



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOSÉ FRANCIS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO NEUROFUNCIONAL DE RATOS EXPOSTOS À
FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

JOSÉ FRANCIS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO NEUROFUNCIONAL DE RATOS EXPOSTOS À
FLUOXETINA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

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^ª. Dr^ª. Estefânia Gastaldello
Moreira

Londrina
2013

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

Dados Inter Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48a José Francis de Oliveira.
Avaliação neurofuncional de ratos expostos à Fluoxetina durante a gestação e lactação / José Francis de Oliveira. – Londrina 2012.
67 f. : il.

Orientador: Estefânia Gastaldello Moreira.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Fluoxetina – Teses. 2. Antidepressivos – Teses. 3. Neurodesenvolvimento – Teses. 4. Estresse – Teses. I. Moreira, Estefânia Gastaldello. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

615.214:612.8

JOSÉ FRANCIS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO NEUROFUNCIONAL DE RATOS EXPOSTOS À FLUOXETINA
DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

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

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

Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto
Universidade de São Paulo – USP

Londrina, 1 de março de 2013.

Dedico este trabalho a todos aqueles que, assim como eu, desejam que um dia a humanidade possa compreender o real significado do amor e, assim, proceder em relação às pessoas que as cercam.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Estefânia G. Moreira, por estar sempre presente durante todo o desenvolvimento deste trabalho, e 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 Prof^a Gislaine Garcia Pelosi Gomes, pelo constante trabalho em equipe e utilização do espaço dos dois laboratórios.

À 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 idéias e experiências; e aos professores do Programa Multicêntrico na UEL, por todas as orientações e conselhos.

Aos amigos do Núcleo de Estudos da Língua Japonesa da UEL, por todo o apoio moral e pelos bons tempos que passamos juntos nestes dois anos. Desejo sucesso a todos vocês que agora estão seguindo para seus respectivos Mestrados! Agradeço também à Prof^a Marly Kaway, do NECJ, pelas alegres e divertidas conversas durante estes dois anos!

À Prof^a Suzana de Fatima Paccola Mesquita do Departamento de Biologia Geral do CCB/UEL, por permitir o uso de seu fotomicroscópio e pelas muitas ideias trocadas. Espero ter prestado tanta ajuda quanto recebi em troca. Foi muito prazeroso trabalhar com você! Também agradeço à sua equipe de laboratório, sempre pronta a ajudar.

A todo o pessoal do Laboratório de Neurobiologia Celular do Professor Luiz R. G. Britto, do ICB/USP, 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, que levarei para a vida toda!

Ao pessoal do Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Aplicada do Professor José Antunes Rodrigues, da USP/Ribeirão Preto, pelo auxílio nas dosagens de corticosterona.

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.

Por fim, 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.

“O que você vê e o que você ouve depende em grande parte de *onde* você está. Também depende do *tipo* de pessoa que você **É**.”

C. S. Lewis – O Sobrinho do Mago

FRANCIS-OLIVEIRA, José. **Avaliação Neurofuncional de Ratos Expostos à Fluoxetina durante a Gestação e Lactação**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Durante o período gestacional e lactacional, mulheres apresentam um risco considerável a desenvolver depressão. O tratamento farmacológico da depressão em mulheres grávidas é aconselhado e as drogas de escolha são os inibidores da recaptção de serotonina (ISRS), como a fluoxetina (FLX). Considerando que a serotonina modula vários processos durante o desenvolvimento do organismo, os potenciais efeitos da exposição perinatal a ISRS sobre o neurodesenvolvimento estão sendo investigados. No entanto, poucos estudos tem avaliado animais expostos perinatalmente a estas drogas ao longo da vida e em ambos os sexos. Neste estudo, nós avaliamos o comportamento de ratos machos e fêmeas, em duas idades (adolescentes e adultos), bem como a resposta ao estressor agudo de imobilização destes animais, após a exposição à FLX durante a gestação e amamentação. Nossos resultados mostraram que a exposição à FLX diminuiu o conflito em machos e fêmeas adolescentes avaliado no teste de hipofagia induzida pela novidade; não alterou o comportamento de anedonia avaliada no teste de preferência pela sacarose; não alterou os níveis plasmáticos de corticosterona em resposta ao estressor agudo de imobilização; reduziu a ativação induzida por estressor da amígdala basolateral em ratos machos adolescentes e da amígdala medial em machos adultos. Assim, concluímos que a exposição à FLX durante a gestação e amamentação leva a alterações de respostas funcionais da circuitaria neuronal de estresse de maneira dependente de gênero; bem como a alterações comportamentais dependentes da idade.

Palavras-chave: Fluoxetina. Antidepressivos. Neurodesenvolvimento. Comportamento. Estresse. Serotonina. *c-fos*. Eixo HPA.

FRANCIS-OLIVEIRA, José. **Neurofunctional Evaluation of Animals Rats Exposed to Fluoxetine during Pregnancy and Lactation**. 2013. 67 p. Dissertation (Master's degree in Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

During pregnancy and lactation, women are at risk to develop major depressive disorders. In these women, pharmacological treatment of depression are mainly conducted with the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), like fluoxetine (FLX). Considering that serotonin modulates several processes during the development of the organism, the potential effects of perinatal exposure to SSRIs on the neurodevelopment are being investigated. However, few studies have been evaluating animals exposed perinatally to these drugs at different ages and in both genders. In this study, we evaluated the behavior of male and female rats, in both ages (adolescents and adults), as well the stress response to acute immobilization in animals exposed to FLX during pregnancy and lactation. Our results showed that FLX exposure decrease the conflict in male and female adolescent rats evaluated in the novelty-induced hypophagia test; does not alter the anhedonia accessed by the sucrose preference test; does not alter corticosterone plasmatic levels in response to acute immobilization stress; reduced stress-induced activation of basolateral amygdala in adolescent male rats and of medial amygdala in adult male rats. In conclusion, data suggest that exposure to FLX during pregnancy and lactation induces alterations of the functional response of the stress neural circuit that are gender-dependent, as well as behavioral alterations that are age-dependent.

Keywords: Fluoxetine. Antidepressants. Neurodevelopment. Behavior. Stress. Serotonin. *c-fos*, HPA axis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Curva de peso de ratas durante a gestação e lactação. CON, grupo controle (n=40); FLX, grupo fluoxetina (n=35) 27
- Figura 2** - Curva de peso dos filhotes durante o período lactacional. CON, grupo controle (n=431); FLX, grupo fluoxetina (n=419) 28
- Figura 3** - Contagem de neurônios imunomarcados para Fos no PVN de ratos machos, adolescentes e adultos, em resposta ao estressor agudo de imobilização. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina..... 29
- Figura 4** - Fotomicrografias do PVN de ratos machos adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. 3V, terceiro ventrículo. Escala: 100µm 30
- Figura 5** - Fotomicrografias do PVN de ratos machos adultos. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. 3V, terceiro ventrículo. Escala: 100µm 31
- Figura 6** - Contagem de neurônios imunomarcados para Fos em diferentes núcleos da amígdala de ratos machos, adolescentes e adultos, em resposta ao estressor agudo de imobilização. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina 33
- Figura 7** - Fotomicrografias da BLA de ratos machos adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. CeA, núcleo central da amígdala; BLA, núcleo basolateral da amígdala (área demarcada). Escala: 100µm 34
- Figura 8** - Fotomicrografias da BLA de ratos machos adultos. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. CeA, núcleo central da amígdala; BLA, núcleo basolateral da amígdala (área demarcada). Escala: 100µm 35
- Figura 9** - Fotomicrografias da CeA de ratos machos adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. Opt, trato óptico; MeA, amígdala medial; BLA, amígdala basolateral; CeA, amígdala central (área demarcada). Escala: 100µm..... 36

Figura 10 - Fotomicrografias da CeA de ratos machos adultos. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. Opt, trato óptico; MeA, amígdala medial; BLA, amígdala basolateral; CeA, amígdala central (área demarcada). Escala: 100µm.....	37
Figura 11 - Fotomicrografias da MeA de ratos machos adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. Opt, trato óptico; BLA, núcleo basolateral da amígdala; MeA, núcleo medial da amígdala (área demarcada). Escala: 100µm.....	38
Figura 12 - Fotomicrografias da MeA de ratos machos adultos. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. Opt, trato óptico; BLA, núcleo basolateral da amígdala; MeA, núcleo medial da amígdala (área demarcada). Escala: 100µm.....	39
Figura 13 - Contagem de neurônios imunomarcados para Fos no PVN de ratas, adolescentes e adultas, em resposta ao estressor agudo de imobilização. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina.....	40
Figura 14 - Fotomicrografias do PVN de ratas adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. 3V, terceiro ventrículo. Escala: 100µm.....	41
Figura 15 - Fotomicrografias do PVN de ratas adultas. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. 3V, terceiro ventrículo. Escala: 100µm.....	42
Figura 16 - Contagem de neurônios imunomarcados para Fos em diferentes núcleos da amígdala de ratas, adolescentes e adultas, em resposta ao estressor agudo de imobilização. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina.....	43
Figura 17 - Fotomicrografias da BLA de ratas adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. CeA, núcleo central da amígdala; BLA, núcleo basolateral da amígdala (área demarcada). Escala: 100µm.....	44

Figura 18 - Fotomicrografias da BLA de ratas adultas. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. CeA, núcleo central da amígdala; BLA, núcleo basolateral da amígdala (área demarcada). Escala: 100µm	45
Figura 19 - Fotomicrografias da BLA de ratas adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. CeA, núcleo central da amígdala; BLA, núcleo basolateral da amígdala; Opt, trato óptico; MeA, amígdala medial (área demarcada). Escala: 100µm.....	46
Figura 20 - Fotomicrografias da BLA de ratas adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. CeA, núcleo central da amígdala; BLA, núcleo basolateral da amígdala; Opt, trato óptico; MeA, amígdala medial (área demarcada). Escala: 100µm.....	47
Figura 21 - Fotomicrografias da MeA de ratas adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. BLA, núcleo basolateral da amígdala; Opt, trato óptico; MeA, núcleo medial da amígdala (área demarcada). Escala: 100µm.....	48
Figura 22 - Fotomicrografias da MeA de ratas adultas. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. BLA, núcleo basolateral da amígdala; Opt, trato óptico; MeA, núcleo medial da amígdala (área demarcada). Escala: 100µm.....	49
Figura 23 - Corticosterona plasmática de ratos machos e fêmeas, adolescentes e adultos, em resposta ao estressor agudo de imobilização. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina	50
Figura 24 - Preferência pela Sacarose de ratos machos e fêmeas adolescentes e adultos. CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina.....	51
Figura 25 - Latência para se alimentar de ratos machos e fêmeas adolescentes e adultos avaliados no teste de Hipofagia Induzida pela Novidade.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
5-HTT	Transportador de Serotonina
BLA	Núcleo Basolateral da Amígdala
BNST	Núcleo Leito da Estria <i>Terminalis</i>
CeA	Núcleo Central da Amígdala
DPN	Dia Pós-Natal
FLX	Fluoxetina
GD	Dia Gestacional
HIN	Teste de Hipofagia Induzida pela Novidade
HPA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
MeA	Núcleo Medial da Amígdala
NO	Grupo experimental não submetido ao estresse
PB	Tampão Fosfato
PFA	Paraformaldeído
PgP	Glicoproteína P
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
ST	Grupo experimental submetido ao estresse

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	19
3	METODOLOGIA	20
3.1	ANIMAIS	20
3.2	PROTOCOLO DE ESTRESSE	21
3.3	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	22
3.4	DOSAGEM DE CORTICOSTERONA	23
3.5	PREFERÊNCIA PELA SACAROSE	24
3.6	HIPOFAGIA INDUZIDA PELA NOVIDADE	25
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4	RESULTADOS	27
4.1	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA GERAL	27
4.2	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA FOS	28
4.2.1	Machos.....	28
4.2.2	Fêmeas.....	40
4.3	CORTICOSTERONA PLASMÁTICA	50
4.4	COMPORTAMENTO.....	51
5	DISCUSSÃO	53
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
7	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Depressão é uma desordem psiquiátrica de alta prevalência e está associada a altos níveis de morbidade e mortalidade (KESSLER, BERGLUND et al. 2005). Durante a gravidez e amamentação, 10% das mulheres poderão apresentar depressão (AUSTIN, KILDEA et al. 2007), e o tratamento farmacológico durante este período é recomendado, apesar dos potenciais efeitos indesejáveis para o feto, por duas razões principais: [1] estudos prévios têm demonstrado que a maioria das drogas antidepressivas não causa alterações morfológicas (VORHEES, ACUFF-SMITH et al. 1994; GENTILE 2011), e [2] os benefícios do tratamento farmacológico são superiores aos potenciais riscos ao desenvolvimento do feto/neonato. Por estas razões, é estimado que 2 a 3% das mulheres grávidas farão uso de medicamentos antidepressivos dos quais os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) são os mais utilizados (LATTIMORE, DONN et al. 2005). Contudo, poucos estudos têm feito uma avaliação contínua de crianças que foram expostas aos ISRSs durante a gravidez e/ou amamentação para examinar se esta exposição não poderia afetar o desenvolvimento psicológico e cognitivo do indivíduo.

A fluoxetina (FLX) é um ISRS e, como tal, age bloqueando a recaptação de serotonina (5-HT) na fenda sináptica, aumentando, conseqüentemente, a biodisponibilidade deste neurotransmissor (WONG, HORNG et al. 1974). A FLX tem sido amplamente prescrita para o tratamento de distúrbios do humor devido à sua eficácia terapêutica e poucos efeitos colaterais, comparada com outros antidepressivos (NONACSCOHEN 2003). Esse fármaco atravessa a barreira placentária em humanos e roedores (POHLAND, BYRD et al. 1989; HENDRICK, STOWE et al. 2003) e é excretada no leite (HENDRICK, STOWE et al. 2001; SURI, STOWE et al. 2002; HEIKKINEN, EKBLAD et al. 2003), além de inibir proteínas de efluxo multidrogas, como a fosfoglicoproteína P (PgP), que está presente na barreira placentária (IQBAL, AUDETTE et al. 2012). Portanto, o uso de FLX durante a gravidez expõe o feto a altos níveis de 5-HT bem como a potenciais xenobióticos e/ou outras moléculas fisiológicas, como os glicocorticóides, que em condições normais seriam barradas na placenta pela PgP, o que poderia levar a alterações nos níveis circulantes destas moléculas no feto e a possíveis alterações no seu desenvolvimento.

A 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 (LAUDER 1990; WHITAKER-AZMITIA, DRUSE et al. 1996; YUEN, JIANG et al. 2005; ZHONG, YUEN et al. 2008; HOMBERG, SCHUBERT et al. 2010). 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 (KIYASOVAGASPAR 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 (BONNINLEVITT 2011).

Distúrbios na sinalização serotoninérgica, mesmo durante períodos estritos do desenvolvimento pré e pós-natal podem resultar em anormalidades comportamentais a longo prazo (GERARDIN, PEREIRA et al. 2005; FAVARO, COSTA et al. 2008; GOUVEA, MORIMOTO et al. 2008; POPA, LENA et al. 2008) ou predispor o indivíduo a desenvolver desordens neuropsiquiátricas durante a vida adulta, tais como ansiedade, autismo e depressão (HANSEN, SANCHEZ et al. 1997; ANSORGE, ZHOU et al. 2004; GERARDIN, PEREIRA et al. 2005; LISBOA, OLIVEIRA et al. 2007; FAVARO, COSTA et al. 2008; GOUVEA, MORIMOTO et al. 2008; POPA, LENA et al. 2008). Acredita-se que isto ocorra através de alterações na modulação serotoninérgica de processos importantes durante o neurodesenvolvimento, como a formação de circuitos neurais e sinaptogênese. Outra hipótese baseia-se numa possível neurotoxicidade devido à exposição do sistema nervoso em desenvolvimento a outras moléculas que seriam normalmente impedidas de atingirem o feto pelo transporte reverso realizado pela PgP placentária.

Estudos com animais nocaute para o transportador de serotonina (5-HTT) mostraram comportamento exploratório alterado. Estes animais apresentaram exploração horizontal reduzida no centro do campo aberto e normal na periferia, mas exploração vertical reduzida, quando comparados aos controles. Os autores sugeriram que estes efeitos poderiam estar associados a alterações no córtex somatosensorial, associado à tigmotaxia, desde que níveis elevados de 5-HT durante o neurodesenvolvimento prejudicam a formação desta estrutura (ALEXANDRE, POPA et al. 2006; KALUEFF, FOX et al. 2007). Animais nocaute para 5-HTT também apresentam maior aversão a ambientes abertos e iluminados

(HOLMESHARIRI 2003), e maior aversão à área central no teste de campo aberto e aos braços abertos no labirinto em cruz elevado (OLIVIER, VAN DER HART et al. 2008). Estas evidências, somadas à alteração do comportamento exploratório, levam à conclusão de que esses animais apresentam comportamento ansiedade-símile. Resultados similares têm sido encontrados quando o 5-HTT é bloqueado pela exposição perinatal à FLX (OLIVIER, VALLES et al. 2011). Um fato interessante que foi descrito é que somente o bloqueio do 5-HTT leva a alterações do comportamento em fases posteriores da vida; o bloqueio do transportador de norepinefrina (outro neurotransmissor) não causou a mesma alteração (ANSORGE, MORELLI et al. 2008).

É consenso geral que animais nocaute para 5-HTT, ou que foram expostos a níveis aumentados de 5-HT durante o desenvolvimento, apresentam também comportamentos similares à depressão. Popa et al. (POPA, LENA et al. 2008) encontraram aumento da imobilidade no teste de nado forçado e de suspensão pela cauda. Ainda corroborando esta ideia, animais com deficiência de 5-HT durante o desenvolvimento apresentam diminuição de comportamentos semelhantes à ansiedade e aumento de agressividade (MOSIENKO, BERT et al. 2012). No entanto, camundongos nocaute para 5-HTT não apresentam anedonia (KALUEFF, GALLAGHER et al. 2006), que é um dos sintomas da depressão, mas ratos nocaute para 5-HTT são anedônicos (OLIVIER, VAN DER HART et al. 2008). Contudo, é possível que estes sintomas depressão-símiles sejam o resultado de uma inabilidade do sistema serotoninérgico em controlar o aumento de liberação de 5-HT induzido por um evento estressor, pois a ocorrência conjunta de estresse durante o período perinatal com redução na recaptação de 5-HT resulta em alterações gênicas nos sistemas serotoninérgico e de estresse, alterações essas associadas à reduzida habilidade de adaptação ao ambiente na idade adulta, bem como a ansiedade (UHER 2008). Sendo o estresse um dos fatores principais envolvidos no desenvolvimento da depressão, alterações no sistema cerebral de estresse, pela exposição a níveis elevados de 5-HT durante o desenvolvimento, poderiam aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento de depressão em fases posteriores da vida.

Homberg et al (HOMBERG, DE BOER et al. 2008) demonstraram que roedores nocaute para 5-HTT apresentam aumento na preferência condicionada de local induzida por cocaína; porém, apenas os ratos nocaute apresentam aumento na auto-administração de cocaína, sugerindo que, entre os roedores, os ratos são mais sensíveis a

esse psicotrópico. Estes animais também apresentam comportamento social reduzido, conforme observado pelo mesmo autor (HOMBERG, SCHIEPERS et al. 2007) no teste de interação social. Além disso, outros autores também encontraram redução no comportamento agressivo destes animais (HOLMES, MURPHY et al. 2002; LISBOA, OLIVEIRA et al. 2007).

Em relação às habilidades cognitivas, Olivier et al (OLIVIER, JANS et al. 2009) encontraram resultados que os levaram a concluir que animais nocaute para 5-HTT apresentam leve prejuízo na memória espacial e de objetos, dependente do hipocampo. Isto poderia ser explicado por prováveis diferenças na modulação serotoninérgica do neurodesenvolvimento do hipocampo e da amígdala.

A 5-HT tem sido relacionada à resposta de estresse desde sua descoberta, e este tópico tem sido o foco de intensa pesquisa desde então (CHAOULOFF, BERTON et al. 1999). Adicionalmente, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) pode estar hiperativo na depressão (SWAAB, BAO et al. 2005). Sabe-se, também, que estresse materno durante a gravidez e amamentação, bem como estresse durante a infância e adolescência, resulta em sensibilização do eixo HPA da criança, tornando sua resposta a eventos estressores subsequentes alterada (ESSEX, BOYCE et al. 2002). Esta habilidade do ambiente materno/infantil de modificar a atividade basal do eixo HPA, bem como sua resposta a eventos estressores em fases posteriores da vida, foi descrita há 50 anos, mas só recentemente esse tópico ganhou atenção (KAPOOR, PETROPOULOS et al. 2008). A percepção de que eventos que ocorrem durante o desenvolvimento do organismo, como a exposição materna a fármacos, podem influenciar tardiamente a saúde do indivíduo levou ao desenvolvimento de uma área de pesquisa em ascensão denominada “Origem Desenvolvimentista da Saúde e Doença” ou *DOHaD* (“*Developmental Origins of HealthDisease*”). O paradigma da *DOHaD* está baseado na influência do ambiente nas fases iniciais do desenvolvimento fetal e pós-natal sobre o desenvolvimento morfológico e funcional de órgãos e sua associação com a origem de doenças posteriormente na vida (SINCLAIR, LEA et al. 2007; GLUCKMAN, HANSON et al. 2008).

