



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRÉ DEMAMBRE BACCHI

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO E
AMAMENTAÇÃO SOBRE O EIXO CORTICOTRÓFICO E VIAS
DOPAMINÉRGICAS EM RATOS**



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRÉ DEMAMBRE BACCHI

**Efeito da exposição à fluoxetina durante a gestação e amamentação
sobre o eixo corticotrófico e vias dopaminérgicas em ratos**

Londrina

2016

ANDRÉ DEMAMBRE BACCHI

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO E
AMAMENTAÇÃO SOBRE O EIXO CORTICOTRÓFICO E VIAS
DOPAMINÉRGICAS EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a 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

Bacchi, André Demambre .

Efeito da exposição à fluoxetina durante a gestação e amamentação sobre o eixo corticotrófico e vias dopaminérgicas em ratos. / André Demambre Bacchi. - Londrina, 2016.

56 f. : il.

Orientador: Estefânia Gastaldello Moreira.

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

Inclui bibliografia.

1. fluoxetina - Teses. 2. toxicidade do desenvolvimento - Teses. 3. eixo HPA - Teses. 4. sistema dopaminérgico - Teses. I. Moreira, Estefânia Gastaldello . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico. III. Título.

ANDRÉ DEMAMBRE BACCHI

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO E
AMAMENTAÇÃO SOBRE O EIXO CORTICOTRÓFICO E VIAS DOPAMINÉRGICAS
EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para a obtenção do título de Doutor

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof Dr Paulo Roberto Dalsenter
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof Dr Marcus Vinicius Gomes
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Prof^a Dr^a Tânia Longo Mazzuco
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de fevereiro de 2016

Dedico este trabalho aos meus pais, Marcelo e Ana Teresa, e aos meus “segundos pais”, Domingos Raphael e Virginia.

AGRADECIMENTOS

Há um ditado popular que diz o seguinte: Quem caminha sozinho, pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza chega mais longe. E parafraseando Paulo Dantas, ainda que conseguíssemos caminhar sozinhos, para onde iríamos, se não teríamos com quem compartilhar a beleza do horizonte? Por este motivo, faço os seguintes agradecimentos.

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida.

Agradeço especial e profundamente à minha orientadora, professora Estefânia, pela maestria e pelo carinho com os quais auxiliou, direcionou, conduziu e algumas vezes apenas tolerou minhas ações. Quando ao final de 2009 você me instigou a prestar o mestrado, estava na verdade me oferecendo um propósito de vida e um caminho profissional, o qual trilhei me esforçando para seguir os seus passos, porém com o meu próprio jeito de caminhar. Há e sempre haverá, portanto, muito de “Estefânia” na minha maneira de pesquisar/ensinar e isso é um dos meus maiores motivos de orgulho.

Agradeço muito à minha família. Aos meus pais, Ana Teresa e Marcelo, que em muitos momentos abdicaram de si mesmos para que eu pudesse ser mais. Que sempre priorizaram seus filhos e o bem-estar da família, deixando a vaidade e o orgulho de lado e mostrando-me como ser um homem melhor. Aos meus avós, Domingos Raphael e Virginia, que foram meus “segundos” pais, sempre me apoiando e acreditando em minha capacidade e ao meu irmão Matheus, que sempre torceu pelo meu sucesso em todas as circunstâncias.

Agradeço também à minha esposa Bruna. Metade da minha vida foi vivida ao seu lado. Você conhece todos os meus “eus” e sabe motivar e consolar cada um deles. *I would rather share one lifetime with you than face all the Ages of this world alone – Arwen (The Lord of The Rings)*

Agradeço ainda ao professor Luiz Roberto Giorgetti de Britto por me aceitar por um mês em seu laboratório para executar a imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase e aos membros e colaboradores de seu laboratório, em especial: ao Adilson, pela incrível competência e auxílio técnico; à Carol Gregório, pelo apoio e auxílio com a interpretação das lâminas e manuseio do ImageJ; ao Mauro Leoneli pela ajuda na obtenção das imagens no fotomicroscópio; à Priscila Garcia e à Cecília Café-Mendes pelo suporte e companhia.

Da mesma forma, agradeço à professora Tânia Mazzuco e ao Jefferson Crespigio por todos ensinamentos e colaboração na elaboração da técnica de dosagem de corticosterona, bem como na execução das imuno-histoquímicas da adrenal e da hipófise e obtenção de dados pelo ImageJ, técnicas estas que fogem às análises comportamentais com as quais estava habituado e me puxaram da “zona de conforto”.

Agradeço também ao professor Décio Sabbatini Barbosa, por me acolher em seu laboratório tanto para obtenção de imagens com o fotomicroscópio, quanto para execução das dosagens de corticosterona. É sempre uma grande satisfação trabalhar com a pessoa que orientou meu primeiro grande trabalho acadêmico (TCC). Agradecimento especial à Kamila Landucci, cuja ajuda foi fundamental nas dosagens de corticosterona e à Carine Coneglian pelo auxílio na obtenção das imagens da adrenal e hipófise.

Gostaria de agradecer também aos amigos e colegas de laboratório e profissão que contribuíram diretamente com este trabalho: José Francis, Guilherme, Matheus, Annie e Bárbara e Rodrigo, bem como aos demais amigos do programa: Luiz Fernando, Bruno, Vinícius, Dênis, Carol, Keiko, Jaqueline e Milene, que indiretamente sempre colaboraram, seja com ajuda técnica, seja com suas companhias, incluindo nos congressos.

Dizem que amigos são a família que a gente escolhe. Por este motivo, gostaria de agradecer à minha “família londrinense” que esteve sempre presente nestes 4 anos de doutorado: Matheus, Liége, Pâmella, Bruna Donato, Gustavo, Bruna Domingues, Henrique, Diogo, Rayssa, Fabrício, Taly, e em especial para este trabalho, Gleyson Stabile que além de tudo contribuiu com seus conhecimentos em estatística. Agradeço ainda aos amigos do Multiverso Londrina: Giovani, Renan, Lari, Mario e Thiago, pela companhia na gratificante missão de fomentar a cultura na cidade.

Agradeço também aos amigos e sócios do site Meia-Lua: Caio, Rodolfo, Renato e Guilherme, que aceitaram o desafio, nos últimos 2 anos, de viver um pouco mais intensamente do que já viviam e alcançar conquistas que pensávamos ser impossíveis. Afinal, como disse Sarah Westphal, “gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morra esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Agradeço ainda à CAPES pela concessão da bolsa de doutorado, bem como à Fundação Araucária pelo financiamento deste projeto.

Por fim agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para este momento, em especial aos meus alunos com os quais frequentemente mais aprendo do que ensino.

Try not.

Do, or do not. There is no try.

(Yoda – Empire Strikes Back)

BACCHI, André Demambre. **Efeito da exposição à fluoxetina durante a gestação e amamentação sobre o eixo corticotrófico e vias dopaminérgicas em ratos.** 2016. 56 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A fluoxetina é um inibidor seletivo da da recaptura de serotonina (ISRS), amplamente utilizada para transtornos depressivos, álgicos e de ansiedade e de escolha para mulheres grávidas. Experimentos sugerem que filhotes expostos a ISRS durante a gestação e/ou lactação apresentam alterações neurofuncionais e endócrinas que persistem até a puberdade e idade adulta. Com o objetivo de ampliar os estudos sobre os efeitos tardios da exposição à fluoxetina durante a gestação e amamentação, este trabalho avaliou, em ratos machos e fêmeas expostos à fluoxetina durante o desenvolvimento: 1) A integridade da neurotransmissão dopaminérgica nos dias pós-natais (DPN) 35 e 75 por meio de estereotipia induzida por apomorfina (0,3 mg/kg, sc), aumento de atividade motora induzida por bupropiona (40mg/kg, vo) e quantificação de neurônios e áreas de projeção dopamina por meio imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH) na substância negra, área tegumental ventral, estriado e núcleo accumbens; 2) A função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) em ratos machos e fêmeas adolescentes (DPN 35), por meio de desafio com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, 50 µg/kg) e subsequente dosagem de corticosterona plasmática, além de quantificação de áreas marcadas para ACTH (hipófise) e 3-β-Hidroxiesteroide desidrogenase (HSD3β) (adrenal) por meio de imuno-histoquímica. Exposição à FLX não induziu alterações significativas na imunomarcagem por TH nas áreas analisadas ou alterações na hiperatividade induzida por bupropiona. A intensidade de estereotipia foi reduzida em machos (DPN 35) e fêmeas (DPN 75) expostos à FLX quando comparados com seus respectivos controles. Não houve redução significativa na corticosterona plasmática em resposta a estímulo com ACTH, porém a expressão da enzima HSD3β se mostrou reduzida nos animais expostos à FLX, indicando comprometimento na biossíntese de glicocorticóides na adrenal. A expressão de ACTH na hipófise, por outro lado, não foi alterada pela exposição à FLX durante o desenvolvimento. O presente estudo sugere que a exposição à FLX durante o desenvolvimento pode levar a alterações duradouras no sistema dopaminérgico, sem afetar número de neurônios e densidade de inervação nas áreas de projeção avaliadas. Sugere ainda que a exposição à FLX pode levar a alteração na biossíntese de corticosterona, não acompanhada por alterações na resposta de corticosterona plasmática a estímulo com ACTH ou imunoexpressão deste hormônio na hipófise.

Palavras-chaves: Fluoxetina. Toxicidade do desenvolvimento. Gestação. Lactação. Eixo HPA. Sistema dopaminérgico.

BACCHI, André Demambre. **Effect of exposure to fluoxetine during gestation and breastfeeding on the corticotrophic axis and dopaminergic pathways in rats.** 2016. 56 p. Tese (Doctoral degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Fluoxetine is a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) widely used for depressive, anxiety and nociceptive disorders and it is the medicine of choice for pregnant women. Animal models suggest that pups exposed to SSRIs during pregnancy and/or lactation present neurofunctional and endocrine changes that persist into pubescence and adulthood. In order to expand the studies on the long lasting effects of fluoxetine exposure during pregnancy and lactation, this study evaluated in rats (male and female) exposed to fluoxetine during development: 1) the integrity of dopaminergic neurotransmission in postnatal days (PND) 35 and 75 through apomorphine-induced stereotypy (0.3 mg/kg, sc), increased motor activity induced by bupropion (40 mg/kg, vo) and dopaminergic neuronal quantification by immunostaining for tyrosine hydroxylase in the substantia nigra, ventral tegmental area, nucleus accumbens and striatum ; 2) The hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis in male and female pubertal rats (PND 35), by challenge with adrenocorticotrophic hormone (ACTH, 50 mg/kg, sc) and subsequent plasmatic corticosterone quantification as well quantification for ACTH (pituitary) and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3 β) (adrenal) by immunohistochemistry. Exposure to FLX did not induce significant changes in immunostaining for TH in the analyzed areas or changes in bupropion-induced hyperactivity. Stereotypy intensity was reduced in males (PND 35) and females (PND 75) exposed to FLX compared to their respective controls. There was no significant reduction in plasma corticosterone levels in response to ACTH stimulation, but the HSD3 β enzyme expression was reduced in animals exposed to FLX, indicating impairment in the adrenal biosynthesis of glucocorticoids. The expression of ACTH in the pituitary, on the other hand, was not altered by exposure to FLX during development. The present study suggests that exposure to FLX during development can lead to long-lasting changes in the dopaminergic system without affecting the number of neurons and innervation density. It also suggests that exposure to FLX can lead to changes in corticosterone biosynthesis, not followed by changes in plasma corticosterone or pituitary ACTH immunostaining.

Keywords: Fluoxetine. Developmental toxicity. Pregnancy. Lactation. HPA axis. Dopaminergic system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Diagrama do desenho experimental	16
Figura 2.	Determinação do Dia Gestacional 0 (DG 0).....	17
Figura 3.	Administração oral por gavagem a ratos	18
Figura 4.	Arena do campo aberto.....	21
Figura 5.	Teste de estereotipia induzida por apomorfina	22
Figura 6.	Ganho de peso das ratas mães durante a gestação e lactação	28
Figura 7.	Ganho de peso real das mães durante a gestação.....	29
Figura 8.	Ganho de peso dos filhotes do nascimento até o desmame	29
Figura 9.	Influência da exposição à FLX na resposta comportamental à bupropiona	31
Figura 10.	Estereotipia em resposta à apomorfina em filhotes expostos à FLX	32
Figura 11.	Expressão de TH na SN em ratos expostos à FLX	34
Figura 12.	Expressão de TH na VTA em ratos expostos à FLX	35
Figura 13.	Expressão de TH no Estriado em ratos expostos à FLX	36
Figura 14.	Expressão de TH no Accumbens em ratos expostos à FLX.....	37
Figura 15.	Corticosterona plasmática pós-ACTH em ratos expostos à FLX.....	38
Figura 16.	Imunomarcção de 3 β HSD na glândula adrenal em ratos expostos à FLX	40
Figura 17.	Imunomarcção de ACTH na hipófise em ratos expostos à FLX	41
Figura 18.	Eixo HPA e a rota simplificada de biossíntese de corticosterona	45
Figura 19.	Rota de biossíntese de estradiol no ovário e encéfalo	47

SUMÁRIO

1.	Introdução	11
2.	Objetivos	15
2.1.	<i>Objetivo geral</i>	15
2.1.	<i>Objetivos específicos</i>	15
3.	Material e métodos	16
3.1.	<i>Desenho experimental</i>	16
3.2	<i>Animais e tratamento</i>	16
3.3	<i>Toxicidade geral das mães</i>	19
3.4	<i>Desenvolvimento físico dos filhotes</i>	19
3.5	<i>Avaliação das vias dopaminérgicas</i>	19
3.5.1	<i>Avaliação funcional das vias dopaminérgicas</i>	19
3.5.1.2	<i>Comportamento estereotipado induzido por apomorfina</i>	21
3.5.2	<i>Avaliação morfológica das vias dopaminérgicas</i>	22
3.6	<i>Avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal</i>	24
3.6.1	<i>Teste funcional da glândula adrenal</i>	24
3.6.2	<i>Reação de imuno-histoquímica da adrenal e hipófise</i>	26
3.7	<i>Análises estatísticas</i>	27
4.	Resultados	28
4.1	<i>Avaliação toxicológica geral</i>	28
4.3	<i>Avaliação funcional das vias dopaminérgicas</i>	30
4.3.1	<i>Hiperatividade em campo aberto induzida por bupropiona</i>	30
4.3.2	<i>Comportamento estereotipado induzido por apomorfina</i>	31
4.4	<i>Avaliação morfológica das vias dopaminérgicas</i>	32
4.5	<i>Avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal</i>	38
4.5.1	<i>Teste funcional da glândula adrenal</i>	38
4.5.2	<i>Reação de imuno-histoquímica da adrenal e hipófise</i>	39

5.	Discussão	42
6.	Conclusões	49
	Referências	50

1. Introdução

Antidepressivos são amplamente utilizados no mundo inteiro para o tratamento não apenas de transtornos do humor (como depressão ou distímia), mas também para tratamento de transtornos de ansiedade e de síndromes álgicas (por ex, fibromialgia, enxaqueca), sendo medicamentos de uso prolongado. A maioria atua aumentando a disponibilidade de uma ou mais monoaminas na fenda sináptica, mas são os efeitos secundários decorrentes da administração repetida os responsáveis pelos efeitos terapêuticos. Entre esses efeitos secundários, estão alteração na densidade e função de receptores monoaminérgicos, além da promoção da neurogênese (STAHL, 2010).

Mulheres que já façam uso de antidepressivos, por qualquer condição supracitada e engravidem, podem ser orientadas a manter o tratamento com a finalidade de minimizar o risco de recaída ou recidiva da doença. Ainda mais, o uso durante a gravidez ou amamentação pode também ser necessário caso a mulher venha a desenvolver algum transtorno durante esses períodos. Sabe-se, portanto, que um grande número de mulheres recebe a prescrição de antidepressivos durante a gestação e período pós-parto, especialmente de antidepressivos da classe dos inibidores seletivos da recaptura de serotonina (ISRS) (OBERLANDER et al., 2005; COOPER et al., 2007). Embora se reconheça que medicamentos, em geral, possuem o potencial de provocar efeitos adversos no feto ou neonato, o não tratamento de algumas doenças que afetam a mãe também pode ter impacto negativo no desenvolvimento da prole (JENSEN et al., 2013). Portanto, avaliar qual situação será menos danosa à unidade mãe-criança constitui-se tarefa complexa devido à escassez de estudos experimentais, bem como de evidências clínicas significativas.

