



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO

CAROLINA CADETE LUCENA CAVALCANTI

**USO DE FLUOXETINA OU DE RESVERATROL EM RATOS JOVENS
SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA MATERNA: ESTUDO
COMPORTAMENTAL E MOLECULAR**

Recife

2022

CAROLINA CADETE LUCENA CAVALCANTI

**USO DE FLUOXETINA OU DE RESVERATROL EM RATOS JOVENS
SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA MATERNA: ESTUDO
COMPORTAMENTAL E MOLECULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutora. Área de concentração: Neurociências

Orientador: Raul Manhães de Castro. Professor Titular Emérito do Departamento de Nutrição - UFPE.

Coorientadora: Raquel da Silva Aragão. Professora Adjunta C-III do Centro Acadêmico da Vitória - UFPE.

Recife

2022

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

C224u Cavalcanti, Carolina Cadete Lucena
 Uso de fluoxetina ou de resveratrol em ratos jovens submetidos à
 dieta hiperlipídica materna: estudo comportamental e molecular / Carolina
 Cadete Lucena Cavalcanti. - 2022.
 183 p. : il.

Orientador: Raul Manhães de Castro.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
 Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e
 Ciências do Comportamento. Recife, 2022.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Nutrição materna. 2. Ansiedade. 3. Inflamação. 4. Serotonina. 5.
 Polifenóis. I. Castro, Raul Manhães de (Orientador). II. Título.

612 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023-106)

CAROLINA CADETE LUCENA CAVALCANTI

**USO DE FLUOXETINA OU DE RESVERATROL EM RATOS JOVENS
SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA MATERNA: ESTUDO
COMPORTAMENTAL E MOLECULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Neuropsiquiatria e Ciências do
Comportamento da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do título de doutora. Área de
concentração: Neurociências

Tese aprovada em 31/05/2022

Profa. Dra. Sandra Lopes de Souza
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Profa. Dra. Lígia Cristina Monteiro Galindo
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Profa. Dra. Tássia Karin Ferreira Borba
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Julliet Araújo de Souza
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. Omar Guzmán Quevedo
Instituto Tecnológico Superior de Tacámbaro (ITST)

RECIFE

2022

Dedico este estudo aos meus pais (Durval e Danielle), ao meu irmão bípede (Victor Dituíto) e ao meu irmão quadrúpede (Wintinho), minha família amada.

AGRADECIMENTOS

Existe uma lei na matemática conhecida como “lei dos números realmente grandes”. Ela afirma que, se há alguma possibilidade de que algo aconteça, independentemente de quão pequena seja a probabilidade, deve acontecer em algum momento. É uma maneira bonita de dizer que tudo é por acaso. Apesar de acreditar no acaso, apenas 50% de mim concorda com essa afirmação. Os outros 50% preferem acreditar – na falta de uma palavra melhor – em “destino”. Posso até não saber “quem” me trouxe até o grupo de pesquisa “Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica”, mas sei que esta jornada foi muito importante como profissional e como pessoa. Como tenho que agradecer a muita gente, talvez estas palavras excedam duas páginas.

Ao meu pai (**Durval**) que, com seu jeito pouco sentimental, mas muito adorável, sempre me estendeu a mão quando eu mais precisei. Nunca me esquecerei do dia em que você sentou ao meu lado e me deixou chorar. Você sabia que eu não queria escutar palavras de consolo, mas tinha certeza que eu não deveria passar por aquele momento sozinha. Muito obrigada, Pozozinho! A minha mãezinha (**Danielle**) por acreditar em mim todos os dias. De tanto você falar das minhas conquistas com sorriso nos olhos, eu vou acabar acreditando nas suas palavras tão doces. Obrigada por escutar todas as minhas histórias com a atenção de quem assiste a um capítulo decisivo de uma novela. Você sempre está pronta para me ouvir contar o que de bom e de ruim aconteceu no meu dia. Por isso, eu sei que não estou sozinha. Ao meu **irmão bípede (Victor Dituito)** que sempre consegue me roubar um sorriso de orelha a orelha ao falar de direito – bem, o sorriso não é exatamente pelo tema da conversa, porque eu não entendo um décimo do que é dito, mas pelo entusiasmo compartilhado nesses pequenos momentos. Você é uma inspiração quando o assunto é amar o que faz. Antes de passar para o próximo da lista, queria agradecer por todo apoio que você me deu em 2019/2020, quando eu experienciei a pior crise depressiva da minha – não tão curta, mas não tão longa assim – vida. Você ama dizer que me salvou, mas não foi bem assim... Ao meu **irmãozinho de quatro patinhas (Wintinho)**, o integrante mais especial dessa família linda. **Pequeninho**, você veio para deixar tudo melhor – sabe quando a letra de uma música encontra a melodia perfeita? Foi exatamente o que aconteceu. Lembro-me bem do dia em que você chegou a nossa casa. Sua alegria de ter encontrado um lar – em 15 de julho de 2005 – é um dos meus momentos preferidos, daqueles que sempre guardarei comigo no meu baú de lembranças. Agradeço também a minha cunhada, **Camila**, por sempre estar disposta a escutar meus desabafos ou ouvir os meus “surtos” de ex-fã.

A minha **Tia Norminha** por manter as portas de seu laboratório abertas. Obrigada por me incentivar a ser mais corajosa e proativa e por me dizer que eu não preciso ter medo de pedir ajuda.

A **Cristelbinha**, o braço direito de mainha. Agradeço por você cuidar tão bem de todos nós. Depois de Vovó Denise, você é a melhor cozinheira que conheço. Infelizmente, não posso dizer o mesmo sobre o seu talento para o canto. Nem eu nem você seríamos aceitas em um concurso musical. Uma é desafinada e a outra não sabe seguir o ritmo.

A **Rinaldo, o Homem de Crachá sempre no bolso**, que me trouxe até o grupo do professor Raul.

Ao Professor **Raul Manhães de Castro** por me dar a oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa e por compartilhar comigo o apreço por poetas como Mario Quintana. Nunca me esquecerei do dia em que conheci o senhor na sala do professor Everton. Seria esse encontro consequência do destino ou do acaso? Ou seria uma mistura dos dois?

A Professora **Raquel(is) Aragão** por desbravar mais essa aventura comigo. É estranho pensar que já faz DEZ anos que nos conhecemos – sim, eu entrei no laboratório em 2012. De lá para cá, vivemos tantas coisas, né? Eu vi você defender o doutorado e se tornar professora efetiva, você me viu terminar a graduação, passar pelo mestrado e chegar ao doutorado. Eu vi você se apaixonar, casar e se tornar mãe de um quadrúpede (Pie) e de duas crianças lindas, você me viu superar algumas manias do TOC e foi uma das poucas a receber um exemplar da antologia “Conto Brasil” com um texto meu. Eu coloquei Valentina para dormir com minha linda voz, você me “colocou” para apresentar um resumo na frente de mais de 200 pessoas. Você me presenteou com uma caneca de Gregory House, eu fiz um livrinho infantil para comemorar o primeiro ano da pequena Titina. Eu vi você entrar na pós-graduação como orientadora de mestrado (e agora doutorado), você esteve na publicação do “meu” artigo. Eu escutei você pedir para eu abrir as mãos inúmeras vezes, você me ouviu desabafar em momentos muito difíceis. São tantos momentos que guardo na minha agendinha de “passados” que, se eu quiser viajar no tempo, terei mil e um lugares para visitar. Obrigada por todos e por cada um deles. Para finalizar, compartilho o trecho que escrevi em um dos meus contos como forma de agradecer tudo o que você fez por mim: **“O ‘Abra as mãos’ tornou-se aquela canção que todo bom músico compõe ao olhar para trás e perceber que a vida continua; que as recordações podem ganhar novos significados e, por isso, novas cores”**.

Aos membros da banca (**Tássia Borba, Lígia Galindo, Julliet Araújo, Sandra Lopes, Omar Quevedo, Ana Elisa Toscano e Isabeli Pinheiro**) pelas contribuições. Depois de ler tantas vezes, é impossível enxergar todos os erros e todas as fraquezas do estudo.

Aproveito a deixa para agradecer a professora (e amiga) **Tássia Borba. Tassinha**, obrigada pelos sete (até agora) anos de amizade. É sempre muito bom conversar contigo sobre todos os assuntos da vida. Sempre tenho muito a aprender. Parabéns pela aprovação no concurso. Como eu já disse uma vez, sua aula sobre comportamento alimentar é – sem sombra de dúvida – a melhor aula que já assisti na vida. Nunca se esqueça de que é “às vezes, a felicidade está na simplicidade de ser o momento”, como a Menina e a Bailarina nos ensinaram alguns anos atrás. A professora **Claudia Lagranha** e aos seus estudantes, **Daniele** e **Osmar**, por nos ajudarem a fazer o PCR. **Dani**, a gente sofreu tanto com essas corridas, né? Cada dia um problema diferente para resolver – foram tantos que o desânimo batia à nossa porta constantemente (somos clientes fieis agora) –, mas, como diria Fernando Sabino, “No final dá tudo certo, e se não deu é porque ainda não chegou ao fim”.

Ao veterinário **Edeones França** por me ensinar sobre o cuidado para com os animais e por me fazer lembrar – diariamente – que toda a vida deve ser respeitada. Agradeço também aos funcionários do departamento de nutrição, principalmente **Douglas** e **Joelma**, por nos darem todo o suporte necessário para que o dia-a-dia no biotério fosse menos cansativo. Acho que devo um garrafão de água ao departamento de tanto que pedi um copo de água para vocês na época em que tudo estava fechado por conta da pandemia.

A mi dúo de viveros y amiga de toda la vida, **Erika Cadena**, por enseñarme tanto en los últimos siete años, especialmente sobre organización y compromiso. También te agradezco por ser la “voz de la razón” en momentos en que la emoción no me dejaba ver lo obvio. Gracias por escuchar siempre lo que tengo que decir y por ayudarme cuando no sé qué hacer. ¡Eres una figura materna (en la flor de la vida) que me ha dado la escuela de posgrado! Espero que me inviten a todos los cumpleaños de mi amado sobrino tan pronto como pase la pandemia. Extrañando mi “ecuatossileiro” favorito (mi Martintín)! ¡Tiene mucho que aprender de mí (jajajaja)!

A **Thaynan Oliveira** por dividir comigo a mesma estrada desde a graduação. A gente aprendeu tanto uma com a outra, né? É verdade que nos desentendemos algumas (poucas) vezes, mas não nos afastamos, nem deixamos de nos falar. Fizemos o contrário, conversamos e nos entendemos. Aceitamos o outro como ele é – sem tirar nem pôr – ao mesmo tempo em que refletimos sobre nossos deslizes e tentamos melhorar, evoluir. Eu, por exemplo, nunca mais anotei o peso por cima (hahahahaha). Agora, coloco um asterisco e anoto o valor correto no final da página.

A **Wenicios Chaves** que – apesar de ser mais novo que eu – carrega dentro de si certa maturidade quando o assunto é fazer pesquisa. Agradeço pela paciência e pela compreensão,

por entender que em alguns momentos eu não estava na minha melhor condição – emocionalmente falando, quero dizer. Obrigada também por sempre organizar junto comigo e com **Luana Olegário** as inúmeras confraternizações que inventamos de fazer nos dois anos que formamos o trio “perfeito, sem defeito”. Qualquer desculpa servia para comprar comida nada saudável. Quer dizer, não sei se posso dizer “nada saudável”, afinal, o pippós é vitaminado, né? (hahahaha). P.S.: a violeta genciana ainda está por toda parte do CANON e nas fichas de controle do biotério. Esse marcador é um perigo!

Ao jovem **Henrique Josué** pelo “intensivo de rap, parte II”. Infelizmente, não foi dessa vez que aprendi a gostar desse estilo musical. Sinto muito (hahahaha)! Agradeço também pelas conversas sem sentido que, apesar de não nos levarem a lugar algum, me fizeram rir um bocado. Os papos cabeças, no entanto, não ficaram de fora do repertório, mas o tempo destinado a eles se restringiu apenas as horas vagas (brincadeirinha!).

Aos colegas de laboratório (**Bárbara Rodrigues, Carolina Ramos, Débora Oliveira, Jacqueline Silva, Luana Olegário, Renata Santos e Sabrina Pereira**) por tornarem o meu dia-a-dia muito mais alegre. Agradeço por todos os bons momentos que vivemos até então. Estarão sempre guardados no meu baú de memórias para que eu possa revisitá-los sempre que precisar. P.S.: **Barbie**, eu sempre me lembrarei das vezes que você me ajudava em dia de experimento. Alguma coisa tinha que dar errado – não houve uma exceção – para nos fazer rir.

As estagiárias, **Riclenya Alves** e **Thamyris Silva**, por dividirem comigo as tarefas do laboratório. Sem vocês, teria sido muito mais cansativo. Foi um presente poder conhecê-las nos intervalos dos experimentos. Estarei sempre na torcida pelos sonhos que vocês quiserem alcançar. Agradeço também a **Álvaro Nascimento** por quebrar o galho quando as meninas não estavam livres. Você é um menino de ouro, **Alvarenha**. Não posso deixar de comentar que nossas conversas sobre matemática deixavam os dias 100% melhores.

As minhas espiãs demais (**Maria Clara** e **Mariane**), a Alex e a Clover da minha Sam, por todos os momentos que compartilhamos nos últimos sete anos. Conhecer vocês foi uma das melhores coisas que o mestrado me proporcionou. Nunca se esqueçam de que “fazer drama é muito bom! É essencial!” (hahahaha).

As minhas amigas D-I-V-I-N-A-S (**Tamarela, Julleba, Bebels, Yanis, e Pamellada**) por estarem comigo nos bons e nos maus momentos, nos dias de sorrir e nos dias de chorar, por compartilharem palavras de consolo ou o som do silêncio, por entenderem que a distância não mede o carinho e que o tempo passa, mas os laços permanecem.

As minhas amigas do colégio (**Quemilla, Sarah e Ana Carolina**) por sempre me incentivarem a seguir os meus sonhos e por me lembrarem de que o importante é não desistir. Nos momentos em que me senti desanimada, poder contar com vocês me ajudou a seguir em frente. **Quemilla**, conversar contigo sobre matemática e física nos últimos anos foi maravilhoso. Saber que o caminho mais curto percorrido pela luz nem sempre é uma linha reta ou que o gato de Schrödinger é uma sobreposição de dois estados me faz perguntar todo o dia “o que mais eu não sei?”.

As minhas amigas de infância (**Carol, Bibi e Bru**) por sempre se fazerem presentes de alguma forma. Não conseguimos nos encontrar muitas vezes nos últimos anos, mas o tempo que passamos juntas foi eternamente feliz. São mais de vinte anos de amizade e eu só tenho a agradecer por todas as coisas que aprendi com vocês. **Carol**, obrigada por me estender a mão quando eu mais precisei em 2019/2020. Você foi essencial para que eu me sentisse melhor. Agradeço por todas as palavras de incentivo e de apoio que me ajudaram a não deixar de acreditar.

As minhas amigas “canceladas” (**Andoreza, Anuka, Bianquis, Gracy, Izzy e Miline**) por me fazerem rir mais frequentemente nos últimos dois anos, principalmente, nos momentos em que manter o otimismo tornou-se uma tarefa difícil.

Ao meu psiquiatra, **José Waldo Câmara**, e a minha psicóloga, **Amanda Sales**, por me acompanharem nessa batalha épica contra o T.O.C. desde 2010-2011, principalmente quando ele planejou um ataque surpresa em 2018. Sem vocês, a estrada teria sido muito mais tortuosa.

A **Arte**, em todas as suas formas, por me devolver um pouco da esperança que a vida insistiu em roubar nos últimos cinco anos. Por isso, deixo registrado neste pequeno espaço o nome dos melhores livros e das mais encantadoras produções televisivas que li e assisti durante essa jornada: “Os mistérios dos números”, “O teorema do papagaio”, “O poder do pensamento matemático”, “A história de nós dois”, “Sapato florido”, “Alex no país dos números”, “Os mistérios matemáticos do Professor Stewart”, “A coragem de ser imperfeito”, “A padaria dos finais felizes”, “Acaso: como a matemática explica as coincidências da vida”, “Almanaque das curiosidades matemáticas”, “Ruby red”, “Espelho da vida”, “Além da ilusão” (mais especificamente, Tenóvia), “Hospital playlist”, “100 days my Prince”, “Terius behind me”, “My Mister”, “Mr. Sunshine”, “Life on mars”, “Come and hug me”, “The crowned clown”, “Special labor inspector Jo”, “Moment at eighteen”, “Mystic pop-up bar”, “Find me in your memory”, “The red sleeve”, “Twenty-five, twenty one” e “School 2021”.

E ao **Céu** que, para mim, é fonte inesgotável de aconchego.

“Que ninguém se desespere, mesmo que na noite mais escura a última estrela de esperança desapareça” (SCHILLER, [18--?], n.p.).

RESUMO

A exposição materna a dieta hiperlipídica durante os períodos de gestação e de lactação pode alterar o comportamento relacionado à ansiedade e a responsividade do sistema serotoninérgico da prole a tratamento medicamentoso ou fitoterápico pós-desmame. Por isto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do uso crônico de fluoxetina ou de resveratrol durante o período pós-desmame sobre o comportamento relacionado à ansiedade e sobre a expressão do sistema serotoninérgico em ratos adulto-jovens expostos à dieta hiperlipídica materna. Foram utilizadas 27 ratas da linhagem Wistar. Após a confirmação da gestação, as fêmeas foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta recebida durante a gestação e a lactação: Controle (CTR=13) e Hiperlipídico/hipercalórico (HH=14). O peso corporal e o eixo longitudinal dos filhotes foram registrados a cada quatro dias durante a lactação e no 28º, 35º, 42º, 49º e 56º dia de vida pós-natal. Na nona semana pós-natal, os grupos CTR e HH foram subdivididos em quatro subgrupos, de acordo com a manipulação farmacológica recebida durante dezessete dias: salina (via i.p.), fluoxetina (10 mg/kg, via i.p.), etanol (via oral) ou resveratrol (50 mg/L, via oral). Considerando as duas manipulações, foram formados oito grupos experimentais: Controle – Salina (CTRS, n=14); Controle – Fluoxetina (CTRF, n=15); Controle – Etanol (CTRE=14); Controle – Resveratrol (CTRR=14); Hiperlipídico/Hipercalórico – Salina (HHS, n=15); Hiperlipídico/Hipercalórico – Fluoxetina (HHF, n=15); Hiperlipídico/Hipercalórico – Etanol (HHE, n=16) e Hiperlipídico/Hipercalórico – Resveratrol (HHR, n=16). Os filhotes foram avaliados no campo aberto (CA), *staircase* (SC) e labirinto elevado em cruz (LEC). A expressão de genes foi avaliada no tronco encefálico. O grupo HHS apresentou menor número de entradas nos braços fechados, maior expressão de *Il6*, *Tph2* e do receptor *5ht2a* do que o grupo CTRS. Com relação à administração de fluoxetina, o grupo CTRF apresentou aumento na distância percorrida, diminuição no tempo de imobilidade, aumento no tempo em *grooming* e aumento na expressão de *Il6*, *Bdnf*, *Tph2* e dos receptores *5ht1a* e *5ht2a* quando comparado ao grupo CTRS. De maneira semelhante, o grupo HHF apresentou aumento na distância percorrida, no número de *rearing*, expressão reduzida de *Il6*, aumentada *Tph2* quando comparado ao grupo HHS. Ademais, o grupo HHE passou mais tempo e maior porcentagem de tempo na área central no labirinto quando comparado ao grupo CTRE. Em suma, a exposição à dieta aumentou a expressão de fatores associados ao estresse, enquanto a administração crônica de fluoxetina levou à hiperatividade e ao aumento no comportamento relacionado à ansiedade. A oferta de resveratrol, por outro lado, recuperou o comportamento emocional, induzido pela

exposição materna à dieta hiperlipídica nos períodos de gestação e de lactação, no grupo HHE.

Palavras-chaves: nutrição materna; ansiedade; inflamação; serotonina; polifenol.

ABSTRACT

Maternal exposure to a high-fat diet during pregnancy and lactation periods can alter anxiety-related behavior and the responsiveness of the serotonergic system to post-weaning drug or herbal treatment. This study aimed to evaluate the effects of chronic use of fluoxetine or resveratrol during the post-weaning period on anxiety-related behavior and on the expression of the serotonergic system in young adult rats exposed to maternal high-fat diet. Twenty-seven female Wistar rats were used. After confirmation of pregnancy, the females were divided into two groups according to the diet received during pregnancy and lactation: Control (CTR=13) and High-fat/high-caloric (HH=14). The body weight and longitudinal axis of the pups were recorded every four days during lactation and on the 28th, 35th, 42nd, 49th and 56th day of postnatal life. The body weight and longitudinal axis of the pups were recorded every four days during lactation and on the 28th, 35th, 42nd, 49th and 56th day of postnatal life. In the ninth postnatal week, the CTR and HH groups were subdivided into four subgroups, according to the pharmacological manipulation received during seventeen days: saline (i.p.), fluoxetine (10 mg/kg, i.p.), ethanol (orally) or resveratrol (50 mg/L, orally). Considering the two manipulations, eight experimental groups were formed: Control – Saline (CTRS, n=14); Control – Fluoxetine (CTRF, n=15); Control – Ethanol (CTRE=14); Control – Resveratrol (CTRR=14); High-fat/high-caloric – Saline (HHS, n=15); High-fat/high-caloric – Fluoxetine (HHF, n=15); High-fat/high-caloric – Ethanol (HHE, n=16) and High-fat/high-caloric – Resveratrol (HHR, n=16). Pups were evaluated in the open field (OF), staircase (SC) and elevated plus maze (EPM). Gene expression was evaluated in the brain stem. The HHS group had a lower number of entries in the closed arms, higher expression of *Il6*, *Tph2* and *5ht2a* receptor than the CTRS group. Regarding fluoxetine administration, the CTRF group showed an increase in the distance covered, a decrease in immobility time, an increase in grooming time and an increase in the expression of *Il6*, *Bdnf*, *Tph2* and *5ht1a* and *5ht2a* receptors when compared to the CTRS group. Similarly, the HHF group showed an increase in the distance covered, in the number of rearing, decreased expression of *Il6* and increased *Tph2* when compared to the HHS group. Furthermore, the HHE group spent more time and a higher percentage of time in the central area of the maze when compared to the CTRE group. In summary, exposure to diet increased the expression of factors associated with stress, while chronic administration of fluoxetine led to hyperactivity and an increase in anxiety-related behavior. The supply of resveratrol, on the other hand, recovered the emotional behavior induced by maternal exposure to a high-fat diet during pregnancy and lactation in the HHE group.

Keywords: maternal nutrition; inflammation; anxiety; serotonin; polyphenol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Influência da exposição materna à dieta hiperlipídica sobre o comportamento relacionado à ansiedade da prole
- Figura 2 – Influência da exposição materna à dieta hiperlipídica sobre a atividade locomotora da prole
- Figura 3 – Biossíntese de serotonina
- Figura 4 – Degradação de serotonina
- Figura 5 – Influência dos receptores serotoninérgicos sobre o comportamento relacionado à ansiedade
- Figura 6 – Biossíntese de resveratrol
- Figura 7 – Desenho experimental
- Figura 8 – Campo aberto
- Figura 9 – *Scaircase*
- Figura 10 – Labirinto elevado em cruz
- Figura 11 – Efeitos da exposição materna à dieta hiperlipídica/hipercalórica e da administração crônica de fluoxetina sobre o comportamento e sobre a expressão gênica do tronco cerebral
- Figura 12 – Peso corporal e eixo longitudinal durante a lactação
- Figura 13 – Peso corporal e eixo longitudinal pós-desmame/pré-tratamento
- Figura 14 – Peso corporal pós-desmame/tratamento
- Figura 15 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 59) no campo aberto durante 15 minutos
- Figura 16 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 59) no *staircase* durante três minutos
- Figura 17 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 59) no labirinto elevado em cruz durante cinco minutos
- Figura 18 – Análise da expressão gênica
- Figura 19 – Efeitos da exposição materna à dieta hiperlipídica/hipercalórica e da administração crônica de resveratrol sobre o comportamento relacionado à ansiedade
- Figura 20 – Peso corporal e eixo longitudinal durante a lactação
- Figura 21 – Peso corporal e eixo longitudinal pós-desmame/pré-tratamento
- Figura 22 – Peso corporal pós-desmame/tratamento

Figura 23 – Consumo de resveratrol

Figura 24 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 60) no labirinto elevado em cruz durante cinco minutos

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Composição de macronutrientes
- Tabela 2 – Sequência de prime RT-qPCR
- Tabela 3 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 59)
no campo aberto durante 15 minutos
- Tabela 4 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 59)
no *staircase* durante três minutos
- Tabela 5 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 59)
no labirinto elevado em cruz durante cinco minutos
- Tabela 6 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 60)
no campo aberto durante 15 minutos
- Tabela 7 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 60)
no *staircase* durante três minutos
- Tabela 8 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 60)
no labirinto elevado em cruz durante cinco minutos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-araquidonilglicerol
4CL	4-cumarato:CoA ligase
5-HIAA	5-hidroxi-3-indolacético
5-HIAL	5-hidroxi-3-indolacetaldeído
5-HT	Serotonina
AA	Ácido araquidônico
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AEA	Anandamida
ALDH	Aldeído desidrogenase
BDNF	Fato neurotrófico derivado do cérebro
BG	Gânglios da base
C4H	Ácido cinâmico 4-hidroxilase
CA	Campo aberto
CACS	Estresse agudo-crônico combinado
CnF	Núcleo cuneiforme
CHS	Chalcona sintase
CPG	Gerador de padrão central
CTR	Controle
CTRE	Controle – Etanol
CTRF	Controle – Fluoxetina
CTRR	Controle – Resveratrol
CTRS	Controle – Salina
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CUS	Estresse crônico imprevisível
DA	Dopamina
DSM V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V
GR	Receptor glicocorticoide
HH	Hiperlipídico/hipercalórico
HHE	Hiperlipídico/hipercalórico – Etanol
HHF	Hiperlipídico/hipercalórico – Fluoxetina
HHR	Hiperlipídico/hipercalórico – Resveratrol

HHS	Hiperlipídico/hipercalórico – Salina
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HPC	Hipocampo ventral
Iba-1	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
IkB- α	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α</i>
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
i.p.	Intraperitoneal
ISRS	Inibidor seletivo de recaptação de serotonina
LEC	Labirinto elevado em cruz
MAO	Monoamina oxidase
MAO-A	Monoamina oxidase A
MAO-B	Monoamina oxidase B
miRNAs	Micro RNAs
MPk-1	<i>Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1</i>
MLR	Região locomotora mesencefálica
MR	Receptor mineralocorticoide
ncRNAs	Non-coding RNAs
NFk- β	Fator de transcrição nuclear kappa β
Nr3c1	Receptor glicocorticoide nuclear da subfamília-3-grupo-c-membro-1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAL	Fenilalanina amônia liase
PEA	Palmitoiletanolamida
PND	Dia pós-natal
PPN	Núcleo pedunculopontino
s.c.	Subcutânea
SC	<i>Staircase</i>
SCH	Modelo de hipotireoidismo subclínico
SCD	Sistema cerebral de defesa
SERT	Transportador de serotonina
SIC	Sistema de inibição comportamental
STS	Estilbeno sintase
TDS	Procedimento de sensibilização dependente do tempo
TNF- α	Fator de necrose tumoral α

TPH-2 Triptofano hidroxilase 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	ANSIEDADE	25
2.2	PLASTICIDADE FENOTÍPICA	34
2.3	DIETA HIPERLIPÍDICA MATERNA E COMPORTAMENTO RELACIONADO À ANSIEDADE	36
2.4	SISTEMA SEROTONINÉRGICO E COMPORTAMENTO RELACIONADO À ANSIEDADE	45
2.5	POLIFENOIS E COMPORTAMENTO RELACIONADO À ANSIEDADE	60
3	HIPÓTESE	69
4	OBJETIVOS	70
4.1	OBJETIVO GERAL	70
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	70
5	MATERIAIS E MÉTODOS	71
5.1	REVISÃO SISTEMÁTICA	71
5.2	QUESTÕES ÉTICAS	71
5.3	ANIMAIS	71
5.4	MANIPULAÇÃO NUTRICIONAL	72
5.5	AVALIAÇÕES SOMÁTICAS	72
5.5.1	Avaliação do peso corporal e do eixo longitudinal	72
5.6	MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA PÓS-DESMAME	73
5.6.1	Administração crônica de fluoxetina	73
5.6.2	Oferta de resveratrol	73
5.7	GRUPOS EXPERIMENTAIS	74
5.8	TESTES COMPORTAMENTAIS	74
5.8.1	Campo aberto	74
5.8.2	<i>Staircase</i>	75
5.8.3	Labirinto elevado em cruz	76
5.9	COLETA DE ESTRUTURAS	77
5.10	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	77

5.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	78
6	RESULTADOS	80
6.1	ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA	80
6.2	FLUOXETINA	109
6.2.1	Peso corporal e eixo longitudinal	109
6.2.1.1	Lactação	109
6.2.1.2	Pós-desmame/pré-tratamento	110
6.2.1.3	Pós-desmame/tratamento	111
6.2.2	Testes comportamentais	111
6.2.2.1	Campo aberto	111
6.2.2.2	<i>Staircase</i>	113
6.2.2.3	Labirinto elevado em cruz	115
6.2.2.4	Análise da expressão gênica	117
6.3	RESVERATROL	120
6.3.1	Peso corporal e eixo longitudinal	120
6.3.1.1	Lactação	120
6.3.1.2	Pós-desmame/pré-tratamento	121
6.3.1.3	Pós-desmame/tratamento	122
6.3.2	Consumo hídrico	122
6.3.3	Testes comportamentais	123
6.3.3.1	Campo aberto	123
6.3.3.2	<i>Staircase</i>	124
6.3.3.3	Labirinto elevado em cruz	125
7	DISCUSSÃO	128
7.1	FLUOXETINA	128
7.2	RESVERATROL	138
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	143
8.1	FLUOXETINA	143
8.1	RESVERATROL	143
	REFERÊNCIAS	144
	ANEXO A – PROTOCOLO REVISÃO SISTEMÁTICA	167
	ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA APROVADO	173
	ANEXO C – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO	174

1 INTRODUÇÃO

A transição nutricional observada no cenário mundial é caracterizada pelo aumento na ingestão de gorduras saturadas e açúcares refinados (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012). Ademais, ao mesmo tempo em que a prevalência dos índices de sobrepeso aumenta no Brasil e no mundo (SAÚDE, 2018), o mesmo acontece para a prevalência dos transtornos depressivos e de ansiedade (ORGANIZATION, 2017). Esses dados tornam-se ainda mais preocupantes quando associados à gestação, à lactação e à primeira infância, afinal, o início da vida é marcado por um conjunto de eventos importantes para o desenvolvimento da prole (DOBBING, 1966; RICE e BARONE, 2000; MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002; ANDERSEN e REVIEWS, 2003). É nesse intervalo de tempo que o sistema nervoso, por exemplo, passa por rápidas mudanças, sendo caracterizado por diversas fases: proliferação, migração e diferenciação celular, sinaptogênese, gliogênese, mielinização e apoptose (RICE e BARONE, 2000). Por isso, qualquer insulto que atue durante essa fase pode alterar a maneira como a prole se desenvolve (DOBBING, 1966; MORGANE *et al.*, 1993).

A nutrição materna balanceada, por exemplo, é essencial para o adequado desenvolvimento (físico, fisiológico e etológico) da prole (ARMITAGE *et al.*, 2004; ARMITAGE, TAYLOR e POSTON, 2005; BARKER, 2007; TAYLOR e POSTON, 2007). Por isso, é muito comum encontrar na literatura modelos experimentais que avaliam o papel de macro- e micronutrientes específicos sobre o bem-estar materno e da prole. A associação entre nutrição materna e inflamação – definida por Antonelli e Kushner (2017) como resposta imune inata a estímulos potencialmente prejudiciais, como patógenos, lesões e estresse metabólico –, por exemplo, é extensivamente discutida na literatura. Estudos em que a dieta hiperlipídica foi ofertada às fêmeas antes do acasalamento e/ou durante os períodos de gestação e/ou lactação encontraram aumento na expressão de mediadores pró-inflamatórios no perfil plasmático materno, na placenta e aumento no teor de gordura presente no leite (PURCELL *et al.*, 2011; REYNOLDS *et al.*, 2015). Na prole, por sua vez, a exposição à dieta hiperlipídica revelou aumento na expressão de fatores pró-inflamatórios, e alteração na expressão de alguns componentes dos sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos – fatores associados à hiperatividade e ao comportamento relacionado à ansiedade (SASAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016; LIPPERT *et al.*, 2020).

Nosso estudo inicial, por exemplo, revelou que machos adulto-jovens de dois grupos hiperlipídicos apresentaram maior emocionalidade – definida por Calvin Hall (1934) como o estado de ser emocional que consiste em um conjunto de reações orgânicas, experienciais e

expressivas que denotam um estado geral de perturbação ou excitação do animal – do que o grupo controle (CAVALCANTI *et al.*, 2021). Como esse aumento pode estar associado à perturbação do sistema serotoninérgico, duas intervenções, uma farmacológica e outra fitoterápica, são propostas pelo presente estudo a fim de diminuir o comportamento relacionado à ansiedade – efeito amplamente documentado na literatura (PRUT e BELZUNG, 2003; ZHU *et al.*, 2019). A primeira refere-se à administração crônica de fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação da serotonina (5-HT), que prolonga a disponibilidade da 5-HT na fenda sináptica (SGHENDO e MIFSUD, 2012). E a segunda refere-se ao resveratrol, um estilbeno que inibe a ação da Monoamina Oxidase A (MAO-A), enzima responsável pela degradação da serotonina (XU *et al.*, 2010). Como pôde ser observado, a fluoxetina e o resveratrol atuam sobre diferentes componentes do sistema serotoninérgico, tendo, no entanto, um objetivo em comum: manter a 5-HT na fenda sináptica por mais tempo (SGHENDO e MIFSUD, 2012).

Além disso, o presente estudo também se propõe a avaliar a responsividade do sistema serotoninérgico. Isso porque alguns artigos já demonstraram que o consumo de dieta hiperlipídica durante o período pós-desmame diminui a sensibilidade de ratos adultos à administração crônica de fármacos como escitalopran e fluoxetina (ISINGRINI *et al.*, 2010; ZEMDEGS *et al.*, 2016). A relação, no entanto, entre exposição materna à dieta hiperlipídica e responsividade do sistema serotoninérgico da descendência ainda não está completamente elucidada. Isso porque a literatura disponível, e que é de nosso conhecimento, avaliou apenas a consequência da aplicação aguda de fluoxetina. Entretanto, nossos resultados prévios demonstraram redução da sensibilidade apenas para um teste que avalia o comportamento relacionado à ansiedade-traço – estado emocional relativamente estável ao longo do tempo (GAMA *et al.*, 2008; TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2009; CAVALCANTI *et al.*, 2021). Em dois testes comportamentais relacionados à ansiedade-estado – condição passageira, de intensidade variável, experimentada em um momento particular do tempo –, a responsividade do sistema serotoninérgico dos grupos hiperlipídicos foi semelhante à resposta do grupo controle. Com relação ao resveratrol, não é de nosso conhecimento trabalhos que associem oferta de dieta hiperlipídica durante a gestação e/ou lactação e responsividade do sistema serotoninérgico da prole. Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar o comportamento e o sistema serotoninérgico de machos adulto-jovens expostos à dieta hiperlipídica/hipercalórica durante a gestação e a lactação após a administração crônica de fluoxetina ou de resveratrol.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ansiedade

Apesar de ser muito comum entre a população e incansavelmente estudada pela ciência, a ansiedade permanece, aos olhos dos pesquisadores, sem uma definição exata (GAMA *et al.*, 2008), sendo caracterizada por alguns como irreduzível e indefinível (LADER, 1972). Mesmo diante desse cenário conflituoso, em que a controvérsia é a protagonista da discussão, alguns estudiosos tentaram conceituá-la. Segundo Gentil e Neto (1996), a ansiedade é definida como um estado emocional desagradável acompanhado de desconforto somático (GENTIL, 1996). Esse estado emocional é geralmente direcionado ao futuro e, às vezes, considerado desproporcional a uma ameaça real (LADER, 1972; GENTIL, 1996). Embora seja caracterizada como desagradável, a ansiedade pode não ser patológica e/ou prejudicial (LEWIS, 1967), pois faz parte do espectro normal das emoções humanas (ANDRADE e GORENSTEIN, 1998). A ansiedade é vivenciada em situações corriqueiras ou específicas do dia a dia, não sendo persistentes ao longo do tempo, como ocorre nos transtornos de ansiedade (LEWIS, 1967).

Com relação aos sistemas encefálicos envolvidos na expressão da ansiedade tem-se o sistema cerebral de defesa (SDC) e o sistema de inibição comportamental (SIC) (SILVA, 2001; HETEM e GRAEFF, 2004). O SCD é um conjunto de estruturas nervosas, longitudinalmente organizadas, formado pela amígdala, pelo hipotálamo medial e pela matéria cinzenta periaquedutal (SILVA, 2001; HETEM e GRAEFF, 2004). A amígdala possui conexões com diversas regiões do cérebro, funcionando como interface sensório-emocional entre elas, analisando e classificando o tipo e o grau do estímulo recebido (SILVA, 2001; HETEM e GRAEFF, 2004). O resultado dessas avaliações é enviado ao hipotálamo medial e à matéria cinzenta periaquedutal, que selecionam e organizam reações comportamentais e fisiológicas de defesa apropriadas, através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (SILVA, 2001; HETEM e GRAEFF, 2004). O SIC, por sua vez, está localizado principalmente no sistema septo-hipocampal (SILVA, 2001; HETEM e GRAEFF, 2004). Em situações em que o estímulo não remete a uma situação esperada, o SIC opera de maneira a exibir comportamentos de esquiva, ao mesmo tempo em que aumenta a atenção ao meio e a vigilância em direção a estímulos considerados perigosos (SILVA, 2001; HETEM e GRAEFF, 2004).

Com relação à expressão da ansiedade é possível diferenciar quatro componentes (EDELMANN, 1992). São eles: cognitivo, comportamental, somático e emocional

(EDELMANN, 1992). O Cognitivo refere-se aos aspectos da percepção do indivíduo e da avaliação dos estímulos recebidos, como nervosismo, irritabilidade, mal-estar indefinido e insegurança (EDELMANN, 1992). O somático faz referência à excitabilidade do sistema nervoso autonômico, caracterizada, por exemplo, pelo aumento da frequência cardíaca e respiratória, aumento da sudorese, redução da salivação, maior tensão muscular e presença de tremores (LADER, 1972; EDELMANN, 1992; GENTIL, 1996). O comportamental pode ser percebido observando-se a expressão corporal, em comportamentos de esquiva (correr em pânico ou gritar), na gesticulação aumentada ou diminuída e nas mudanças de postura (LADER, 1972; EDELMANN, 1992). Segundo Lader (1972), as expressões faciais são o indicador mais óbvio da ansiedade (LADER, 1972). Por último, o componente emocional envolve sensações subjetivas de desconforto e desprazer, apresentadas como nós na garganta, senso de constrição no peito e dificuldade de concentração (LADER, 1972; EDELMANN, 1992; GENTIL, 1996). Como essas manifestações citadas acima não são específicas para a ansiedade – estando presente em emoções como esperança, medo e raiva – só é possível saber se alguém está ou não ansioso por dedução (LADER, 1972; GENTIL, 1996).

Quando a ansiedade se torna mais frequente, severa ou persistente do que o sujeito é acostumado ou pode tolerar, fazendo-o procurar por remédio ou por outro tipo de ajuda, ela passa a ser chamada de ansiedade-patológica (LADER, 1972). A ansiedade patológica está presente em vários quadros psiquiátricos definidos pelo DSM V (do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V*) (ASSOCIATION, 2014). No capítulo de transtornos de ansiedade, estão descritas as seguintes patologias: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobia específica, transtorno de ansiedade social, transtorno de pânico, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento, transtorno de ansiedade devido à outra condição médica e outros transtornos de ansiedade especificados (ASSOCIATION, 2014). Além disso, o transtorno bipolar, a esquizofrenia e os transtornos depressivos podem estar acompanhados de características ansiosas (ASSOCIATION, 2014).

No relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre prevalência e perda de saúde, observou-se que entre 2005 e 2015, o número de pessoas com transtorno de ansiedade aumentou 14,9%, atingindo 3,6% da população global (264 milhões de pessoas) (ORGANIZATION, 2017). Segundo a OMS, esse aumento está relacionado ao crescimento e ao envelhecimento populacional (ORGANIZATION, 2017). Além disso, o relatório destaca que os transtornos de ansiedade acometeram homens (2,6%) e mulheres (4,6%) em proporções diferentes (ORGANIZATION, 2017). Outro dado interessante trazido pelo estudo

mostra que a taxa de prevalência não variou substancialmente entre os grupos etários, apesar de haver menor tendência em grupos mais velhos (ORGANIZATION, 2017). Ademais, os transtornos de ansiedade aparecem em 6º lugar na listagem de doenças não fatais que contribuem para perda de saúde (ORGANIZATION, 2017). Em terras brasileiras, os transtornos de ansiedade alcançam 9,3% da população, mais de 18 milhões de pessoas (ORGANIZATION, 2017). Esse valor torna-se ainda mais alarmante quando comparado a outros países do continente americano (Paraguai – 7,6%; Chile, 6,5%; Uruguai – 6,4%; Argentina – 6,3%; EUA – 6,3%) (ORGANIZATION, 2017), pois o Brasil lidera a listagem com a maior porcentagem de pessoas que sofrem algum transtorno de ansiedade (ORGANIZATION, 2017).

Na tentativa de elucidar o fenômeno conhecido por ansiedade, foram desenvolvidos testes comportamentais para modelos animais capazes de detectar respostas fisiológicas e comportamentais semelhantes àquelas vivenciadas em situações ansiogênicas (HALL, 1934; HUGHES, 1965b; HUGHES, 1968; THIEBOT *et al.*, 1973; CRAWLEY e GOODWIN, 1980; PELLOW *et al.*, 1985; PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012). Entretanto, para serem considerados válidos os testes precisam ser validados para os critérios listados por Belzung e Griebel (2001) em uma revisão de literatura. São eles: validade preditiva, validade de face e validade do constructo (BELZUNG e GRIEBEL, 2001). Validade preditiva refere-se à eficiência de agentes farmacológicos usados na clínica (BELZUNG e GRIEBEL, 2001). O teste deve, portanto, ser capaz de identificar as diferentes respostas eliciadas por fármacos com propriedades opostas (BELZUNG e GRIEBEL, 2001). Apesar disso, é necessário ressaltar que as espécies não são iguais, podendo ser observadas diferenças na farmacocinética e na farmacodinâmica em resposta ao mesmo fármaco (BELZUNG e GRIEBEL, 2001). Validade de face, por sua vez, implica que a resposta relacionada à ansiedade observada em modelos animais deve ser idêntica a resposta comportamental e fisiológica exibida por seres humanos (BELZUNG e GRIEBEL, 2001). No entanto, como humanos e roedores, por exemplo, apresentam repertórios etológicos diferentes, é necessário levar-se em consideração que a história evolutiva das espécies é distinta (BELZUNG e GRIEBEL, 2001). Isso quer dizer que a seleção natural tem papel fundamental nos comportamentos adotados pelos seres vivos, adaptando-os ao ambiente da melhor maneira possível (BELZUNG e GRIEBEL, 2001). Por último, a validade do constructo está relacionada à semelhança entre a etiologia e os fatores biológicos subjacentes a ansiedade em animais e humanos (BELZUNG e GRIEBEL, 2001). Apesar de ambos estarem expostos a

perigos diferentes, o ponto chave desse critério é a ameaça do modelo à homeostasia do indivíduo (BELZUNG e GRIEBEL, 2001).

Com relação aos modelos experimentais capazes de detectar a ansiedade, destacam-se: campo aberto, labirinto elevado em cruz, caixa de transição claro-escuro, *staircase*, teste de enterrar bolinhas, *hole-board* e teste de neofobia alimentar (HALL, 1934; THIEBOT *et al.*, 1973; CRAWLEY e GOODWIN, 1980; PELLOW *et al.*, 1985; PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012). Nos cinco aparatos citados anteriormente, o comportamento relacionado à ansiedade é induzido expondo-se o animal a um ambiente desconhecido, sem qualquer relação com aquele onde ele foi mantido durante todo o seu desenvolvimento (TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2009; ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015). Antes de serem submetidos aos testes, entretanto, os animais podem passar por alguma manipulação experimental capaz de alterar o comportamento relacionado à ansiedade, como a manipulação nutricional, farmacológica ou de tamanho de ninhada (DIMITSANTOS *et al.*, 2007; SPENCER e TILBROOK, 2009; PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; AMODEO *et al.*, 2015; GRAY e HUGHES, 2015; MCNEILLY *et al.*, 2015). É importante salientar, no entanto, que existem outros modelos comportamentais disponíveis na literatura, sendo, por isso, necessário, escolher aquele(s) teste(s) que mais se adequa(m) ao que o estudo propõe.

O campo aberto (CA) é um modelo animal utilizado desde a primeira metade do século XX (HALL, 1934). Na época, o trabalho desenvolvido por Calvin Hall (1934) abordava a questão da “emocionalidade” e os parâmetros capazes de diferenciar estados fisiológicos distintos (número de defecações e urinações) (HALL, 1934). Da década de 30 para os dias atuais, inúmeros estudos foram realizados utilizando-se o aparato, aumentando o repertório de parâmetros avaliados (ROYCE, 1977; MARKEL, GALAKTIONOV IU e EFIMOV, 1988; CAROLA *et al.*, 2002) Novas medidas espaço-temporais (número de locomoções, tempo e frequência na área central e periférica) e características etológicas inéditas (*linking* e *grooming* – lambar/coçar, *rearing* – exploração vertical sobre duas patas, e *sniffing* – cheirar) foram adicionadas às análises, sendo úteis para interpretação mais clara do comportamento animal (ROYCE, 1977; MARKEL, GALAKTIONOV IU e EFIMOV, 1988; CAROLA *et al.*, 2002). Esses parâmetros, quando analisados juntos, ajudam a descrever as mais variadas dimensões do comportamento, como a atividade motora, a exploração do campo, a análise de risco, a tomada de decisão e o comportamento relacionado à ansiedade (MARKEL, GALAKTIONOV IU e EFIMOV, 1988; CAROLA *et al.*, 2002).

