neurodesenvolvimento, envolvido na sinaptogênese e neurogênese e em proteger a viabilidade dos neurônios recentemente diferenciados. O BDNF é liberado a partir de neurônios pré e pós-sinápticos, possui dois receptores: o receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) e o receptor de quinases relacionadas com a tropomiosina B (TrkB). A sinalização por BDNF depende da clivagem proteolítica de uma pró-forma de BDNF a uma forma madura. O pró-BDNF liga-se preferencialmente ao p75NTR mediando a apoptose e a depressão de longo prazo, o BDNF maduro liga-se à TrkB e estimula as vias de sinalização que induzem diferenciação neuronal, aumento da sobrevivência celular e fortalecimento das sinapses. Diminuição dos níveis de BDNF no encéfalo tem sido associadas a uma variedade de distúrbios psiquiátricos e neurológicos (KAPCZINSKI *et al.*, 2008; MITCHELMOREA and GEDE, 2014; WOLKOWITZ *et al.*, 2011).

Efeitos comportamentais e não comportamentais têm sido relatados em animais após a exposição perinatal aos ISRS (CABRERA-VERA *et al.*, 1997; CABRERA-VERA *et al.*, 1998; NOORLANDER *et al.*, 2008; OLIVIER *et al.*, 2011; SMIT-RIGTER *et al.*, 2012). No entanto, estudos relatando falta de efeitos também foram publicados (BAIRY *et al.*, 2007; CAPELLO *et al.*, 2011). Nosso grupo vem investigando o potencial da neurotoxicidade no desenvolvimento causada pela FLX usando os princípios publicados na diretriz 426 da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD 2007). Até agora, nós relatamos que a exposição à FLX durante a gestação e lactação não influencia no peso materno e no peso da ninhada, porém evidenciamos: diminuição da locomoção de ratos machos púberes em um campo aberto (Lisboa *et al.*, 2007), aumento do comportamento similar à depressão em camundongos fêmeas púberes e adultas (Lisboa *et al.*, 2007), diminuição da resposta comportamental a drogas dopaminérgicas em ratas fêmeas púberes (Favaro *et al.*, 2008), diminuição da motivação sexual de ratos adultos (GOUVEA *et al.*; 2008), comportamento alterado de tomada de decisão de ratos machos e fêmeas púberes (Francis-Oliveira *et al.*, 2013), diminuição da ativação induzida pelo estresse da amígdala basolateral de ratos púberes e adultos

(Francis-Oliveira *et al.*, 2013.), diminuição do perfil global de metilação do DNA de hipocampo e aumento no córtex de ratos recém-desmamados (Toffoli *et al.*, 2014).

Apesar dos possíveis efeitos negativos observados na progênie após a exposição materna à FLX, reconhece-se que o não tratamento de uma mãe que tem indicação clínica para uso de antidepressivos também pode impactar negativamente seu bem-estar e o desenvolvimento fetal e/ou do recém-nato. Desta forma, nós projetamos este estudo a fim de avaliar se dois suplementos já usados por mulheres grávidas, ou seja, o AF ou OP, poderiam minimizar os efeitos induzidos pela exposição materna à FLX no modelo de exposição que tem sido usado em nosso laboratório. Apenas ratos púberes (35 dias) foram usados porque nossos estudos identificaram este período como sensível aos efeitos da FLX. As avaliações realizadas incluíram dois testes comportamentais (labirinto em cruz elevado e hipofagia induzida pela novidade) e quantificação dos níveis hipocampais de BDNF.

## **1 OBJETIVOS**

Os objetivos deste estudo foram avaliar a capacidade da co-exposição ao AF e OP em reverter possíveis efeitos na prole decorrentes da exposição perinatal à FLX e analisar os efeitos causados por estes suplementos separadamente na exposição perinatal. Para isso, foram avaliados o comportamento ansiedade/depressão-símile no teste de hipofagia Induzida pela novidade, o comportamento ansiedade-símile no teste de labirinto em cruz elevado e os níveis hipocampais de BDNF.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 ANIMAIS

Ratos e ratas (virgens) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) foram acasalados (1 macho e 2 a 3 fêmeas por caixa) durante todo o período escuro dos animais no Departamento de Ciências Fisiológicas, UEL. Na manhã do dia seguinte, através do esfregaço vaginal, foi possível diagnosticar a prenhez dessas ratas. As ratas com presença da fase estro do ciclo estral e presença de espermatozóides foram consideradas prenhes, sendo o dia de diagnóstico denominado dia gestacional 0 (DG0), essas fêmeas foram separadas e mantidas em caixas individuais e em ambiente climatizado ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) com ciclo claro/escuro de 12 h, controlado por timer. Os animais receberam água e ração para roedores à vontade.

Estas fêmeas foram distribuídas em 2 grupos e receberam diariamente, por gavagem, água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) ou 5 mg/kg de FLX (Daforin® solução oral, EMS, Brasil). Cada um desses grupos foi dividido em 3 subgrupos que receberam, com intervalo de 1h da primeira gavagem,  $\text{H}_2\text{O}$  ou 3 mg/kg de AF (solução oral, Fagron, Brasil) ou 1,3 g/kg de OP (Botânica Herbarium, Brasil) contendo 400mg/kg de ômega-3 com 12% ácido eicosapentaenóico e 18% de ácido docosahexaenóico. Desta forma, obtivemos 6 grupos no total:  $\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{H}_2\text{O}-\text{AF}$ ;  $\text{H}_2\text{O}-\text{OP}$ ;  $\text{FLX}-\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FLX}-\text{AF}$ ;  $\text{FLX}-\text{OP}$ . O tratamento durou toda a gestação e amamentação.

Ao nascimento, denominado dia pós-natal (DPN) 0, os filhotes foram pesados e o número de vivos e mortos foram contados. Ao DPN 4, a prole foi reduzida para 10 filhotes e proles menores que 8 filhotes foram descartadas. Os filhotes foram pesados no DPN 0, 4, 7, 14 e 21, quando foram desmamados e separados por sexo até a sua avaliação no DPN 35.

As mães foram pesadas diariamente com o objetivo de ajustar o volume de administração. A base racional para a dosagem da FLX está descrita em Lisboa *et al.* (2007), mas no presente estudo foram calculadas doses para ratos e não para camundongos. A dose de AF recomendado para mulheres grávidas sob risco de apresentarem fetos com alteração no fechamento do tubo neural é de 5 mg/dia ou 0.071 mg/kg para uma mulher de 70 kg. A fim de considerar possíveis variações

intraespécies, foi aplicado dosimetria BW3/4 (EPA 2006) e se obteve 0,3 mg/kg e, em seguida, usado um fator de 7 a 10 para contabilizar a variação interespecies. Portanto, a dose de AF selecionada para este estudo foi de 3 mg/kg/dia. Para OP um raciocínio semelhante foi aplicado, considerando a dose recomendada para o ser humano de 900 mg/dia ou 13 mg/kg.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Londrina (protocolo 3058.2014.58).

## 2.2 HIPOFAGIA INDUZIDA PELA NOVIDADE

O teste de Hipofagia Induzida pela Novidade (HIN) é um modelo de ansiedade e depressão em roedores (BODNOFF, *et al.*, 1989; DULAWA AND HEN, 2005). O teste introduz um paradigma no qual existe conflito entre um componente motivacional do comportamento (a fome), com o comportamento de medo e ansiedade do rato, que faz com que ele evite áreas novas e desprotegidas (área central de uma arena). Portanto, a latência para começar a se alimentar na arena reflete a tomada de decisão pelo animal, a qual está inversamente relacionada à ansiedade e depressão (BODNOFF, SURANYI-CADOTTE *et al.*, 1989; DULAWA and HEN, 2005).

Para este teste, os animais foram colocados em jejum por 24h em gaiolas metabólicas (Fig. 1) e então individualmente colocados na área periférica de uma arena circular de madeira (diâmetro de 72cm) a qual continha 30 g de ração em sua área central. Foi mensurada a latência para que o animal começasse a se alimentar (Fig. 2). Os animais foram deixados na arena por 5 min e, ao final do teste, foram devolvidos à gaiola metabólica agora contendo ração. Foi mensurada a quantidade de ração ingerida na arena bem como durante 5 min após retorno à gaiola. A mensuração da ração no retorno à gaiola objetiva avaliar possível alteração do comportamento alimentar.

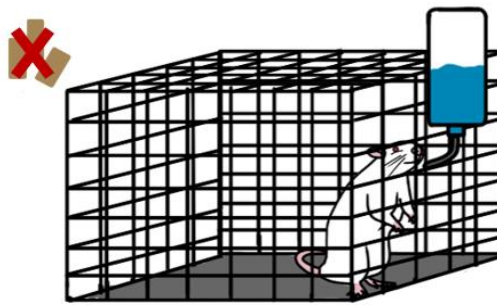


Fig. 1: Animais colocados, individualmente, nas gaiolas metabólicas em jejum, 24 horas antes do teste.