O sistema neural de estresse compreende várias áreas, como a amígdala e suas subdivisões, o córtex medial pré-frontal, o hipocampo, o Núcleo Leito da estria *terminalis* (BNST) e o núcleo paraventricular (PVN). Cada uma destas estruturas desempenha um papel diferente na resposta a um evento estressor, o qual pode ser dependente de

contexto, de gênero e de idade (FIGUEIREDO, DOLGAS et al. 2002; MCEWEN 2007; JOELSBARAM 2009). Ainda, o sistema de estresse é de importância fundamental para a sobrevivência, pois permite respostas motoras para evitar o perigo e permitir a fuga, e através da formação de memória de eventos estressores passados, o cérebro é capacitado a programar futuras ações em um posterior contato com eventos estressores (ARNSTEN 2009).

Receptores serotoninérgicos podem modular muitas das estruturas encefálicas envolvidas na resposta de estresse, e já foram descritos pelo menos 14 subtipos de receptores para a 5-HT, que se acoplam a múltiplas vias de sinalização intracelular e, inclusive, temos um receptor serotoninérgico que funciona como um canal de cátions (RAYMOND, MUKHIN et al. 2001). Portanto, alterações no tônus serotoninérgico durante o neurodesenvolvimento em regiões encefálicas envolvidas na resposta de estresse podem conduzir a alterações nesta resposta na idade adulta (LUPIEN, MCEWEN et al. 2009). É importante ressaltar que, durante a adolescência, os circuitos encefálicos são mais sensíveis a eventos estressores e, por isso, encontram-se mais vulneráveis a alterações que podem se tornar permanentes na idade adulta (ROMEO e MCEWEN 2006; MCEWEN 2012). Entretanto, deficiências ou anormalidades na formação de circuitos neurais que podem alterar funções cognitivas devido à exposição perinatal a xenobióticos ou fármacos, como a FLX, podem permanecer quiescentes e somente se manifestarem frente a um desafio da função encefálica (WEISS 1990).

Tomados em conjunto, estes dados da literatura acima apresentados fornecem evidências de que alterações na função do sistema serotoninérgico durante o neurodesenvolvimento, seja devido à exposição a um fármaco, pela ausência do 5-HTT ou pela manipulação de receptores, levam a alterações de comportamento em fases posteriores da vida do indivíduo. Portanto, neste estudo nós avaliamos se o aumento da biodisponibilidade de 5-HT durante o desenvolvimento, induzida pelo tratamento de ratas prenhes e lactantes com FLX, resultaria, na prole durante a adolescência e/ou idade adulta, em alterações do comportamento e/ou da resposta de estresse. A resposta de estresse foi avaliada através dos níveis plasmáticos de corticosterona e imuno-histoquímica para Fos, uma proteína que é produto do gene de resposta imediata *c-fos*, expresso em resposta à ativação neuronal e tem sido utilizada para o mapeamento de vias neurais (MORGAN e CURRAN 1995).

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram avaliar em ratos machos e fêmeas expostos à FLX durante os períodos de gestação e amamentação:

1. A ativação de áreas cerebrais envolvidas na resposta de estresse frente a um agente estressor agudo, através de imuno-histoquímica para Fos;
2. Os níveis plasmáticos de corticosterona basais e após a exposição aguda a um agente estressor de imobilização;
3. O comportamento ansiedade/depressão-símile no teste de hipofagia induzida pela novidade;
4. O comportamento de anedonia no teste de preferência pela sacarose.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Ratas fêmeas virgens foram acasaladas (1 macho e 3 fêmeas por caixa) durante todo o período escuro dos animais e, na manhã do dia seguinte, a prenhez foi diagnosticada empregando-se esfregaço vaginal. Ratas com presença da fase estro do ciclo estral e presença de espermatozoides foram consideradas prenhes, sendo o dia de diagnóstico denominado dia gestacional 0 (DGO). As fêmeas prenhes foram então separadas e mantidas em caixas individuais, em ambiente controlado com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade de $55\pm 5\%$, ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas às 06:00 a.m.) e livre acesso à água e ração para roedores.

Estas fêmeas foram casualmente alocadas em 2 grupos: o grupo controle (CON), que recebeu diariamente a partir do DGO aproximadamente 0,3mL de água por gavage; e o grupo tratado (FLX), que recebeu 5mg/Kg/dia de FLX (Daforin® solução oral, EMS, Brasil). Esta dose de FLX foi escolhida baseada em estudos preliminares realizados em nosso laboratório que mostraram que doses mais altas que 5mg/Kg/dia causam toxicidade materna em ratos, o que é indesejável quando um estudo de neurotoxicidade do desenvolvimento é delineado. Todas as ratas prenhes foram pesadas para acompanhamento do ganho de peso e ajuste do volume de administração.

O dia de nascimento dos filhotes foi denominado dia pós-natal 0 (DPN0), e o tratamento foi contínuo e ininterrupto até o DPN21, quando os filhotes foram então desmamados e separados em caixas por gênero e por teste experimental, com até 5 animais por caixa. No DPN4 as ninhadas foram reduzidas para 10 filhotes cada, mantendo número igual de machos e fêmeas nas ninhadas, quando possível. As ninhadas foram pesadas semanalmente para acompanhamento do ganho de peso.

Os experimentos foram conduzidos com os filhotes na adolescência (DPN35) e na idade adulta (DPN75). Todos os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA 12/11).

3.2 PROTOCOLO DE ESTRESSE

Neste trabalho utilizamos um agente estressor agudo de imobilização, que consistiu em colocar os animais em um tubo cônico de metal, com aberturas para ventilação, de modo que o animal permanecesse restrito dentro do mesmo, durante 1 hora. Os controles (animais não estressados) permaneceram em suas caixas no biotério.

Após o estresse de imobilização, os animais destinados à dosagem de corticosterona plasmática foram guilhotinados para coleta de sangue, em tubos heparinizados. Animais estressados (grupos ST) e não estressados (grupos NO) foram guilhotinados intercaladamente, sempre entre 08:00am e 10:00am, que corresponde aproximadamente ao período no qual os níveis de corticosterona estão mais baixos (nadir). 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. Fêmeas adultas tiveram a fase estral checada antes do experimento através de esfregaço vaginal, e foram submetidas ao experimento somente quando estavam na fase estro. As amostras de sangue foram centrifugadas em 3000rpm por 15min, a 4°C, e o plasma foi separado e congelado a -20°C até a dosagem de corticosterona.

Os animais destinados à imuno-histoquímica foram, após o estresse de imobilização, anestesiados com uretana (1,2g/Kg) e então submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina tamponada em tampão fosfato (PB) 0,2M (pH 7,4) seguida de paraformaldeído (PFA) tamponado em PB 0,1M (pH 7,4) a 4% para fixação. As perfusões dos animais dos grupos ST e NO foram intercaladas, e executadas durante todo o período da tarde (01:00pm até 05:00pm). Os encéfalos foram removidos, pós-fixados *overnight* em PFA 4%, e então transferidos para frascos contendo PB 0,1M que permaneceram em estocados a 4°C até posterior processamento. Os encéfalos foram colocados em solução de sacarose a 30% em PB para crioproteção, 48h antes do processamento histológico.

3.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os encéfalos foram cortados a 30µm em um micrótomo de congelamento (Leica®). As fatias foram lavadas em PB e incubadas por 16-24h com 1:2000 de anticorpo anti-Fos (*rabbit anti-rat Fos*, Ab-5; Santa Cruz Biotech®) diluído em 0,3% de Triton X-100, contendo 50µL de soro normal de cabra. Após a incubação, os cortes foram lavados 3 vezes de 10min em PB, e então incubados por 2h com 1:200 de anticorpo secundário biotilado (*goat anti-rabbit IgG*, Jackson ImmunoResearch®), seguidos de 3 lavagens de 10min com PB para então serem incubados com complexo avidina-biotina (1:100; ABC Elite kit, Vector Labs®) por 2h. A visualização foi feita utilizando uma mistura de 0,05% diaminobenzidina-0,01% peróxido de hidrogênio. Os cortes foram então lavados em PB e montados em lâminas com meio de montagem baseado em glicerol, secas a temperatura ambiente, desidratadas com soluções gradativas de etanol seguidas de xilol, e então cobertas com permalte (Fisher Scientific®) e lamínula, para conservação e visualização ao microscópio óptico.

Neurônios Fos-positivos foram contados bilateralmente em dois cortes de cada região analisada, sendo elas: núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN, bregma -1.72 até -1.92mm) e amígdala (bregma -1.80 até -2.40mm). Considerando que a amígdala é uma coleção heterogênea de núcleos que são ativados diferentemente de acordo com o contexto e tipo de estresse, nós analisamos separadamente três subdivisões da amígdala: a amígdala medial (MeA), o núcleo central da amígdala (CeA) e o núcleo basolateral da amígdala (BLA). Cada corte foi fotografado com aumento de 50x, utilizando um fotomicroscópio acoplado a câmera digital, e as fotografias foram armazenadas em computador para posterior análise digital.

A análise das imagens foi feita utilizando o *software* ImageJ (*National Institutes of Health*, USA). Foram analisados 2 cortes de cada região, bilateralmente, gerando 4 imagens de cada região para cada animal analisado. Foi calculada uma média do número de neurônios Fos-positivos de cada região, gerando um valor único de contagem para cada animal.

Brevemente, a região de interesse foi manualmente demarcada, dentro de um valor de área conhecido, e um limiar foi fixado para assegurar a contagem apenas de núcleos de neurônios que podiam ser facilmente distinguidos do plano de fundo

(*background*), excluindo falso-positivos. Também foi fixado um limiar de tamanho para eliminar pontos grandes ou pequenos demais para serem considerados núcleos de neurônios. Depois de acertadas estas configurações, o *software* executava a contagem do número de pontos na imagem (correspondentes aos neurônios imunomarcados) e este dado era então tabelado para posterior análise estatística. O resultado foi expresso como número de neurônios imunomarcados/mm² de tecido.

3.4 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

As dosagens de corticosterona plasmática foram realizadas por radioimunoensaio segundo a técnica descrita por Elias et al. (ELIAS, ELIAS et al. 2004). A corticosterona foi extraída das amostras de plasma congelado utilizando etanol (25µL de plasma + 1mL de etanol) e depois liofilizadas. Foram então resuspendidas com 2,5mL de tampão de diluição (Tris-HCl 0,05M, Sigma®; NaCl 0,1M, Sigma®; soroalbumina bovina 0,1%, Sigma®; azida sódica 0,1%, Merck®; pH 8,0). Foram tomados 500µL das amostras resuspendidas, em duplicata, aos quais foram adicionados 100µL de anticorpo anti-corticosterona (*rabbit anti-rat IgG*, Sigma®), na diluição de 1:8, e 100µL de corticosterona triciada ([1,2-³H(N)] – Corticosterona), com período de incubação de 15h.

Após a incubação, as amostras foram agitadas com 200µL de solução de carvão ativado e dextrana (carvão ativado 0,5% - Sigma®; Dextran T70 0,5%, Sigma®) e incubadas por 15min a 4°C, sendo então centrifugadas à 3000rpm e a 4°C por 15min. Após a centrifugação, 600µL do sobrenadante foram transferidos para os frascos de cintilação, contendo 5mL de líquido de cintilação (ScintiSafe Econo 1 SX20-5, Fischer®) e a radiação (cpm) da corticosterona triciada foi determinada em espectrofotômetro de cintilação líquida (Beckman®).

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

e, ao invés da utilização da suspensão de carvão ativado, foram adicionados 200µL do tampão de diluição.

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

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

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

3.5 PREFERÊNCIA PELA SACAROSE

Neste teste, os animais foram separados em caixas individuais nas quais havia duas garrafas: uma contendo água e outra contendo solução de sacarose a 3%, com volumes iguais. A concentração de sacarose foi baseada em estudos prévios, que demonstraram que roedores conseguem perceber a sacarose mesmo a concentrações tão baixas quanto 0,1%, e muitos estudos utilizam concentrações de sacarose variando de 1 a 3% para este teste (KALUEFF, GALLAGHER et al. 2006).

Os animais tiveram livre acesso às duas garrafas durante 3 dias, e o volume ingerido de líquido de cada garrafa foi mensurado, assim como o peso dos animais e, para evitar possível preferência pelo lado da garrafa na caixa, as garrafas foram trocadas de lado diariamente. A preferência pela sacarose foi então calculada, diariamente, como se segue:

$$\frac{\text{mL de Solução de Sacarose Ingerido}}{\text{mL Total Ingerido}} \times 100$$

Os resultados foram expressos como a % total de preferência pela sacarose, calculada a partir da soma das preferências diárias de cada animal.

3.6 HIPOFAGIA INDUZIDA PELA NOVIDADE

Este é um teste comumente utilizado para camundongos e nós o adaptamos para ratos (BODNOFF, SURANYI-CADOTTE et al. 1989). O teste de Hipofagia Induzida pela Novidade (HIN) é baseado no medo inato de roedores de áreas novas e abertas, conflitando com um componente motivacional (como fome ou desejo por um alimento mais palatável) e tem sido usado para avaliação de comportamentos similares à ansiedade e depressão, em roedores.

Para este teste, os animais foram colocados em jejum por 24h em gaiolas metabólicas, e então individualmente colocados na área periférica de uma arena circular de madeira (diâmetro de 72cm) que continha 30g de ração em sua área central. Foi mensurada a latência para que o animal começasse a se alimentar. Os testes tiveram duração de 5min para os animais adolescentes, e de 15min para os animais adultos, devido ao fato dos animais adultos, tanto do grupo CON quanto do grupo FLX, apresentarem maior latência para começarem a se alimentar. Como o tratamento perinatal com FLX poderia levar à alteração da ingesta alimentar, após o teste os animais foram devolvidos à gaiola metabólica e a ingesta alimentar destes animais em suas respectivas gaiolas foi também quantificada, durante o mesmo período de duração do teste.

O teste de HIN 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 capacidade do animal de resolver um conflito, a qual está inversamente relacionada à ansiedade e depressão (BODNOFF, SURANYI-CADOTTE et al. 1989; DULAWA e HEN 2005).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

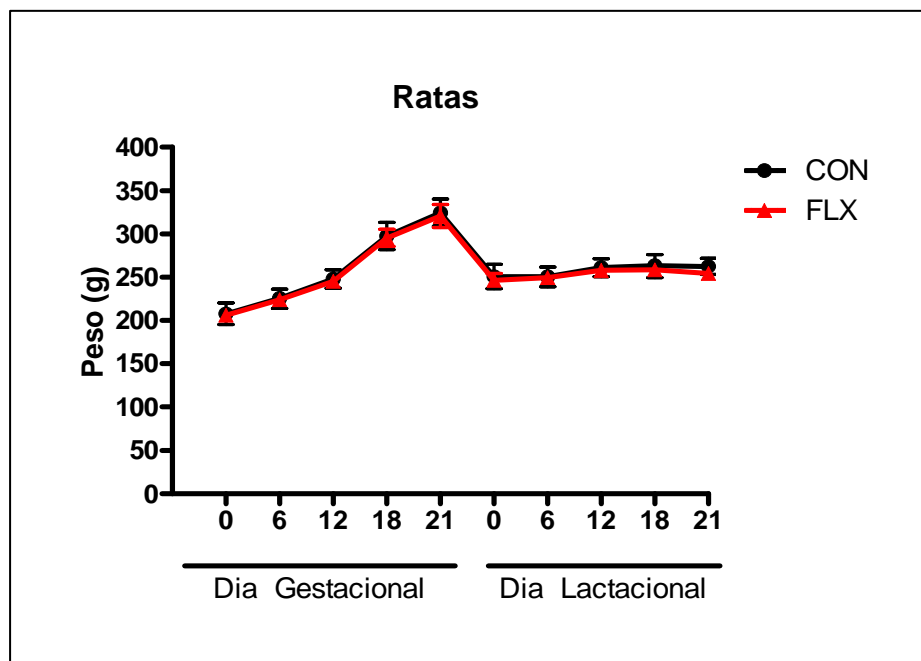
Os dados foram inicialmente submetidos a uma análise estatística exploratória na qual se avaliou a distribuição normal de cada variável e a homogeneidade de variâncias. Análises paramétricas (ANOVA, ANOVA fatorial ou ANOVA para medidas repetidas) foram empregadas para as variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância. Para as variáveis que não atingiram esses dois critérios, análise estatística não paramétrica (Kruskal-Wallis) foi empregada. As conclusões foram estabelecidas considerando o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA GERAL

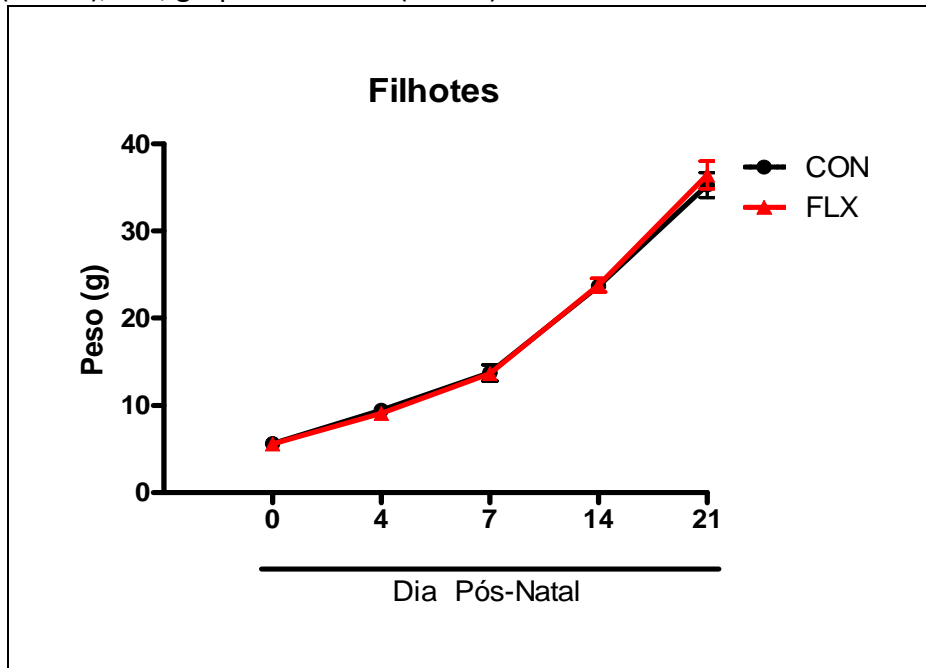
O tratamento com FLX não alterou o peso das mães durante a gestação e amamentação (ANOVA para medidas repetidas, $p>0,05$) (**Figura 1**), quando comparadas ao grupo CON. O ganho de peso dos filhotes também foi similar entre os dois grupos experimentais (ANOVA para medidas repetidas, $p>0,05$) (**Figura 2**). Ainda mais, o tratamento com FLX não influenciou o número de filhotes nascidos vivos e mortos (dados não mostrados).

Figura 5 - Curva de peso de ratas durante a gestação e lactação. CON, grupo controle (n=40); FLX, grupo fluoxetina (n=35).



Dados são médias \pm EPM. ANOVA para medidas repetidas, $p>0,05$.

Figura 6 - Curva de peso dos filhotes durante o período lactacional. CON, grupo controle (n=431); FLX, grupo fluoxetina (n=419).



Dados são médias \pm EPM. ANOVA para medidas repetidas, $p > 0,05$.