Entre os antidepressivos atualmente comercializados, a fluoxetina (FLX), pertencente à classe dos ISRS, é o antidepressivo mais prescrito no mundo e destaca-se por ser a droga de escolha para uso durante a gravidez (NONACS; COHEN, 2003). Sabe-se que a FLX atravessa a barreira placentária e que também é encontrada no leite materno, podendo alcançar portanto a criança tanto no período pré quanto no período pós-natal (POHLAND et al., 1989; HENDRICK et al., 2001; SURI et al., 2002; HEIKKINEN et al., 2003; HENDRICK, 2003). Estes períodos são críticos para o neurodesenvolvimento, nos quais a serotonina (5-HT) exerce influência trófica para a migração e sinaptogênese de neurônios monoaminérgicos (LAUDER, 1990; WHITAKER-AZMITIA et al., 1996).

Entretanto, o impacto que a exposição à FLX e a outros ISRS durante o neurodesenvolvimento pode ter na função encefálica em humanos é praticamente desconhecido, embora um recente estudo tenha demonstrado que mulheres tratadas com ISRS durante a gravidez têm um risco aumentado de terem filhos com problemas neurológicos e baixo quociente de inteligência (JENSEN et al., 2013). Embora existam descritas algumas correlações positivas entre exposição materna a ISRS e atraso no desenvolvimento motor (CASPER et al., 2003; PEDERSEN; HENRIKSEN; OLSEN, 2010), diminuição de reatividade à dor (OBERLANDER et al., 2005), risco aumentado para autismo (CROEN, 2011), alguns estudos não encontraram correlação entre essa exposição e alteração do desenvolvimento cognitivo (NULMAN et al., 1997; MATTSON et al., 1999; GRUNAU et al., 2005) e neurocomportamental (MATTSON et al., 1999). Entretanto, é importante ressaltar que os estudos epidemiológicos acompanharam os descendentes até no máximo os 7 anos de idade, sendo possível que, havendo alteração do desenvolvimento encefálico, alterações mais tardias possam se manifestar.

Os poucos estudos existentes em animais sugerem que a administração de ISRS no período de desenvolvimento pode induzir ansiedade e comportamento semelhante à depressão, que persistem até a fase adulta (HANSEN; SÁNCHEZ; MEIER, 1997; ANSORGE; MORELLI; GINGRICH, 2008; NOORLANDER et al., 2008; POPA et al., 2008; OLIVIER et al., 2011; SMIT-RIGTER et al., 2012), fato que também foi demonstrado em nosso laboratório (LISBOA et al., 2007). Outro estudo que conduzimos mostrou que camundongos adolescentes expostos à FLX durante a gestação e amamentação, apresentaram menor ativação comportamental em resposta a drogas dopaminérgicas (FAVARO; COSTA; MOREIRA, 2008), sugerindo possível deficiência dopaminérgica nestes animais. Além disso, em ratos, demonstramos que machos e fêmeas adolescentes expostos à FLX durante a gestação e amamentação apresentam alteração do comportamento de tomada de decisão e que filhotes machos adolescentes e adultos apresentam menor ativação da amígdala basolateral em resposta a um estressor agudo de imobilização (FRANCIS-OLIVEIRA et al., 2013).

Distúrbios causados à homeostasia, como por exemplo agentes estressores, ativam o “sistema do stress” como forma de defesa. (PIGNATELLI et al., 2000). Neste contexto, a glândula adrenal possui papel ímpar, uma vez que está envolvida tanto no sistema simpático

adreno-medular, quanto no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (ULRICH-LAI et al., 2006). Neste último sistema, a adrenal participa com sua região cortical, promovendo a liberação de glicocorticóides mediante ação do ACTH, especialmente na zona fasciculada da glândula. (SMART et al., 2007). Áreas nervosas centrais como amígdala, córtex medial pré-frontal, hipocampo, leito núcleo da estria terminalis e o núcleo paraentricular do hipotálamo também participam do sistema neural de estresse, evocando diferentes respostas a um agente estressor (FIGUEIREDO, DOLGAS et al. 2002; MCEWEN 2007; JOELS & BARAM 2009).

A 5-HT possui importante papel tanto no desenvolvimento quanto no correto funcionamento do eixo HPA (LAPLANTE; DIORIO; MEANEY, 2002) e na liberação de cortisol (DELARUE et al., 2001). Foi demonstrado que ratos machos adolescentes, expostos à FLX durante a amamentação, apresentaram menor corticosterona sérica (PAWLUSKI et al., 2012). Liberação diminuída de corticosterona após um agente estressor sugere desregulação do eixo HPA, podendo envolver desde alterações no sistema nervoso central, até problemas na própria glândula adrenal. Sabe-se, inclusive, que a glândula adrenal é o alvo mais comum de toxicidade no sistema endócrino (HARVEY; SUTCLIFFE, 2010) e que possui, em seu próprio córtex, receptores para serotonina (5-HT₄). (LEFEBVRE et al., 1998). É notável ainda que alterações neste importante eixo podem conduzir a significativo impacto na função imune, responsividade à dor e no aumento à vulnerabilidade a certas doenças (MCEWEN, 2008; LUPIEN et al., 2009).

Visando ampliar os estudos sobre efeitos tardios da exposição à FLX durante a gestação e amamentação e considerando que animais expostos à FLX neste período de desenvolvimento apresentaram prejuízo em respostas comportamentais dependentes do sistema dopaminérgico, o presente estudo propôs-se a avaliar a neurotransmissão dopaminérgica, observando-se possíveis alterações na inervação dopaminérgica por meio de imunohistoquímica para a enzima tirosina hidroxilase, no comportamento estereotipado induzido pelo agonista de receptores dopaminérgicos apomorfina e na hiperatividade motora induzida pela bupropiona, droga que aumenta a disponibilidade de noradrenalina e de dopamina, em ratos machos e fêmeas expostos à FLX durante a gestação e amamentação em diferentes idades (35 e 75 dias). Além disso, considerando que ratos machos adolescentes expostos à FLX durante a gestação e amamentação apresentaram diminuição na corticosterona plasmática e no padrão de liberação deste hormônio em resposta a um

agente estressor (FRANCIS-OLIVEIRA, 2013), este estudo também avaliou, em ratos púberes (35 dias) se esta alteração se deve à possível toxicidade na glândula adrenal ou em estruturas superiores do eixo HPA, por meio de desafio com o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e consequente dosagem de corticosterona plasmática. Ainda mais, foram conduzidas análises imunohistoquímicas da glândula adrenal para a expressão de HSD3 β , enzima responsável pela conversão de pregnelona em progesterona, um processo crítico na síntese de corticosterona pelo córtex da adrenal (MILLER & AUCHUS, 2011). Além disso foi também realizada imuno-histoquímica para a expressão de ACTH na hipófise.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da exposição à FLX durante a gestação e amamentação em ratos machos e fêmeas sobre o eixo HPA e sobre a integridade morfológica e funcional da neurotransmissão dopaminérgica.

2.1. Objetivos específicos

Investigar em ratos expostos à FLX durante a gestação e amamentação:

- A morfologia das vias dopaminérgicas centrais por meio da técnica de imunohistoquímica para tirosina hidroxilase;
- A integridade funcional das vias dopaminérgicas pelo emprego de fármacos que desencadeiam respostas comportamentais dependentes de dopamina;
- A função do eixo HPA por meio de dosagem plasmática de corticosterona basal e estimulada pelo ACTH;
- A disponibilidade de ACTH na hipófise por meio de imunohistoquímica;
- A capacidade secretora da glândula adrenal por meio da técnica de imunohistoquímica para a enzima HSD3 β , que participa de uma etapa essencial na síntese de glicocorticóides: a transformação de pregnelona em progesterona;

3. Material e Métodos

3.1. Desenho experimental

O diagrama abaixo resume o desenho experimental empregado nesse trabalho.

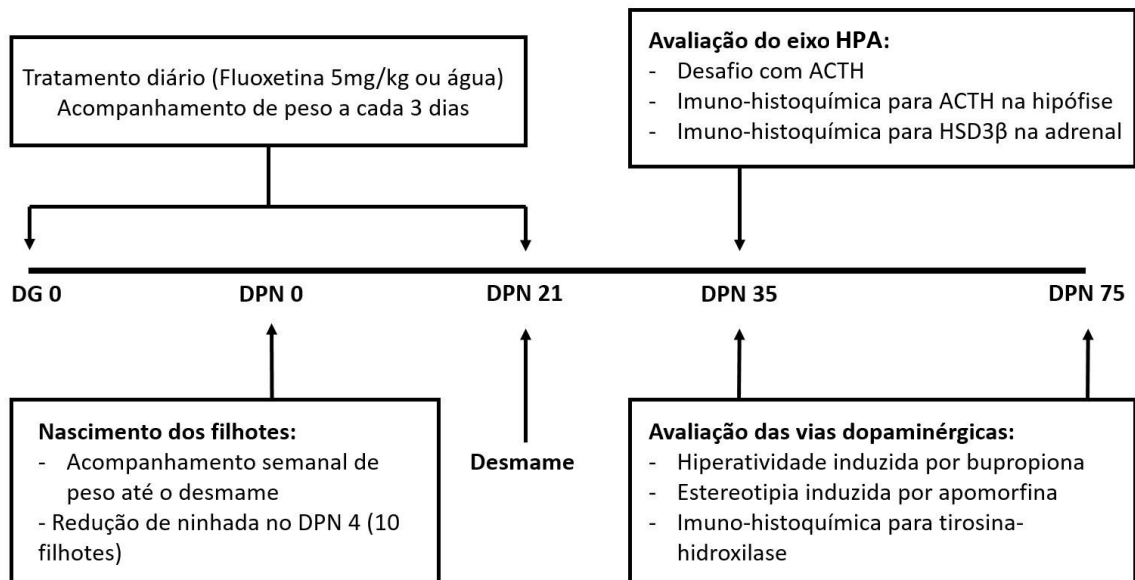


Figura 1. Diagrama do desenho experimental. DG: dia gestacional; DPN: dia pós-natal; ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico; HSD3β: 3-β-Hidroxiesteroide desidrogenase, enzima que converte pregnenolona em progesterona durante a biossíntese da corticosterona no córtex adrenal.

3.2. Animais e tratamento

Para a geração parental foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar, com aproximadamente 80 dias de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Ao final de cada dia foi colocado 1 macho em cada gaiola contendo 2 ou 3 fêmeas. Em cada manhã foi realizado esfregaço vaginal e o dia gestacional (DG) 0 foi determinado quando se observou, ao microscópio óptico, a presença de células características da fase estro concomitantes com espermatozoides (Figura 2).

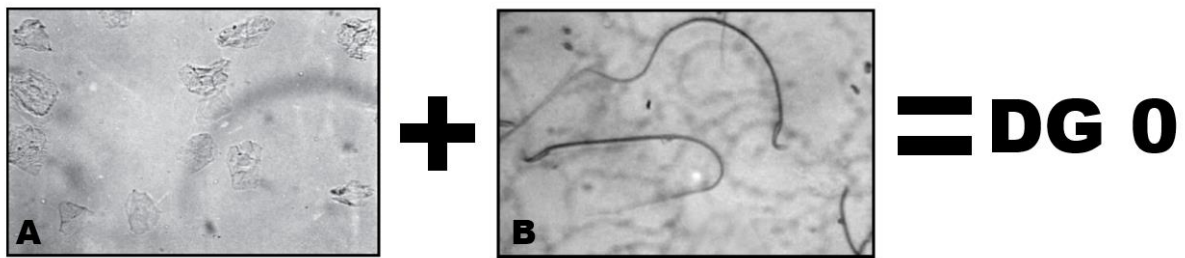


Figura 2. Determinação do Dia Gestacional 0 (DG 0). O dia em que se encontram células características da fase estro (A) concomitante com a presença de espermatozoides (B) no esfregaço vaginal é considerado o DG 0.

No DG 0, as ratas consideradas prenhes foram alojadas individualmente e separadas aleatoriamente em fêmeas controle (CON) ou fêmeas tratadas com fluoxetina (FLX). As fêmeas CON (n=29) foram tratadas por gavagem diariamente com água, enquanto as fêmeas FLX (n=27) receberam diariamente por gavagem (figura 3) 5 mg/kg de fluoxetina (Daforin® solução oral, EMS, Brasil). A dose escolhida justifica-se pelo fato de que, em humanos, a dose usual de fluoxetina varia de 20 a 80 mg/dia, o que corresponde a aproximadamente 0,3-1,1mg/kg/dia (considerando um peso médio de 70 kg). A caracterização de risco de substâncias químicas para humanos é frequentemente feita com base em estudos animais. Visando aumentar a segurança nas extrapolações interespecies de doses, animais experimentais são considerados mais resistentes que humanos. Sendo assim, doses maiores costumam ser testadas em animais. Aplicando-se a metodologia de extrapolação dosimétrica interespecie recomendada pela *US Environmental Protection Agency* (EPA, 2011), a dose 1,1 mg/kg/dia de FLX em humanos corresponderia a 7,5 mg/kg/dia em ratos de peso médio 250 g. Contudo, em estudo piloto em nosso laboratório, a dose de 7,5mg/kg/dia provocou toxicidade materna em ratos, condição indesejável quando um estudo de neurotoxicidade do desenvolvimento é conduzido.



Figura 3. Administração oral por gavagem a ratos.

Ao nascer (DPN 0), o número de filhotes foi contabilizado e as ninhadas foram pesadas. No DPN 4, as ninhadas foram reduzidas a 10 filhotes para evitar que filhotes pertencentes a ninhadas maiores recebessem menor quantidade de princípio ativo que filhotes de ninhadas menores. Os filhotes excedentes foram eutanasiados por decapitação. Sempre que possível foi mantido um número igual de machos e fêmeas por ninhada. Os filhotes foram desmamados no DPN 21 e alojados em grupos separados por sexo e teste a serem submetidos, até o momento das avaliações.

A unidade experimental foi a ninhada, ou seja, não foram utilizados filhotes irmãos do mesmo sexo para uma mesma avaliação.

Todos os animais tiveram livre acesso à água e ração (Nuvital®). Eles foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas a 21 ± 2 ° C em um ciclo de 12:12h claro-escuro. Os animais foram aclimatizados por pelo menos 7 dias antes de iniciar os acasalamentos. Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (6179.2013.89).

3.3. Toxicidade geral das mães

O peso corporal materno foi registrado a cada 3 dias durante todo o período de gestação e lactação. Além disso, o ganho de peso materno real foi estimado subtraindo-se o peso no DPN 0 do peso no DG 0. No DPN 0, o número de filhotes machos e fêmeas em cada ninhada foi determinado, bem como o peso total da ninhada. No DPN 21, as mães foram eutanasiadas com éter etílico.

3.4. Desenvolvimento físico dos filhotes

O peso de cada ninhada foi registrado e dividido pelo número total de filhotes nos DPN 0, 7, 14 e 21. Dessa forma, encontrou-se o peso médio dos filhotes de cada ninhada, do nascimento até o desmame.

3.5. Avaliação das vias dopaminérgicas

3.5.1 Avaliação funcional das vias dopaminérgicas.

Machos e fêmeas foram avaliados no DPN 35 e 75. Diferentes animais de cada ninhada foram usados para cada teste comportamental e avaliação morfológica. Os animais foram desafiados com drogas que possuem a capacidade de disparar respostas comportamentais dependentes de dopamina. Sendo assim, dois testes foram escolhidos: comportamento estereotipado induzido por apomorfina (APO) e hiperatividade em campo aberto induzida por bupropiona (BUP). As doses das drogas foram escolhidas de acordo com a literatura (REDOLAT et al., 2005) (SETLER; SARAU; MCKENZIE, 1976). O laboratório apresentou controle de temperatura, luminosidade e ruído. Todos os testes foram gravados por uma câmera ligada a um computador na sala adjacente e os vídeos foram analisados de forma cega em relação ao tratamento.

3.5.1.1 Hiperatividade em campo aberto induzida por bupropiona

A bupropiona é um antidepressivo que inibe a recaptura principalmente de dopamina e, com menor eficácia, de noradrenalina (STAHL, 2010). Dependendo da dose, ela pode aumentar a atividade motora de roedores, comportamento este mediado pelo aumento da atividade dopaminérgica do sistema mesolímbico (DELLA MAGGIORE; RALPH, 2000). Assim, avaliar se a exposição à FLX influencia o aumento de atividade motora induzido pela bupropiona permite investigar a integridade funcional da inervação dopaminérgica mesolímbica. Para esta avaliação, ratos de ambos os sexos e ambas as idades foram divididos em 8 grupos experimentais:

2 Grupos controle-H₂O (macho e fêmea): animais CON receberam água pela via oral;

2 Grupos controle-bupropiona (macho e fêmea): animais CON receberam 40 mg/kg de bupropiona (EMS, Brasil) pela via oral;

2 Grupos FLX-H₂O (macho e fêmea): animais FLX receberam água pela via oral;

2 Grupos FLX-bupropiona (macho e fêmea): animais FLX receberam 40 mg/kg de bupropiona, pela via oral.

Após 30 minutos da administração, os animais foram avaliados em uma arena circular de madeira (72 cm de diâmetro) com o chão subdividido em 12 partes similares (figura 4) para quantificação da atividade motora: locomoção (número de espaços invadidos pelo animal com as 4 patas) e levantar (número de vezes que o animal se apoiou sobre as patas traseiras). A atividade motora foi quantificada minuto a minuto durante 10 min seguindo a metodologia proposta por Broadhurst (BROADHURST, 1960). Entre um animal e outro, a arena foi limpa com álcool 5%.