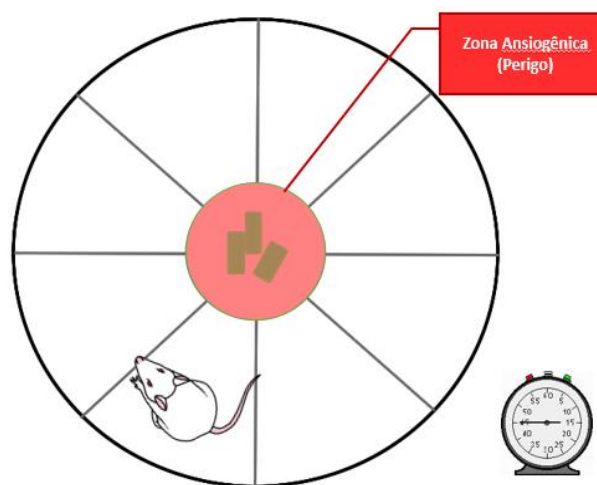


Fig. 2: Animal colocado na periferia de uma arena circular com 30 g de ração no centro, caracterizado como zona ansiogênica. Mensurado a latência (s) de alimentação.

### 2.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado (LCE) tem considerável validade como modelo de ansiedade. Contém elementos de conflito, evasão e fuga que são úteis em estudos da neurobiologia e farmacologia (HANDLEY and McBLANE, 1993).

O modelo baseia-se em um procedimento descrito por Montgomery em 1958 para avaliar a ansiedade em ratos e camundongos o qual baseava-se em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. Em seu estudo, Montgomery interpretou a aversão aos braços abertos como sendo gerada pela neofobia ("medo da novidade", que induziria aversão e curiosidade) e pela elevação do aparato. A preferência para os braços fechados deve-se ao grau de maior

aversão dos braços abertos, porque este último apresenta um maior número de novos estímulos (PELLOW *et al.*, 1985).

Trata-se de um labirinto em forma de cruz constituído de dois braços abertos e opostos (50 cm x 10 cm), e dois fechados (50 cm x 10 cm) em suas três faces externas por paredes de 40 cm de altura, conectados por uma plataforma central (10 cm x 10 cm). O aparelho dista 50 cm do solo e os braços abertos possuem uma borda de acrílico de 1 cm para evitar que o animal caia do aparato (Fig 3).

Os animais foram avaliados individualmente e colocados inicialmente na plataforma central. Montgomery (1958) mostrou que o comportamento de evasão é particularmente marcado ao longo do período de 5 min, mas começa a diminuir no final de um período de 10 min (PELLOW *et al.* 1985). Com base nesses estudos, o teste teve duração de 5 min.

As entradas nos braços fechados e abertos foram registradas a partir do número de travessias e uma entrada foi considerada quando o animal colocava as quatro patas em um dos braços do aparelho. Também foram registrados tempo de permanência (em segundos) nos braços abertos e fechados, *stretched attend posture* (SAP: quando o animal estende seu corpo para frente e, em seguida, retrai-se para a posição original sem locomoção), e *grooming* rostral e corporal (tempo de autolimpeza).

Após encerrar a realização de cada sessão de teste, a arena foi limpa com solução de álcool a 5%.

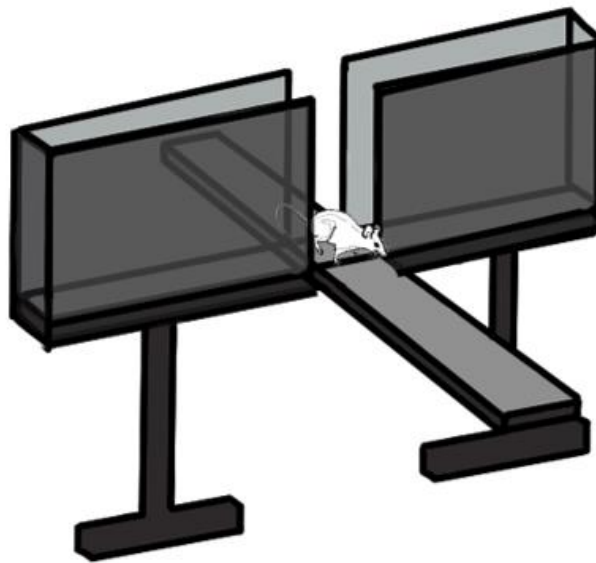


Fig. 3: Animal é colocado no centro do aparato e monitorado por 5 minutos de teste. Análise de medidas espaço temporal (número e tempo no braço aberto e fechado) e medidas etológicas (SAP e grooming).

#### 2.4 QUANTIFICAÇÃO DO BDNF HIPOCAMPAL - IMUNOENSAIO ELISA

Ao completarem 35 dias de idade os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e o encéfalo removido imediatamente. O hipocampo foi rapidamente dissecado, congelado em gelo seco e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso. Os níveis de BDNF foram quantificados utilizando um kit ELISA comercialmente disponível (Promega, Madison, WI).

No dia anterior ao teste foi preparado uma solução contendo  $10\mu\text{l}$  Anti-BDNF mAb +  $9.99\text{ml}$  de tampão de revestimento de carbonato (pH 9.7), e desta diluição foram pipetados  $100\mu\text{l}$  em uma placa contendo 96 poços de fundo plano. A placa foi incubada *overnight* a  $4^{\circ}\text{C}$ .

No dia seguinte, a placa foi removida da geladeira e o conteúdo foi retirado, os poços foram lavados com Tampão Salina Tris com Tween-20 (TBST) (20 mM Tris – HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20), usando um lavador de placas automatizado. Foi adicionado  $200\mu\text{l}$  do bloqueio 1x ( $10.6\text{ml}$  *Block & Sample 5X Buffer* em  $42,4\text{ ml}$  de água deionizada) em cada poço utilizando pipetador multicanal. A incubação foi por 1 hora em temperatura ambiente, sem agitação. Após este período a placa foi lavada com TBST.

A curva padrão foi preparada usando padrão puro de BDNF (Promega, Madison, WI) e tampão de bloqueio 1x nas diluições: 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,3pg/ml, 15,6pg/ml, 7,8pg/ml e 0pg/ml.

Cada amostra foi homogeneizada em 200ul de tampão de lise (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% Tween 20, 10% glicerol, 1 mM Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF), 10 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 0.5 mM vonadato de sódio). Foi feito um homogenato com o tecido hipocampal bilateral e centrifugado em 16000 g por 30 min a uma temperatura de 4°C. Foram pipetados 100 µl deste sobrenadante e diluído em 400 µl Tampão Fosfato Salino com Dulbecco (DPBS) (137mM NaCl, 2.68mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.35), 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O) (SZAPACS *et al.*, 2004).

Em seguida, as amostras foram acidificadas com 10 µl de HCl 1N e incubadas por 15 min a temperatura ambiente, para diminuir o pH em torno de 2,5. As amostras foram neutralizadas com 10 µl de NaOH 1N para elevar o pH próximo de 7,0. Foram adicionados 100µl de cada amostra na placa com incubação de 2 horas em temperatura ambiente sob agitação (400±100rpm). Este processo dosa BDNF total nas amostras.

Foram adicionados 100µl da solução de anticorpo anti-BDNF humano pAb (20µl de Anti-Human BDNF pAb diluído em 9,98 ml de bloqueio 1x) e a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação. Logo após, a placa foi lavada 5 vezes com TBST e adicionados 100 µl do conjugado ANTI-IgY HRP (50µl conjugado ANTI-IgY HRP em 9,95 ml da solução de bloqueio 1x). Após incubação de 1 hora sob agitação, a placa foi lavada mais 5 vezes com TBST.

Para a revelação da reação, a placa foi incubada com 100 µl da solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) sob agitação por 10 minutos e uma coloração azul foi evidenciada. Com a adição de 100 µl de HCl 1N para parar a reação formou-se uma cor amarelada em cada poço.

A leitura foi realizada no aparelho Enspire (Perkin Elmer®), USA), usando comprimento de onda de 450nm, em temperatura ambiente. Os Resultados foram expressos em pg de BDNF por mg de hipocampo.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, a distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Levene) foram avaliados. Se estes critérios foram alcançados ( $p > 0,01$ ), as variáveis foram avaliadas por *three-way* ANOVA. Fatores foram: exposição (H<sub>2</sub>O ou FLX), suplemento (H<sub>2</sub>O, AF ou OP) e sexo. Se *three-way* ANOVA indicou interação significativa entre os fatores, *two-way* ou *one-way* ANOVA complementado com Bonferroni foram realizados. Os dados que não atingiram esses critérios foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis complementado com teste de Dunn. Os dados da avaliação de toxicidade geral foram analisados por *two-way* ANOVA (ganho de peso materno) ou *three-way* ANOVA para Medidas Repetidas (ganho de peso dos filhotes).