Alguns anos mais tarde, o labirinto elevado em cruz (LEC), baseado no aparato desenvolvido por Montgomery (1955) surgiu como novo modelo para análise do comportamento animal (PELLOW *et al.*, 1985). Montgomery baseou-se na aversão de roedores a espaços abertos e elevados (MONTGOMERY, 1955). A altura, no entanto, foi contestada por alguns trabalhos, afirmando-se que a distância do labirinto para o chão não é tão importante para o comportamento do animal (RODGERS e DALVI, 1997). Na verdade, foi demonstrado que um fator determinante para a resposta obtida é a altura das paredes dos braços fechados, pois elas funcionam como pistas para os roedores (RODGERS e DALVI, 1997). Antes dessas discussões, entretanto, em 1985, o LEC foi validado pelo elegante trabalho de Pellow e colaboradores (1985). Inicialmente, o teste também estava restrito aos parâmetros de espaço e tempo, como número de entradas e tempo gasto nos braços abertos e fechados do aparato (PELLOW *et al.*, 1985) e tempo despendido na área central (RODGERS e DALVI, 1997). Os parâmetros etológicos, como *head-dipping* (movimento descendente da cabeça para fora dos braços abertos), *stretching attend posture* (postura de alongamento), *sniffing* (cheirar), e *licking e grooming*, (lamber/coçar) foram adicionados posteriormente (BELZUNG e LE PAPE, 1994; CRUZ, FREI e GRAEFF, 1994; RODGERS e JOHNSON, 1995; ESPEJO, 1997; CAROLA *et al.*, 2002; CLEMENT *et al.*, 2007; WALF e FRYE, 2007). A análise conjunta desses parâmetros (espaço-temporais e etológicos) permitiu que o comportamento animal fosse destrinchado, sendo possível identificar a relação entre as medidas utilizadas e, assim, caracterizar o animal (BELZUNG e LE PAPE, 1994; CRUZ, FREI e GRAEFF, 1994; RODGERS e JOHNSON, 1995; ESPEJO, 1997; CAROLA *et al.*, 2002; CLEMENT *et al.*, 2007; WALF e FRYE, 2007). Ou seja, os critérios selecionados podem traduzir diferentes componentes do comportamento relacionado à ansiedade, o comportamento relacionado à ansiedade induzido pela novidade, a atividade geral, o comportamento exploratório e a tomada de decisão (BELZUNG e LE PAPE, 1994; CRUZ, FREI e GRAEFF, 1994; RODGERS e JOHNSON, 1995; ESPEJO, 1997; CAROLA *et al.*, 2002; CLEMENT *et al.*, 2007; WALF e FRYE, 2007). É importante ressaltar, entretanto, que a caracterização varia de trabalho para trabalho (BELZUNG e LE PAPE, 1994; CRUZ, FREI e GRAEFF, 1994; RODGERS e JOHNSON, 1995; ESPEJO, 1997; CAROLA *et al.*, 2002; CLEMENT *et al.*, 2007; WALF e FRYE, 2007).

Quase uma década depois, Boissier, Simon e Lwoff (1964) apresentaram a comunidade científica outro teste para avaliar o comportamental animal. Inicialmente, o *hole-board* consistia em uma placa pintada de preto, em que 24 furos de três centímetros de diâmetro estão espalhados por uma superfície de 1700 cm² – elevada acima do nível da mesa,

para que os furos pareçam infinitos (BOISSIER, SIMON e LWOFF, 1964). A latência até o primeiro *head-dip*, o tempo e o número de *head-dipping* durante um período de três minutos devem ser registrados (BOISSIER, SIMON e LWOFF, 1964). No entanto, a exploração só será considerada válida quando toda a cabeça do animal ultrapassar o furo (BOISSIER, SIMON e LWOFF, 1964). Além desses parâmetros, atualmente, também são contabilizados o número e o tempo em rearing e a distância percorrida (SAITOH *et al.*, 2006). Esse teste é baseado na suposição de que a atividade de *head-dipping* é inversamente proporcional ao comportamento relacionado à ansiedade (BILKEI-GORZO e GYERTYAN, 1996). Entretanto, o estudo de Bilkei-Gorzó e Gyertyan (1996) concluiu que essa relação inversa entre o comportamento emocional e o número de head-dip é verdadeira apenas em determinadas condições de estresse (BILKEI-GORZO e GYERTYAN, 1996). Em situações mais aversivas, quando o nível de emocionalidade dos animais é alto, o head-dipping pode representar uma tentativa de escapar do ambiente aversivo, e não indicar aumento na exploração (BILKEI-GORZO e GYERTYAN, 1996). Portanto, nesse caso, a relação entre o estado emocional e a atividade de head-dipping é diretamente e não inversamente proporcional (BILKEI-GORZO e GYERTYAN, 1996).

Mais de dez anos depois, outro aparato desenvolvido com objetivo de avaliar o comportamento animal foi o teste conhecido como “marble burying” (teste de enterrar bolinha, em tradução livre). Na verdade, a ação de enterrar como resposta de defesa foi observada primeiramente por Hudson, em 1950, ao alojar ratos em uma gaiola coberta por maravalha (PINEL e TREIT, 1978). Ele descobriu que esses animais usavam a maravalha para cobrir/enterrar estímulos associados ao choque (PINEL e TREIT, 1978). No entanto, esse achado não despertou interesse da comunidade científica na época. O primeiro estudo que, de fato, foi desenvolvido com objetivo de elucidar o que esse comportamento significava foi liderado por Pinel e Treit em 1978. Os autores descobriram que enterrar faz parte do repertório defensivo do rato, desde que o acesso a maravalha seja ilimitado (PINEL e TREIT, 1978). Na metodologia atual, os animais devem ser colocados em uma câmara plástica (45 x 30 x 40) contendo maravalha (5 cm de profundidade) e nove bolinhas de gude (de 2,3 cm de diâmetro) dispostas em três fileiras uniformemente espaçadas (YU *et al.*, 2019b). Após dez minutos de exposição ao teste, os animais devem ser retirados da câmara e o número de bolinhas enterradas, registrado (YU *et al.*, 2019b). O aumento no número de bolinhas enterradas sugere aumento no comportamento relacionado à ansiedade (YU *et al.*, 2019b).

Um quinto teste utilizado desde a década de 80 para avaliar o comportamento animal é a caixa de transição claro-escuro (CRAWLEY e GOODWIN, 1980). O aparato foi

inicialmente baseado na ideia de alterar a propensão relativa para explorar e recuar em um ambiente novo (CRAWLEY e GOODWIN, 1980). Ademais, apesar de os roedores noturnos, como ratos e camundongos, tenderem a explorar ambientes desconhecidos, espaços abertos parecem ter efeito aversivo que inibem a exploração desses animais (CRAWLEY e GOODWIN, 1980). Nesse caso, os parâmetros avaliados são: latência para entrar e tempo de permanência na área clara da caixa, número de transições entre claro e escuro e números de *rearings* (exploração vertical sobre duas patas) (CRAWLEY e GOODWIN, 1980; MISSLIN, BELZUNG e VOGEL, 1989; BELZUNG e LE PAPE, 1994; CLEMENT *et al.*, 2007). Belzung e Le Pape (1994) observaram que o número de transições e a exploração sobre duas patas e o tempo na área clara foram relacionados tanto à atividade do animal quanto à aversão ao ambiente claro (BELZUNG e LE PAPE, 1994). O estudo desenvolvido por Clément e colaboradores, por outro lado, sugere que o tempo gasto na área clara e a transição claro-escuro estão associados ao comportamento relacionado à ansiedade (CLEMENT *et al.*, 2007).

Além dos aparatos citados acima, o teste *staircase* (teste da escada, em tradução livre) é outro artefato utilizado nos estudos comportamentais com roedores (THIEBOT *et al.*, 1973; SIMIAND, KEANE e MORRE, 1984; LEPICARD *et al.*, 2000). Proposto inicialmente por Thiébot e colaboradores (1973), para ratos, o teste foi adaptado por outros estudiosos nas décadas seguintes para atender as necessidades dos animais utilizados (THIEBOT *et al.*, 1973). Uma versão para camundongos, por exemplo, foi pensada e validada por Simiand, Keane e Morre (1984). No trabalho pioneiro, os autores mostraram que quando o animal é colocado em uma escada fechada pela primeira vez, os ansiolíticos diminuíram o número de *rearing* sem reduzir, no entanto, o número de degraus escalados (THIEBOT *et al.*, 1973). Embasado nesses resultados, foi proposto que o número de *rearing* poderia ser usado como índice de ansiedade e o número de degraus como índice de exploração e locomoção (THIEBOT *et al.*, 1973). De maneira semelhante, o grupo de Simiand (1984) também sugeriu que o *Staircase* é um método primário válido para avaliar o comportamento relacionado à ansiedade do animal (SIMIAND, KEANE e MORRE, 1984). No estudo, o uso de benzodiazepinas também diminuiu o número *rearing* sem alterar a quantidade de degraus subidos (SIMIAND, KEANE e MORRE, 1984). Em outro trabalho, contudo, o número de *rearings* foi definido de forma diferente, sendo discutido no tópico exploração, locomoção e atividade vertical (LEPICARD *et al.*, 2000). Apesar disso, os autores sugerem que a redução da locomoção e da exploração podem indicar alta “emocionalidade” ou ansiedade (LEPICARD *et al.*, 2000).

Por fim, outra opção disponível para analisar o comportamento do animal, expondo-o a novidade, é o teste de neofobia alimentar, descrito pelo trabalho de Peleg-Raibstein e colaboradores (2012). O aparato consiste em uma gaiola-padrão modificada, em que a resposta do animal é avaliada para o consumo de dieta padrão e de um item alimentar desconhecido (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012). Para isso, os autores cronometraram o tempo gasto para o primeiro contato voluntário com o alimento e o tempo necessário para consumi-lo (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012). Ademais, a diferença entre os tempos, a latência líquida, foi calculada e utilizada como índice de neofobia alimentar (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012). Esse parâmetro pode indicar aumento no comportamento relacionado à ansiedade quando o valor para o alimento novo é superior ao obtido para o alimento familiar (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012).

Quanto aos aparatos desenvolvidos para mensuração da ansiedade-traço, o paradigma da exploração livre (PEL) é o mais conhecido (HUGHES, 1965a; 1968). Desenvolvido por Hughes (1965a), o aparelho foi construído com objetivo de separar a resposta do animal ao ambiente a que foi exposto daquela relacionada exclusivamente a condição avaliada (HUGHES, 1965a). No caso do citado trabalho, o autor pretendeu avaliar a influência da privação alimentar sobre a atividade locomotora do rato branco (HUGHES, 1965a). A caixa de Hughes, como ficou conhecida por alguns, não obriga o animal a enfrentar o desconhecido, e sim permite que ele escolha entre um ambiente novo ou familiar (HUGHES, 1965a). Na época, os parâmetros adotados pelo autor foram: número total de unidades entradas, porcentagem de unidades entradas no ambiente novo e o número de períodos de 10 segundos no ambiente novo (HUGHES, 1965a). O mesmo pesquisador também avaliou posteriormente (1968), o número de *sniffings* (cheirar), *rearings* (exploração vertical sobre duas patas), *grooming* (lamber/coçar), *eating* (comer) e *drinking* (beber), e *freezing* (congelar) (HUGHES, 1968). Todos os parâmetros citados anteriormente foram utilizados para analisar a locomoção e a preferência do rato pelo ambiente novo (HUGHES, 1968). Quase duas décadas depois, Griebel e colaboradores (1993) sugeriram que o aparato desenvolvido por Hughes poderia ser um método eficiente para estudar a ansiedade-traço (GRIEBEL *et al.*, 1993). Para isso, os parâmetros utilizados foram: número de urinações e defecações, número de unidades “entradas”, tentativas de aproximação do ambiente novo, tempo gasto nas áreas familiar e nova e número de *rearing* (exploração vertical sobre duas patas) (GRIEBEL *et al.*, 1993). Em estudo mais recente sobre os componentes de análise, Clément e colaboradores (2007) sugeriram que o PEL poderia fornecer informações sobre o comportamento relacionado à

ansiedade através de quatro componentes (CLEMENT *et al.*, 2007). São eles: ansiedade induzida pela novidade, atividade geral, comportamento exploratório e tomada de decisão (CLEMENT *et al.*, 2007).

Além do paradigma, a ansiedade-traço pode ser avaliada utilizando-se diferentes linhagens de camundongo *knock-out* (BELZUNG e GRIEBEL, 2001). Infelizmente, esses modelos genéticos são baseados na deleção de um único gene, o que não reflete a complexidade do fenômeno conhecido por ansiedade (BELZUNG e GRIEBEL, 2001). Isso porque já foi observado que a modulação da ansiedade envolve múltiplos genes (BELZUNG e GRIEBEL, 2001). Outra opção é usar linhagens de camundongos espontaneamente mais emocionais, como a BALB/c; ou selecionar os indivíduos que apresentaram maiores níveis de ansiedade previamente (BELZUNG e GRIEBEL, 2001).

No que diz respeito aos fatores que influenciam a expressão do comportamento relacionado à ansiedade, estímulos, tanto externos quanto internos, são decisivos para a resposta do animal (LADER, 1972; GENTIL, 1996; KALIN *et al.*, 2005; DAVIS, 2006; CLEMENT *et al.*, 2007; GOES, ANTUNES e TEIXEIRA-SILVA, 2015). Como já foram observadas em pesquisas com roedores, primatas e humanos, as características genéticas que o animal carrega em seu DNA, as condições do ambiente em que vive e as experiências prévias armazenadas na memória são fundamentais para a resposta do indivíduo aos insultos que recebe (LADER, 1972; GENTIL, 1996; KALIN *et al.*, 2005; DAVIS, 2006; CLEMENT *et al.*, 2007; DIMITSANTOS *et al.*, 2007; GOES, ANTUNES e TEIXEIRA-SILVA, 2015). Com relação ao DNA, o background genético (pool de genes) indica em um primeiro momento a suscetibilidade que o animal tem a ser mais ou menos emocional. Além disso, o meio onde o indivíduo está inserido, levando-se em consideração características como a disponibilidade de água e comida, a competição por alimento e a presença de predadores são de indiscutível importância para seu desenvolvimento (HOLMES *et al.*, 2005; DIMITSANTOS *et al.*, 2007; ROSEBOOM *et al.*, 2007; CHAHOUD e PAUMGARTTEN, 2009). Ademais, a exposição do animal a situações de recompensa ou punição são capazes de moldar a resposta do indivíduo a circunstâncias futuras (CHORPITA e BARLOW, 1998; BORELLI *et al.*, 2004; HOLMES *et al.*, 2005). Somado a esses estímulos, a capacidade que o animal tem de adaptar-se ao meio (resiliência) é extremamente importante para o seu melhor desempenho frente aos desafios que virão (ANDRADE e GORENSTEIN, 1998; ENDLER e KOCOVSKI, 2001; BERNIK e CORREGIARI, 2002).

2.2 Plasticidade fenotípica

Define-se como plasticidade fenotípica a capacidade que um genótipo tem de produzir fenótipos diferentes ao ser exposto a condições ambientais variadas (FORDYCE, 2006). A janela crítica (ou período sensível), por sua vez, refere-se aos períodos do desenvolvimento em que um fenótipo é especialmente plástico e pode ser influenciado por uma ampla variedade de fatores intrínsecos ou extrínsecos (ambientais) (MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002; BURGGREN e MUELLER, 2015). Portanto, a exposição a esses insultos durante o início da vida pode alterar a trajetória de desenvolvimento da prole e afetar aspectos morfológicos, fisiológicos e comportamentais, assim como sua história de vida (MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002; VICKERS, 2014; BURGGREN e MUELLER, 2015; SOMMER, 2020). Os mecanismos pelos quais esses fatores ambientais precoces podem ter efeitos de longo prazo, no entanto, ainda não estão completamente elucidados (VICKERS, 2014). Até o momento, esses mecanismos incluem alterações estruturais permanentes nos órgãos, causadas por níveis abaixo do ideal de um fator importante; alterações na expressão gênica, causadas por modificações epigenéticas; e alterações permanentes no envelhecimento (VICKERS, 2014).

A regulação epigenética pode ser feita através de três mecanismos diferentes que estão correlacionados – metilação de DNA, modificação de histonas e RNAs não codificantes (ncRNA) – e não envolve alterações no sequenciamento do DNA (VICKERS, 2014; DESAI, JELLYMAN e ROSS, 2015). Se por um lado, a expressão de certos tipos de ncRNAs é controlada pela metilação do DNA e pelas modificações na cromatina (VICKERS, 2014; DESAI, JELLYMAN e ROSS, 2015), por outro, os ncRNAs podem afetar a maquinaria da metilação e a expressão de proteínas envolvidas nas modificações das histonas (VICKERS, 2014). A metilação do DNA é caracterizada pela adição de um grupo metil, catalisada por uma família de DNA metiltransferases (DNMTs), ao quinto carbono do anel de pirimidina de uma base de citosina – pertencente a um par de nucleotídeos citosina-fosfato-guanina (CpG) – e silencia os genes, inibindo a sua expressão (MOORE, LE e FAN, 2013; BIANCO-MIOTTO *et al.*, 2017; JANG *et al.*, 2017; LAUBACH *et al.*, 2018). Essa regulação é feita através do recrutamento de proteínas envolvidas na repressão gênica ou pela inibição da ligação do(s) fator(es) de transcrição ao DNA (MOORE, LE e FAN, 2013). A modificação de histonas, por sua vez, é uma alteração estrutural chave que pode afetar a expressão gênica, principalmente, por meio da metilação ou da acetilação – um grupo metil ou acetil é adicionado, respectivamente, à estrutura da molécula – e acarreta na inibição ou exacerbação do gene

envolvido, dependendo da localização onde a ligação ocorre (VICKERS, 2014; DESAI, JELLYMAN e ROSS, 2015). Para ser mais precisa, a adição de grupos metil às caudas de histonas é catalisada por histonas metiltransferases (HMTs) e pode reprimir ou ativar a transcrição gênica, enquanto a adição de grupos acetil é catalisada por histonas acetiltransferases (HATs) e potencializa a transcrição (DELAGE e DASHWOOD, 2008). A repressão gênica associada ao estado de acetilação da molécula é catalisada pelas histonas desacetilase (HDAC) através da remoção de grupos acetil (DESAI, JELLYMAN e ROSS, 2015). Por fim, os ncRNAs são transcritos de DNA – não traduzidos em proteínas – que também regulam a expressão gênica através de diferentes mecanismos (CHEN e RAJEWSKY, 2007; DING, WEILER e GROSSHANS, 2009; DESAI, JELLYMAN e ROSS, 2015). O modo de ação de micro RNAs (miRNAs), por exemplo, consiste em uma interação com os mRNAs alvo em uma sequência de bases complementar perfeita que resulta na clivagem do mRNA (FRÍAS-LASSERRE e VILLAGRA, 2017). Além disso, uma interação em uma sequência de base imperfeita causa uma repressão translacional (FRÍAS-LASSERRE e VILLAGRA, 2017).

Hoje em dia, um número cada vez maior de estudos procura desvendar as contribuições epigenéticas por trás da manifestação de doenças que aparecem como consequência da programação do desenvolvimento (VICKERS, 2014). Trabalhos com modelos experimentais de programação já mostraram, por exemplo, que a exposição a uma série de desafios durante a gestação ou no início da vida neonatal resulta em mudanças na metilação do promotor e, portanto, afeta direta ou indiretamente a expressão gênica em vias associadas a uma variedade de processos fisiológicos (VICKERS, 2014). Dentre os insultos ambientais associados aos eventos epigenéticos, destacam-se a nutrição, a atividade física, o consumo de álcool e o estresse (MATHERS, STRATHDEE e RELTON, 2010). A condição ambiental da mãe mais bem estudada, que afeta o epigenótipo da prole, é a nutrição materna (AGUILERA *et al.*, 2010). No estudo de Glendinning e colaboradores (2018), por exemplo, a oferta de dieta hiperlipídica antes do acasalamento e durante os períodos de gestação e de lactação levou a infrarregulação de importantes marcadores epigenéticos, como a *Creb binding protein* (CREBBP). Esse fator está relacionado à ativação da *cAMP-response element binding protein* (CREB), proteína associada a diferentes processos, vide a proliferação, a diferenciação, a sobrevivência, a potencialização sináptica de longo prazo, a neurogênese e a plasticidade neuronal, como revisado por Wang e colaboradores (2018).

2.3 Dieta hiperlipídica materna e comportamento relacionado à ansiedade

O início da vida – período correspondente à gestação, à lactação e à primeira infância – é marcado por uma série precisa e sincronizada de eventos, que permite o desenvolvimento adequado do animal (DOBBING, 1966; RICE e BARONE, 2000; MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002; ANDERSEN e REVIEWS, 2003). Portanto, qualquer insulto que interfira no desdobramento dessa sequência de acontecimentos pode acarretar alterações permanentes na estrutura e na função do indivíduo (DOBBING, 1966; MORGANE *et al.*, 1993). Essa vulnerabilidade está relacionada ao conceito de período crítico, definido como janelas de tempo em que os tecidos e os órgãos estão susceptíveis a fatores intrínsecos e extrínsecos (DOBBING, 1966; ANDERSEN e REVIEWS, 2003). Tal conceito vem sendo explorado sob diferentes abordagens ao longo dos anos, na tentativa de entender de maneira mais clara como, quando e por que a exposição a determinados insultos pode afetar drasticamente o curso do desenvolvimento. O papel da nutrição materna, por exemplo, é um dos temas explorados pela ciência para definir a importância que o período perinatal tem sobre o desenvolvimento da prole (CADENA-BURBANO *et al.*, 2019). Contudo, muitas vezes os resultados dos trabalhos são contraditórios, visto que as dietas utilizadas para explorar o tema não são totalmente padronizadas (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; PAGE, JONES e ANDAY, 2014; LIN *et al.*, 2015). Ademais, os períodos de intervenção também variam entre os trabalhos, gerando resultados que podem diferir entre a literatura (GRISSOM, GEORGE e REYES, 2017; JANTHAKHIN *et al.*, 2017).

A oferta de dietas hiperlipídicas tem se tornado cada vez mais comum em modelos experimentais com roedores e visam estudar a relação do alto teor de gordura com os mais variados aspectos da fisiologia e do comportamento (GIRIKO *et al.*, 2013; JOHNSON *et al.*, 2017; CADENA-BURBANO *et al.*, 2019). Ademais, é importante salientar que a influência da exposição nutricional pode ser feita de maneira indireta, através da mãe, ou de maneira direta, ofertando-se a dieta para animais desmamados (SHALEV *et al.*, 2010; FINGER, DINAN e CRYAN, 2011; PERANI *et al.*, 2015). Dentre os aspectos estudados, a influência que a dieta hiperlipídica tem sobre a locomoção e sobre o comportamento relacionado à ansiedade da prole adolescente e/ou adulta revelou resultados contraditórios entre os trabalhos dispostos na literatura (SASAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; ZIEBA *et al.*, 2019).

Quando o período de exposição à dieta hiperlipídica esteve restrito aos períodos de pré-acasalamento e gestação, os resultados obtidos variaram de acordo com a linhagem, o sexo e a idade dos filhotes avaliados. No estudo de Kang e colaboradores (2014), por

exemplo, camundongos C57BL/6J adolescentes (32-35 dias) de mães expostas à dieta hiperlipídica (lipídio 60%), quando avaliados no campo aberto, exibiram aumento na atividade locomotora (hiperatividade) (machos HD vs. machos CD) e no comportamento relacionado à ansiedade (fêmeas HFD vs. fêmeas CD) (KANG *et al.*, 2014). O estudo desenvolvido por Raygada, Cho e Hilakivi-Clarke (1998), por sua vez, observou que camundongos CD-1 adultos jovens (60 dias – fêmeas e machos) do grupo hiperlipídico/normocalórico (proteína 19,2%, lipídio 43,2%, 15,7% kcal) apresentaram aumento da atividade locomotora no campo aberto, quando comparados ao grupo controle, o que sugere comportamento hiperativo (RAYGADA, CHO e HILAKIVI-CLARKE, 1998). Na literatura, a hiperatividade é referida como níveis persistentes, elevados e sustentados de atividade, e/ou aumento da velocidade do movimento (KEOGH, 1971). Não foi observada diferença para as linhagens BAL/c (90 dias) e CH3 (365 dias) (RAYGADA, CHO e HILAKIVI-CLARKE, 1998).

O trabalho de Balsevich e colaboradores (2016) avaliou o efeito da exposição materna a dieta hiperlipídica (lipídio 58% de kcal) sobre o comportamento para duas idades diferentes (BALSEVICH *et al.*, 2016). Em camundongos (C57BL/6J) adultos (90 dias – machos), houve aumento na atividade locomotora no campo aberto (hiperatividade) e diminuição no comportamento relacionado à ansiedade no labirinto elevado em cruz (BALSEVICH *et al.*, 2016). A locomoção não foi diferente quando animais adultos-velhos (365 dias), expostos à mesma dieta, foram avaliados (BALSEVICH *et al.*, 2016). Entretanto, no labirinto elevado em cruz, foi observado aumento no comportamento relacionado à ansiedade (BALSEVICH *et al.*, 2016).

Os efeitos da manipulação nutricional materna antes da concepção até o final da lactação também foram influenciados pelo sexo e pela idade dos animais. O estudo de Kang e colaboradores (2014), citado anteriormente, também avaliou a repercussão que a dieta hiperlipídica materna tem sobre o comportamento da prole (32-35 dias) (KANG *et al.*, 2014). No campo aberto, os machos apresentaram aumento na atividade locomotora, enquanto as fêmeas exibiram aumento no comportamento relacionado à ansiedade (KANG *et al.*, 2014). Ademais, machos e fêmeas passaram mais tempo em *rearing* (exploração vertical sobre duas patas), o que segundo os autores sugere aumento na emocionalidade (KANG *et al.*, 2014). No trabalho realizado por Lin e colaboradores (2015) (lipídio 45% kcal, proteína 20% kcal), ratos adolescentes Sprague-Dawley (56 dias) exibiram menor número de *rearing* no campo aberto (LIN *et al.*, 2015). Essa redução, no entanto, não foi associada à diminuição no comportamento relacionado à ansiedade, como sugerido por Kang e colaboradores (2014). Na

verdade, o número reduzido de *rearing* foi interpretado como comportamento semelhante à depressão (LIN *et al.*, 2015).

Ratos adolescentes (entre P35 e 45) de mães expostas à dieta rica em lipídio (proteína 20%, lipídio 60%, 5,24 Kcal) expressaram diminuição no comportamento relacionado à ansiedade no campo aberto, no labirinto elevado em cruz e na caixa de transição claro-escuro (SASAKI *et al.*, 2014). Por outro lado, animais adultos (P90), expostos a mesma dieta, apresentaram aumento na emocionalidade nos mesmos três testes avaliados (SASAKI *et al.*, 2013). No estudo de Peleg-Raibstein e colaboradores (2012) (lipídio 60% Kcal), por sua vez, camundongos também adultos (P90) revelaram aumento no comportamento relacionado à ansiedade no teste de neofobia alimentar (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012).

O estudo de Johnson e colaboradores (2017), por sua vez, avaliou o comportamento relacionado à ansiedade em camundongos adultos (>90 dias) no labirinto elevado em cruz (JOHNSON *et al.*, 2017). Fêmeas provenientes do grupo HFD (lipídios 43.8% kcal) gastaram mais tempo em comportamento imóvel e menos em comportamento móvel, enquanto machos desse mesmo grupo gastaram mais tempo em *rearing* (JOHNSON *et al.*, 2017). Por fim, machos e fêmeas do grupo HFD passaram menor quantidade de tempo em *head-dipping* (JOHNSON *et al.*, 2017). Segundo os autores, a diminuição na mobilidade poderia indicar aumento no comportamento relacionado à ansiedade e diminuição na exploração (JOHNSON *et al.*, 2017). Com relação aos demais parâmetros, o menor tempo gasto em *head-dipping* também estaria associado à diminuição no comportamento exploratório, enquanto o aumento do tempo em *rearing* sugeriria expressão de comportamento estereotipado (JOHNSON *et al.*, 2017).

O trabalho de Berry e colaboradores (2018) (lipídio 58%, proteína 16.4%, 5.56 kcal/g), por outro lado, não observou diferença quando camundongos adultos C57Bl/6J (84 – 94 dias), descendentes de ninhadas hiperlipídicas, foram avaliados no campo aberto e no labirinto elevado em cruz (BERRY *et al.*, 2018). No estudo realizado por Bayandor (2019), ratos adultos Wistar (90 dias), provenientes de mães expostas à dieta hiperlipídica (lipídio 52%, proteína 27,1%, 4.07 kcal/g), revelaram aumento no comportamento relacionado à ansiedade no labirinto elevado em cruz e no campo aberto (BAYANDOR *et al.*, 2019). O estudo de Page e colaboradores (2014) (lipídio 45% kcal, 4.73 kcal), por sua vez, avaliou o comportamento de ratos adultos (110 – 119 dias) Sprague-Dawley quando submetidos ao campo aberto (PAGE, JONES e ANDAY, 2014). Houve aumento no comportamento relacionado à ansiedade (PAGE, JONES e ANDAY, 2014). O estudo de Glendining (2018)

avaliou o comportamento relacionado à ansiedade no labirinto elevado em cruz da prole adulta de camundongos CB57L/6 (120 dias) expostos à dieta hiperlipídica (lipídio 45%) (GLENDINING, FISHER e JASONI, 2018). As fêmeas apresentaram aumento no comportamento relacionado à ansiedade (GLENDINING, FISHER e JASONI, 2018). Zieba e colaboradores (2019) não encontraram diferença para a atividade locomotora, nem para o comportamento relacionado à ansiedade quando camundongos C57BL/6J (267 e 295 dias), provenientes de mães expostas à dieta hiperlipídica (lipídio 43% MJ), foram analisados no campo aberto, no labirinto elevado em cruz e no teste de supressão alimentar pela novidade (ZIEBA *et al.*, 2019).

A influência que a oferta de dieta hiperlipídica durante os períodos de gestação e lactação tem sobre o comportamento também foi avaliada. Animais adultos-jovens Wistar (60 dias – machos), provenientes de mães expostas a dieta hiperlipídica/hipercalórica (HH) (lipídios 51%), apresentaram maior velocidade média no campo aberto, característica de hiperatividade (CADENA-BURBANO *et al.*, 2019). Não houve diferença para o grupo hiperlipídico/isocalórico (lipídio 51%) (HI). Em um segundo estudo conduzido pelo mesmo grupo de pesquisa, o campo aberto foi avaliado na nona semana (63 dias) (CAVALCANTI *et al.*, 2021). Houve aumento no tempo gasto em *rearing* (HIV e HHV vs. CV) e aumento na atividade locomotora (HIV vs. CV) (CAVALCANTI *et al.*, 2021). Janthakhin e colaboradores (2017), por outro lado, não observaram influência da exposição à dieta hiperlipídica materna (lipídio 45%, proteína 20%, 4,7 kcal/g) sobre o comportamento relacionado à ansiedade avaliado pelo labirinto elevado em cruz (90-150 dias) (JANTHAKHIN *et al.*, 2017).

Por fim, o efeito que a dieta rica em lipídio tem sobre o comportamento também foi considerado quando o consumo materno esteve restrito ao período de lactação. No trabalho desenvolvido pelo grupo de Giriko (2013), a oferta de dieta hiperlipídica (lipídio 52% kcal, proteína 27.1% kcal, 406.7 kcal) não influenciou o comportamento relacionado à ansiedade em ratos adulto-jovens Wistar (80 dias) (GIRIKO *et al.*, 2013). Nesse estudo, o número de *crossing* e o número de *rearing* foram avaliados no teste de campo aberto (GIRIKO *et al.*, 2013). Os principais efeitos da exposição materna à dieta hiperlipídica sobre o comportamento relacionado à ansiedade e sobre a atividade locomotora da prole, observados pelos diferentes estudos incluídos nesta revisão, estão ilustrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Figura 1 – Influência da exposição materna à dieta hiperlipídica sobre o comportamento relacionado à ansiedade da prole

	Pré-gestação e gestação	Pré-gestação, gestação e lactação	Gestação e lactação	Gestação ou lactação
	Idade e sexo			
↑	Kang et al., 2014 FM (32-35 dias)	Peleg-Raibstein et al., 2012 FM (90 dias)	Yan et al., 2017 FM (49-56)	Souto et al., 2020 M (80 dias)
	Balsevich et al., 2016 M (365 dias)	Sasaki et al., 2013 FM (90 dias)	Cavalcanti et al., 2021 M (63 dias)	
		Kang et al., 2014 FM (32-35 dias)	Rocha-Gomes et al., 2021 M (42 dias)	
		Page et al., 2014 M (118 dias)		
		Johnson et al., 2017 FM (~97 dias)		
		Glendining et al., 2018 F (120 dias)		
		Bayandor et al., 2019 M (90 dias)		
↓	Balsevich et al., 2016 M (90 dias)	Sasaki et al., 2014 FM (35-45)	Gawlinska et al., 2021 F (28 e 63 dias)	
=		Berry et al., 2017 FM (84-94 dias)	Janthakin et al., 2015 M (90 e 150 dias)	Giriko et al., 2015 M (60 dias)
		Zieba et al., 2019 M (267 e 295 dias)	Cadena et al., 2019 M (30, 45 e 60 dias)	Lippert et al., 2015 FM (180 dias)
			Gawlinska et al., 2021 M (28 e 63 dias)	

Fonte: Carolina Cavalcanti (2022)

Figura 2 - Influência da exposição materna à dieta hiperlipídica sobre a atividade locomotora da prole

	Pré-gestação e gestação	Pré-gestação, gestação e lactação	Gestação e lactação	Gestação ou lactação
	Idade e sexo			
↑	Raygada, Cho e Clarke, 1999 FM (60 dias - CD1)	Kang et al., 2014 M (32-35 dias)	Cavalcanti et al., 2021 M (63 dias - HIV)	Lippert et al., 2020 M (180 dias)
	Kang et al., 2014 M (32-35 dias)	Page et al., 2014 M (118 dias)		
	Balsevich et al., 2016 M (90 dias)	Tozuca et al., 2010 M (70 dias)		
↓		Yan et al., 2017 FM (49-56)	Rocha-Gomes et al., 2021 M (42 dias)	
	Raygada, Cho e Clarke, 1999* FM (90 - BALB/c, 365 dias - C3H)	Tozuca et al., 2010 M (21 dias)	Naef et al. 2008 M (56-62 dias)	Giriko et al., 2015 M (60 dias)
	Kang et al., 2014 F (32-35 dias)	Peleg-Raibstein et al., 2012 FM (90 dias)	Naef et al. 2012 M (90-100 dias)	Sarker et al., 2019 FM (70 e 110 dias)
	Balsevich et al., 2016 M (365 dias)	Sasaki et al., 2013 FM (90 dias)	Janthakin et al., 2015 M (90 e 150 dias)	Lippert et al., 2020 F (180 dias)
		Kang et al., 2014 F (32-35 dias)	Cadena et al., 2019 M (30, 45 e 60 dias - HH; 30, 45 e 60 dias - HI)	Souto et al., 2020 M (80 dias)
		Lin et al., 2015 M (56, 120, 127, 134 e 141 dias)	Gawlinski et al., 2020 F (63 dias)	
		Peleg-Raibstein et al., 2016 FM (120 dias)	Cavalcanti et al., 2021 M (63 dias - HHV, 77 dias - HIV e HHV)	
		Grissom, George e Reyes., 2017 M (135 dias)	Gawlinska et al., 2021 FM (28 e 63 dias)	
		Sasaki et al., 2018 FM (65 dias)		
		Zieba et al., 2019 M (267 e 295 dias)		

Fonte: Carolina Cavalcanti (2022)

Como pôde ser visto acima (Fig. 1), os efeitos da exposição materna a dietas ricas em lipídios sobre o comportamento da prole variam de trabalho para trabalho (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; SASAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; BELLISARIO *et al.*, 2015; BALSEVICH *et al.*, 2016). De forma semelhante, os mecanismos por trás dessas alterações podem residir em um conjunto de diferentes fatores (SASAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014; PRIOR *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016). É sabido, por exemplo, que a exposição a situações estressantes ativa o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), aumentando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e da corticosterona (GRAEFF, 2007). Essa resposta ao insulto é crucial para melhor adaptação do organismo as circunstâncias vivenciadas, sendo conhecida como reações de luta ou fuga (GRAEFF, 2007). Em filhotes fêmeas [camundongo (BELLISARIO *et al.*, 2015); rato (SASAKI *et al.*, 2013)] de mães alimentadas com dietas hiperlipídicas, observou-se resposta exacerbada do eixo HPA e, conseqüentemente, níveis plasmáticos de corticosterona elevados (SASAKI *et al.*, 2013; BELLISARIO *et al.*, 2015).

Somado a isso, houve *feedback* negativo menos eficiente, expondo os animais a um aumento duradouro dos níveis de corticosterona (SASAKI *et al.*, 2013; BELLISARIO *et al.*, 2015). Ademais, filhotes machos exibiram corticosterona basal atenuada (SASAKI *et al.*, 2013).

A exacerbação do eixo HPA citada acima está relacionada ao aumento na expressão de receptores específicos em regiões do encéfalo (SASAKI *et al.*, 2013). O receptor mineralocorticoide (MR) tem alta afinidade pela corticosterona, sendo normalmente ligado a ela em condições basais, determinando o limiar de resposta ao estresse (JOËLS *et al.*, 2008). O receptor glicocorticoide (GR), por sua vez, aumenta a resposta mediada por corticosterona ao estresse (JOËLS *et al.*, 2008). Em adultos jovens (P45), o efeito “ansiolítico” da dieta materna, observado nos testes comportamentais, foi consistente com o aumento na expressão de RG no hipocampo desses animais, (SASAKI *et al.*, 2014). Segundo os autores, esses resultados podem sugerir que a diminuição na emocionalidade pode estar associada a comportamentos exploratórios impulsivos/de risco em animais adolescentes como já foi observado em outros estudos (SASAKI *et al.*, 2014). Nos animais adultos (P90) do grupo hiperlipídico, por sua vez, o aumento nos comportamentos relacionados à ansiedade foi acompanhado pela expressão elevada de RM e de RG na amígdala (SASAKI *et al.*, 2013). O aumento na expressão desses receptores em diferentes estruturas do encéfalo e sua associação com os níveis do comportamento relacionado à ansiedade precisam, portanto, de estudos mais detalhados para o entendimento mais claro do mecanismo por trás das respostas comportamentais observadas. Em outro trabalho, a expressão elevada do RNA mensageiro do receptor glicocorticoide nuclear da subfamília-3-grupo-c-membro-1 (Nr3c1) nos núcleos ventromedial hipotalâmico e arqueado, e o aumento do Nr3c1 no núcleo paraventricular foram associados ao aumento no comportamento relacionado à ansiedade (BALSEVICH *et al.*, 2016).

O papel inflamatório e anti-inflamatório dos receptores glicocorticoides no cérebro foi recentemente estudado (SORRELLS *et al.*, 2009). Em situações de estresse crônico, por exemplo, a ativação desses receptores é necessária para aumentar a resposta inflamatória no cérebro (SORRELLS *et al.*, 2009). Para que isso aconteça, no entanto, o aumento na expressão de fatores pró-inflamatórios, como o aumento das citocinas, é imprescindível (SASAKI *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2014). Entre as citocinas estudadas, a expressão elevada da interleucina-1 β (IL-1 β) e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) no hemisfério cerebral de fêmeas e da interleucina-6 (IL-6) na amígdala de fêmeas e machos foi traduzida com aumento no comportamento relacionado à ansiedade em descendentes de mães expostas a dieta hiperlipídica (SASAKI *et al.*, 2013). O aumento na expressão de IL-6 pode estar

associado ao aumento do fator de transcrição nuclear kappa β (NFk- β) e a não inibição do NFk- β pelo seu regulador negativo, o *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α* (IkB- α) (SASAKI *et al.*, 2013). A expressão elevada do receptor antagonista da IL-1 também foi encontrada na amígdala de fêmeas (SASAKI *et al.*, 2013). Além disso, houve aumento de marcadores microgliais, como o *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba-1) em fêmeas, indicando maior inflamação neuronal (KANG *et al.*, 2014).

Por outro lado, o aumento na transcrição do fator NFk- β e da IL-6 em ambos os sexos e do IkB- α em machos no hipocampo foi relacionado à diminuição nos comportamentos relacionados à ansiedade (SASAKI *et al.*, 2014). A diminuição na expressão dos receptores antagonistas de IL-1 em fêmeas e do fator NFk- β em machos e fêmeas na amígdala também foram associados ao “efeito ansiolítico” da dieta (SASAKI *et al.*, 2014). Ademais, houve aumento da expressão de *mitogen-activated protein kinase phosphatase-1* (MKP-1) no hipocampo, responsável pela desativação de MAPK (RASTOGI *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2014). A MKP-1 responde imediatamente a fatores de crescimento, estresse e citocinas e a desativação da MAPK protege o indivíduo de efeitos sistêmicos deletérios e de doenças crônicas inflamatórias (RASTOGI *et al.*, 2013). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é outra abordagem utilizada para entender o comportamento (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012). Animais provenientes de mães expostas à dieta hiperlipídica apresentaram aumento na expressão do BDNF no hipocampo dorsal (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012). Tal aumento refletiu a expressão de perfis mais emocionais e essa relação já foi explorada na literatura como apontado pelo trabalho de Peleg-Raibstein, Luca e Wolfrum (2012).

Além dos mecanismos explanados acima, a exposição a níveis mais elevados de leptina pode ser também um fator que contribui para o aumento nos comportamentos relacionados à ansiedade (BELLISARIO *et al.*, 2015). Estudo feito por Prior e colaboradores (2014) revelou que proles de mães alimentadas com dieta rica em lipídio exibiram sensibilidade hipotalâmica alterada à leptina (PRIOR *et al.*, 2014). Essa mudança sugeriria que alterações metabólicas podem ter ocorrido em uma janela de tempo do desenvolvimento susceptível a insultos ambientais (PRIOR *et al.*, 2014).

Por fim, alterações nos sistemas endocanabinóide, GABAérgico e serotoninérgico podem estar associados aos diferentes níveis do comportamento emocional (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). Com relação ao sistema endocanabinóide, a diminuição no nível de anandamida (AEA) e do ácido

araquidônico (AA) em machos e a redução de palmitoiletanolamida (PEA) em machos e fêmeas no hipotálamo sugeriu aumento no comportamento relacionado à ansiedade (RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). Ademais, menores níveis de AEA e PEA no hipocampo de machos corroboraram o efeito “ansiogênico” da dieta (RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). Nos sistemas GABAérgico e serotoninérgico, por sua vez, a expressão gênica elevada da subunidade do receptor G2 de GABA_A e do receptor 5-HT_{1A} no hipocampo ventral foi interpretada como fator que contribuiu para o comportamento relacionado à ansiedade (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012).

Apesar disso, trabalhos que investiguem de que maneira essas alterações agem sobre a responsividade (sensibilidade/resistência) farmacológica desses receptores ainda são escassos. Por exemplo, camundongos BALB/c adultos expostos à dieta hiperlipídica no período pós-desmame e ao estresse ameno repetido durante dois períodos de sete semanas separados por um de seis semanas, apresentaram aumento na resistência à fluoxetina crônica (ISINGRINI *et al.*, 2010). Isso porque a aplicação do fármaco não foi capaz de reverter os efeitos observados nos testes comportamentais ao final da manipulação farmacológica (ISINGRINI *et al.*, 2010). Em outro estudo, camundongos C57/B16 alimentados com dieta hiperlipídica durante 16 semanas, a partir da 8ª semana pós-natal, apresentaram diminuição no nível basal de serotonina no hipocampo ventral (HPC) (ZEMDEGS *et al.*, 2016). Como os autorreceptores 5-HT_{1A} somatodendríticos localizados nos neurônios 5-HT do núcleo dorsal da rafe exercem controle sobre a liberação de 5-HT via feedback negativo, o trabalho também avaliou a resposta desses animais a um agonista do 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) (ZEMDEGS *et al.*, 2016). Apesar de ambos os grupos expressarem resposta hipotérmica ao fármaco utilizado, os animais submetidos à dieta hiperlipídica, revelaram efeito mais acentuado após a aplicação (ZEMDEGS *et al.*, 2016). Segundo os autores, juntos, esses resultados sugerem que a redução externa de serotonina observada no HPC pode ser consequência da expressão elevada e/ou função dos autorreceptores 5-HT_{1A} da rafe (ZEMDEGS *et al.*, 2016).

Primatas não humanos, por sua vez, quando expostos indiretamente a dieta hiperlipídica materna, durante o período de gestação, revelaram aumento na enzima limitante para síntese de serotonina, a triptofano hidroxilase 2 (TPH2) e da expressão dos autorreceptores inibitórios 5-HT_{1A} no núcleo rostral da rafe (SULLIVAN *et al.*, 2010). Tais resultados sugerem perturbação do sistema serotoninérgico da prole, estando ele suprimido em decorrência da exposição indireta ao alto teor de lipídio (SULLIVAN *et al.*, 2010). Por isso, pode-se sugerir que a oferta de dieta hiperlipídica durante o período perinatal leva ao aumento na resistência do sistema serotoninérgico à ação do fármaco. Para testar essa

hipótese, nosso estudo prévio avaliou o comportamento de ratos adulto-jovens provenientes de duas dietas hiperlipídicas após a administração aguda de fluoxetina em testes de ansiedade-estado (campo aberto e labirinto elevado em cruz) e ansiedade-traço (paradigma da exploração livre) (CAVALCANTI *et al.*, 2021). Uma menor sensibilidade só foi observada para o PEL. No CA e no LEC, a responsividade dos grupos hiperlipídicos foi semelhante a do grupo controle (CAVALCANTI *et al.*, 2021). Esses resultados nos levaram a questionar qual seria a resposta dos grupos hiperlipídicos à administração crônica de fluoxetina.