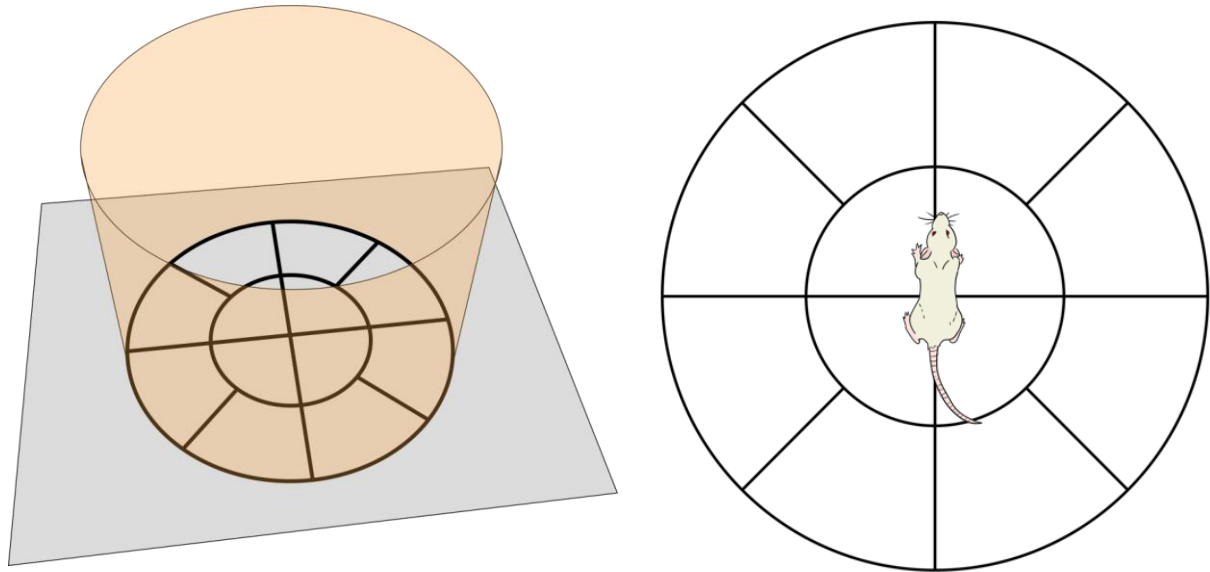


Figura 4. Arena do campo aberto. À esquerda, imagem em perspectiva do aparelho utilizado. À direita, representação esquemática da vista superior da arena, com o animal posicionado ao centro.

3.5.1.2 Comportamento estereotipado induzido por apomorfina


A apomorfina é agonista de receptores dopaminérgicos (D1 e D2) e, quando administrada a roedores, induz estereotipia, comportamento mediado principalmente pela ativação da via dopaminérgica nigroestriatal (STATON; SOLOMON, 2013). Para avaliação do comportamento estereotipado, ratos de ambos os sexos e ambas as idades (DPN 35 e 75) foram divididos em 4 grupos experimentais:

2 Grupos controle (macho e fêmea): animais CON receberam 0,3 mg/kg de apomorfina (Sigma-Aldrich, USA), pela via subcutânea.

2 Grupos FLX (macho e fêmea): animais FLX receberam 0,3 mg/kg de apomorfina, pela via subcutânea.

Após a administração, os animais foram colocados individualmente em gaiolas de acrílico transparentes e o comportamento estereotipado foi quantificado a cada 10 min (1 minuto de observação) durante 120 min. Para cada observação, um escore foi atribuído ao animal, que variou de 0 (animal dormindo ou parado) até 6 (roer contínuo) conforme descrito por Setler (SETLER; SARAU; MCKENZIE, 1976). A intensidade de estereotipia foi

determinada somando-se os escores individuais (de cada 10 min) obtidos durante o período de 30, 60, 90 e 120 min de observação (Figura 5).



Escore	Comportamento
0	Adormecido ou parado
1	Ativo
2	Predominantemente ativo mas com curtos períodos de farejar, levantar, limpar estereotipados
3	Atividade estereotipada constante (farejar, levantar, balançar cabeça) mas com atividade locomotora ainda presente
4	Atividade estereotipada constante realizada em um só local
5	Atividade estereotipada constante, mas com curtos períodos de lamber e/ou roer e morder
6	Lamber e/ou roer constante

Figura 5. Teste de estereotipia induzida por apomorfina. Após a administração da droga, a cada 10 minutos, o pesquisador observa o animal por 1 minuto e atribui um escore que varia de 0 a 6, conforme descrito na tabela.

3.5.2 Avaliação morfológica das vias dopaminérgicas

A imunohistoquímica das vias dopaminérgicas foi executada conforme descrito por Real (REAL et al., 2013). Os animais (n=5-7/grupo) foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina 0,9%, seguida de solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram coletados e armazenados em paraformaldeído 4% por 4 horas. Em seguida, o material foi transferido para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em PB. Os encéfalos foram então cortados em uma espessura de 30 μ m em um micrótomo deslizante de congelamento.

Os cortes histológicos foram transferidos, com auxílio de um pincel, para placas de cultivo contendo solução tampão (PB 0,1 M), e mantidos em geladeira a 4 $^{\circ}$ C até o momento do procedimento de imunohistoquímica. Cortes da Substância Negra Compacta (SN), Área Tegmental Ventral (ATV), Núcleo Accumbens e Estriado foram selecionados e submetidos à metodologia de imunoperoxidase com anticorpos específicos para detecção da enzima limitante da síntese de dopamina tirosina hidroxilase (TH).

A seguir, os cortes foram lavados em tampão fosfato (PB 0,1 M) por três vezes (10 minutos cada) e então incubados com anticorpos para TH (1:2000, MAB5280, Chemicon–Millipore, EUA), em PB com 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal de jumento (normal donkey serum – NDS) e incubados por um período de 14 a 18 horas à temperatura ambiente (24 °C).

Após este período, foram lavados novamente em PB à temperatura ambiente e incubados por 2 horas com anticorpo secundário biotilado (anti-camundongo) em uma concentração de 1:200. Após nova série de lavagens à temperatura ambiente, os cortes foram colocados por duas horas numa solução de Triton X-100 0,3% em tampão fosfato 0,1 M com 0,4 M de NaCl, contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC ELITE kit, Vector Labs, EUA). Depois de nova série de lavagens, os cortes foram imersos em meio contendo 3-3'diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, EUA) 0,05% em PB 0,1 M por 5 minutos. Foram acrescentados a seguir 3 ml de solução de peróxido de hidrogênio a 0,1% em água destilada, mantendo-se os cortes neste banho até que a reação fosse evidenciada.

Atingida a imunorreatividade (evidenciada pelo desenvolvimento de coloração marrom), os cortes foram removidos da solução com DAB e imersos em tampão PB 0,1 M. Após nova série de lavagens em PB com o objetivo de remoção do excesso de reagente, os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro gelatinizadas e colocadas em placa quente. Depois de secas, foram hidratadas em água destilada por 1 minuto, banhadas em solução de tetróxido de ósmio 0,1% por 15 – 30 segundos, desidratadas por uma série de álcoois em concentrações crescentes, clareadas com Hemo-De (Fisher, EUA) e cobertas com lamínulas, tendo como meio de montagem o Permount (Sigma, EUA).

A imunorreatividade foi analisada em microscópio de luz e a quantificação da marcação foi realizada por meio do *software* Image J (NIH, USA). Para análise semi-quantitativa capturamos imagens digitais em microscópio óptico (E1000, Nikon) acoplado a uma câmera digital e ao programa Motic Imaging Software ACT-U. Foram obtidas imagens da SN, ATV, Nucleo Accumbens e Estriado. As análises do número de corpos celulares marcados nos núcleos dopaminérgicos SN e ATV foram realizadas em um campo de 420.000 μm^2 . Os dados foram obtidos por meio da ferramenta “Cell Counter”, no *software* supracitado, permitindo a quantificação do número de células TH-positivas.

A análise da densidade de fibras dopaminérgicas nas áreas de projeção Estriado e Núcleo Accumbens foram feitas por meio da quantificação da densidade integrada da marcação obtida em um campo de 2500 μm^2 . Os valores foram obtidos após realização de 3 medidas em regiões distintas do corte, calculando-se um valor médio. Com os valores das médias calculou-se uma razão (média da densidade integrada da área marcada/média da densidade integrada da área não marcada) e, assim, obteve-se um valor final para cada animal.

Pelo menos 4 imagens digitais foram obtidas para cada animal, entre os bregmas 4,68 a 5,64 para SN e ATV, 1,20 a 1,44 para Nucleo Accumbens e bregmas 0,36 a 0,42 para o Estriado.

3.6. Avaliação do eixo HPA

Para a avaliação do eixo HPA foram utilizados machos e fêmeas no DPN 35, considerando que foi essa a fase na qual alterações no eixo foram observadas na literatura (PAWLUSKI et al., 2012; FRANCIS-OLIVEIRA et al., 2013)

3.6.1 Teste funcional da glândula adrenal

A competência da glândula adrenal foi avaliada pelo método de desafio com ACTH descrito por Harvey (HARVEY; EVERETT; SPRINGALL, 2007), com modificações. Trata-se de um método para exclusão de toxicidade adrenal. Durante 5 dias, os animais foram injetados entre 8:00 e 9:00 AM com salina pela via subcutânea para se adaptarem à manipulação. No sexto dia, os animais foram divididos em 8 grupos:

2 Grupos controle-salina (macho e fêmea): animais CON receberam salina pela via subcutânea;

2 Grupos controle-ACTH (macho e fêmea): animais CON receberam 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ACTH (Synacthen[®], Novartis, EUA) pela via subcutânea;

2 Grupos FLX-salina (macho e fêmea): animais FLX receberam salina pela via subcutânea;

2 Grupos FLX-ACTH (macho e fêmea): animais FLX receberam 50 µg/kg de ACTH (Synacthen®, Novartis, EUA), pela via subcutânea.

O ACTH foi dissolvido em salina imediatamente antes das administrações. Após 1 hora da administração, os animais foram decapitados em guilhotina e o sangue do tronco foi coletado em tubos contendo heparina, envolvidos por gelo. Os animais foram divididos de maneira que a coleta de sangue ocorreu entre 9:00 e 10:00 AM (período no qual os níveis de corticosterona estão mais baixos em ratos). A escolha desse horário objetivou minimizar as flutuações circadianas nos níveis de corticosterona e aumentar a sensibilidade para detecção de possíveis alterações do eixo HPA induzidas pela exposição materna à FLX. O sangue foi centrifugado e o plasma congelado em freezer -80°C até a quantificação de corticosterona. Dos grupos Controle-salina e FLX-salina foram retirados e pesados as adrenais, hipófise e hipotálamo.

A dosagem da corticosterona plasmática foi avaliada nas amostras por meio de ensaio imunoenzimático, de acordo com as recomendações do fabricante (corticosterone EIA Kit, Cayman Chemical, EUA). Este ensaio pauta-se na competição entre a corticosterona e um conjugado de corticosterona–acetilcolinesterase (AChE) por um número limitado de sítios ligadores em anticorpo de coelhos, específico para corticosterona. Uma vez que a concentração de AChE é constante e a concentração da corticosterona a ser dosada varia, a quantidade de AChE que se liga ao anticorpo (Ac) é inversamente proporcional à concentração de corticosterona na amostra. O complexo Ac-corticosterona (analito ou AChE) liga-se a um Ac monoclonal de camundongo anti-IgG de coelho, pré-aderido à placa. Em seguida, a placa é lavada e o substrato para AChE é adicionado no poço. O produto da reação enzimática exibe coloração amarela, com leitura ótima na região de 412 nm em espectrofotômetro. A intensidade desta coloração é proporcional à quantidade de AChE ligada e portanto inversamente proporcional à quantidade de corticosterona na amostra.

As amostras de plasma foram aplicadas em cada poço, nas diluições de 1:10 para corticosterona basal e de 1:30 para corticosterona pós-estímulo com ACTH. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro de placa, 60 minutos após a adição do substrato.

3.6.2 Reação de imunohistoquímica na adrenal e hipófise

Após pesagem, a hipófise foi fixada por 12-24 h em folmaldeído a 10% e incluída em parafina. A imunohistoquímica para ACTH foi realizada em cortes histológicos de 4 μm suspensos em lâminas silanizadas para identificar as células corticotróficas no lobo anterior da hipófise. A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão, com as lâminas imersas em solução tampão EDTA a 4% durante 1 minuto e 12 segundos, seguida por resfriamento das lâminas em temperatura ambiente por pelo menos 20 minutos. A reação de imuno-histoquímica foi realizada utilizando-se anticorpo policlonal de coelho anti-ACTH humano (Dbiosys, EUA, 1:250). Após incubação com anticorpo secundário e revelação com DAB as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 5 min, desidratadas e montadas utilizando-se lamínulas.

De forma semelhante, após pesagem, a adrenal direita foi fixada por 12-24 h em folmaldeído a 10% e incluída em parafina. A imunohistoquímica para HSD3 β foi realizada em cortes histológicos de 4 μm suspensos em lâminas silanizadas para identificar a expressão desta enzima envolvida na esteroidogênese de células corticais da adrenal. A reação de imuno-histoquímica foi realizada utilizando-se anticorpo policlonal de coelho anti-HSD3 β 1 (Bioss, UK, 1:100), como descrito resumidamente no item anterior.

Nos dois casos, as áreas de maior positividade dos anticorpos foram fotografadas e analisadas utilizando-se o programa Image J (NIH, EUA). Calculou-se então a razão entre área marcada relativa e área total de tecido e os valores foram expressos em porcentagem de pixels (pixels das células positivas/pixel total do tecido). É interessante mencionar que métodos imunohistoquímicos quantitativos têm mostrado uma boa correlação com a concentração absoluta de peptídeos como ACTH determinadas por técnicas de radioimunoensaio (BERKENBOSCH; TILDERS, 1988).

3.7. Análises estatísticas

Inicialmente, uma análise exploratória foi realizada para avaliar a distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Levene) de cada variável. Para variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, foram conduzidas análises paramétricas.

Os testes foram realizados com filhotes de ambos os sexos. Sendo assim, o sexo também foi adicionado como fator nas análises estatísticas paramétricas. Por outro lado, a idade não foi incluída como um fator na análise, ou seja, as análises realizadas em diferentes idades foram analisadas de forma separada. A razão para isso é que, uma vez que a avaliação ocorreu em momentos diferentes, outras variáveis ambientais além da idade podem estar presentes.

Os testes estatísticos empregados neste estudo foram:

- ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA): ganho de peso das mães e filhotes
- ANOVA fatorial: ganho de peso materno real, desafio com bupropiona em campo aberto, teste funcional da adrenal pelo desafio com ACTH, Expressão de ACTH na hipófise e da 3 β HSD pela adrenal por meio de imunohistoquímica.
- ANCOVA: Peso dos órgãos do eixo HPA (hipotálamo, hipófise e adrenal), considerando o peso total do animal como uma covariável.
- Mann-Whitney: Estereotipia induzida por apomorfina, contagem neuronal e densidade ótica de neurônios e projeções do sistema dopaminérgico.

Para o estabelecimento das conclusões adotou-se $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Avaliação Toxicológica geral

ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA) indicou efeito do período no ganho de peso das mães, refletindo as flutuações que ocorrem durante a gravidez e lactação. O tratamento com FLX não influenciou o ganho de peso, como pode ser observado na Figura 6. O tratamento com FLX também não influenciou o ganho de peso real materno (peso no DPN 0 subtraído do peso no DG 0) (Figura 7).

O peso corporal dos filhotes durante as primeiras três semanas de idade não foi influenciado pela exposição à FLX como indicado por RMANOVA. Houve apenas um efeito da idade, refletindo o ganho de peso dos filhotes no decorrer do desenvolvimento (Figura 8).