Todos os grupos foram tratados concomitantemente para reduzir o número de animais controle, mas dados sobre a influência do AF ou OP foram analisados separadamente e são apresentados separados. Como resultado, temos apenas um grupo H<sub>2</sub>O + H<sub>2</sub>O e um FLX + H<sub>2</sub>O que serviram tanto para a análise de AF quanto OP. Decidimos analisar os dados sobre AF e OP separados porque não era nosso objetivo comparar esses suplementos. Nosso objetivo foi avaliar a influência de cada suplemento sobre alterações induzidas por FLX na progenitura e a inclusão de ambos os conjuntos de dados em uma única análise poderia ter resultado em comparações desnecessárias que poderiam ter comprometido a interpretação dos dados.

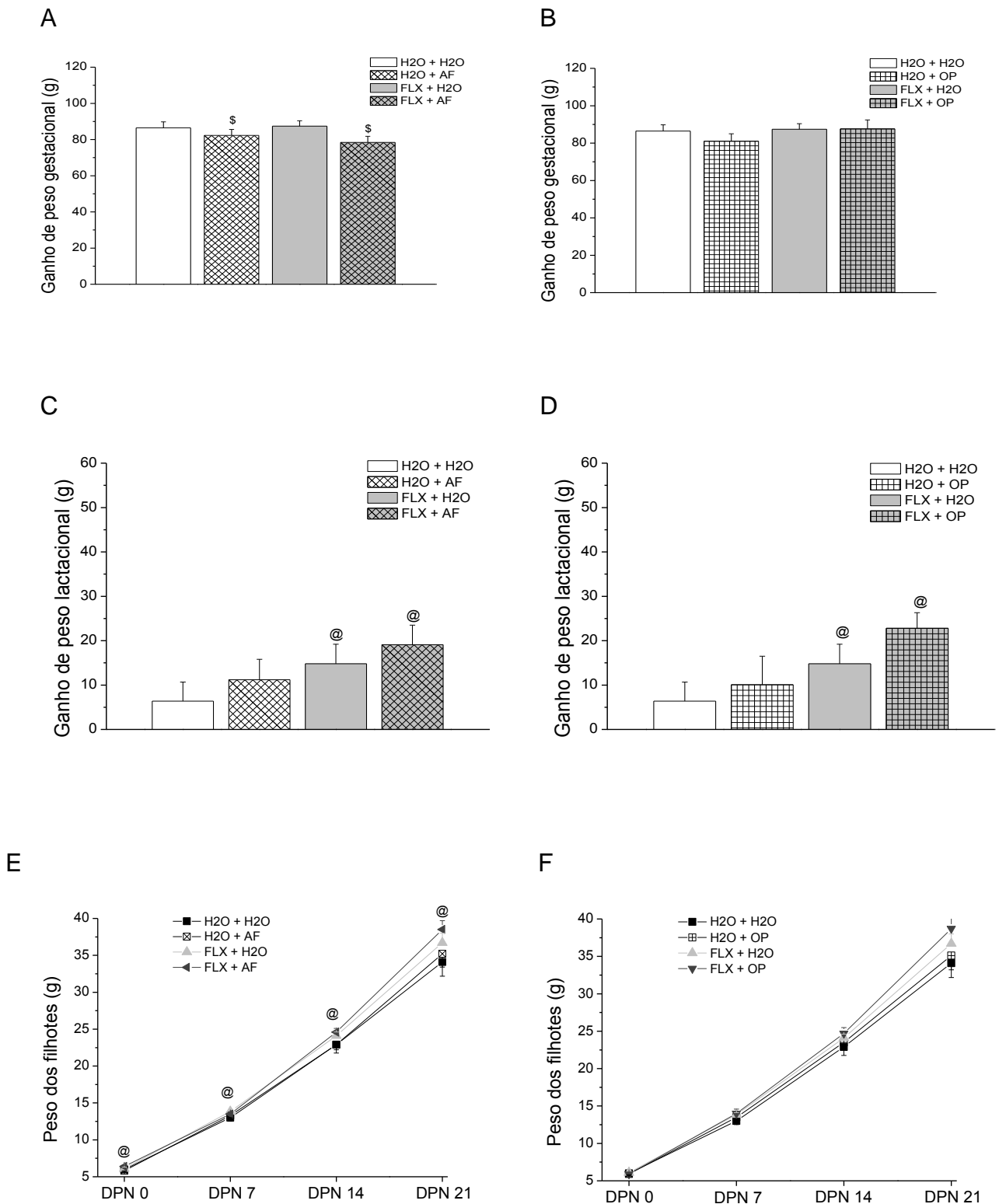
Conclusões foram estabelecidos em  $p \leq 0.05$ , mas as tendências estatística ( $p < 0,10$ ) são também indicadas.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ANÁLISE DA TOXICIDADE DO TRATAMENTO

Durante a gestação, mães expostas ao AF apresentaram uma ligeira mas significativa redução no ganho de peso [ $F(1, 57) = 4,1, p = 0,048$ ] (Fig. 4A), enquanto uma não diferença estatística foi observada para mães expostas à FLX (Fig. 4A e B) ou OP (Fig. 4 B). Durante a lactação, ANOVA fatorial indicou uma tendência estatística para o fator exposição [Figura 4C:  $F(1, 57) = 3,4, p = 0,07$ ; Figura 4D:  $F(1, 55) = 4,8, p = 0,03$ ], ou seja, todas as mães que receberam FLX ganharam mais peso durante a lactação do que as que receberam H<sub>2</sub>O (Fig. 4C e D).

Como esperado, ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA) indicou que os filhotes apresentaram ganho gradual de peso durante o período de lactação [Figura 4E:  $F(1.3, 61.6) = 1301,8, p < 0,001$ ; Figura 4F:  $F(1.2, 56.2) = 1202,9, p < 0,001$ ] e a suplementação com AF (Fig. 1E) ou OP (Fig. 4F) não influenciou este perfil. A exposição à FLX, no entanto, atingiu significância [ $F(1, 49) = 4,3, p = 0,043$ ] e pode ser observada na Fig. 4E que todos os filhotes expostos à FLX pesavam mais do que os não expostos. Mesmo que um padrão semelhante possa ser observado na Fig. 4F, os dados apresentam apenas tendência à significância estatística [ $F(1, 47) = 3,15, p = 0,083$ ].



**Fig. 4:** Ganho de peso total das mães durante a gestação (A, B) e lactação (C, D) e ganho de peso os filhotes do nascimento ao desmame (E, F). Dados são expressos em médias ± EPM de 13-15 mães ou filhotes. \$ p<0,05 quando comparadas todas as mães expostas à AF durante a gestação com as que não receberam AF, @ p<0,05 animais expostos à FLX comparados aos não expostos.

### 3.2 INFLUÊNCIA DA CO-EXPOSIÇÃO AO ÁCIDO FÓLICO E FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO

#### 3.2.1 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

ANOVA fatorial não indicou qualquer diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos parâmetros analisados no teste HIN (Tabela 1).

**Tabela 1:** Avaliação de filhotes expostos à FLX e/ou AF no teste de Hipofagia Induzida pela Novidade.

	Machos			
	H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O	FLX + H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O + AF	FLX + AF
Latência para alimentação (s)	134,07 ± 9,78	122,49 ± 11,05	112,47 ± 22,16	122,28 ± 9,6
Consumo ração na arena(g)	0,37 ± 0,03	0,45 ± 0,07	0,46 ± 0,08	0,39 ± 0,05
Consumo ração na gaiola (g)	0,54 ± 0,03	0,56 ± 0,07	0,51 ± 0,06	0,55 ± 0,07