4.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA FOS

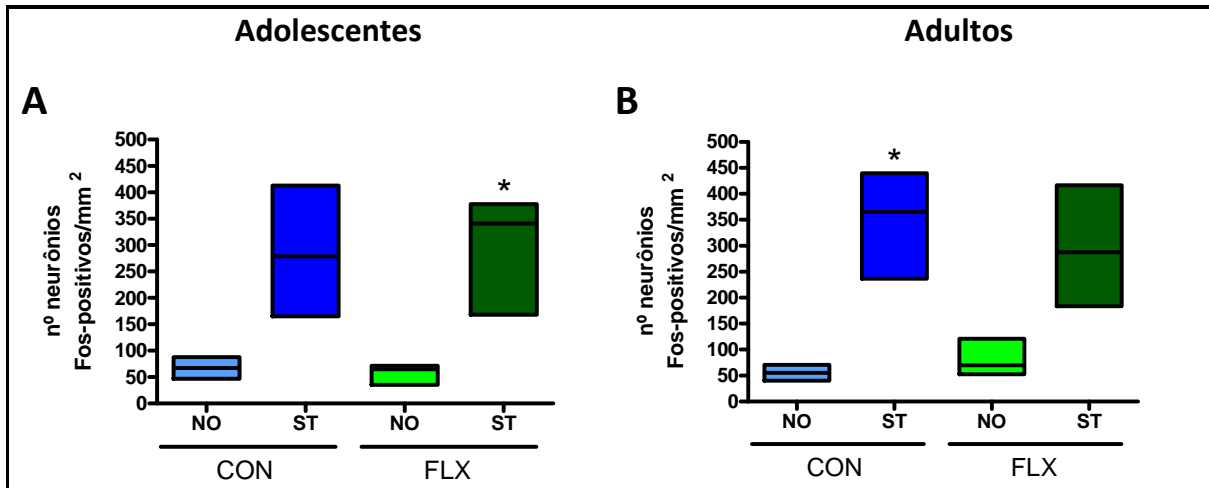
A contagem de neurônios imunomarcados para Fos foi analisada por teste estatístico não paramétrico, e neste trabalho utilizamos Kruskal-Wallis complementado com Dunn. Assim, os dados estão apresentados como medianas acompanhadas pelos valores mínimo e máximo. Os dados de machos e fêmeas, assim como de animais adolescentes e adultos, foram todos analisados separadamente uma vez que a análise não paramétrica não permite o uso de fatores.

4.2.1 Machos

Nos animais adolescentes e adultos (**Figura 3A e B**, respectivamente), o protocolo de estresse aumentou expressivamente a ativação neuronal no PVN, tanto no grupo CON quanto no grupo FLX. Embora esse aumento não tenha atingido significância estatística no grupo CON adolescente e no grupo FLX adulto, é evidente que há uma tendência, quando se compara os respectivos grupos NO e ST (**Figura 4 e 5**). Isto demonstra

que a exposição à FLX durante a gestação e a amamentação não alterou a resposta de estresse do PVN.

Figura 7 - Contagem de neurônios imunomarcados para Fos no PVN de ratos machos, adolescentes e adultos, em resposta ao estressor agudo de imobilização. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina.



Dados são medianas \pm máximo/mínimo de 5-8 animais por grupo. Kruskal Wallis, * $p < 0,05$ ST comparado ao respectivo NO

Figura 8 - Fotomicrografias do PVN de ratos machos adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. 3V, terceiro ventrículo. Escala: 100 μ m.

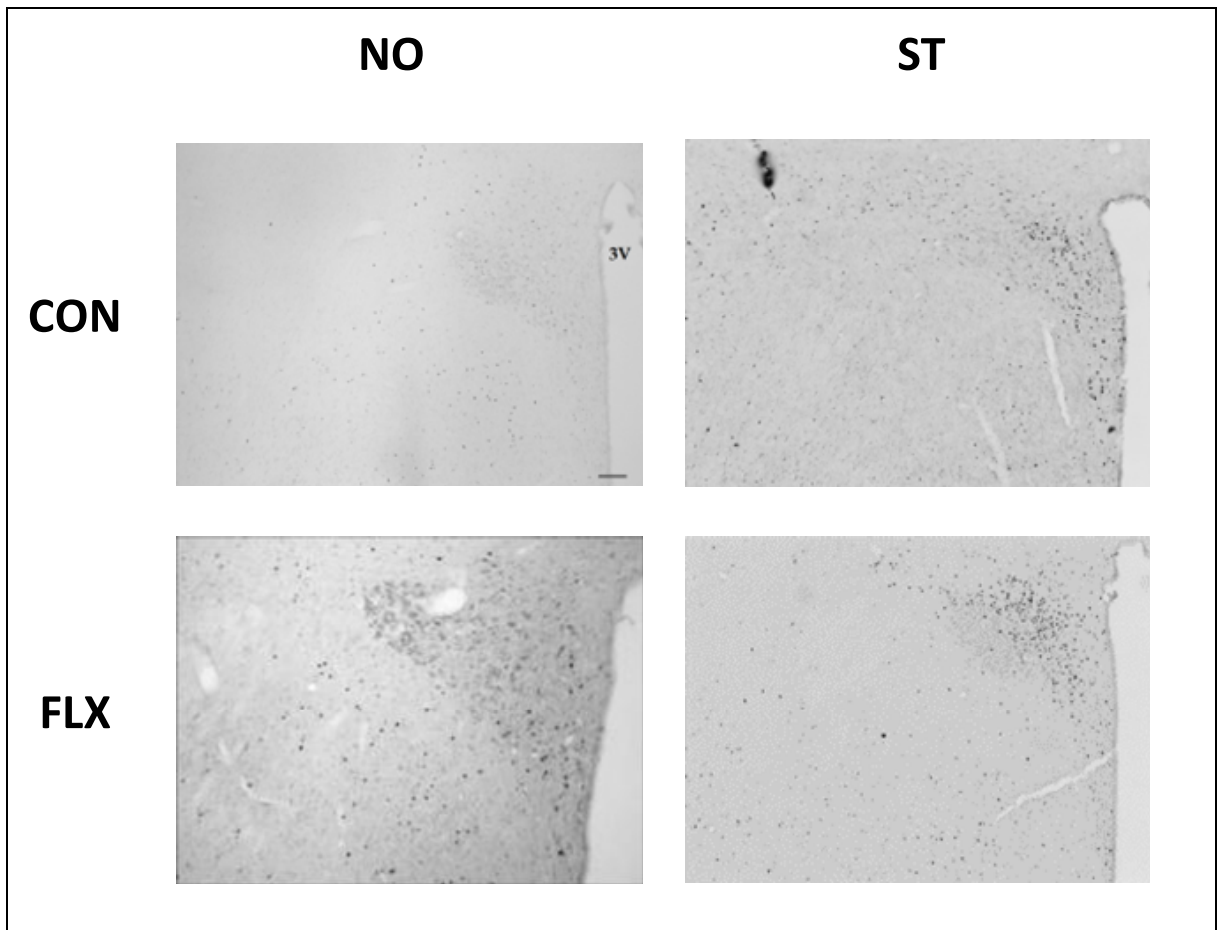
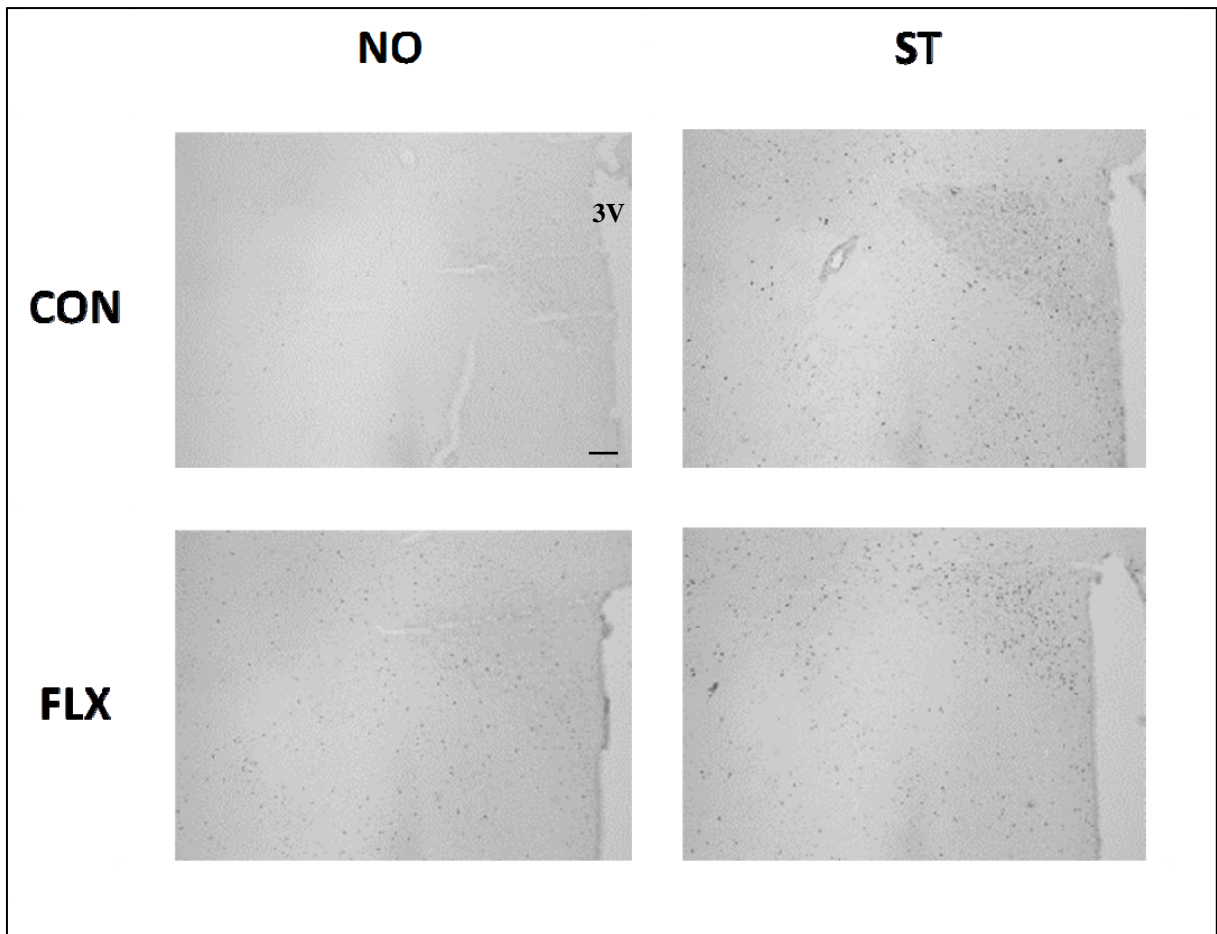


Figura 5 - Fotomicrografias do PVN de ratos machos adultos. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. 3V, terceiro ventrículo. Escala: 100µm.



Na amígdala, observamos efeitos diferentes de acordo com os núcleos analisados. Estas diferenças na ativação da amígdala em resposta a um agente estressor são esperadas, pois a amígdala possui uma organização complexa e responde diferentemente de acordo com a intensidade e contexto do agente estressor.

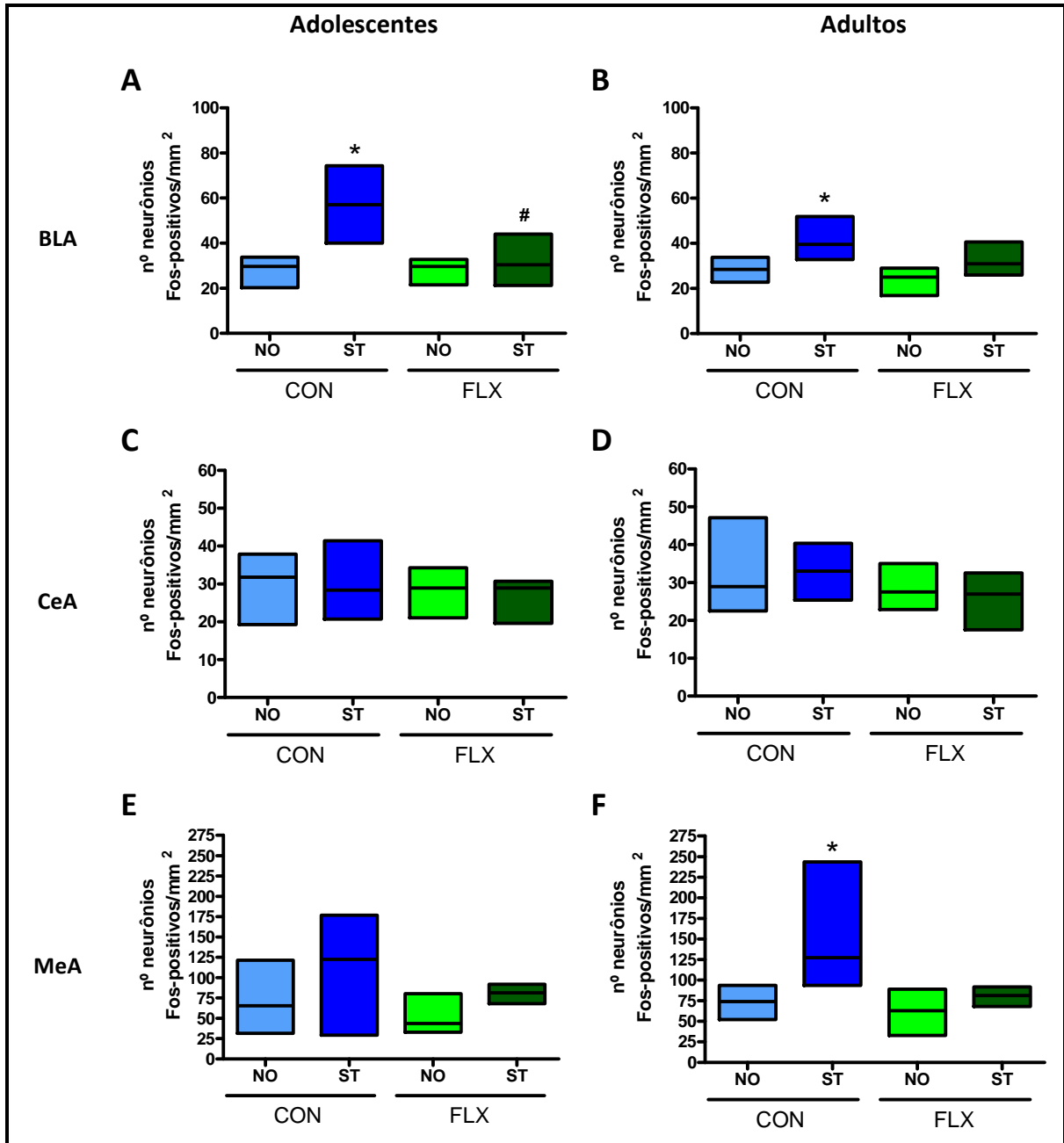
Na BLA de machos adolescentes, houve ativação induzida pelo estressor nos animais CON, e podemos observar que no grupo exposto à FLX e submetido ao estressor (FLX ST), não só houve redução estatisticamente significativa da expressão de Fos quando comparado ao grupo não submetido ao estressor (FLX NO), como também houve diferença significativa quando comparado ao grupo CON submetido ao estressor (CON ST) (**Figura 6A**). Isto evidencia que a exposição à FLX reduziu a ativação da BLA frente ao estressor, em machos adolescentes. Nos machos adultos também observamos ativação da BLA somente no grupo CON (**Figura 6B**) e, embora o grupo FLX ST não tenha sido diferente

estatisticamente do grupo CON ST, os dados sugerem que a exposição à FLX também pode ter diminuído a responsividade da BLA ao estressor nesta idade. A **Figura 7** e **Figura 8** apresenta as fotomicrografias da BLA de machos adolescentes e adultos, respectivamente.

Por outro lado, a CeA (**Figura 6C e D**) não se mostrou responsiva ao estressor agudo de imobilização (considerado um agente estressor psicológico) em ambas as idades, evidenciando que a CeA não participa da resposta ao protocolo de estresse utilizado neste trabalho (**Figura 9 e 10**).

Na MeA, observamos aumento de expressão de Fos no grupo CON ST quando comparado ao CON NO, nos adolescentes, embora não estatisticamente significativa (**Figura 6E**), pois há grande variabilidade nos dados destes grupos, o que pode ter prejudicado a análise estatística. No entanto, tendência ao aumento de expressão de Fos pode ser observada, e uma análise mais pormenorizada dos dados indica que houve indução de ativação pelo estressor semelhante nos dois grupos, sendo que os animais CON ST dobraram a expressão de Fos quando comparados aos CON NO, e os animais FLX ST também dobraram a expressão de Fos comparados aos FLX NO, levando à conclusão de que houve, de fato, ativação da MeA induzida pelo estressor; porém a exposição à FLX não influenciou esta ativação. Já nos animais adultos, observamos indução de ativação pelo agente estressor na MeA dos animais CON, porém, nos animais FLX, observamos uma redução na resposta de estresse da MeA (**Figura 6F**). Sugerimos que a exposição à FLX diminuiu a responsividade da MeA ao estressor nos machos adultos. As fotomicrografias da MeA podem ser observadas na **Figura 11** e na **Figura 12**.

Figura 6 - Contagem de neurônios imunomarcados para Fos em diferentes núcleos da amígdala de ratos machos, adolescentes e adultos, em resposta ao estressor agudo de imobilização. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina.



Dados são medianas \pm máximo/mínimo de 5-8 animais por grupo. Kruskal Wallis, * $p < 0,05$ ST comparado ao respectivo NO; # $p < 0,05$ FLX ST comparado a CON ST.

Figura 7 - Fotomicrografias da BLA de ratos machos adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. CeA, núcleo central da amígdala; BLA, núcleo basolateral da amígdala (área demarcada). Escala: 100 μ m.

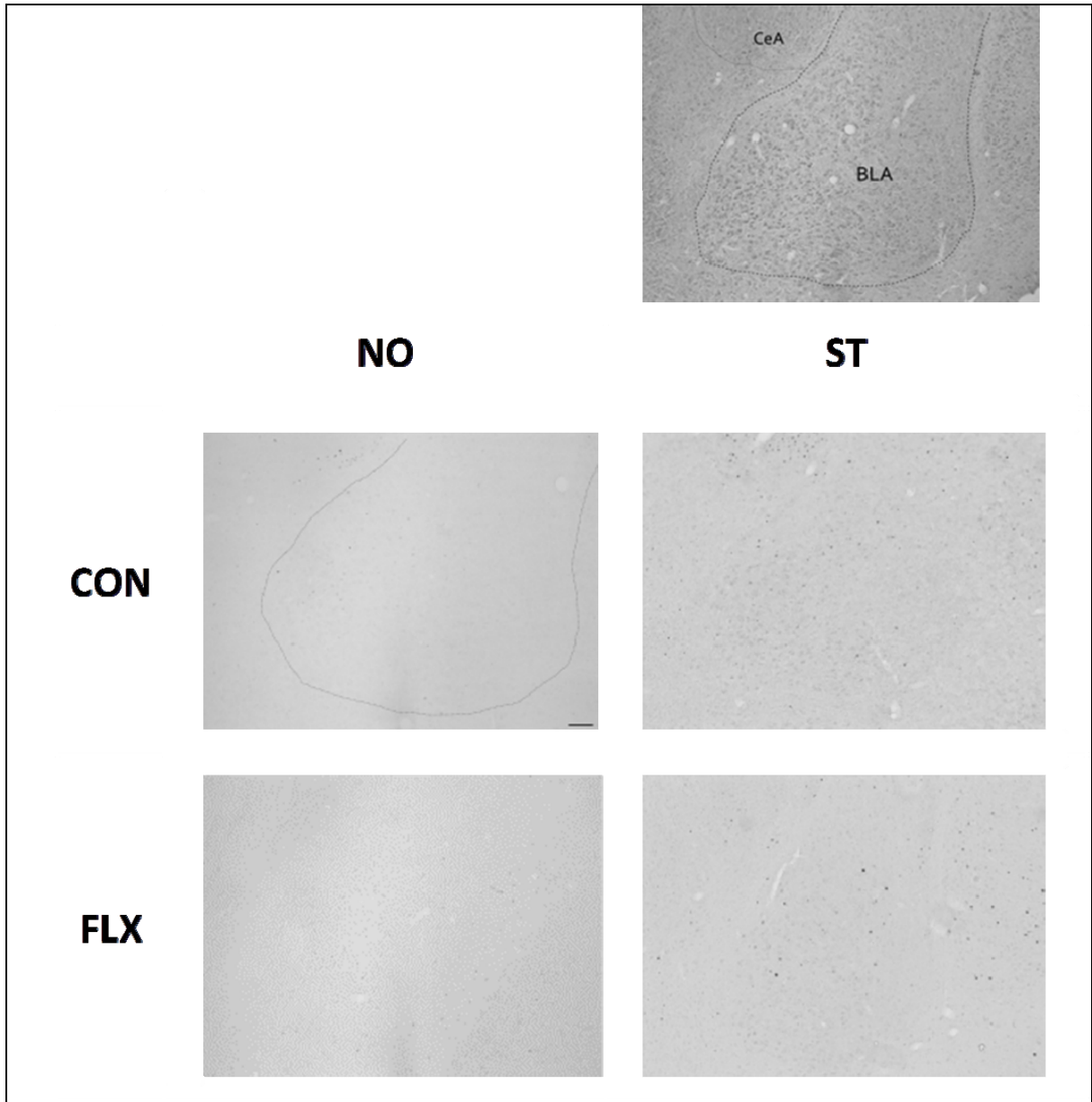


Figura 8 - Fotomicrografias da BLA de ratos machos adultos. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. CeA, núcleo central da amígdala; BLA, núcleo basolateral da amígdala (área demarcada). Escala: 100 μ m.