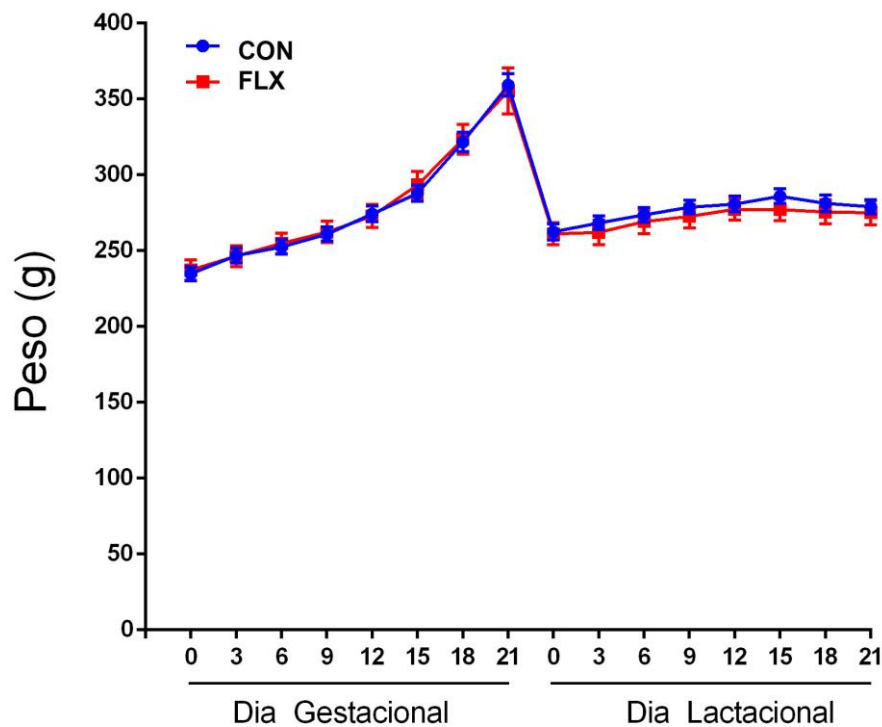


Figura 6. Ganho de peso das ratas mães durante a gestação e lactação. Dados expressos como média \pm EPM de 27-29 animais em cada grupo. ANOVA para medidas repetidas indicou apenas efeito do período. CON: água; FLX: fluoxetina 5mg/kg/dia.

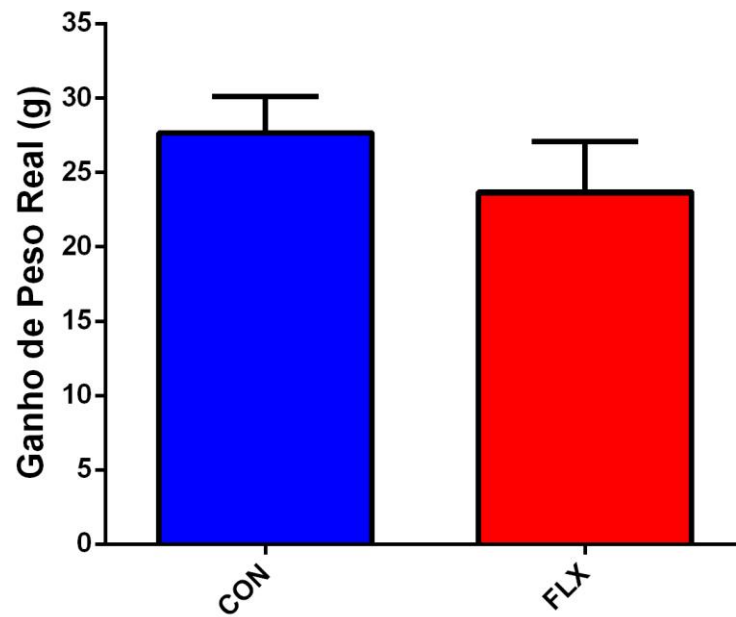


Figura 7. Ganho de peso real das mães durante a gestação. Dados expressos como média \pm EPM de 27-29 animais em cada grupo. ANOVA fatorial, $p > 0,05$. CON: água; FLX: fluoxetina 5mg/kg/dia.

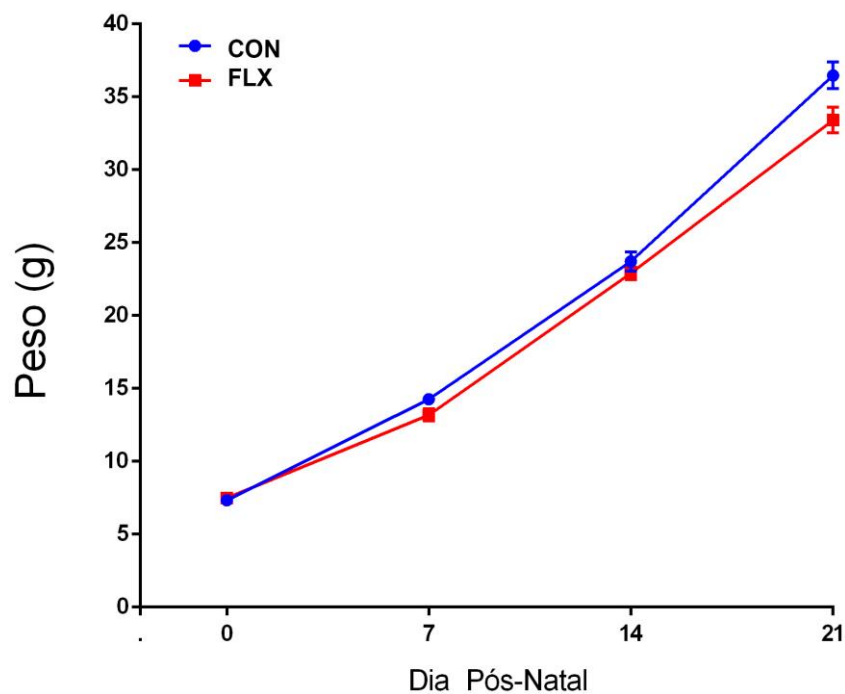


Figura 8. Ganho de peso dos filhotes do nascimento até o desmame. Dados expressos como média \pm EPM de 27-29 ninhadas em cada grupo. ANOVA para medidas repetidas indicou apenas efeito do período. CON: água; FLX: fluoxetina 5mg/kg/dia.

4.3. Avaliação funcional das vias dopaminérgicas

4.3.1. Hiperatividade em campo aberto induzida por bupropiona

Neste teste, ANOVA fatorial foi empregada e os 3 fatores considerados foram exposição (CON ou FLX), sexo (macho ou fêmea) e tratamento (água ou BUP). No DPN 35, houve efeito de tratamento tanto para o comportamento de locomoção (Figura 9A), quanto para o comportamento de levantar (Figura 9B), indicando que independente da exposição durante o desenvolvimento e independente do sexo, ratos tratados com BUP apresentaram maior contagem de locomoção e levantar. Para este último comportamento, a exposição também atingiu significância estatística indicando que independentemente do tratamento, animais expostos à FLX apresentam aumento no comportamento de levantar, quando comparados aos animais CON.

No DPN 75, foi detectado efeito de tratamento tanto para locomoção quanto para levantar, revelando que BUP foi capaz de aumentar os dois comportamentos, independente da exposição ou sexo. Para locomoção, sexo também atingiu significância estatística, indicando que fêmeas são mais ativas que machos no campo aberto, independente de tratamento. Foi também observada uma interação entre exposição e sexo para o comportamento de locomoção e pode ser observada na figura 9C. Neste caso, fêmeas expostas à FLX foram mais ativas que fêmeas CON. Isso, contudo, não foi observado para machos.

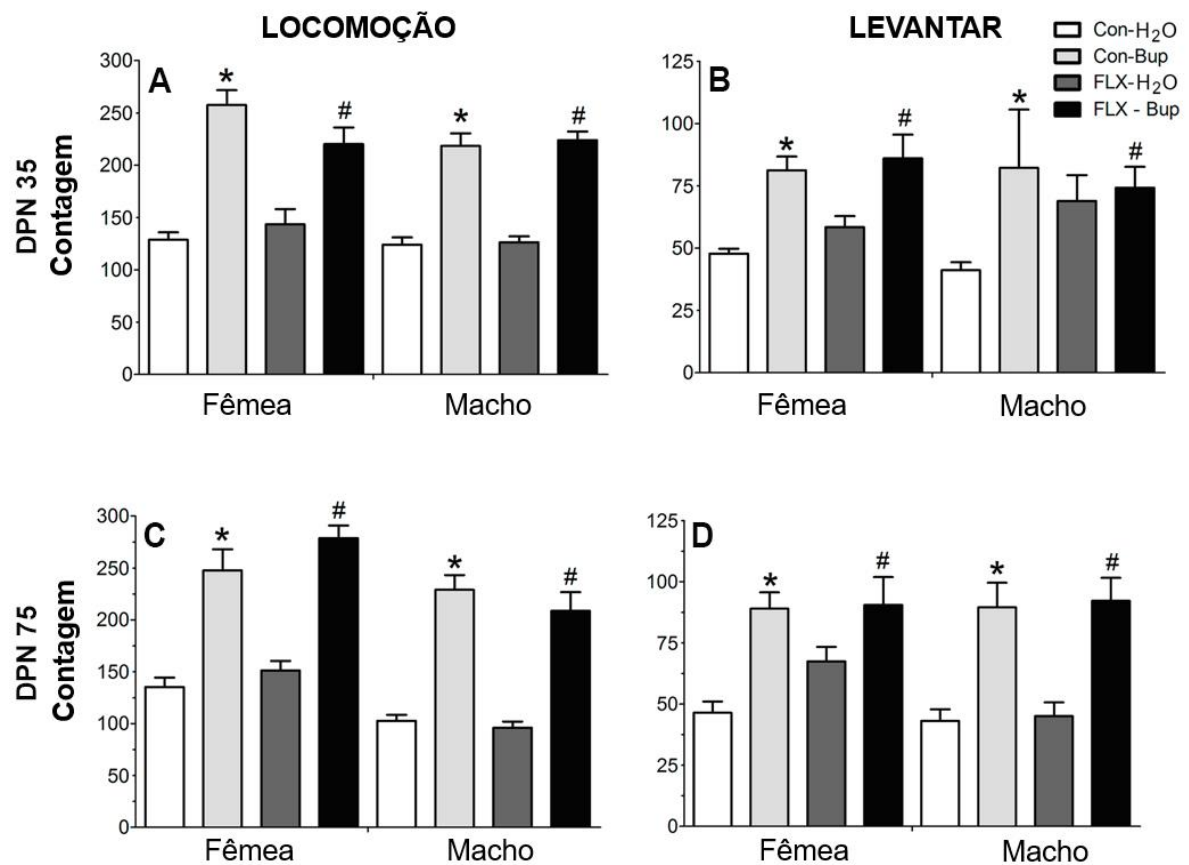


Figura 9. Influência da exposição à FLX durante a gestação e amamentação na resposta comportamental de filhotes machos e fêmeas à bupropiona (40mg/kg, gavage) nos DPN 35 e 75 no teste de campo aberto. Dados expressos como médias \pm EPM de 8-13 animais por grupo. CON: controle, FLX: fluoxetina, BUP: Bupropiona. * $p < 0.05$ comparado a CON-H₂O; # $p < 0.05$ comparado a FLX-H₂O (ANOVA fatorial). Além dos efeitos da BUP, ANOVA fatorial também indicou que, independente do tratamento: 1) animais expostos à FLX no DPN 35 apresentaram aumento do comportamento de levantar, quando comparados a CON; 2) fêmeas no DPN 75 apresentaram aumento de locomoção em relação aos machos; e 3) no DPN 75, fêmeas expostas à FLX apresentaram maior locomoção do que fêmeas CON.

4.3.1. Comportamento estereotipado induzido por apomorfina

Uma vez que os dados não alcançaram critérios suficientes para testes paramétricos em cada tempo, idade e sexo os dados foram analisados por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Como pode ser observado na Figura 10, diferenças significativas foram detectadas para machos adolescentes em 120 min e para fêmeas adultas em 90 min. Em

ambos os casos, filhotes expostos à FLX apresentaram diminuição no comportamento estereotipado, quando comparados aos seus respectivos controles.

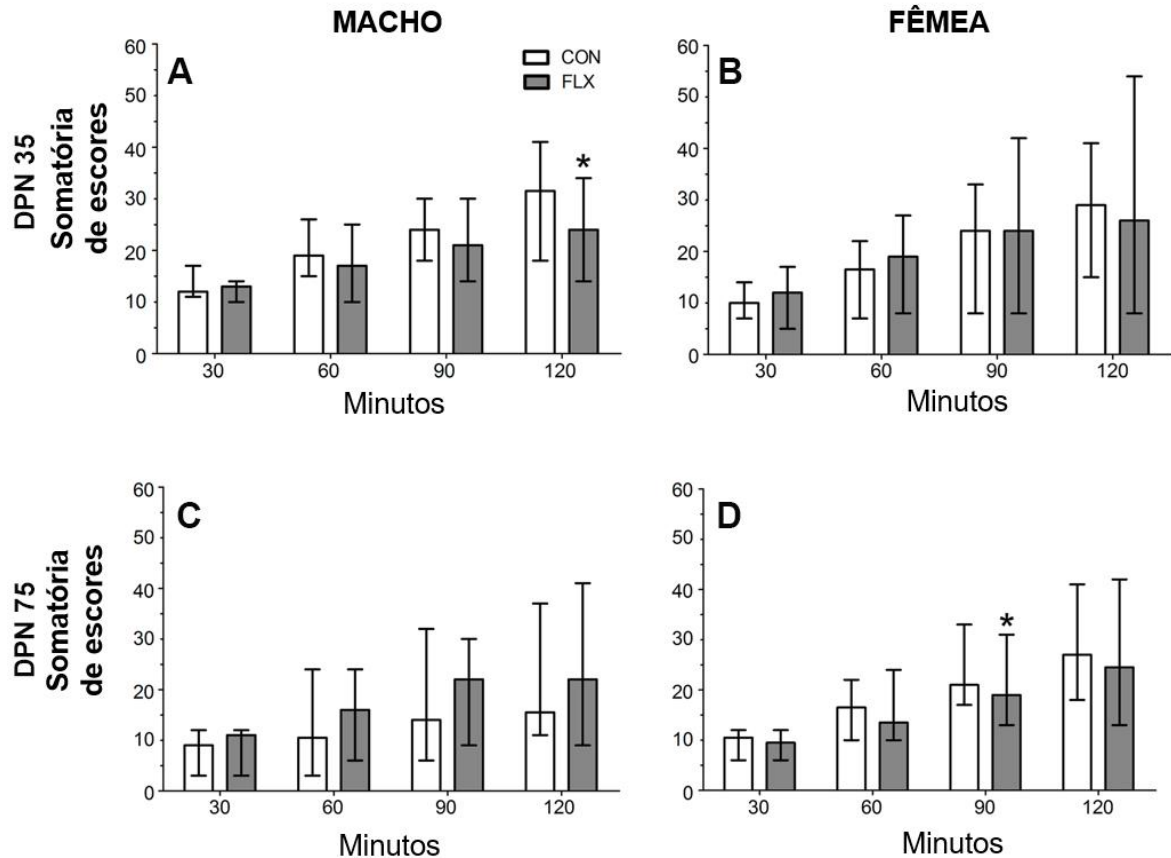


Figura 10. Escore de intensidade na estereotipia induzida por apomorfina em filhotes adolescentes (DPN 35) e adultos (DPN 75) expostos ou não à FLX durante o desenvolvimento. Dados expressos como medianas (valores mínimos-máximos) de 9-10 animais por grupo. * $p < 0.05$ comparado ao CON (Mann-Whitney).

4.4. Avaliação morfológica das vias dopaminérgicas

Os dados para cada idade e sexo foram analisados pelo test de Mann-Whitney. Como pode ser observado na Tabela 1, a exposição à FLX durante a gestação e lactação não influenciou ($p > 0,05$) o número de neurônios na SN e ATV bem como a inervação dopaminérgica no estriado em filhotes adolescentes e adultos. As imagens representativas referentes aos cortes histológicos imunomarcados podem ser vistos nas figuras 11, 12, 13 e 14.

Tabela 1. Contagem neuronal (celulas/mm²) na substância negra e área tegumental ventral e razão da densidade ótica no estriado e núcleo accumbens, obtidos por meio de imunomarcção para tirosina hidroxilase. Foram avaliados cérebros de ratos e ratas adolescentes (DPN 35) e adultos (DPN 75) expostos ou não à FLX durante o desenvolvimento.