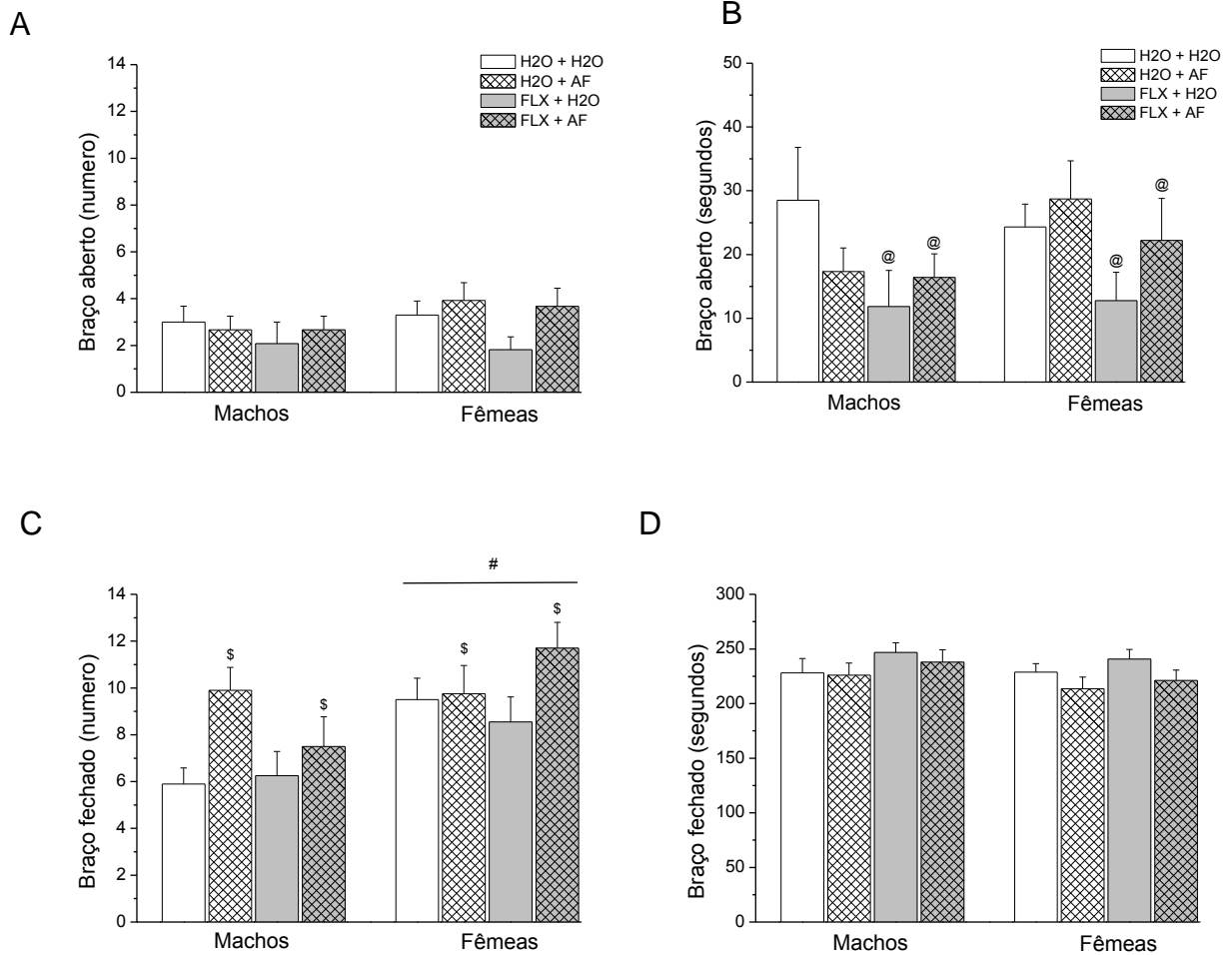
	Fêmeas			
	H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O	FLX + H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O + AF	FLX + AF
Latência para alimentação (s)	133,17 ± 11,81	123,98 ± 11,57	149,09 ± 18,06	122,81 ± 3,70
Consumo ração na arena(g)	0,36 ± 0,06	0,36 ± 0,05	0,38 ± 0,08	0,36 ± 0,05
Consumo ração na gaiola (g)	0,56 ± 0,05	0,55 ± 0,09	0,47 ± 0,06	0,44 ± 0,05

Dados expressos em média ± EPM de 11-13 animais em cada grupo. *Three-way* ANOVA,  $p > 0.05$ .

No LEC (Fig. 5, Tabela 2), ANOVA fatorial indicou efeito da suplementação [ $F(1,92) = 8,39$ ,  $p = 0,005$ ] e sexo [ $F(1,92) = 11,01$ ,  $p = 0,001$ ] para o número de entradas nos braços fechados (Fig. 5), refletindo que os filhotes expostos a AF

entraram mais nos braços fechados do que os que não receberam, e que as fêmeas também entraram mais do que os machos.

Aumento de entradas nos braços fechados é considerado índice de atividade motora e alteração de atividade motora pode comprometer a avaliação do estado de ansiedade pelo indicador clássico que é a percentagem de entradas nos braços abertos. Pellow e File (1986) sugeriram que na presença de alteração da atividade motora o melhor parâmetro para avaliar a ansiedade é o número de entradas nos braços abertos analisado por análise de covariância (ANCOVA) com o número de entradas nos braços fechados como co-variável. ANCOVA não indicou significância estatística para essa variável ( $p > 0,05$ ). Em relação ao tempo de permanência nos braços, ANOVA fatorial indicou um efeito de exposição para o tempo gasto nos braços abertos [ $F(1,92) = 4,39, p = 0,039$ ] e foi observado que filhotes expostos à FLX apresentaram menor tempo nos braços abertos (Fig. 5B). Ao todo, os resultados sugerem que: 1) o tratamento de mães com AF resulta em filhotes púberes hiperativos; 2) as fêmeas púberes são mais ativas do que os machos; 3) os filhotes expostos à FLX apresentaram comportamento de ansiedade que não foi influenciado pela suplementação com AF.



**Fig. 5:** Avaliação dos filhotes expostos ou não à FLX e/ou AF no teste LCE. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. \$  $p < 0,05$  em relação aos animais que não receberam AF; #  $p < 0,05$  comparado a machos; @  $P < 0,05$  comparado a animais que não receberam FLX.

**Tabela 2:** Avaliação de filhotes expostos à FLX e/ou AF no teste de LCE.

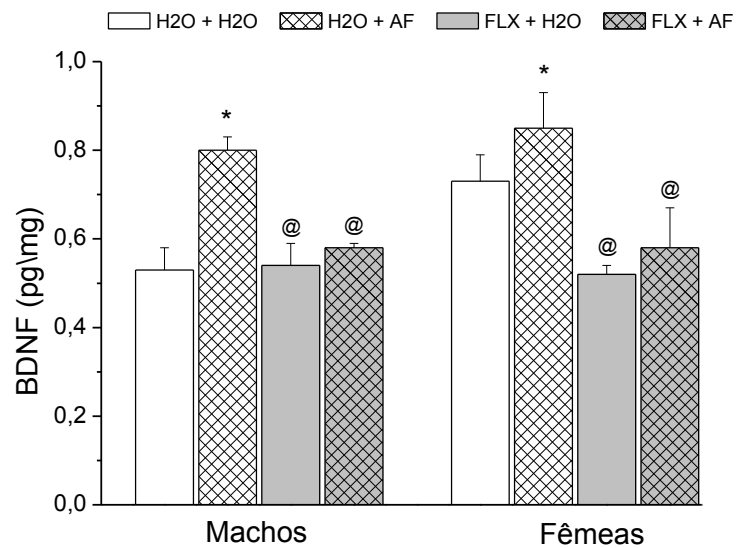
	Machos			
	H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O	FLX + H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O + AF	FLX + AF
SAP braço aberto (contagem)	1,0 (0,0-2,0)	0,0 (0,0-2,0)	0,0 (0,0-2,0)	1,0 (0,0-2,0)
SAP braço fechado (contagem)	1,0 (0,0-6,0)	1,0 (0,0-7,0)	0,5 (0,0-5,0)	2,5 (0,0-7,0)
SAP centro (contagem)	1,0 (1,0-6,0)	2,0 (0,0-4,0)	1,5 (1,0-3,0)	2,0 (1,0-5,0)
Autolimpeza Rostral (s)	11,2 (0,0-23,3)	6,0 (0,0-24,2)	8,2 (0,0-24,2)	7,7 (0,0-18,3)
Autolimpeza Corporal (s)	0,0 (0,0-19,7)	2,2 (0,0-13,3)	0,0 (0,0-7,4)	0,9 (0,0-9,3)
Autolimpeza Total (s)	19,0 (0,0-34,3)	8,4 (0,0-36,2)	9,3 (0,0-29,2)	7,9 (0,8 -24,3)
	Fêmeas			
	H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O	FLX + H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O + AF	FLX + AF
SAP braço aberto (contagem)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-2,0)	1,0 (0,0-2,0)	0,0 (0,0-2,0)
SAP braço fechado (contagem)	0,0 (0,0-6,0)	1,0 (0,0-5,0)	1,0 (0,0-2,0)	0,5 (0,0-4,0)
SAP centro (contagem)	2,0 (0,0-5,0)	2,0 (0,0-3,0)	1,0 (0,0-4,0)	2,0 (0,0-4,0)
Autolimpeza Rostral (s)	7,8 (0,4-26,2)	6,1 (0,0-27,9)	6,7 (0,0-26,3)	8,4 (0,0-11,7)
Autolimpeza Corporal (s)	0,0 (0,0-4,7)	0,0 (0,0-24,1)	0,0 (0,0-7,4)	0,0 (0,0-11,7)
Autolimpeza Total (s)	7,8 (0,4-32,6)	6,1 (0,0-56,6)	7,4 (0,0-32,8)	8,7 (0,0-17,6)

Dados expressos em mediana (valor mínimo – valor máximo) de 10-12 animais em cada grupo. Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .

### 3.2.2 QUANTIFICAÇÃO DO BDNF HIPOCAMPAL DOS ANIMAIS EXPOSTOS A ÁCIDO FÓLICO

A Figura 6 mostra as concentrações de BDNF do hipocampo. ANOVA fatorial indicou interação entre a exposição e a suplementação [ $F(1,50) = 4,03$ ,  $p =$

0,05]. O desmembramento da ANOVA indicou: a) apenas no grupo exposto à água [F (1,24) = 9,77, p = 0,005] o AF aumentou os níveis de BDNF, b) exposição à FLX diminuiu os níveis de BDNF nos grupos expostos à água [F (1,25) = 4,36, p = 0,049] e ao AF [F (1,26) = 22,67, p <0,001]. Estes resultados sugerem um impacto negativo da exposição à FLX nos níveis de BDNF que não é influenciado pelo AF. Ainda, a exposição à FLX impede o aumento induzido por AF dos níveis hipocâmpais de BDNF.