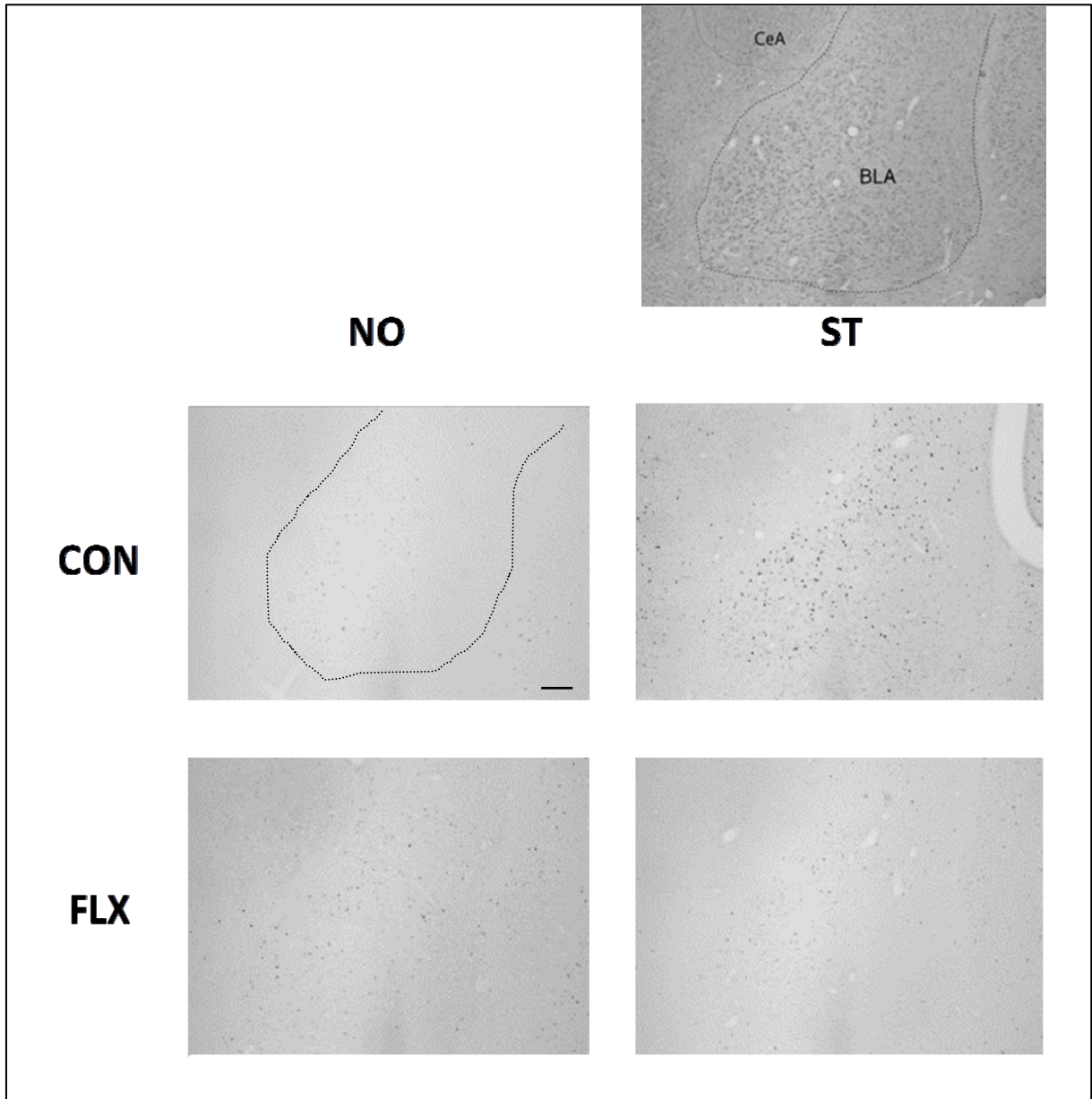


Figura 9 - Fotomicrografias da CeA de ratos machos adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. Opt, trato óptico; MeA, amígdala medial; BLA, amígdala basolateral; CeA, amígdala central (área demarcada). Escala: 100µm.

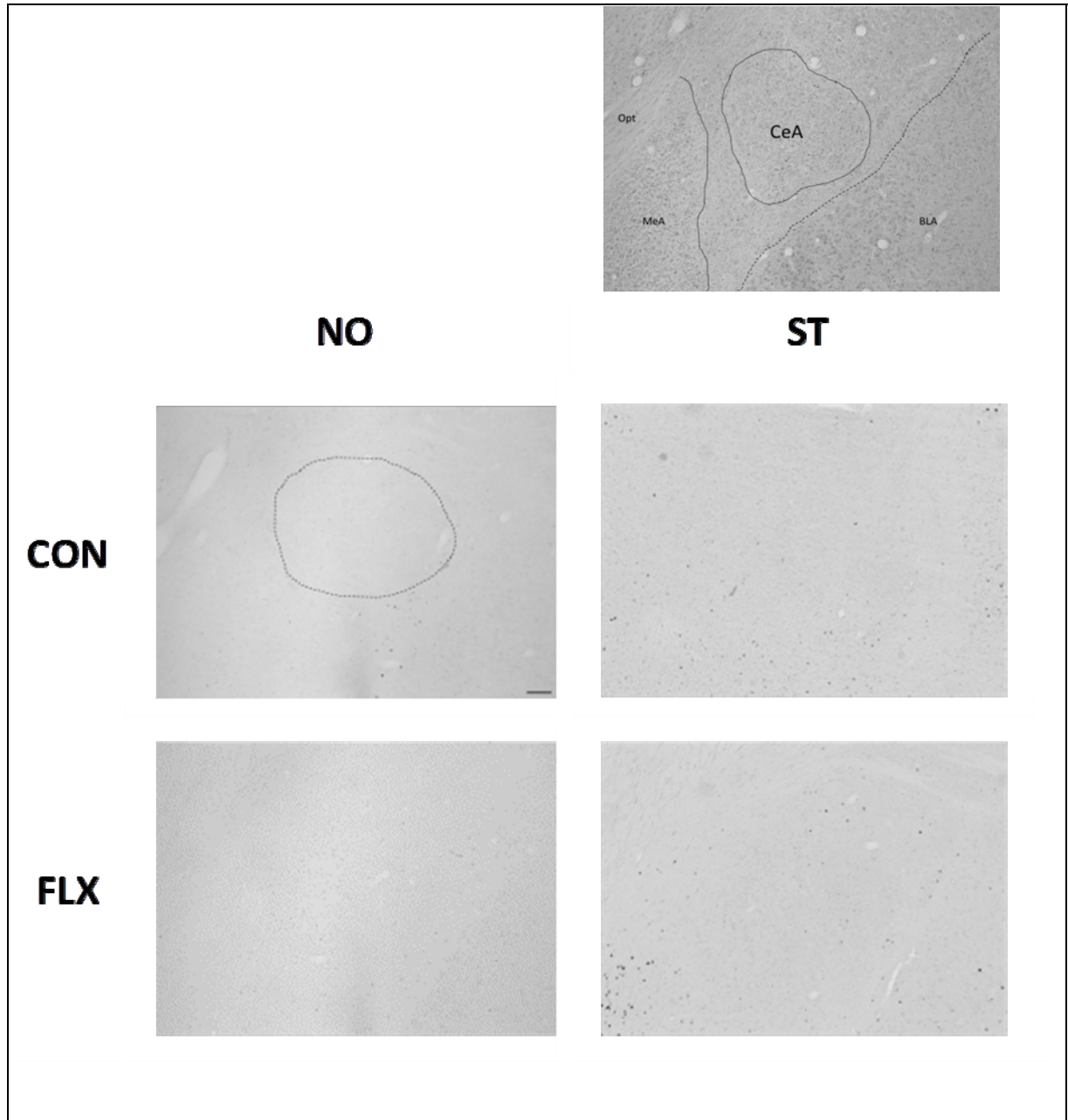


Figura 10 - Fotomicrografias da CeA de ratos machos adultos. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. Opt, trato óptico; MeA, amígdala medial; BLA, amígdala basolateral; CeA, amígdala central (área demarcada). Escala: 100 μ m.

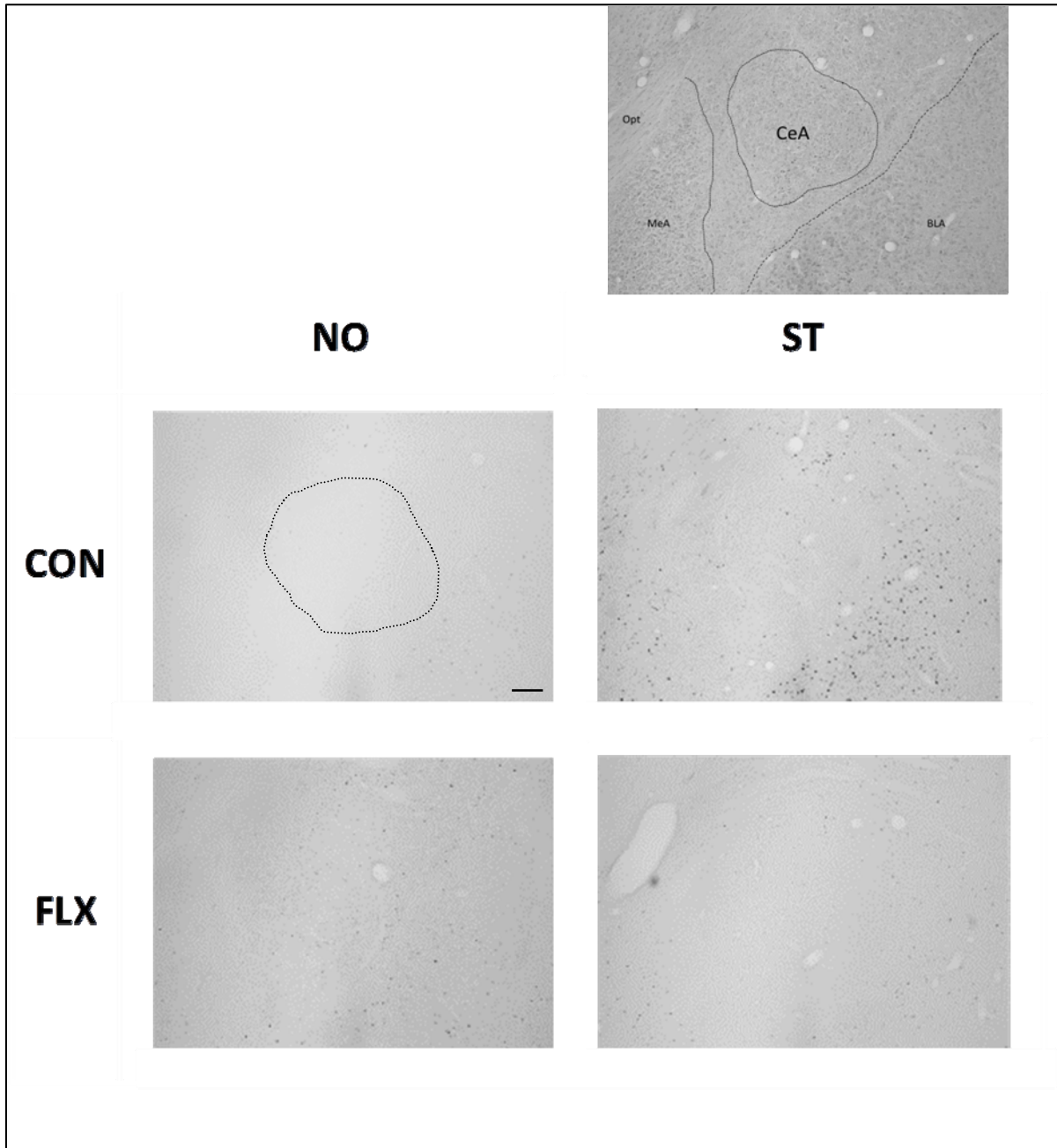


Figura 11 - Fotomicrografias da MeA de ratos machos adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. Opt, trato óptico; BLA, núcleo basolateral da amígdala; MeA, núcleo medial da amígdala (área demarcada). Escala: 100 μ m.

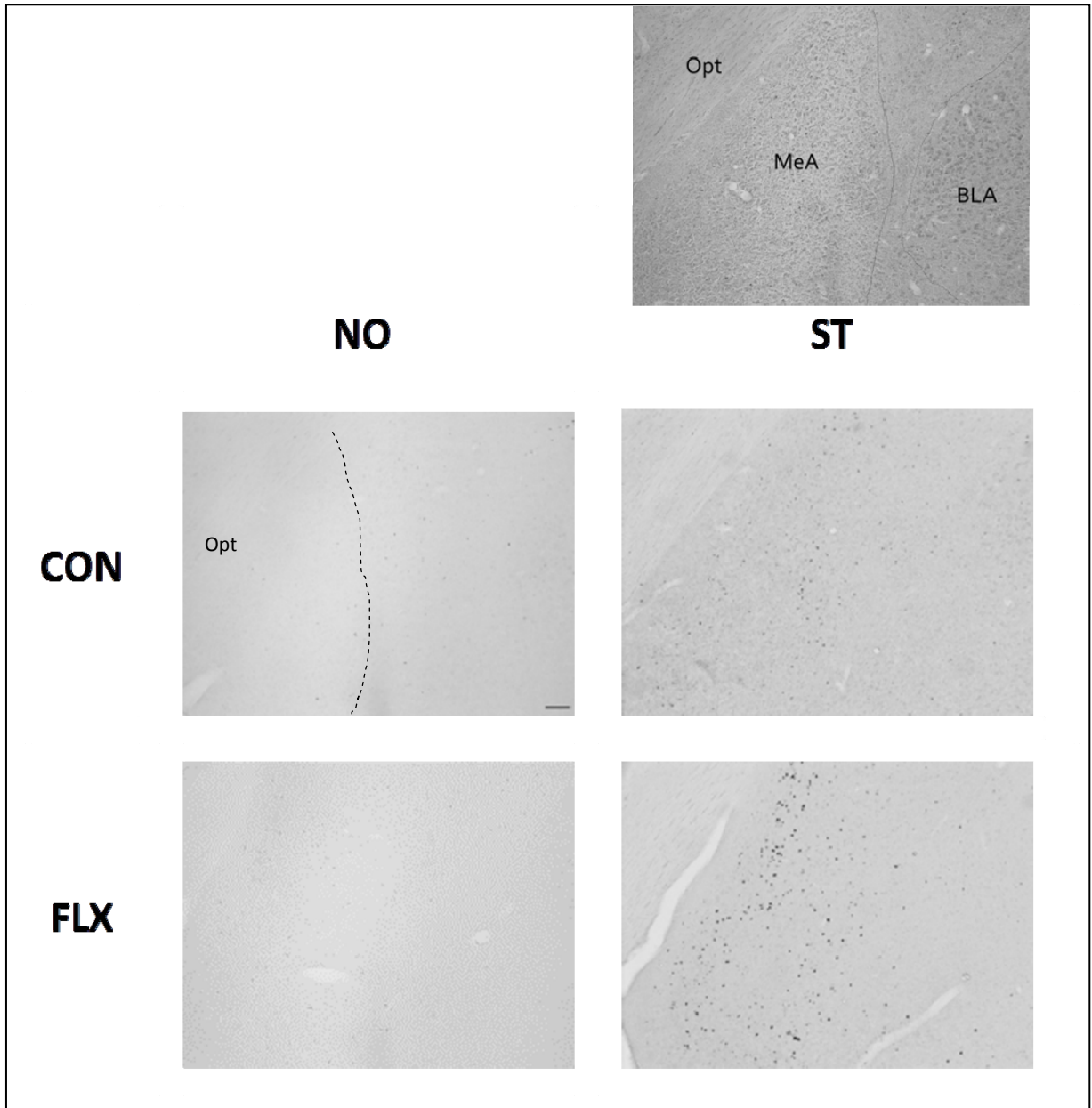
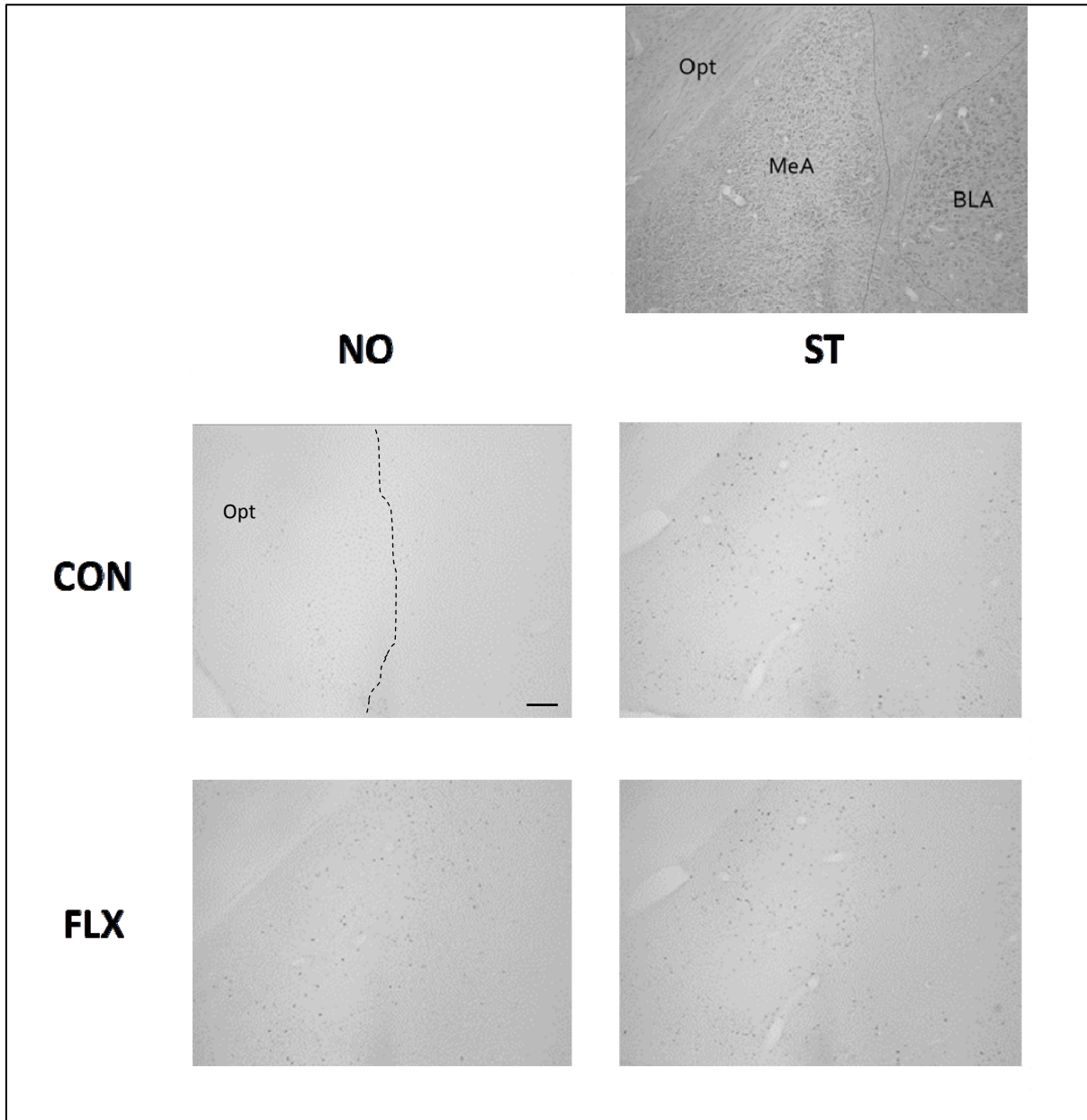


Figura 12 - Fotomicrografias da MeA de ratos machos adultos. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. Opt, trato óptico; BLA, núcleo basolateral da amígdala; MeA, núcleo medial da amígdala (área demarcada). Escala: 100 μ m.