	DPN 35						DPN 75					
	FÊMEAS			MACHOS			FÊMEAS			MACHOS		
	CON	FLX	CON	FLX	CON	FLX	CON	FLX	CON	FLX	CON	FLX
SN (contagem neuronal)	336,3 (291,2-412,7)	353,8 (273,6-365,3)	362,4 (349,3-383,5)	369,2 (351,1-393,4)	287,2 (214,9-432,4)	259,4 (208,5-317,4)	253,9 (213,8-290,7)	268,8 (219,5-378,9)				
ATV (contagem neuronal)	228,5 (213,8-288,0)	219,6 (188,6-247,8)	227,4 (222,1-258,3)	213,0 (187,1-298,6)	199,4 (135,8-235,0)	162,5 (148,4-210,5)	167,0 (131,2-194,3)	168,8 (105,6-221,9)				
Estriado (densidade ótica)	1,3 (1,1-1,6)	1,4 (1,3-2,7)	1,4 (1,1-2,4)	1,3 (1,2-2,0)	1,5 (1,2-2,1)	1,4 (1,4-1,8)	1,6 (1,3-2,1)	1,6 (1,2-2,0)				
Accumbens (densidade ótica)	2,4 (1,4-3,9)	1,8 (1,4-2,7)	2,0 (1,3-3,9)	1,8 (1,6-1,8)	2,3 (1,6-3,9)	2,7 (2,1-5,2)	2,3 (1,3-2,8)	2,0 (1,5-3,3)				

Dados expressos como medianas (valores mínimos-máximos) de 5-7 animais por grupo. CON: água; FLX: fluoxetina 5mg/kg/dia. Mann Whitney, p>0.05.

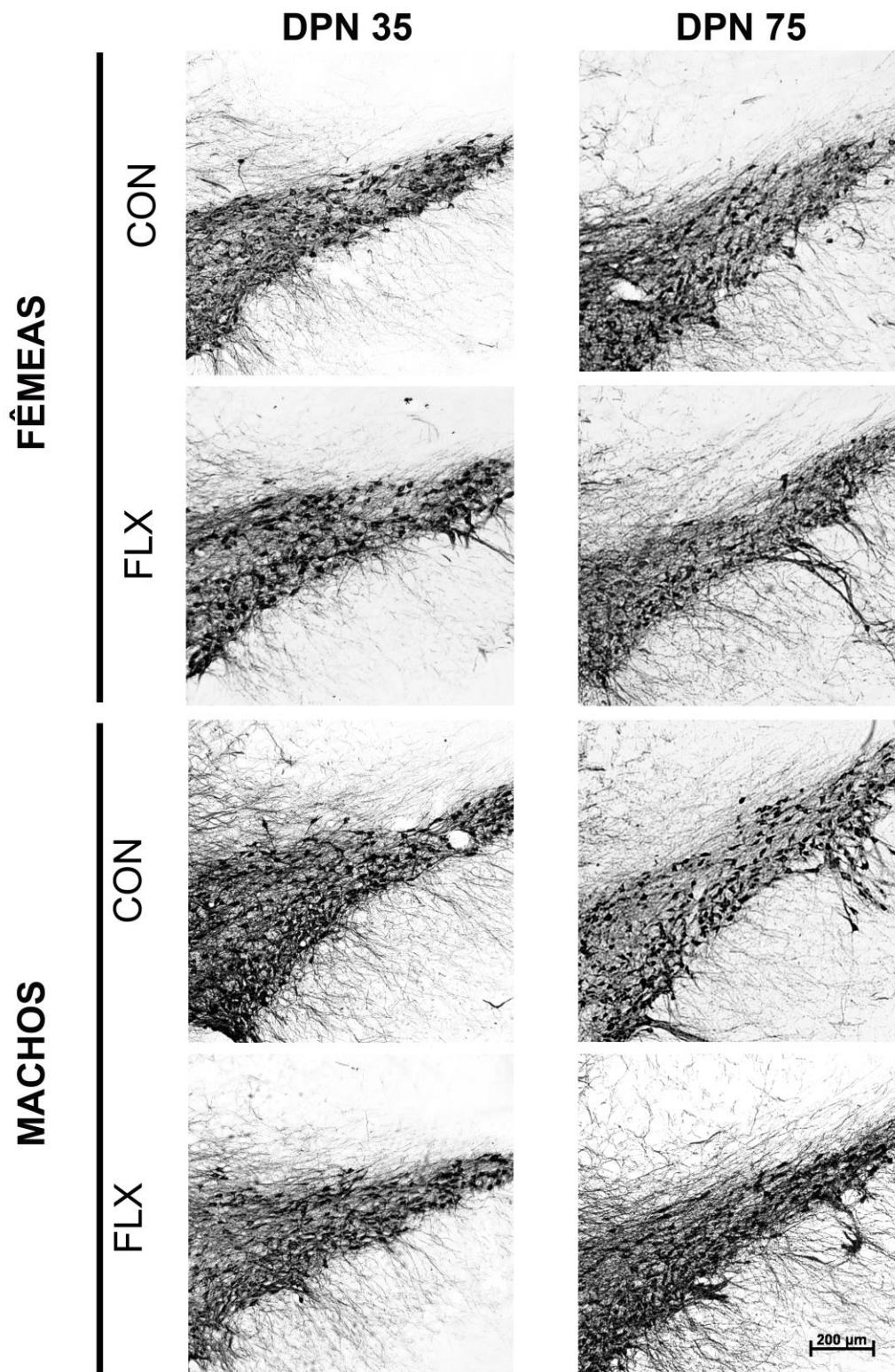


Figura 11. Imagens representativas de secções coronais da Substância Negra (bregmas 4.68 to 5.64) em filhotes machos e fêmeas (DPN 35 e 75) expostos à fluoxetina durante o desenvolvimento, ilustrando a expressão de tirosina-hidroxilase neste.

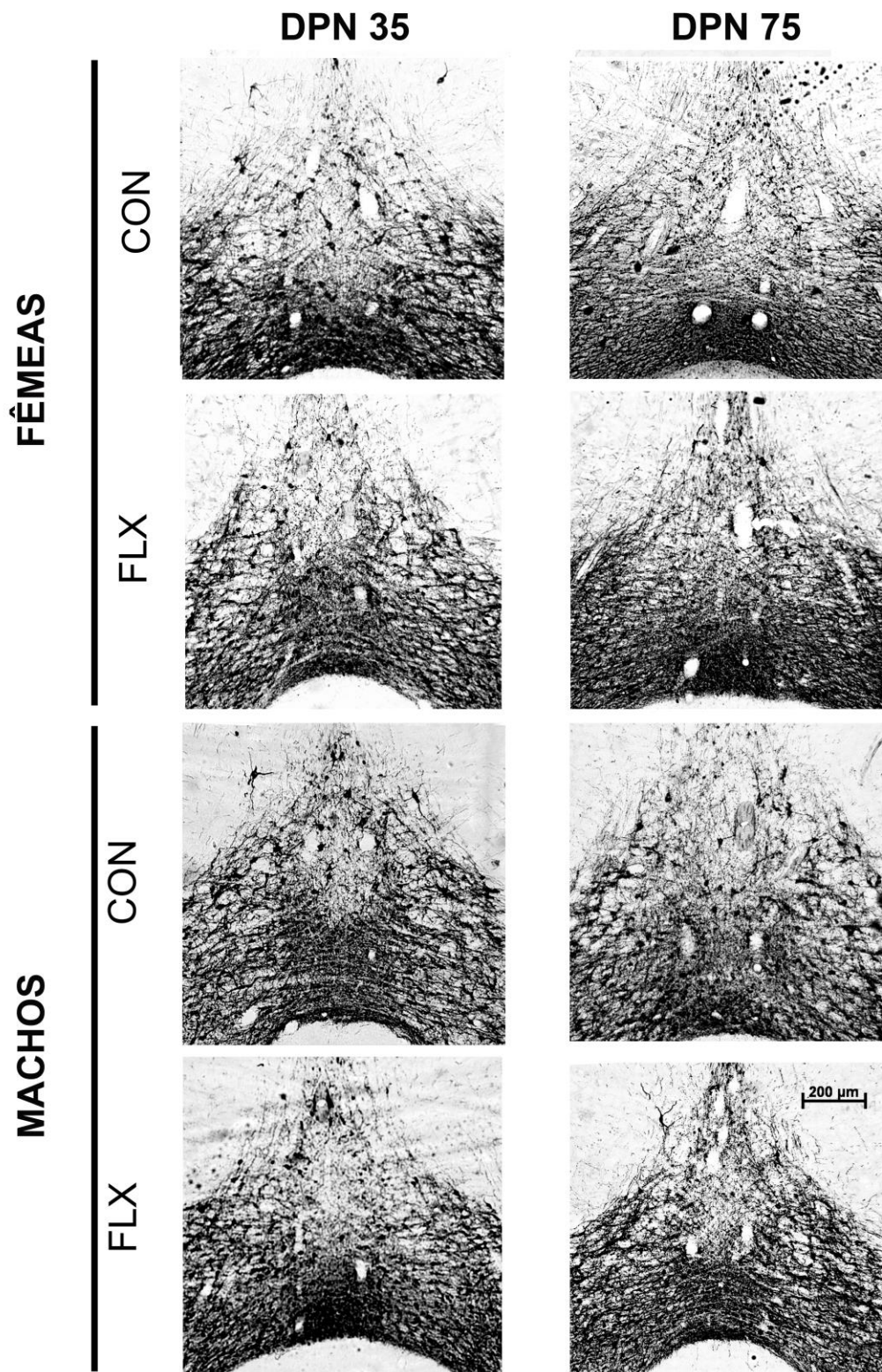


Figura 12. Imagens representativas de secções coronais da Área Tegmental Ventral (bregmas 4.68 to 5.64) em filhotes machos e fêmeas (DPN 35 e 75) expostos à fluoxetina durante o desenvolvimento, ilustrando a expressão de tirosina-hidroxilase.

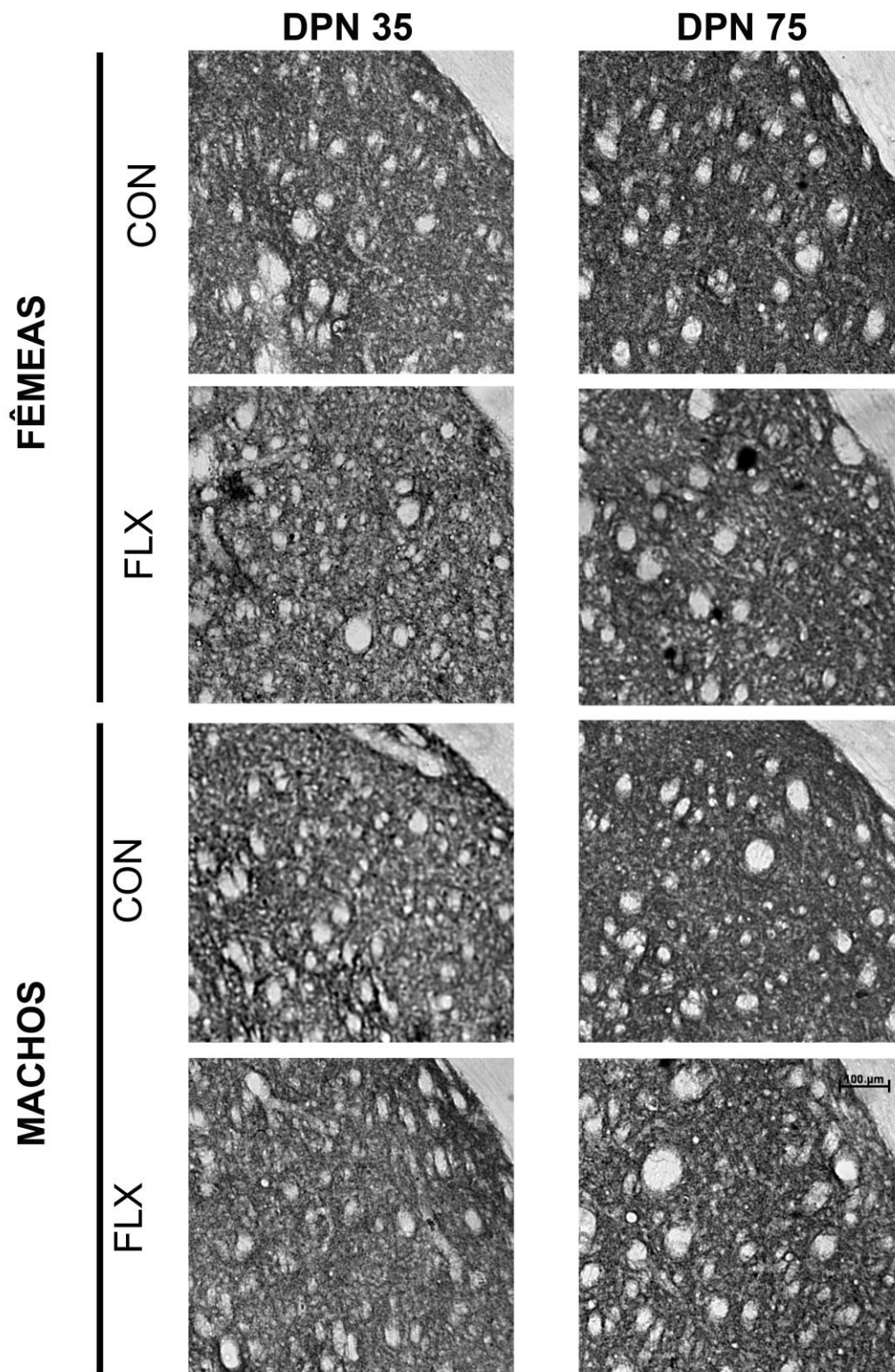


Figura 13. Imagens representativas de secções coronais do Estriado (bregmas 0.36 to 0.42) em filhotes machos e fêmeas (DPN 35 e 75) expostos à fluoxetina durante o desenvolvimento, ilustrando a expressão de tirosina-hidroxilase.

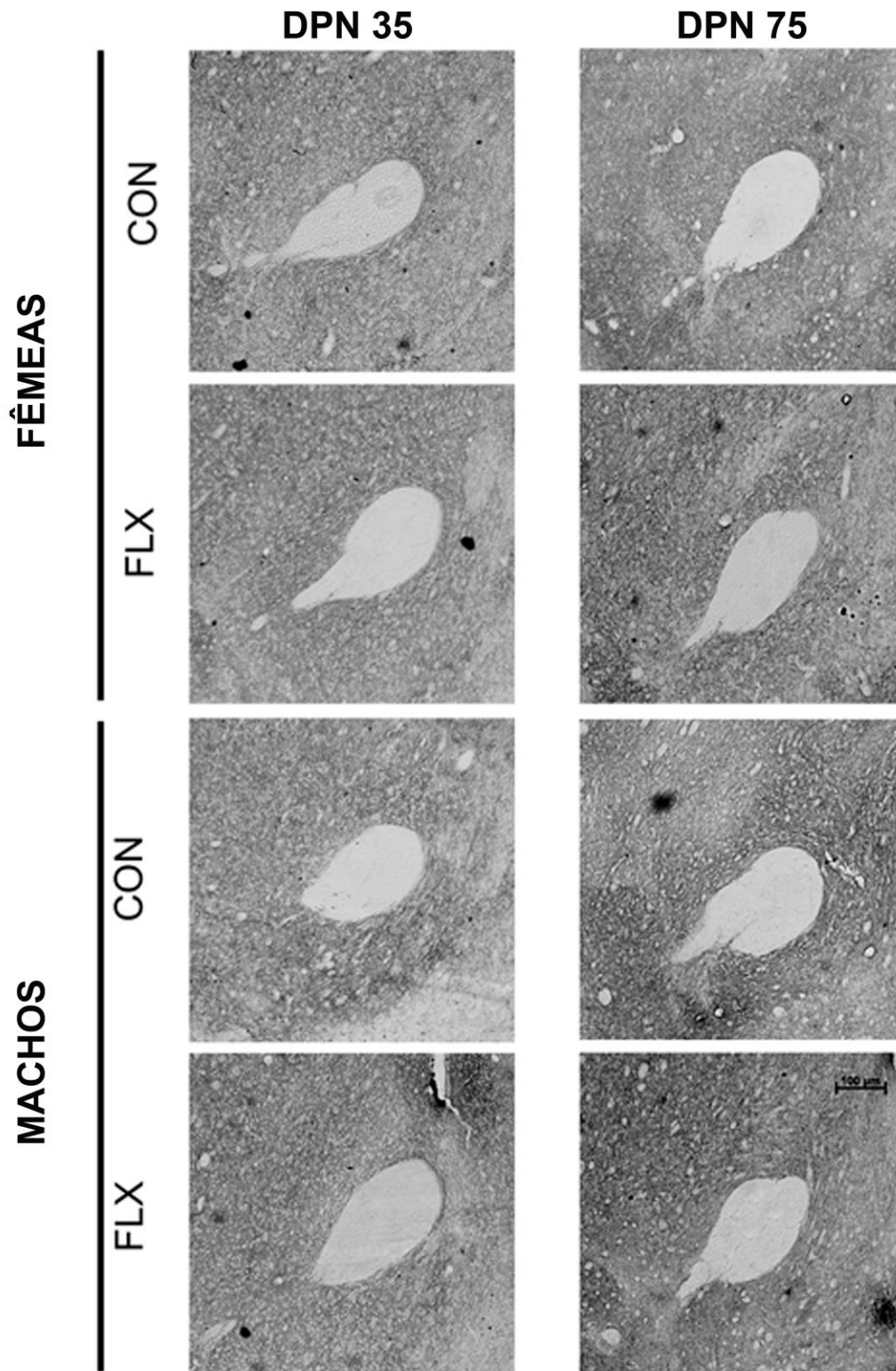


Figura 14. Imagens representativas de secções coronais do Accumbens (bregmas 1.20 to 1.44) em filhotes machos e fêmeas (DPN 35 e 75) expostos à fluoxetina durante o desenvolvimento, ilustrando a expressão de tirosina-hidroxilase.