**Fig. 6:** Concentração de BDNF no hipocampo de filhotes expostos ou não à FLX e/ou AF. Dados expressos em média  $\pm$  EPM de 6-7 animais em cada grupo. ANOVA fatorial indicou interação entre exposição à FLX e suplementação com AF. \* p<0,05 comparado a animais H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>O; @ p<0,05 comparado a animais que não receberam FLX.

### 3.3 INFLUÊNCIA DA CO-EXPOSIÇÃO A ÓLEO DE PEIXE E FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO

#### 3.3.1 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

A Tabela 3 apresenta dados do teste HIN. ANOVA fatorial indicou efeito da suplementação com OP sobre a ingestão de alimento tanto na arena [F(1,96)=5,78, p=0,02] quanto na gaiola metabólica [F(1,96)=3,95, p=0,05]. Animais do grupo OP consumiram menos ração sugerindo diminuição no comportamento alimentar e não uma resposta emocional.

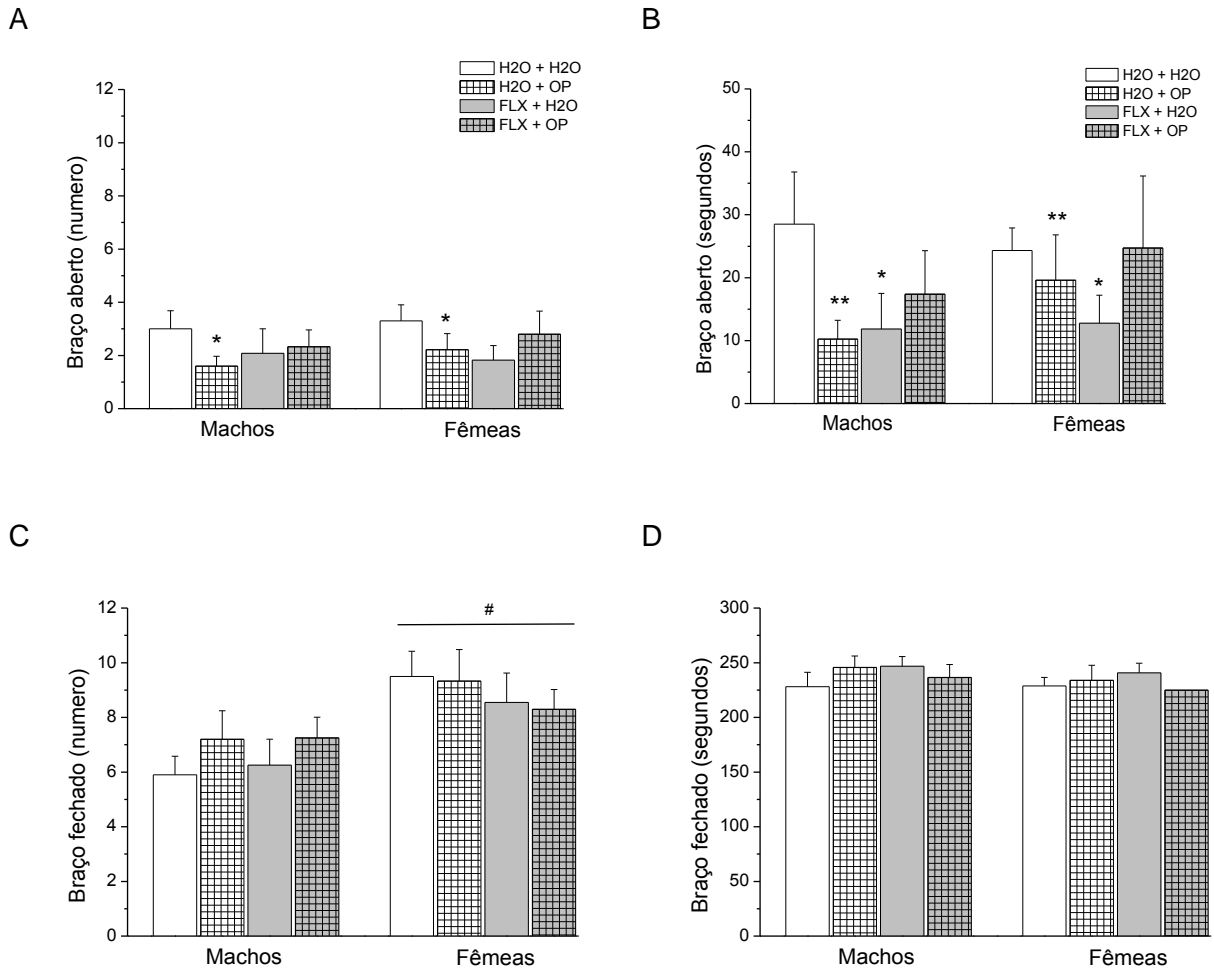
**Table 3:** Avaliação de filhotes expostos à FLX e/ou OP no teste de Hipofagia Induzida pela Novidade.

	Machos			
	H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O	FLX + H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O + OP	FLX + OP
Latência para alimentação (s)	134,07 ± 9,78	122,49 ± 11,05	155,41 ± 16,04	138,92 ± 17,25
Consumo ração na arena(g)	0,37 ± 0,03	0,45 ± 0,07	0,26 ± 0,04 <sup>§</sup>	0,32 ± 0,06 <sup>§</sup>
Consumo ração na gaiola (g)	0,54 ± 0,03	0,56 ± 0,07	0,50 ± 0,07 <sup>§</sup>	0,46 ± 0,07 <sup>§</sup>
	Fêmeas			
	H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O	FLX + H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O + OP	FLX + OP
Latência para alimentação (s)	133,17 ± 1,81	123,98 ± 11,57	129,58 ± 14,36	161,01 ± 18,97
Consumo ração na arena(g)	0,36 ± 0,06	0,36 ± 0,05	0,31 ± 0,04 <sup>§</sup>	0,29 ± 0,04 <sup>§</sup>
Consumo ração na gaiola (g)	0,56 ± 0,05	0,55 ± 0,09	0,48 ± 0,06 <sup>§</sup>	0,47 ± 0,05 <sup>§</sup>

Dados são média ± EPM de 11-13 animais por grupo. <sup>§</sup>p<0,05 para o fator suplementação, ANOVA fatorial.

No LEC, ANOVA fatorial indicou novamente efeito do sexo no número de entradas nos braços fechados [F(1,85)=12,08, p=0,001] (Fig. 7C). Por esta razão, o número de entradas nos braços abertos foi analisado por ANCOVA (entradas no braço fechado como covariável) e houve uma interação entre os fatores exposição e suplementação [F(1,85)=4,23, p=0,043]. O desmembramento da ANCOVA revelou que a suplementação com OP diminuiu o número de entradas no braço aberto apenas em animais que não foram expostos à FLX [F(1,40)=6,50, p=0,015]. No tempo de permanência nos braços abertos, ANOVA fatorial indicou interação entre exposição à FLX e suplementação com OP [F(1,85)=4,55, p=0,036] e desmembramento da análise mostrou que o tempo de permanência nos braços abertos foi reduzido pela FLX apenas em animais não suplementados com OP [F(1,44)=5,78, p=0,021]. Mostrou, ainda, uma tendência de redução pelo OP apenas em animais não expostos à FLX [F(1,40)=3,6, p=0,067]. Esses resultados mostram que: 1) independentemente do sexo, exposição à FLX induziu comportamento similar à ansiedade; 2) suplementação com OP induziu comportamento similar à

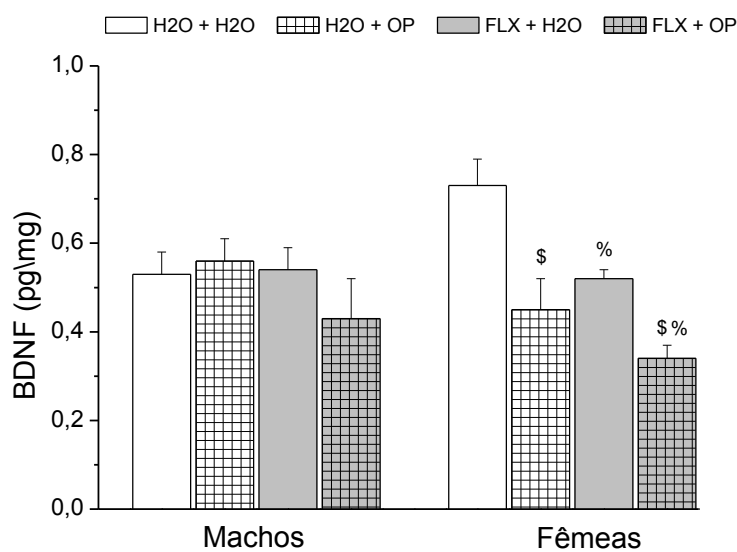
ansiedade; 3) co-exposição à FLX e OP não resultou em tal efeito. Nenhuma diferença estatística foi apontada por Kruskal-Wallis nos parâmetros SAP e *grooming* (Tabela 4).