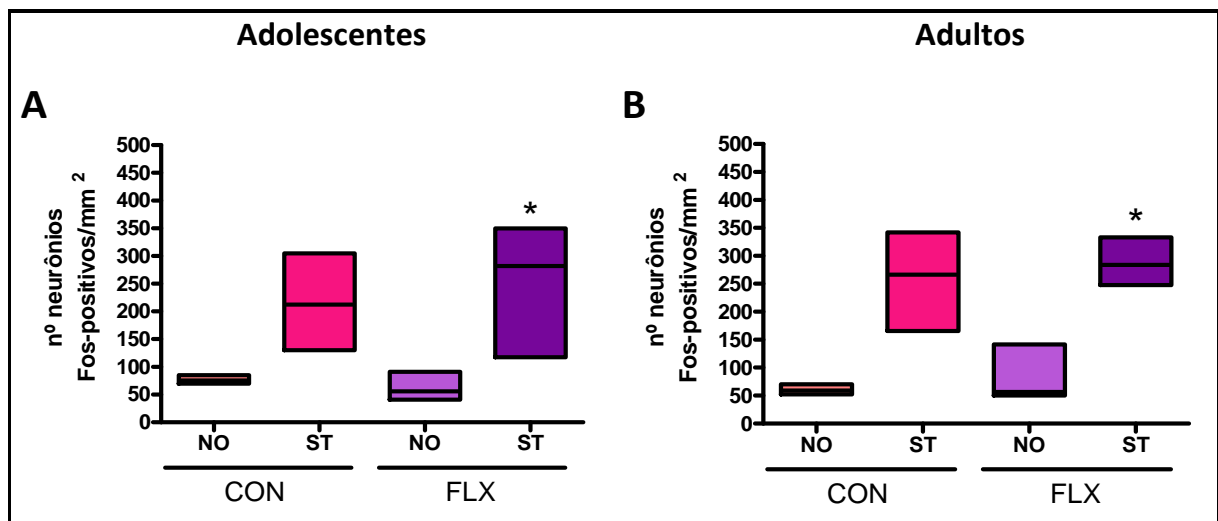


4.2.2 Fêmeas

A análise estatística da ativação cerebral na resposta de estresse nas fêmeas CON não apontou diferenças estatisticamente significativas induzidas pelo estressor, quando comparados os grupos NO e ST, em ambas as idades e em todas as áreas, com exceção da BLA das adolescentes.

No PVN, embora possa ser observado aumento da expressão de Fos no grupo CON ST quando comparado ao grupo CON NO de ratas adolescentes e adultas (**Figura 13**), esses aumentos não atingiram significância estatística; por outro lado, nesse mesmo núcleo, houve aumento estatisticamente significativo nos grupos FLX ST quando comparados aos FLX NO, em ambas as idades. Acreditamos que a ausência de significância estatística no grupo CON tenha sido casual e sugerimos que os dados não devem ser interpretados como maior ativação no grupo FLX (**Figura 14 e 15**).

Figura 13 - Contagem de neurônios imunomarcados para Fos no PVN de ratas, adolescentes e adultas, em resposta ao estressor agudo de imobilização. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina.



Dados são medianas \pm máximo/mínimo de 5-8 animais por grupo. Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$ ST comparado ao respectivo NO

Figura 14 - Fotomicrografias do PVN de ratas adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. 3V, terceiro ventrículo. Escala: 100 μ m.

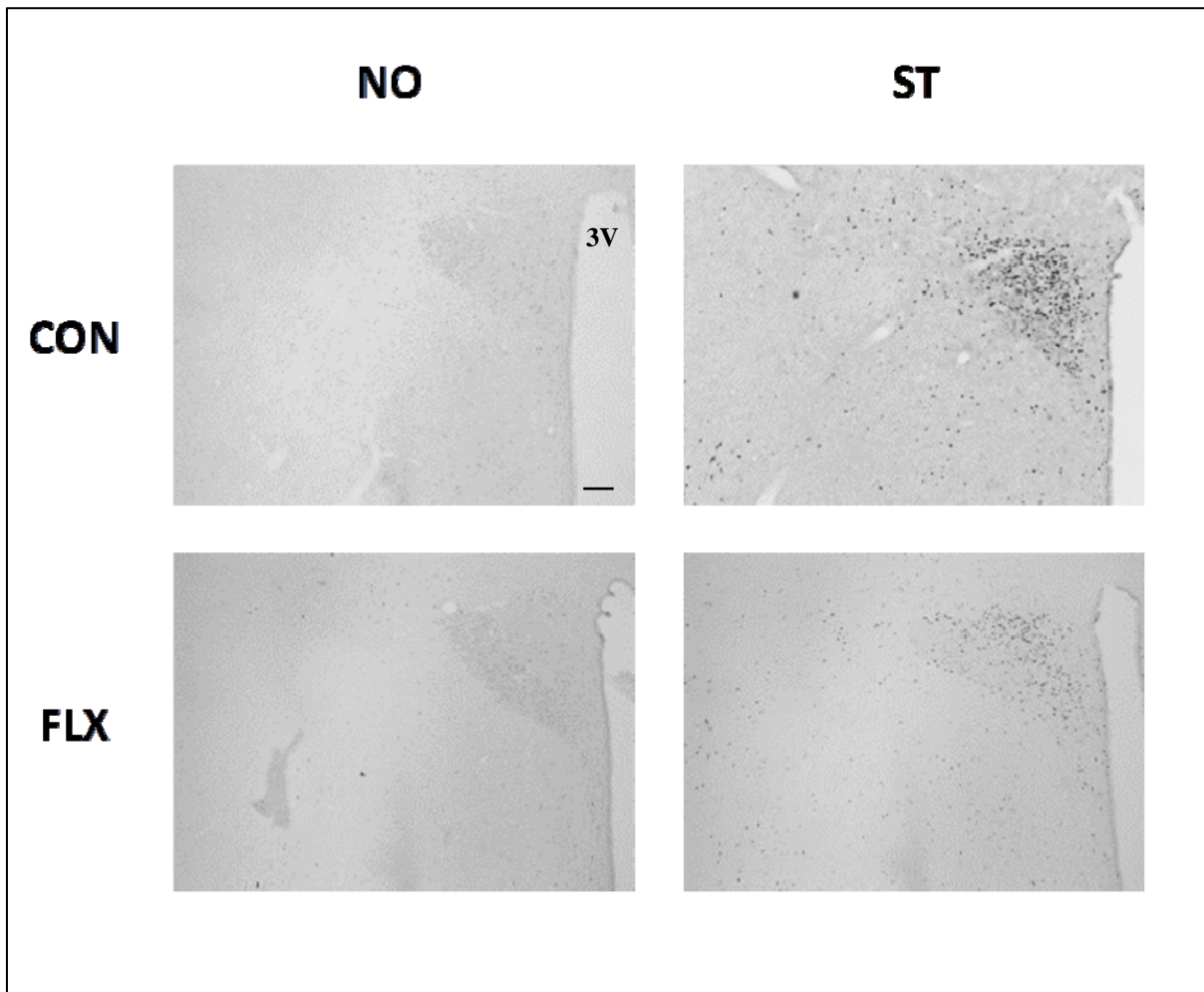
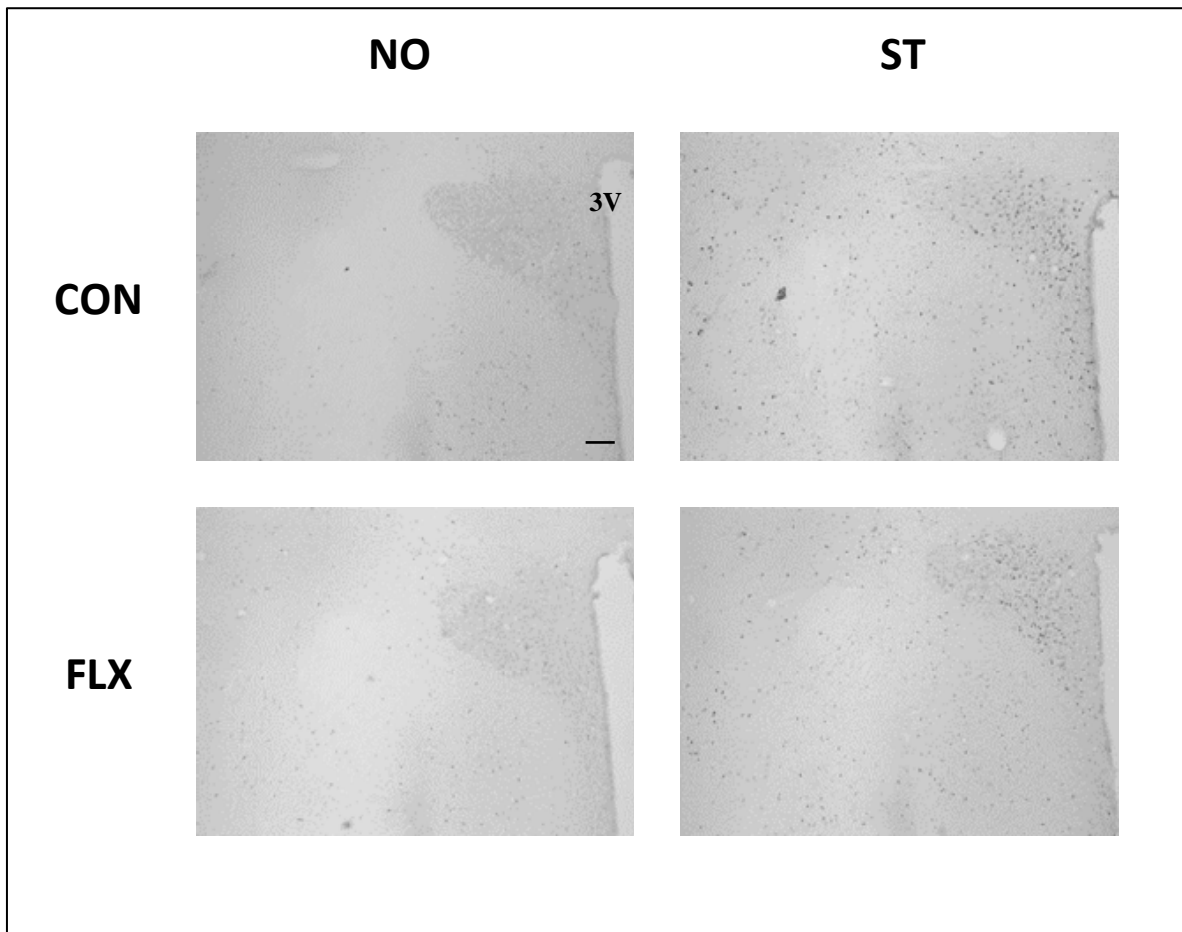


Figura 15 - Fotomicrografias do PVN de ratas adultas. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. 3V, terceiro ventrículo. Escala: 100µm.



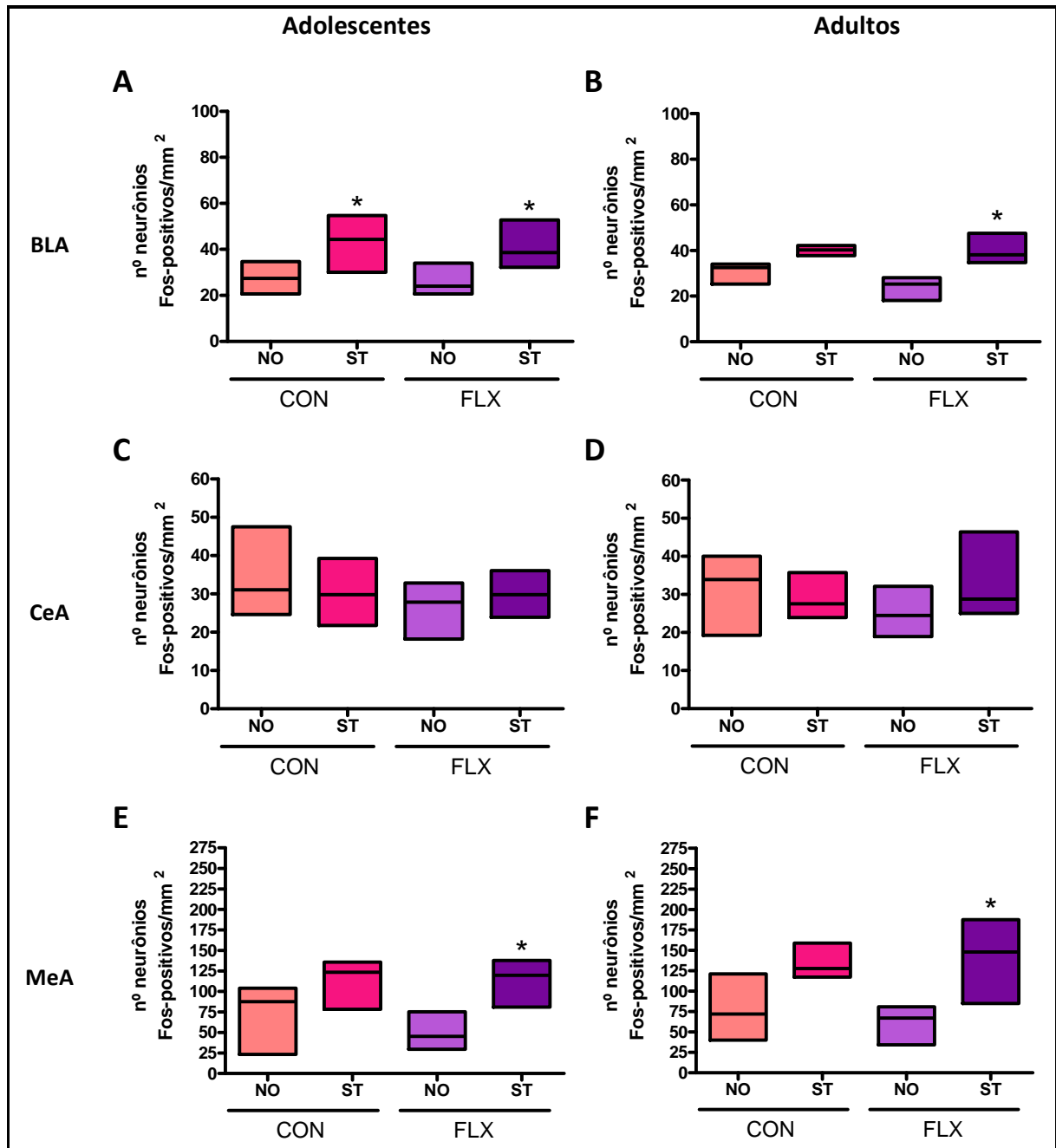
Na amígdala das adolescentes foi observado aumento da ativação da BLA tanto nos grupos CON quanto nos grupos FLX (**Figura 16A e B**). Nas fêmeas adultas, ativação da BLA pelo estressor pode ser observada no grupo FLX. Assim, nossos dados mostram que a exposição à FLX durante a gestação e amamentação não influenciou a resposta de estresse da BLA em ratas adolescentes ou adultas (**Figura 17 e 18**).

Como pode ser observado nas **Figuras 16C e D**, assim como a CeA de machos, a CeA de fêmeas, em ambas as idades, também não foi ativada pelo estressor utilizado nesse trabalho, evidenciando novamente a não participação deste núcleo amigdalár na resposta ao estressor agudo de imobilização (**Figura 19 e 20**).

Na MeA houve ativação pelo agente estressor em todos os grupos ST, de ambas as idades (**Figura 16E e F**), embora os aumentos nos grupos CON não tenham atingido significância estatística. Embora nos grupos FLX o aumento tenha sido significativo, a observação dos dados sugere que não houve influência da exposição à FLX durante a

gestação e amamentação no perfil de ativação da MeA pelo estressor (**Figura 21 e 22**). Esse resultado contrasta com o observado nos machos adultos, nos quais houve menor responsividade ao estressor na MeA dos adultos expostos à FLX (**Figura 6F**).

Figura 16 - Contagem de neurônios imunomarcados para Fos em diferentes núcleos da amígdala de ratas, adolescentes e adultas, em resposta ao estressor agudo de imobilização. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina.



Dados são medianas \pm máximo/mínimo de 5-8 animais por grupo. Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$ ST comparado ao respectivo NO.

Figura 17 - Fotomicrografias da BLA de ratas adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. CeA, núcleo central da amígdala; BLA, núcleo basolateral da amígdala (área demarcada). Escala: 100 μ m.

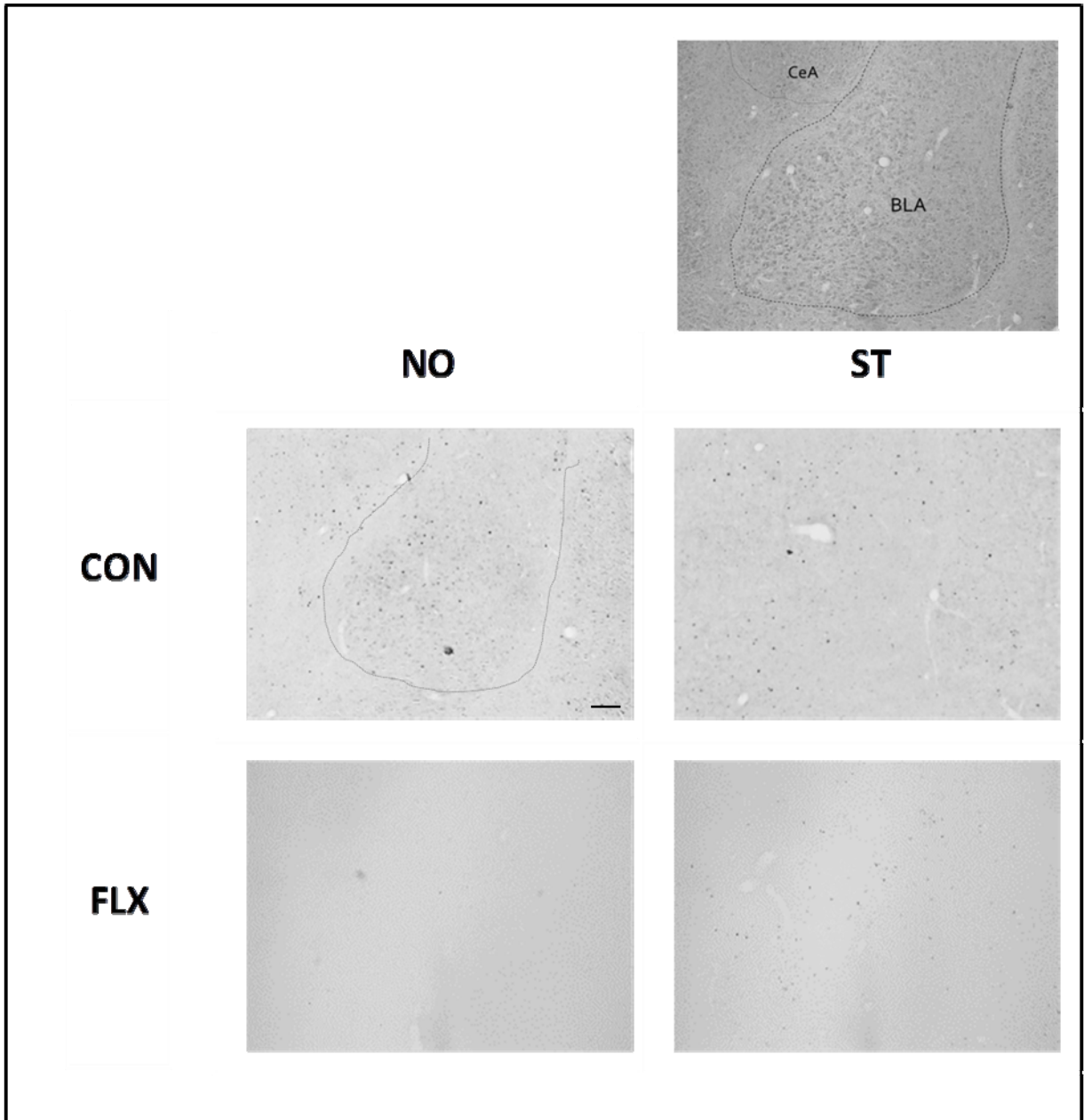


Figura 18 - Fotomicrografias da BLA de ratas adultas. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. CeA, núcleo central da amígdala; BLA, núcleo basolateral da amígdala (área demarcada). Escala: 100µm.