2.4 Sistema serotoninérgico e comportamento relacionado à ansiedade

A ansiedade normal é a expressão de um sistema biológico de alerta desencadeada em situações interpretadas como potencialmente perigosas (HOEHN-SARIC, 1982). A ansiedade torna-se anormal quando ocorre sem razões suficientemente objetivas ou quando as manifestações são excessivas em intensidade e duração (HOEHN-SARIC, 1982). Por trás dessas manifestações, alterações nos sistemas de neurotransmissão estão entre os fatores capazes de modular o comportamento (NINAN, 2001). Dentre os neurotransmissores, pelo menos cinco têm sido associados à ansiedade. São eles: ácido γ -aminobutírico, norepinefrina, serotonina, hormônio liberador de corticotrofina e colecistoquinina (NINAN, 2001). Além dos já citados, o sistema endocanabinóide também tem sido relacionado à expressão da ansiedade (RUTKOWSKA, JAMONTT e GLINIAK, 2006; RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). Segundo Hoehn-Saric (1982), os efeitos ansiolíticos mais previsíveis dos neurotransmissores estão ligados à ativação do subsistema formado pelo ácido γ -aminobutírico (GABAérgico) associado a receptores específicos de benzodiazepinas (HOEHN-SARIC, 1982). Com relação à norepinefrina, estudos com animais mostraram que apenas alguns tipos de ansiedade são mediados pelo sistema (HOEHN-SARIC, 1982). Por fim, o sistema serotoninérgico também foi implicado na expressão de alguns tipos de ansiedade (HOEHN-SARIC, 1982). No entanto, até a serotonina ser associada aos transtornos psiquiátricos, foram necessários quase 20 anos de pesquisa, como veremos a seguir.

A serotonina foi primeiramente descoberta por Vittorio Erspamer, no ano 1937, em células enterocromafins do intestino, sendo, por isso, denominada enteramina (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Alguns anos depois, Irvine Page, na tentativa de “eliminar um artefato chato para que o verdadeiro trabalho de encontrar a causa da hipertensão pudesse ser obtido” convidou o químico orgânico Maurice Rapport e a bioquímica Arda Alda Green para ajudá-lo neste desafio (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Dois anos depois de sua chegada ao laboratório, em Cleveland, Dr. Rapport conseguiu, finalmente, em nove de março de 1948,

isolar o vasoconstritor que tanto “incomodava” a pesquisa de Dr. Page sobre hipertensão (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Neste dia, em uma comemoração entre eles, de maneira não oficial, sem saber que se tratava da mesma substância encontrada por Dr. Erspamer, o químico orgânico e seus colaboradores decidiram chamá-la de serotonina – nome utilizado até hoje (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Oficialmente, o nome ficou mundialmente conhecido no artigo publicado em 24 de setembro daquele mesmo ano (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Em maio do ano seguinte (1949), a estrutura foi finalmente determinada como 5-hidroxitriptamina (WHITAKER-AZMITIA, 1999).

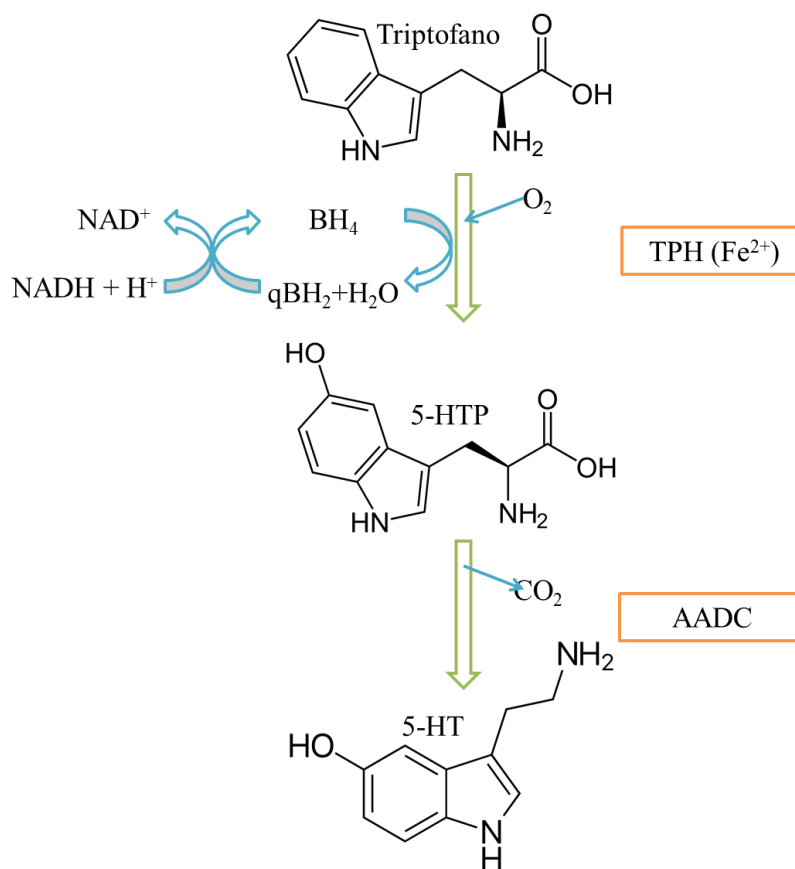
Dois anos mais tarde (em 1951), enquanto estudava os receptores que regulavam o “catch” na musculatura lisa de *Mytilus*, Dr. Betty Mack Twarog ficou diante de um neurotransmissor responsável pelo relaxamento muscular que não era de seu conhecimento (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Quando os artigos sobre serotonina da Cleveland Clinic chegaram às suas mãos, a Dr. Twarog percebeu que a estrutura preenchia os requisitos estruturais que haviam sido estabelecidos para o neurotransmissor *Mytilus* (WHITAKER-AZMITIA, 1999). No entanto, a serotonina era apenas um vasoconstritor sérico encontrado no soro de mamíferos e, ainda, não havia razão para acreditar que teria alguma função como molécula neurotransmissora (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Naquele mesmo ano, entretanto, os documentos do Dr. Erspamer mostraram que a enteramina era encontrada nas glândulas salivares dos polvos e que esta substância poderia excitar o coração dos moluscos (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Ambos, Betty Twarog e John Welsh (seu orientador), acreditavam que as secreções salivares frequentemente continham toxinas relacionadas a neurotransmissores (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Portanto, a enteramina poderia ser o neurotransmissor desconhecido que inibia o “catch” (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Pouco tempo depois, quando a serotonina e a enteramina foram identificadas como a mesma substância, Twarog e Welsh solicitaram serotonina da Abbott Laboratories e descobriram que o neurotransmissor desconhecido era de fato a serotonina (WHITAKER-AZMITIA, 1999). O próximo passo, então, era demonstrar que esse neurotransmissor estava presente no encéfalo dos vertebrados (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Para isso, Twarog seguiu rumo Cleveland Clinics e junto a um cético Irvine Page, publicou o artigo em outubro de 1953, trazendo a serotonina para o campo da neurociência (WHITAKER-AZMITIA, 1999).

Naquele momento, o “único passo que faltava” era expandir o conhecido papel da serotonina sobre a função cerebral para além das fronteiras até então conhecidas (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Para isso, o Dr. Dilworth Wayne Woolley teve importante função (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Combinando os trabalhos da Dr. Twarog e a

descoberta do LSD por Albert Hoffman ao seu trabalho sobre LSD como “antimetabólito” da serotonina, Dr. Wooley propôs, em 1954, que esse neurotransmissor teria papel importante sobre o desenvolvimento cerebral e sobre a aparição de transtornos mentais (WHITAKER-AZMITIA, 1999).

Com relação as suas características, a serotonina (5-HT) é uma amina biogênica sintetizada (Figura 3) a partir do aminoácido L-triptofano através de uma reação que envolve duas enzimas (MOHAMMAD-ZADEH, MOSES e GWALTNEY-BRANT, 2008). A reação um converte o L-triptofano em 5-hidroxi-L-triptofano (5-HTP) e é catalisada pela triptofano hidroxilase (TPH) (HASEGAWA e NAKAMURA, 2010). A reação dois, por sua vez, converte 5-HTP em serotonina e é catalisada pela descarboxilase de L-aminoácido aromático (HASEGAWA e NAKAMURA, 2010). Alguns modelos experimentais revelaram que quando a serotonina extracelular aumenta, sua síntese e liberação das vesículas são inibidas (SGHENDO e MIFSUD, 2012). Por outro lado, quando a concentração de serotonina extracelular diminui, sua síntese e liberação das vesículas são facilitadas (SGHENDO e MIFSUD, 2012). Tais processos complexos ocorrem porque os sistemas serotoninérgicos devem responder rapidamente aos sinais, garantindo a homeostase (SGHENDO e MIFSUD, 2012).

Figura 3 – Biossíntese de serotonina (adaptada de Hasegawa, 2010)

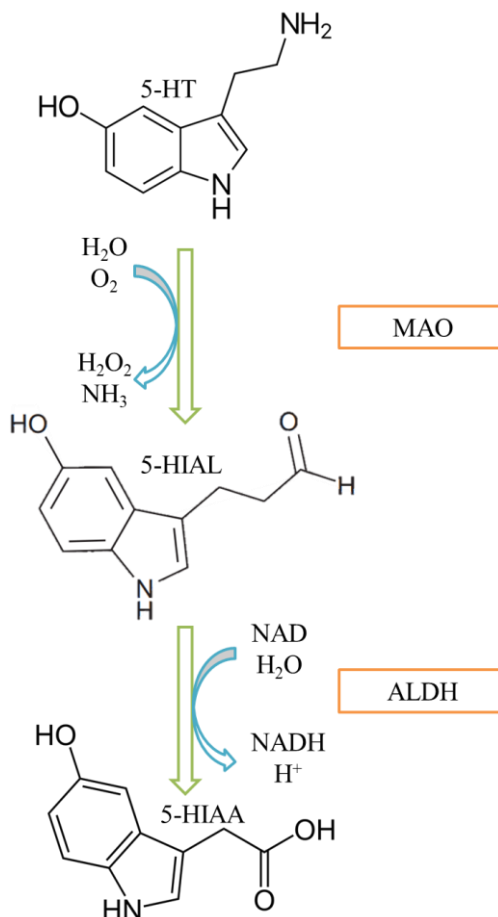


Biossíntese de serotonina a partir de triptofano. A serotonina (5-HT, 5 hidroxitriptamina) é sintetizada a partir do L-triptofano por uma reação enzimática em duas etapas. A triptofano hidroxilase (TPH) requer oxigênio molecular (O₂) e tetrahidrobiopterina (BH₄) como co-substrato. A enzima tem uma necessidade absoluta de ferro ferroso (Fe⁺²). O produto da reação, 5-hidroxi-L-triptofano (5-HTP), é convertido em serotonina pela L-aminoácido descarboxilase aromática (AADC).

Além disso, o equilíbrio também é mantido pela degradação enzimática da serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) (Figura 4), que é mediada, principalmente, pela monoamina oxidase (MAO), uma enzima ligada às mitocôndrias que requer dinucleotídeo de flavina adenina como cofator (BORTOLATO, CHEN e SHIH, 2010). Essa enzima catalisa a desaminação oxidativa da 5-HT, convertendo-a em 5-hidroxi-3-indolacetaldeído (5-HIAL), que é posteriormente processado em ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA) pela aldeído-desidrogenase (ALDH) (BORTOLATO, CHEN e SHIH, 2010). Por fim, o 5-HIAA é rapidamente eliminado por difusão, transportado para a corrente sanguínea e excretado pelos rins através de um mecanismo combinado de filtração glomerular e excreção tubular ativa (BORTOLATO, CHEN e SHIH, 2010). Atualmente, são conhecidas duas isoenzimas da MAO, denominadas A e B, que diferem em relação às bases genéticas, à regulação transcricional, à preferência pelo substrato, à afinidade de inibidor e à distribuição regional

(BORTOLATO, CHEN e SHIH, 2010). Embora a MAO-A exiba maior preferência por 5-HT e catalise seu metabolismo sob condições fisiológicas, a MAO-B é a única isoenzima identificada em neurônios serotoninérgicos (BORTOLATO, CHEN e SHIH, 2010).

Figura 4 – Degradação de serotonina (adaptada de Bortolato, Chen e Shih, 2010)



A enzima MAO catalisa a conversão de 5-HT em 5-hidroxi-3 indolacetaldeído (5-HIAL), que é posteriormente degradado em ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA).

Apesar de ser muito conhecida pelo seu papel como neurotransmissor, a 5-HT também pode atuar como hormônio e mitógeno (substância que influencia a proliferação celular) (MOHAMMAD-ZADEH, MOSES e GWALTNEY-BRANT, 2008). Ademais, é no trato gastrointestinal onde ocorre a maior parte da produção corporal da serotonina (95%) (TYCE, 1990). No intestino, a molécula é produzida pelas células enteroendócrinas ou enterocromafins, enquanto no sistema nervoso entérico ocorre a produção de neurônios serotoninérgicos (GERSHON e TACK, 2007). A porcentagem restante é sintetizada nas plaquetas e no sistema nervoso central (SNC) (TYCE, 1990). No SNC, os neurônios 5-HT estão localizados no tronco cerebral e na medula espinhal (FLAIVE *et al.*, 2020). No tronco

encefálico, os corpos celulares de 5-HT estão distribuídos ao longo da linha média nos núcleos da rafe, que são constituídos por dois grupos, o rostral e o caudal (HORNUNG, 2010).

O grupo rostral está localizado no mesencéfalo (núcleo caudal linear da rafe, núcleo dorsal da rafe, núcleo mediano da rafe) e na ponte rostral (núcleos pontino e supramecniscal) (HORNUNG, 2010). Esses núcleos enviam principalmente projeções ascendentes para o prosencéfalo, projeções locais para as regiões do tronco encefálico e um número limitado de projeções descendentes para a medula espinhal (HORNUNG, 2010). O grupo caudal está localizado na ponte caudal (núcleo da rafe magno) e na medula oblonga (núcleo da rafe obscura, núcleo da rafe pálida e neurônios 5-HT da formação reticular medular lateral, ou seja, núcleo paragigantocelular lateral, LPGi) (HORNUNG, 2010). Esse grupo caudal envia principalmente projeções descendentes para a medula espinhal, projeções locais para o tronco encefálico e uma quantidade limitada de projeções ascendentes para o prosencéfalo (HORNUNG, 2010). Finalmente, os neurônios 5-HT na medula espinhal projetam-se localmente, enviam ramos rostral ou caudal, ou em direção à borda ventrolateral e, ocasionalmente, no canal central (HORNUNG, 2010). A comunicação no sistema serotoninérgico ocorre pela fenda sináptica, através da transmissão eletroquímica, onde a 5-HT liga-se a receptores específicos, conhecidos como receptores serotoninérgicos (5-HT₁₋₇) (GOODMAN e GILMAN, 1996; RAYMOND *et al.*, 2001).

A manipulação do sistema serotoninérgico é bem comum na literatura e tem sido utilizada para entender o papel que a serotonina tem sobre a ansiedade (RAMBOZ *et al.*, 1995; PINHEIRO *et al.*, 2002; RICHARDSON-JONES *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012; VICENTE e ZANGROSSI, 2012; KJAERBY *et al.*, 2016; NAUTIYAL *et al.*, 2016). Estudos realizados com roedores mostraram que os receptores serotoninérgicos podem ter funções distintas dependendo do tipo de receptor estudado, da região do cérebro avaliada e da idade do animal utilizado (RAMBOZ *et al.*, 1995; PINHEIRO *et al.*, 2002; RICHARDSON-JONES *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012; VICENTE e ZANGROSSI, 2012; KJAERBY *et al.*, 2016; NAUTIYAL *et al.*, 2016). Dentre os receptores serotoninérgicos conhecidos, os subtipos associados ao controle emocional são 1A, 1B, 2A, 2C, 3, 4, 6 e 7 (TURCO, 2013; ŻMUDZKA *et al.*, 2018).

O trabalho desenvolvido pelo grupo de Li (2012) com camundongos adultos (56 dias) injetados com um adenovírus recombinante encontrou papel “ansiolítico” para o autorreceptor 5-HT_{1A} no núcleo central e basomedial da amígdala (LI *et al.*, 2012). Isso porque a diminuição na densidade desse receptor, em decorrência da exposição ao adenovírus,

aumentou os comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto elevado em cruz e no campo aberto (LI *et al.*, 2012). Richardson-Jones e colaboradores (2010), por sua vez, mostraram que a modulação nos níveis do autorreceptor 5-HT_{1A} na vida adulta não alterou os níveis de comportamento relacionado à ansiedade (RICHARDSON-JONES *et al.*, 2010). Esse resultado pode sugerir, segundo os autores, que o autorreceptor teria papel fundamental durante o desenvolvimento, no estabelecimento do circuito do comportamento relacionado à ansiedade, e não na vida adulta (RICHARDSON-JONES *et al.*, 2010). No estudo conduzido por Xiang e colaboradores (2019), o papel do receptor 5-HT_{1A} sobre o comportamento emocional foi avaliado em um modelo de estresse pós-traumático (XIANG *et al.*, 2019). A administração crônica (durante sete dias) de um antagonista (WAY10063) desse receptor na dose de 3 mg/kg de peso, via subcutânea, revelou aumento no comportamento relacionado à ansiedade no teste de campo aberto (XIANG *et al.*, 2019). A ativação optogenética de terminais 5-HT no núcleo do leito da estria terminal reduz o comportamento relacionado à ansiedade e essa diminuição está associada à ativação dos receptores 5-HT_{1A} (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2018). Esse efeito foi inibido pela administração de um antagonista (WAY 100,635) desse subtipo (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2018).

Estudos com o receptor 5-HT_{1B}, por sua vez, sugeriram que o subtipo poderia ter funções diferentes quando localizados em áreas distintas (KJAERBY *et al.*, 2016; NAUTIYAL *et al.*, 2016). Camundongos *knock-out* sem o autorreceptor 5-HT_{1B} apresentaram diminuição no comportamento relacionado à ansiedade no campo aberto (NAUTIYAL *et al.*, 2016). Os autores sugerem que esse resultado poderia ser explicado pelo nível elevado de serotonina extracelular no hipocampo ventral; como também pela modulação na função do transportador da serotonina (SERT) (NAUTIYAL *et al.*, 2016). Por fim, a resposta “ansiolítica” a depleção do autorreceptor 5-HT_{1B} poderia indicar que o subtipo é importante para a maturação dos circuitos neuronais responsáveis por esses comportamentos (NAUTIYAL *et al.*, 2016). De maneira contrária, Ramboz e colaboradores (1995) não observaram resposta “ansiolítica” de camundongos mutantes sem o receptor 5-HT_{1B} (RAMBOZ *et al.*, 1995). No estudo, os autores não obtiveram diferença para os parâmetros relacionados à ansiedade na caixa de transição claro-escuro entre os animais mutantes e os *wild-type* (RAMBOZ *et al.*, 1995). No estudo de Kjaerby e colaboradores (2016), por sua vez, em que os camundongos adultos (com idade entre 56-84 dias) foram injetados com o agonista CP93129 do receptor 5-HT_{1B} no córtex pré-frontal medial, observou redução nos comportamentos relacionados à ansiedade (KJAERBY *et al.*, 2016). Essa resposta “ansiolítica” poderia ser consequência da supressão do “*input*” no hipocampo ventral para o

córtex pré-frontal medial (KJAERBY *et al.*, 2016). A expressão aumentada do receptor 5-HT_{1B} – obtida através de um modelo de transferência de genes mediada pelo vírus do herpes – no núcleo dorsal da rafe aumentou o comportamento relacionado à ansiedade no campo aberto e no labirinto elevado em cruz (CLARK *et al.*, 2002). No estudo de McDevitt e colaboradores (2011), por outro lado, o aumento na expressão desse receptor não alterou o comportamento relacionado à ansiedade quando o animal foi exposto ao campo aberto (MCDEVITT *et al.*, 2011).

Com relação ao receptor 5-HT₂, o uso de antagonista simultâneo dos subtipos 2A e 2C, o RP62203, na porção basolateral da amígdala de ratos Wistar adolescentes (pesando entre 200-280g), resultou em resposta “ansiolítica” no labirinto elevado em cruz (PINHEIRO *et al.*, 2002). De maneira semelhante, o uso do antagonista do subtipo 2C, o SB-242984, antes da aplicação de serotonina ou imipramina, no núcleo basolateral da amígdala de ratos Wistar adolescentes (290-310g) inibiu os efeitos ansiogênicos das drogas utilizadas (VICENTE e ZANGROSSI, 2012). Esse resultado sugere que o comportamento relacionado à ansiedade poderia estar relacionado à ativação dos receptores 2C (VICENTE e ZANGROSSI, 2012). Corroborando esses achados, camundongos adultos expostos a um adenovírus recombinante (56 dias), em que a densidade do receptor 2C foi aumentada no núcleo basolateral, exibiram aumento no comportamento relacionado à ansiedade quando expostos ao labirinto elevado em cruz e ao campo aberto (LI *et al.*, 2012). Em camundongos knock-out para o receptor 5-HT_{2C}, a diminuição no comportamento relacionado à ansiedade foi observada quando o labirinto elevado em zero e o campo aberto foram avaliados (HEISLER *et al.*, 2007). O estudo de Xiang e colaboradores (2019), citado anteriormente, também avaliou o efeito da administração i.p. de um antagonista (Ketanserin) do receptor 5-HT_{2A} na dose de 0,3 mg/kg de peso (XIANG *et al.*, 2019). O tratamento crônico (durante sete dias) não diminuiu o comportamento relacionado à ansiedade provocado pelo modelo de estresse pós-traumático (XIANG *et al.*, 2019). Em animais knock-out para o receptor 5-HT_{2A}, houve diminuição no comportamento relacionado à ansiedade no campo aberto, na caixa de transição claro-escuro, no labirinto elevado em cruz e no paradigma da alimentação suprimida pela novidade (WEISSTAUB *et al.*, 2006). Em animais knock-out para o receptor 5-HT_{2A}, houve diminuição no comportamento relacionado à ansiedade basal quando fêmeas e machos foram expostos ao campo aberto (JAGGAR *et al.*, 2017).

Outro receptor serotoninérgico associado ao comportamento emocional é o subtipo 5-HT_{3A} (LOPES *et al.*, 2022). Nesse estudo, a infusão intracerebroventricular de um antagonista (Ondansetron, 3 nmol) na massa cinzenta periaquedutal dorsal revelou aumento no

comportamento relacionado à ansiedade avaliado pelo labirinto elevado em cruz (LOPES *et al.*, 2022). Além disso, o bloqueio do receptor 5-HT_{3A} (1,0 nmol) preveniu o efeito “ansiolítico” induzido pela infusão de um agonista (mCPP, 0,03 nmol) do receptor 5-HT_{2C} (LOPES *et al.*, 2022). Segundo os autores, esses resultados sugerem que o efeito “ansiolítico” exercido pela atividade da serotonina sobre o receptor 5-HT_{2C} na massa cinzenta periaquedutal dorsal é modulado por receptores 5-HT_{3A} expressos na mesma região (LOPES *et al.*, 2022). O estudo conduzido por Bhatnagar e colaboradores (2004) investigou a emocionalidade em camundongos knock-out para o receptor 5-HT_{3A}. Houve diminuição no comportamento relacionado à ansiedade no labirinto elevado em cruz (BHATNAGAR *et al.*, 2004). Além disso, a deleção do subtipo 5-HT_{3A} revelou que esse receptor tem papel importante sobre a regulação de respostas do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal ao estresse agudo e potencial interação entre o receptor 5-HT_{3A} e o hormônio liberador de corticotrofina na amígdala (BHATNAGAR *et al.*, 2004). Juntos, esses dados sugerem que o receptor 5-HT_{3A} não tem um papel unitário na regulação de comportamentos relacionados à ansiedade (BHATNAGAR *et al.*, 2004). Em camundongos knock-out para a subunidade do receptor 5-HT_{3A}, o comportamento emocional diminuiu na caixa de transição claro/escuro, no labirinto elevado em cruz e no teste de interação com o objeto novo (KELLEY, BRATT e HODGE, 2003).

O subtipo 5-HT₄, como foi salientado acima, também está implicado na questão emocional (TURCO, 2013; MENDEZ-DAVID *et al.*, 2014). Apesar disso, trabalhos que relacionem o receptor a ansiedade ainda são escassos na literatura disponível para modelos animais. No trabalho de Chegini, Nasehi e Zarrindast (2014), em que o agonista R67333 (1 mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg) e o antagonista RS23597 (10 mg/kg, 20 mg/kg e 40 mg/kg) foram aplicados de maneira aguda na amígdala basolateral de camundongos brancos adultos (63-70 dias) não observou efeito sobre os comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto elevado em cruz (CHEGINI, NASEHI e ZARRINDAST, 2014). Em outro estudo com camundongos adultos (C57BL/6Ntac – 105-112 dias), o papel do receptor 5-HT₄ foi analisado após a exposição crônica a corticosterona (modelo conhecido por induzir o comportamento relacionado à ansiedade) (MENDEZ-DAVID *et al.*, 2014). Para tanto, um agonista, o RS67333 (1,5 mg/kg/dia durante 28 dias) e um antagonista, o GR125487 (1 mg/kg/dia durante 28 dias), foram utilizados ao final das quatro semanas de aplicação da corticosterona (MENDEZ-DAVID *et al.*, 2014). No campo aberto, o RS67333 foi capaz de aumentar o tempo gasto na área central do teste (MENDEZ-DAVID *et al.*, 2014). Por outro lado, o GR125487 não produziu efeitos sobre os parâmetros relacionados à ansiedade

(MENDEZ-DAVID *et al.*, 2014). Entretanto, quando o antagonista foi associado à fluoxetina, o efeito “ansiolítico” observado no grupo exposto a fluoxetina não foi observado (MENDEZ-DAVID *et al.*, 2014). O papel da expressão desse receptor no hipocampo sobre o comportamento emocional também foi avaliado em camundongos knock-out para o receptor 5-HT₄ (KARAYOL *et al.*, 2021). Houve elevação no comportamento relacionado à ansiedade basal no campo aberto e no paradigma de alimentação suprimida pela novidade (KARAYOL *et al.*, 2021).

Como foi dito acima, o efeito que o receptor 5-HT₆ tem sobre o comportamento relacionado à ansiedade já foi demonstrado. Geng e colaboradores (2018), por exemplo, revelaram que a administração intracerebroventricular do agonista EMD386088 e do antagonista SB271046 no córtex pré-frontal dorsomedial influencia a emocionalidade de maneira diferente (GENG *et al.*, 2018). Enquanto o agonista diminuiu o comportamento relacionado à ansiedade no campo aberto, no labirinto elevado em cruz e no teste de interação social, o antagonista teve efeito oposto (GENG *et al.*, 2018). Esse mesmo agonista, nas doses de 10 e 20 µg, reduziu o comportamento relacionado à ansiedade no labirinto elevado em cruz e no teste de Vogel após a aplicação intra-hipocampal (NIKIFORUK, KOS e WESOŁOWSKA, 2011). De maneira similar, a administração subcutânea de dois agonistas (WAY-208466 e WAY-181187 – 2 ml/kg) diminuiu o comportamento relacionado à ansiedade quando ratos machos Sprague-Dawley foram expostos aos testes de enterrar defensivo e de hipofagia induzida pela novidade (CARR, SCHECHTER e LUCKI, 2011). O antagonista SB-399885 (1-3 mg/kg, i.p.), por sua vez, diminuiu o comportamento emocional (ratos machos Wistar) no teste do beber punido de Vogel (1,0 e 3,0 mg/kg de peso) e no labirinto elevado em cruz (0,3; 1,0; 3,0 mg/kg de peso) (WESOŁOWSKA e NIKIFORUK, 2007).

Por fim, o receptor 5-HT₇, assim com o subtipo 4, ainda não foi muito estudado quanto ao seu papel sobre o comportamento relacionado à ansiedade. Na verdade, esse receptor serotoninérgico parece ser mais relevante para o tratamento da depressão [para mais informações, ler os artigos: (ROBERTS *et al.*, 2004; HEDLUND *et al.*, 2005; ABBAS *et al.*, 2009; SARKISYAN, ROBERTS e HEDLUND, 2010). A administração intra-hipocampal do antagonista SB269970 (0,3; 1 e 3 µg) revelou diminuição no comportamento relacionado à ansiedade quando os ratos foram expostos ao teste do beber punido de Vogel (WESOŁOWSKA, NIKIFORUK e STACHOWICZ, 2006). O mesmo grupo de pesquisa revelou que camundongos adultos da linhagem albina Swiss (24-28g) foram menos emocionais para algumas doses (0,5 mg/kg e 1 mg/kg) (WESOŁOWSKA, NIKIFORUK e

STACHOWICZ, 2006). Esse resultado foi observado no labirinto elevado em cruz, em que ambas as doses aumentaram a porcentagem de entradas nos braços abertos, enquanto o tempo gasto nesses braços foi maior apenas para dose de 0,5 mg/kg (WESOŁOWSKA *et al.*, 2006). Guscott e colaboradores (2005) investigaram o papel desse receptor sobre o comportamento relacionado à ansiedade em camundongos knock-out (GUSCOTT *et al.*, 2005). Não houve diferença para os parâmetros avaliados no labirinto elevado em cruz (GUSCOTT *et al.*, 2005).

Como demonstrado acima, a procura pelo papel dos receptores serotoninérgicos sobre a ansiedade motiva a comunidade científica (RAMBOZ *et al.*, 1995; PINHEIRO *et al.*, 2002; WESOŁOWSKA *et al.*, 2006; RICHARDSON-JONES *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012; VICENTE e ZANGROSSI, 2012; CHEGINI, NASEHI e ZARRINDAST, 2014; MENDEZ-DAVID *et al.*, 2014; KJAERBY *et al.*, 2016; NAUTIYAL *et al.*, 2016). Mais do que isso, o conhecimento produzido oferece embasamento teórico para o desenvolvimento de fármacos capazes de modular a atividade desses receptores e, conseqüentemente, aliviar os sintomas dos distúrbios psiquiátricos. Outros agentes farmacológicos que atuem sobre o sistema serotoninérgico podem agir sobre o armazenamento, a síntese e a recaptação da serotonina (NADAL-VICENS, CHYUNG e TURNER, 2008). Os principais efeitos da manipulação dos receptores serotoninérgicos, observados pelos estudos incluídos nessa revisão, estão ilustrados na Figura 5.

Figura 5 – Influência dos receptores serotoninérgicos sobre o comportamento relacionado à ansiedade



Fonte: Carolina Cavalcanti (2022)

Além de investigar o papel de cada um dos receptores serotoninérgicos sobre o comportamento relacionado à ansiedade, outro componente desse sistema de neurotransmissão, comumente avaliado pelos laboratórios, é o transportador de serotonina (SERT). De acordo com o modelo funcional do transportador de serotonina, o primeiro passo da recaptação ocorre quando um íon sódio se liga à proteína transportadora (SGHENDO e MIFSUD, 2012). A serotonina, então, em sua forma protonada (5-HT^+), se liga ao transportador, seguido por um íon cloreto (SGHENDO e MIFSUD, 2012). Os íons cloreto não são necessários para que ocorra a ligação da serotonina protonada, mas são necessários para que o transporte líquido ocorra (SGHENDO e MIFSUD, 2012). O complexo formado pela serotonina, por um íon sódio e por um íon cloreto atua na estrutura da proteína transportadora (SGHENDO e MIFSUD, 2012). A proteína, que inicialmente está voltada para fora do neurônio, move-se para uma posição interna, onde o neurotransmissor e os íons são liberados no citoplasma do neurônio (SGHENDO e MIFSUD, 2012). Em seguida, um íon potássio intracelular se liga ao SERT para promover a reorientação do transportador para outro ciclo de transporte (SGHENDO e MIFSUD, 2012). O sítio de ligação desocupado fica, então, mais uma vez, exposto ao exterior da célula e o íon potássio é liberado para fora da célula (SGHENDO e MIFSUD, 2012).

Essa recaptação sináptica pode, no entanto, ser influenciada pela administração de fármacos como os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), que bloqueiam a ação do SERT, aumentando a quantidade de serotonina na fenda sináptica (SGHENDO e MIFSUD, 2012). Assim como a ligação de substratos, a ligação do antagonista aos transportadores de serotonina também depende dos íons sódio extracelulares, embora a dependência do íon seja diferente para cada antagonista (SGHENDO e MIFSUD, 2012). Não está claro, entretanto, se esses inibidores se ligam ao mesmo domínio que a serotonina ou se operam através de mecanismos mais indiretos (SGHENDO e MIFSUD, 2012). Além disso, é importante deixar claro que os ISRS parecem se ligar ao transportador de serotonina com taxas de ocupação similares, mas com duração e potência diferentes (SGHENDO e MIFSUD, 2012). Em doses terapêuticas mínimas, por exemplo, a taxa de ocupação do SERT excede 80% para fármacos como sertralina, paroxetina e fluoxetina (SGHENDO e MIFSUD, 2012). No entanto, o tempo de ocupação do transportador é significativamente menor para sertralina e paroxetina, durando cerca de 40 horas, do que para fluoxetina, que é de aproximadamente 50 horas (SGHENDO e MIFSUD, 2012).

Com relação ao efeito da administração de IRSR sobre o comportamento, seu uso como ansiolítico é amplamente difundido na literatura [para mais informações, ler a revisão de Prut e Belzung de (2003)]. Apesar disso, os resultados obtidos ao longo dos anos são bastante contraditórios para os IRSR (PRUT e BELZUNG, 2003). A fluoxetina, por exemplo, pode apresentar efeito “ansiolítico”, “ansiogênico” ou pode ainda não ter efeito sobre o comportamento (GRIEBEL *et al.*, 1999; RODRIGUES-FILHO e TAKAHASHI, 1999; BELZUNG *et al.*, 2001; DRAPIER *et al.*, 2007; BALU *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2010; ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015). Essa controvérsia pode ser fruto dos protocolos experimentais adotados pelos grupos de pesquisa, que variam desde a dose aplicada até o tempo de exposição ao fármaco (agudo ou crônico) (DURAND *et al.*, 1999; DULAWA *et al.*, 2004; SORREGOTTI *et al.*, 2013; AMODEO *et al.*, 2015; MCAVOY *et al.*, 2015).

A aplicação aguda da fluoxetina para análise do comportamento relacionado à ansiedade pode resultar em animais com características comportamentais similares ou contraditórias (GRIEBEL *et al.*, 1999; RODRIGUES-FILHO e TAKAHASHI, 1999; BELZUNG *et al.*, 2001; DRAPIER *et al.*, 2007; BALU *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2010; ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015). Ratos Wistar machos adolescentes (pesando entre 200-300g) apresentaram aumento no comportamento relacionado à ansiedade no labirinto elevado em cruz (fluoxetina 5mg/kg e 10mg/kg – dose injetada 30 minutos antes do teste), passando menos tempo nos braços abertos do aparelho (DRAPIER *et al.*, 2007). No paradigma da exploração livre, a fluoxetina (5mg/kg) quando aplicada em machos Wistar adolescentes (60-90 dias) 30 minutos antes do teste teve efeito “ansiogênico”, passando menos tempo no ambiente novo do aparato (ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015). De forma similar, Camundongos adultos BALB/c (56 dias) sujeitos ao paradigma da exploração livre 30 minutos após a manipulação farmacológica (fluoxetina 20mg/kg) tiveram aumento no comportamento relacionado à ansiedade (BELZUNG *et al.*, 2001). Foi observada diminuição na proporção de tempo gasto nas unidades novas do teste e redução no número de transição entre as unidades (BELZUNG *et al.*, 2001). Ademais, camundongos adultos (C57BL/6J – 63-70 dias) expostos ao labirinto elevado em cruz 30 minutos depois da aplicação do fármaco (fluoxetina 10 mg/kg) exibiram comportamentos considerados “ansiogênicos” (LIU *et al.*, 2010). Isso porque houve diminuição no tempo total e na porcentagem de entrada nos braços abertos (LIU *et al.*, 2010).

Em oposição aos resultados descritos acima, machos adolescentes da linhagem Wistar-Kyoto (pesando entre 180-280g), testados no labirinto elevado em cruz, um dia depois da

injeção do fármaco (fluoxetina 20mg/kg), apresentaram diminuição das respostas comportamentais relacionadas à ansiedade (GRIEBEL *et al.*, 1999). Houve aumento do tempo gasto nos braços abertos, mais *head-dippings* (movimento descendente da cabeça para fora dos braços abertos) e menos tentativas de aproximação dos braços abertos seguida de comportamento de evitação (GRIEBEL *et al.*, 1999).

No trabalho de Balu e colaboradores (2008), os níveis de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) de ratos Sprague-dawley (pesando entre 250-275g) não foram diferentes quando a análise foi feita 24 horas após a injeção de uma dose de 10 mg/kg (BALU *et al.*, 2008). Além disso, a primeira exposição de machos Wistar adolescentes (60-90 dias) ao paradigma da exploração livre, 30 minutos depois da aplicação da dose de fluoxetina (0,5 mg/kg), não trouxe resultados para nenhum dos parâmetros avaliados (ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015). Quando camundongos machos adultos da linhagem Swiss (pesando entre 30-40g) foram submetidos a diferentes doses de fluoxetina (5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg), a exposição ao labirinto 30 minutos depois da aplicação do fármaco não teve efeito (RODRIGUES-FILHO e TAKAHASHI, 1999). De maneira semelhante, a injeção de fluoxetina (10 mg/kg) em camundongos adultos (c57BL/6J – 63-70 dias), 30 minutos antes do teste, não alterou o comportamento animal relacionado à ansiedade no campo aberto (LIU *et al.*, 2010).

Por sua vez, o uso crônico da fluoxetina em roedores também produziu efeitos discrepantes para o comportamento de trabalho para trabalho (DURAND *et al.*, 1999; GRIEBEL *et al.*, 1999; DULAWA *et al.*, 2004; BALU *et al.*, 2008; SORREGOTTI *et al.*, 2013; AMODEO *et al.*, 2015; MCAVOY *et al.*, 2015). Ratos Sprague-dawley adolescentes (45 dias) de ambos os sexos tratados com fluoxetina (10 mg/kg/dia e 20 mg/kg/dia durante 10 dias) apresentaram aumento de comportamento relacionado à ansiedade na caixa de transição claro-escuro (AMODEO *et al.*, 2015). Ademais, o grupo que recebeu a dose de 20 mg/Kg também apresentou aumento no comportamento relacionado à ansiedade no labirinto elevado em cruz, pois diminuiu o tempo gasto nos braços abertos e o número de *head-dippings* (AMODEO *et al.*, 2015). No estudo de Durand e colaboradores (1999), o tratamento com fluoxetina (5mg/kg/dia) durante 13 dias alterou a resposta emocional na linhagem WKY, 30 horas depois da aplicação (56-63 dias) (DURAND *et al.*, 1999). Houve diminuição no número total de entradas nos braços do labirinto e aumento no número de entradas nos braços fechados, o que indica menor locomoção e maior emocionalidade, respectivamente (DURAND *et al.*, 1999). O aumento no comportamento emocional também foi observado em ratos Sprague-Dawley (250-275g) submetidos à fluoxetina na dose de 10m/kg por 21 dias,

através do maior nível de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) no córtex frontal, um dia após a última aplicação (BALU *et al.*, 2008). De maneira semelhante, ratas transgênicas velhas (300-330 dias) submetidas à fluoxetina (18mg/kg/dia) durante 28 dias foram mais emocionais no campo aberto, no labirinto elevado em cruz e na caixa de transição claro-escuro (MCAVOY *et al.*, 2015).

Contrapondo os resultados descritos acima para aplicação crônica de fluoxetina, em machos Wistar-Kyoto adolescentes (pesando entre 180-280g), a manipulação farmacológica durante um período de 21 dias (fluoxetina 20mg/kg/dia) diminuiu o comportamento relacionado à ansiedade (GRIEBEL *et al.*, 1999). Tal resultado foi expresso pela diminuição no número de tentativas de aproximação dos braços abertos seguido de comportamento aversivo no labirinto elevado em cruz (dose final aplicada 30 minutos ou 24 horas antes do teste comportamental) (GRIEBEL *et al.*, 1999). Esse parâmetro está associado à tomada de decisão e, portanto, quanto menos frequente, menor a indecisão do animal diante do braço aberto. O estudo desenvolvido por Sorregotti e colaboradores (2013) com camundongos Swiss adultos (25-35g) também observou diminuição no comportamento emocional (SORREGOTTI *et al.*, 2013). O tratamento com dose de fluoxetina de 20 mg/kg de peso durante 15 dias aumentou o número de *head-dippings* (SORREGOTTI *et al.*, 2013). Por fim, a aplicação de dose de 18mg/kg de fluoxetina durante 20 dias em camundongos BALB/c adultos (75-90 dias) aumentou a expressão de comportamentos associados a menor emocionalidade, como número de entradas na área central, distância central percorrida e relação distância central/total (DULAWA *et al.*, 2004).

Concluindo, a influência que a aplicação de fluoxetina tem sobre o comportamento animal não pode ser interpretada como definida e completamente elucidada (DURAND *et al.*, 1999; GRIEBEL *et al.*, 1999; RODRIGUES-FILHO e TAKAHASHI, 1999; BELZUNG *et al.*, 2001; DULAWA *et al.*, 2004; DRAPIER *et al.*, 2007; BALU *et al.*, 2008; SORREGOTTI *et al.*, 2013; ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015; AMODEO *et al.*, 2015; MCAVOY *et al.*, 2015). No entanto, isso não precisa ser interpretado como algo ruim, porque os resultados controversos encontrados nos modelos animais também podem ser vistos no tratamento clínico. O uso de fármacos com potencial ansiolítico nem sempre faz jus a essa característica, podendo ter efeito nulo ou oposto sobre a ansiedade. Essa divergência traduz o que cada um carrega dentro de si, a individualidade. Afinal, apesar de sermos da mesma espécie, cada ser é único e tem características próprias que o diferenciam de seus semelhantes.

2.5 Polifenóis e comportamento relacionado à ansiedade

Os polifenóis são um grupo grande e heterogêneo de fitoquímicos – mais de 8.000 compostos já foram identificados – que contêm anéis de fenol (PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009; GUASCH-FERRÉ *et al.*, 2017). Todos os compostos fenólicos de plantas surgem de um intermediário comum, a fenilalanina, ou de um precursor próximo, o ácido shiquímico (PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009). Eles ocorrem principalmente em formas conjugadas, com um ou mais resíduos de açúcar ligados a grupos hidroxila, embora existam ligações diretas do açúcar (polissacarídeo ou monossacarídeo) a um carbono aromático (PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009). Também é comum a associação com outros compostos, como ácidos carboxílicos e orgânicos, aminas, lipídios e ligação com outros fenóis (PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009). Os *polifenóis* podem ser classificados em diferentes grupos, de acordo com o número de anéis de fenol e com base em elementos estruturais que ligam esses anéis entre si (PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009). As principais classes incluem flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e lignanas (PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009; GUASCH-FERRÉ *et al.*, 2017). Frutas como maçãs, uvas, peras e bagas geralmente contêm grandes quantidades de *polifenóis* (200 a 300 mg por 100 g) (PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009). Os ácidos fenólicos mais comuns são o ácido cafeico e o ácido ferúlico, principais compostos fenólicos do café e dos cereais, respectivamente (PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009). Os estilbenos são encontrados apenas em pequenas quantidades na dieta humana e estão presentes em uvas, produtos de uva e vinho tinto (MANACH *et al.*, 2004; PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009). Outras fontes alimentares principais de *polifenóis* incluem vegetais, chocolate, chá, grãos integrais, legumes secos, nozes e azeite de oliva (PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009). Os *polifenóis*, assim como outros fenólicos alimentares, são objeto de crescente interesse científico, devido a seu possível efeito benéfico à saúde humana (PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009; JEANDET *et al.*, 2010; GUASCH-FERRÉ *et al.*, 2017).

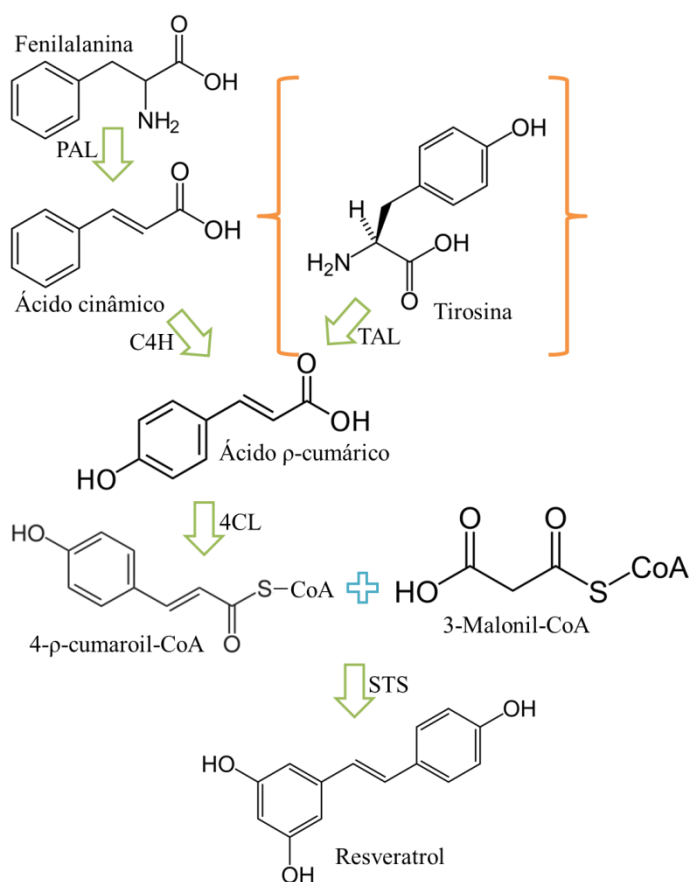
Os estilbenos ocorrem em famílias distantes de plantas superiores, incluindo Vitaceae (videira – uva), Pinaceae (pinheiro) e Fabaceae (ameioim) (SCHRÖDER, 1997; JEANDET *et al.*, 2010). Embora os polifenólicos exibam enorme diversidade química, os estilbenos parecem constituir um grupo de moléculas bastante restrito, caracterizado por duas porções fenis conectadas por uma ponte de metileno com dois carbonos (PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009; JEANDET *et al.*, 2010). O estilbeno mais estudado é o resveratrol (3,4', 5-trihidroxiestilbeno) e seu primeiro registro data de 1940, quando foi isolado a partir de raízes do heléboro branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) (BAUR e SINCLAIR, 2006;

PANDEY, RIZVI e LONGEVITY, 2009). Vinte e três anos depois, em 1963, o resveratrol foi encontrada em raízes de *Polygonum cuspidatum*, planta utilizada na medicina tradicional chinesa e japonesa (BAUR e SINCLAIR, 2006). Caracterizado inicialmente como fitoalexina – um composto tóxico produzido por plantas superiores em resposta a condições de estresse –, o resveratrol atraiu pouco interesse até 1992, quando foi reconhecido o efeito cardioprotetor do vinho tinto (BAUR e SINCLAIR, 2006). Desde então, diversos estudos demonstraram que o resveratrol pode impedir ou retardar a progressão de um grande leque de doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e lesões isquêmicas, além de aumentar a resistência ao estresse e prolongar a vida útil de vários organismos, da levedura aos vertebrados (BAUR e SINCLAIR, 2006). O consumo de resveratrol parece também ter efeitos antidepressivo e ansiolítico, propriedades interessantes ao considerarmos o aumento na prevalência desses transtornos no cenário mundial (ORGANIZATION, 2017).