4.5. Avaliação do eixo HPA

4.5.1. Teste funcional da glândula adrenal

A avaliação dos níveis plasmáticos de corticosterona por meio de ANOVA fatorial revelou aumento significativo em animais estimulados com ACTH, independente de sexo ou exposição à FLX. A aparente diminuição de corticosterona nos grupos FLX-ACTH em relação ao grupo CON-ACTH não atingiu significância estatística, como demonstrado na Figura 15.

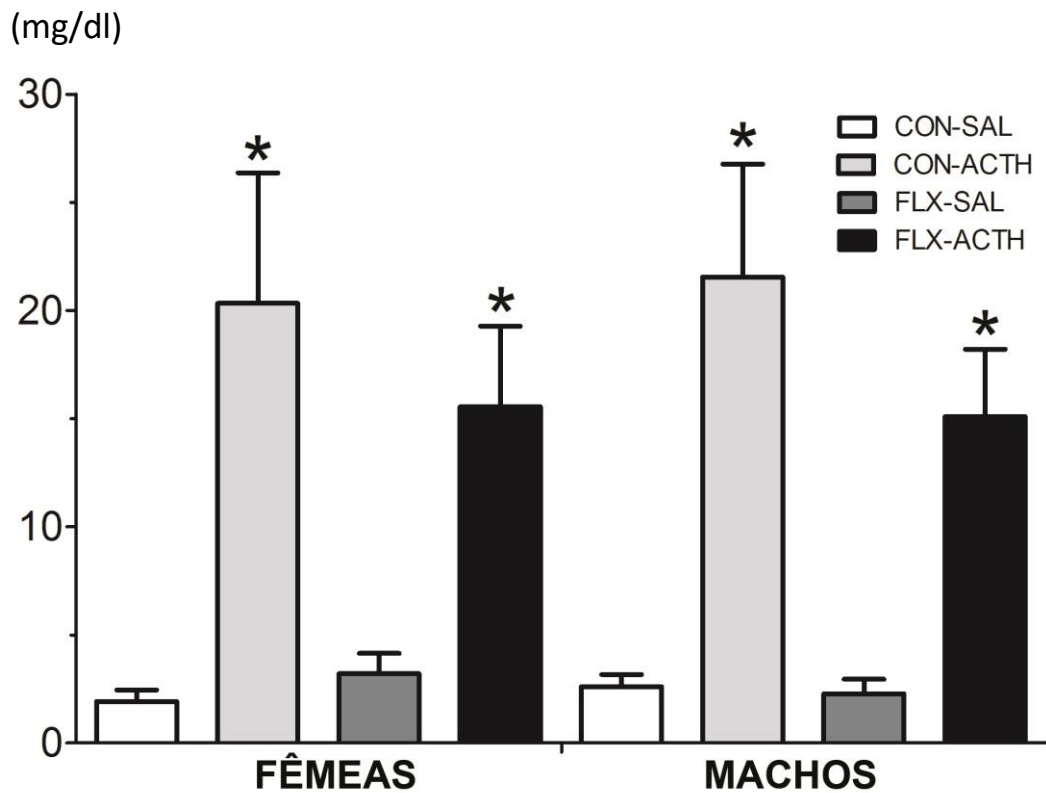


Figura 15. Dosagem de corticosterona plasmática após estimulação com ACTH sintético em filhotes machos e fêmeas no DPN 35 expostos à fluoxetina durante o desenvolvimento. Cada barra representa média \pm EPM (n=15/grupo). *p < 0,05 (ACTH em relação à Salina), ANOVA fatorial.

4.5.2. Reação de imunohistoquímica na adrenal e hipófise

ANOVA fatorial indicou efeito de exposição na imunoexpressão da enzima 3β HSD no córtex da adrenal. Filhotes expostos à FLX durante a gestação e amamentação apresentaram redução na imunomarcagem para a enzima 3β HSD. (Figura 16)

Na hipófise, a exposição à FLX durante o desenvolvimento não reduziu a expressão de ACTH ($p>0,05$) (Figura 17). Da mesma forma, o peso dos órgãos que compõe o eixo HPA não foi alterado pela exposição à FLX durante a gestação e amamentação, como pode ser observado na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2. Peso do hipotálamo, hipófise e adrenal de animais FLX e CON no DPN 35.

	Machos		Fêmeas	
	CON	FLX	CON	FLX
Hipotálamo (mg)	47,8 ± 0,8	50,1 ± 0,9	48,2 ± 0,9	49,7 ± 0,7
Hipófise (mg)	4,0 ± 0,1	3,8 ± 0,1	4,4 ± 0,1	3,9 ± 0,1
Adrenal (mg)	14,5 ± 0,3	14,4 ± 0,2	13,9 ± 0,1	12,3 ± 0,1

Dados expressos como média ± EPM de 13-16 filhotes em cada grupo. $p>0,05$ (ANCOVA fatorial).

Con: água; FLX: fluoxetina 5 mg/kg/dia

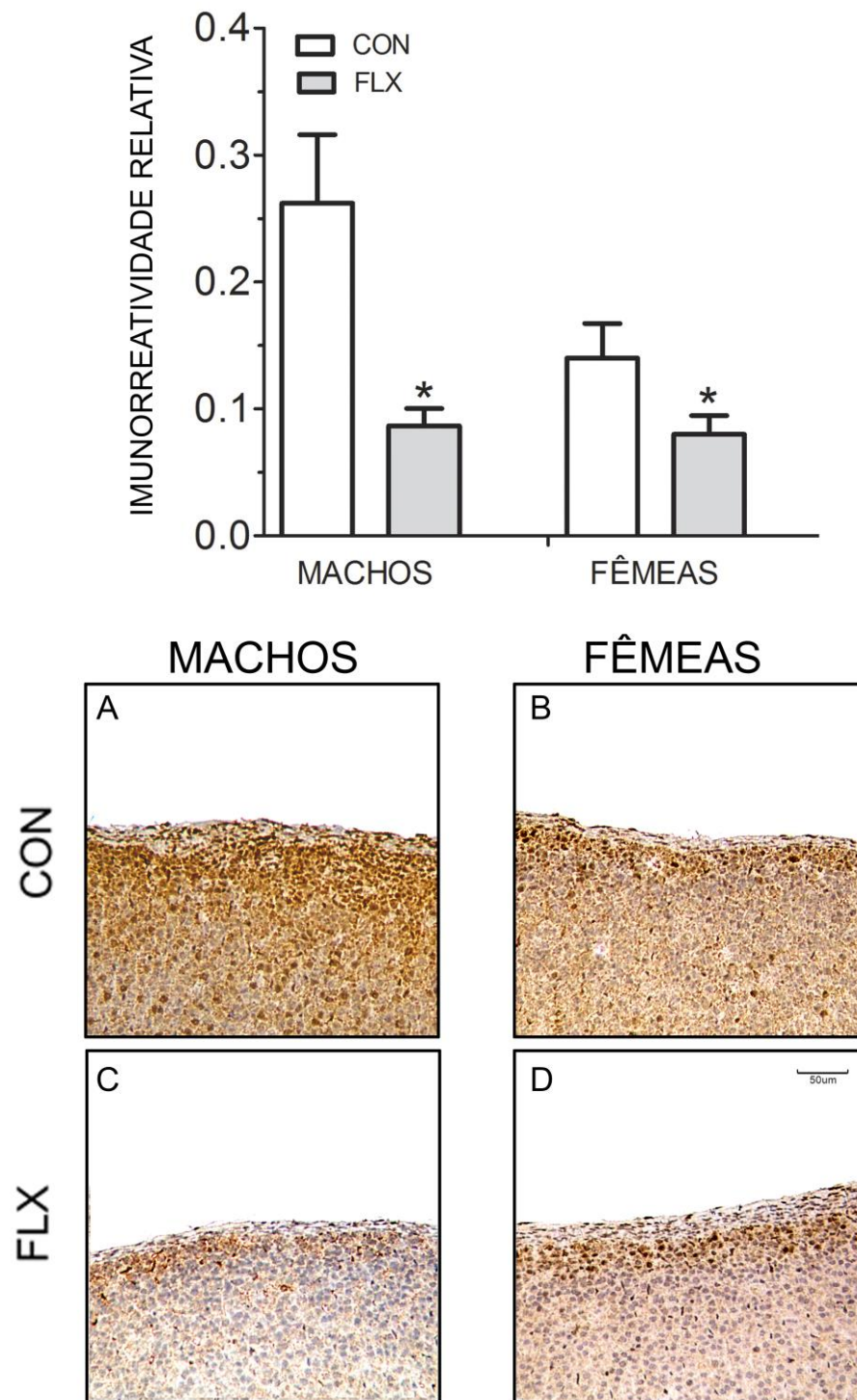


Figura 16. Imunomarcção de 3β HSD na glândula adrenal de filhotes machos e fêmeas com 35 dias expostos ou não à fluoxetina. O gráfico demonstra a razão entre área imunomarcada e área total de corte de tecido analisado. Cada barra representa média \pm EPM de 6 animais. * $p < 0,05$ comparado ao controle (ANOVA fatorial).

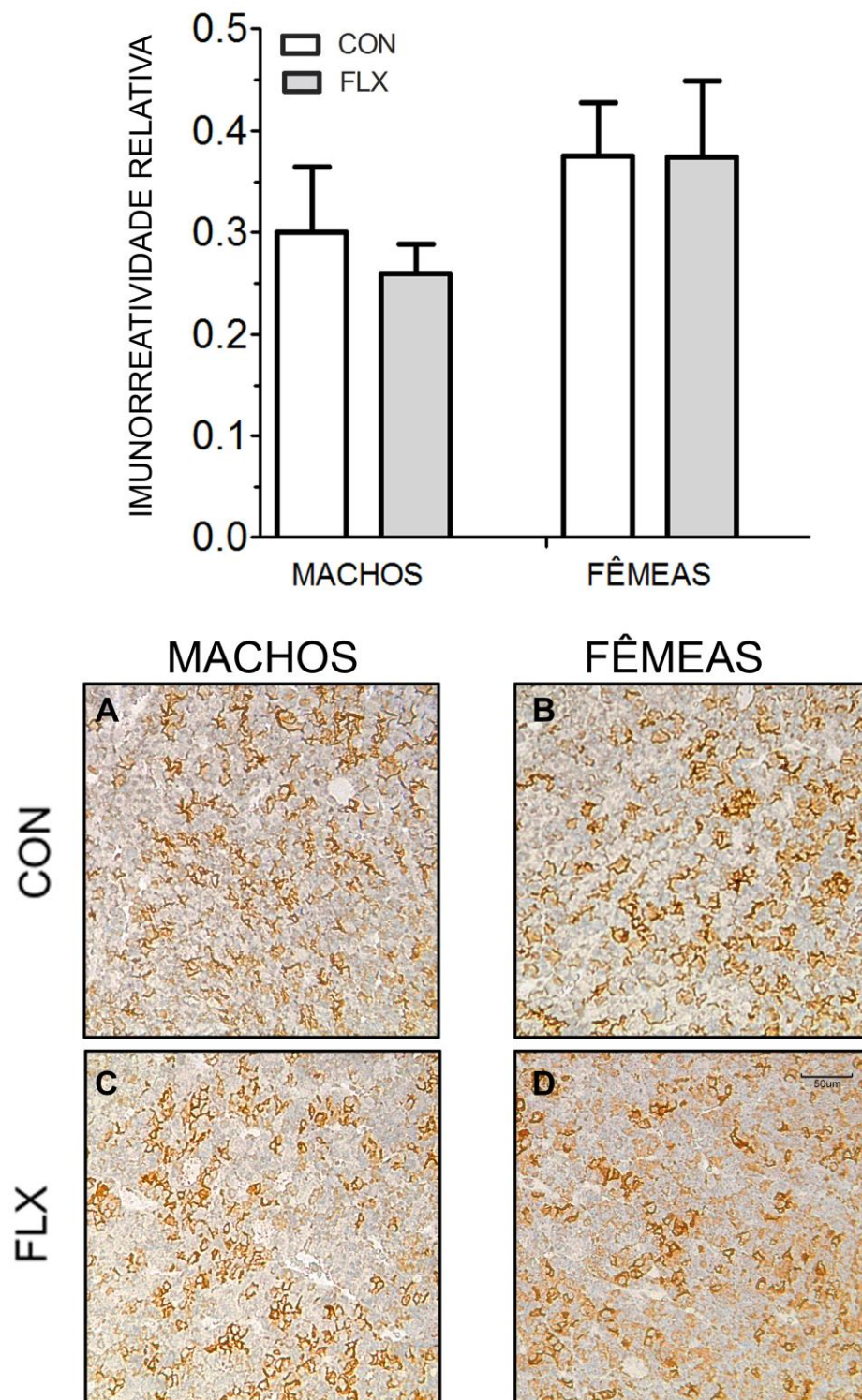


Figura 17. Imunomarcção para ACTH na hipófise de filhotes machos e fêmeas com 35 dias expostos ou não à fluoxetina. O gráfico demonstra a razão entre área imunomarcada e área total de corte de tecido analisado. Cada barra representa média \pm EPM de 6 animais. $p > 0,05$, ANOVA fatorial.

5. Discussão

Na tentativa de investigar possíveis déficits no sistema dopaminérgico central após exposição à FLX durante a gestação e amamentação, este estudo avaliou a resposta comportamental dos filhotes à BUP e APO. A BUP pode aumentar a atividade motora em roedores de maneira dose-dependente, um comportamento mediado pelo aumento de atividade dopaminérgica no sistema mesolímbico (DELLA MAGGIORE; RALPH, 2000).

No presente estudo, todos os animais apresentaram aumento de atividade motora induzida por BUP, indicando que a exposição materna à FLX parece não influenciar a sensibilidade do sistema dopaminérgico mesolímbico dos filhotes de ambos os sexos e idades (DPN 35 e 75). Estes resultados não corroboram um estudo anterior conduzido em camundongos (FAVARO; COSTA; MOREIRA, 2008), no qual fêmeas expostas à FLX durante o desenvolvimento não apresentaram hiperatividade em resposta à dietilpropiona, uma droga anfetamínica cujo metabólito, N, N-dietilnorefedrina, aumenta a liberação e diminui a recaptura de monoaminas (YU et al., 2000). Além das diferenças interespecies e dos diferentes mecanismos de ação das drogas utilizadas para aumentar a neurotransmissão dopaminérgica (BUP versus dietilpropiona), também deve ser levado em consideração o fato de que esta aparente discrepância entre os dois estudos pode ter origem na duração da sessão do campo aberto empregada. No estudo conduzido em camundongos, sessões de 3 min foram utilizadas, enquanto no presente estudo, a duração de cada sessão foi de 10 min, uma vez que sessões mais longas tem sido descritas como mais apropriadas para avaliação de atividade motora (CASARRUBEA et al., 2010).

Neste estudo, filhotes machos e fêmeas adolescentes expostos à FLX apresentaram aumento dos comportamentos de levantar e locomoção quando comparado aos controles. Sendo assim, estes resultados sugerem que a exposição à FLX durante gestação e amamentação induz hiperatividade de longa duração nos filhotes, o que poderia indicar aumento da atividade mesolímbica basal. Novamente, esse resultado difere do observado em camundongos expostos à FLX em um regime semelhante ao do presente estudo (LISBOA et al., 2007), no qual camundongos machos adolescentes apresentaram diminuição na locomoção no campo aberto. Se estas diferenças se dão pela duração da sessão do campo

aberto mencionada acima, pelas diferenças interespecies ou pela dose de FLX utilizada não é possível saber.

Com relação ao comportamento estereotipado induzido pela APO, filhotes machos expostos à FLX mostraram diminuição na intensidade de estereotipia no DPN 35 enquanto fêmeas expostas à FLX apresentaram redução similar no DPN 75. O tempo no qual esta redução ocorreu, contudo, foi diferente (120 min após injeção para machos e 90 min para fêmeas). Diminuição no comportamento estereotipado induzido por APO foi também relatado em camundongos fêmeas (DPN 40) expostos à FLX durante o desenvolvimento (FAVARO; COSTA; MOREIRA, 2008). Uma vez que o comportamento estereotipado é primariamente mediado pela ativação da via dopaminérgica nigroestriatal (STATON; SOLOMON, 2013), os dados sugerem que a exposição à FLX durante o desenvolvimento pode reduzir a atividade desta via específica e esta redução pode envolver primariamente a responsividade dos receptores pós-sinápticos, considerando-se o mecanismo de ação da APO.