**Fig. 7:** Avaliação dos filhotes expostos ou não à FLX e/ou OP no teste de labirinto em cruz elevado. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado a animais H<sub>2</sub>O- H<sub>2</sub>O (análise *post-hoc* depois de three-way ANOVA indicou interação entre fatores de exposição e suplementação), \*\*  $p = 0,07$  comparado a animais H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>O, #  $p < 0,05$  comparado aos machos.

### 3.3.2 QUANTIFICAÇÃO DO BDNF HIPOCAMPAL DOS ANIMAIS EXPOSTOS A ÓLEO DE PEIXE

Para os níveis de BDNF hipocampal, ANOVA fatorial indicou interação entre sexo e suplementação com OP [ $F(1,52)=7,54$ ,  $p=0,009$ ]. O desmembramento da ANOVA indicou que somente fêmeas suplementadas com OP apresentaram níveis de BDNF reduzidos [ $F(1,26)=20,7$ ,  $p<0,001$ ] independentemente da exposição à FLX. Ainda mais, a exposição à FLX reduziu os níveis hipocampais de BDNF [ $F(1,26)=9,7$ ,  $p=0,005$ ] independentemente da suplementação com OP (Figura 8).



**Fig. 8:** Avaliação da concentração de BDNF hipocampal de filhotes expostos ou não à FLX e/ou OP. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. \$  $p<0,05$  em relação aos animais que não receberam OP, %  $P<0,05$  comparado a animais que não receberam FLX.

## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo, filhotes na fase da puberdade expostos à FLX durante a gestação e lactação apresentaram comportamento similar à ansiedade e menores níveis de BDNF hipocampal. Nem co-exposição com AF nem com OP foram benéficas para evitar essas alterações. Além disso tratamento das ratas prenhas com AF resultaram em prole púberes hiperativas e aumentou os níveis de BDNF no hipocampo, enquanto o tratamento com OP resultou na diminuição do BDNF hipocampal nas fêmeas e diminuição do comportamento alimentar em ambos os sexos masculino e feminino filhotes púberes.

A literatura é controversa em relação aos efeitos comportamentais observadas na progênie de roedores após a exposição à FLX durante o período de desenvolvimento ou a outros ISRS, o que não é surpreendente, pois os desenhos dos estudos divergem sobre o tempo de exposição, dose, idade de avaliação, espécies utilizadas, etc. No entanto, comportamentos emocionais interrompidos na progênie após a exposição materna à FLX foram descritos em alguns estudos (LISBOA *et al.*, 2007; MCALLISTER *et al.*, 2012; NOORLANDER *et al.*, 2008; OLIVIER *et al.*, 2011; SMIT-RIGTER *et al.*, 2012).

Comportamento similar a ansiedade e depressão tem sido associado à diminuição da neurogênese hipocampal. O BDNF é um fator importante na neurogênese e plasticidade neuronal e nos efeitos terapêuticos da FLX, como também de outros antidepressivos que aumentam 5-HT e/ou a disponibilidade da noradrenalina, os quais são conhecidos por serem parcialmente mediados por um aumento dos níveis de BDNF (NESTLER *et al.*, 2008). Pouco se sabe, entretanto, sobre as alterações moleculares induzidas pela exposição à FLX durante o desenvolvimento do cérebro, mas o nosso grupo relatou recentemente que esta exposição diminuiu o perfil de metilação global do DNA no hipocampo de ratos desmamados (DPN 22), sugerindo que mecanismos epigenéticos podem ocorrer após exposição à FLX durante o desenvolvimento (TOFFOLI *et al.*, 2014). Neste mesmo estudo, a co-administração de AF (8 mg/kg, gavagem) reverteu esta diminuição do perfil global de metilação induzida pela FLX. O folato é um co-fator para a metilação do DNA e atua doando radical metil e modificando a expressão gênica (CHO *et al.*, 2013; TAYLOR *et al.*, 2004).

No presente estudo uma menor dose de AF (3 mg/kg, gavagem) foi utilizada de modo a melhor se aproximar da dose humana relevante, e embora o AF influencie o desenvolvimento cerebral (e nosso estudo demonstrou hiperatividade e aumento dos níveis de BDNF do hipocampo em filhotes expostos à AF), esta dose não foi eficaz em reverter o comportamento de ansiedade induzido pela FLX, bem como a diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo. Na verdade, a exposição à FLX impede que o AF aumente os níveis de BDNF hipocampal. Desta forma, parece plausível sugerir que a exposição à FLX durante o desenvolvimento influencia a neuroplasticidade do hipocampo, alterando os níveis de BDNF através de mecanismos epigenéticos. Continua a ser elusivo, no entanto, se doses mais elevadas de AF durante o desenvolvimento do cérebro e, conseqüentemente, maior disponibilidade de radicais metil, poderiam inibir os efeitos da FLX sobre a ansiedade e os níveis de BDNF. É digno de nota que menores níveis de BDNF do hipocampo foram também observados em camundongos machos adultos C57BL/6J tratados na fase neonatal com FLX (10 mg/kg, intraperitoneal, DPN 4-DPN 21) (KARPOVA *et al.*, 2009).

Da mesma forma que o AF, a co-exposição à OP também não reverteu a diminuição induzida por FLX nos níveis de BDNF, e surpreendentemente, OP reduziu os níveis de BDNF nas fêmeas. No LCE, OP e exposição à FLX interagiram e FLX antagonizou o efeito ansiogênico observado com OP em animais não expostos à FLX e com FLX em animais não suplementados com OP, ou seja, no grupo co-exposto à FLX e OP, um efeito ansiogênico não foi detectado. Isso sugere um efeito do OP sobre as redes neurais relacionadas com a ansiedade que seja parcialmente modulado pela ação do sistema monoaminérgico. Além disso, OP diminuiu comportamento alimentar de filhotes púberes no teste de HIN. Há uma escassez de dados sobre os possíveis resultados na progenitura após a exposição materna à OP, e alguns estudos apresentaram resultados contrários aos deste trabalho. Um aumento na concentração de BDNF cortical e do hipocampo foi relatado em ratos desmamados e adultos (DPN 90) e um efeito antidepressivo foi relatado em ratos adultos maternalmente expostos a 3 g/kg OP (12% EPA e 18% DHA) (VINES *et al.*, 2012).

Com relação aos efeitos metabólicos, o enriquecimento da dieta da ração materna com 10% de OP resultou em filhotes machos na fase adulta pesando 20% menos e apresentando diminuição dos níveis de leptina quando comparado ao

grupo controle. A leptina plasmática é um marcador de adiposidade corporal total, e essa descoberta de menores níveis de leptina é um indicativo de que esses animais armazenam menos gordura. Uma vez que PUFAs podem ser fornecidos em excesso através do leite da mãe para prole, circuitos neuronais envolvidos na regulação do balanço energético, que estão principalmente localizados no hipotálamo e envolvem neuropeptídeos que se desenvolvem no mesmo momento em que o cérebro requer grandes quantidades de DHA para a expansão, é possível que o DHA possa afetar diretamente o desenvolvimento e funcionamento desses neurônios neuropeptidérgicos (VAN DIJK *et al.*, 2011), dessa forma, PUFAs podem estar envolvidos na programação metabólica durante o desenvolvimento fetal. Por outro lado, a exposição de ratas mães Wistar à 15mg/kg/dia de ácidos graxos ômega-3 na dieta durante a gravidez e aleitamento resultou em filhotes com peso normal ao nascimento, mas que acumularam gordura com o envelhecimento (idades de 3 e 6 semanas), particularmente em depósitos subcutâneos (MUHLHAUSLER *et al.*, 2011). Curiosamente, este efeito não foi mediado através de regulação positiva de genes de transcrição adipogênicos/lipogênicos. Portanto, uma compreensão clara dos resultados na prole após a suplementação materna com OP está longe de ser existente. É importante salientar que nenhum dos estudos avaliou animais púberes e que as doses empregadas de OP, quando citadas, foram muito variáveis (de 15 mg a 3 g/kg/dia).

Por último, todos os tratamentos empregados no presente estudo não induziram toxicidade geral nas mães e/ou filhotes. OP não apresentou efeito sobre o ganho de peso de mães durante a gravidez e lactação ou no tamanho da ninhada, nem sobre o ganho de peso da prole do nascimento até o desmame. AF reduziu o ganho de peso durante a gravidez, mas ao se comparar o grupo controle (H<sub>2</sub>O+H<sub>2</sub>O) com o grupo que recebeu apenas AF (H<sub>2</sub>O+AF) vimos que a diferença entre eles foi de apenas 4,1 g, ou 4,8%, e essa diferença não resultou em baixo peso dos filhotes ao nascimento, nem persistiu durante a lactação. Em relação a exposição à FLX, observamos aumento do ganho de peso materno e dos filhotes durante a lactação, este regime de exposição foi empregado em nosso laboratório há algum tempo e esse efeito não foi observado anteriormente (por exemplo, FRANCIS-OLIVEIRA *et al.*, 2013 e TOFFOLI *et al.*, 2014). Outros trabalhos, como o de Li-Jen Lee (2009), mostraram que a exposição perinatal à FLX (10 mg/kg), por injeção subcutânea em

ratos neonatos (P0-P6), resulta em uma prole com menor ganho de peso quando comparado ao grupo controle.