Antes de detalhar os resultados promissores obtidos pelas pesquisas com roedores, é necessário, no entanto, descrever como o resveratrol é sintetizado na natureza, ou, mais especificamente, em algumas plantas. A biossíntese de compostos de resveratrol (Figura 6) é iniciada a partir de ácidos fenilpropanóides, que são derivados de aminoácidos aromáticos (WANG, YANG e YAN, 2018). Essa produção envolve quatro enzimas: a fenilalanina amônia liase (PAL), a ácido cinâmico 4 hidroxilase (C4H), a 4-cumarato:CoA ligase (4CL) e a estilbeno sintase (STS) (HALLS e YU, 2008). As duas primeiras enzimas, PAL e C4H, transformam o aminoácido fenilalanina em ácido p-cumárico (ácido 4-cumárico) (HALLS e YU, 2008). A terceira enzima, a 4CL, por sua vez, liga o ácido p-cumárico ao grupo panteteína da Coenzima-A (CoA) para produzir 4-coumaroil-CoA (HALLS e YU, 2008). Por último, a enzima final da via, a STS, catalisa a condensação do resveratrol a partir de uma molécula de 4-coumaroil-CoA e de três moléculas de malonil-CoA, que se originam da biossíntese de ácidos graxos (HALLS e YU, 2008). A STS é membro das sintases de policetídeos do tipo III e tem extensa homologia com a chalcona sintase (CHS) (HALLS e YU, 2008). A CHS é responsável pela formação de chalconas em muitas plantas superiores – as chalconas são moléculas iniciais para todos os compostos flavonóides (HALLS e YU, 2008). Embora a CHS seja comumente encontrada nas plantas, a STS está presente apenas em espécies que acumulam resveratrol e compostos relacionados (HALLS e YU, 2008). Portanto, a STS é essencial para a bioengenharia do resveratrol. Essa enzima existe como um homodímero – proteína composta por duas subunidades idênticas – solúvel cujo peso molecular é 40 kD (HALLS e YU, 2008). Semelhante a CHS, o sítio ativo interno possui uma tríade catalítica Cys-His-Asn conservada. Ambas as enzimas sintetizam o mesmo

intermediário policetídeo de cadeia longa (HALLS e YU, 2008). A análise estrutura-função sugere que a STS usa um mecanismo de troca aldólica para realizar de maneira região-específica a ciclização C2-C7, em vez da ciclização C6-C1 da CHS (HALLS e YU, 2008). Esta reação é seguida por hidrólise de tioéster para produzir resveratrol (HALLS e YU, 2008). Esse composto existe em duas estereoisôformas com configuração *cis*- ou *trans*-, sendo esta última a mais amplamente estudada, embora o resveratrol *cis* também possua propriedades promotoras da saúde (GIOVINAZZO *et al.*, 2012).

Figura 6 – Biossíntese de resveratrol (adaptada de Halls e Yu, 2008)



As enzimas envolvidas na síntese do resveratrol são fenilalanina amônia liase (PAL), cinamato-4-hidroxilase (C4H) – que pode ser substituída por uma única enzima tirosina amônia liase (TAL) – 4-cumarato-CoA ligase (4CL) e estilbeno sintase (STS). STS e chalcona sintase (CHS) compartilham os mesmos substratos e intermediários, mas produzem resveratrol através de uma condensação aldólica C2->C7, ou chalcona através de uma condensação Claisen C6->C1, respectivamente.

Com relação ao seu papel “ansiolítico”, estudos com roedores já demonstraram que a administração de resveratrol pode ter efeito benéfico sobre o comportamento emocional através de diferentes protocolos experimentais. Por exemplo, o trabalho realizado por Zhu e

colaboradores (2019), com camundongos machos ICR (PND84-PND112), expostos ao estresse crônico imprevisível (CUS) durante 12 dias, revelou que a administração i.p. e i.g. de resveratrol nas doses de 5 e 10 mg/kg de peso diminuiu o comportamento relacionado à ansiedade (ZHU *et al.*, 2019). Esse resultado foi expresso pelo aumento na porcentagem de entradas e do tempo gasto nos braços abertos do labirinto elevado em cruz quando comparado ao grupo veículo + CUS (ZHU *et al.*, 2019). Em um modelo animal clássico de transtorno de estresse pós-traumático, conhecido como procedimento de sensibilização dependente do tempo (TDS), a administração crônica de resveratrol, durante 18 dias, via i.g. nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg foi avaliada para seus efeitos sobre o comportamento (LI *et al.*, 2018). De maneira resumida, o procedimento de TDS foi conduzido da seguinte maneira: no primeiro dia, cada rato foi imobilizado dentro de um dispositivo de contenção (um cone de polietileno transparente) por 2 h (LI *et al.*, 2018). A extremidade do cone foi fechada apenas permitindo a passagem da cauda (LI *et al.*, 2018). A cabeça do cone tinha um buraco que permitia que os ratos respirassem livremente (LI *et al.*, 2018). Ao término da restrição, os ratos foram submetidos ao nado forçado por 20 minutos em um cilindro de vidro transparente (24 cm de diâmetro, 50 cm de altura) preenchido com água limpa (25° C) até 2/3 de sua altura (LI *et al.*, 2018). Os ratos foram então expostos a éter dietílico até perderem a consciência 15 min após a natação forçada (LI *et al.*, 2018). Durante uma semana, os ratos foram deixados em recuperação sem serem perturbados (LI *et al.*, 2018). No dia 7, os ratos foram submetidos a um breve estresse (natação forçada por 20 min) (LI *et al.*, 2018). Entre os dias 15 e 18, os ratos foram avaliados em três testes diferentes (ex.: paradigma do medo contextual, atividade locomotora e labirinto em cruz elevado), uma hora após a administração da droga (LI *et al.*, 2018). A dose média aumentou a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto elevado em cruz, enquanto a maior dose aumentou o tempo gasto no centro do campo aberto, e a porcentagem de tempo e o número de entradas nos braços abertos (LI *et al.*, 2018).

Outro protocolo utilizado para avaliar o comportamento relacionado à ansiedade envolve a deficiência de estrogênio, induzida pela remoção dos ovários (LIU *et al.*, 2019). Quando a ooforectomia foi associada ao tratamento com resveratrol via i.p., durante duas semanas, na dose de 20 mg/kg de peso, houve diminuição no comportamento relacionado à ansiedade (LIU *et al.*, 2019). Camundongos ovariectomizados se locomoveram menos no campo aberto – apresentaram menor distância percorrida – do que o grupo controle (LIU *et al.*, 2019). No entanto, essa redução foi revertida pela administração de resveratrol (LIU *et al.*, 2019). De maneira semelhante, o tempo gasto no centro – menor para o grupo – também foi recuperado pelo tratamento crônico com resveratrol (LIU *et al.*, 2019). No labirinto elevado

em cruz e na caixa de transição claro-escuro, a aplicação de resveratrol também ajudou a reverter os efeitos da ooforectomia, resultado expresso pelo aumento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e pela diminuição no tempo gasto na área escura (LIU *et al.*, 2019).

O estudo de Hu e colaboradores (2016) avaliou o efeito do resveratrol sobre o comportamento relacionado à ansiedade quando os animais foram previamente expostos à cocaína (HU *et al.*, 2016). Brevemente, ratos Sprague-Dawley machos, entre 280-300 g, foram injetados com cocaína (10 mg / kg, i.p.) ou solução salina (1 ml/kg, i.p., controle) de D2 a D7, uma vez por dia (HU *et al.*, 2016). De D8 a D22, os animais não receberam aplicação, sendo, por isso, considerado um período de abstinência (HU *et al.*, 2016). Durante 11 dias (de D10 a D20), os grupos foram novamente subdivididos, desta vez de acordo com a administração de veículo (1 ml/kg, s.c.) ou de resveratrol (90 mg/kg, s.c.) (HU *et al.*, 2016). No D22, os animais foram submetidos ao teste comportamental de labirinto elevado em cruz (HU *et al.*, 2016). A administração de resveratrol na dose de 90 mg/kg de peso aumentou significativamente o tempo (%) e o número de entradas nos braços abertos do grupo tratado com cocaína, sugerindo diminuição no comportamento relacionado à ansiedade (HU *et al.*, 2016). Outro protocolo utilizado para avaliar o efeito do resveratrol sobre o comportamento foi um modelo animal para síndrome do intestino irritável, induzido pelo procedimento de estresse agudo-crônico combinado (CACS) (YU *et al.*, 2019b). Brevemente, os ratos tratados com CACS receberam estresse crônico imprevisível aleatoriamente por 22 dias consecutivos, incluindo privação de comida por 24 h, privação de água por 24 h, natação em água fria a 4°C por quatro minutos, pinça de cauda por três minutos, iluminação noturna, e alojamento em gaiola molhada por seis horas (YU *et al.*, 2019b). No dia 22, todos os ratos, exceto o grupo controle, receberam três horas de estresse de contenção aguda (YU *et al.*, 2019b). Como consequência desse procedimento, o grupo veículo + CACS apresentou aumento no comportamento relacionado à ansiedade no teste de enterrar “bolinhas de gude” quando comparado ao grupo veículo + controle (YU *et al.*, 2019b). Entretanto, a administração crônica de resveratrol, nas doses de 20 e 40 mg/kg de peso corporal, via i.g., durante 22 dias, normalizou o número de “bolinhas de gude” enterradas – houve diminuição quando comparado ao grupo veículo + CACS (YU *et al.*, 2019b).

O grupo liderado Lv (2021) avaliou o efeito que a administração crônica de resveratrol tem sobre o comportamento relacionado à ansiedade em um modelo experimental que mimetiza a dor lombar (LV *et al.*, 2021). De maneira resumida, camundongos adulto-jovens foram anestesiados e submetidos à cirurgia de instabilidade da coluna lombar pela ressecção

dos processos espinhosos do 3º ao 5º lombar e dos ligamentos interespinhoso e supraespinhoso (LV *et al.*, 2021). Um dia após a cirurgia, o resveratrol na dose de 40 mg/kg de peso foi administrado via i.p. durante duas, quatro e oito semanas (LV *et al.*, 2021). Os testes comportamentais utilizados foram o campo aberto e o labirinto elevado em cruz (LV *et al.*, 2021). A administração de resveratrol durante oito semanas aumentou a porcentagem de tempo gasto na área central do campo aberto e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto elevado em cruz, o que sugere diminuição no comportamento emocional (LV *et al.*, 2021).

Ge e colaboradores (2016), por sua vez, avaliaram o efeito do resveratrol sobre o comportamento relacionado à ansiedade a partir de um modelo animal de hipotireoidismo subclínico (SCH) (GE *et al.*, 2016). Resumidamente, 33 ratos foram submetidos à eletrocauterização hemitireoidiana, e oito ratos controle foram submetidos à mesma operação, mas os tecidos da tireoide foram expostos sem eletrocauterização (GE *et al.*, 2016). A taxa de sucesso do modelo SCH foi avaliada duas semanas depois, de acordo com o critério de a concentração plasmática de TSH ser superior ao percentil 97,5 do grupo controle e de o nível plasmático de fT4 estar entre o percentil 2,5 e 97,5 do grupo controle (GE *et al.*, 2016). Com relação ao tratamento farmacológico, os ratos Sprague-Dawley adulto-jovens receberam uma aplicação de resveratrol intragástrica na dose de 15 mg/kg de peso durante 16 dias (GE *et al.*, 2016). No campo aberto, o modelo de SCH diminuiu a distância percorrida e o número de *rearing*, enquanto a administração de resveratrol aliviou esses efeitos (GE *et al.*, 2016).

Por fim, o estudo conduzido por Reddy (2016) expôs ratos Sprague-Dawley à dieta rica em frutose durante oito semanas (56 dias) para induzir a condição pré-diabética (REDDY *et al.*, 2016). De maneira breve, o grupo controle foi alimentado com 65% de dieta de amido de milho e o grupo resistente à insulina alimentado com frutose, ou seja, o grupo diabético foi alimentado com 65% de frutose (REDDY *et al.*, 2016). Um terceiro grupo (Diab + Resv) foi alimentado com 65% de frutose juntamente com uma dose única de 10 mg/kg/dia de resveratrol por via oral (REDDY *et al.*, 2016). O grupo diabético revelou aumento no comportamento relacionado à ansiedade nos testes de campo aberto e na caixa de transição claro-escuro quando comparado ao grupo controle (REDDY *et al.*, 2016). No entanto, a administração crônica de resveratrol via oral, na dose de 10 mg/kg/dia, resgatou o tempo gasto na área central e o tempo gasto na área clara – houve aumento em ambos os parâmetros (REDDY *et al.*, 2016).

Como pôde ser visto acima, o comportamento relacionado à ansiedade pode ser influenciado por diversos insultos ambientais. De maneira semelhante, os mecanismos por

trás dessas alterações comportamentais podem residir em um conjunto de diferentes fatores. É sabido, por exemplo, que a exposição a situações estressantes ativa o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), aumentando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e da corticosterona (GRAEFF, 2007). Essa resposta ao insulto é crucial para a melhor adaptação do organismo ao ambiente, sendo conhecida como reações de luta ou fuga (GRAEFF, 2007). A exposição a testes comportamentais, como, por exemplo, o teste de nado forçado, ativa o eixo HPA e aumenta os níveis de corticosterona sérica. No entanto, a administração sub- e crônica de resveratrol (80 mg/kg de peso, i.p., durante 5 e 21 dias) diminuiu o nível de corticosterona presente no soro (WANG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014). De maneira similar, Ge e colaboradores encontraram diminuição nos níveis plasmáticos de corticosterona e redução na expressão hipotalâmica de mRNA do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (GE *et al.*, 2016). No estudo conduzido por Li (2018), por sua vez, a oferta de resveratrol diminuiu o nível de CRH e resgatou a expressão diferencial do receptor de glicocorticoide (GR) no hipotálamo, hipocampo e amígdala (LI *et al.*, 2018). Esse receptor está associado à exacerbação do eixo HPA e aumenta a resposta mediada pela corticosterona ao estresse (JOËLS *et al.*, 2008).

O papel inflamatório dos receptores glicocorticoides no cérebro foi recentemente estudado (SORRELLS *et al.*, 2009). Em situações de estresse crônico, por exemplo, a ativação desses receptores é necessária para aumentar a resposta inflamatória encefálica (SORRELLS *et al.*, 2009). Para que isso aconteça, no entanto, o aumento na expressão de fatores pró-inflamatórios como, por exemplo, as citocinas IL-1 β e TNF- α , é imprescindível (SASAKI *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2014). A expressão desses fatores está associada a fatores de transcrição, como, por exemplo, o fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) que controla diferentes genes ligados à resposta inflamatória. O modelo animal de depressão induzida por administração de lipopolissacarídeo (LPS), por exemplo, aumentou os níveis de IL-1 β e TNF α no córtex pré-frontal, no hipocampo e em cocultura microglial-neuronal (BUREAU, LONGPRE e MARTINOLI, 2008; GE *et al.*, 2016). No entanto, a administração crônica de resveratrol reduziu esses valores, normalizando a expressão de ambos os marcadores pró-inflamatórios nas regiões avaliadas (BUREAU, LONGPRE e MARTINOLI, 2008; GE *et al.*, 2016). Esse efeito pode estar relacionado à recuperação dos níveis normais de NF- $\kappa\beta$ no córtex pré-frontal e no hipocampo (GE *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016). Em um protocolo experimental de “depressão” e “ansiedade” – induzidas por deficiência de estrogênio –, por sua vez, o resveratrol suprimiu a produção de citocinas inflamatórias aumentando os níveis de sirtuina 1 (Sirt1) – enzima histona desacetilase dependente de NAD⁺, que regula as vias de

resposta ao estresse (YAMAKUCHI, 2012; LIU *et al.*, 2019). Além disso, é sabido que as sirtuinas regulam diversas famílias de fatores de transcrição, incluindo NF- κ B (OKAWARA *et al.*, 2007). Reddy e colaboradores, por sua vez, também revelaram que o resveratrol diminuiu o comportamento emocional a partir da regulação positiva das sirtuinas 1 e 7 (REDDY *et al.*, 2016). Outros dois estudos também observaram efeito positivo do tratamento com resveratrol sobre o comportamento através da ativação da via relacionada à sirtuina (LV *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2021). O efeito do resveratrol também foi avaliado em animais adultos expostos à dieta hiperlipídica antes, durante e depois da lactação (YU *et al.*, 2019a). O nível plasmático elevado de TNF α – produzido pelo consumo de dieta rica em lipídio – foi reduzido pela oferta de resveratrol (YU *et al.*, 2019a). Por fim, em um procedimento de aterosclerose-induzida por dieta, houve aumento no nível sérico de IL-6 (CHANG *et al.*, 2015). No entanto, quando a dieta rica em colesterol foi associada à oferta de resveratrol na dose de 25 mg/kg/dia, o nível IL-6 foi normalizado (CHANG *et al.*, 2015).

Outro mecanismo por trás dessas alterações comportamentais está relacionado à família de fatores neurotróficos, como, por exemplo, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). A administração crônica de resveratrol normalizou o nível de BDNF em diferentes regiões do encéfalo. Houve aumento na expressão do BDNF no hipocampo (WANG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2019a; WANG *et al.*, 2021), no córtex pré-frontal (WANG *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016), na amígdala (LIU *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2018), no hipotálamo (LI *et al.*, 2018) e no tecido cerebral como um todo (GU, CHU e HAN, 2019). O nível sérico de leptina também foi influenciado pela administração crônica de resveratrol (FRANCO *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2019a; LIU *et al.*, 2020). Em estudos que utilizaram dieta hiperlipídica e/ou hiperglicídica no início da vida e/ou no período pós-desmame, o aumento no nível plasmático de leptina foi normalizado após o tratamento com resveratrol (FRANCO *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2019a; LIU *et al.*, 2020).

Por fim, alterações nos sistemas dopaminérgico, endocanabinóide, e serotoninérgico podem estar associados ao comportamento emocional. Uma série de estudos, por exemplo, demonstrou que a administração de determinadas doses de resveratrol aumentou o nível de dopamina em diferentes regiões do encéfalo (XU *et al.*, 2010; AHMED *et al.*, 2014; GU, CHU e HAN, 2019). Além disso, o resveratrol preveniu a diminuição no número de neurônios dopaminérgicos (OKAWARA *et al.*, 2007) e reduziu a morte apoptótica mediada por inflamação de células neuronais desse sistema (BUREAU, LONGPRE e MARTINOLI, 2008). Com relação ao sistema endocanabinóide, Hassanzadeh e colaboradores (2016) revelaram aumento nos níveis de anandamida (AEA) e 2 araquidonilglicerol (2-AG) em

regiões do encéfalo, como, por exemplo, córtex frontal, hipocampo e amígdala, quando a análise foi feita uma, cinco e 12 horas depois da última dose (HASSANZADEH *et al.*, 2016). Por fim, o sistema serotoninérgico também é influenciado pela ação do resveratrol. Um estudo revelou aumento nos níveis de serotonina (5-HT) e regulação negativa na expressão de mRNA do transportador de 5-HT (SERT) no hipocampo (SHEN *et al.*, 2020). De maneira semelhante, Ahmed e colaboradores (2014) encontraram aumento na concentração de 5-HT. Esse aumento também foi observado pelo estudo conduzido por Xu e colaboradores. Os mesmos autores também revelaram diminuição na atividade da monoamina oxidase A (MAO-A), enzima responsável pela degradação da serotonina (XU *et al.*, 2010). Além disso, o resveratrol também pode agir sobre outros componentes desse sistema de neurotransmissão. Os grupos liderados por Yu (2019a) e Zhao (2014), por exemplo, demonstraram que o efeito do resveratrol envolve a ativação de receptores 5-HT_{1A} (ZHAO *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2019a). Lee e colaboradores, por sua vez, relataram que a atividade no canal do receptor 5-HT_{3A} é regulada pelo resveratrol via interação com o domínio N-terminal, local onde provavelmente ocorre a interação com a serotonina (LEE *et al.*, 2011).

Como pôde ser visto acima, a exposição a um insulto ambiental seguido pela administração de resveratrol diminuiu o comportamento relacionado à ansiedade. No entanto, não é de nosso conhecimento estudos que avaliem se esses resultados sobre o comportamento relacionado à ansiedade se estendem a prole adulto-jovem exposta à dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação.

3 Hipótese

A exposição materna à dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação aumenta a expressão de BDNF, de fatores pró-inflamatórios, da enzima triptofano hidroxilase-2 e dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}, assim como favorece a expressão do comportamento relacionado à ansiedade na prole adulto-jovem. Esses efeitos são amenizados pela administração crônica de fluoxetina e de resveratrol no período pós-desmame.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do uso crônico de fluoxetina ou de resveratrol no período pós-desmame sobre o comportamento relacionado à ansiedade sobre respostas moleculares centrais em ratos adulto-jovens provenientes de mães expostas à dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar revisão sistemática sobre a influência que a exposição materna à dieta hiperlipídica tem sobre a atividade locomotora da prole, avaliada dentro de testes relacionados à ansiedade.
- Avaliar em animais provenientes de mães expostas à dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação e submetidos no período pós-desmame ao tratamento crônico com fluoxetina ou resveratrol:
 - Desenvolvimento somático;
 - Resposta comportamental a testes de ansiedade-estado;
 - Expressão gênica de componentes do sistema serotoninérgico – a enzima TPH-2 e os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} – e de fatores relacionados à inflamação.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Revisão sistemática

O protocolo para a revisão sistemática foi publicado no SYRCLE e encontra-se no ANEXO A.

5.2 Questões éticas

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), processo nº 0046/2019 (ANEXO B). A manipulação e os cuidados para com os animais seguiram as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal (CONCEA).

5.3 Animais

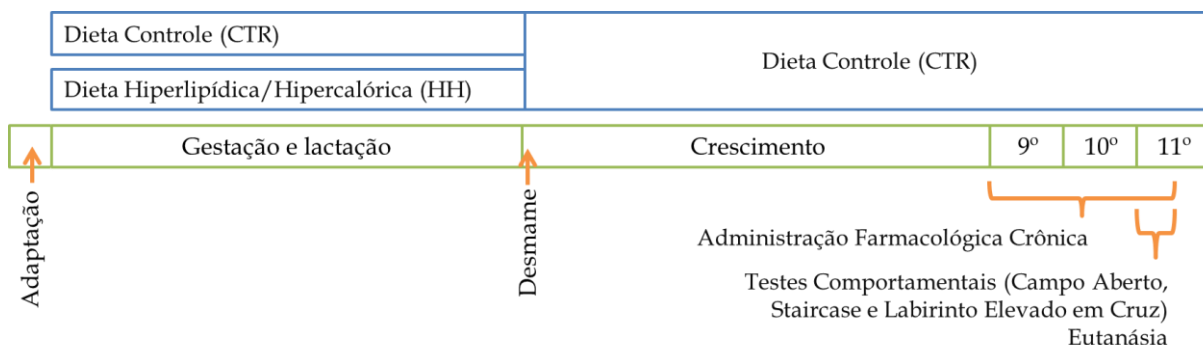
Foram utilizadas 27 ratas albinas da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A seleção das ratas foi feita utilizando-se alguns critérios: 1) possuir idade entre 90 e 150 dias de vida, 2) apresentar peso entre 200 e 250 gramas e 3) ser nulípara. Tais cuidados foram adotados para minimizar possíveis influências genéticas e fisiológicas sobre os resultados (BENTO-SANTO *et al.*, 2012).

Os animais foram mantidos em biotério de experimentação com temperatura de $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ em um ciclo de luz invertido de 12 h [ciclo claro (20:00 às 08:00) e ciclo escuro (08:00 às 20:00)]. Água filtrada e ração foram ofertadas *ad libitum*. Após o período de adaptação ao ciclo de luz, os roedores foram alocados para gaiolas-padrão de biotério de polipropileno (33x40x17 cm) para acompanhamento do ciclo estral através do esfregaço vaginal. No período estro, as ratas foram postas para acasalar (2 fêmeas/1 macho), sendo separadas do macho depois da confirmação da gestação através da presença de espermatozoide na cavidade vaginal. Durante todo o período de gestação e lactação, as ratas tiveram livre acesso à água filtrada e à dieta experimental.

Um dia após o nascimento, os neonatos foram pesados e selecionados, sendo escolhido o maior número de machos. A ninhada foi ajustada para oito filhotes e as fêmeas foram utilizadas para completá-la quando necessário. Filhotes supranumerários foram sacrificados por decapitação. Os neonatos foram amamentados durante os 21 dias pós-natal (período da lactação), sendo expostos as dietas experimentais através do leite materno e a partir da ingestão sólida da dieta ofertada. No 22º pós-natal, os filhotes foram separados das mães, sendo mantidos juntos (2-4 machos) até o final dos experimentos. Após o desmame,

todos os animais receberam a mesma dieta padrão de biotério (Presence – Purina®, Brasil). Para os procedimentos experimentais só foram considerados os filhotes machos. O desenho experimental do presente estudo está ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – Desenho experimental



Fonte: Carolina Cavalcanti (2022)

5.4 Manipulação nutricional

Para a manipulação dietética, foram utilizadas duas dietas: a dieta comercial e uma dieta hiperlipídica/hipercalórica, confeccionadas em parceria com o Laboratório de Nutrição Experimental e Dietética (LNED) do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (OLIVEIRA *et al.*, 2018). A suplementação de lipídio foi feita com banha animal. A composição de macronutrientes das dietas está disposta na tabela abaixo:

Tabela 1 – Composição de macronutrientes

VET por Macronutrientes	Controle AIN-93G	Hiperlipídica Hipercalórica
VET (kcal/g)	3,60	4,62
Proteína (% kcal VET)	19	19
Carboidrato (% kcal VET)	63	30
Lipídeo (% kcal VET)	18	51

Fonte: Carolina Cavalcanti (2022)

5.5 Avaliações somáticas

5.5.1 Avaliação de peso corporal e eixo longitudinal

O peso corporal dos animais foi avaliado no 1º, 5º, 9º, 13º, 17º, 21º, 28º, 35º, 42º, 49º e 56º dia de vida pós-natal, através de uma balança eletrônica digital – Marte, modelo S-1000, com capacidade máxima de 1000g e sensibilidade de 0,01g. Por sua vez, o comprimento

corporal (eixo longitudinal) foi medido no 1º, 5º, 9º, 13º, 17º, 21º, 28º, 35º, 42º, 49º e 56º dia de vida pós-natal com uma rápida imobilização do animal. Com uma caneta, os pontos entre o focinho e a base da cauda foram marcados e a distância entre estes, efetuada com uma régua.

5.6 Manipulação farmacológica pós-desmame

Na nona semana pós-natal, entre os dias 63 e 67, os grupos formados pela manipulação nutricional materna foram subdivididos de acordo com a manipulação farmacológica recebida durante dezessete dias.

5.6.1 Administração crônica de fluoxetina

Para a manipulação serotoninérgica, foi utilizado o inibidor seletivo de recaptação da serotonina, a fluoxetina. A administração foi feita entre 08:30 e 09:30. O horário de aplicação foi definido de acordo com a mudança de ciclo de luz do biotério, pois o pico de serotonina no plasma e no hipotálamo ocorre duas horas depois do apagar das luzes (SANCHEZ *et al.*, 2008). Vinte quatro horas depois da 14ª administração de fluoxetina, os animais foram submetidos a três testes comportamentais durante três dias consecutivos, sendo eutanasiados no quarto dia. Nos dias dos testes, a dose de fluoxetina foi administrada após a filmagem. Foram formados os seguintes grupos:

- Salina: recebeu solução salina (NaCl a 0,9%), por via intraperitoneal, no volume de 1 ml/100 g de peso corporal;
- Fluoxetina 10 mg: recebeu solução de fluoxetina de 10 mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal, no volume de 1 ml/100 g de peso corporal.

5.6.2 Oferta de resveratrol

Para o tratamento crônico com polifenol, foi utilizado o estilbeno resveratrol. A oferta foi feita diariamente através da água para gaiolas com dois ou três animais. Trezentos mililitros de solução eram ofertados todos os dias, entre 08:30 e 09:30, mesmo horário da administração de fluoxetina. Para avaliar o consumo, o valor do rejeito era mensurado com o auxílio de uma proveta e subtraído do valor da oferta. Não houve intervalo de vinte e quatro horas entre a oferta de resveratrol e a exposição aos testes comportamentais. Foram formados os seguintes grupos:

- Etanol: recebeu solução 0,1% de etanol diluído em água.
- Resveratrol: 50 mg de resveratrol foram, inicialmente, dissolvidos em 1 ml de etanol. Esta solução foi, então, diluída em água filtrada. A concentração final obtida foi de 50

mg/L (JAVKHEDKAR *et al.*, 2015). O consumo de resveratrol diário foi de 1,9 a 2,0 mg por animal, o que equivaleria a uma dose de 6,5 a 7,2 mg/kg de peso corporal.

5.7 Grupos experimentais

Considerando as duas manipulações (nutricional materna e farmacológica na prole pós-desmame), foram formados oito grupos experimentais. São eles:

- Controle – Salina (CTRF=15)
- Controle – Fluoxetina (CTRF = 15);
- Controle – Etanol (CTRE = 14);
- Controle – Resveratrol (CTRR = 14);
- Hiperlipídico – Salina (HHS = 15);
- Hiperlipídico – Fluoxetina (HHF = 15);
- Hiperlipídico – Etanol (HHE = 16);
- Hiperlipídico – Resveratrol (HHR = 16).

5.8 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados durante três dias consecutivos, iniciando entre 77º e 80º dia de vida (11ª. semana), na fase escura do ciclo de luz, entre 08:00 e 11:00 horas. Entre as filmagens, os aparatos foram limpos com hipoclorito a 2% para eliminar odores que pudessem influenciar o comportamento do animal seguinte. Todos os animais de todos os grupos experimentais (ver 5.7) foram submetidos apenas uma vez a cada um dos testes em dias consecutivos na mesma ordem descrita: campo aberto, *staircase*, labirinto elevado em cruz.

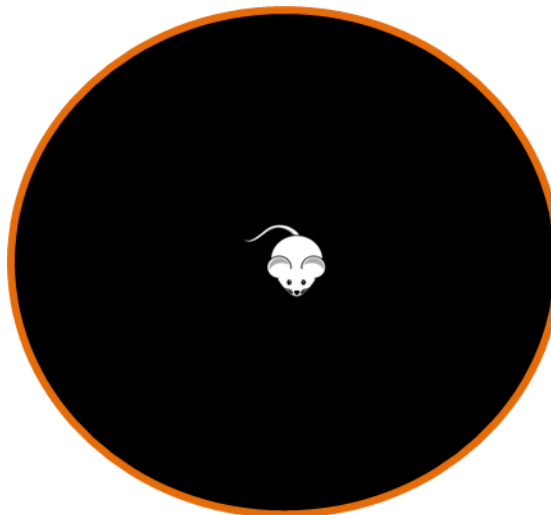
5.8.1 Campo aberto

O sistema consiste em um campo aberto circular (Ø1m) coberto por EVA, delimitado por paredes de 30 cm de altura (DA SILVA ARAGÃO *et al.*, 2011). O animal foi posicionado no centro do campo e sua trajetória registrada por uma câmera digital, durante quinze minutos, enquanto o animal se locomovia livremente. Uma ilustração do aparato está disponível na Figura 8. Os vídeos foram analisados off-line, através de um sistema automático de análise, o AnyMaze ®. Para diminuir o risco de viés durante a análise dos parâmetros etológicos, os vídeos foram renomeados. Foram extraídos os seguintes dados:

- Distância percorrida (m);
- Velocidade média (m/s);

- Tempo de permanência: tempo gasto pelo animal na área central (s);
- % de tempo de permanência: % de tempo gasto na área central
- Tempo de imobilidade (s);
- Número de entradas: número de vezes que o animal entrou com as quatro patas na área central;
- *Grooming*: número de vezes em comportamento de limpeza (lamber);
- *Rearing*: número de vezes em comportamento exploratório sobre duas patas;
- Bolos fecais: número de defecações encontrado no campo após a filmagem.

Figura 8 – Campo aberto



Fonte: Carolina Cavalcanti (2022)

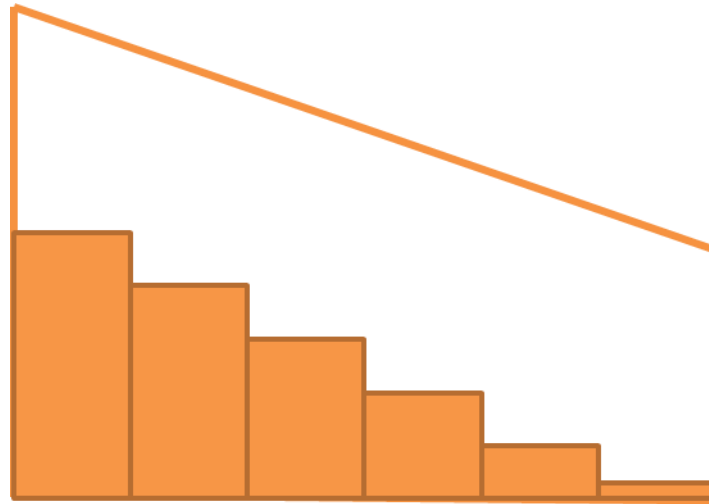
5.8.2 *Staircase*

Vinte e quatro horas após a exposição ao campo aberto, o animal foi submetido ao teste de *staircase*. O *staircase* consiste em uma caixa de 95 cm de comprimento, 20 cm de largura e 30 cm de altura; a escadaria construída no interior é composta por cinco degraus de seis cm de altura, 15 cm de profundidade e 20 cm de largura. O animal foi posicionado no chão da caixa, com as costas voltadas para a escada, e sua trajetória registrada por uma câmera digital. Uma ilustração do aparato está disponível na Figura 9. Os vídeos foram analisados através de um contador desenvolvido pelo próprio grupo de pesquisa. Para diminuir o risco de viés durante a análise dos parâmetros etológicos, os vídeos foram renomeados. Foram registrados os seguintes parâmetros:

- Degraus escalados: número de degraus escalados – sentido ascendente – pelo animal. A subida só será considerada quando o rato colocar as quatro patas no degrau;

- *Rearing*: número de vezes em comportamento exploratório sobre duas patas;
- Presença de bolos fecais.

Figura 9 – Staircase



Fonte: Carolina Cavalcanti (2022)

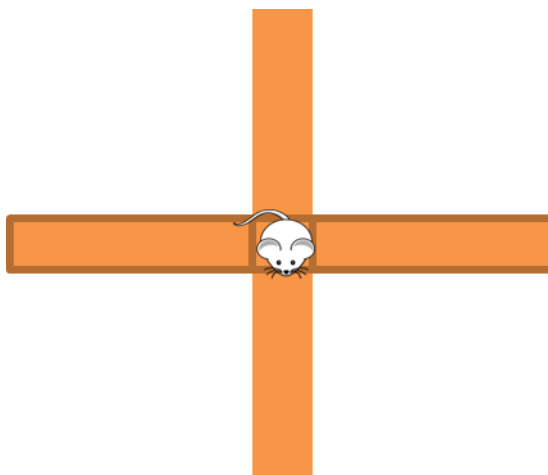
5.8.3 Labirinto elevado em cruz

Vinte e quatro horas após a exposição ao *staircase*, o animal foi submetido ao teste de labirinto elevado em cruz. O labirinto consiste em uma estrutura de madeira com quatro braços com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, elevados 50 cm do chão. Dois braços fechados possuem paredes de 40 cm de altura. Os outros dois braços não possuem as paredes, sendo chamados de “braços abertos”. Todos os braços são cobertos com EVA. Os animais foram posicionados na área central do aparelho, com a face voltada para um braço aberto, e sua trajetória registrada por uma câmera digital. Uma ilustração do aparato está disponível na Figura 10. Os vídeos foram analisados off-line, através de um sistema automático de análise, o *Anymaze*®. Foram registrados os seguintes parâmetros:

- Distância total percorrida (m);
- Velocidade média (m/s);
- Tempo de imobilidade (s);
- Número de entradas nos braços do labirinto: número de vezes em que o animal entra com as quatro patas nos braços abertos e nos fechados;
- Porcentagem do número de entradas: % do número de vezes em que o animal entra com as quatro patas nos braços abertos e fechados;
- Tempo de permanência (s): total de tempo gasto nos braços abertos e fechados, e na área central;

- Porcentagem de tempo de permanência: % de tempo gasto nos braços abertos e fechados, e na área central;
- Presença de bolos fecais.

Figura 10 – Labirinto Elevado em Cruz



Fonte: Carolina Cavalcanti (2022)

5.9 Coleta de estruturas

Um dia após a exposição ao labirinto elevado em cruz, os animais foram anestesiados e eutanasiados com guilhotina para retirada do tronco cerebral para análises moleculares. Foram coletados seis animais de cada grupo experimental. Imediatamente após a decapitação, o encéfalo foi retirado através de uma abertura da calota craniana, seguindo a linha de bregma. O tronco cerebral foi dissecado e congelado em gelo seco e armazenado em freezer - 80°C até análise.

5.10 Análise da expressão gênica

Para análise da expressão gênica, amostras de seis animais de cada grupo foram utilizadas. O tronco encefálico foi homogeneizado em reagente Trizol® (Invitrogen) para subsequente extração do RNA total. Os procedimentos de extração seguiram o recomendado pelo fabricante. Em resumo, 50-100mg de tecido foram homogeneizados em 1ml de Trizol®, depois de 5 minutos de incubação, 200µl de clorofórmio foram adicionados para permitir a separação das fases. Após centrifugação, a fase aquosa foi recuperada, e 500 µl de álcool isopropílico adicionado, para precipitar o RNA. Após centrifugação, o pelete foi lavado em etanol a 75% e redissolvido em água livre de RNases. O RNA total foi quantificado utilizando-se Nanodrop e sua pureza verificada pela relação A260/280 sendo usadas apenas

amostras que obtiveram um grau de pureza superior a 1,9. Em seguida 700pg de RNA foi utilizado para amplificação PCR em tempo real utilizando SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante. Foi analisada a expressão gênica dos receptores serotoninérgicos *5ht1a*, *5ht2a*, do transportador de serotonina (*Sert*), da enzima triptofano hidroxilase 2 (*Tph2*), do fator neurotrófico derivado do cérebro (*Bdnf*) e dos fatores pró-inflamatórios *Il1β*, *Il6*. O gene beta-2 microglobulina (*B2m*) foi o controle endógeno. Os níveis relativos de expressão de mRNAs em diferentes amostras foi calculado usando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 2 – Sequência de primer RT-qPCR

Gene	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (3' – 5')
<i>Bdnf</i>	ACCATAACCCCGCACACT	CCAAGTTGCCTTGTCCGT
<i>Il1b</i>	GCCACCTTTTGACAGTGATG	CCCAGGTCAAAGGTTTGGAA
<i>Il6</i>	CAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG	GGAGAGCATTGGAAATTGGG
<i>Tph2</i>	GCTCAAGTTTCAGACCACCA	CACGGCACATCCTCTAGTTC
<i>Sert</i>	CAGGACAACATCACCTGGAC	GACGCCTTTCCAGATGCTAA
<i>5ht1a</i>	CATCTACTCCACTTTCGGCG	CGACGAAGTTCCTAAGCTGG
<i>5ht2a</i>	TGAACCCCTAGTCTCTCCAC	GGGCCATCACCTAATTGCAT
<i>B2m</i>	GCCATTCAGAAACTCCCCA	CAGTTGAGGAAGTTGGGCTT

Fonte: Carolina Cadete (2022)

5.11 Análises estatísticas

Os dados foram analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism 6® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Inicialmente foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. O peso corporal e o eixo longitudinal durante a lactação e pós-desmame/pré-tratamento foram analisados pelo teste ANOVA *two-way* medidas repetidas (fatores dieta x tempo), seguidos pelo pós-teste de Tukey. O peso corporal durante as semanas de administração de fluoxetina ou resveratrol foi analisado pelo teste ANOVA *two-way* (dieta x droga). O consumo hídrico de resveratrol na primeira semana foi analisado pelo teste Kruska-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Por sua vez, o consumo hídrico de resveratrol na segunda semana foi analisado pelo teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido pelo pós-teste de Tukey. Os parâmetros avaliados nos testes comportamentais – campo aberto, *staircase* e labirinto elevado em cruz – foram, em sua maioria, analisados através do teste ANOVA *two-way* (fatores dieta x droga), seguido pelo pós-teste de Tukey. Na primeira parte

(fluoxetina), apenas o número de bolos fecais e o número de *grooming* no campo aberto, e o número de bolos fecais, a velocidade média, o tempo e a porcentagem de tempo de permanência na área central no labirinto elevado em cruz foram analisados através do teste Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Dunn. Na segunda parte (resveratrol), apenas os números de *grooming* e de *rearing* no campo aberto, e o número de bolos fecais e o número de *rearing* no *staircase* foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6 RESULTADOS

6.1 Artigo de revisão sistemática

TITLE: Influence of maternal high-fat diet on offspring's locomotor activity during anxiety-related behavioral tests: a systematic review.

AUTHORS: Carolina Cadete Lucena Cavalcanti¹, Raul Manhães-de-Castro^{1,2,3}, Wenicios Ferreira Chaves⁴, Erika Vanesa Cadena-Burbano², José Antonio-Santos³, Raquel da Silva Aragão^{2,3,5,*}.

AFFILIATIONS: ¹Graduate Program of Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, PE, Brazil. ²Graduate Program in Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil. ³Unit of Studies in Nutrition and Plasticity, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, PE, Brazil. ⁴Graduate Program of Nutrition and Sport Sciences and Metabolism, Universidade Estadual de Campinas, 13484-350, Campinas, SP, Brazil, ⁵Graduate Program in Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

***Correspondence to:** Raquel da Silva Aragão, Cursos de Educação Física, Centro Acadêmico da Vitória, Universidade Federal de Pernambuco. Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, CEP 55608-680, Brazil. E-mail: raquel.aragao@ufpe.br.

ABSTRACT

The aim of this review was to summarize and discuss maternal high-fat diet intake influence on offspring locomotor activity during anxiety-related behavioral tests. This systematic review consisted in a search in LILACS, Web of Science, SCOPUS and PUMBED databases. Inclusion criteria were studies that submitted rodent dams to HFD before pregnancy and/or during gestation and/or lactation and evaluated the locomotor activity parameters in any anxiety-related test. At the end of searches, twenty-four articles presented the chosen outcomes and were included, but only eight of them found changes in offspring's locomotor activity. Therefore, maternal exposure to a high-fat diet can influence offspring's motor behavior. Nevertheless, this influence is associated with the initial response to the test and the first day of exposure to the apparatus.

Keywords: Maternal nutrition. Offspring behavior. Locomotor activity.

1. INTRODUCTION

Locomotion has been considered a type of emotional motor behavior (1). It is commonly assessed in anxiety-like behavior tests, such as open field, staircase, elevated plus-maze, light-dark transition and free exploratory paradigm (2). Nevertheless, data from locomotor parameters are usually interpreted separately from anxiety-like behaviors parameters (3, 4). Despite that, the available literature has already shown that high activity in the open field at the first day of testing may be associated with greater emotional reactivity (5). This hyperactivity could be characterized by persistent, heightened, and sustained activity levels and/or increased locomotor speed (6).

Therefore, locomotion could provide valuable information in characterizing the emotional profile in experimental models (5, 7). Factors such as nutrition, pharmacological treatment and physical exercise can influence locomotor activity (8-10). Several studies have shown that maternal nutrition is an important factor in promotion to adequate neural and behavioral development in offspring (11). In this sense, maternal exposure to a high-fat diet (HFD) during critical periods, such as pregnancy and lactation, makes the offspring more susceptible to the development of behavioral disorders, such as anxiety and depression (12, 13).

For instance, offspring from HFD dams presented increased anxiety-like behavior – with or without changes in locomotor activity – when exposed to open field and elevated plus-maze tests (4, 8, 14). The study conducted by Sasaki, de Vega (4), for example, observed an increase in anxiety-related behavior for the HFD offspring. However, this difference was not accompanied by changes in locomotor activity (4). Similarly, Peleg-Raibstein, Luca (14) also revealed an increase in emotional behavior and no difference in locomotion. Kang, Kurti (8), on the other hand, found increased anxiety-like behavior and enhanced locomotor activity for male offspring from HFD group. On its turn, in Yan, Jiao (15) study, offspring from HFD showed increased emotional behavior and decreased locomotion. Finally, Balsevich, Baumann (16) observed a decrease in anxiety-like behavior and an increase in locomotor activity for adult animals (PND90) from HFD group. Old-adults animals (PND365), on the other hand, showed an increase in emotional behavior with no change in locomotion.

Thus, the overall objective of the present systematic review was to investigate the repercussions on locomotor activity during anxiety-related behavioral tests in offspring from dams exposed to high-fat during perinatal period.

2. MATERIAL AND METHODS

For the elaboration of this systematic review, the authors followed the recommendations present in the check list of the Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-analyses PRISMA Statement (15). Our systematic review was carried out by publication of the protocol in the Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies (CAMARADES) platform, with free access to interested parties (<https://syrf.org.uk/protocols>).