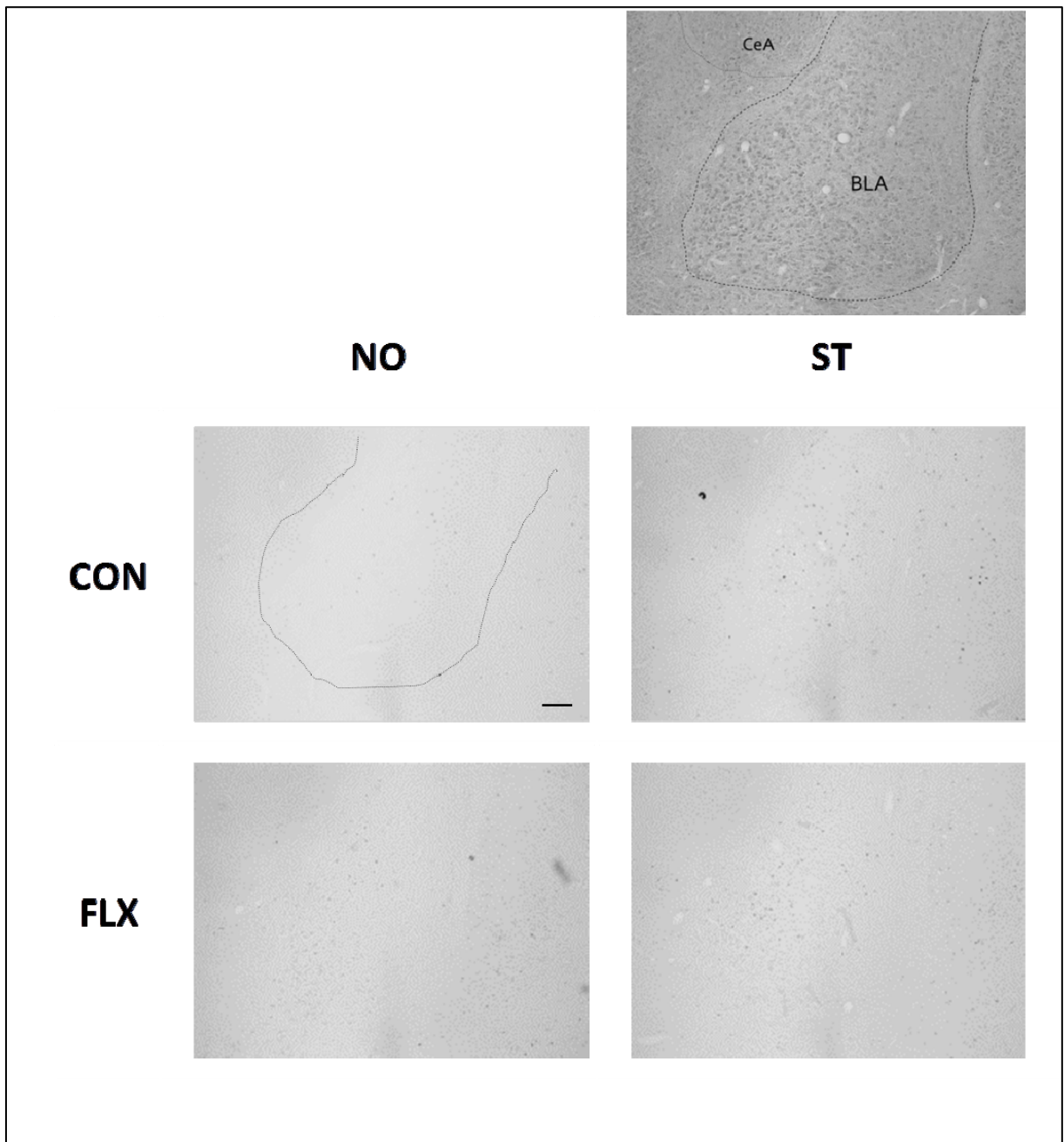


Figura 19 - Fotomicrografias da BLA de ratas adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. CeA, núcleo central da amígdala; BLA, núcleo basolateral da amígdala; Opt, trato óptico; MeA, amígdala medial (área demarcada). Escala: 100µm.

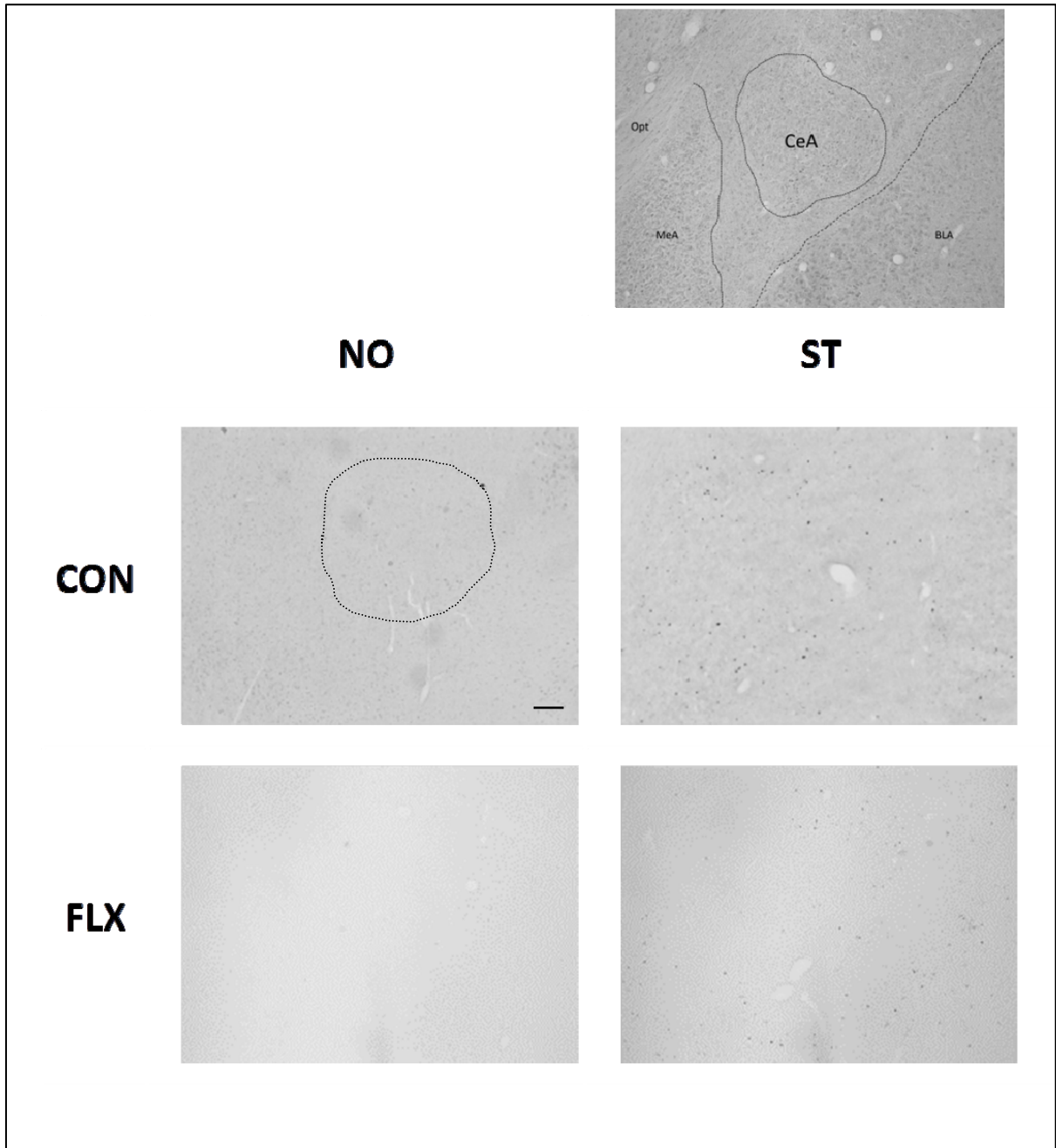


Figura 20 - Fotomicrografias da BLA de ratas adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. CeA, núcleo central da amígdala; BLA, núcleo basolateral da amígdala; Opt, trato óptico; MeA, amígdala medial (área demarcada). Escala: 100 μ m.

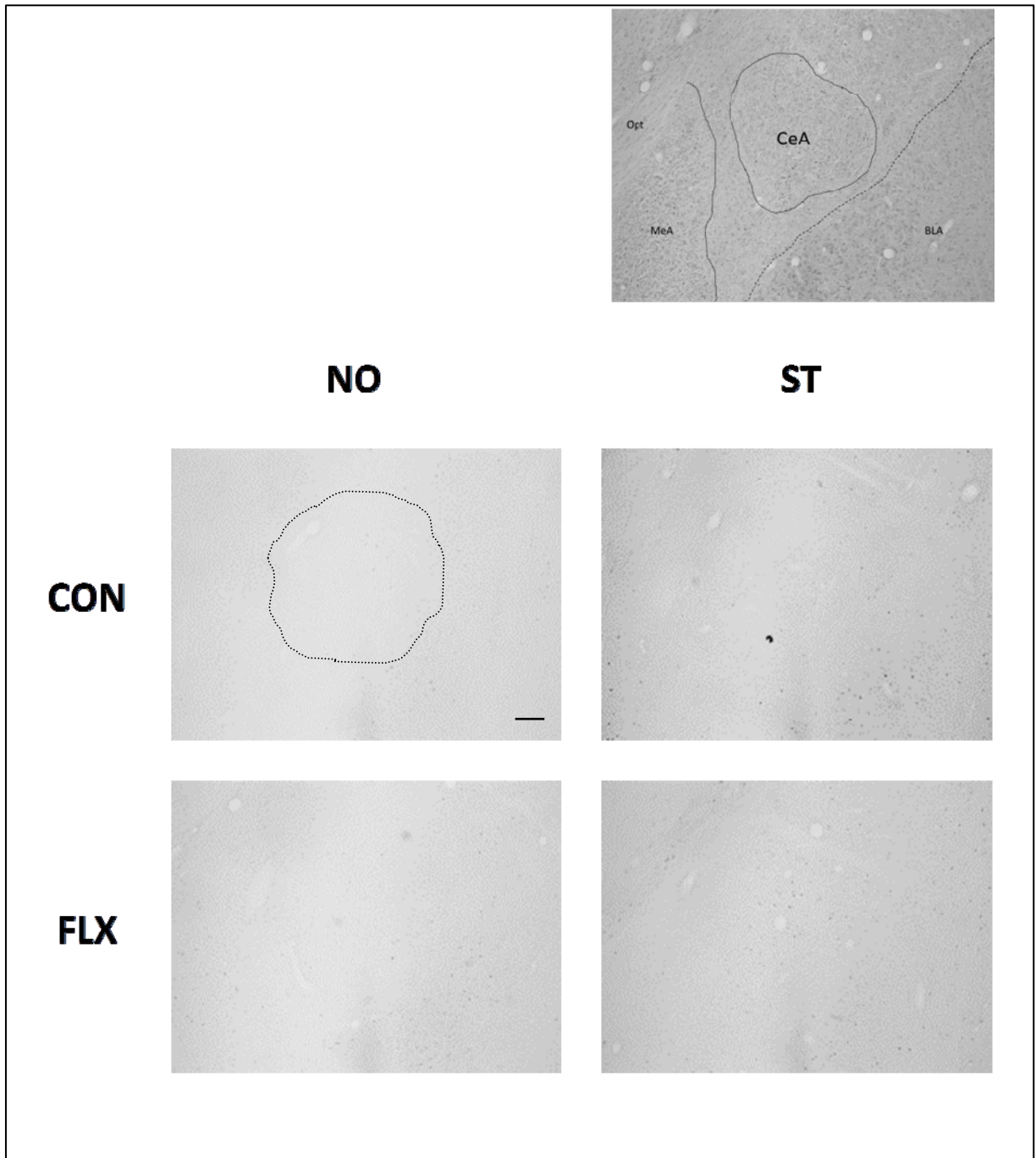


Figura 21 - Fotomicrografias da MeA de ratas adolescentes. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. BLA, núcleo basolateral da amígdala; Opt, trato óptico; MeA, núcleo medial da amígdala (área demarcada). Escala: 100 μ m.

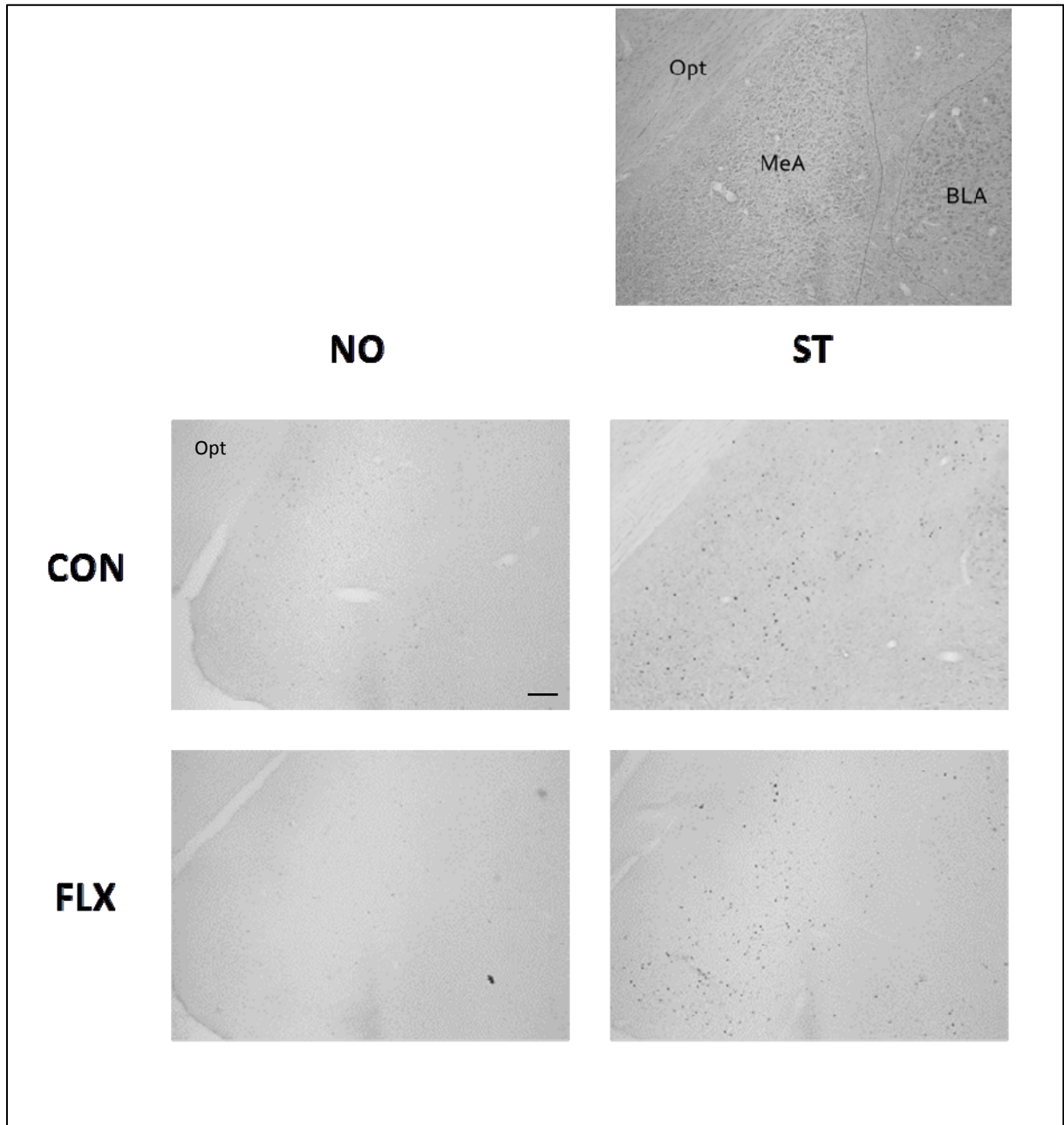
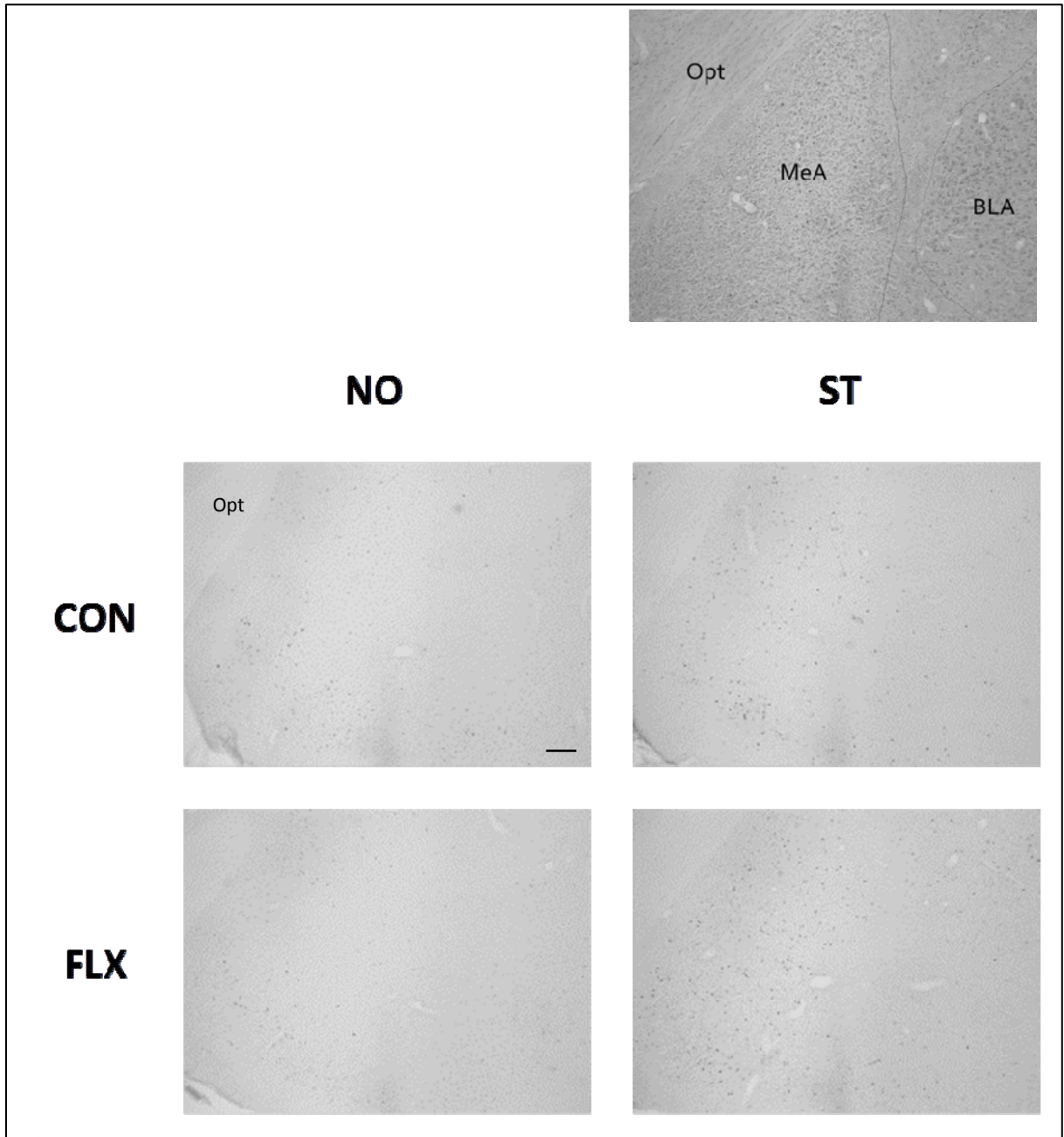


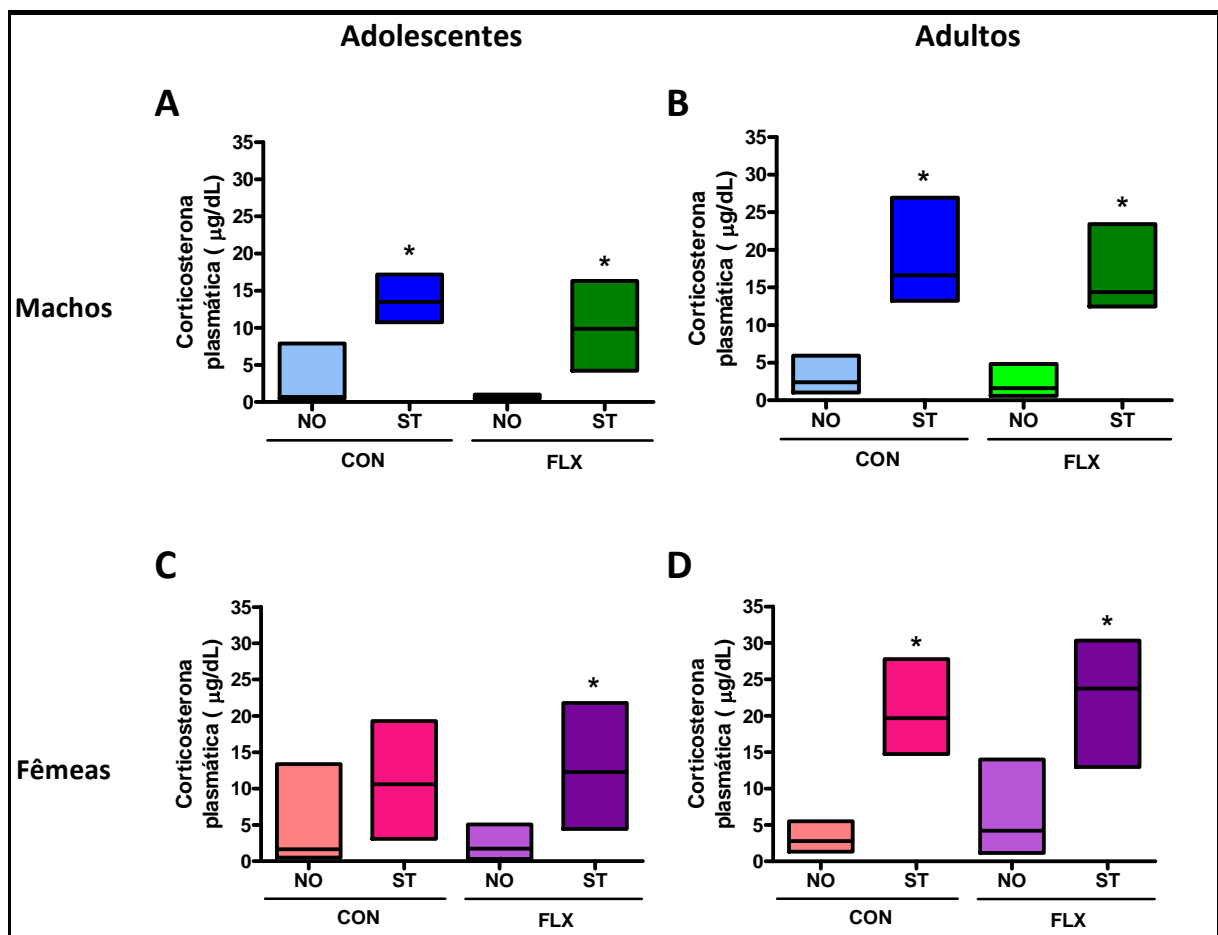
Figura 22 - Fotomicrografias da MeA de ratas adultas. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina. BLA, núcleo basolateral da amígdala; Opt, trato óptico; MeA, núcleo medial da amígdala (área demarcada). Escala: 100 μ m.