Enquanto na literatura referente aos efeitos comportamentais provocados pela exposição à FLX durante o desenvolvimento encontramos diversos resultados positivos e, em alguns casos, discrepantes, existem estudos que relatam ausência de efeitos comportamentais (BAIRY et al., 2007; FORCELLI; HEINRICH, 2008; RIBAS et al., 2008; CAPELLO et al., 2011; LEE; LEE, 2012). Infelizmente, diferentes desenhos experimentais com diferentes espécies, doses, vias de administração, durações de tratamento, bem como diferenças nos protocolos de análise comportamental, podem dificultar a comparação dos resultados.

No presente estudo, foi também conduzida avaliação das vias nigroestriatal e mesolímbica por meio de contagem de corpos celulares dopaminérgicos na SN e ATV, bem como da determinação da densidade de fibras dopaminérgicas na áreas de projeção - Estriado e Núcleo Accumbens - após imunomarcagem para TH. A exposição à FLX não influenciou a contagem neuronal ou densidade de fibras em nenhuma região analisada, tanto de machos quanto fêmeas nos DPN 35 e 75. Alterações comportamentais observadas neste e em outros estudos parecem, portanto, não envolver alterações no número de neurônios ou na densidade das fibras em áreas de projeção, mas possivelmente alterações

em componentes pré ou pós sinápticos como densidade populacional de receptores ou espinhos dendríticos. De fato, a administração pós-natal de ISRS foi capaz de reverter redução na densidade de espinhos dendríticos em camundongos com densidade reduzida devido a estresse pré-natal (ISHWATA; SHIGA; OKADO, 2005). Além disso, a administração de FLX durante o período neonatal (primeira semana após o nascimento) em ratos, provocou redução de espinhos dendríticos em neurônios piramidais do sistema límbico. (KO et al., 2013)

A avaliação funcional do eixo HPA por meio do desafio com ACTH revelou aumento na liberação de corticosterona em todos os grupos estimulados, demonstrando a eficiência do protocolo utilizado. Contudo, apesar de podermos observar uma diminuição aparente na liberação de corticosterona pelos grupos FLX-ACTH em relação aos grupos CON-ACTH, esta diminuição não foi estatisticamente significativa. Evento similar ocorreu no trabalho de Francis-Oliveira et al. (FRANCIS-OLIVEIRA, 2013) que adotaram o mesmo protocolo de exposição à FLX mas empregaram estressor de imobilização como estímulo para liberação de corticosterona. Por outro lado, Pawluski et al. (PAWLUSKI et al., 2012) demonstrou redução nos níveis plasmáticos de corticosterona em ratos no DPN 39 a 42 expostos maternalmente à FLX (5mg/kg/dia via mini bomba osmótica nas mães) durante o período de amamentação, além de diminuição de expressão de receptores para glicocorticóides no hipocampo destes filhotes machos. Considerando a grande variabilidade observada em dosagens hormonais, é possível que diferenças significativas nas concentração plasmática de corticosterona possam ser encontradas se a amostragem for aumentada. De fato, o valor de p relaciona-se intimamente com tamanho da amostra e nem sempre está relacionado com a magnitude ou tamanho do efeito observado. Sendo assim, alguns autores recomendam-se que, além de calcular o valor de p , calcule-se também o valor de d , ou seja o tamanho do efeito (CLARK-CARTER, 2003). Em nosso estudo, embora o valor de p tenha sido igual a 0,16 para a interação exposição x estímulo, o valor de d encontrado para animais FLX estimulados, comparados com animais CON estimulados com ACTH foi de 0,31. De acordo com Cohen (COHEN, 1988), 0,31 indica um tamanho de efeito entre pequeno e médio. Considerando o contexto dos demais dados levantados na literatura em situações semelhantes citadas acima, é provável que, embora esta redução não tenha sido estatisticamente significativa, a

menor concentração de corticosterona plasmática dos animais FLX não seja fruto apenas de mero acaso.

O resultado mais interessante deste estudo foi encontrado ao se proceder a análise imunohistoquímica da adrenal para a enzima 3β HSD dos filhotes adolescentes (DPN 35). O colesterol é precursor dos hormônios adrenocorticais. No rato, apenas a forma HDL é captada e o colesterol é armazenado para futura síntese de glicocorticóides. O primeiro hormônio produzido a partir do colesterol é a pregnelona, por meio da ação da CYP11A1, enzima constituinte do citocromo P-450. Esta ação é regulada pelo ACTH. A enzima 3β HSD é a responsável por catalisar a conversão de pregnelona em progesterona, etapa crucial para a síntese de corticosterona (Figura 18) (ROSOL et al., 2001; MILLER; AUCHUS, 2011)

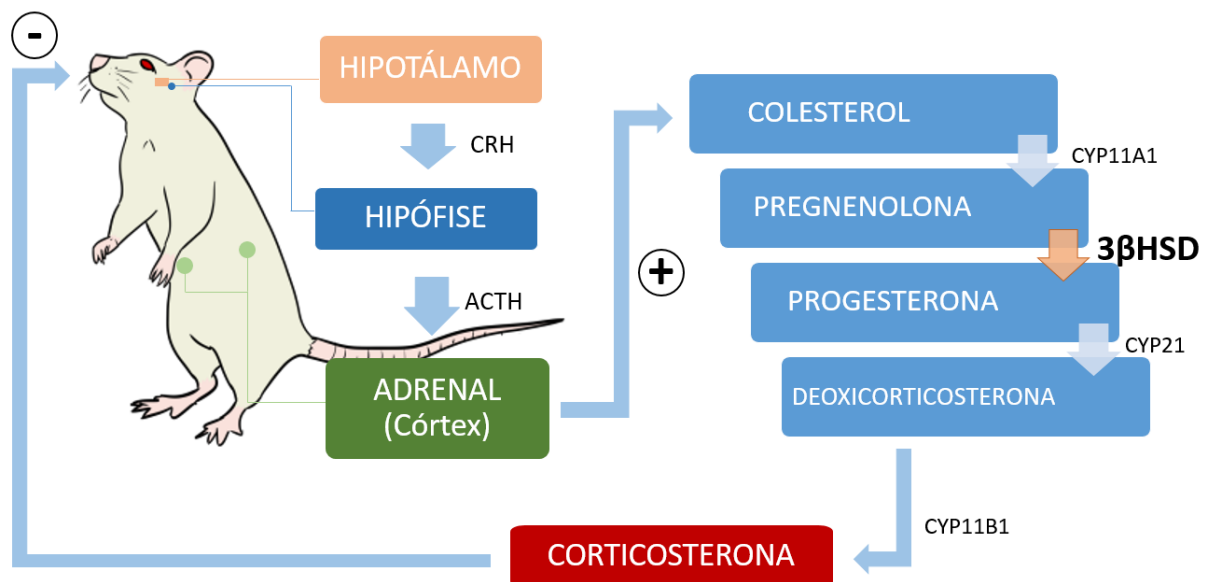


Figura 18. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e a rota de biossíntese (simplificada) de corticosterona no córtex adrenal de ratos. Neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo liberam CRH que ativa receptores na adeno-hipófise. Em seguida, a liberação de ACTH pela adeno-hipófise desencadeia uma série de reações no córtex da adrenal. Entre elas, a biossíntese da corticosterona a partir do colesterol. Uma das etapas cruciais deste processo é a conversão de pregnenolona em progesterona pela enzima 3β HSD. Após liberada, a corticosterona promove retroalimentação negativa nas áreas centrais (hipotálamo e hipófise) do eixo HPA.

No presente estudo, animais de ambos os sexos expostos à FLX durante o desenvolvimento apresentaram redução significativa na expressão da 3β HSD. A imunexpressão desta enzima é um indicador da capacidade secretora de corticosterona da glândula e tem sido bem correlacionada com a síntese de glicocorticóides e o teste funcional da adrenal (MAZZUCO et al., 2006). Este resultado relaciona-se com outros achados da literatura que mostram que a 5-HT está intimamente relacionada não só com o desenvolvimento do eixo HPA, mas também com o seu funcionamento (MEANEY et al., 1994). Não apenas no SNC, mas também no próprio córtex da adrenal há receptores para serotonina (5-HT₄), principalmente na zona glomerulosa. (LEFEBVRE et al., 1998). Embora a serotonina, de forma basal, não seja capaz de afetar significativamente a secreção de corticosterona, em situações anormais os receptores 5-HT₄ podem mostrar-se desregulados e, quando estimulados, interferirem no padrão de secreção deste hormônio (BUGALHO et al., 2000). Ainda mais, diversas evidências de alterações no eixo HPA pela manipulação farmacológica do sistema serotoninérgico são encontradas na literatura. Pesquisas clínicas demonstraram redução nos níveis basais de cortisol salivar em neonatos expostos a ISRSs (BRENNAN et al., 2008), bem como atenuação da resposta aguda de estresse (GRUNAU et al., 2005; OBERLANDER et al., 2005). Além disso, camundongos expostos à FLX (5mg/Kg/dia, DPN1-21, por meio de minibomba osmótica) têm níveis reduzidos de corticosterona plasmática em resposta ao estresse (ISHIWATA; SHIGA; OKADO, 2005). É interessante notar ainda que ratas expostas à FLX durante a gestação e amamentação demonstraram atraso na instalação da puberdade, processo este dependente do aumento do nível de estradiol circulante (SANTOS, 2013). Ainda que o mecanismo pelo qual este atraso ocorra ainda não tenha sido bem estabelecido, podendo envolver alterações hipotalâmicas ou hipofisárias, é possível levantar a hipótese da redução na expressão de 3β HSD, sabendo-se que a conversão de pregnelona em progesterona por esta enzima também é um processo crucial na biossíntese do estradiol (CUI; SHEN; LI, 2013)(Figura 19).

O exato mecanismo molecular pela qual a FLX atua na diminuição da expressão da enzima 3β HSD permanece incerto, podendo envolver, por exemplo, mecanismos epigenéticos. Durante o desenvolvimento de mamíferos, diferentes células e tecidos manifestam diferentes programações e expressão de genes, em parte regulada por mecanismos epigenéticos como a metilação (ou desmetilação) do DNA (JONES; TAKAI, 2001;

BIRD, 2002; LI, 2002). Evidências demonstram que a estrutura do cromossomo pode ser afetada pela metilação do DNA e que diversas doenças e condições humanas podem ser causadas por anormalidades neste processo (JONES; TAKAI, 2001). Recentemente, Toffoli et al. (TOFFOLI et al., 2014) sugeriram que os efeitos comportamentais provocados pela exposição à FLX durante o desenvolvimento podem envolver alterações em componentes epigenéticos em áreas específicas do encéfalo, envolvendo principalmente alteração no padrão de metilação do DNA. Se estas alterações epigenéticas provocadas pela FLX podem afetar também outros órgãos, como a adrenal, ainda não é possível afirmar até que estudos neste órgão sejam conduzidos.

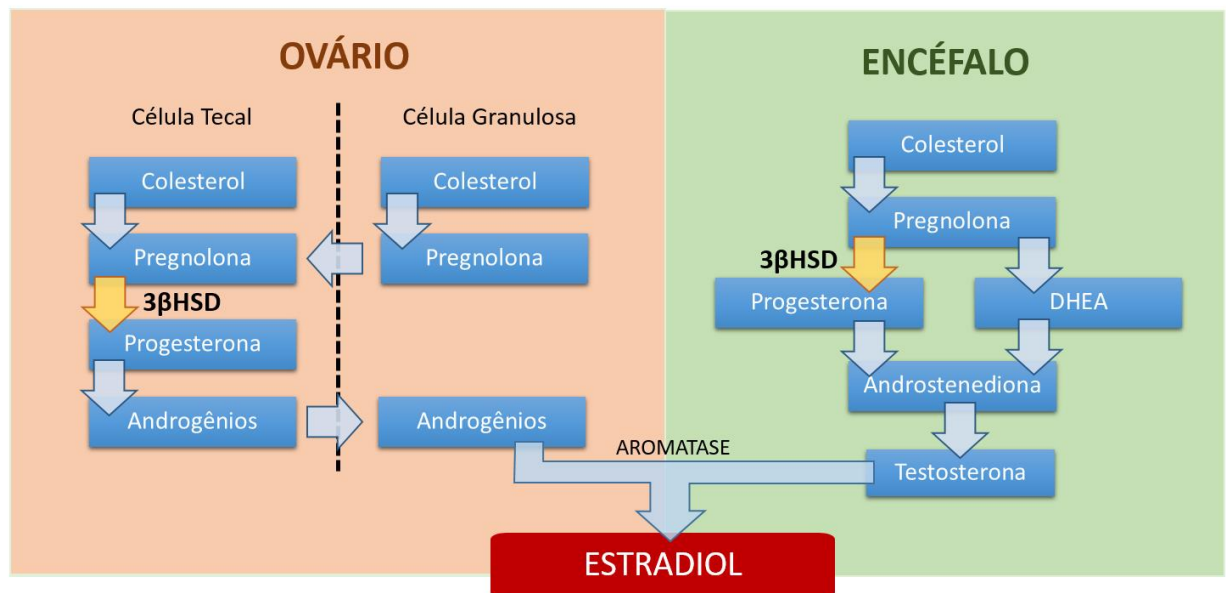


Figura 19. Rota de biossíntese (simplificada) do estradiol no ovário e encéfalo. Nota-se que em ambos os órgãos há a participação da enzima 3β HSD para a conversão de pregnelona em progesterona. Da mesma forma como ocorre na adrenal, esta é uma etapa crucial para a biossíntese do estradiol.

Ainda que em nosso estudo a redução na expressão da 3β HSD não tenha sido acompanhada pela redução estatisticamente significativa de corticosterona plasmática em resposta a estímulo com ACTH, deve-se lembrar também que tecidos e órgãos possuem uma reserva funcional. Sendo assim é possível que uma diminuição significativa na expressão desta enzima que participa na biossíntese da corticosterona não reflita necessariamente em

uma diminuição efetiva da liberação do hormônio frente ao estímulo com ACTH. Dessa forma, alguns pesquisadores recomendam a utilização de doses menores de ACTH, após supressão da glândula com glicocorticóides, para um resultado mais sensível. (CROWLEY et al., 1991; DICKSTEIN et al., 1991, 1997; TSATSOULIS et al., 2000).

Por outro lado, a expressão de ACTH na hipófise não sofreu influência da exposição à FLX durante o desenvolvimento, indicando que, se houver redução na liberação de corticosterona, ela se dará, neste caso, provavelmente à redução da atividade enzimática na adrenal e não a um distúrbio hipofisário. De fato, a adrenal é o órgão do sistema endócrino mais comumente associado a lesões induzidas por compostos químicos (RIBELIN, 1984).

Por fim, deve-se ressaltar que, em estudos de toxicidade do desenvolvimento, a avaliação da toxicidade materna é de fundamental importância. Embora algum grau de toxicidade materna seja exigido em diretrizes regulatórias, não existe um consenso sobre qual nível de toxicidade materna é aceitável (uma revisão sobre esse tópico pode ser encontrada em BEYER et al., 2011). Um dos principais indicadores não-invasivos de toxicidade materna é o ganho de peso corporal. Avaliando-se este parâmetro, deve-se lembrar que parâmetros referentes à ninhada (peso ou tamanho) podem influenciar o peso materno. Sendo assim, sugere-se também calcular o ganho de peso materno real, subtraindo-se o peso da ninhada ao nascer do peso materno inicial. O desenvolvimento físico dos filhotes foi avaliado por meio do ganho de peso corporal, o qual tem sido sugerido como o melhor indicador deste parâmetro e altamente correlacionado com os marcos de desenvolvimento pré-desmame (piloereção, erupção de incisivo, etc) (ICH, 2005). O regime de tratamento com FLX adotado neste estudo não afetou o ganho de peso das fêmeas prenhes e lactantes, não induziu toxicidade materna geral ou afetou o desenvolvimento físico dos filhotes, corroborando com estudos prévios do nosso grupo (LISBOA et al., 2007; FAVARO; COSTA; MOREIRA, 2008; FRANCIS-OLIVEIRA et al., 2013).