2.1 Search strategy

The search and selection of the articles was conducted by two independent reviewers (CCLC and WFC) and carried out in the LILACS, Web of Science, SCOPUS and PUBMED databases. The search was conducted between June and July 2019. In July 2021, searches were updated. Any disagreements between the researchers during this stage were solved by consulting a third independent reviewer (RdSA). To search the databases the following MESH (Medical Subject Headings) terms were applied: "diet, high-fat", "diet, western", "mothers", "maternal nutritional physiological phenomena", "pregnancy", "lactation", "breast feeding", "prenatal exposure delayed effects", "behavior" "locomotion". For greater sensitivity were also used in all fields: "high fat diet", "obesogenic diet", "mothers", "maternal", "pregnancy", "gestation", "lactation", "breast feeding", "perinatal", "critical period", "maternal intake", "prenatal exposure", "behavior", "behaviour" "behavioral test", "behavioural test", "ethological analysis", "behavioural specificity", "ethology", "locomotion", "locomotor activity", "activity, locomotor" and "hyperactivity", "open field", "free exploratory paradigm", "elevated plus maze", "light-dark box", "light/dark box", "staircase", "home cage task". Articles found in search databases were recorded in Excel® program and then duplicates were removed. The first stage of article selection consisted of reading the titles and abstracts in relation to the eligibility criteria. The second stage consisted of the complete reading of selected articles in the previous phase, being confronted with the inclusion criteria.

2.2 Eligibility criteria

The population of interest was limited to rodents' pups of any species, sex, and age whose mothers were exposed to a HFD before pregnancy and/or during gestation and/or lactation. There were no year and language limitations for the inclusion of the studies. Articles that did not fit the criteria of population eligibility, intervention, comparison, outcomes, and studies presented in Table 1 were excluded. Our primary outcome was

locomotor activity and articles were included when the horizontal movement was evaluated over the entire length of the apparatus. Articles that only evaluated locomotor activity in a certain region of the test were not included.

Table 1. Eligibility criteria applied in this study.

	Inclusion criteria	Exclusion criteria
Population	Rodents	Genetic modified rodents
Intervention	Maternal exposure to high fat diets (gestation and/or lactation) which content of macronutrients or energy was modified from standard diets.	Studies where macronutrient or energy manipulation was performed using beverage drinks (eg. water with glucose); studies whose exposure to diet started more than six weeks before mating/pregnancy.
Outcomes	Evaluation of locomotor activity on anxiety-like behavioral tests.	Studies that did not consider the entire test area when evaluation locomotion.
Publication parameters	There was no restriction of articles and languages and date.	None.

2.1 Data extraction

The data extraction of primary and secondary outcomes took place after the complete reading of the scientific articles previously selected according to the eligibility criteria by two independent researchers. The third researcher was consulted when there were differences or doubts. The key data were collected, such as names of authors, year of publication, species of animal, composition of diets, intervention period, post-weaning diet, parameters analyzed, and main offspring results. The data were transcribed into a table according to outcomes, these being horizontal movement as primary outcomes, and indirect measures of locomotor activity and ethological parameters as secondary outcomes.

2.2 Assessment of methodology quality

The evaluation of methodological quality of studies included in this systematic review was performed using the tool known as SYRCL risk of bias (RoB). The tool was applied individually to the articles included and independently by each reviewer. SYRCL Risk of Bias consists of 10 questions about: random sequence generation, baseline characteristics, allocation concealment, random housing, blinding of participants and personnel, random

outcome data, blinding of outcome assessment, incomplete outcome data, selective reporting, and other bias. These questions were judged according to the risk of bias level, being classified as high, uncertain, or low. To assess the level of agreement between the first and second reviewers, the Kappa index was used after this stage. The information from this step was synthesized through a figure obtained with Review Manager software version 5.3, also used in the elaboration of study flowchart.

3 RESULTS

During the first stage of searching electronic databases (Lilacs, PUBMED, SCOPUS and Web of Science) a total of 1818 articles were found. Then, 484 duplicates were removed. A total of 1334 articles had titles and abstracts screened from which 1250 articles were eliminated because they did not address the eligibility criteria (Table 1). Full text of 84 articles was read, being excluded 60 articles through the exclusion criteria (Table 1). All articles found were published in English. The steps of conducting the research are described in the flowchart below (Figure 1).

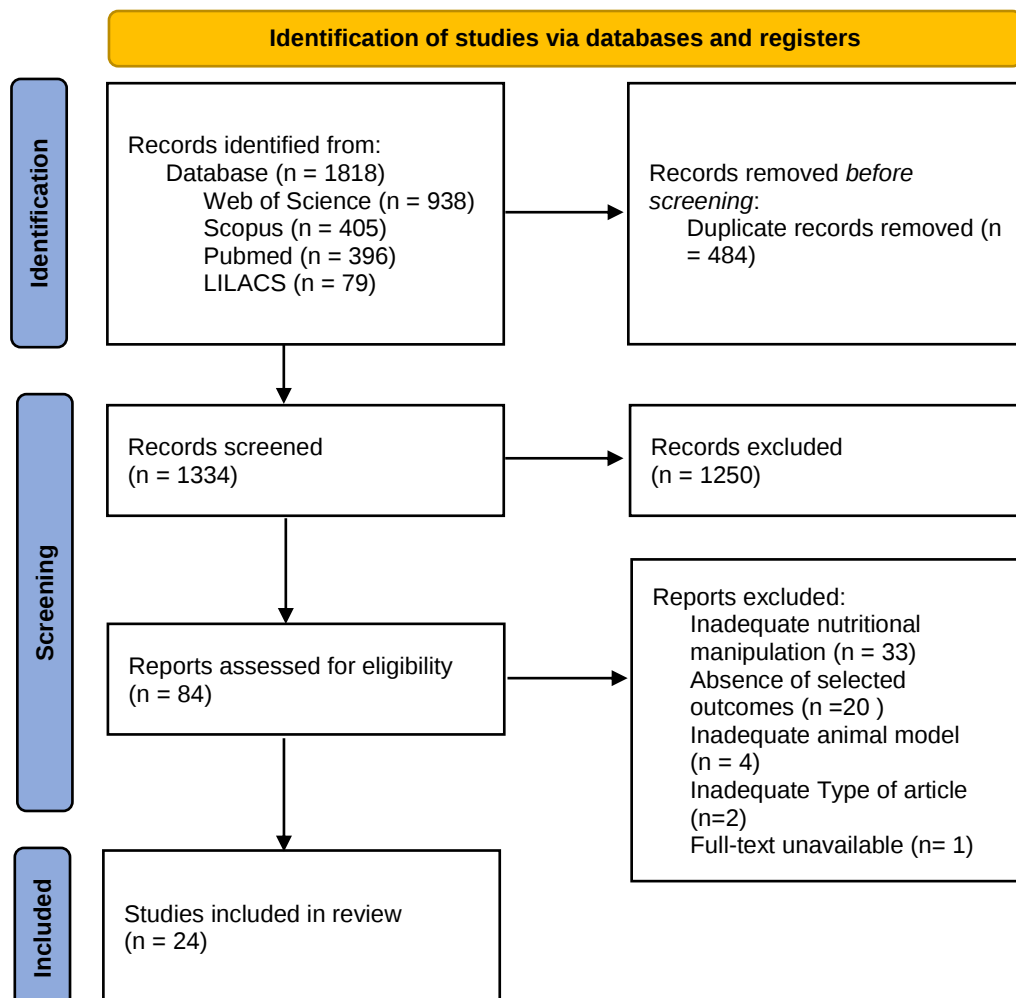


Figure 1. Flow diagram of the study selection process applied in the present study.

3.1 Assessment of quality of studies

Risk of bias applied between the reviewers resulted in Kappa = 0.81, which is classified as almost perfect level of agreement. In the studies, only six authors reported randomizing animals (9, 16-20). Regarding baseline characteristics, six articles did not report the baseline characteristics of their subjects in the text (19, 21-25). None of the articles recorded the allocation concealment (4, 8, 9, 14, 16-34). Also, no article was clear about randomization in accommodation (4, 8, 9, 14, 16-34). Six articles did not report the blinding of participants and personnel (9, 26, 30, 31, 34, 35) and seven showed random outcome data (4, 8, 14, 20-22, 31). In relation to blinding of outcomes assessment, three studies did not provide sufficient information in the text (17, 21, 28). Incomplete outcome data were found for four articles included in this review (25, 27, 30, 31). Only three studies presented selective reporting (4, 18, 25). Finally, other risk of bias was found in one study where some data presented in the results section were not included in the methodology section (33).

	Random sequence generation (selection bias)	Baseline characteristics (selection bias)	Allocation concealment (selection bias)	Random housing (performance bias)	Blinding of participants and personnel (performance bias)	Random outcome data (attrition bias)	Blinding of outcome assessment (detection bias)	Incomplete outcome data (attrition bias)	Selective reporting (reporting bias)	Other bias
Balsevich et al., 2015	+	+	?	?	+	-	+	+	+	+
Cadena-Burbano et al., 2018	-	+	?	?	-	-	+	+	+	+
Cavakanti et al., 2021	+	+	?	?	-	?	?	-	-	+
Gawilnska et al., 2020	+	+	?	?	+	?	?	+	+	+
Gawilnska et al., 2021	+	+	?	?	+	?	+	+	+	+
Giriko et al., 2013	+	+	?	?	+	?	+	+	+	+
Grisson, George and Reys, 2017	+	?	?	?	+	-	+	+	+	+
Janthakhin et al., 2017	-	+	?	?	+	?	+	-	+	+
Kang et al., 2014	-	+	?	?	+	+	+	+	+	+
Lin et al., 2015	-	?	?	?	+	+	?	+	+	+
Lippert et al., 2020	-	+	?	?	+	?	?	+	+	+
Naef et al., 2008	-	+	?	?	-	?	+	-	+	+
Naef et al., 2011	-	+	?	?	-	?	+	+	+	+
Page et al., 2014	-	?	?	?	+	+	+	+	+	+
Peleg-Railbstein, Luca and Wolfrum, 2012	-	+	?	?	+	+	+	+	+	+
Peleg-Railbstein et al., 2016	-	?	?	?	+	?	+	+	+	+
Raygada, Cho e Clarke, 1999	-	+	?	?	-	+	+	-	+	+
Rocha-Gomes et al., 2021.	+	+	?	?	-	+	+	+	+	+
Sarker et al., 2019	-	?	?	?	+	-	+	+	+	+
Sasaki et al., 2013	-	+	?	?	+	+	+	+	-	+
Sasaki et al., 2018	-	?	?	?	+	?	+	-	-	+
Souto et al., 2021	+	+	?	?	+	+	+	+	+	+
Yan et al., 2017	-	+	?	?	+	?	+	+	+	?
Zieba et al., 2019	-	+	?	?	+	-	+	+	+	+

Figure 2. Risk of bias of studies: Review authors judgments about each risk of bias item for each included articles. + (green) low risk of bias, - (red) high risk of bias and (yellow) unclear risk of bias.

3.2 Methodological profile of studies

The studies included used the following types of rodents: Sprague-Dawley (n=4) (21, 22, 36, 37), Wistar (n=8) (9, 16, 20, 27, 34, 38-40), C57BL/6J (N=3) (8, 32, 33), C57BL/6N (n=4) (14, 41-43), WT C57BL6/N (n=1) (28), Long-Evans (n=2) (4, 44), Balb/c (n=1) (31), B6D2F1/J (n=1) (19), C3H (n=1) (31), CD-1 (n=1) (31). Thirteen articles evaluated only male offspring (9, 19-22, 27, 33, 34, 36-39, 42), while one article used only females (40), nine studies used both sexes (4, 8, 14, 16, 28, 31, 41, 43, 44). The nutritional manipulation was performed through diets with a caloric contribution of lipids ranging from 4.5% (14, 41) to 22.1% (45) for control diet versus 30% (36, 37) to 60% (4, 8, 14, 32, 40, 41, 44) for high-fat diets. Diet manipulation was more frequent before pregnancy, and throughout gestation and lactation (n=10) (4, 8, 14, 19, 21, 22, 32, 33, 41, 44), but there were also interventions before and during pregnancy (n=3) (8, 31, 42), during gestation and lactation (n=8) (9, 16, 27, 34, 36, 37, 39, 40), throughout gestation (n=2) (20, 43) and only at lactation (n=3) (28, 38, 43). Comparisons were made only between offspring from groups fed on a control diet after weaning. When the groups formed by maternal nutrition were subdivided according to an additional intervention (e.g.: acute and repeated administration of cocaine (46)), only baseline conditions were included (21, 34, 36, 37, 43-45). The age of the animals evaluated varied from post-natal day 30 (PND30) (39) to PND365 (16). Behavioral tests used were open field (4, 8, 9, 14, 20-22, 27, 28, 31-34, 38, 39, 41-43) and analogue tests (16, 19, 36, 37, 40, 44), elevated plus maze (4, 14, 32, 33), light dark transition (4) and free exploratory paradigm (n=1) (9). All articles accepted presented locomotor activity parameters. In open field and analogous tests, locomotor activity was addressed by: distance traveled, number of entries into squares/quadrants, number of crossings, number of photo-beam interruptions and ambulation episodes. Data from elevated plus maze were expressed by: distance traveled. Finally, locomotor activity in light-dark transition was stated by: distance traveled. In addition, indirect measures have been included to better understand the main results, such as time immobile, time mobile, locomotor/mean/average speed, average potency, kinetic energy, rearing, jumping and stereotypical behaviors.

3.3 Main results on offspring locomotor activity

Articles selected are summarized in table 2 and 3. Main outcomes related to locomotor activity were described according to parameters analyzed (Table 2). Only studies that evaluated locomotion throughout the entire test area were considered. Horizontal movement presented conflicting results. Most of the studies did not reveal any difference for horizontal

movement (4, 14, 23, 29, 33, 34, 37-45). Increased locomotor activity was found in six studies. Raygada, Cho (33) showed increased number of entries into the squares on open field for CD-1 offspring (males and females at PND60) from High (n-6) PUFA diet, when diet was offered before pregnancy and throughout gestation, until delivery. Also, Balsevich, Baumann (16) (males at PND90) found increased distance traveled on open field. Page, Jones (24) (males at PND110-118) and Kang, Kurti (8) (males at PND32-35) revealed increased distance traveled, when HFD was offered before pregnancy and throughout gestation and lactation. Cavalcanti, Da Silva Aragao (9) observed increased number of quadrants entered when high-fat/isocaloric diet was offered during gestation and lactation. Lippert, Hess (30) showed increased number of ambulatory episodes and increased distance traveled on open field, when diet was offered during lactation (35). Yan, Jiao (15) found decreased distance traveled, when diet was offered before pregnancy and throughout gestation and lactation (15). Rocha-Gomes, Teixeira (35) revealed decreased distance traveled when HFD was offered during gestation and lactation (35). Figure 3 summarizes the main results obtained.

3.4 Secondary results on offspring locomotor activity

Indirect measures of locomotor activity and ethological parameters are complementary results that help understanding the repercussions caused by changes in locomotion. Speed was evaluated only in three studies (4, 24, 40). Sasaki, de Vega (4) (males and females at PND90) evaluated mean speed on open field, elevated plus maze and light dark transition, but did not reveal any difference. Cadena-Burbano, Cavalcanti (40) (males at PND 60) and Page, Jones (24) (males at PND110-118) showed increased speed for HFD offspring on open field. Average potency and kinetic energy were evaluated by Cadena-Burbano, Cavalcanti (40). They found that maternal HFD offspring presented increase in both parameters at PND60 (40). Time spent immobile was only assessed in two studies (24, 40). Cadena-Burbano, Cavalcanti (40) and Page, Jones (24) did not reveal any difference.

From ethological parameters, rearing (also known as vertical activity) was evaluated in seven studies (8, 9, 22, 23, 30, 34, 39). Giriko, Andreoli (39) and Zieba, Uddin (34) did not show any difference on open field. Kang, Kurti (8) and Lippert, Hess (30) (PND180) found increased rearing for male and female offspring from HFD on open field. Moreover, female HFD/CD offspring revealed decreased rearing than female HFD/HFD offspring. Cavalcanti, Da Silva Aragao (9) showed increased time spent in rearing for both high-fat (isocaloric and high-caloric) diets (9). Lin, Shao (23) found decreased rearing for HFD offspring at PND56 on open field. Finally, Souto, Nakao (22) revealed decreased rearing for HFD-lard offspring.

Lippert, Hess (30) were the only one to study jumping and stereotypical behaviors and they observed increase in both parameters for male HFD offspring.

Table 2. Summary of main results about locomotor activity in anxiety-like behaviors tests obtained in included studies.

Author (Year)	Strain	Diet composition	Intervention period	Offspring evaluated	Behavioral test	Parameters analyzed in offspring	Main results in offspring
Raygada, Cho & Clarke, 1999	Balb/c C3H CD-1	High (n-6) PUFA (43% kcal from fat) vs. Control (n-6) PUFA (16% kcal from fat)	One week before mating, throughout gestation until delivery.	Males and females (Balb/c and CD-1); female (C3H) PND90 (Balb/c) PND365 (C3H) and PND60 (CD-1)	Open field (3 min)	1. Number of entries into squares	1. No difference between groups for Balb/c and C3H strains. Increased number of entries into squares for CD-1 High (n-6) PUFA.
Naef et al., 2008	Sprague-Dawley	High-fat/low carbohydrate (30% kcal from fat) vs. Control diet (5% kcal from primex-fat)	14 th gestational day and throughout lactation	Males PND56-62	Locomotor box (60 min)	1. Number of photo-beam interruptions	1. No difference between groups at baseline condition.
Naef et al., 2011	Sprague-Dawley	High-fat diet (30% kcal from fat) vs. Control diet (5% kcal from fat)	12 th -13 th gestational day and throughout lactation	Males PND90-100	Acrylic chambers (90 min)	1. Distance traveled	1. No difference between groups at baseline condition.
Peleg-Raibstein, Luca & Wolfrum, 2012.	C57BL/6N.	HFD (60% kcal from fat) vs. Control (4.5% kcal from fat)	Three weeks prior to mating, throughout gestation and lactation.	Male and female PND90	Elevated plus-maze (5 min) Open field (60 min).	1. Distance traveled 1. Distance traveled	1. No difference between groups.. 1. No difference between groups.
Giriko et al., 2013	Wistar.	HFD (52% kcal from fat) vs. CD (14.7% from kcal)	Lactation.	Male PND60	Open field (5 min)	1. Number of crossings	1. No difference between groups.
Sasaki et al., 2013	Long-Evans	HFD (60% kcal from fat) vs. CHD (13.5% kcal from fat)	Four weeks prior to mating, throughout gestation and lactation.	Male and female PND90	Elevated plus-maze (5 min) Light-dark transition (5 min)	1. Distance traveled 1. Distance traveled	1. No difference between groups. 1. No difference between groups.

Page et al. 2014	Sprague-Dawley	HFD (45% kcal from fat) vs. Standard Chow diet (10% kcal from fat)	One month before mating, throughout gestation and lactation.	Male PND118	Open field (5 min)	1. Distance traveled	1. Increased distance traveled.
Kang et al., 2014	C57BL/6J.	HFD (60% kcal from fat) vs CD (10% kcal from fat)	Six weeks before pregnancy, throughout gestation. and/or lactation	Male and female PND32-35	Open field (15 min)	1. Distance traveled	1. Increased distance traveled for male HFD/HFD and HFD/CD vs. male CD/CD.
Balsevich et al., 2015.	C57BL/6N.	DIO (58% kcal from fat) vs Chow (10,5% kcal from fat)	Six weeks before pregnancy until gestation day 18±2	Male PND90 and 365.	Open field (15 min)	1. Distance traveled	1. Increased locomotor activity for DIO vs Chow in 3-month-old offspring, independently of the stress condition.
Lin et al. 2015.	Sprague-Dawley	HFD (45% kcal from fat) vs. ND (21% kcal from fat).	Ten days before mating, throughout gestation and lactation.	Male PND56,120,127,134 and 141	Open field (3 min)	1. Number of entries into squares.	1. No difference between groups.
Peleg-Raibstein et al., 2016	C57BL/6N	HFD (60% energy from fat) vs. Control (4.5% kcal from fat)	Three weeks before mating, throughout gestation and lactation.	Male and female PND120	Open field (10 min)	1. Distance traveled	1. No difference between groups.
Grisson, George & Reyes, 2017.	B6D2F1/J	HFD (60% kcal from fat) vs. CD (22.1% kcal from fat).	Onset of breeding, throughout gestation and lactation.	Male PND135 (4.5 months of age)	Metabolic cage (120 min)	1. Number of photo-beam interruptions	1. No difference between groups.
Janthakhin et al., 2017	Wistar	HFD (45% kcal from fat) vs. CD (10% kcal from fat)	Gestation and lactation.	Male PND90 and 150	Open field (10 min)	1. Distance traveled	1. No difference between groups.

Yan et al., 2017.	C57BL/6J.	HFD (60% kcal from fat) vs. Control diet (10% kcal from fat)	Five weeks before pregnancy and throughout gestation and lactation.	Sex: not specified. PND49-56	Open field (10 min) Elevated plus maze	1. Distance traveled 1. Distance traveled	1. Decreased distance traveled for HFD vs. Control. 1. Decreased distance traveled for HFD vs. Control.
Sasaki et al., 2018	Long-Evans	HFD (60% kcal from fat) vs. CHD (13.5% kcal from fat)	Four weeks prior to mating, throughout gestation and lactation.	Male and female PND65	Locomotor activity chambers (30 min) Elevated plus-maze (5min)	1. Distance traveled 1. Distance traveled	1. No difference between groups at baseline condition. 1. No difference between groups at baseline condition.
Cadena-Burbano et al., 2019.	Wistar.	HH (51% kcal from fat) vs. AIN-93G (18% kcal from fat).	Gestation and lactation.	Male PND 30, 45 and 63	Open field (5 min)	1. Distance traveled	1. No difference between groups.
Sarker et al., 2019.	C57BL/6N mice.	HFD (60% energy from fat) vs. Chow diet (5% kcal from fat).	Early gestation (EG) or late gestation (LG) or lactation (Lact).	Male and female PND70 and 110	Open field (30 min)	1. Distance traveled	1. No difference between groups for baseline condition.
Zieba et al., 2019.	C57BL/6J.	HFD (43% MJ from fat) vs. CHOW (13% MJ from fat)	Five weeks before mating and throughout gestation and lactation (PND 24)	Male PND267 and 295	Elevated plus maze (5 min) Open field (30 min)	1. Total arm distance 1. Distance traveled	1. No difference between groups. 1. No difference between groups.
Gawlinski et al., 2020.	Wistar	HFD (60% kcal from fat) vs. CD (13% kcal from fat)	Gestation and lactation	Female PND63	Opto-Varimex cages (5, 30 and 120 min)	1. Distance traveled	1. No difference between groups.

Lippert et al., 2020.	WT C57BL6/N	CH (35.5% kcal from fat) vs. CC (5.5% kcal from fat)	Lactation		Male and female PND180 (during three consecutive days)	Open field (5 min)	1. Ambulatory episodes 2. Distance traveled	1. Increased ambulatory episodes for male CH offspring at day one. 2. Increased distance traveled for male CH offspring at day one.
Souto et al., 2020	Wistar	HFD-Lard (52% kcal from fat) vs. HFD-canola oil (52% kcal from fat) vs. CD (14,7% kcal from fat)	Gestation		Male PND80	Open field (5 min)	1. Number of crossings	1. No difference between groups.
Cavalcanti et al., 2021	Wistar	HH (51% kcal from fat) vs. HIV (51% kcal from fat) vs. Control (18 kcal from fat)	Gestation and lactation	and	Male PND 63 and 77	Open field (15 min) Free exploratory paradigm (15 min)	1. Number of quadrants entered 1. Total number of units entered	1. Increased number of quadrants entered for HIV vs CV. 1. No difference between groups.
Gawlinska et al., 2021	Wistar	HFD (60% kcal from fat) vs. SD (13% kcal from fat)	Gestation and lactation	and	Male and female PND28 and 63	OptoVarimex cages (5 min and 30 min)	1. Distance traveled	1. No difference between groups.
Rocha-Gomes et al. 2021	Wistar	HFD (44,95% kcal from fat) vs. Control (17,62% kcal from fat)	Gestation and lactation	and	Male PND42	Open field (5 min)	1. Distance covered	1. Decreased distance covered for HFD vs. Control.

Table 3. Indirect measures of locomotor activity in anxiety-like behaviors tests and ethological parameters obtained in included studies.

Author (Year)	Strain	Diet composition	Intervention period	Offspring evaluated	Behavioral test	Parameters analyzed in offspring	Main results in offspring
Giriko et al., 2013	Wistar.	HFD (52% kcal from fat) vs. CD (14.7% from kcal)	Lactation.	Male PND60	Open field (5 min)	1. Rearing	1. No difference between groups.
Sasaki et al., 2013	Long-Evans	HFD (60% kcal from fat) vs. CHD (13.5% kcal from fat)	Four weeks prior to mating, throughout gestation and lactation.	Male and female PND90	Open field (15 min)	1. Mean speed	1. No difference between groups. 2. No difference between groups.
					Elevated plus-maze (5 min)	2. Time spent mobile 1. Mean speed	1. No difference between groups. 2. No difference between groups.
					Light-dark transition (5 min)	2. Time spent mobile 1. Mean speed	1. No difference between groups. 2. No difference between groups.
Kang et al., 2014	C57BL/6J.	HFD (60% kcal from fat) vs CD (10% kcal from fat)	Six weeks before pregnancy, and throughout gestation. and/or lactation	Male and female PND32-35	Open field (15 min)	1. Rearing	1. Increased rearing for male and female HFD/HFD vs. male and female CD/CD. Decreased rearing for female HFD/CD vs. female HFD/HFD.
Page et al. 2014	Sprague-Dawley	HFD (45% kcal from fat) vs. Standart Chow diet (10% kcal from fat)	One month before mating, throughout gestation and lactation.	Male PND110-118	Open field (5 min)	1. Locomotor speed 2. Immobility time	1. Increased locomotor speed. 2. No difference between groups.

Lin et al. 2015.	Sprague-Dawley	HFD (45% kcal from fat) vs. ND (21% kcal from fat).	Ten days before mating, throughout gestation and lactation.	Male PND56,120,127,134 and 141	Open field (3 min)	1. Rearing	1. Decreased rearing at 56-days-old for HFD vs. ND.
Cadena-Burbano et al., 2019.	Wistar.	HH (51% kcal from fat) HI (51% kcal from fat) vs. AIN-93G (18% kcal from fat).	Gestation and lactation.	Male PND30, 45 and 60	Open field (5 min)	1. Average speed, 2. Average potency, 3. Kinetic energy, 4. Time immobile.	1. Increased average speed at 60-days-old. 2. Increased average potency at 60-days-old. 3. Increased kinetic energy at 60-days-old. 4. No difference between groups.
Zieba et al. 2019.	C57BL/6J.	HFD (43% MJ from fat) vs. CHOW (13% MJ from fat)	Five weeks before mating and throughout gestation and lactation (PND 24)	Male PND267 and 295	Open field (30 min)	1. Vertical activity (rearing)	1. No difference between groups.
Lippert et al., 2020.	WT C57BL6/N	CH (35.5% kcal from fat) vs. CC (5.5% kcal from fat)	Lactation	Male and female PND180 (during three consecutives days)	Open field (5 min)	1. Jumping 2. Rearing 3. Stereotypical behaviours	1. Increased jumping for male CH offspring. 2. Increased rearing for male and female CH offspring.. 3. Increased stereotypical behaviours for male CH offspring.
Souto et al., 2020	Wistar	HFD-Lard (52% kcal from fat) vs. HFD-canola oil (52% kcal from fat) vs. CD (14,7% kcal from fat)	Gestation	Male PND80	Open field (5 min)	1. Rearing	1. Decreased rearing for HFD-lard vs CD and HFD-canola oil.

Cavalcanti et al., 2021	Wistar	HH (51% kcal from fat) vs. HI (51% kcal from fat) vs. Control (18% kcal from fat)	Gestation lactation	and	Male PND63-77	Open field (15 min)	1. Grooming 2. Rearing 3. Number of faecal boli	1. No difference between groups. 2. Increased rearing for HHV and HIV vs. CV. 3. No difference between groups.
						Elevated plus-maze (5 min)	1. Grooming 2. Head-dipping 3. Rearing	1. No difference between groups. 2. No difference between groups. 3. No difference between groups.
						Free exploratory paradigm (15 min)	1. Rearing	1. No difference between groups.
Rocha-Gomes et al. 2021	Wistar	HFD (44,95% kcal from fat) vs. Control (17,62% kcal from fat)	Gestation lactation	and	Male PND42	Open field (5 min)	1. Grooming 2. Rearing	1. No difference between groups. 2. No difference between groups.

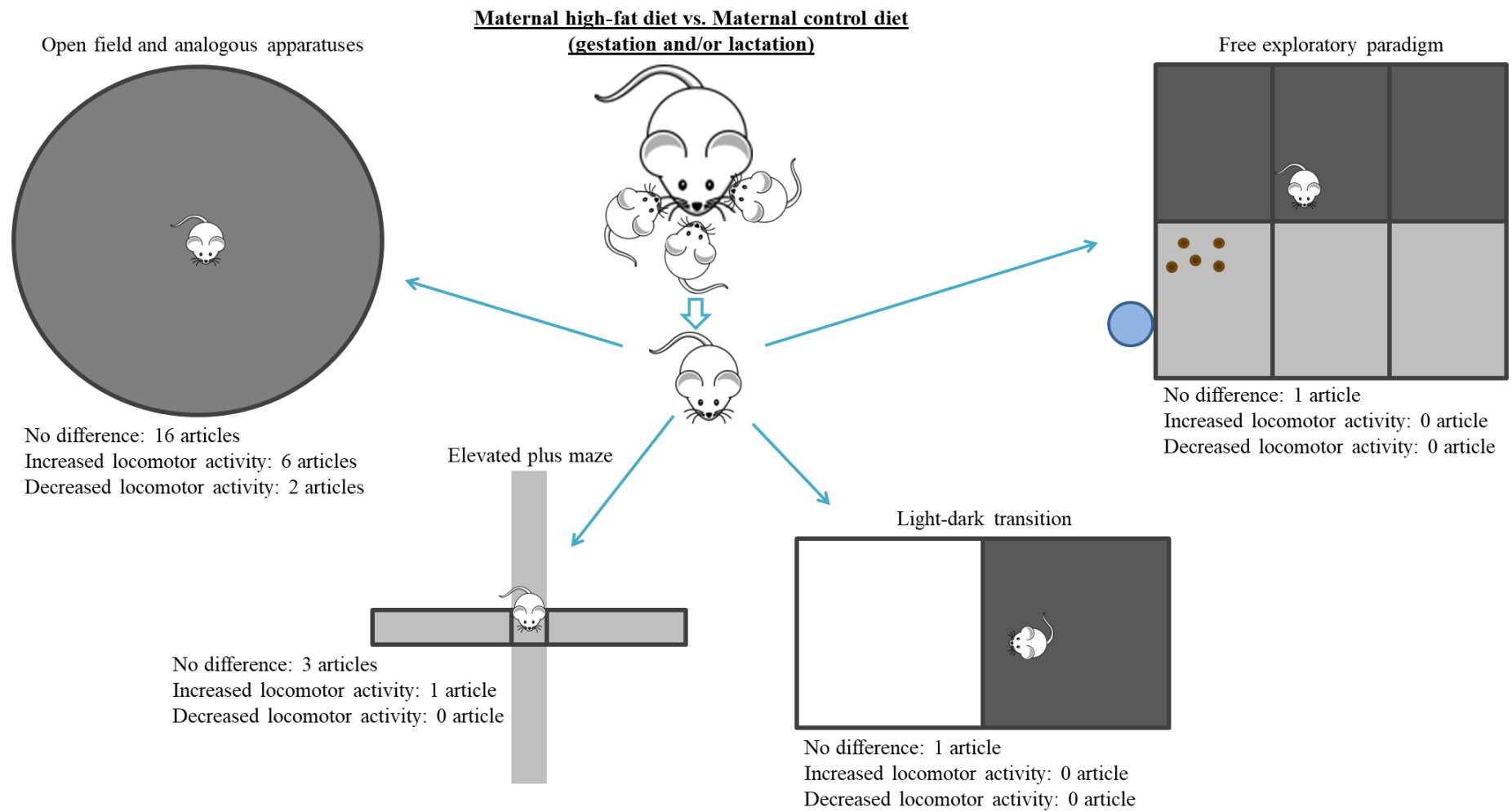


Figure 3. Main results of offspring locomotor activity on behavioral tests related to anxiety.

4. DISCUSSION

Most of the studies included in this review did not reveal any effect of the maternal high fat diet exposure on offspring's locomotor activity in anxiety-related behavioral tests. Nevertheless, six studies found increased horizontal movement – the primary parameters – in elevated plus maze, open field and analogous tests, while two studies revealed decreased horizontal movement (Figure 3). This different response may be associated with the experimental protocols used, which varied from the time and period of exposure to a high-fat diet to the age at which the behavioral tests were performed. Also, it is worth noting that the content of lipids and calories were very different between the studies included here. Secondary parameters, such as mean speed and rearing, were also considered in this review as they can influence the outcome of the primary parameters. Of the eleven studies that included these parameters, seven works found difference between high fat and control groups. In five of them, there was an increase in the parameters evaluated. Once again, the results showed a difference when elevated plus maze; open field or analogous tests were evaluated.

Locomotor activity could be described as motor behavior influenced by emotionality (1). In literature, hyperactivity is referred as a persistent, heightened, and sustained activity levels, and/or increased speed of movement (6). This enhanced locomotor activity can be explained at different levels (6). Lippert, Hess (28), for example, found a link between this increased locomotor activity and the dopaminergic system expression. According to Takakusaki (1), the basal ganglia – which are comprised of striatum (with input from cortex, thalamus, and the dopamine system), globus pallidus externa, the subthalamic nucleus, and the output nuclei – are involved in the emotional expression of locomotor behavior (1, 47). Within the basal ganglia, the effects of dopamine ascending projection involve the direct and indirect pathways (48). Through the 'direct pathway', dopamine increases the excitability of D1-expressing cells in the striatum, and this results in relieving the inhibition sent by the basal ganglia to the midbrain locomotor region (MLR), which includes the cuneiform (CnF) and pedunculo pontine nuclei (PPN), leading to locomotion initiation (48, 49). In its turn, through the 'indirect pathway', dopamine decreases the excitability of the D2-expressing neurons in the striatum, and this also results in reducing the inhibition sent by the basal ganglia to the MLR (48). Therefore, the increase in horizontal movement observed by Kang, Kurti (8), Balsevich, Baumann (42), Page, Jones (22), Raygada, Cho (31), Lippert, Hess (28) and Cavalcanti, Da Silva Aragao (9) could involve changes in these pathways. In fact, when analyzing the dorsal striatum, Lippert, Hess (28) revealed an increased spontaneous activation of D1 medium spiny neurons (MSN) and decreased D2 MSN projections (28). Together,

these results suggest that maternal exposure to a high-fat diet may alter the offspring's dopaminergic circuitry and, consequently, influence offspring behavior. In addition to the ascending dopaminergic (DA) projection, recent studies showed that DA cells also send direct descending projections to the MLR (48). These innervations come from the substantia nigra pars compacta and the medial zona incerta, the latter is found in the ventral thalamus (48). Also, another group of DA cells, located in the hypothalamus, sends descending projections directly to the spinal cord, which, according to Fougère, Flaive (48), could contribute to regulate some features of the locomotor pattern by releasing dopamine on neurons of the central pattern generator (CPG) (48).

In addition to dopamine, another important neurotransmitter in the control of locomotion is serotonin (5-HT) (50). Serotonergic neurons are located in the brainstem and spinal cord and innervate the locomotor circuitry at different levels (51). In the brainstem, the 5-HT neurons are distributed along the midline in the raphe nuclei, which are constituted of the rostral and the caudal groups (52). The caudal group is located in the caudal pons (which comprises the nucleus raphe magnus) and medulla oblongata (corresponding to the nucleus raphe obscurus and the nucleus raphe pallidus) and by a large population of serotonergic neurons located in the lateral medullary reticular formation (51, 52). This group is innervated by the MLR and mainly sends descending projections to the spinal cord, local projections to the brainstem, and a limited amount of ascending projections to the forebrain (50-52). In other words, MLR stimulation activates 5-HT descending neurons, resulting in the release of serotonin in the spinal cord, which comprises the CPG (50). This effect appears to involve activation of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, and 5-HT₇ receptors (50, 53). It is already known that maternal exposure to a high-fat and/or high-glucose diet alters the offspring's serotonergic system (14, 54-56). However, the influence of high-fat diet consumption during pregnancy and/or lactation on serotonergic expression in the caudal raphe nucleus still needs to be evaluated. In turn, the rostral group is located in the midbrain (which comprises the caudal linear raphe nucleus, dorsal raphe nucleus and median raphe nucleus) and rostral pons (corresponding to pontine and suprallemniscal nuclei) (51, 52). These nuclei mostly send ascending projections to the forebrain, local projections to the brainstem regions, and a limited number of descending projections to the spinal cord (51, 52). In the dorsal raphe nucleus (DRN – a part of rostral group), subtypes of 5-HT neurons with different molecular, electrophysiological, and anatomical signatures have already been identified (51, 52). In mice, for example, one cell type selectively innervates the basal ganglia (BG) – whose inhibitory role on MLR was described above (51). In line with this, Correia, Lottem (57) revealed that

phasic activation of 5-HT neurons in the DRN, the main source of 5-HT to the forebrain, reduced the horizontal movement. Therefore, the decrease in locomotion observed by Yan, Jiao (32) and Rocha-Gomes, Teixeira (34) could be explained by changes in this pathway (32, 34). In addition, a non-human primate study showed that offspring exposed to a maternal high-fat diet during gestation had an enhanced expression of 5-HT_{1A} inhibitory self-receptors in rostral nucleus of raphe, the first hypothalamic source of 5-HT (58, 59).

Finally, the glutamatergic system also plays a fundamental role in the control of locomotion (60). In the MLR (comprising the PPN and the CnF), glutamatergic neurons receive projections from different regions (60, 61). The main inputs to glutamatergic neurons in the PPN originate from other midbrain structures, several nuclei in the medulla and the basal ganglia (BG) (61). On the other hand, glutamatergic neurons of the CnF receive little input from BG output nuclei or from cortices, but are strongly innervated by midbrain structures such as the periaqueductal grey and inferior colliculus (61, 62). The connection with the BG circuitry suggests that glutamatergic system play a key role on direct and indirect pathways action (60). In fact, Roseberry, Lee (60) showed that stimulation of the direct pathway in the striatum significantly increased the firing rate of glutamatergic neurons from MLR and this increase preceded movement onset (60). Also, when MLR glutamatergic neurons were inhibited, running speed decreased, despite continued activation of direct pathway (60). In addition, populations of glutamatergic neurons – defined by the transcription factors *Lhx3* and *Chx10* – in the medullary reticular formation, that project to the spinal cord, receive functional inputs from the MLR, and are activated in locomotion (63). According to the authors, these data support the hypothesis that *Lhx3/Chx10* reticulospinal neurons are involved in mediating a descending motor command for locomotion (63). Exposure to a high-fat diet during the post-weaning period has already revealed that the high lipid content influences the expression of the glutamatergic system (64-66). However, it is still necessary to assess whether this effect extends to maternal nutrition and related-regions to locomotion, taking into account that there is still not much information available to assess this relationship.

In fact, only one study has evaluated the influence that offering a high-fat diet to mothers has on the offspring's glutamatergic system. Yan, Jiao (32) revealed a decrease expression of *GRIN2b* (N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunit gene) in the hippocampus and this reduction was associated with a decrease in locomotor activity (32). A study conducted by Pham and Grudzien (67) has already shown that the diminished expression of this gene in the hippocampus was accompanied by a decrease in the distance traveled and in the average

speed (67). Furthermore, it is known that the limbic system (e.g. hippocampus) influences locomotor activity through nucleus accumbens-subpallidal-pedunculo-pontine nucleus connections. Also, according to Yan, Jiao (32), this behavioural deficit could be associated with decreased BDNF expression (32, 34). However, other studies in which mothers were exposed to a high-fat diet observed a decrease in BDNF with increased locomotion (22) or no change in locomotion (68). On the other hand, an increase in BDNF has already been observed without modification of locomotion (14). Finally, there was an increase in locomotor activity with no change in BDNF (68). Therefore, it is possible that BDNF alone does not play a fundamental role in the control of locomotion, which suggests that the expression of other factors may be necessary for its action on the horizontal movement to be effective. Here, it is interesting to point out that the minor locomotion of the HFD group was interpreted by the authors as a higher anxiety condition due to the lower interest in exploring a new environment (32).

Hyperactivity is also characterized by increased speed (6). Here, we classified speed as an indirect measure of locomotor activity. Page, Jones (22) and Cadena-Burbano, Cavalcanti (39) showed enhanced speed for male offspring from high-fat diet dams. A detailed study conducted by Caggiano, Leiras (61) on MLR evaluated the contribution of CnF and PPN to locomotor speed. They revealed that the activation of CnF glutamatergic neurons produced a wide range of speed, while PPN glutamatergic neurons could only trigger low speed locomotion (61). Caggiano, Leiras (61) also showed that PPN neurons are more active at lower speeds, whereas CnF neurons are strongly recruited during fast locomotion. Together these results suggest that the glutamatergic neurons of the CnF elicit fast locomotion to enable an escape response, whereas glutamatergic neurons of the PPN facilitate slow locomotor movements to favor an explorative behavior (61, 62). Therefore, these data reinforce the role of the glutamatergic system on locomotion. An important component for the transformation of this central information into a motor response is the action of the skeletal muscles. Thus, changes in offspring skeletal muscle may be also associated with this hyperlocomotion (69). Oliveira, Manhaes-de-Castro (69), for example, revealed that exposure to high-fat/high-caloric or high-fat/isocaloric diets, during pregnancy and lactation, altered the offspring's skeletal muscle profile.

Finally, ethologic parameters – grooming, head-dipping, jumping, rearing and stereotypical behaviors – were also included in the results of this review, because these behaviors could reduce the time the animal spends walking freely. Nonetheless, the increased number of jumping, rearing, and stereotypical behaviors did not affect the amount of

horizontal movement displayed by HFD groups (8, 9, 20, 21, 28). Kang, Kurti (8) and Lippert, Hess (28) revealed increased rearing for HFD offspring associated with increased locomotor activity only in male offspring. Lippert, Hess (28) also showed increased jumping and stereotypical behavior, but this difference was also only found in males (28). Cavalcanti, Da Silva Aragao (9), in its turn, found increased rearing with (when maternal HFD was isocaloric compared to control diet) or without (when maternal HFD was hypercaloric compared to control diet) increased locomotion. Meanwhile, Lin, Shao (21) and Souto, Nakao (20) revealed decrease in rearing for HFD offspring with no difference in locomotion. The same locomotion-related neurotransmitters also participate in the control of these ethological parameters at different levels. The study conducted by Ferreira-Pinto, for example, revealed that glutamatergic neurons from the MLR send descending projections to the spinal cord and that these projections were recruited mostly during rearing (70). In fact, when PPN glutamatergic neurons were stimulated, there was a decrease in the number of rearing (71). Regarding serotonergic system role, phasic activation of 5-HT neurons in the DRN reduced the time spent in rearing (57). Finally, mice with dopamine transporter (DAT) inhibition exhibited increased rearing when placed individually in a fresh home cage (72). The administration of a D1 receptor antagonist (SCH23390) in mice with the DAT inhibition suppressed this increase (72). In addition, D2 knock-out mice, placed individually in a fresh home cage, showed decreased rearing (72).

Regarding the methodology adopted to assess locomotor activity, most studies chose to expose the same animal to each behavioral test only once. In fact, only three of them evaluated locomotion on consecutive days (30) or at different stages of development (23, 28). Interestingly, Lippert, Hess (30) found an increase in distance traveled for the high-fat group only on day one of exposure to the behavioral test (30). According to the authors, this hyperlocomotive response in males was due to exposure to a novel environment (30). Furthermore, the study conducted by Denenberg (5) revealed that on the first day of testing, the increase in locomotion is associated with emotional reactivity (since it was associated with groups that had high defecation and high corticosterone scores), while high activity after that is indicative of low emotionality (5). Another methodological variation that could influence the results is test duration. When using an open field, test duration ranged from three (33) to 120 minutes (19, 21). Studies that evaluated the animal for more than fifteen minutes did not observe any difference in locomotor activity (14, 21, 26, 27, 31, 32, 34), while those that observed differences used shorter exposure time (8, 9, 16, 23, 24, 30, 33, 35). This may suggest greater reactivity to novelty in the first minutes of exposure to behavioral testing.

When taking into account the sex of the animals, a curious result emerged from Lippert, Hess (30) (C57BL6/N mice) and Kang, Kurti (8) (C57BL/6J mice). Both studies evaluated female and male offspring, but only males showed increased distance traveled on open field, which may suggest slightly different behavioral profiles. On the other hand, Raygada, Cho (33) (CD-1) found increased locomotion for both sexes, which may indicate that the behavioral response depends on the strain used (33). The other studies that found altered locomotor activity evaluated only males (9, 15, 16, 24, 35). Finally, an aspect that must be taken into account is the lack of similarities between the studies, which varied greatly from the composition (between 30% and 60% kcal from fat) of the high-fat diet to the age (from PND30 to PND365) at which the tests were applied.

5. CONCLUSION

Maternal exposure to a high-fat diet before pregnancy and/or gestation and/or lactation can influence offspring locomotor activity. However, this influence seems to be associated with the initial behavioral response to exposure to the device, since studies that evaluated behavior for more than fifteen minutes did not observe any difference. In addition, in the study that evaluated locomotion on consecutive days, the difference observed on the first test day was not found for days two and three. This result suggests that the observed increase in locomotor activity is associated with the novelty response. Regarding the mechanisms behind these changes, only two studies (8, 30) discussed the locomotor issue in depth. Therefore, it would be interesting for future studies to pay more attention to locomotor activity since emotionality influences motor behavior.

FINANCIAL SUPPORT

This article was financially supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) with project number: 88882.379499/2019-01.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Takakusaki K. Forebrain control of locomotor behaviors. *Brain Res Rev.* 2008;57(1):192-8.