4.3 CORTICOSTERONA PLASMÁTICA

O agente estressor de imobilização induziu aumento marcante nos níveis plasmáticos de corticosterona em todos os grupos experimentais (**Figura 23**). A comparação dos grupos ST com seus respectivos NO apontou que os grupos são estatisticamente diferentes (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) com exceção das fêmeas adolescentes do grupo controle, no qual a maior variabilidade dos dados do grupo NO pode ter prejudicado a análise estatística (**Figura 15C**).

Figura 23 - Corticosterona plasmática de ratos machos e fêmeas, adolescentes e adultos, em resposta ao estressor agudo de imobilização. NO, grupo não estressado; ST, grupo estressado; CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina.

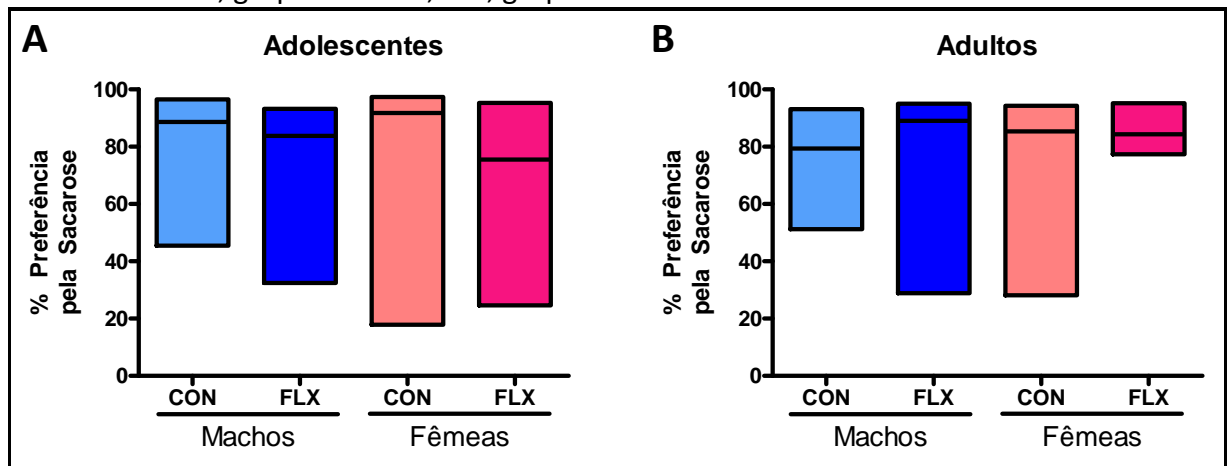


Dados são medianas \pm máximo/mínimo de 7-12 animais por grupo. Kruskal-Wallis, $*p < 0,05$ ST comparado ao respectivo NO.

4.4 COMPORTAMENTO

O teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferença significativa entre os grupos analisados no teste de preferência pela sacarose (**Figura 24**), sugerindo que nenhum grupo apresentou anedonia. A ingestão líquida total também não foi significativamente diferente entre os grupos (dados não mostrados), indicando que a exposição à FLX durante a gestação e amamentação não influencia esse comportamento dos animais, nem a ingestão de líquidos dos mesmos.

Figura 24 - Preferência pela Sacarose de ratos machos e fêmeas adolescentes e adultos. CON, grupo controle; FLX, grupo fluoxetina.

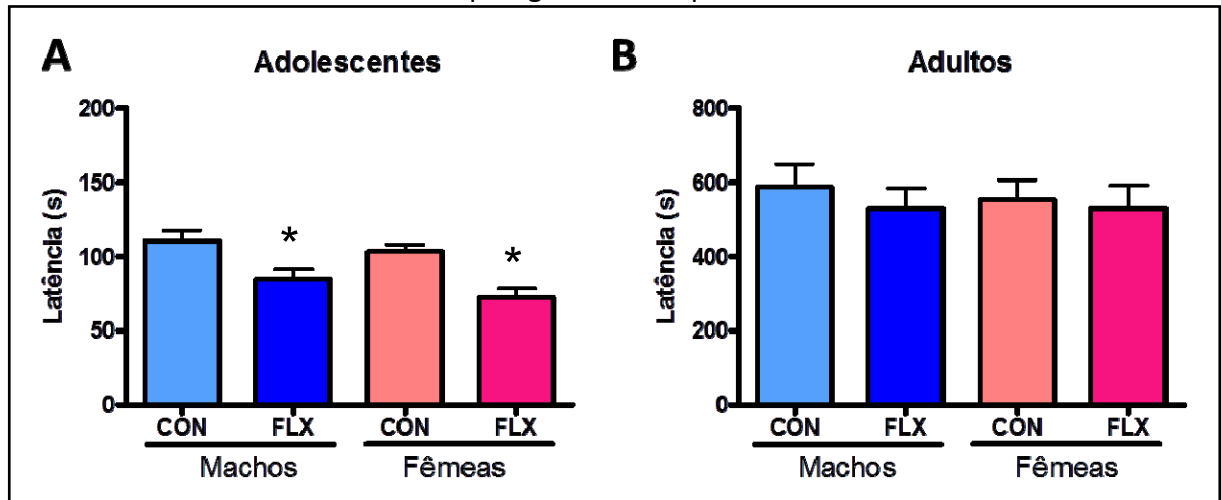


Dados são medianas \pm máximo/mínimo de 11-16 animais por grupo. Kruskal-Wallis, $p > 0,05$.

No teste de HIN, ANOVA fatorial (fatores: gênero e exposição) mostrou um efeito significativo da exposição à FLX na latência para se alimentar nos animais adolescentes. Tanto machos quanto fêmeas adolescentes expostos à FLX apresentaram menor latência para se alimentarem quando comparados aos grupos CON (**Figura 25A**). Não houve diferença no consumo de ração dos animais em suas respectivas gaiolas metabólicas (dados não mostrados) sugerindo que o efeito observado no HIN não pode ser atribuído a uma redução geral da ingestão alimentar nos animais expostos à FLX.

Em animais adultos, ANOVA fatorial não indicou qualquer efeito significativo na latência para se alimentar (**Figura 25B**).

Figura 25 - Latência para se alimentar de ratos machos e fêmeas adolescentes e adultos avaliados no teste de Hipofagia Induzida pela Novidade.



Dados são médias \pm EPM de 8-12 animais por grupo. ANOVA fatorial, * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo CON.

5 DISCUSSÃO

A ausência de efeito da FLX sobre o peso materno, número de filhotes nascidos vivos e mortos e peso dos filhotes ao nascimento e durante a lactação evidenciam que o regime de exposição à FLX utilizado neste trabalho não induziu toxicidade geral, o que é desejável em estudos que avaliam efeitos funcionais após exposição a drogas durante o desenvolvimento do organismo.

Analisando os dados da imuno-histoquímica em conjunto, vemos que há diferença de gênero na resposta de estresse. Os dados dos grupos CON nos indicam que fêmeas têm menor ativação neuronal do que machos em resposta ao estressor agudo de imobilização. Diferenças entre gêneros na resposta de estresse também foram descritas por Mitsushima et al. (MITSUSHIMA, YAMADA et al. 2006). Estes autores relataram que fêmeas possuem menos 5-HT basal na BLA quando comparadas aos machos, o que poderia estar relacionado à maior vulnerabilidade emocional das fêmeas. No entanto, quando expostas a um estressor agudo de contenção, fêmeas apresentam maior elevação nos níveis de 5-HT e dopamina na amígdala, sugerindo que fêmeas possuem diferenças quanto às conexões neurais do sistema de estresse, sendo naturalmente mais capazes de resolver uma situação estressante que os machos. Adicionalmente, diferenças nos níveis de 5-HT e dopamina basais no cérebro de machos e fêmeas também foram demonstradas (DUCHESNE, DUFRESNE et al. 2009).

O efeito da exposição à FLX sobre a expressão de Fos também se mostrou gênero dependente. Em linhas gerais, machos dos grupos FLX demonstraram menor ativação da amígdala pelo estressor, enquanto fêmeas dos grupos FLX demonstraram aumento de responsividade ao estressor, na mesma área. É interessante mencionar que, além de haver diferenças no sistema serotoninérgico de machos e fêmeas, como mencionado no parágrafo anterior, encontramos na literatura estudos que relatam em animais expostos perinatalmente à FLX diferenças funcionais distintas entre gêneros. Em estudos que avaliaram ambos os gêneros expostos à FLX (camundongos, 7,5mg/Kg/dia, gavagem, DG0 – DPN21), apenas as fêmeas apresentaram comportamento depressivo (LISBOA et al., 2007) e redução de respostas comportamentais mediadas pelo sistema dopaminérgico (FAVARO, COSTA et al. 2008). Exposição perinatal a outras classes de drogas que não atuam diretamente no sistema serotoninérgico também leva a diferenças gênero-específicas. Frieder

e Grimm (FRIEDER e GRIMM 1985) mostraram que a administração de diazepam perinatalmente (ratos, 10mg/Kg/dia, subcutâneo, DG8-14 ou GD14-20) altera diferentemente os níveis cerebrais de 5-HT em machos e fêmeas. Tomados em conjunto, estes fatos evidenciam não somente um sistema serotoninérgico naturalmente distinto mas que também responde diferentemente não só a manipulações do sistema serotoninérgico, mas também a manipulações de outros sistemas.

A amígdala projeta-se para o córtex medial pré-frontal e recebe deste outras projeções que modulam a sua atividade. Este circuito é responsável pelo estabelecimento de uma resposta flexível de estresse, de acordo com o contexto do agente estressor, levando a uma resposta *bottom-up*, caracterizada pelo controle da amígdala sobre o córtex, ou a uma resposta *top-down*, em que o córtex exerce controle inibitório sobre a amígdala (ARNSTEN 2009; ULRICH-LAI e HERMAN 2009; KIM, LOUCKS et al. 2011). Ambos os tipos de respostas são necessários para o indivíduo se adequar ao contexto do agente estressor, levando a uma resposta otimizada para cada situação e permitindo melhores chances de sobrevivência. Machos parecem apresentar predomínio de resposta *top-down*, enquanto fêmeas apresentam predomínio de resposta *bottom-up* de estresse, embora essas diferenças na regulação da circuitaria de estresse parecem culminar em efeitos psicofisiológicos similares, conforme hipotetizado em estudos com animais e humanos (MCEWEN 2007; LEBRON-MILAD, ABBS et al. 2012). Baseado em nossos dados, sugerimos que a exposição à FLX pode ter prejudicado a formação das conexões neurais entre a amígdala e o córtex pré-frontal alterando a regulação diferencial da resposta de estresse entre gêneros, desde que observamos neste estudo que machos expostos à FLX durante a gestação e amamentação apresentaram uma diminuição de responsividade ao estressor, em linhas gerais, enquanto as fêmeas tiveram um aumento nessa responsividade, quando comparados aos animais CON.

A MeA é um núcleo de saída da resposta de estresse na amígdala, projetando-se para outras áreas como o BNST e hipotálamo, e responde principalmente a agentes estressores psicológicos; ela sofre plasticidade através da experiência de eventos estressores durante a vida, e é classificada como um núcleo não cortical, assim como a CeA, ao passo que a BLA é classificada como um núcleo cortical (ROOZENDAAL, MCEWEN et al. 2009). Nota-se que a exposição à FLX alterou o circuito intra-amigdalár de resposta ao estresse nos machos, pois machos adolescentes apresentaram redução na ativação da BLA,

porém ativação da MeA normal, enquanto machos adultos apresentaram efeitos exatamente inversos, i.e., ativação da BLA normal e redução da ativação da MeA. Isto sugere que a exposição à FLX levou à alteração da circuitaria neural de estresse de maneira também dependente de idade.

Curiosamente, ratos machos adolescentes expostos à FLX (10mg/Kg/dia, subcutâneo, DG2-DG21) apresentam aumentam da expressão de 5-HTT na BLA e MeA, efeito que não aparece em machos adultos (CABRERA-VERA e BATTAGLIA 1998). Ainda mais, estresse tanto agudo como crônico induz a formação de espinhas dendríticas na BLA (ROOZENDAAL, MCEWEN et al. 2009) causando modificações permanentes na circuitaria intra-amigdalar, processo que também sofre modulação pela 5-HT (LESCH, BENGEL et al. 1996; HOMBERG, SCHUBERT et al. 2010). Portanto, se a exposição à FLX levou a reduzidos níveis de 5-HT na BLA e MeA pelo aumento da expressão do 5-HTT durante a adolescência, espera-se interferência nos processos de plasticidade da BLA e MeA, que dependem da formação de espinhos dendríticos em neurônios corticais, o que poderia prejudicar a formação de memórias relacionadas a eventos estressores. Assim, diminuição da atividade da BLA durante a adolescência poderia prejudicar a formação de memória a eventos estressores, o que, por sua vez, levaria à diminuição na resposta da MeA na idade adulta.

Em relação à CeA, nesse trabalho observamos que ela não respondeu ao estressor empregado. Existem evidências de que o cérebro é capaz de reconhecer duas classes principais de agentes estressores: os físicos, que são aqueles que causam ameaça direta à vida (como por exemplo, hemorragia ou infecção), e os psicológicos, que seriam aqueles que causam preocupação e ansiedade, mas não ameaçam imediatamente a vida do indivíduo (tais como provas e situações sociais embaraçosas) (JOELS e BARAM 2009). Embora exista debate sobre como modelar estes dois tipos de agentes estressores em animais, ou mesmo se existe essa diferenciação pelo cérebro, dados da literatura têm demonstrado que de fato protocolos de estressores diferentes levam a ativações distintas da circuitaria neural de estresse. Os resultados do nosso estudo corroboram os relatos de que a amígdala é capaz de diferenciar entre estressores psicológicos e físicos, sendo a CeA responsiva apenas a estressores físicos (DAYAS, BULLER et al. 2001).

O PVN também é um núcleo importante envolvido na resposta de estresse. Ele exerce controle sobre o eixo HPA e, por ser um dos principais controladores do eixo, recebe muitas projeções de várias áreas cerebrais, incluindo a amígdala, o BNST e o córtex

pré-frontal, que usualmente interagem com interneurônios inibitórios próximos ao PVN (HERMAN, TASKER et al. 2002). Regiões do sistema límbico e a amígdala, quando ativados, levam à desinibição do PVN, permitindo, assim, a ação do eixo HPA frente a um agente estressor. Já núcleos do tronco encefálico, como os núcleos da rafe e a área tegmental ventral, conectam-se diretamente ao PVN através de neurônios glutamatérgicos e o ativam diretamente em resposta a um evento estressor (HERMAN, TASKER et al. 2002). Neste estudo, observamos em todos os grupos experimentais aumento marcante na ativação deste núcleo frente ao estressor, comprovando a eficácia do protocolo utilizado, bem como a ausência de efeito da exposição à FLX na ativação do PVN. É possível que a 5-HT modifique algumas projeções para o PVN durante o desenvolvimento, mas como o PVN é um núcleo que integra várias respostas não só de estresse mas também endócrinas e também de outros comportamentos, como a ingestão alimentar, alterações sutis no seu funcionamento podem não resultar em efeitos funcionais aparentes. Entretanto, essas possíveis alterações do PVN poderiam aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento de patologias endócrinas ou neuropsiquiátricas. De fato, anormalidades de crescimento e ganho de peso têm sido relatadas em estudos com animais e humanos expostos a ISRSs durante a gravidez e lactação (GRZESKOWIAK, GILBERT et al. 2012).

Demonstramos a eficiência de nosso protocolo estressor tanto pela ativação do PVN quanto pelo aumento marcante nos níveis plasmáticos de corticosterona nos ratos estressados. No entanto, não observamos efeito da exposição à FLX durante a gestação e amamentação no aumento de corticosterona plasmática em resposta ao estressor. A 5-HT está intimamente relacionada não só com o desenvolvimento do eixo HPA, mas também com o seu funcionamento (MEANEY, DIORIO et al. 1994), e várias evidências de alterações no eixo HPA pela manipulação do sistema serotoninérgico são encontradas na literatura. Pesquisas clínicas têm demonstrado redução nos níveis basais de cortisol salivar em neonatos expostos a ISRSs (BRENNAN, PARGAS et al. 2008), bem como atenuação da resposta aguda de estresse (OBERLANDER, ECKSTEIN GRUNAU et al. 2002; GRUNAU, HOLSTI et al. 2005). Em ovelhas, a exposição à FLX na dose de 98,5 µg/Kg/dia, intravenoso, durante a gestação, resulta em aumento dos níveis plasmáticos de cortisol e outras alterações no comportamento dos fetos (MORRISON, RIGGS et al. 2004), e ratos expostos à FLX (5mg/Kg/dia, DPN1-21, através de minibombas osmóticas) têm níveis reduzidos de corticosterona plasmática em resposta ao estresse (ISHIWATA, SHIGA et al. 2005).

Em um elegante estudo, Pawluski et al. (PAWLUSKI, RAYEN et al. 2012) demonstraram redução nos níveis plasmáticos de corticosterona em ratos adolescentes (DPN 39-42) expostos à FLX durante o período lactacional (5mg/Kg/dia, através de mini-bombas osmóticas nas fêmeas lactantes), bem como redução na expressão de receptores para glicocorticóides no hipocampo destes animais. Estes efeitos não foram observados nos filhotes fêmeas, corroborando nossos resultados que evidenciam marcante diferença de gênero nos efeitos da exposição perinatal à FLX. Estes autores sugerem que a diferença em relação ao eixo HPA pode ser devida aos hormônios sexuais circulantes, pois outros trabalhos demonstraram modulação do eixo HPA pelo estradiol (VIAU e MEANEY 1991), porém ressaltam que esta diferença pode ser neural, desde que machos e fêmeas apresentam diferentes níveis de 5-HT em várias regiões cerebrais (DUCHESNE, DUFRESNE et al. 2009). Como não observamos nenhum efeito da exposição à FLX na intensidade de ativação do PVN pelo estressor de imobilização, o fato de não encontrarmos alterações nos níveis circulantes de corticosterona seria esperado. Contudo, é importante notar que neste trabalho, a via de administração e o período de exposição empregados foram diferentes do protocolo utilizado por Pawluski et al., o que pode explicar a discrepância de resultados entre os dois estudos. Também é importante mencionar que, durante a análise exploratória dos dados, observamos uma aparente redução nos níveis plasmáticos de corticosterona em resposta ao estressor em machos adolescentes expostos à FLX, mas a análise estatística dos dados não apontou diferença significativa. É possível que, aumentando a amostragem dos grupos para tentarmos reduzir a variabilidade dos dados, possamos encontrar diferenças significativas.