6. Conclusões

Os dados do nosso laboratório, somados a este estudo, reforçam a hipótese de que a exposição à FLX durante a gestação e amamentação pode levar a alterações funcionais de longa duração que são espécie, região, sexo e idade específica e não são acompanhadas por alterações na imunomarcção para TH. Um aumento na atividade mesolímbica parece estar presente em ratos enquanto uma diminuição na atividade nigroestriatal parece estar presente tanto em ratos como camundongos (LISBOA et al., 2007). Mais estudos investigando componentes pré e pós-sinápticos do sistema dopaminérgico, em ambas as espécies, são necessários.

A FLX durante o desenvolvimento pode levar também a alterações funcionais no eixo HPA, provocando redução na expressão da 3 β HSD, enzima chave na biossíntese da corticosterona, mas não na expressão de ACTH pela hipófise, indicando efeito na adrenal e não em áreas superiores do eixo. A redução da expressão de 3 β HSD, contudo, não foi acompanhada por diminuição significativa na liberação de corticosterona frente ao estímulo com ACTH ou alterações nos pesos dos órgãos envolvidos no processo. Estudos que elucidem o mecanismo molecular pelo qual a FLX seja capaz de reduzir a expressão da 3 β HSD se fazem necessários, tendo possíveis alterações epigenéticas como hipótese que merece investigação mais aprofundada.

Referências

- ANSORGE, M. S.; MORELLI, E.; GINGRICH, J. A. Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 199–207, 2 jan. 2008.
- BAIRY, K. L.; MADHYASTHA, S.; ASHOK, K. P.; BAIRY, I.; MALINI, S. Developmental and behavioral consequences of prenatal fluoxetine. **Pharmacology**, v. 79, n. 1, p. 1–11, jan. 2007.
- BERKENBOSCH, F.; TILDERS, F. J. Effect of axonal transport blockade on corticotropin-releasing factor immunoreactivity in the median eminence of intact and adrenalectomized rats: relationship between depletion rate and secretory activity. **Brain research**, v. 442, n. 2, p. 312–20, 1 mar. 1988.
- BEYER, B. K.; CHERNOFF, N.; DANIELSSON, B. R.; DAVIS-BRUNO, K.; HARROUK, W.; HOOD, R. D.; JANER, G.; LIMINGA, U. W.; KIM, J. H.; ROCCA, M.; ROGERS, J.; SCIALLI, A. R. ILSI/HESI maternal toxicity workshop summary: maternal toxicity and its impact on study design and data interpretation. **Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology**, v. 92, n. 1, p. 36–51, fev. 2011.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & development**, v. 16, n. 1, p. 6–21, 1 jan. 2002.
- BRENNAN, P. A.; PARGAS, R.; WALKER, E. F.; GREEN, P.; NEWPORT, D. J.; STOWE, Z. Maternal depression and infant cortisol: influences of timing, comorbidity and treatment. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v. 49, n. 10, p. 1099–107, out. 2008.
- BROADHURST, P. L. **Experiments in psychogenetics**. In: Eysenk, H.J. Experiments in personality. Rutledge and Kegan Paul, London, pp. 31-61.
- BUGALHO, M.J., LI, X., RAO, C.V. et al. Presence of a Gs alpha mutation in an adrenal tumor expressing LH/hCG receptors and clinically associated with Cushing's syndrome. **Gynecological Endocrinology**, v.14, p.50–54, 2000.
- CAPELLO, 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. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 339, n. 1, p. 275–85, out. 2011.
- CASARRUBEA, M.; SORBERA, F.; MAGNUSSON, M.; CRESCIMANNO, G. Temporal patterns analysis of rat behavior in hole-board. **Behavioural brain research**, v. 208, n. 1, p. 124–31, 17 mar. 2010.
- CASPER, R. C.; FLEISHER, B. E.; LEE-ANCAJAS, J. C.; GILLES, A.; GAYLOR, E.; DEBATTISTA, A.; HOYME, H. E. Follow-up of children of depressed mothers exposed or not exposed to antidepressant drugs during pregnancy. **The Journal of pediatrics**, v. 142, n. 4, p. 402–8, abr. 2003.
- CLARK-CARTER, D. Effect size: The missing piece in the jigsaw. **The Psychologist**, 16(12): 636–

638. Coe,R. 2003.

COHEN, J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. New York: Academic Press, 1988. 2^aed.

COOPER, W. O.; WILLY, M. E.; PONT, S. J.; RAY, W. A. Increasing use of antidepressants in pregnancy. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 196, n. 6, p. 544.e1–5, jun. 2007.

CROEN, L. A. Antidepressant Use During Pregnancy and Childhood Autism Spectrum Disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 68, n. 11, p. 1104, 1 nov. 2011. D

CROWLEY, S.; HINDMARSH, P. C.; HOLOWNIA, P.; HONOUR, J. W.; BROOK, C. G. The use of low doses of ACTH in the investigation of adrenal function in man. **The Journal of endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 475–9, set. 1991.

CUI, J.; SHEN, L.; RENA, L. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain. **Trends in Molecular Medicine**, v.19, n.3, p. 197-209, 2013.

DELARUE, C.; CONTESSE, V.; LENGLET, S.; SICARD, F.; PERRAUDIN, V.; LEFEBVRE, H.; KODJO, M.; LÉBOULENGER, F.; YON, L.; GALLO-PAYET, N.; VAUDRY, H. Role of neurotransmitters and neuropeptides in the regulation of the adrenal cortex. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 2, n. 3, p. 253–67, ago. 2001.

DELLA MAGGIORE, V.; RALPH, M. R. The effect of amphetamine on locomotion depends on the motor device utilized. The open field vs. the running wheel. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 65, n. 4, p. 585–90, abr. 2000.

DICKSTEIN, G.; SHECHNER, C.; NICHOLSON, W. E.; ROSNER, I.; SHEN-ORR, Z.; ADAWI, F.; LAHAV, M. Adrenocorticotropin stimulation test: effects of basal cortisol level, time of day, and suggested new sensitive low dose test. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 72, n. 4, p. 773–8, abr. 1991.

DICKSTEIN, G.; SPIGEL, D.; ARAD, E.; SHECHNER, C. One microgram is the lowest ACTH dose to cause a maximal cortisol response. There is no diurnal variation of cortisol response to submaximal ACTH stimulation. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 137, n. 2, p. 172–5, ago. 1997.

EPA. **Recommended Use of Body Weight 3/4 as the Default Method in Derivation of the Oral Reference Dose**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/sites/production/files/2013-09/documents/recommended-use-of-bw34.pdf>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

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.

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

FRANCIS-OLIVEIRA, J.; PONTE, B.; BARBOSA, A. P. M.; VERÍSSIMO, L. F.; GOMES, M. V.;

PELOSI, G. G.; BRITTO, L. R. G. de; 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. **Behavioural brain research**, v. 252, p. 195–203, 1 set. 2013.

FIGUEIREDO, H. F., C. M. DOLGAS, et al. "Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus." **Endocrinology**, v. 143(7) p. 2534-40. 2002.

FRANCIS-OLIVEIRA, José. **Avaliação Neurofuncional de Ratos Expostos à Fluoxetina durante a Gestação e Lactação**. 2013. 48 páginas. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR - Brasil.

GRUNAU, R. E.; HOLSTI, L.; HALEY, D. W.; OBERLANDER, T.; WEINBERG, J.; SOLIMANO, A.; WHITFIELD, M. F.; FITZGERALD, C.; YU, W. Neonatal procedural pain exposure predicts lower cortisol and behavioral reactivity in preterm infants in the NICU. **Pain**, v. 113, n. 3, p. 293–300, mar. 2005.

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

HARVEY, P. W.; EVERETT, D. J.; SPRINGALL, C. J. Adrenal toxicology: a strategy for assessment of functional toxicity to the adrenal cortex and steroidogenesis. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 27, n. 2, p. 103–15, jan. 2007.

HARVEY, P. W.; SUTCLIFFE, C. Adrenocortical hypertrophy: establishing cause and toxicological significance. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 30, n. 7, p. 617–26, out. 2010.

HEIKKINEN, T.; EKBLAD, U.; PALO, P.; LAINE, K. Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 73, n. 4, p. 330–7, abr. 2003.

HENDRICK, V. Placental Passage of Antidepressant Medications. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 5, p. 993–996, 1 maio 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. **Biological psychiatry**, v. 50, n. 10, p. 775–82, 15 nov. 2001.

ICH. **Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5(R2)**. Disponível em:

<http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S5/S5_R3_Final_Concept_Paper_27Mar2015.pdf>. Acesso em: 1 jan. 2016.

ISHIWATA, H.; SHIGA, T.; OKADO, N. Selective serotonin reuptake inhibitor treatment of early postnatal mice reverses their prenatal stress-induced brain dysfunction. **Neuroscience**, v. 133, n. 4, p. 893–901, jan. 2005.

JENSEN, H. M.; GRØN, R.; LIDEGAARD, Ø.; PEDERSEN, L. H.; ANDERSEN, P. K.; KESSING, L. V.

Maternal depression, antidepressant use in pregnancy and Apgar scores in infants. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 202, n. 5, p. 347–51, maio 2013.

JOELS, M. and T. Z. BARAM. "The neuro-symphony of stress." **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n.6, p. 459-66. 2009

JONES, P. a; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1068–1070, 2001.

LAPLANTE, P.; DIORIO, J.; MEANEY, M. J. Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT7 receptor. **Brain research. Developmental brain research**, v. 139, n. 2, p. 199–203, 15 dez. 2002.

KO, M. C.,; LEE, L. J. H. Long-term consequences of neonatal fluoxetine exposure in adult rats. **Developmental Neurobiology**, v. 74, n.10, p. 1038-1051, 2014.

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

LEE, L.-J.; LEE, L. J.-H. Neonatal fluoxetine exposure alters motor performances of adolescent rats. **Developmental neurobiology**, v. 72, n. 8, p. 1122–32, ago. 2012.

LEFEBVRE, H., CONTESSE, V., DELARUE, C. et al. Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Hormone and Metabolic Research*, v.30, p.398–403. 1998.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature reviews. Genetics**, v. 3, n. 9, p. 662–73, set. 2002.

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, n. 1, p. 49–56, jan. 2007.

LUPIEN, S. J.; MCEWEN, B. S.; GUNNAR, M. R.; HEIM, C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 434–45, jun. 2009.

MATTSON, S.; EASTVOLD, A.; JONES, K.; HARRIS, J.; CHAMBERS, C. Neurobehavioral follow-up of children prenatally exposed to fluoxetine. **Teratology**, 1999.

MAZZUCO, T. L.; CHABRE, O.; STURM, N.; FEIGE, J. J.; THOMAS, M. Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. **Endocrinology**, v. 147, n. February, p. 782–790, 2006.

MCEWEN, B. S. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. **European journal of pharmacology**, v. 583, n. 2-3, p. 174–85, 7 abr. 2008.

MCEWEN, B. S. "Brain on stress: How the social environment gets under the skin." **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2012.

MEANEY, M. J.; DIORIO, J.; FRANCIS, D.; LAROCQUE, S.; O'DONNELL, D.; SMYTHE, J. W.; SHARMA, S.; TANNENBAUM, B. Environmental regulation of the development of glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. The role of serotonin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 746, p. 260–73; discussion 274, 289–93, 30 nov. 1994.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocrine reviews**, v. 32, n. 1, p. 81–151, fev. 2011.

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

NOORLANDER, C. W.; VERVERS, 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, n. 7, p. e2782, jan. 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. **The New England journal of medicine**, v. 336, n. 4, p. 258–62, 23 jan. 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, n. 2, p. 411–25, mar. 2005.

OLIVIER, J. D. A.; VALLÈS, A.; VAN HEESCH, F.; AFRASIAB-MIDDELMAN, A.; ROELOFS, J. J. P. M.; JONKERS, M.; PEETERS, E. J.; KORTE-BOUWS, G. A. H.; DEDEREN, J. P.; KILIAAN, A. J.; MARTENS, G. J.; SCHUBERT, D.; HOMBERG, J. R. Fluoxetine administration to pregnant rats increases anxiety-related behavior in the offspring. **Psychopharmacology**, v. 217, n. 3, p. 419–32, out. 2011.

PAWLUSKI, J. L.; RAYEN, I.; NIESSEN, N. A.; KRISTENSEN, S.; VAN DONKELAAR, E. L.; BALTHAZART, J.; STEINBUSCH, H. W.; CHARLIER, T. D. Developmental fluoxetine exposure differentially alters central and peripheral measures of the HPA system in adolescent male and female offspring. **Neuroscience**, v. 220, p. 131–41, 18 set. 2012.

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, n. 3, p. e600–8, mar. 2010.

PIGNATELLI, D.; MAIA, M.; CASTRO, A.R.; CONCEIÇÃO-MAGALHAES, M.; VIVIER, J.; DEFAYE, G. Chronic stress effects on the rat adrenal cortex. **Endocr Res**, v.26, p. 537-544. 2000

POHLAND, R. C.; BYRD, T. K.; HAMILTON, M.; KOONS, J. R. Placental transfer and fetal distribution of fluoxetine in the rat. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 98, n. 2, p. 198–205, abr. 1989.

POPA, D.; LÉNA, C.; ALEXANDRE, C.; ADRIEN, J. Lasting syndrome of depression produced by reduction in serotonin uptake during postnatal development: evidence from sleep, stress, and behavior. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 14, p. 3546–54, 2 abr. 2008.

REAL, C. C.; FERREIRA, A. F. B.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; TORRÃO, A. S.; PIRES, R. S.; BRITTO, L. R. G. BDNF receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 237, p. 118–29, 1 maio 2013.

REDOLAT, R.; VIDAL, J.; GÓMEZ, M. C.; CARRASCO, M. C. Effects of acute bupropion administration on locomotor activity in adolescent and adult mice. **Behavioural pharmacology**, v. 16, n. 1, p. 59–62, fev. 2005.

RIBAS, V. R.; ANICETO, H. K. R.; MARTINS, H. A. de L.; RIBAS, K. H. dos S.; GUERRA-RIBAS, R. de M.; FRAGA, S. do N.; RIBEIRO-RIBAS, V.; VASCONCELOS, C. M. M.; VIANA, M. T.; MANHAES-DE-CASTRO, R. Neonatal administration of fluoxetine did not alter the anxiety indicators, but decreased the locomotor activity in adult rats in the elevated plus-maze. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 66, n. 4, p. 844–847, dez. 2008.

RIBELIN, W. E. The effects of drugs and chemicals upon the structure of the adrenal gland. **Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology**, v. 4, n. 1, p. 105–19, fev. 1984.

ROSOL, T. J.; YARRINGTON, J. T.; LATRENDESSE, J.; CAPEN, C. C. Adrenal Gland : Structure , Function , and Mechanisms of Toxicity. **Toxicologic pathology**, v. 29, n. 1, p. 41–48, 2001.

SANTOS, Alice Hartmann. **Parâmetros reprodutivos e de fertilidade de ratas expostas a fluoxetina in utero e durante a lactação**. 2013. 60 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SETLER, P.; SARAU, H.; MCKENZIE, G. Differential attenuation of some effects of haloperidol in rats given scopolamine. **European journal of pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 117–26, set. 1976.

SMART, J.L.; TOLLE, V.; OTERO-CORCHON, V.; LOW, M.J. Central dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. **Endocrinology**, v.148, p. 647-659. 2007.

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-HT₃ receptor-dependent cortical abnormalities and anxiety-like behaviour. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 865–70, fev. 2012.

STAHL, S. **Psicofarmacologia – bases neurocientíficas e aplicações clínicas**. 3a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2010.

STATON, D. M.; SOLOMON, P. R. Microinjections of d-amphetamine into the nucleus accumbens and caudate-putamen differentially affect stereotypy and locomotion in the rat. **Physiological Psychology**, v. 12, n. 2, p. 159–162, 4 nov. 2013.

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. **Biological psychiatry**, v. 52, n. 5, p. 446–51, 1 set. 2002.

TOFFOLI, L. V; RODRIGUES, 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. **Behavioural brain research**, v. 265, p. 142–7, 15 maio 2014.

TSATSOULIS, A.; JOHNSON, E. O.; KALOGERA, C. H.; SEFERIADIS, K.; TSOLAS, O. The effect of thyrotoxicosis on adrenocortical reserve. **European journal of endocrinology**, v. 142, n. 3, p. 231–5, 2000.

ULRICH-LAI, Y.M.; FIGUEIREDO, H.F.; OSTRANDER, M.M.; CHOI, D.C.; ENGELAND, W.C.; HERMAN, J.P. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.291, p. 965-973. 2006

WHITAKER-AZMITIA, P. M.; DRUSE, M.; WALKER, P.; LAUDER, J. M. Serotonin as a developmental signal. **Behavioural brain research**, v. 73, n. 1-2, p. 19–29, jan. 1996.

YU, H.; ROTHMAN, R. B.; DERSCH, C. M.; PARTILLA, J. S.; RICE, K. C. Uptake and release effects of diethylpropion and its metabolites with biogenic amine transporters. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 2689–2692, 2000.