2. Lezak KR, Missig G, Carlezon Jr WA. Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2022.
3. Sasaki A, de Vega W, Sivanathan S, St-Cyr S, McGowan PO. Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. *Neuroscience*. 2014;272:92-101.
4. Sasaki A, de Vega WC, St-Cyr S, Pan P, McGowan PO. Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. *Neuroscience*. 2013;240:1-12.
5. Denenberg VH. Open-field behavior in the rat: What does it mean? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1969;159(3):852-9.
6. Keogh BK. Hyperactivity and learning disorders: review and speculation. *Except Child*. 1971;38(2):101-9.
7. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *JoVE*. 2015(96):e52434.
8. Kang SS, Kurti A, Fair DA, Fryer JD. Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring. *J Neuroinflammation*. 2014;11:156.
9. Cavalcanti CCL, Da Silva Aragao R, Cadena-Burbano EV, Oliveira T, Silva JM, Benjamim RAC, et al. High-caloric or isocaloric maternal high-fat diets differently affect young-adult offspring behavior in anxiety-related tests and offspring sensitivity to acute fluoxetine. *Behav Brain Res*. 2021;403:113141.
10. Fragoso J, Lira AO, Chagas GS, Lucena Cavalcanti CC, Beserra R, de Santana-Muniz G, et al. Maternal voluntary physical activity attenuates delayed neurodevelopment in malnourished rats. *Exp Physiol*. 2017;102(11):1486-99.
11. Sullivan EL, Nousen EK, Chamlou KA, Grove KL. The Impact of Maternal High-Fat Diet Consumption on Neural Development and Behavior of Offspring. *International journal of obesity supplements*. 2012;2(Suppl 2):S7-s13.
12. Bolton JL, Bilbo SD. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2014;16(3):307-20.
13. Lin CC, Shao B, Zhou YL, Niu XT, Lin YS. Maternal high-fat diet influences stroke outcome in adult rat offspring. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2016;56(2):101-12.
14. Peleg-Raibstein D, Luca E, Wolfrum C. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behav Brain Res*. 2012;233(2):398-404.
15. Yan Z, Jiao F, Yan X, Ou H. Maternal Chronic Folate Supplementation Ameliorates Behavior Disorders Induced by Prenatal High-Fat Diet Through Methylation Alteration of BDNF and Grin2b in Offspring Hippocampus. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(12).
16. Balsevich G, Baumann V, Uribe A, Chen A, Schmidt MV. Prenatal Exposure to Maternal Obesity Alters Anxiety and Stress Coping Behaviors in Aged Mice. *Neuroendocrinology*. 2016;103(3-4):354-68.
17. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *International Journal of Surgery*. 2021;88:105906.
18. Gawlińska K, Gawliński D, Korostyński M, Borczyk M, Frankowska M, Piechota M, et al. Maternal dietary patterns are associated with susceptibility to a depressive-like phenotype in rat offspring. *Developmental cognitive neuroscience*. 2021;47:100879.
19. Gawlinski D, Gawlinska K, Frankowska M, Filip M. Maternal Diet Influences the Reinstatement of Cocaine-Seeking Behavior and the Expression of Melanocortin-4 Receptors in Female Offspring of Rats. *Nutrients*. 2020;12(5).
20. Giriko C, Andreoli CA, Mennitti LV, Hosoume LF, Souto Tdos S, Silva AV, et al. Delayed physical and neurobehavioral development and increased aggressive and depression-

like behaviors in the rat offspring of dams fed a high-fat diet. *Int J Dev Neurosci.* 2013;31(8):731-9.

21. Grissom NM, George R, Reyes TM. Suboptimal nutrition in early life affects the inflammatory gene expression profile and behavioral responses to stressors. *Brain Behavior and Immunity.* 2017;63:115-26.

22. Souto TD, Nakao FSN, Giriko CA, Dias CT, Cheberle AID, Lambertucci RH, et al. Lard-rich and canola oil-rich high-fat diets during pregnancy promote rats' offspring neurodevelopmental delay and behavioral disorders. *Physiology & Behavior.* 2020;213.

23. Lin C, Shao B, Huang H, Zhou Y, Lin Y. Maternal high fat diet programs stress-induced behavioral disorder in adult offspring. *Physiol Behav.* 2015;152(Pt A):119-27.

24. Page KC, Jones EK, Anday EK. Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014;306(8):R527-37.

25. Peleg-Raibstein D, Sarker G, Litwan K, Kramer SD, Ametamey SM, Schibli R, et al. Enhanced sensitivity to drugs of abuse and palatable foods following maternal overnutrition. *Translational Psychiatry.* 2016;6.

26. Sarker G, Litwan K, Kastli R, Peleg-Raibstein D. Maternal overnutrition during critical developmental periods leads to different health adversities in the offspring: relevance of obesity, addiction and schizophrenia. *Scientific Reports.* 2019;9.

27. Sasaki A, McGowan PO, Erb S. A study of the effects of maternal high fat diet on behavioural responses to acute and repeated administrations of cocaine in rat offspring. *Neuroscience Letters.* 2018;673:157-62.

28. Cadena-Burbano EV, Cavalcanti CCL, Lago AB, Benjamim RAC, Oliveira T, Silva JM, et al. A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. *Nutr Neurosci.* 2019;22(2):98-109.

29. Janthakhin Y, Rincel M, Costa AM, Darnaudery M, Ferreira G. Maternal high-fat diet leads to hippocampal and amygdala dendritic remodeling in adult male offspring. *Psychoneuroendocrinology.* 2017;83:49-57.

30. Lippert RN, Hess S, Klemm P, Burgeno LM, Jahans-Price T, Walton ME, et al. Maternal high-fat diet during lactation reprograms the dopaminergic circuitry in mice. *The Journal of clinical investigation.* 2020;130(7):3761-76.

31. Naef L, Moquin L, Dal Bo G, Giros B, Gratton A, Walker CD. MATERNAL HIGH-FAT INTAKE ALTERS PRESYNAPTIC REGULATION OF DOPAMINE IN THE NUCLEUS ACCUMBENS AND INCREASES MOTIVATION FOR FAT REWARDS IN THE OFFSPRING. *Neuroscience.* 2011;176:225-36.

32. Naef L, Srivastava L, Gratton A, Hendrickson H, Owens SM, Walker CD. Maternal high fat diet during the perinatal period alters mesocorticolimbic dopamine in the adult rat offspring: reduction in the behavioral responses to repeated amphetamine administration. *Psychopharmacology.* 2008;197(1):83-94.

33. Raygada M, Cho E, Hilakivi-Clarke L. High maternal intake of polyunsaturated fatty acids during pregnancy in mice alters offsprings' aggressive behavior, immobility in the swim test, locomotor activity and brain protein kinase C activity. *J Nutr.* 1998;128(12):2505-11.

34. Zieba J, Uddin GM, Youngson NA, Karl T, Morris MJ. Long-term behavioural effects of maternal obesity in C57BL/6J mice. *Physiol Behav.* 2019;199:306-13.

35. Rocha-Gomes A, Teixeira AE, de Oliveira DG, Santiago CMO, da Silva AA, Riul TR, et al. LPS tolerance prevents anxiety-like behavior and amygdala inflammation of high-fat-fed dams' adolescent offspring. *Behavioural Brain Research.* 2021;411:113371.

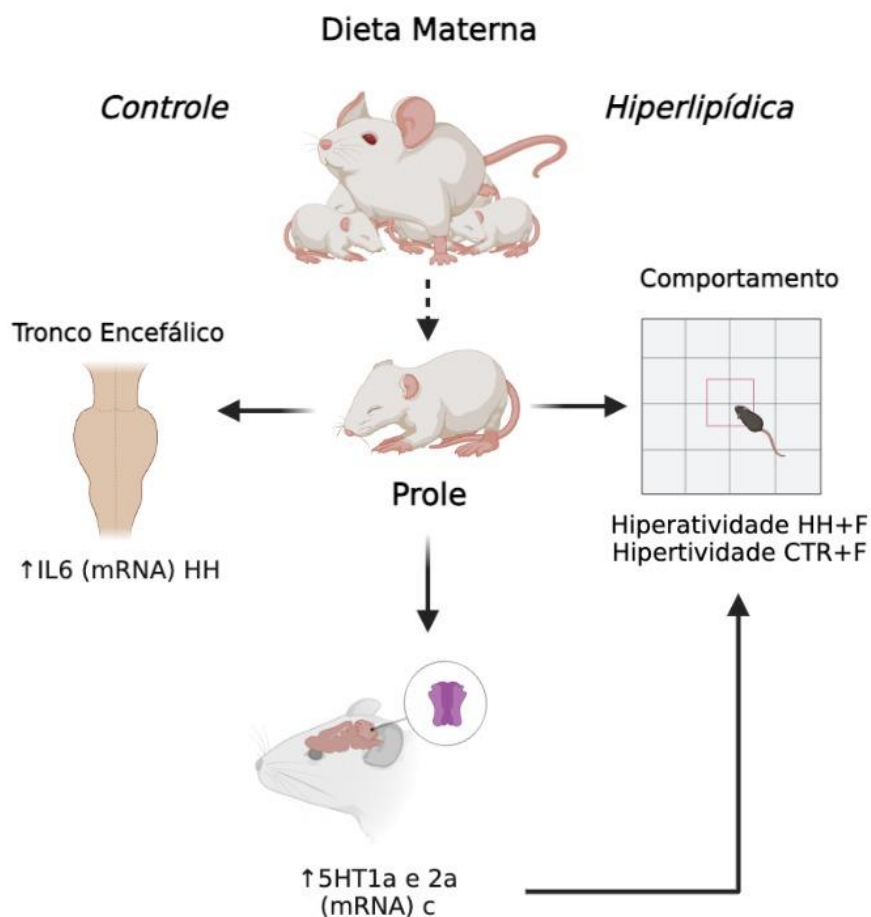
36. Naef L, Gratton A, Walker CD. Exposure to high fat during early development impairs adaptations in dopamine and neuroendocrine responses to repeated stress. *Stress-the International Journal on the Biology of Stress*. 2013;16(5):540-8.
37. Naef L, Moquin L, Dal Bo G, Giros B, Gratton A, Walker C-DJN. Maternal high-fat intake alters presynaptic regulation of dopamine in the nucleus accumbens and increases motivation for fat rewards in the offspring. 2011;176:225-36.
38. Naef L, Srivastava L, Gratton A, Hendrickson H, Owens SM, Walker C-DJP. Maternal high fat diet during the perinatal period alters mesocorticolimbic dopamine in the adult rat offspring: reduction in the behavioral responses to repeated amphetamine administration. 2008;197(1):83-94.
39. Giriko CA, Andreoli CA, Mennitti LV, Hosoume LF, Souto Tdos S, Silva AV, et al. Delayed physical and neurobehavioral development and increased aggressive and depression-like behaviors in the rat offspring of dams fed a high-fat diet. *Int J Dev Neurosci*. 2013;31(8):731-9.
40. Cadena-Burbano EV, Cavalcanti CCL, Lago AB, Benjamim RAC, Oliveira T, Silva JM, et al. A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. *Nutr Neurosci*. 2019;22(2):98-109.
41. Gawliński D, Gawlińska K, Frankowska M, Filip M. Maternal Diet Influences the Reinstatement of Cocaine-Seeking Behavior and the Expression of Melanocortin-4 Receptors in Female Offspring of Rats. *Nutrients*. 2020;12(5).
42. Peleg-Raibstein D, Sarker G, Litwan K, Krämer S-D, Ametamey SM, Schibli R, et al. Enhanced sensitivity to drugs of abuse and palatable foods following maternal overnutrition. 2016;6(10):e911-e.
43. Sarker G, Litwan K, Kastli R, Peleg-Raibstein D. Maternal overnutrition during critical developmental periods leads to different health adversities in the offspring: relevance of obesity, addiction and schizophrenia. *Sci Rep*. 2019;9(1):17322.
44. Sasaki A, McGowan PO, Erb SJNl. A study of the effects of maternal high fat diet on behavioural responses to acute and repeated administrations of cocaine in rat offspring. 2018;673:157-62.
45. Grissom NM, George R, Reyes TMJB, behavior,, immunity. Suboptimal nutrition in early life affects the inflammatory gene expression profile and behavioral responses to stressors. 2017;63:115-26.
46. Sasaki A, McGowan PO, Erb S. A study of the effects of maternal high fat diet on behavioural responses to acute and repeated administrations of cocaine in rat offspring. *Neurosci Lett*. 2018;673:157-62.
47. Grillner S, El Manira A. Current Principles of Motor Control, with Special Reference to Vertebrate Locomotion. *Physiol Rev*. 2020;100(1):271-320.
48. Fougère M, Flaive A, Frigon A, Ryczko D. Descending dopaminergic control of brainstem locomotor circuits. *Current Opinion in Physiology*. 2019;8:30-5.
49. Takakusaki K. Functional Neuroanatomy for Posture and Gait Control. *J Mov Disord*. 2017;10(1):1-17.
50. Sławińska U, Jordan LM. Serotonergic influences on locomotor circuits. *Current Opinion in Physiology*. 2019;8:63-9.
51. Flaive A, Fougere M, van der Zouwen CI, Ryczko D. Serotonergic Modulation of Locomotor Activity From Basal Vertebrates to Mammals. *Front Neural Circuits*. 2020;14:590299.
52. Hornung J-P. The neuronatomy of the serotonergic system. *Handbook of Behavioral Neuroscience*. 21: Elsevier; 2010. p. 51-64.

53. Liu J, Jordan LM. Stimulation of the parapyramidal region of the neonatal rat brain stem produces locomotor-like activity involving spinal 5-HT₇ and 5-HT_{2A} receptors. *J Neurophysiol.* 2005;94(2):1392-404.
54. Sullivan EL, Grayson B, Takahashi D, Robertson N, Maier A, Bethea CL, et al. Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. *J Neurosci.* 2010;30(10):3826-30.
55. Martin B, Pearson M, Kebejian L, Golden E, Keselman A, Bender M, et al. Sex-dependent metabolic, neuroendocrine, and cognitive responses to dietary energy restriction and excess. *Endocrinology.* 2007;148(9):4318-33.
56. Thompson JR, Valteau JC, Barling AN, Franco JG, DeCapo M, Bagley JL, et al. Exposure to a High-Fat Diet during Early Development Programs Behavior and Impairs the Central Serotonergic System in Juvenile Non-Human Primates. *Frontiers in Endocrinology.* 2017;8.
57. Correia PA, Lottem E, Banerjee D, Machado AS, Carey MR, Mainen ZF. Transient inhibition and long-term facilitation of locomotion by phasic optogenetic activation of serotonin neurons. *Elife.* 2017;6:e20975.
58. Aagaard K, Prince A, Oliva G, Ma J, Ramirez JSB, Dean T, et al. A high fat maternal diet contributes to microbiomedriven regulation of the offspring gut-brain axis & behavior in primates. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2016;214(1):S50-S.
59. Willoughby JO, Blessing WW. Origin of serotonin innervation of the arcuate and ventromedial hypothalamic region. *Brain Res.* 1987;418(1):170-3.
60. Roseberry TK, Lee AM, Lalive AL, Wilbrecht L, Bonci A, Kreitzer AC. Cell-Type-Specific Control of Brainstem Locomotor Circuits by Basal Ganglia. *Cell.* 2016;164(3):526-37.
61. Caggiano V, Leiras R, Goñi-Erro H, Masini D, Bellardita C, Bouvier J, et al. Midbrain circuits that set locomotor speed and gait selection. *Nature.* 2018;553(7689):455-60.
62. Gatto G, Goulding M. Locomotion Control: Brainstem Circuits Satisfy the Need for Speed. *Curr Biol.* 2018;28(6):R256-R9.
63. Bretzner F, Brownstone RM. Lhx3-Chx10 reticulospinal neurons in locomotor circuits. *J Neurosci.* 2013;33(37):14681-92.
64. Clyburn C, Travagli RA, Browning KN. Acute high-fat diet upregulates glutamatergic signaling in the dorsal motor nucleus of the vagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2018;314(5):G623-G34.
65. Tsai SF, Wu HT, Chen PC, Chen YW, Yu M, Wang TF, et al. High-fat diet suppresses the astrocytic process arborization and downregulates the glial glutamate transporters in the hippocampus of mice. *Brain Res.* 2018;1700:66-77.
66. Tsai S-F, Chen Y-W, Kuo Y-M. High-fat diet reduces the hippocampal content level of lactate which is correlated with the expression of glial glutamate transporters. *Neuroscience Letters.* 2018;662:142-6.
67. Pham NC, Grudzien SJ. Assessing Motor Impairments in Mouse Models of GRIN2B Haploinsufficiency. *NCUR Proceedings.* 2020.
68. Tozuka Y, Kumon M, Wada E, Onodera M, Mochizuki H, Wada K. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochemistry International.* 2010;57(3):235-47.
69. Oliveira T, Manhaes-de-Castro R, Silva JM, Cadena-Burbano EV, Cavalcanti CCL, Benjamim RAC, et al. Differential effects of maternal high-fat/high-caloric or isocaloric diet on offspring's skeletal muscle phenotype. *Life Sci.* 2018;215:136-44.

70. Ferreira-Pinto MJ, Kanodia H, Falasconi A, Sigrist M, Esposito MS, Arber S. Functional diversity for body actions in the mesencephalic locomotor region. *Cell*. 2021;184(17):4564-78 e18.
71. Dautan D, Kovacs A, Bayasgalan T, Diaz-Acevedo MA, Pal B, Mena-Segovia J. Modulation of motor behavior by the mesencephalic locomotor region. *Cell Rep*. 2021;36(8):109594.
72. Lee Y, Kim H, Kim JE, Park JY, Choi J, Lee JE, et al. Excessive D1 Dopamine Receptor Activation in the Dorsal Striatum Promotes Autistic-Like Behaviors. *Molecular neurobiology*. 2018;55(7):5658-71.

6.2 Fluoxetina

Figura 11 – Efeitos da exposição materna à dieta hiperlipídica/hipercalórica e da administração crônica de fluoxetina sobre o comportamento e sobre a expressão gênica do tronco cerebral



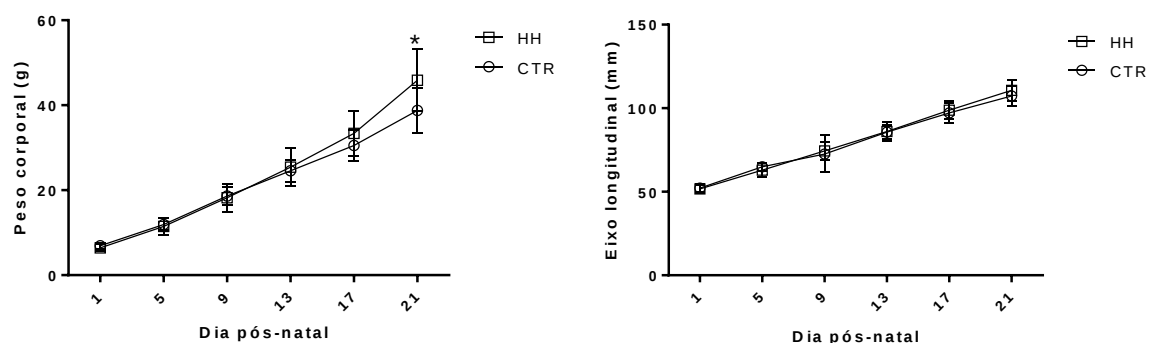
Fonte: Carolina Cavalcanti (2022)

6.2.1 Peso corporal e eixo longitudinal

6.2.1.1 Lactação

O peso corporal e o eixo longitudinal foram avaliados a cada quatro dias durante a lactação (Figura 12). ANOVA *Two-way* medidas repetidas (dieta x idade) indicou efeito da idade ($p < 0,0001$) e interação entre os fatores ($p < 0,0001$) sobre o peso corporal. Filhotes do grupo HH apresentaram maior peso corporal do que filhotes do grupo Controle no 17º ($p < 0,05$) e 21º ($p < 0,0001$) dias pós-natal. Com relação ao eixo longitudinal, o teste ANOVA *Two-way* medidas repetidas (dieta x idade) revelou interação entre os fatores ($p = 0,0162$) e efeito da idade ($p < 0,0001$). No entanto, o pós-teste de Tukey não detectou diferença entre os grupos.

Figura 12 – Peso corporal e eixo longitudinal durante a lactação

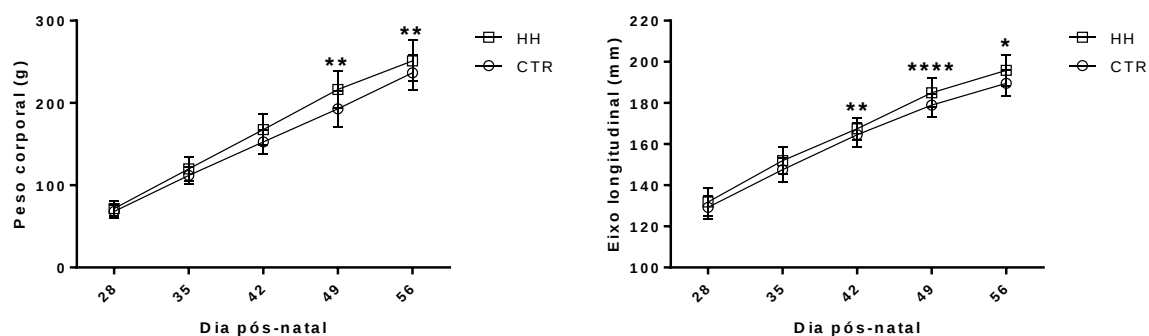


Os filhotes foram alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=11$; $n_{\text{filhotes}}=29$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=11$; $n_{\text{filhotes}}=30$) durante os períodos de gestação e lactação. Valores expressos em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *two-way* (dieta x idade) medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Tukey. $p<0,05$, *vs. CTR.

6.2.1.2 Pós-desmame/pré-tratamento

Após o desmame, a evolução do peso corporal e do eixo longitudinal foi avaliada semanalmente até a oitava semana pós-natal (Figura 13). O teste ANOVA *two-way* medidas repetidas indicou efeito da idade ($p<0,0001$) e da dieta ($p=0,029$), e interação entre os fatores ($p<0,0001$) sobre o peso corporal pré-tratamento. O grupo HH apresentou maior peso corporal no 42º ($p<0,01$), 49º ($p<0,0001$) e 56º ($p<0,05$) dias quando comparado ao grupo CTR. Com relação ao eixo longitudinal, ANOVA *Two-way* medidas repetidas (dieta x idade) revelou efeito da idade ($p<0,0001$) e da dieta ($p=0,0015$). Filhotes do grupo HH apresentaram maior eixo longitudinal do que filhotes do grupo Controle no 49º ($p<0,01$) e 56º ($p<0,01$) dia pós-natal.

Figura 13 – Peso corporal e eixo longitudinal pós-desmame/pré-tratamento

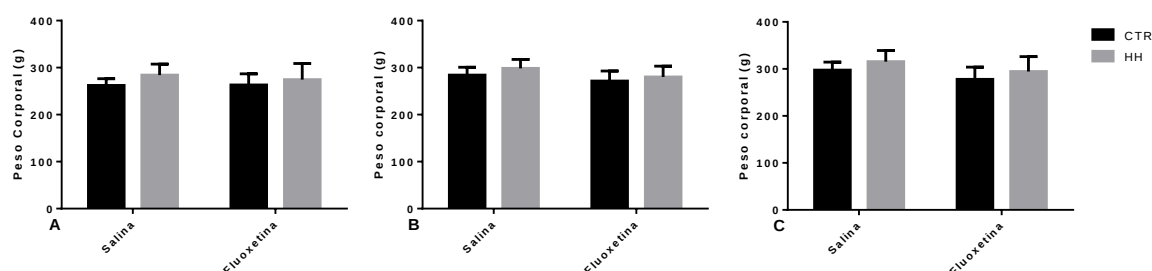


Os filhotes foram alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=11$; $n_{\text{filhotes}}=29$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=11$; $n_{\text{filhotes}}=30$) durante os períodos de gestação e lactação. Valores expressos em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *two-way* (dieta x idade) medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Tukey. $p<0,05$, *vs. CTR.

6.2.1.3 Pós-desmame/tratamento

A partir da nona semana pós-natal, apenas o peso corporal foi avaliado (Figura 14). O teste ANOVA *two-way* (dieta x droga) indicou efeito da dieta ($p=0,0156$) sobre o peso corporal na 9ª semana. Na 10ª ($p_{\text{droga}}=0,0061$; $p_{\text{dieta}}=0,0376$) e na 11ª ($p_{\text{droga}}=0,0035$; $p_{\text{dieta}}=0,0117$) semanas, por outro lado, houve efeito da droga e da dieta. No entanto, o pós-teste de Tukey não indicou diferença entre os grupos em nenhuma das semanas avaliadas.

Figura 12 – Peso corporal pós-desmame/tratamento



Os filhotes foram alimentados por mães submetidas à dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=11$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=11$) durante os períodos de gestação e lactação. At the 9th week, the groups were subdivided into two subgroups: Saline (via i.p) or Fluoxetine (10 mg/kg, via i.p), according to the treatment received for seventeen days, forming four experimental groups, CTRS ($n=14$), CTRF ($n=15$), HHS ($n=15$), HHF ($n=15$). Weight was assessed at the 9th (A), 10th (B) and 11th (C) weeks. Values expressed as mean $\pm$ SD. Two-way ANOVA test (diet x drug), followed by Tukey's post-test. $p<0.05$.

6.2.2 Testes comportamentais

6.2.2.1 Campo aberto

O primeiro teste avaliado foi o campo aberto (Tabela 3). ANOVA *two-way* indicou efeito da droga ($p=0,0131$) e interação entre os fatores ($p=0,0027$) sobre a distância percorrida. O grupo CTRF percorreu maior distância do que o grupo CTRS ($p<0,05$). Com relação à velocidade média, ANOVA *two-way* não revelou efeito ($p_{\text{dieta}}=0,7886$; $p_{\text{droga}}=0,1490$) ou interação ($P=0,2477$) envolvendo os fatores (dieta x droga). O tempo imóvel, por sua vez, foi influenciado pela interação entre os fatores ($p=0,0220$). O grupo CTRF permaneceu menos tempo imóvel do que o grupo CTRS ($p<0,05$). Quando a área

central foi avaliada, ANOVA *two-way* indicou efeito da dieta ($p=0,0217$) sobre o número de entradas. No entanto, o pós-teste de Tukey não revelou diferença entre os grupos. Com relação ao tempo ($p_{\text{interação}}=0,8118$; $p_{\text{dieta}}=0,3713$; $p_{\text{droga}}=0,4595$) e a porcentagem de tempo ($p_{\text{interação}}=0,7337$; $p_{\text{dieta}}=0,2795$; $p_{\text{droga}}=0,5857$) de permanência na área central, ANOVA *two-way* não detectou efeito ou interação envolvendo os fatores (dieta x droga) (Tabela 3). ANOVA *two-way* indicou efeito da droga ($p=0,0442$) e interação envolvendo os fatores ($p=0,038$) sobre o número de *rearing*. O grupo HHF ($p<0,05$) apresentou maior número de *rearing* do que o grupo HHS. Os parâmetros que não passaram no teste de normalidade foram avaliados pelo teste não paramétrico. Kruskal-Wallis indicou diferença para o número de *grooming* ($p=0,0028$). O grupo CTRF ($p<0,05$) apresentou maior número de *grooming* do que o grupo CTRS. Com relação ao número de bolos fecais, Kruskal-Wallis não detectou diferença entre os grupos estudados ($p=0,6777$). Para melhor visualização dos dados, os principais resultados obtidos no campo aberto estão expostos na Figura 15.

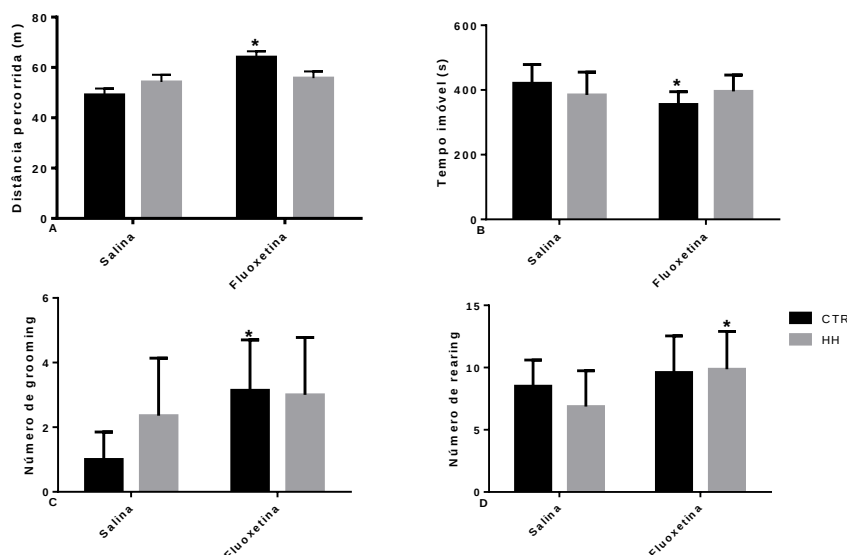
Tabela 3 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 59) no campo aberto durante 15 minutos

	CTR	HH
Distância percorrida (m)^{A,i,f}		
Salina	49,12±8,288	54,25±9,546
Fluoxetina	64,10±8,417*	55,78±9,260
Velocidade média (m/s)^A		
Salina	0,102±0,024	0,109±0,015
Fluoxetina	0,115±0,013	0,110±0,019
Tempo imóvel (s)^{A,i}		
Salina	420,5±58,33	384,9±70,13
Fluoxetina	355,2±39,60*	395,7±50,76
Área central		
Número de entradas^{A,d}		
Salina	45,42±9,080	37,69±11,90
Fluoxetina	49,17±7,196	44,33±7,750
Tempo (s)^A		
Salina	165,7±66,43	167,4±69,39
Fluoxetina	149,1±58,72	168,3±46,42
Porcentagem de tempo^A		
Salina	18,40±7,394	19,64±6,926
Fluoxetina	16,58±6,519	19,52±4,435
Número de grooming^B		
Salina	1,0 (0,25 – 1,0)	2,0 (1,0 – 4,0)
Fluoxetina	3,0 (2,0 – 4,25)*	3,0 (2,0 – 4,0)
Número de rearing^{A,i,f}		
Salina	23,00±7,087	15,21±8,842
Fluoxetina	22,85±8,214	24,85±7,581*
Número de bolos fecais^B		

Salina	3,0 (0,0 – 6,0)	1,0 (0,0 – 3,0)
Fluoxetina	3,0 (0,0 – 5,0)	3,0 (1,0 – 5,0)

Os filhotes machos alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=11$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=11$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9ª semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Salina (via i.p) ou Fluoxetina (10 mg/kg, via i.p), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRS (n=14), CTRF (n=15), HHS (n=15), HHF (n=15). ^AValores expressos em média $\pm$ DP, Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga, *i*: interação, *f*: droga, *d*: dieta), seguido pelo pós-teste de Tukey. ^BValores expressos em mediana (25-75%). Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. $p<0,05$. *vs. Salina do mesmo grupo nutricional.

Figura 15 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 59) no campo aberto durante 15 minutos



Os filhotes machos alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=11$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=11$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9ª semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Salina (via i.p) ou Fluoxetina (10 mg/kg, via i.p), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRS (n=14), CTRF (n=15), HHS (n=15), HHF (n=15). A e B Valores expressos em média $\pm$ DP, Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido pelo pós-teste de Tukey. C e D Valores expressos em mediana (25-75%), Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. $p<0,05$. *vs. Salina do mesmo grupo nutricional.

6.2.2.2 Staircase

Vinte quatro horas depois do campo aberto, os animais foram expostos ao *staircase* (Tabela 4). ANOVA *two-way* não indicou efeito ($p_{\text{dieta}}=0,4373$; $p_{\text{droga}}=0,8912$) ou interação ($p=0,2249$) envolvendo os fatores (dieta x droga) sobre o número de degraus escalados. Com relação ao número de *rearing*, ANOVA *two-way* revelou efeito da droga ($P=0,0064$). O grupo HHF apresentou maior número de *rearing* do que o grupo HHS ($p<0,05$). O número de bolos

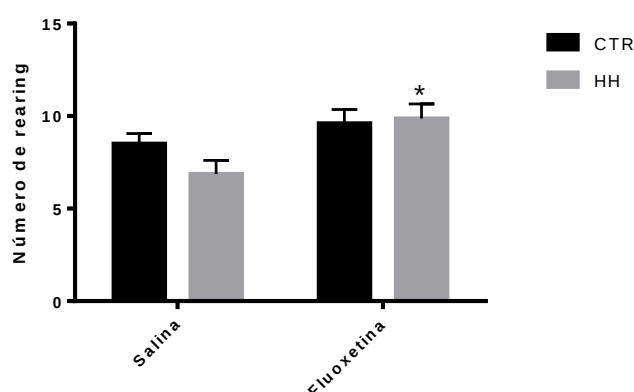
fecais foi avaliado através do teste Kruskal-Wallis. Não houve diferença entre os grupos ($p=0.6961$). A Figura 16 exibe o número de *rearing* para melhor visualização do resultado.

Tabela 4 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 59) no *staircase* durante três minutos

	CTR	HH
Número de degraus escalados^A		
Salina	21,77±5,262	21,09±4,505
Fluoxetina	16,69±4,922	22,75±6,312
Número de <i>rearing</i>^{A,f}		
Salina	8,500±2,103	6,867±2,875
Fluoxetina	9,600±2,947	9,867±3,044*
Bolos fecais^B		
Salina	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)
Fluoxetina	0,0 (0,0 – 1,0)	0,0 (0,0 – 0,0)

Os filhotes machos alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=11$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=11$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9ª semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Salina (via i.p) ou Fluoxetina (10 mg/kg, via i.p), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRS ($n=14$), CTRF ($n=15$), HHS ($n=15$), HHF ($n=15$). ^AValores expressos em média ± DP, Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga, *i*: interação. *f*: droga. *d*: dieta), seguido pelo pós-teste de Tukey. ^BValores expressos em mediana (25-75%). Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. $p<0,05$. *vs. Salina do mesmo grupo nutricional.

Figura 16 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 59) no *staircase* durante três minutos



Os filhotes machos alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=11$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=11$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9ª semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Salina (via i.p) ou Fluoxetina (10 mg/kg, via i.p), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRS ($n=14$), CTRF ($n=15$), HHS ($n=15$), HHF ($n=15$). Valores expressos em média ± DP, Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido pelo pós-teste de Tukey. $p<0,05$. *vs. Salina do mesmo grupo nutricional.

6.2.2.3 Labirinto elevado em cruz

Vinte quatro horas depois do *staircase*, os animais foram expostos ao labirinto elevado em cruz (Tabela 5). ANOVA *two-way* indicou efeito da droga ($P=0,0005$) sobre a distância percorrida. O grupo HHF percorreu maior distância do que o grupo HHS ($P<0,05$). Com relação à velocidade média, Kruskal-Wallis revelou diferença entre os grupos ($P=0,072$). No entanto, o pós-teste de Dunn não detectou diferença. O tempo imóvel, por sua vez, não foi influenciado pela dieta ou droga ou pela interação entre os fatores ($p_{\text{interação}}=0,1889$; $p_{\text{dieta}}=0,9490$; $p_{\text{droga}}=0,5875$). Quando os braços abertos foram avaliados, ANOVA *two-way* não indicou efeito ou interação entre os fatores sobre o número de entradas ($p_{\text{interação}}=0,4525$; $p_{\text{dieta}}=0,48630$; $p_{\text{droga}}=0,2350$) e sobre a porcentagem do número de entradas ($p_{\text{interação}}=0,8096$; $p_{\text{dieta}}=0,1529$; $p_{\text{droga}}=0,6529$). No entanto, o teste ANOVA *two-way* indicou efeito da dieta e interação entre os fatores sobre o tempo ($p_{\text{interação}}=0,0412$; $p_{\text{dieta}}=0,0091$) e sobre a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos ($p_{\text{interação}}=0,0262$; $p_{\text{dieta}}=0,0186$). O grupo HHF permaneceu mais tempo e teve maior porcentagem de tempo nos braços abertos do que o grupo CTRF ($p<0,05$). Com relação aos braços fechados, ANOVA *two-way* indicou efeito da dieta ($p=0,0170$) sobre o número de entradas nos braços fechados. O grupo HHS entrou menos vezes nos braços fechados do que o grupo CTRS ($p<0,05$). A porcentagem do número de entradas ($p_{\text{interação}}=0,3682$; $p_{\text{dieta}}=0,1405$; $p_{\text{droga}}=0,1145$), o tempo de permanência ($p_{\text{interação}}=0,7838$; $p_{\text{dieta}}=0,366$; $p_{\text{droga}}=0,9853$) e porcentagem de tempo de permanência nos braços fechados ($p_{\text{interação}}=0,6052$; $p_{\text{dieta}}=0,05064$; $p_{\text{droga}}=0,7935$) não foram diferentes entre os grupos estudados. Por fim, Kruskal-Wallis revelou que o tempo ($p=0,0129$) e a porcentagem de tempo ($p=0,0438$) de permanência na área central foram diferentes. No entanto, o pós-teste de Dunn não detectou diferença entre os grupos. A Figura 17 exibe os principais resultados obtidos no labirinto elevado em cruz.

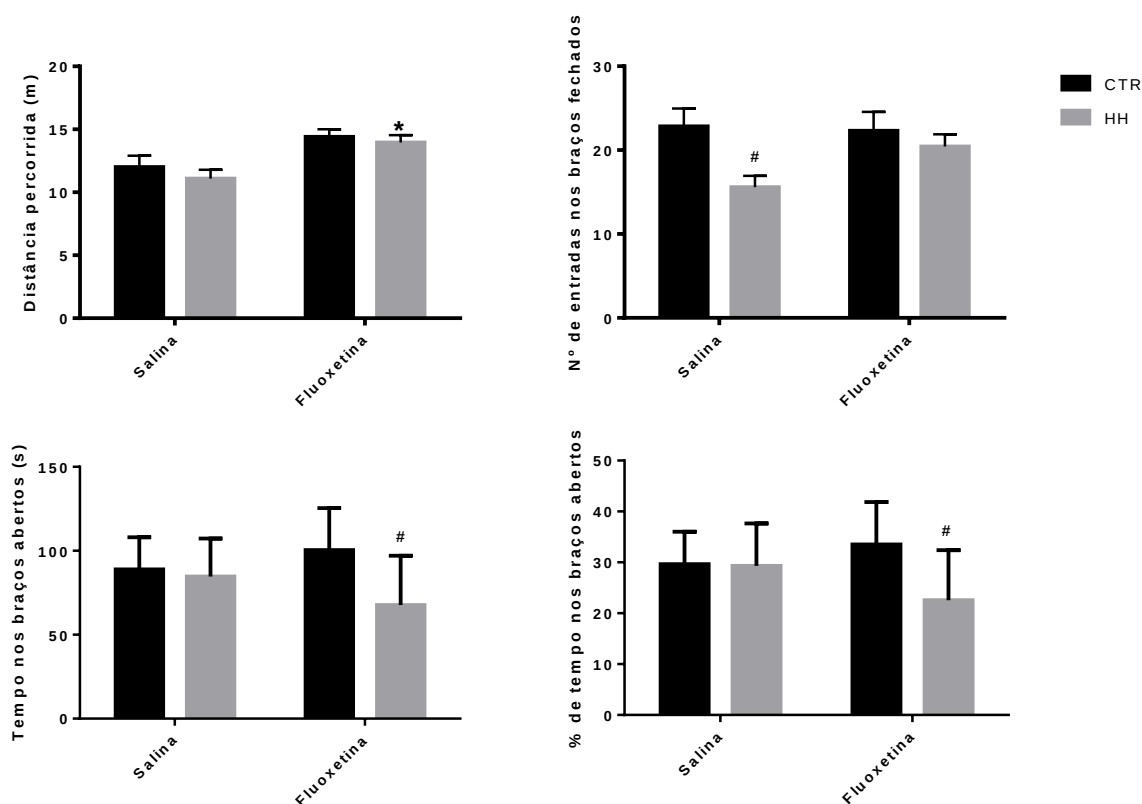
Tabela 5 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 59) no labirinto elevado em cruz durante cinco minutos

	CTR	HH
Labirinto elevado em cruz		
Distância percorrida (m)^{A,f}		
Salina	12,00±3,264	11,09±2,486
Fluoxetina	14,40±2,353	13,95±2,064*
Velocidade média (m/s)^B		
Salina	0,097 (0,092 – 0,112)	0,090 (0,087 – 0,109)
Fluoxetina	0,127 (0,099 – 0,135)	0,104 (0,095 – 0,113)
Tempo imóvel (s)^A		
Salina	183,5±19,58	176,5±20,10

Fluoxetina	173,1±18,37	180,8±5,831
Braços abertos		
Número de entradas^A		
Salina	15,23±4,126	13,21±3,984
Fluoxetina	15,85±4,469	15,92±7,005
% número de entradas^A		
Salina	40,83±9,263	45,82±8,455
Fluoxetina	40,22±11,72	43,77±12,74
Tempo (s)^{A,i,d}		
Salina	88,90±19,20	84,67±6,044
Fluoxetina	100,5±25,01	67,64±29,44 [#]
% tempo^{A,i,d}		
Salina	29,63±6,382	29,31±8,358
Fluoxetina	33,50±8,345	22,56±9,822 [#]
Braços fechados		
Número de entradas^{A,d}		
Salina	22,85±7,647	15,58±4,660 [#]
Fluoxetina	22,31±8,148	20,43±5,459
% número de entradas^A		
Salina	59,17±9,263	52,42±10,30
Fluoxetina	61,12±10,91	59,47±10,19
Tempo (s)^A		
Salina	136,7±27,88	142,8±30,31
Fluoxetina	133,9±41,18	145,2±36,69
% tempo^A		
Salina	47,13±7,972	47,60±10,11
Fluoxetina	44,64±13,73	48,42±12,24
Área central		
Tempo (s)^B		
Salina	55,40 (51,40 – 74,23)	82,90 (66,45 – 91,55)
Fluoxetina	63,65 (51,75 – 75,33)	81,20 (60,95 – 95,40)
% tempo^B		
Salina	18,47 (17,13 – 24,74)	24,47 (21,38 – 29,45)
Fluoxetina	21,22 (17,25 – 25,11)	27,07 (20,32 – 31,80)

Os filhotes machos alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=11$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=11$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9ª semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Salina (via i.p) ou Fluoxetina (10 mg/kg, via i.p), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRS ($n=14$), CTRF ($n=15$), HHS ($n=15$), HHF ($n=15$). ^AValores expressos em média ± DP, Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga, *i*: interação. *f*: droga. *d*: dieta.), seguido pelo pós-teste de Tukey. ^BValores expressos em mediana (25-75%). Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. $p<0,05$. *vs. Salina do mesmo grupo nutricional. # vs. CTR para o mesmo tratamento farmacológico.

Figura 17 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 59) no labirinto elevado em cruz durante cinco minutos



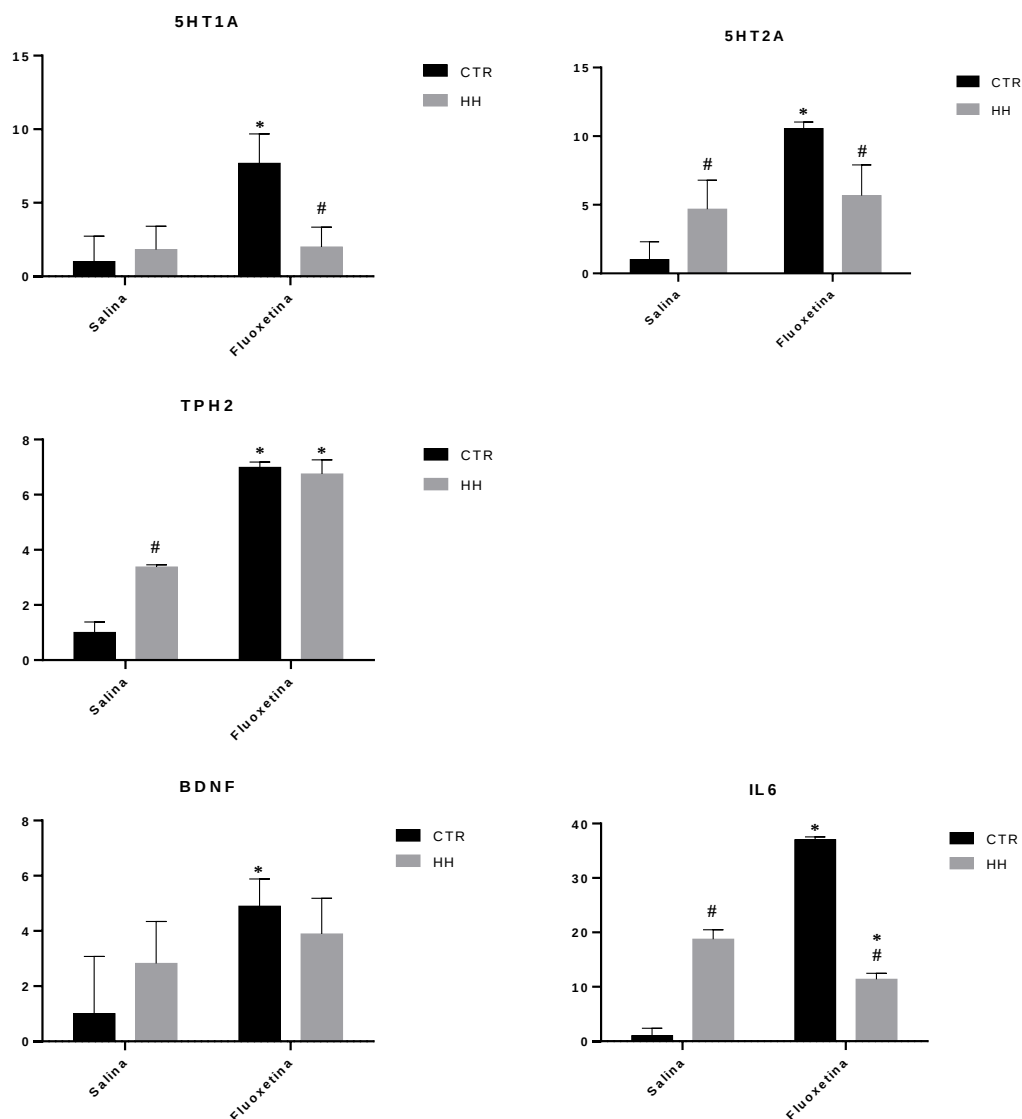
Os filhotes machos alimentados por mães submetidas à dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=11$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=11$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9ª semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Salina (via i.p) ou Fluoxetina (10 mg/kg, via i.p), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRS ($n=14$), CTRF ($n=15$), HHS ($n=15$), HHF ($n=15$). Valores expressos em média $\pm$ DP, Teste ANOVA two-way (dieta x droga), seguido pelo pós-teste de Tukey. $p<0,05$. *vs. Salina do mesmo grupo nutricional. # vs. CTR para o mesmo tratamento farmacológico.