Concluindo, este estudo descreve dados adicionais para ajudar no entendimento da neurotoxicidade da FLX no desenvolvimento e avalia a eficácia de dois suplementos para reverter os efeitos induzidos pela FLX. Entretanto, AF e OP não foram eficazes para esse propósito, como empregados no presente estudo, mas a busca de alternativas para gerenciar o risco de exposição a antidepressivos durante a gravidez e/ou lactação é garantida, considerando que o não tratamento de algumas mulheres pode influenciar negativamente o seu bem-estar e, conseqüentemente, o desenvolvimento saudável dos filhos, sem considerar o risco de suicídio que mulheres grávidas com depressão podem apresentar.

## 5 CONCLUSÕES

Desde a introdução dos ISRSs no mercado no final dos anos 80, quando relatos de síndrome de abstinência neonatal em neonatos de mães em tratamento com estes fármacos começaram a aparecer, o impacto da exposição perinatal a ISRSs é uma preocupação crescente. Experimentos conduzidos em roedores para avaliar o efeito da exposição perinatal a ISRSs revelaram alterações neurocomportamentais, nos filhotes, mas há controvérsias entre estes estudos, já que nem todos relataram os mesmos efeitos neurocomportamentais, e às vezes demonstraram efeitos discrepantes e paradoxais, deixando em aberto se os efeitos são transitórios ou se ocorrem alterações permanentes no cérebro em desenvolvimento, levando a alteração da função na idade adulta.

Neste estudo, nós observamos que a exposição de ratos à FLX durante o neurodesenvolvimento causou alterações no comportamento, assim como alteração nos níveis hipocámpais de BDNF. Com o objetivo de tentar reverter esses efeitos negativos causados pela exposição perinatal à FLX, suplementamos com AF e OP as ratas, durante o mesmo período de exposição à FLX. Os resultados mostraram que a co-exposição ao AF não foi eficaz em reverter os efeitos da FLX e por si só causou alteração comportamental na prole (hiperatividade) e aumento de BDNF hipocámpal. A co-exposição ao OP antagonizou a alteração comportamental apresentada pela exposição à FLX e ao OP, e isoladamente apresentou comportamento similar a ansiedade no LCE, mostrando também menores níveis hipocámpais de BDNF nas fêmeas.

Ainda há muito trabalho a ser feito para compreender totalmente o papel da suplementação perinatal de OP e AF na co-exposição com FLX, no contexto do desenvolvimento.

## REFERÊNCIAS

- BAIRY, K.L.; MADHYASTHA, S.; ASHOK, K.P.; BAIRY, I. Malini S. Developmental and behavioral consequences of prenatal fluoxetine. **Pharmacology**, v. 79, p. 1–11, 2007.
- BODNOFF, S.R.; SURANYI-CADOTTE, B.E., QUIRION, R.; MEANEY, M.J. Role of the central benzodiazepine receptor system in behavioral habituation to novelty. **Behav Neurosci**. v. 103, p. 209–12. 1989.
- BONNIN, A. and LEVITT, P. Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. **Neuroscience**. v. 197, p. 1-7. 2011.
- BORSONELO, E.C.; SUCHECKI, E.C.; GALDUROZ, J.C.F. Effect of fish oil and coconut fat supplementation on depressive-type behavior and corticosterone levels of prenatally stressed male rats. **Brain Res**. 2011;1385:144–50.
- BORSONELO, E.C.; GALDUROZ, J.C.F. The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: review and propositions. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, v.78, p. 237 e 245, 2008.
- CABRERA-VERA, T. and BATTAGLIA, G. Prenatal Exposure to Fluoxetine (Prozac) Produces Site-Specific and Age-Dependent Alterations in Brain Serotonin Transporters in Rat Progeny: Evidence from Autoradiographic Studies. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 286, p. 1474–1481, 1998.
- CABRERA-VERA, T.M.; GARCIA, F.; PINTO, W.; BATTAGLIA, G. Effect of prenatal fluoxetine (Prozac) exposure on brain serotonin neurons in prepubescent and adult male rat offspring. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 280, p. 138–45, 1997.
- CAPPELO, C.F.; BOURKE, C.H.; RITCHIE, J.C.; STOWE, Z.N.; NEWPORT, D.J.; NEMEROFF, A.; OWENS, M.J. Serotonin transporter occupancy in rats exposed to serotonin reuptake inhibitors in utero or via breast milk. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 339, p. 275–85, 2011.
- CASPER, R.C.; FLEISHER, B.E; Lee-ANCAJAS, J.C; GILLES, A.; GAYLOR, E.; De BATTISTA, A.; HOYME, H.E. Follow-up of children of depressed mothers exposed or not exposed to antidepressant drugs during pregnancy. **J Pediatr**, v. 142, p. 402-408, 2003.
- CHO, C.E.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, D.; REZA-LÓPEZ, S.A.; HUOT, P.S.P.; KIM, Y.I.; ANDERSON G.H. High folate gestational and post-weaning diets alter hypothalamic feeding pathways by DNA methylation in Wistar rat offspring. **Epigenetics**, v.8, p. 710–9, 2013.
- CROEN, L.A.; GREYER, J.K.; YOSHIDA, C.K.; ODOULI, R.; HENDRICK, V. Antidepressant use during pregnancy and childhood autism spectrum disorders. **Arch Gen Psychiatry**, v. 68, p. 1104-1112, 2011.

DA SILVA, T.M.; MUNHOZ, R.P.; ALVAREZ, C.; NALIWAIKO, K.; KISS, Á.; ANDREATINI, R.; FERRAZ, A.C. Depression in Parkinson's disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **J Affect Disord**, v. 111, p. 351–9, 2008.

DULAWA, S.C. and HEN, R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: The novelty-induced hypophagia test. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, p. 771–83, 2005.

EILANDER, A.; HUNDSCHHEIN, D.C.; OSENDARO, S.J.; TRANSLER, C.; ZOCK, P.L. Effects of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation on visual and cognitive development throughout childhood: a review of human studies. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 76, p. 189 e 203, 2007.

FAVARO, P.D.N.; COSTA, L.C.; MOREIRA, E.G. Maternal fluoxetine treatment decreases behavioral response to dopaminergic drugs in female pups. **Neurotoxicol Teratol**, v.30, p. 487–94, 2008.

FRANCIS-OLIVEIRA, J.; PONTE, B.; BARBOSA, A.P.M.; VERÍSSIMO, L.F.; GOMES, M.V.; PELOSI, G.G.; BRITTO, L.R.G.; MOREIRA, E.G. 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. **Behav Brain Res**, v. 252, p. 195–203, 2013.

GOUVEA, T. S.; MORIMOTO, H.K.; de FARIA, M.J.; MOREIRA, E.G.; GERARDIN, D.C.C. Maternal exposure to the antidepressant fluoxetine impairs sexual motivation in adult male mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 90, p. 416-419, 2008.

GRZESKOWIAK, L.E.; GILBERT, A.L.; MORRISON, J.L. Long term impact of prenatal exposure to SSRIs on growth and body weight in childhood: evidence from animal and human studies. **Reprod Toxicol**, v. 34, p.101-109, 2012.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HEIKKINEN, T.; EKBLAD, U.; PABLO, P.; LAINE, K. Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. **Clin Pharmacol Ther**, v. 73, p. 330–7, 2003.

HENDRICK, V.; STOWE, Z.N.; ALTSHULER, L.L.; MINTZ, J.; HWANG, S.; HOSTETTER, A.; SURI, R.; LEIGHT, K.; FUKUCHI, A. Fluoxetine and norfluoxetine concentrations in nursing infants and breast milk. **Biol Psychiatry**, v. 50, p. 775–82, 2001.

HENDRICK, V. Placental Passage of Antidepressant Medications. **Am J Psychiatry**, v. 160, p. 993–6, 2003.

HOMBERG, J.R.; SCHUBERT, D.; GASPATR, P. New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, p. 60–5, 2010.

KAPCZINSKI, F., FREY, B.N., ANDREAZZA, A.C., SANT'ANNA, M.K., CUNHA, A.B.M., POST, R.M. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 30, p. 243-5, 2008.

KARPOVA, N.N.; LINDHOLM, J.; PRUUNSILD, P.; TIMMUSK, T.; CASTREN, E. Long-lasting behavioural and molecular alterations induced by early postnatal fluoxetine exposure are restored by chronic fluoxetine treatment in adult mice. **Eur Neuropsychopharmacol**, v, 19, p. 97–108, 2009.