Em relação aos comportamentos analisados neste estudo, a exposição à FLX não influenciou a capacidade de sentir prazer dos animais, mas reduziu comportamento ansiedade/depressivo símile em machos e fêmeas adolescentes. A anedonia é um sintoma da depressão, caracterizada pela incapacidade de sentir prazer, e tem sido mimetizada em alguns modelos animais como, por exemplo, o teste de preferência pela sacarose, que possui validade de constructo (i.e., animais expostos a fatores que levam a depressão apresentam anedonia neste teste) e de face (i.e., é capaz de mimetizar um sintoma observado em pessoas com depressão). A ausência de anedonia observada nesse estudo pela exposição à FLX está de acordo com trabalhos na literatura realizados com camundongos nocaute para 5-HTT (KALUEFF, GALLAGHER et al. 2006; KALUEFF, OLIVIER et

al. 2010), que também se desenvolvem na presença de níveis aumentados de 5-HT. Sabe-se que animais expostos perinatalmente à FLX apresentam distúrbios do sistema de recompensa (BEARER, ZHANG et al. 2009), mas não está claro se esta alteração resulta em aumento da atividade do circuito, ou em diminuição.

No teste de HIN temos uma situação comportamental complexa, em que se presume que o animal estará motivado, pela fome, a se aproximar do alimento, mas a localização da comida em um local desprotegido em uma arena desconhecida induz conflito no animal, e, conseqüentemente, ansiedade. De fato, o potencial anti-conflito de várias drogas tem demonstrado estar positivamente correlacionado com a eficácia clínica destes fármacos como ansiolíticos (COOK e SEPINWALL 1975). Além disso, como a habilidade em resolver conflitos está implicada na etiologia da depressão (uma maior habilidade em resolver conflitos reflete uma melhor resolução de situações estressoras), o teste de HIN também tem sido empregado para a avaliação de drogas antidepressivas. Assim sendo, através da mensuração da latência para se alimentar, comportamentos ansiedade e depressivo símiles podem ser avaliados. A redução da latência para ingestão de ração observada em animais adolescentes expostos à FLX sugerem, portanto, que esses animais apresentam redução dos comportamentos ansiedade/depressão símiles. Efeitos similares foram descritos em camundongos fêmeas adultos (DPN 73-83) avaliadas nos testes de labirinto em cruz elevado e nado forçado, após exposição à FLX (25mg/Kg/dia, água de beber, DG15-DPN12) (MCALLISTER, KIRYANOVA et al. 2012) e outro autor relata que não há efeito da exposição à FLX durante a gestação no comportamento de ratos machos e fêmeas adultos, avaliados em vários testes comportamentais, utilizando regime de exposição com doses variando de 1-12mg/Kg/dia, gavagem, GD7-GD20 (VORHEES, ACUFF-SMITH et al. 1994). Entretanto, aumento de comportamentos similares a ansiedade e depressão também têm sido relatados após exposição a níveis elevados de 5-HT durante o desenvolvimento, em roedores (ANSORGE, ZHOU et al. 2004; LISBOA, OLIVEIRA et al. 2007; POPA, LENA et al. 2008; HOMBERG, SCHUBERT et al. 2010; OLIVIER, VALLES et al. 2011).

A aparente inconsistência dos efeitos relatados nos estudos que avaliaram ansiedade e depressão em animais expostos perinatalmente à FLX ou a outros ISRSs podem ser decorrentes de diferenças quanto aos protocolos de exposição, como o uso de diferentes doses, via de administração, período de tratamento, gênero, espécie animal utilizada ou teste comportamental realizado. Entretanto, também devemos considerar que tanto

ansiedade quanto depressão são doenças neuropsiquiátricas que envolvem uma miríade de sintomas (KRISHNAN e NESTLER 2008) e os parâmetros avaliados nos modelos animais refletem apenas alguns deles. Assim sendo, torna-se difícil tirar conclusões acerca dos efeitos da exposição perinatal a níveis aumentados de 5-HT em relação a esses comportamentos.

Finalmente, em relação ao teste de HIN, é digno de nota que a resposta dos animais neste teste também pode estar relacionada à impulsividade. O tempo que o animal leva para se aproximar do alimento poderia ser dirigido não pela maior habilidade em resolver o conflito, mas sim pela maior impulsividade do animal, ou seja, uma maior predisposição a assumir riscos. Seguindo este raciocínio, no teste de HIN, se o animal for mais impulsivo, ele apresentará menor latência para se alimentar. Embasando esta ideia, em nosso estudo, observamos um tempo de 5 a 6 vezes maior nos animais adultos em relação aos animais adolescentes, sabidamente mais impulsivos (LAVIOLA, MACRI et al. 2003). Assim sendo, nesse momento, não temos como afirmar se os resultados observados nos animais adolescentes do grupo FLX (i.e., redução da latência para alimentação) refletem aumento de impulsividade ou redução de comportamentos ansiedade/depressão símiles.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O impacto da exposição perinatal a ISRSs é uma preocupação crescente, 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. Experimentos conduzidos em roedores e ovelhas para avaliar o efeito da exposição perinatal a ISRSs revelaram alterações neurocomportamentais, no feto e 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 resposta alterada de estresse, durante a adolescência. No entanto, aparentemente estes efeitos são transitórios, pois não se manifestaram na idade adulta. Nós também observamos que, comparadas aos machos, as fêmeas exibem diferenças importantes na resposta de estresse, indicando uma diferença de conexões neurais envolvidas na resposta de estresse entre machos e fêmeas. Adicionalmente, desfechos da exposição perinatal à FLX representam uma interconexão entre fatores psicológicos, genéticos, farmacológicos e ambientais, tornando difícil o estabelecimento de um “efeito principal” desta exposição, e as implicações clínicas e importância destes efeitos deverão ser determinadas futuramente. É importante ressaltar que a extrapolação dos resultados para definir a segurança da FLX em relação à neurotoxicidade do desenvolvimento para humanos é uma tarefa complexa, pois muitos fatores podem interferir nos estudos experimentais, que interagem de maneira complexa para determinar o funcionamento do organismo do indivíduo na fase adulta.

Ainda há muito trabalho a ser feito para compreender totalmente o papel da exposição perinatal aos ISRSs no contexto do desenvolvimento, e os impactos que essa exposição, somada a alterações do humor materno, poderia ter posteriormente na vida do indivíduo.

7 CONCLUSÕES

A exposição à FLX durante a gestação e amamentação leva, de acordo com nosso estudo, a:

- Diminuição do conflito em machos e fêmeas adolescentes avaliado no teste de HIN;
- Nenhuma alteração do comportamento de anedonia avaliada no teste de preferência pela sacarose;
- Nenhuma alteração estatisticamente significativa nos níveis plasmáticos de corticosterona em resposta ao estressor agudo de imobilização; porém observamos uma tendência biológica à redução nos níveis plasmáticos de corticosterona em machos adolescentes;
- Redução na ativação induzida por estressor da amígdala basolateral em ratos machos adolescentes e da amígdala medial em machos adultos.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, C., D. POPA, et al. (2006). Early life blockade of 5-hydroxytryptamine 1A receptors normalizes sleep and depression-like behavior in adult knock-out mice lacking the serotonin transporter. J Neurosci **26**(20): 5554-64.
- ANSORGE, M. S., E. MORELLI, et al. (2008). Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. J Neurosci **28**(1): 199-207.
- ANSORGE, M. S., M. ZHOU, et al. (2004). Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. Science **306**(5697): 879-81.
- ARNSTEN, A. F. (2009). Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. Nat Rev Neurosci **10**(6): 410-22.
- AUSTIN, M. P., S. KILDEA, et al. (2007). Maternal mortality and psychiatric morbidity in the perinatal period: challenges and opportunities for prevention in the Australian setting. Med J Aust **186**(7): 364-7.
- BEARER, E. L., X. ZHANG, et al. (2009). Reward circuitry is perturbed in the absence of the serotonin transporter. Neuroimage **46**(4): 1091-104.
- BODNOFF, S. R., B. E. SURANYI-CADOTTE, et al. (1989). Role of the central benzodiazepine receptor system in behavioral habituation to novelty. Behav Neurosci **103**(1): 209-12.
- BONNIN, A. and P. LEVITT (2011). Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. Neuroscience **197**: 1-7.
- BRENNAN, P. A., R. PARGAS, et al. (2008). Maternal depression and infant cortisol: influences of timing, comorbidity and treatment. J Child Psychol Psychiatry **49**(10): 1099-107.
- CABRERA-VERA, T. M. and G. BATTAGLIA (1998). 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 **286**(3): 1474-81.
- CHAOULOFF, F., O. BERTON, et al. (1999). Serotonin and stress. Neuropsychopharmacology **21**(2 Suppl): 28S-32S.
- COOK, L. and J. SEPINWALL (1975). Behavior analysis of the effects and mechanisms of action of benzodiazepines. Psychopharmacol Bull **11**(4): 53-5.
- DAYAS, C. V., K. M. BULLER, et al. (2001). Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. Eur J Neurosci **14**(7): 1143-52.
- DUCHESNE, A., M. M. DUFRESNE, et al. (2009). Sex differences in corticolimbic dopamine and serotonin systems in the rat and the effect of postnatal handling. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **33**(2): 251-61.

- DULAWA, S. C. and R. HEN (2005). Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. Neurosci Biobehav Rev **29**(4-5): 771-83.
- ELIAS, P. C., L. L. ELIAS, et al. (2004). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis up-regulation in rats submitted to pituitary stalk compression. J Endocrinol **180**(2): 297-302.
- ESSEX, M. J., W. T. BOYCE, et al. (2002). The confluence of mental, physical, social, and academic difficulties in middle childhood. II: developing the MacArthur health and Behavior Questionnaire. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **41**(5): 588-603.
- FAVARO, P. N., L. C. COSTA, et al. (2008). Maternal fluoxetine treatment decreases behavioral response to dopaminergic drugs in female pups. Neurotoxicol Teratol **30**(6): 487-94.
- FIGUEIREDO, H. F., C. M. DOLGAS, et al. (2002). Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus. Endocrinology **143**(7): 2534-40.
- FRIEDER, B. and V. E. GRIMM (1985). Some long-lasting neurochemical effects of prenatal or early postnatal exposure to diazepam. J Neurochem **45**(1): 37-42.
- GENTILE, S. (2011). Neurodevelopmental effects of prenatal exposure to psychotropic medications. Depress Anxiety **27**(7): 675-86.
- GERARDIN, D. C., O. C. PEREIRA, et al. (2005). Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. Physiol Behav **84**(1): 97-104.
- GLUCKMAN, P. D., M. A. HANSON, et al. (2008). Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. N Engl J Med **359**(1): 61-73.
- GOUVEA, T. S., H. K. MORIMOTO, et al. (2008). Maternal exposure to the antidepressant fluoxetine impairs sexual motivation in adult male mice. Pharmacol Biochem Behav **90**(3): 416-9.
- GRUNAU, R. E., L. HOLSTI, et al. (2005). Neonatal procedural pain exposure predicts lower cortisol and behavioral reactivity in preterm infants in the NICU. Pain **113**(3): 293-300.
- GRZESKOWIAK, L. E., A. L. GILBERT, et al. (2012). Long term impact of prenatal exposure to SSRIs on growth and body weight in childhood: evidence from animal and human studies. Reprod Toxicol **34**(1): 101-9.
- HANSEN, H. H., C. SANCHEZ, et al. (1997). 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? J Pharmacol Exp Ther **283**(3): 1333-41.
- HEIKKINEN, T., U. EKBLAD, et al. (2003). Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. Clin Pharmacol Ther **73**(4): 330-7.

HENDRICK, V., Z. N. STOWE, et al. (2003). Placental passage of antidepressant medications. Am J Psychiatry **160**(5): 993-6.

HENDRICK, V., Z. N. STOWE, et al. (2001). Fluoxetine and norfluoxetine concentrations in nursing infants and breast milk. Biol Psychiatry **50**(10): 775-82.

HERMAN, J. P., J. G. TASKER, et al. (2002). Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration: glutamate-GABA connections. Pharmacol Biochem Behav **71**(3): 457-68.

HOLMES, A. and A. R. HARIRI (2003). The serotonin transporter gene-linked polymorphism and negative emotionality: placing single gene effects in the context of genetic background and environment. Genes Brain Behav **2**(6): 332-5.

HOLMES, A., D. L. MURPHY, et al. (2002). Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter. Psychopharmacology (Berl) **161**(2): 160-7.

HOMBERG, J. R., S. F. DE BOER, et al. (2008). Adaptations in pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor function and cocaine supersensitivity in serotonin transporter knockout rats. Psychopharmacology (Berl) **200**(3): 367-80.

HOMBERG, J. R., O. J. SCHIEPERS, et al. (2007). Acute and constitutive increases in central serotonin levels reduce social play behaviour in peri-adolescent rats. Psychopharmacology (Berl) **195**(2): 175-82.

HOMBERG, J. R., D. SCHUBERT, et al. (2010). New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. Trends Pharmacol Sci **31**(2): 60-5.

IQBAL, M., M. C. AUDETTE, et al. (2012). Placental drug transporters and their role in fetal protection. Placenta **33**(3): 137-42.

ISHIWATA, H., T. SHIGA, et al. (2005). Selective serotonin reuptake inhibitor treatment of early postnatal mice reverses their prenatal stress-induced brain dysfunction. Neuroscience **133**(4): 893-901.

JOELS, M. and T. Z. BARAM (2009). The neuro-symphony of stress. Nat Rev Neurosci **10**(6): 459-66.

KALUEFF, A. V., M. A. FOX, et al. (2007). Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. Genes Brain Behav **6**(4): 389-400.

KALUEFF, A. V., P. S. GALLAGHER, et al. (2006). Are serotonin transporter knockout mice 'depressed'? : hypoactivity but no anhedonia. Neuroreport **17**(12): 1347-51.

KALUEFF, A. V., J. D. OLIVIER, et al. (2010). Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes. Neurosci Biobehav Rev **34**(3): 373-86.

KAPOOR, A., S. PETROPOULOS, et al. (2008). Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. Brain Res Rev **57**(2): 586-95.

- KESSLER, R. C., P. BERGLUND, et al. (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. Arch Gen Psychiatry **62**(6): 593-602.
- KIM, M. J., R. A. LOUCKS, et al. (2011). The structural and functional connectivity of the amygdala: from normal emotion to pathological anxiety. Behav Brain Res **223**(2): 403-10.
- KIYASOVA, V. and P. GASPARD (2011). Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance. Eur J Neurosci **34**(10): 1553-62.
- KRISHNAN, V. and E. J. NESTLER (2008). The molecular neurobiology of depression. Nature **455**(7215): 894-902.
- LATTIMORE, K. A., S. M. DONN, et al. (2005). Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) use during pregnancy and effects on the fetus and newborn: a meta-analysis. J Perinatol **25**(9): 595-604.
- LAUDER, J. M. (1990). Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. Ann N Y Acad Sci **600**: 297-313; discussion 314.
- LAVIOLA, G., S. MACRI, et al. (2003). Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. Neurosci Biobehav Rev **27**(1-2): 19-31.
- LEBRON-MILAD, K., B. ABBS, et al. (2012). Sex differences in the neurobiology of fear conditioning and extinction: a preliminary fMRI study of shared sex differences with stress-arousal circuitry. Biol Mood Anxiety Disord **2**(1): 7.
- LESCH, K. P., D. BENDEL, et al. (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. Science **274**(5292): 1527-31.
- LISBOA, S. F., P. E. OLIVEIRA, et al. (2007). Behavioral evaluation of male and female mice pups exposed to fluoxetine during pregnancy and lactation. Pharmacology **80**(1): 49-56.
- LUPIEN, S. J., B. S. MCEWEN, et al. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. Nat Rev Neurosci **10**(6): 434-45.
- MCALLISTER, B. B., V. KIRYANOVA, et al. (2012). Behavioural outcomes of perinatal maternal fluoxetine treatment. Neuroscience **226**: 356-66.
- MCEWEN, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. Physiol Rev **87**(3): 873-904.
- MCEWEN, B. S. (2012). Brain on stress: How the social environment gets under the skin. Proc Natl Acad Sci U S A.
- MEANEY, M. J., J. DIORIO, et al. (1994). Environmental regulation of the development of glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. The role of serotonin. Ann N Y Acad Sci **746**: 260-73; discussion 274, 289-93.

MITSUSHIMA, D., K. YAMADA, et al. (2006). Sex differences in the basolateral amygdala: the extracellular levels of serotonin and dopamine, and their responses to restraint stress in rats. Eur J Neurosci **24**(11): 3245-54.

MORGAN, J. I. and T. CURRAN (1995). Proto-oncogenes: beyond second messengers. Psychopharmacology: the fourth generation of progress. New York, New York: Raven Press: 631-642.

MORRISON, J. L., K. W. RIGGS, et al. (2004). Chronic maternal fluoxetine infusion in pregnant sheep: effects on the maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes. Pediatr Res **56**(1): 40-6.

MOSIENKO, V., B. BERT, et al. (2012). Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. Transl Psychiatry **2**: e122.

NONACS, R. and L. S. COHEN (2003). Assessment and treatment of depression during pregnancy: an update. Psychiatr Clin North Am **26**(3): 547-62.

OBERLANDER, T. F., R. ECKSTEIN GRUNAU, et al. (2002). Prolonged prenatal psychotropic medication exposure alters neonatal acute pain response. Pediatr Res **51**(4): 443-53.

OLIVIER, J. D., L. A. JANS, et al. (2009). Serotonin transporter deficiency in rats contributes to impaired object memory. Genes Brain Behav **8**(8): 829-34.

OLIVIER, J. D., A. VALLES, et al. (2011). Fluoxetine administration to pregnant rats increases anxiety-related behavior in the offspring. Psychopharmacology (Berl) **217**(3): 419-32.

OLIVIER, J. D., M. G. VAN DER HART, et al. (2008). A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders. Neuroscience **152**(3): 573-84.

PAWLUSKI, J. L., I. RAYEN, et al. (2012). Developmental fluoxetine exposure differentially alters central and peripheral measures of the HPA system in adolescent male and female offspring. Neuroscience **220**: 131-41.

POHLAND, R. C., T. K. BYRD, et al. (1989). Placental transfer and fetal distribution of fluoxetine in the rat. Toxicol Appl Pharmacol **98**(2): 198-205.

POPA, D., C. LENA, et al. (2008). Lasting syndrome of depression produced by reduction in serotonin uptake during postnatal development: evidence from sleep, stress, and behavior. J Neurosci **28**(14): 3546-54.

RAYMOND, J. R., Y. V. MUKHIN, et al. (2001). Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. Pharmacol Ther **92**(2-3): 179-212.

ROMEO, R. D. and B. S. MCEWEN (2006). Stress and the adolescent brain. Ann N Y Acad Sci **1094**: 202-14.

ROOZENDAAL, B., B. S. MCEWEN, et al. (2009). Stress, memory and the amygdala. Nat Rev Neurosci **10**(6): 423-33.

SINCLAIR, K. D., R. G. LEA, et al. (2007). The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. Soc Reprod Fertil Suppl **64**: 425-43.

SURI, R., Z. N. STOWE, et al. (2002). Estimates of nursing infant daily dose of fluoxetine through breast milk. Biol Psychiatry **52**(5): 446-51.

SWAAB, D. F., A. M. BAO, et al. (2005). The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. Ageing Res Rev **4**(2): 141-94.

UHER, R. (2008). The implications of gene-environment interactions in depression: will cause inform cure? Mol Psychiatry **13**(12): 1070-8.

ULRICH-LAI, Y. M. and J. P. HERMAN (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. Nat Rev Neurosci **10**(6): 397-409.

VIAU, V. and M. J. MEANEY (1991). Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. Endocrinology **129**(5): 2503-11.

VORHEES, C. V., K. D. ACUFF-SMITH, et al. (1994). A developmental neurotoxicity evaluation of the effects of prenatal exposure to fluoxetine in rats. Fundam Appl Toxicol **23**(2): 194-205.

WEISS, B. (1990). Risk assessment: the insidious nature of neurotoxicity and the aging brain. Neurotoxicology **11**(2): 305-13.

WHITAKER-AZMITIA, P. M., M. DRUSE, et al. (1996). Serotonin as a developmental signal. Behav Brain Res **73**(1-2): 19-29.

WONG, D. T., J. S. HORNG, et al. (1974). A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. Life Sci **15**(3): 471-9.

YUEN, E. Y., Q. JIANG, et al. (2005). Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. J Neurosci **25**(23): 5488-501.

ZHONG, P., E. Y. YUEN, et al. (2008). Modulation of neuronal excitability by serotonin-NMDA interactions in prefrontal cortex. Mol Cell Neurosci **38**(2): 290-9.