6.2.3 Análise da expressão gênica

O tronco cerebral foi analisado quanto à expressão de alguns genes relacionados ao sistema serotoninérgico e à inflamação (Figura 18). ANOVA two-way indicou efeito da dieta ($p=0,0041$) e da droga ($p=0,0002$), e interação entre os fatores ($p=0,0004$) sobre a expressão do receptor *5ht1a*. O grupo CTRF apresentou maior expressão do receptor *5ht1a* do que o grupo CTRS ($p<0,0001$). Além disso, o grupo HHF ($p=0,0001$) revelou diminuição na expressão do subtipo quando comparado ao grupo CTRF. Com relação ao receptor *5ht2a*, ANOVA two-way indicou efeito da droga ($p<0,0001$), e interação entre os fatores ($p<0,0001$). No grupo HHS, a expressão do receptor *5ht2a* foi maior do que a expressão do grupo CTRS

($p=0,0168$). Ademais, o grupo HHF revelou diminuição na expressão desse receptor quando comparado ao grupo CTRF ($p<0,0011$), enquanto a expressão do subtipo foi maior no grupo CTRF do que no grupo CTRS ($p<0,0001$). Outro componente do sistema serotoninérgico avaliado pelo presente estudo foi a expressão da enzima triptofano hidroxilase 2 (*Tph2*). ANOVA two-way detectou efeito da dieta ($p=0,0036$) e da droga ($p<0,0001$), e interação entre os fatores ($p=0,0006$) sobre a expressão da *Tph2*. Os grupos HHS ($p=0,0002$) e CTRF ($p<0,0001$) revelaram aumento na expressão de *Tph2* quando comparados ao grupo CTRS. Além disso, o grupo HHF apresentou maior expressão de *Tph2* do que o grupo HHS ($p<0,0001$). Com relação ao *Bdnf*, ANOVA two-way indicou da droga ($p=0,0009$), e interação entre os fatores ($p<0,0389$). O grupo CTRF ($p=0,0007$) apresentou aumento na expressão de *Bdnf* quando comparados ao grupo CTRS. Com relação ao fator pró-inflamatório *Il6*, ANOVA two-way detectou efeito da dieta ($p<0,0001$) e da droga ($p<0,0001$), e interação entre os fatores ($p<0,0001$). Os grupos HHS ($p<0,0001$) e CTRF ($p<0,0001$) apresentaram aumento na expressão de *Il6* comparados com o grupo CTRS. Finalmente, o grupo HHF revelou diminuição na expressão de *Il6* quando comparado aos grupos HHS ($p<0,0001$) e CTRS ($p<0,0001$).

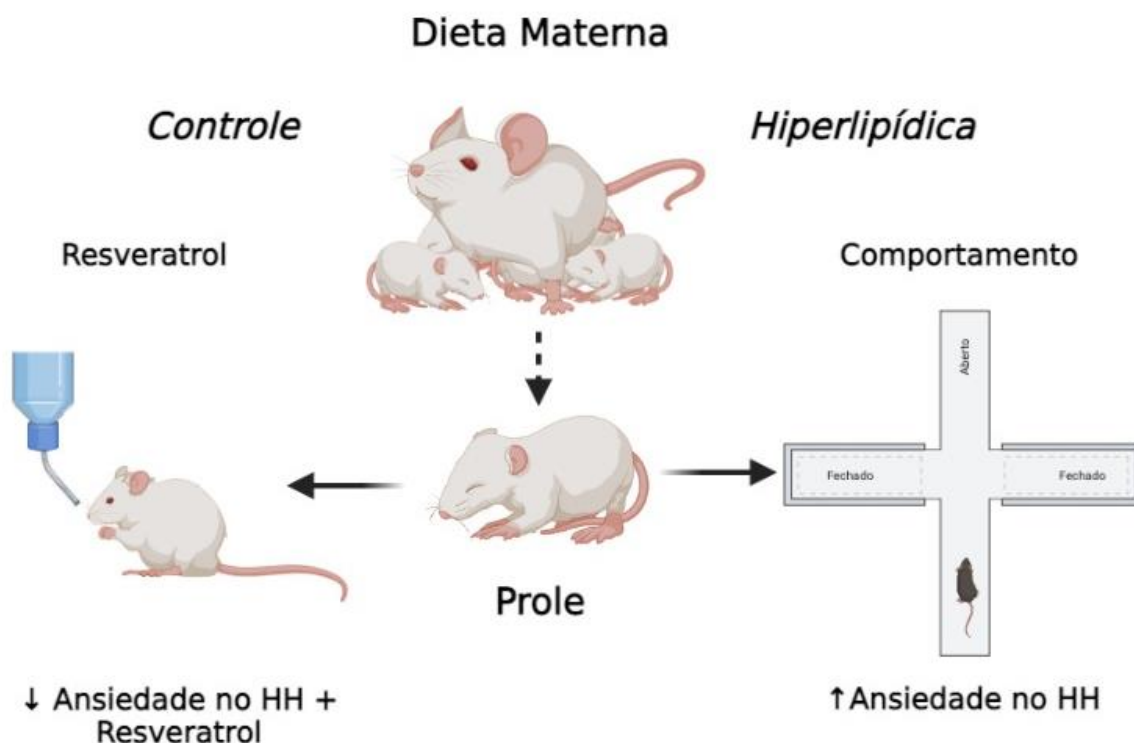
Figura 18 – Expressão gênica



Os filhotes machos alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=11$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=11$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9ª semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Salina (via i.p) ou Fluoxetina (10 mg/kg, via i.p), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRS ($n=6$), CTRF ($n=6$), HHS ($n=6$), HHF ($n=6$). Valores expressos em média $\pm$ EPM, Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido pelo pós-teste de Tukey. *vs. Salina do mesmo grupo nutricional. # vs. CTR para o mesmo tratamento farmacológico.

6.3 Resveratrol

Figura 19 – Efeitos da exposição materna à dieta hiperlipídica/hipercalórica e da administração crônica de resveratrol sobre o comportamento relacionado à ansiedade



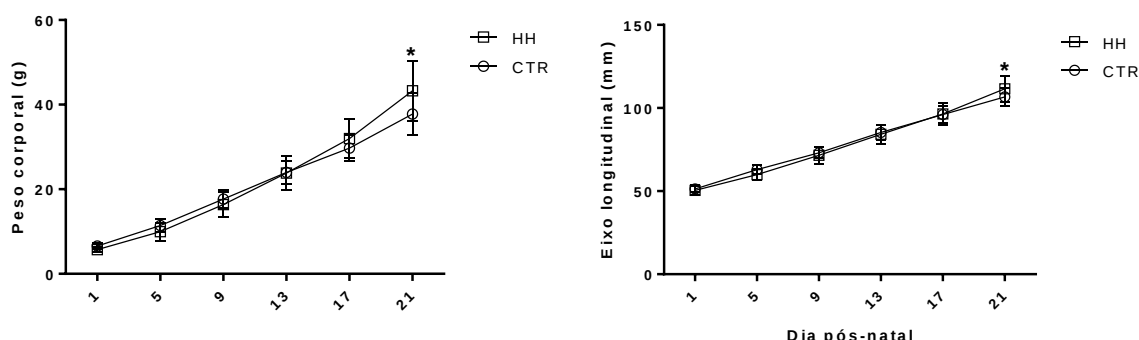
Fonte: Carolina Cadete (2022)

6.3.1 Peso corporal e eixo longitudinal

6.3.1.1 Lactação

O peso corporal e o eixo longitudinal foram avaliados a cada quatro dias durante a lactação (Figura 20). O teste ANOVA *Two-way* medidas repetidas (dieta x idade) revelou efeito significativo da idade ($p < 0,0001$) e interação entre os fatores ($p < 0,0001$) sobre o peso corporal. Filhotes do grupo HH apresentaram maior peso corporal do que os filhotes do grupo CTR no e 21º ($p < 0,0001$) dia pós-natal. Com relação ao eixo longitudinal, o teste ANOVA *Two-way* medidas repetidas (dieta x idade) revelou efeito significativo da idade ($p < 0,0001$) e interação entre os fatores ($p < 0,0001$). O grupo HH apresentou maior eixo longitudinal do que o grupo CTR no 21º ($p < 0,01$) dia pós-natal.

Figura 20 – Peso corporal e eixo longitudinal durante a lactação

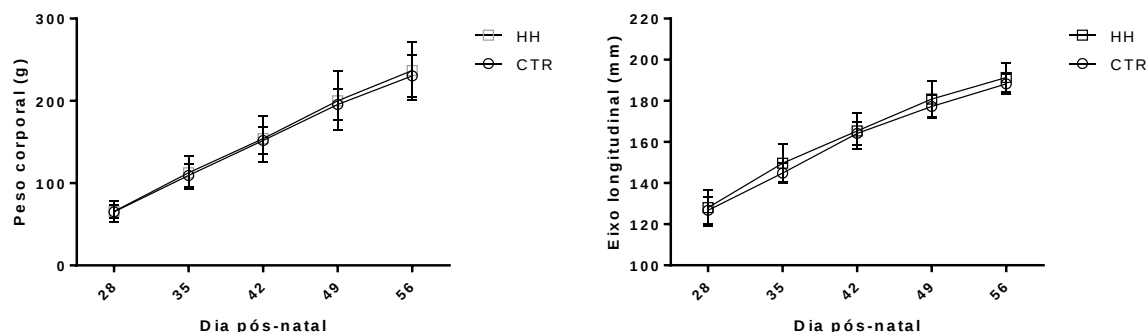


Os filhotes machos foram alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=7$; $n_{\text{filhotes}}=28$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=8$; $n_{\text{filhotes}}=32$) durante os períodos de gestação e lactação. Valores expressos em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *two-way* (dieta x idade) medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Tukey. $p<0,05$, *vs. CTR.

6.3.1.2 Pós-desmame/pré-tratamento

Após o desmame, a evolução do peso corporal e do eixo longitudinal foi avaliada semanalmente até a oitava semana pós-natal (Figura 21). O teste ANOVA *Two-way* medidas repetidas (dieta x idade) revelou efeito da idade ($p<0,0001$) sobre o peso corporal. No entanto, o pós-teste de Tukey não indicou diferença entre os grupos. Com relação ao eixo longitudinal, o teste ANOVA *Two-way* medidas repetidas (dieta x idade) detectou efeito significativo da idade ($p<0,0001$). No entanto, o pós-teste de Tukey não identificou diferença entre os grupos.

Figura 21 – Peso corporal e eixo longitudinal pós-desmame/pré-tratamento



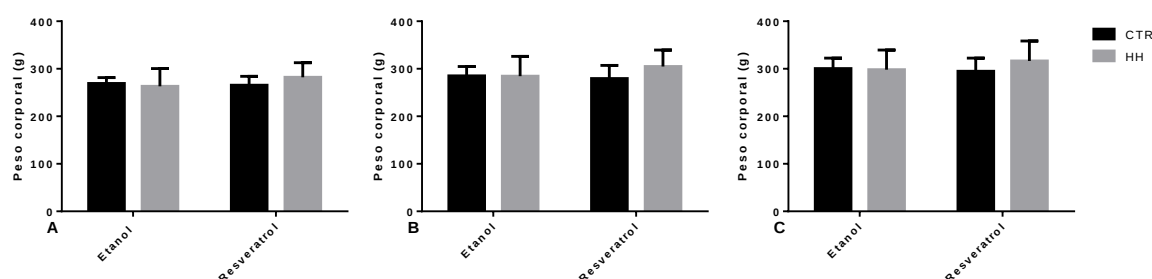
Os filhotes machos foram alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=7$; $n_{\text{filhotes}}=28$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=8$; $n_{\text{filhotes}}=32$) durante os períodos de gestação e lactação. Valores

expressos em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *two-way* (dieta x idade) medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Tukey. $p < 0,05$, *vs. CTR.

6.3.1.3 Pós-desmame/tratamento

A partir da nona semana pós-natal, apenas o peso corporal foi avaliado (Figura 22). ANOVA *two-way* não indicou efeito ou interação envolvendo os fatores (dieta x droga) sobre o peso corporal na 9^a ($p_{\text{interação}}=0,1425$; $p_{\text{dieta}}=0,4810$; $p_{\text{droga}}=0,3074$), 10^a ($p_{\text{interação}}=0,1356$; $p_{\text{dieta}}=0,1535$; $p_{\text{droga}}=0,3992$) e 11^a ($p_{\text{interação}}=0,1968$; $p_{\text{dieta}}=0,2902$; $p_{\text{droga}}=0,4822$) semanas pós-natal.

Figura 22 – Peso corporal pós-desmame/tratamento

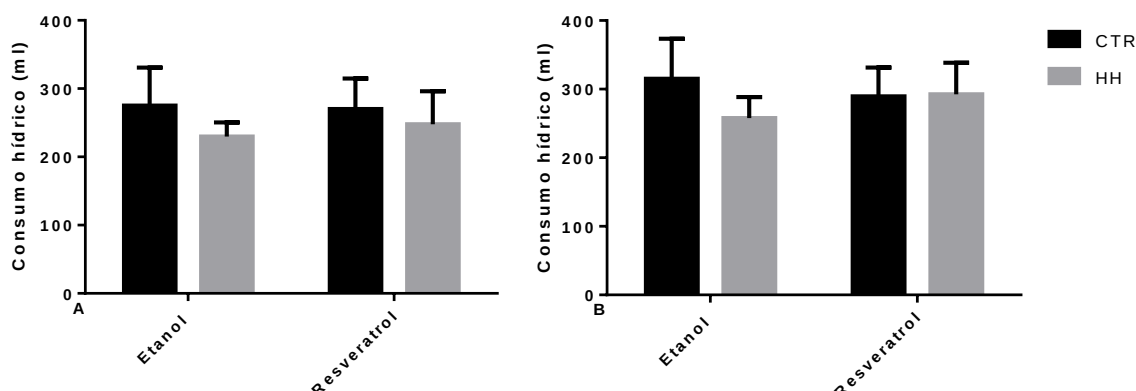


Os filhotes machos alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=7$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=8$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9^a semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Etanol (via oral) ou Resveratrol (50 mg/l, via oral), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRE ($n=14$), CTRR ($n=14$), HHE ($n=16$), HHF ($n=16$). O peso foi avaliado na 9^a (A), 10^a (B) e 11^a (C) semanas. Valores expressos em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido pelo pós-teste de Tukey. $p < 0,05$.

6.3.2 Consumo hídrico

O consumo de resveratrol foi avaliado durante duas semanas (Figura 23). O teste de Kruskal-Wallis não indicou diferença entre os grupos para o consumo durante a primeira semana de oferta (9^a-10^a semanas pós-natal) ($p=0,3437$). Com relação ao consumo durante a segunda semana (10^a-11^a semanas pós-natal), ANOVA *two-way* não revelou efeito ou interação ($p=0,09$) entre os fatores ($p_{\text{dieta}}=0,1238$; $p_{\text{droga}}=0,7929$).

Figura 23 – Consumo hídrico de resveratrol



Os filhotes machos alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=7$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=8$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9ª semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Etanol (via oral) ou Resveratrol (50 mg/l, via oral), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRE ($n=14$), CTRR ($n=14$), HHE ($n=16$), HHF ($n=16$). O consumo de resveratrol foi avaliado durante duas semanas (A: 9ª-10ª e B: 10ª-11ª). A: Valores expressos em mediana (25-75%). Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. B: Valores expressos em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido pelo pós-teste de Tukey.

6.3.3 Testes comportamentais

6.3.3.1 Campo aberto

O campo aberto foi o primeiro teste avaliado (Tabela 6). ANOVA *two-way* não indicou efeito ou interação envolvendo os fatores (dieta x droga) sobre a distância percorrida ($p_{\text{interação}}=0,6972$; $p_{\text{droga}}=0,1534$; $p_{\text{dieta}}=0,5020$), velocidade média ($p_{\text{interação}}=0,9608$; $p_{\text{droga}}=0,9128$; $p_{\text{dieta}}=0,4762$), tempo de imobilidade ($p_{\text{interação}}=0,0507$; $p_{\text{droga}}=0,0769$; $p_{\text{dieta}}=0,6433$), número de entradas na área central ($p_{\text{interação}}=0,1655$; $p_{\text{droga}}=0,8226$; $p_{\text{dieta}}=0,8719$), tempo na área central ($p_{\text{interação}}=0,8223$; $p_{\text{droga}}=0,4405$; $p_{\text{dieta}}=0,0530$) e porcentagem de tempo na área central ($p_{\text{interação}}=0,8187$; $p_{\text{droga}}=0,4425$; $p_{\text{dieta}}=0,0838$). Kruskal-Wallis revelou diferença para o número de bolos fecais ($p=0,0202$). No entanto, o pós-teste de Dunn não detectou diferença entre os grupos. Com relação ao número de *grooming* ($p=0,5073$) e ao número de *rearing* ($p=0,3060$), Kruskal-Wallis não indicou diferença.

Tabela 6 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar ($N = 60$) no campo aberto durante 15 minutos

	CTR	HH
Campo aberto		

Distância percorrida (m)^A		
Etanol	51,76±12,50	52,59±11,38
Resveratrol	46,40±10,90	49,51±9,769
Velocidade média (m/s)^A		
Etanol	0,1036±0,01159	0,1060±0,1306
Resveratrol	0,1039±0,01759	0,1066±0,0118
Tempo imóvel (s)^A		
Etanol	374,5±47,29	418,8±50,14
Resveratrol	442,9±85,93	415,3±69,75
Área central		
Número de entradas^A		
Etanol	38,46±9,649	35,00±8,677
Resveratrol	33,92±12,35	38,29±10,37
Tempo(s)^A		
Etanol	118,3±34,72	151,6±71,12
Resveratrol	108,6±42,48	134,8±75,32
% Tempo^A		
Etanol	13,14±3,873	16,84±7,902
Resveratrol	12,13±4,720	14,98±8,365
Número de grooming^B		
Etanol	2,00 (1,00 – 3,00)	2,00 (1,00 – 2,00)
Resveratrol	1,00 (0,50 – 3,50)	1,00 (0,50 – 2,00)
Número de rearing^B		
Etanol	8,00 (6,75 – 9,25)	7,50 (7,00 – 10,75)
Resveratrol	9,00 (7,00 – 10,0)	9,00 (7,00 – 10,00)
Número de bolos fecais^B		
Etanol	3,00 (0,25 – 6,00)	7,00 (3,00 – 11,0)
Resveratrol	3,00 (2,00 – 5,00)	4,00 (1,00 – 8,00)

Os filhotes machos alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=7$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=8$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9ª semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Etanol (via oral) ou Resveratrol (50 mg/l, via oral), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRE ($n=14$), CTRR ($n=14$), HHE ($n=16$), HHF ($n=16$). A: Valores expressos em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido pelo pós-teste de Tukey. B: Valores expressos em mediana (25-75%). Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn.

6.3.3.2 Staircase

Vinte quatro horas depois do campo aberto, os animais foram expostos ao *staircase* (Tabela 7). O teste ANOVA *two-way* não indicou efeito ou interação envolvendo os fatores (dieta x droga) sobre o número de degraus escalados ($p_{\text{interação}}=0,8643$; $p_{\text{droga}}=0,1453$; $p_{\text{dieta}}=0,3603$). Com relação ao número de rearing ($p=0,6382$), Kruskal-Wallis não revelou diferença entre os grupos. O número de bolos fecais foi analisado a partir do teste Kruskal-Wallis. Não houve diferença entre os grupos ($p=0,4913$).

Tabela 7 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 60) no *staircase* durante 3 minutos

	CTR	HH
Staircase		
Número de degraus escalados^A		
Etanol	24,57±7.891	25.94±6.884
Resveratrol	21.57±6.442	23.56±6.880
Número de rearing^B		
Etanol	8,00 (6,75 – 9,25)	7,50 (7,00 – 12,0)
Resveratrol	9,00 (7,00 – 10,0)	9,00 (7,00 – 13,0)
Bolos fecais		
Etanol	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)
Resveratrol	0,0 (0,0 – 2,5)	0,0 (0,0 – 1,0)

Os filhotes machos alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=7$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=8$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9ª semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Etanol (via oral) ou Resveratrol (50 mg/l, via oral), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRE ($n=14$), CTRR ($n=14$), HHE ($n=16$), HHF ($n=16$). A: Valores expressos em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido pelo pós-teste de Tukey. B: Valores expressos em mediana (25-75%). Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn.

6.3.3.3 Labirinto elevado em cruz

Vinte quatro horas depois do *staircase*, os animais foram expostos ao labirinto elevado em cruz (Tabela 8). ANOVA *two-way* não indicou efeito ou interação entre os fatores (dieta x droga) sobre a distância percorrida ($p_{\text{interação}}=0,2793$; $p_{\text{droga}}=0,1277$; $p_{\text{dieta}}=0,7831$). Com relação à velocidade média, ANOVA *two-way* revelou interação entre os fatores ($p=0,0344$). No entanto, o pós-teste de Dunn não identificou diferença entre os grupos. O tempo imóvel foi influenciado pela droga ($p=0,0311$). No entanto, pós-teste de Dunn não detectou diferença entre os grupos. Quando os braços abertos foram avaliados, ANOVA *two-way* indicou efeito da dieta sobre o número de entradas ($p=0,0047$). No entanto, o pós-teste de Tukey não revelou diferença entre os grupos. Ademais, a porcentagem do número de entradas ($p_{\text{interação}}=0,4491$; $p_{\text{droga}}=0,7117$; $p_{\text{dieta}}=0,0862$), o tempo de permanência ($p_{\text{interação}}=0,3214$; $p_{\text{droga}}=0,9614$; $p_{\text{dieta}}=0,4300$) e a porcentagem de tempo ($p_{\text{interação}}=0,1527$; $p_{\text{droga}}=0,9535$; $p_{\text{dieta}}=0,2184$) de permanência nos braços abertos não foi diferente entre os grupos. Com relação aos braços fechados, ANOVA *two-way* não indicou efeito ou interação envolvendo os fatores sobre o número de entradas ($p_{\text{interação}}=0,7950$; $p_{\text{droga}}=0,9156$; $p_{\text{dieta}}=0,3554$), sobre a porcentagem do número de entradas ($p_{\text{interação}}=0,8517$; $p_{\text{droga}}=0,7481$; $p_{\text{dieta}}=0,2121$), sobre o tempo de permanência ($p_{\text{interação}}=0,7537$; $p_{\text{droga}}=0,0865$; $p_{\text{dieta}}=0,2015$) e sobre a porcentagem de tempo ($p_{\text{interação}}=0,5896$; $p_{\text{droga}}=0,1434$; $p_{\text{dieta}}=0,1027$) de permanência nessa região. Por fim, o tempo

($p_{\text{interação}}=0.0158$) e a porcentagem ($p_{\text{interação}}=0.0287$) de tempo de permanência na área central foram influenciados pela interação entre os fatores (dieta x droga). O grupo HHS passou mais tempo ($p<0,05$) e maior porcentagem de tempo ($p<0,05$) na área central do que o grupo CTRS. Kruskal-Wallis não indicou diferença para o número de bolos fecais ($p=0,9863$). Para melhor visualização dos dados, os principais resultados obtidos no labirinto elevado em cruz estão expostos na Figura 24.

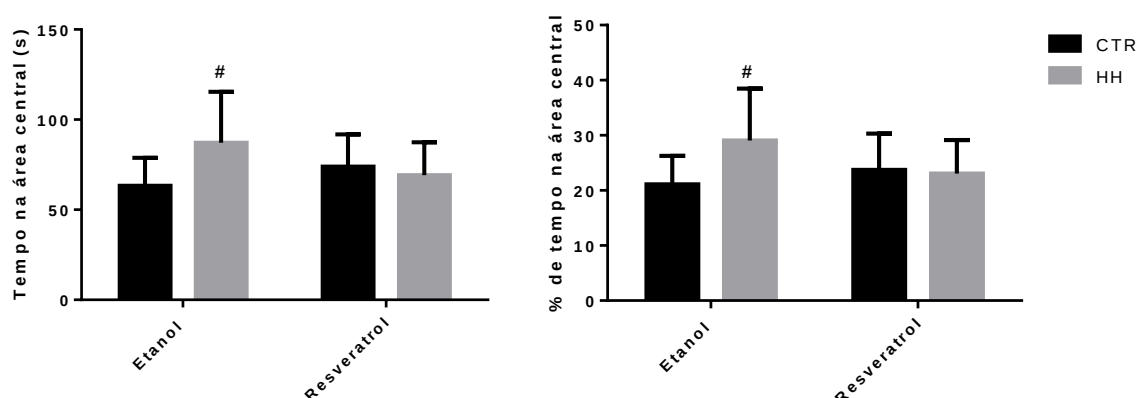
Tabela 8 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 60) no labirinto elevado em cruz durante cinco minutos

	CTR	HH
Labirinto elevado em cruz		
Distância percorrida (m)^A		
Etanol	14,66±4,012	13,95±3,389
Resveratrol	12,37±2,773	13,50±2,886
Velocidade média (m/s)^{A,i}		
Etanol	0,1076±0,02267	0,1018±0,01344
Resveratrol	0,09979±0,01266	0,1113±0,01099
Tempo imóvel (s)^{A,f}		
Etanol	163,7±23,21	164,8±24,41
Resveratrol	176,4±14,48	178,1±22,74
Braços abertos		
Número de entradas^{A,d}		
Etanol	12,77±5,403	16,46±2,295
Resveratrol	13,15±4,298	16,75±5,285
% Número de entradas^A		
Etanol	39,50±12,59	42,51±7,514
Resveratrol	38,31±12,79	45,96±11,92
Tempo (s)^A		
Etanol	75,98±41,14	74,28±24,27
Resveratrol	68,09±16,88	82,98±29,80
% Tempo^A		
Etanol	25,34±13,73	24,76±8,090
Resveratrol	21,42±6,941	29,01±10,91
Braços fechados		
Número de entradas^A		
Etanol	20,00±7,990	18,71±5,413
Resveratrol	22,07±8,033	19,79±6,693
% número de entradas^A		
Etanol	60,57±12,51	57,16±9,920
Resveratrol	60,14±13,59	19,79±6,693
Tempo (s)^A		
Etanol	139,7±33,95	131,4±31,82
Resveratrol	157,4±31,55	143,6±26,58
% Tempo^A		
Etanol	46,58±11,32	43,79±10,61
Resveratrol	62,47±10,51	43,53±10,01

Área central		
Tempo (s)^{A,i}		
Etanol	63,32±15,45	87,20±28,20 [#]
Resveratrol	73,95±5,155	69,17±18,30
% Tempo^{A,i}		
Etanol	21,10±5,151	29,07±9,401 [#]
Resveratrol	23,74±6,575	23,06±6,100
Bolos fecais^B		
Etanol	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)
Resveratrol	0,0 (0,0 – 0,0)	0,0 (0,0 – 0,0)

Os filhotes machos alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=7$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=8$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9ª semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Etanol (via oral) ou Resveratrol (50 mg/l, via oral), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRE ($n=14$), CTRR ($n=14$), HHE ($n=16$), HHF ($n=16$). A: Valores expressos em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga, *i*: interação. *f*: fármaco. *d*: dieta), seguido pelo pós-teste de Tukey. B: Valores expressos em mediana (25-75%). Teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. $p<0,05$. # vs. CTR para a mesma linha.

Figura 24 – Comportamentos exibidos por ratos machos albinos Wistar (N = 60) no labirinto elevado em cruz durante cinco minutos



Os filhotes machos alimentados por mães submetidas a dieta Controle (CTR, $n_{\text{mães}}=7$) ou Hiperlipídica-hipercalórica (HH, $n_{\text{mães}}=8$) durante os períodos de gestação e lactação. Na 9ª semana de vida, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos: Etanol (via oral) ou Resveratrol (50 mg/l, via oral), de acordo com o tratamento recebido por dezessete dias, formando quatro grupos experimentais, CTRE ($n=14$), CTRR ($n=14$), HHE ($n=16$), HHF ($n=16$). Valores expressos em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido pelo pós-teste de Tukey. $p<0,05$. # vs. CTR para o mesmo tratamento.

7 DISCUSSÃO

7.1 Fluoxetina

A exposição materna a dieta hiperlipídica/hipercalórica aumentou o peso corporal dos filhotes no final da lactação. No período pós-desmame, o peso corporal e o eixo longitudinal foram maiores para o grupo HH apenas em alguns pontos do desenvolvimento. Quanto aos testes comportamentais, quando analisamos o efeito da dieta hiperlipídica materna, observamos diferença apenas no teste de labirinto elevado em cruz. O grupo HHS entrou menos vezes nos braços fechados do que o grupo CTRS. A análise de expressão gênica do tronco cerebral, por sua vez, revelou aumento nos níveis de *Il6*, de *Tph2* e do receptor *5ht2a* no grupo hiperlipídico quando comparado ao grupo controle. Com relação ao tratamento farmacológico, a administração crônica de fluoxetina influenciou o comportamento do grupo CTR apenas no campo aberto. O grupo CTRF apresentou aumento na distância percorrida, diminuição no tempo de imobilidade e aumento no número de *grooming* quando comparado ao grupo CTRS. Além disso, houve aumento na expressão de *Il6*, de *Bdnf*, de *Tph2* e dos receptores *5ht1a* e *5ht2a*. Quando o filhote era proveniente do grupo HH, o tratamento com fluoxetina influenciou o comportamento nos três aparatos. O grupo HHF apresentou aumento no número de *rearing* tanto no campo aberto quanto no *staircase* e aumentou a distância percorrida no labirinto elevado em cruz quando comparado ao HHS. Ademais houve diminuição na expressão gênica de *Il6* e aumento na expressão gênica de *Tph2* comparado aos animais HHS. Além disso, o grupo HHF passou menos tempo e teve menor porcentagem de tempo nos braços abertos do que o grupo HHS. Finalmente, o grupo HHF apresentou menor expressão gênica dos receptores *5ht1a* e *5ht2a* e menor expressão gênica de *Il6* do que o grupo CTRF.

O peso corporal e o eixo longitudinal dos filhotes de mães HH e CTR não foram diferentes ao nascer. De maneira semelhante, outros estudos com dieta hiperlipídica materna também não observaram diferença (DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO, 1997; GIRIKO *et al.*, 2013; CADENA-BURBANO *et al.*, 2019). Segundo Sasaki (2013), a semelhança entre os pesos corporais dos grupos hiperlipídicos e controle no primeiro dia pós-natal (PND1) sugere que o modelo experimental adotado não envolve restrição proteica. Isso porque dietas hiperlipídicas que também são hipoproteicas reduzem o peso corporal da prole (MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014).

Ao decorrer da lactação, filhotes de mães HH apresentaram maior peso corporal do que filhotes de mães CTR no 17º e 21º dias pós-natal. Cadena-Burbano e colaboradores (2019) observaram resposta similar, já que a prole HH também apresentou maior peso do que

a prole CTR no último dia da lactação. Outros estudos não observaram diferença (GIRIKO *et al.*, 2013; BALSEVICH *et al.*, 2016) entre os grupos experimentais ou revelaram diminuição (MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014) no peso corporal para o grupo hiperlipídico. Com relação ao comprimento, os estudos conduzidos por Soares (2009) e Mendes-da-Silva (2014) observaram diminuição no eixo longitudinal em diferentes pontos da lactação (SOARES *et al.*, 2009; MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014). Cadena-Burbano (2019), por outro lado, observou aumento no eixo longitudinal ao final da lactação (PND21) (CADENA-BURBANO *et al.*, 2019). O aumento no peso corporal observado pelo presente estudo pode estar relacionado à composição do leite materno. Estudos que ofertaram dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação revelaram aumento na quantidade de lipídico total presente no leite materno (DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO, 1997; PURCELL *et al.*, 2011) e produção de maior volume diário de leite (DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO, 1997). Além disso, a exposição dos filhotes à dieta materna também pode ter influenciado o peso corporal. Segundo Doerflinger e colaboradores (2004), os filhotes expostos à dieta materna rica em gordura e em caloria iniciaram a ingestão de alimentos sólidos um dia antes dos filhotes expostos à dieta controle (DOERFLINGER e SWITHERS, 2004).

No período pós-desmame, o grupo HH apresentou maior peso corporal do que o grupo CTR no 42º, 49º e 56º dia pós-natal/pré-tratamento. Além disso, o grupo HH também revelou maior eixo longitudinal no 49º e no 56º dia pós-natal/pré-tratamento. Sun e colaboradores (2012) também observaram aumento no peso corporal para o grupo HH durante o período pós-desmame e esse aumento foi atribuído à sensibilidade reduzida a leptina (SUN *et al.*, 2012). No entanto, é válido ressaltar que, em machos, a diferença foi observada da sexta semana até o final dos experimentos, na 12ª semana pós-natal (SUN *et al.*, 2012). Os estudos conduzidos por Balsevich (2016) e Sasaki (2013), por outro lado, não encontraram diferença para o peso corporal entre os grupos experimentais. Nas semanas de administração de fluoxetina (9ª-10ª e 10ª-11ª semanas), por sua vez, o peso corporal não foi diferente entre os grupos. Trabalhos que avaliaram apenas o efeito da fluoxetina – sem oferta de dieta – observaram diminuição no peso corporal 7, 14 e 21 dias após o início do tratamento (DURAND *et al.*, 1999) ou em alguns pontos do desenvolvimento (AMODEO *et al.*, 2015). No estudo conduzido por McGuirk, Muscat e Willner (MCGUIRK, MUSCAT e WILLNER, 1992), a perda de peso foi relacionada à diminuição no consumo alimentar. Com relação à dieta rica em gordura, um estudo que associou dieta hiperlipídica pós-desmame e um modelo animal de depressão à administração crônica de fluoxetina na dose de 10 mg/kg de peso, via i.p., não revelou diferença entre o peso corporal dos grupos controle e hiperlipídico

(ISINGRINI *et al.*, 2010). No trabalho de Zemdeg (2016), por sua vez, o tratamento com outro ISRS, o escitalopran na dose de 10 mg/kg de peso, não teve efeito sobre o peso corporal de ambos os grupos, o controle e o hiperlipídico (ZEMDEGS *et al.*, 2016). Desta forma, o efeito que a administração crônica de fluoxetina tem sobre o peso corporal parece variar de acordo com o protocolo experimental adotado.

Quanto aos testes comportamentais, foram avaliados o campo aberto, o *staircase* e o labirinto elevado em cruz – catorze dias depois do início do tratamento farmacológico com fluoxetina. Esses três testes avaliam o comportamento relacionado à ansiedade-estado (GRIEBEL *et al.*, 1993; CLEMENT *et al.*, 2007; ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015), que pode ser caracterizado como: estado emocional passageiro, de intensidade variável, experimentado em um momento particular do tempo (ANDRADE e GORENSTEIN, 1998; GAMA *et al.*, 2008). A dieta hiperlipídica/hipercalórica durante a gestação e a lactação teve efeito sobre o comportamento emocional dos filhotes machos apenas quando o labirinto elevado em cruz foi avaliado. No LEC, o grupo HHS entrou menos vezes nos braços fechados do que o grupo CTRS. No entanto, quando a porcentagem do número de entradas nos braços fechados foi calculada, essa diferença foi perdida. Além disso, o número e a porcentagem do número de entradas nos braços abertos não foram diferentes entre os grupos. Portanto, essa diminuição não é suficiente para afirmar que o grupo hiperlipídico/hipercalórico apresentou menor comportamento relacionado à ansiedade. Similarmente, alguns estudos não encontraram diferença para o comportamento emocional quando as mães foram expostas à dieta hiperlipídica antes do acasalamento e/ou durante os períodos de gestação e/ou lactação (GIRIKO *et al.*, 2013; JANTHAKHIN *et al.*, 2017; BERRY *et al.*, 2018; CADENABURBANO *et al.*, 2019; ZIEBA *et al.*, 2019; LIPPERT *et al.*, 2020; GAWLIŃSKA *et al.*, 2021). Por outro lado, o aumento ou a diminuição na emocionalidade também já foram observados (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; SASAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016; JOHNSON *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2017; GLENDINING, FISHER e JASONI, 2018; BAYANDOR *et al.*, 2019; SOUTO *et al.*, 2020; CAVALCANTI *et al.*, 2021; GAWLIŃSKA *et al.*, 2021; ROCHA-GOMES *et al.*, 2021). Essa discrepância entre os nossos resultados e aqueles encontrados na literatura pode estar associada à metodologia adotada, que varia desde o tempo de exposição materna à dieta hiperlipídica até a idade do animal avaliado.

Com relação à atividade locomotora, nós também não observamos diferença entre os grupos estudados. De maneira similar, os parâmetros locomotores não foram diferentes entre os grupos hiperlipídico e controle em alguns trabalhos disponíveis na literatura (NAEF *et al.*,

2008; PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; NAEF, GRATTON e WALKER, 2013; SASAKI *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2015; PELEG-RAIBSTEIN *et al.*, 2016; GRISSOM, GEORGE e REYES, 2017; JANTHAKHIN *et al.*, 2017; SASAKI, MCGOWAN e ERB, 2018; CORDNER *et al.*, 2019). No entanto, o aumento ou a diminuição nos parâmetros locomotores já foram observados por outros estudos (RAYGADA, CHO e HILAKIVI-CLARKE, 1998; TOZUKA *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2014; PAGE, JONES e ANDAY, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2017; LIPPERT *et al.*, 2020; CAVALCANTI *et al.*, 2021; ROCHA-GOMES *et al.*, 2021). Como foi dito anteriormente, o protocolo experimental utilizado pode ter contribuído para a semelhança observada entre os grupos avaliados, pois não há uma padronização entre os estudos disponíveis na literatura. Além de o tempo de oferta de dieta hiperlipídica ser diferente, a quantidade de lipídio, a linhagem do animal, o sexo e a idade de exposição aos testes são bem diferentes de um estudo para o outro.

Apesar de o comportamento não ter sido diferente, a expressão de *Il6* no tronco cerebral foi maior para o grupo hiperlipídico quando comparado ao grupo controle. Sasaki e colaboradores (2013), por sua vez, observaram aumento na expressão de *Il6* na amígdala em machos e fêmeas adultos (SASAKI *et al.*, 2013). Outros estudos, por outro lado, não observaram diferença entre os grupos (GRISSOM, GEORGE e REYES, 2017; ROCHA-GOMES *et al.*, 2021). O aumento na expressão de *Il6* sugere que a exposição materna à dieta hiperlipídica levou a inflamação – definida como uma resposta imune natural ao estresse (DONEV, 2012; SALIM, CHUGH e ASGHAR, 2012). A inflamação é geralmente considerada protetora quando seu mecanismo de ação é conter a lesão ou a infecção, localmente (DONEV, 2012; SALIM, CHUGH e ASGHAR, 2012). No entanto, a inflamação torna-se prejudicial quando passa a ser excessiva ao longo do tempo (DONEV, 2012; SALIM, CHUGH e ASGHAR, 2012). A inflamação crônica, por exemplo, torna-se patológica após uma resposta inflamatória ativa duradoura e quando leva a destruição tecidual prolongada (DONEV, 2012; SALIM, CHUGH e ASGHAR, 2012). As citocinas são conhecidas por mediar a comunicação entre o sistema imunológico e o cérebro, e parecem coordenar a resposta celular aos desafios imunológicos e permitir mudanças comportamentais necessárias para a recuperação (DONEV, 2012; SALIM, CHUGH e ASGHAR, 2012). A liberação de citocinas pró-inflamatórias durante uma resposta imune é geralmente transitória e regulada por mecanismos anti-inflamatórios (DONEV, 2012; SALIM, CHUGH e ASGHAR, 2012). Assim, os efeitos comportamentais provocados pela ativação da resposta inflamatória aparecem como reação temporária e controlada do SNC aos sinais imunes (DONEV, 2012; SALIM, CHUGH e ASGHAR, 2012). Entretanto, quando o desafio imunológico se torna

crônico, os efeitos comportamentais das citocinas e a resposta inflamatória resultante podem contribuir para o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas (DONEV, 2012; SALIM, CHUGH e ASGHAR, 2012). Apesar de os testes comportamentais utilizados pelo presente estudo não terem acusado diferença entre os grupos controle e hiperlipídico, a exposição materna à dieta hiperlipídica pode ter influenciado outros aspectos do comportamento. Portanto, seria interessante utilizar outros aparatos para avaliar o comportamento relacionado à depressão e a memória. Além disso, é importante salientar que diferentes idades podem revelar comportamentos antagônicos como já observado por alguns estudos (SASAKI *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016). Então, outro ponto a ser explorado por futuros estudos seria o comportamento em diferentes fases do desenvolvimento.

Com relação aos componentes do sistema serotoninérgico, o grupo hiperlipídico apresentou aumento na expressão gênica da enzima triptofano hidroxilase 2 e do receptor 5-HT_{2A}. Similarmente, a equipe de Sullivan (2010) revelou aumento na expressão de *Tph2* no núcleo rostral da rafe (SULLIVAN *et al.*, 2010). O estudo liderado por Tavares-Dias, por sua vez, revelou aumento na expressão proteica de TPH2 no hipocampo (DIAS *et al.*, 2020). Sullivan e colaboradores (2010) propuseram que a expressão elevada de *Tph2* pode estar relacionada ao estresse provocado pela exposição materna à dieta hiperlipídica, visto que o estresse agudo aumentou a expressão de *Tph2* no mesencéfalo (SHISHKINA, KALININA e DYGALO, 2007; SULLIVAN *et al.*, 2010). Além disso, eles também resgataram a ideia explorada por outros autores, em que a expressão elevada desse componente do sistema serotoninérgico seria uma resposta homeostática à neurotransmissão deficiente de serotonina, visto que pacientes com depressão apresentaram aumento na expressão de *Tph2* no núcleo dorsal da rafe (BACH-MIZRACHI *et al.*, 2008; LOWRY *et al.*, 2008). Essa interpretação levanta a possibilidade de o protocolo experimental adotado pelo presente estudo levar ao aumento no comportamento relacionado à depressão ainda não avaliado. Portanto, seria interessante analisar futuramente esse tipo de comportamento e, consequentemente, preencher as lacunas deixadas em branco.

Como a exposição à dieta hiperlipídica pode alterar a sensibilidade do sistema serotoninérgico (ISINGRINI *et al.*, 2010; ZEMDEGS *et al.*, 2016), nós também avaliamos o efeito que a administração crônica de fluoxetina tem sobre o comportamento emocional e sobre a atividade locomotora. O grupo Controle que recebeu fluoxetina percorreu maior distância, gastou menos tempo em imobilidade e apresentou maior número de *grooming* no campo aberto do que o grupo que recebeu salina. De maneira similar, o grupo hiperlipídico/hipercalórico que recebeu fluoxetina apresentou aumento no número de *rearing*

no campo aberto e no *staircase*, e percorreu maior distância no labirinto elevado em cruz do que o grupo que recebeu salina. Juntos, esses resultados sugerem que a sensibilidade ao fármaco não foi reduzida no grupo hiperlipídico, além de indicarem que ambos os grupos apresentaram hiperatividade e aumento no comportamento relacionado à ansiedade devido à administração da fluoxetina.

Segundo Keogh (1971), a hiperatividade é caracterizada por um nível persistente, elevado e sustentado de atividade, e/ou pelo aumento da velocidade (KEOGH, 1971). Ademais, alguns pesquisadores consideram o número/tempo em *rearing* como “movimento locomotor” e associam o aumento desse parâmetro ao comportamento hiperativo (VEZINA e KIM, 1999; ZHOU *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2014). Outros defendem que esse aumento também pode ser interpretado como sinal de comportamento relacionado à ansiedade (KANG *et al.*, 2014). O *rearing* teria um papel na coleta de informações e no comportamento de fuga e fatores como o medo e o comportamento relacionado à ansiedade podem influenciar o número/tempo em *rearing* (LEVER, BURTON e O'KEEFE, 2006). De maneira simples, o *rearing* ocorreria menos durante os extremos de altos níveis de medo e níveis muito baixos de ansiedade, e mais durante baixos níveis de medo e níveis relativamente altos de ansiedade (GENARO e SCHMIDEK, 2000; GRAY e MCNAUGHTON, 2000). Outro ponto interessante é a influência que o ambiente do teste exerce sobre o *rearing* (GENARO e SCHMIDEK, 2000). A exposição a um “campo aberto simples” revelou resposta emocional elevada – identificada pela presença de defecação e urinação – e aumento na distância percorrida e no número de *rearing* (GENARO e SCHMIDEK, 2000). Quando o campo aberto oferecia a opção de ficar dentro de um abrigo ou de explorar a arena, os animais foram relutantes em deixar essa “zona de conforto” (GENARO e SCHMIDEK, 2000). Esse resultado sugere que o maior número de *rearing* e a maior distância percorrida estão associados ao comportamento de fuga e não ao comportamento exploratório (GENARO e SCHMIDEK, 2000).

O número/tempo em grooming, por sua vez, pode ser interpretado de diferentes maneiras, dependendo do contexto. A atividade de grooming pode aumentar em duas situações opostas: quando exposto a condições espontâneas ou de baixo estresse, o grooming é considerado uma “atividade de conforto”, caracterizando-se como uma transição do repouso para a atividade, seguindo uma regra cefalocaudal (KALUEFF e TUOHIMAA, 2005). No entanto, o estresse leve, como a exposição a um novo ambiente, também é conhecido por induzir o grooming em ratos (KALUEFF e TUOHIMAA, 2005). O *grooming* evocado pelo estresse, por outro lado, é caracterizado pela curta duração, alta frequência e rapidez do

movimento (KALUEFF e TUOHIMAA, 2005). Portanto, como o campo aberto pode ser considerado um ambiente estressante, o aumento no número de grooming observado pelo presente estudo sugere aumento no comportamento emocional.

De maneira semelhante aos nossos resultados, outros estudos, que avaliaram apenas o efeito da administração crônica de fluoxetina – sem a oferta da dieta –, encontraram aumento no comportamento relacionado à ansiedade (DURAND *et al.*, 1999; AMODEO *et al.*, 2015; MCAVOY *et al.*, 2015). No entanto, a diminuição no comportamento emocional também já foi observada (GRIEBEL *et al.*, 1999; DULAWA *et al.*, 2004; SORREGOTTI *et al.*, 2013). Com relação à atividade locomotora, resultados semelhantes ao nosso, para administração crônica de fluoxetina, não são de nosso conhecimento. Por outro lado, estudos que não observaram diferença entre os grupos estudados (DULAWA *et al.*, 2004; MCAVOY *et al.*, 2015) ou que encontraram diminuição na locomoção (GRIEBEL *et al.*, 1999; SILVA, ALVES e SANTAREM, 1999; BAEK, PARK e HAN, 2015) estão disponíveis na literatura.