KIYASOVA, V. and GASPAR, P. Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance. **Eur J Neurosci**, v. 34, p. 1553-62, 2001.

LAUDER, J.M. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. **Ann N Y Acad Sci**. v. 600, p. 297–314, 1990.

LATTIMORE, K.A.; DONN, S.M.; KACIROTI, N.; KEMPER, A.R.; NEAL, C.R.Jr.; VAZQUEZ D.M. Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) use during pregnancy and effects on the fetus and newborn: a meta- analysis. **J Perinatol**, v. 25, p. 595-604, 2005.

LI-JEN, L. Neonatal Fluoxetine Exposure Affects the Neuronal Structure in the Somatosensory Cortex and Somatosensory-Related Behaviors in Adolescent Rats. **Neurotox Res**, v. 15, p. 212–223, 2009.

LISBOA, S.F.S.; OLIVEIRA, P.E.; COSTA, L.C.; VENÂNCIO, E.J.; MOREIRA, E.G. Behavioral evaluation of male and female mice pups exposed to fluoxetine during pregnancy and lactation. **Pharmacology**, v.80, p. 49–56, 2007.

MATTSON, S.; EASTVOLD, A.D.; JONES, K.L.; HARRIS, K.L.; CHAMBERS, J.A.; Neurobehavioral follow-up of children prenatally exposed to fluoxetine. **Teratology**, v. 59, p. 376, 1999.

MATTSON, M.P.; SHEA, T.B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends Neurosci**, v. 26, p. 137–46, 2003.

MCALLISTER, B.B.; KIRYANOVA, V.; DYCK, R.H. Behavioural outcomes of perinatal maternal fluoxetine treatment. **Neuroscience**, v. 226, p. 356–66, 2012.

MCNAMARA, R.K.; CARISON, S.E. Role of ômega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 75, p.329 e 349, 2006.

MITCHELMOREA, C., GEDE, L. Brain derived neurotrophic factor: Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Brain Res**, v. 1586, p. 162 – 172, 2014.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol PsychoL**, v. 48, p. 254-260, 1958.

MUHLHAUSLER, B.S.; MILJKOVIC, D.; FONG, L.; XIAN, C.J.; DUTHOIT, E.; GIBSON, R.A. Maternal omega-3 supplementation increases fat mass in male and female rat offspring. **Front Genet**, v. 2, p. 1–10, 2011.

NELEN, W.D.M.; BLOM, H.J.; STEEGER, E.A.P.; HEIJER M.D.; THOMAS, C.M.G.; ESKES, T.K.A.B. Homocysteine and Folate Levels as Risk Factors for Recurrent Early Pregnancy Loss. **The Netherlands**, v. 95, 2000.

NESTLER, E.; HYMAN, S.; MALENKA, R. Molecular Neuropharmacology: A foundation for clinical neuroscience. 2nd ed. 2008.

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

NOORLANDER, C.W.; VERVES, F.F.T.; NIKKELS, P.G.J.; VAN ECHELD, C.J.A.; VISSER, G.H.A.; SMIDT, M.P. Modulation of serotonin transporter function during fetal development causes dilated heart cardiomyopathy and lifelong behavioral abnormalities. **PLoS One**, v. 3, p. 1–10, 2008.

NULMAN, I.; ROVET, J.; STEWART, D.E.; WOLPIN, J.; GARDNER, H.A.; THEIS, J.G.; KULIN, N.; KOREN, G. Neurodevelopment of children exposed in utero to antidepressant drugs. **Engl J Med**, v. 336, p. 258-262, 1997.

OBERLANDER, T. F.; GRUNAU, R. E.; FITZGERALD, C.; PAPSDORF, M.; RURAK, D.; RIGGS, W. Pain reactivity in 2-month- old infants after prenatal and postnatal serotonin reuptake inhibitor medication exposure. **Pediatrics**, v. 115, p. 411-425, 2005.

OECD. Guideline for the Testing of Chemicals Developmental Neurotoxicity Study 2007.

OLIVIER, J.D.A.; VALLES, A.; VAN HEESCH, F.; Afrasiab-Middelma A, Roelofs JJPM, Jonkers M, Peeters EJ, Korte-Bouws GAH, Dederen JP, Kiliaan AJ, Martens GJ, Schubert D, Homberg JR. Fluoxetine administration to pregnant rats increases anxiety-related behavior in the offspring. **Psychopharmacology**, v. 217, p. 419–32, 2011.

PEDERSEN, L.H.; HENRIKSEN, T.B.; OLSEN, J. Fetal exposure to antidepressants and normal milestone development at 6 and 19 months of age. **Pediatrics**, v. 125, p. 600-608, 2010.

PELLOW, S. AND FILE, S.E. Anxiolytic and Anxiogenic Drug Effects on Exploratory Activity in an Elevated Plus-Maze: a Novel Test of Anxiety in the Rat. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 24, p. 525–9, 1986.

POHLAND, R.C.; BYRD, T.K.; HAMLTON, M.; KOONS, J.R. Placental transfer and fetal distribution of fluoxetine in the rat. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 98, p. 198–205, 1989.

RESLER, G.; LEVIE, R.; CAMPOS, J.; MATA, S.; URBINA, M.; GARCIA, A.; APITZ, R.; LIMA, L. Effect of Folic Acid Combined with Fluoxetine in Patients with Major Depression on Plasma Homocysteine and Vitamin B 12, and Serotonin Levels in Lymphocytes. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, p. 145–152, 2008.

SABLE, P.; DANGAT, K.; KALE, A.; JOSHI, S. Altered brain neurotrophins at birth: Consequence of imbalance in maternal folic acid and vitamin B12 metabolism. **Neuroscience**, v. 190, p. 127–34, 2011.

SHELTON, R.C.; OSUNTOKUN, O.; HEINLOTH, A.N.; CORYA, S.A. Therapeutic options for treatment-resistant depression. **CNS Drugs**, v. 24, p. 131-161, 2010.

SMIT-RIGTER, L.A.; NOORLANDER, C.W.; VON OERTHEL, L.; CHAMEAU, P.; SMIDT, M.P.; VAN HOOFT, J.A. Prenatal fluoxetine exposure induces life-long serotonin 5-HT 3 receptor-dependent cortical abnormalities and anxiety-like behaviour. **Neuropharmacology**, v.62, p. 865–70, 2012.

SURI, R.; STOWE, Z.N.; HENDRICK, V.; HOSTETTER, A.; WIDAWSKI, M.; ALTSHULER, L.L. Estimates of nursing infant daily dose of fluoxetine through breast milk. **Biol Psychiatry**, v. 52, p. 446–51, 2002.

SZAPACS, M.E.; MATHEWS, T.A.; TESSAROLLO, L.; LYONS, W.E.; MAMOUNAS, L.A.; ANDREWS, A.M. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived Neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. **J Neurosci Methods**, v. 140, p. 81–92, 2004.

TAYLOR, M.J.; CARNEY, S.M.; GOODWIN, G.M.; GEDDES, J.R.; Folate for depressive disorders: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **J Psychopharmacol**, v.18, p. 251–6, 2004.

TOFFOLI, L.V.; RODRIGUES JR., G.M.; OLIVEIRA, J.F.; SILVA, A.S.; MOREIRA, E.G.; PELOSI, G.G.; GOMES, M.V. Maternal exposure to fluoxetine during gestation and lactation affects the DNA methylation programming of rat's offspring: Modulation by folic acid supplementation. **Behav Brain Res**, v. 265, p. 142–147, 2014.

VORHEES, C.V.; MORFORD, L.R.; GRAHAM, D.L.; SKELTON, M.R.; WILLIAMS, M.T. Effects of periadolescent fluoxetine and paroxetine on elevated plus-maze, acoustic startle, and swimming immobility in rats while on and off-drug. **Behav Brain Funct**, v. 7, p. 41, 2011.

VAN DIJK, G.; KACSNDI, A.; KBOR-NYAKAS, D.E.; HGYES, E.; NYAKAS, C. Perinatal polyunsaturated fatty acids supplementation causes alterations in fuel homeostasis in adult male rats but does not offer resistance against STZ-induced diabetes. **Horm Metab Res**, v.43, p. 938–43, 2011.

VINES, A.; DELATTRE, A.M.; LIMA, M.M.S.; RODRIGUES, L.S.; SUCHECKI, D.; MACHADO, R.B.; TUFIK, S.; PEREIRA, S.I.R.; ZANATA, S.M.; FERRAZ, A.C. . 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, p. 184–91, 2012.

WHITAKER-AZMITIA, P.M.; DRUSE, M.; WALKER, P.; LAUDER, J.M. Serotonin as a developmental signal. **Behav Brain Res**, v. 73, p. 19–29, 1995.

WOLKOWITZ, O.M., WOLF, J., SHELLY, W., ROSSER, E., BURKE, H.M., LERNER, K.L., REUS, V.I., NELSON, J.C., EPEL, E.S., MELLON, S.H. Serum BDNF levels before treatment predict SSRI response in depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych**, v. 35, p. 1623–1630, 2011.