O aumento na atividade locomotora e no comportamento relacionado à ansiedade observado pelo presente estudo pode ser explicado em diferentes níveis. Alterações nos sistemas de neurotransmissão, por exemplo, aparecem como fortes candidatos (LIPPERT *et al.*, 2020). Apesar de a fluoxetina atuar sobre o transportador de serotonina, o SERT, estudos já demonstraram que a administração crônica desse fármaco pode afetar outros componentes do sistema serotoninérgico e de outros neurotransmissores de maneira indireta (HRDINA e VU, 1993; PENTTILÄ *et al.*, 2004; AMPUERO *et al.*, 2010; FARLEY *et al.*, 2012; KOBAYASHI *et al.*, 2012; MUSAZZI *et al.*, 2013; O'CONNOR *et al.*, 2013; SHUTO *et al.*, 2020; HEINRICH *et al.*, 2021). Um estudo pioneiro desenvolvido por Hrdina e Vu (1993), por exemplo, relatou que a administração crônica de fluoxetina influencia a expressão do receptor *5ht2a* em diferentes regiões do encéfalo – subtipo cuja ativação está relacionada à locomoção (HRDINA e VU, 1993; LIU e JORDAN, 2005; SŁAWIŃSKA e JORDAN, 2019). Os subtipos 5-HT_{1A} e 5-HT₇ também estão associados ao comportamento emocional e a atividade locomotora (HRDINA e VU, 1993; LIU e JORDAN, 2005; SŁAWIŃSKA e JORDAN, 2019). No entanto, não é de nosso conhecimento artigos que façam associação desses receptores à ação da fluoxetina.

Com relação ao presente estudo, nós observamos aumento na expressão dos receptores *5ht1a* e *5ht2a* no grupo controle após a administração crônica de fluoxetina quando o tronco cerebral foi avaliado. Além disso, houve aumento na expressão de *Bdnf* e de *Tph2*. Esses resultados podem ser explicados pela interação que o BDNF tem com o sistema serotoninérgico no cérebro por meio de mecanismos de *feedback* – engajados na

autorregulação do complexo envolvendo o sistema 5-HT e fatores neurotróficos (POPOVA, ILCHIBAEVA e NAUMENKO, 2017). O BDNF estimula o crescimento de neurônios 5-HT e influencia a expressão de genes-chave do sistema serotoninérgico no cérebro – aqueles que codificam a TPH2 e os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} (POPOVA, ILCHIBAEVA e NAUMENKO, 2017). O 5-HT, por sua vez, afeta a expressão de genes que controlam o BDNF em estruturas cerebrais (POPOVA, ILCHIBAEVA e NAUMENKO, 2017). Por exemplo, o aumento na expressão de *Bdnf*, na cultura de células do núcleo da rafe, foi acompanhado pela expressão elevada de *5ht1a* e *5ht2a*, como revisado por Popova, Ilchibaeva e Naumenko (2017). Com relação à TPH2, um estudo semelhante ao nosso, que administrou fluoxetina na dose de 25 mg/kg de peso, via oral, durante 14 dias, observou diminuição na expressão de *Tph2* no tronco cerebral quando ratos Wistar (entre 200–220 g) foram eutanasiados vinte e quatro horas depois da última dose (DYGALO *et al.*, 2006). Apesar disso, a administração crônica de fluoxetina aumentou o comportamento relacionado à ansiedade no labirinto elevado em cruz, resultado similar ao nosso (DYGALO *et al.*, 2006).

No grupo hiperlipídico, por outro lado, a administração crônica de fluoxetina influenciou apenas a expressão de *Tph2*. Houve aumento no grupo HHF quando comparado ao grupo HHS. Esses resultados sugerem, portanto, que o aumento na locomoção observado foi influenciado por outros fatores. É sabido, por exemplo, que a fluoxetina influencia de maneira indireta alguns componentes do sistema dopaminérgico, como, por exemplo, a concentração de dopamina extracelular e a densidade dos receptores D1 e D2 (PENTTILÄ *et al.*, 2004; KOBAYASHI *et al.*, 2012; SHUTO *et al.*, 2020). Por fim, alguns componentes do sistema glutamatérgico, como, por exemplo, a densidade dos transportadores vesicular de glutamato (VLUG1 e VLUG3) e a expressão de subunidades (GluA4, NR1, NR2A, NR2B, GluR1 e GluR2) de seus receptores (AMPA, mGlu, NMDA) também são afetados pela ação desse fármaco (AMPUERO *et al.*, 2010; FARLEY *et al.*, 2012; MUSAZZI *et al.*, 2013; O'CONNOR *et al.*, 2013; HEINRICH *et al.*, 2021). Ambos os sistemas de neurotransmissão estão associados à atividade locomotora.

Além disso, a administração de fluoxetina aumentou a expressão de *Il6* no grupo controle e diminuiu no grupo hiperlipídico. Como foi dito anteriormente a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, está associada à resposta do sistema imune ao estresse. Portanto, nossos resultados sugerem que o tratamento crônico com esse ISRS levou à inflamação no grupo controle e ajudou a amenizar o efeito da dieta no grupo hiperlipídico. Similarmente ao observado no CTRF, Kubera e colaboradores (2000) revelaram aumento na produção de IL-6 no grupo fluoxetina (na dose de 10 mg/kg, durante 4 semanas, via i.p.)

quando comparado ao grupo salina (KUBERA *et al.*, 2000). O estudo conduzido por Zavvari, Nahavandi e Goudarzi (2020), por sua vez, não observou diferença na concentração plasmática de IL-6 após a administração crônica de fluoxetina (na dose de 18 mg/kg, durante 24 dias, via oral) (ZAVVARI, NAHAVANDI e GOUDARZI, 2020). Chiu e colaboradores (2021) também não encontraram diferença entre os grupos controle e fluoxetina (na dose de 10 mg/kg, durante quatro semanas, via i.p.) quando a expressão de IL-6 foi avaliada no tecido adiposo epididimal (CHIU *et al.*, 2021). Com relação à diminuição de *Il6* observada no grupo HHF, o estudo liderado por Chiu (2021) revelou que a administração crônica de fluoxetina (na dose de 10 mg/kg, durante quatro semanas, via i.p.) em animais adultos, expostos previamente a dieta hiperlipídica da oitava a vigésima semana pós-natal, diminuiu a expressão de *Il6* no tecido adiposo epididimal (CHIU *et al.*, 2021). A pesquisa conduzida por Gao e colaboradores (2021), por sua vez, avaliou o efeito da fluoxetina sobre a produção de IL-6 em animais adultos expostos à dieta hiperlipídica (HFD) e ao estresse crônico leve imprevisível (CUMS – modelo para a avaliação do comportamento relacionado à depressão) em conjunto. O grupo HFD + CUMS que recebeu fluoxetina (na dose de 20 mg/kg, durante uma semana) apresentou diminuição na expressão de *Il6* no hipocampo (GAO *et al.*, 2021).

Por fim, o estudo conduzido por Alboni e colaboradores (2016) também revelou resultado curioso quando a resposta inflamatória à fluoxetina foi avaliada em diferentes tipos de ambiente (ALBONI *et al.*, 2016). De maneira resumida, camundongos C57BL/6 foram expostos ao estresse (modelo para avaliação do comportamento relacionado à depressão) durante duas semanas (ALBONI *et al.*, 2016). Ao final desse período, os animais foram divididos entre três tipos de ambiente (padrão, estressante e enriquecido) e foram tratados com veículo ou fluoxetina durante três semanas (ALBONI *et al.*, 2016). As soluções foram preparadas de acordo com o peso do camundongo e com o consumo de água a fim de fornecer uma ingestão diária média de 30 mg/kg (ALBONI *et al.*, 2016). Enquanto o grupo exposto ao ambiente padrão revelou diminuição na expressão de *Il6* em células CD11b+ após a oferta de fluoxetina; o grupo submetido ao ambiente estressante apresentou aumento (ALBONI *et al.*, 2016). Além disso, não foi observada diferença para o grupo exposto ao ambiente enriquecido (ALBONI *et al.*, 2016). Esses resultados nos ajudam a sugerir que o tipo de dieta ofertada durante a gestação e a lactação pode influenciar a maneira como a prole responde a administração crônica de fluoxetina. Os mecanismos por trás dessas alterações antagônicas, no entanto, ainda precisam ser investigados.

Em estudo anterior de nosso grupo de pesquisa, o efeito que a administração aguda de fluoxetina, nas doses de 1 e 10 mg/kg de peso, tem sobre o comportamento foi avaliado para

animais expostos a duas dietas hiperlipídicas durante a gestação e a lactação (CAVALCANTI *et al.*, 2021). Houve diminuição no número de quadrantes invadidos – parâmetro análogo a distância percorrida – e no tempo gasto em *rearing* no grupo hiperlipídico/isocalórico (CAVALCANTI *et al.*, 2021). Além disso, a maior dose reduziu o tempo gasto em rearing no grupo hiperlipídico/hipercalórico. Portanto, esses resultados nos mostram que a sensibilidade a administração aguda de fluoxetina também não foi reduzida no grupo hiperlipídico.

Em consonância com a manutenção da sensibilidade à fluoxetina, o grupo HHF apresentou diminuição no tempo e na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LEC quando comparado ao grupo CTRF, o que sugere aumento no comportamento emocional. Em outras palavras, o grupo HH que recebeu fluoxetina respondeu normalmente a administração crônica do fármaco. Artigos que associem dieta hiperlipídica materna ao tratamento farmacológico pós-desmame não são de nosso conhecimento. Apesar disso, em um estudo conduzido por Zemdegs e colaboradores (2016), o efeito que a dieta hiperlipídica tem sobre o comportamento relacionado à ansiedade foi avaliado quando a oferta ocorreu no período pós-desmame (ZEMDEGS *et al.*, 2016). Ademais, um inibidor seletivo de recaptação de serotonina, o escitalopran, foi administrado de maneira crônica na tentativa de amenizar os efeitos da dieta (ZEMDEGS *et al.*, 2016). Os autores observaram que o grupo hiperlipídico-escitalopran apresentou aumento na emocionalidade quando comparado ao grupo controle-escitalopran (ZEMDEGS *et al.*, 2016). Houve diminuição no número de entradas e no tempo de permanência na área central do campo aberto (ZEMDEGS *et al.*, 2016).

Em suma, os resultados acima demonstram que a dieta, quando ofertada nos períodos de gestação e lactação, não diminuiu a responsividade do sistema serotoninérgico da prole adulto-jovem em testes comportamentais relacionados à ansiedade-estado.

7.2 Resveratrol

A exposição materna a dieta hiperlipídica/hipercalórica influenciou o peso corporal e o eixo longitudinal dos filhotes no final da lactação. O grupo HH apresentou aumento no peso corporal e no eixo longitudinal no PND21. Com relação aos testes comportamentais, a exposição materna à dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação influenciou o comportamento emocional apenas quando o labirinto elevado em cruz foi avaliado. O grupo HHE passou mais tempo e maior porcentagem de tempo na área central do que o grupo CTRE. No entanto, essa diferença foi perdida quando o resveratrol foi ofertado para o grupo HH.

O peso corporal e o eixo longitudinal dos filhotes de mães HH e CTR foram avaliados durante as três semanas de lactação e no período pós-desmame. No PND1, não houve diferença entre os grupos avaliados. Cavalcanti e colaboradores (2021) também não observaram diferença entre os grupos hiperlipídicos e o controle um dia após o nascimento. De acordo com Sasaki e colaboradores SASAKI *et al.* (2013), a similaridade existente entre os pesos corporais dos grupos experimentais ao nascimento sugere que o protocolo utilizado não envolve restrição proteica. No final da lactação, filhotes do grupo HH apresentaram maior peso corporal e maior eixo longitudinal do que filhotes do grupo CTR. Estudos similares também encontraram aumento no peso corporal para o grupo HH ao final da terceira semana de lactação (OLIVEIRA *et al.*, 2018; CADENA-BURBANO *et al.*, 2019; CAVALCANTI *et al.*, 2021). Outros trabalhos, no entanto, não revelaram diferença (GIRIKO *et al.*, 2013; BALSEVICH *et al.*, 2016) para o peso corporal ou observaram diminuição para o grupo HH (MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014). Com relação ao comprimento, o aumento encontrado para o PND21, também foi observado por outros trabalhos (OLIVEIRA *et al.*, 2018; CADENA-BURBANO *et al.*, 2019). Os estudos conduzidos por Soares (2009) e por Mendes-da-Silva (2014), por outro lado, observaram diminuição no eixo longitudinal em diferentes pontos da lactação (SOARES *et al.*, 2009; MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014).

O maior tamanho (peso e comprimento) observado pelo presente estudo pode estar relacionado à composição do leite materno. Protocolos que ofertaram dieta rica em gordura durante a gestação e a lactação relataram aumento na quantidade de lipídico total presente no leite materno (DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO, 1997; PURCELL *et al.*, 2011) e aumento no volume de leite produzido por dia (DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO, 1997). Além disso, a exposição dos filhotes à dieta materna também pode ter influenciado o peso corporal. Segundo Doerflinger e colaboradores, os filhotes expostos à

dieta materna rica em gordura e em caloria iniciaram a ingestão de alimentos sólidos um dia antes dos filhotes expostos à dieta controle (DOERFLINGER e SWITHERS, 2004).

Com relação ao peso corporal e ao eixo longitudinal pós-desmame/pré-tratamento, não houve diferença entre os grupos estudados. Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos com dietas também ricas em lipídios (SASAKI *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016). Segundo Sasaki e colaboradores, a semelhança entre os pesos dos grupos hiperlipídico e controle durante o período pós-desmame implica que a diferença observada no período de lactação pode ser atribuída à exposição materna *in utero* (SASAKI *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2014). O peso corporal também não foi diferente entre os grupos durante as semanas de oferta de resveratrol (9^a – 11^a semanas). De maneira semelhante, a equipe liderada por Ge (2016) também não encontrou diferença entre os grupos quando o resveratrol foi administrado na dose de 15 mg/kg de peso, via intragástrica (GE *et al.*, 2016). Franco e colaboradores (2016), por sua vez, também não revelaram diferença entre os grupos quando resveratrol foi ofertado na dose de 30 mg/kg de peso, via gavagem. É interessante ressaltar que esse trabalho avaliou o efeito da nutrição materna – a dieta foi ofertada antes do acasalamento e nos períodos de gestação e lactação (FRANCO *et al.*, 2016). No estudo de Yu e colaboradores (2019a), por outro lado, a oferta de resveratrol (5 mg/kg de peso) durante dois meses diminuiu o peso corporal do grupo exposto à dieta hiperlipídica antes do acasalamento e durante os períodos de gestação, lactação e pós-desmame quando comparado ao seu controle. Essa dissonância em relação ao nosso trabalho pode estar associada ao menor tempo de exposição ao resveratrol, que foi apenas de duas semanas. Similarmente, o estudo conduzido por Liu (2019) também observou menor peso para o grupo que recebeu resveratrol na dose de 20 mg/kg de peso durante 14 dias, via *i.p.* (LIU *et al.*, 2019). Nesse caso, a diferença pode estar relacionada a via de administração e a dose utilizada pelo presente estudo (entre 6,5 e 7,2 mg/kg de peso).

Quanto aos testes comportamentais, foram avaliados o campo aberto, o *staircase* e o labirinto elevado em cruz – catorze dias depois do início do tratamento com resveratrol. Esses três testes avaliam o comportamento relacionado à ansiedade-estado (GRIEBEL *et al.*, 1993; CLEMENT *et al.*, 2007; ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015) caracterizado como: estado emocional passageiro, de intensidade variável, experimentado em um momento particular do tempo (ANDRADE e GORENSTEIN, 1998; GAMA *et al.*, 2008). Apenas o labirinto elevado em cruz indicou efeito da exposição materna à dieta hiperlipídica sobre o comportamento emocional da prole.

No labirinto elevado em cruz, o tempo e a porcentagem de tempo na área central foram maiores para o grupo HHE quando comparado ao grupo CTRE, o que sugere aumento no comportamento relacionado à ansiedade. Com relação a atividade locomotora, nós não observamos diferença entre os grupos experimentais. O estudo liderado por Clement (2007) propõe que o comportamento emocional pode ser dividido em quatro componentes: o comportamento relacionado à ansiedade induzido pela novidade, a atividade geral, o comportamento exploratório e a tomada de decisão (CLEMENT *et al.*, 2007). Portanto, o aumento no tempo e na porcentagem de tempo gasto na área central – região utilizada, segundo os autores, para tomar decisões e associada à aversão a novidade – indica que a exposição materna à dieta hiperlipídica influenciou um dos componentes que caracteriza o comportamento emocional (CLEMENT *et al.*, 2007). Além disso, a análise de componentes principais do labirinto em cruz, conduzida por Carola e colaboradores (2002), revelou que o tempo gasto na área central está associado à exploração não “ansiosa” quando diminui – resultado oposto ao encontrado pelo presente estudo.

Com relação ao efeito da dieta, resultados semelhantes aos nossos – em que houve aumento no comportamento emocional no LEC – foram encontrados por outros estudos (JOHNSON, VAN JAARSVELD e WARDLE, 2011; SASAKI *et al.*, 2013; GLENDINING, FISHER e JASONI, 2018; BAYANDOR *et al.*, 2019; SOUTO *et al.*, 2020). Além disso, em alguns trabalhos esse aumento foi observado em outros testes comportamentais, como, por exemplo, a caixa de transição claro-escuro, o campo aberto e o teste de neofobia alimentar (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; SASAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014; PAGE, JONES e ANDAY, 2014; CAVALCANTI *et al.*, 2021). Uma série de estudos, por outro lado, não revelou diferença entre os grupos controle e hiperlipídico (GIRIKO *et al.*, 2013; JANTHAKHIN *et al.*, 2017; BERRY *et al.*, 2018; CADENA-BURBANO *et al.*, 2019; ZIEBA *et al.*, 2019; LIPPERT *et al.*, 2020). Por fim, alguns trabalhos demonstraram que o resultado comportamental depende do sexo e da idade do animal avaliado (SASAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016; LIPPERT *et al.*, 2020; GAWLIŃSKA *et al.*, 2021). Tais resultados sugerem que as características do protocolo experimental adotado, como tempo de exposição à dieta e idade do animal submetido ao teste podem influenciar os resultados encontrados.

Ao considerarmos a atividade locomotora, inúmeros estudos também não encontraram efeito da exposição materna a dieta hiperlipídica (NAEF *et al.*, 2008; NAEF *et al.*, 2011; PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; GIRIKO *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2015; PELEG-RAIBSTEIN *et al.*, 2016; GRISSOM, GEORGE e REYES,

2017; JANTHAKHIN *et al.*, 2017; SASAKI, MCGOWAN e ERB, 2018; SARKER *et al.*, 2019; ZIEBA *et al.*, 2019; GAWLIŃSKA *et al.*, 2020; GAWLINSKI *et al.*, 2020; SOUTO *et al.*, 2020). No entanto, o aumento e a diminuição também já foram reportados (RAYGADA, CHO e HILAKIVI-CLARKE, 1998; TOZUKA *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2014; PAGE, JONES e ANDAY, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2017; LIPPERT *et al.*, 2020; CAVALCANTI *et al.*, 2021; ROCHA-GOMES *et al.*, 2021). Como as metodologias utilizadas foram muito diferentes, não foi possível agrupar os resultados de acordo com alguma característica específica dos trabalhos.

A influência que a exposição materna a dieta hiperlipídica tem sobre o comportamento emocional pode estar relacionado a um conjunto de diferentes fatores (SASAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014; PRIOR *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016). Como exemplo, podemos citar: exacerbação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA); aumento na expressão de receptores mineralocorticoides e glicocorticoides em diferentes regiões do cérebro; expressão aumentada de fatores pró-inflamatórios; exposição elevada a leptina; níveis reduzidos dos principais endocanabinóides e alteração na expressão dos receptores GABAérgico e serotoninérgicos no cérebro (SASAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014; PRIOR *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016).

Quando observamos o efeito da oferta do polifenol, os grupos que consumiram resveratrol (CTRR e HHR) não foram diferentes de seus respectivos controles (CTRE e HHE). De maneira semelhante para o grupo controle, o estudo conduzido por Hu e colaboradores (2016) não encontrou diferença para o comportamento relacionado à ansiedade entre os grupos salina-veículo e salina-resveratrol (90 mg/kg de peso, durante 22 dias, via s.c.) em um modelo de abstinência (HU *et al.*, 2016). Ademais, Liu e colaboradores (2019) também não observaram diferença para o comportamento emocional entre os grupos controle-veículo e controle-resveratrol (20 mg/kg de peso, durante 14 dias, via i.p.) em ratas não ovariectomizadas (LIU *et al.*, 2019). Os demais estudos não administraram resveratrol no grupo controle.

Com relação à resposta do grupo exposto a determinado insulto ambiental sobre o comportamento, o resultado dependeu da dose de resveratrol administrada de maneira crônica (LI *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2019a; ZHU *et al.*, 2019). Por exemplo, o modelo de sensibilização dependente do tempo (TDS), que mimetiza o transtorno de estresse pós-traumático, revelou diferença entre os grupos veículo-TDS e resveratrol-TDS nas doses de 20 e 40 mg/kg de peso (LI *et al.*, 2018). Resveratrol na dose de 10 mg/kg de peso, por outro lado, não apresentou efeito sobre o comportamento (LI *et al.*, 2018). Hu e colaboradores (2016), por sua vez,

também observaram diminuição na emocionalidade quando o grupo Cocaína-resveratrol (na dose de 90 mg/kg de peso) foi comparado ao Cocaína-veículo (HU *et al.*, 2016). Outros estudos também encontraram diminuição no comportamento relacionado à ansiedade quando o grupo previamente exposto ao insulto escolhido foi associado ao resveratrol nas doses de 5 mg/kg (ZHU *et al.*, 2019); 10 mg/kg (REDDY *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2019), 15 mg/kg (GE *et al.*, 2016), 20 mg/kg (LIU *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2019a) e 40 mg/kg de peso (YU *et al.*, 2019b; LV *et al.*, 2021). Por fim, os estudos de Yu (2019a) e Zhu (2019) não encontraram efeito do resveratrol sobre o comportamento emocional nas doses de 10 mg/kg e 2,5 mg/kg de peso, respectivamente (YU *et al.*, 2019b; ZHU *et al.*, 2019).

O único estudo que associou nutrição materna e tratamento com polifenol pós-desmame não avaliou o comportamento emocional na prole (FRANCO *et al.*, 2016). Na verdade, o objetivo foi avaliar o efeito resveratrol no período pós-desmame sobre o peso corporal, a ingestão alimentar e a leptinemia com alterações na sinalização central da leptina, em ratos expostos a dieta hiperlipídica materna (FRANCO *et al.*, 2016). O tratamento com resveratrol diminuiu adiposidade, evitou o aumento da leptinemia e melhorou a sinalização de leptina (FRANCO *et al.*, 2016).

Como não houve diferença entre os animais HHE e HHR, demonstramos que a oferta crônica de resveratrol suprimiu o aumento observado para o comportamento relacionado à ansiedade no grupo HHE. Isso porque o tempo e a porcentagem de tempo de permanência na área central do labirinto elevado em cruz não foram diferentes entre os grupos HHR e CTRR. Esse efeito pode estar relacionado ao eixo HPA – o que inclui a diminuição no nível sérico de corticosterona –, associado à diminuição na expressão de fatores de transcrição e pró-inflamatórios e à alterações nos sistemas dopaminérgico, endocanabinóide, GABAérgico e serotoninérgico (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). Além disso, esse resultado reafirma que não houve perda de sensibilidade do grupo exposto à dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação.

Em suma, a exposição materna à dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação levou ao aumento no comportamento relacionado à ansiedade, enquanto a oferta crônica de resveratrol ajudou a resgatar esse comportamento no grupo HHR.

8 Considerações finais

8.1 Fluoxetina

A exposição à dieta hiperlipídica/hipercalórica não influenciou o comportamento animal quando comparada a dieta controle. Apesar disso, a nutrição materna levou ao aumento na expressão de *Il6* no tronco cerebral, o que indica inflamação no grupo hiperlipídico. Por isso, seria interessante avaliar se essa expressão elevada de *Il6* influencia o desempenho animal em outros aparatos, como, por exemplo, o teste de enterrar bolinhas e o paradigma da exploração livre, ou em outros tipos de comportamento, como o associado à depressão. Com relação ao fármaco, ratos adulto-jovens do grupo controle responderam a administração crônica de fluoxetina (10 mg/kg) apenas quando o campo aberto foi avaliado. O grupo CTRF apresentou hiperatividade e aumento no comportamento relacionado à ansiedade quando comparado ao grupo CTRS. Por sua vez, em ratos adulto-jovens do grupo hiperlipídico/hipercalórico, a administração de fluoxetina levou a hiperatividade e ao comportamento relacionado à ansiedade nos três aparatos avaliados. Esses resultados indicam que a sensibilidade do sistema serotoninérgico do grupo hiperlipídico foi mantida para testes comportamentais relacionados à ansiedade-estado. Além disso, o aumento na locomoção e no comportamento emocional pode estar associado à expressão elevada dos receptores *5ht1a* e *5ht2a* no grupo controle. Com relação ao grupo hiperlipídico, outras vias podem estar associadas. Juntos, esses resultados refutam a nossa hipótese parcialmente, visto que a exposição materna à dieta hiperlipídica não influenciou o comportamento da prole, e a administração crônica de fluoxetina aumentou a atividade locomotora e o comportamento relacionado à ansiedade.

8.2 Resveratrol

A oferta de dieta hiperlipídica/hipercalórica durante os períodos de gestação e de lactação levou ao aumento no comportamento relacionado à ansiedade no labirinto elevado em cruz. Com relação à oferta de polifenol, o comportamento dos grupos controle e hiperlipídico que receberam resveratrol (entre 5,7 e 6,2 mg/kg de peso) foi diferente dos grupos que receberam etanol. Apesar disso, o resveratrol ajudou a recuperar o comportamento emocional do grupo hiperlipídico/hipercalórico quando comparado ao grupo controle. Juntos, esses resultados corroboram a nossa hipótese, visto que a nutrição materna aumentou o comportamento relacionado à ansiedade da prole, enquanto a oferta de resveratrol ajudou a recuperá-lo.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. I. et al. Amisulpride is a potent 5-HT₇ antagonist: relevance for antidepressant actions in vivo. **Psychopharmacology**, v. 205, n. 1, p. 119-128, 2009.

AGUILERA, O. et al. Epigenetics and environment: a complex relationship. **J Appl Physiol** (1985), v. 109, n. 1, p. 243-251, Jul 2010.

AHMED, R. F. et al. Combined hepatoprotective and antidepressant effects of resveratrol in an acute model of depression. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 52, n. 2, p. 191-197, 2014.

ALBONI, S. et al. Fluoxetine treatment affects the inflammatory response and microglial function according to the quality of the living environment. **Brain Behav Immun**, v. 58, p. 261-271, Nov 2016.

ALMEIDA-SOUZA, T. H.; GOES, T. C.; TEIXEIRA-SILVA, F. Pharmacological validation of the free-exploratory paradigm in male Wistar rats: A proposed test of trait anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 135, p. 114-120, Aug 2015.

AMODEO, L. R. et al. Effects of acute or repeated paroxetine and fluoxetine treatment on affective behavior in male and female adolescent rats. v. 232, n. 19, p. 3515-3528, 2015.

AMPUERO, E. et al. Chronic fluoxetine treatment induces structural plasticity and selective changes in glutamate receptor subunits in the rat cerebral cortex. **Neuroscience**, v. 169, n. 1, p. 98-108, Aug 11 2010.

ANDERSEN, S. L. J. N.; REVIEWS, B. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? , v. 27, n. 1-2, p. 3-18, 2003.

ANDRADE, L. H. S. G. D.; GORENSTEIN, C. J. R. P. C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. p. 285-290, 1998.

ANTONELLI, M.; KUSHNER, I. It's time to redefine inflammation. **FASEB J**, v. 31, n. 5, p. 1787-1791, May 2017.

ARMITAGE, J. A. et al. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? , v. 561, n. 2, p. 355-377, 2004.

ARMITAGE, J. A.; TAYLOR, P. D.; POSTON, L. J. T. J. O. P. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. v. 565, n. 1, p. 3-8, 2005.

ASSOCIATION, A. P. **DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Artmed Editora, 2014. ISBN 8582711832.

BACH-MIZRACHI, H. et al. Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides. **Molecular psychiatry**, v. 13, n. 5, p. 507-513, 2008.

BAEK, I. S.; PARK, J. Y.; HAN, P. L. Chronic Antidepressant Treatment in Normal Mice Induces Anxiety and Impairs Stress-coping Ability. **Exp Neurobiol**, v. 24, n. 2, p. 156-168, Jun 2015.

BALSEVICH, G. et al. Prenatal Exposure to Maternal Obesity Alters Anxiety and Stress Coping Behaviors in Aged Mice. **Neuroendocrinology**, v. 103, n. 3-4, p. 354-368, 2016.

BALU, D. T. et al. Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. v. 1211, p. 37-43, 2008.

BARKER, D. J. J. O. I. M. The origins of the developmental origins theory. v. 261, n. 5, p. 412-417, 2007.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. J. N. R. D. D. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. v. 5, n. 6, p. 493-506, 2006.

BAYANDOR, P. et al. The effect of troxerutin on anxiety- and depressive-like behaviours in the offspring of high-fat diet fed dams. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 125, n. 2, p. 156-162, Mar 2019.

BELLISARIO, V. et al. Maternal high-fat diet acts as a stressor increasing maternal glucocorticoids' signaling to the fetus and disrupting maternal behavior and brain activation in C57BL/6J mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 60, p. 138-150, Oct 2015.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behav Brain Res**, v. 125, n. 1-2, p. 141-149, Nov 1 2001.

BELZUNG, C. et al. An investigation of the mechanisms responsible for acute fluoxetine-induced anxiogenic-like effects in mice. **Behav Pharmacol**, v. 12, n. 3, p. 151-162, Jun 2001.

BELZUNG, C.; LE PAPE, G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. **Physiology Behavior**, v. 56, n. 3, p. 623-628, 1994.

BENTO-SANTO, A. et al. Critérios para escolha da amostra em experimentos com ratos Wistar. **R. Soc. bras. Ci. Anim. Lab.**, p. 121-129, 2012.

BERNIK, M.; CORREGIARI, F. Como diagnosticar & tratar ansiedade. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 59, n. 9, p. 621-634, 2002.

BERRY, A. et al. Administration of the Antioxidant N-Acetyl-Cysteine in Pregnant Mice Has Long-Term Positive Effects on Metabolic and Behavioral Endpoints of Male and Female Offspring Prenatally Exposed to a High-Fat Diet. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, Mar 2018.

BHATNAGAR, S. et al. Changes in anxiety-related behaviors and hypothalamic–pituitary–adrenal activity in mice lacking the 5-HT-3A receptor. **Physiology behavior**, v. 81, n. 4, p. 545-555, 2004.

BIANCO-MIOTTO, T. et al. Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond. **J Dev Orig Health Dis**, v. 8, n. 5, p. 513-519, Oct 2017.

BILKEI-GORZO, A.; GYERTYAN, I. Some doubts about the basic concept of hole-board test. **Neurobiology of Disease**, v. 4, n. 4, p. 405-415, 1996.

BOISSIER, J.; SIMON, P.; LWOFF, J. L'utilisation d'une réaction particulière de la souris (méthode de la planche à trous) pour l'étude des médicaments psychotropes. **Thérapie**, v. 19, p. 571-589, 1964.

BORELLI, K. G. et al. Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 77, n. 3, p. 557-566, Mar 2004.

BORTOLATO, M.; CHEN, K.; SHIH, J. C. The degradation of serotonin: role of MAO. **Handbook of Behavioral Neuroscience**, v. 21, p. 203-218, 2010.

BUREAU, G.; LONGPRE, F.; MARTINOLI, M. G. Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. **J Neurosci Res**, v. 86, n. 2, p. 403-410, Feb 1 2008.

BURGGREN, W. W.; MUELLER, C. A. Developmental critical windows and sensitive periods as three-dimensional constructs in time and space. **Physiological Biochemical Zoology**, v. 88, n. 2, p. 91-102, 2015.

CADENA-BURBANO, E. V. et al. A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. **Nutr Neurosci**, v. 22, n. 2, p. 98-109, Feb 2019.

CAROLA, V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behav Brain Res**, v. 134, n. 1-2, p. 49-57, Aug 21 2002.

CARR, G. V.; SCHECHTER, L. E.; LUCKI, I. Antidepressant and anxiolytic effects of selective 5-HT₆ receptor agonists in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 213, n. 2-3, p. 499-507, Feb 2011.

CAVALCANTI, C. C. L. et al. High-caloric or isocaloric maternal high-fat diets differently affect young-adult offspring behavior in anxiety-related tests and offspring sensitivity to acute fluoxetine. **Behav Brain Res**, v. 403, p. 113141, Apr 9 2021.

CHAHOU, I.; PAUMGARTTEN, F. J. Influence of litter size on the postnatal growth of rat pups: is there a rationale for litter-size standardization in toxicity studies? **Environmental research**, v. 109, n. 8, p. 1021-1027, 2009.

CHANG, G. R. et al. Resveratrol protects against diet-induced atherosclerosis by reducing low-density lipoprotein cholesterol and inhibiting inflammation in apolipoprotein E-deficient mice. **Iran J Basic Med Sci**, v. 18, n. 11, p. 1063-1071, Nov 2015.

CHEGINI, H.-R.; NASEHI, M.; ZARRINDAST, M.-R. Differential role of the basolateral amygdala 5-HT₃ and 5-HT₄ serotonin receptors upon ACPA-induced anxiolytic-like behaviors and emotional memory deficit in mice. **Behavioural brain research**, v. 261, p. 114-126, 2014.

CHEN, K.; RAJEWSKY, N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 2, p. 93-103, Feb 2007.

CHIU, Y. J. et al. Fluoxetine ameliorates high-fat diet-induced metabolic abnormalities partially via reduced adipose triglyceride lipase-mediated adipocyte lipolysis. **Biomed Pharmacother**, v. 141, p. 111848, Sep 2021.

CHORPITA, B. F.; BARLOW, D. H. The development of anxiety: the role of control in the early environment. **Psychol Bull**, v. 124, n. 1, p. 3-21, Jul 1998.

CLARK, M. S. et al. Overexpression of 5-HT_{1B} receptor in dorsal raphe nucleus using Herpes Simplex Virus gene transfer increases anxiety behavior after inescapable stress. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 4550-4562, 2002.

CLEMENT, Y. et al. Anxiety in mice: a principal component analysis study. **Neural Plast**, v. 2007, p. 35457, 2007.

CORDNER, Z. A. et al. Maternal high-fat diet results in cognitive impairment and hippocampal gene expression changes in rat offspring. **Experimental Neurology**, v. 318, p. 92-100, Aug 2019.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 13, n. 2, p. 167-170, Aug 1980.

CRUZ, A. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 1, p. 171-176, Sep 1994.

DA SILVA ARAGÃO, R. et al. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents—A reproducibility study. **J. Neurosci. Methods**, v. 195, n. 2, p. 216-221, 2011.

DAVIS, M. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. **Am Psychol**, v. 61, n. 8, p. 741-756, Nov 2006.

DE OLIVEIRA, E. P. et al. Dietary factors associated with metabolic syndrome in Brazilian adults. **Nutr J**, v. 11, p. 13, Mar 14 2012.

DEL PRADO, M.; DELGADO, G.; VILLALPANDO, S. Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. **J Nutr**, v. 127, n. 3, p. 458-462, Mar 1997.

DELAGE, B.; DASHWOOD, R. H. Dietary manipulation of histone structure and function. **Annu Rev Nutr**, v. 28, p. 347-366, 2008.

DESAI, M.; JELLYMAN, J. K.; ROSS, M. G. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. **Int J Obes (Lond)**, v. 39, n. 4, p. 633-641, Apr 2015.

DIAS, C. T. et al. Maternal high-fat diet stimulates proinflammatory pathway and increases the expression of Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH2) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in adolescent mice hippocampus. **Neurochem Int**, v. 139, p. 104781, Oct 2020.

DIMITSANTOS, E. et al. Litter size affects emotionality in adult male rats. **Physiol Behav**, v. 92, n. 4, p. 708-716, Nov 23 2007.

DING, X. C.; WEILER, J.; GROSSHANS, H. Regulating the regulators: mechanisms controlling the maturation of microRNAs. **Trends Biotechnol**, v. 27, n. 1, p. 27-36, Jan 2009.

DOBBING, J. The effect of undernutrition on myelination in the central nervous system. In: (Ed.). **Development of Metabolism as Related to Nutrition**: Karger Publishers, 1966. p.132-147.

DOERFLINGER, A.; SWITHERS, S. E. Effects of diet and handling on initiation of independent ingestion in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 45, n. 2, p. 72-82, Sep 2004.

DONEV, R. **Inflammation in Neuropsychiatric Disorders**. Academic Press, 2012. ISBN 0123983142.

DRAPIER, D. et al. Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 176, n. 2, p. 202-209, Jan 25 2007.

DULAWA, S. C. et al. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 7, p. 1321-1330, Jul 2004.

DURAND, M. et al. Effects of repeated fluoxetine on anxiety-related behaviours, central serotonergic systems, and the corticotropic axis axis in SHR and WKY rats. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 6, p. 893-907, Jun 1999.

DYGALO, N. N. et al. Effect of repeated treatment with fluoxetine on tryptophan hydroxylase-2 gene expression in the rat brainstem. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 85, n. 1, p. 220-227, Sep 2006.

EDELMANN, R. J. **Anxiety: Theory, research and intervention in clinical and health psychology**. John Wiley & Sons, 1992. ISBN 0471923893.

ENDLER, N. S.; KOCOVSKI, N. L. State and trait anxiety revisited. **J Anxiety Disord**, v. 15, n. 3, p. 231-245, May-Jun 2001.

ESPEJO, E. F. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural brain research**, v. 86, n. 1, p. 105-112, 1997.

FARLEY, S. et al. Increased expression of the Vesicular Glutamate Transporter-1 (VGLUT1) in the prefrontal cortex correlates with differential vulnerability to chronic stress in various mouse strains: effects of fluoxetine and MK-801. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 503-517, 2012.

FINGER, B.; DINAN, T.; CRYAN, J. J. N. High-fat diet selectively protects against the effects of chronic social stress in the mouse. v. 192, p. 351-360, 2011.

FLAIVE, A. et al. Serotonergic Modulation of Locomotor Activity From Basal Vertebrates to Mammals. **Front Neural Circuits**, v. 14, p. 590299, 2020.

FORDYCE, J. A. The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 12, p. 2377-2383, 2006.

FRANCO, J. G. et al. Resveratrol treatment rescues hyperleptinemia and improves hypothalamic leptin signaling programmed by maternal high-fat diet in rats. **Eur J Nutr**, v. 55, n. 2, p. 601-610, Mar 2016.

FRÍAS-LASSERRE, D.; VILLAGRA, C. A. The importance of ncRNAs as epigenetic mechanisms in phenotypic variation and organic evolution. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2483, 2017.

GAMA, M. M. A. et al. Ansiedade-traço em estudantes universitários de Aracaju (SE). v. 30, n. 1, p. 19-24, 2008.

GAO, L. N. et al. Puerarin Alleviates Depression-Like Behavior Induced by High-Fat Diet Combined With Chronic Unpredictable Mild Stress via Repairing TLR4-Induced Inflammatory Damages and Phospholipid Metabolism Disorders. **Front Pharmacol**, v. 12, p. 767333, 2021.

GARCIA-GARCIA, A. L. et al. Serotonin inputs to the dorsal BNST modulate anxiety in a 5-HT1A receptor-dependent manner. **Mol Psychiatry**, v. 23, n. 10, p. 1990-1997, Oct 2018.

GAWLIŃSKA, K. et al. Relationship of maternal high-fat diet during pregnancy and lactation to offspring health. **Nutr Rev**, May 23 2020.

GAWLIŃSKA, K. et al. Maternal dietary patterns are associated with susceptibility to a depressive-like phenotype in rat offspring. **Developmental cognitive neuroscience**, v. 47, p. 100879, 2021.

GAWLINSKI, D. et al. Maternal Diet Influences the Reinstatement of Cocaine-Seeking Behavior and the Expression of Melanocortin-4 Receptors in Female Offspring of Rats. **Nutrients**, v. 12, n. 5, May 2020.

GE, J.-F. et al. Resveratrol ameliorates the anxiety-and depression-like behavior of subclinical hypothyroidism rat: possible involvement of the HPT axis, HPA axis, and Wnt/ β -catenin pathway. **Frontiers in endocrinology**, v. 7, p. 44, 2016.

GENARO, G.; SCHMIDEK, W. R. Exploratory activity of rats in three different environments. **Ethology: Research Papers**, v. 106, n. 9, p. 849-859, 2000.

GENG, F. et al. Dorsomedial prefrontal cortex 5-HT6 receptors regulate anxiety-like behavior. **Cogn Affect Behav Neurosci**, v. 18, n. 1, p. 58-67, Feb 2018.

GENTIL, V. **Pânico, fobias e obsessões: a experiência do projeto AMBAN**. Edusp, 1996. ISBN 8531402263.

GERSHON, M. D.; TACK, J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 397-414, Jan 2007.

GIOVINAZZO, G. et al. Resveratrol biosynthesis: plant metabolic engineering for nutritional improvement of food. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 67, n. 3, p. 191-199, Sep 2012.

GIRIKO, C. et al. Delayed physical and neurobehavioral development and increased aggressive and depression-like behaviors in the rat offspring of dams fed a high-fat diet. **Int J Dev Neurosci**, v. 31, n. 8, p. 731-739, Dec 2013.

GLENDINING, K. A.; FISHER, L. C.; JASONI, C. L. Maternal high fat diet alters offspring epigenetic regulators, amygdala glutamatergic profile and anxiety. **Psychoneuroendocrinology**, v. 96, p. 132-141, Oct 2018.

GOES, T. C.; ANTUNES, F. D.; TEIXEIRA-SILVA, F. Environmental enrichment for adult rats: effects on trait and state anxiety. **Neurosci Lett**, v. 584, p. 93-96, Jan 1 2015.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica–McGraw–9ª edição, Rio de Janeiro-RJ, Hill Interamericana Editores, S: A 1996.**

GRAEFF, F. G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 29, p. s3-s6, 2007.

GRAY, J.; MCNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System**. 2nd Edn. . Oxford: Oxford University Press., 2000.

GRAY, V. C.; HUGHES, R. N. Drug-, dose- and sex-dependent effects of chronic fluoxetine, reboxetine and venlafaxine on open-field behavior and spatial memory in rats. **Behav Brain Res**, v. 281, p. 43-54, Mar 15 2015.

GRIEBEL, G. et al. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. **Behav Pharmacol**, v. 4, n. 6, p. 637-644, Dec 1993.

GRIEBEL, G. et al. Behavioral effects of acute and chronic fluoxetine in Wistar–Kyoto rats. **Physiol. Behav.**, v. 67, n. 3, p. 315-320, 1999.

GRISSOM, N. M.; GEORGE, R.; REYES, T. M. Suboptimal nutrition in early life affects the inflammatory gene expression profile and behavioral responses to stressors. **Brain Behavior and Immunity**, v. 63, p. 115-126, Jul 2017.

GU, Z.; CHU, L.; HAN, Y. Therapeutic effect of resveratrol on mice with depression. **Exp Ther Med**, v. 17, n. 4, p. 3061-3064, Apr 2019.

GUASCH-FERRÉ, M. et al. Dietary polyphenols, Mediterranean diet, prediabetes, and type 2 diabetes: a narrative review of the evidence. **Oxidative medicine cellular longevity**, v. 2017, 2017.

GUSCOTT, M. et al. Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT₇ receptor suggest therapeutic potential in depression. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 4, p. 492-502, Mar 2005.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative psychology**, v. 18, n. 3, p. 385, 1934.

HALLS, C.; YU, O. Potential for metabolic engineering of resveratrol biosynthesis. **Trends Biotechnol**, v. 26, n. 2, p. 77-81, Feb 2008.

HASEGAWA, H.; NAKAMURA, K. Tryptophan hydroxylase and serotonin synthesis regulation. In: (Ed.). **Handbook of behavioral neuroscience**: Elsevier, v.21, 2010. p.183-202. ISBN 1569-7339.

HASSANZADEH, P. et al. The endocannabinoid system and NGF are involved in the mechanism of action of resveratrol: a multi-target nutraceutical with therapeutic potential in neuropsychiatric disorders. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 233, n. 6, p. 1087-1096, Mar 2016.

HEDLUND, P. B. et al. 5-HT₇ receptor inhibition and inactivation induce antidepressantlike behavior and sleep pattern. **Biol Psychiatry**, v. 58, n. 10, p. 831-837, Nov 15 2005.

HEINRICH, I. A. et al. Neuronal activity regulated pentraxin (narp) and GluA4 subunit of AMPA receptor may be targets for fluoxetine modulation. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 4, p. 711-722, 2021.

HEISLER, L. et al. Serotonin 5-HT_{2C} receptors regulate anxiety-like behavior. **Genes, Brain Behavior**, v. 6, n. 5, p. 491-496, 2007.

HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. Editora Atheneu, 2004.

HOEHN-SARIC, R. Neurotransmitters in anxiety. **Arch Gen Psychiatry**, v. 39, n. 6, p. 735-742, Jun 1982.

HOLMES, A. et al. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1335-1346, 2005.

HORNUNG, J.-P. The neuronatomy of the serotonergic system. In: (Ed.). **Handbook of Behavioral Neuroscience**: Elsevier, v.21, 2010. p.51-64. ISBN 1569-7339.

HRDINA, P. D.; VU, T. B. Chronic fluoxetine treatment upregulates 5-HT uptake sites and 5-HT₂ receptors in rat brain: an autoradiographic study. **Synapse**, v. 14, n. 4, p. 324-331, Aug 1993.

HU, P. et al. Resveratrol fails to affect cocaine conditioned place preference behavior, but alleviates anxiety-like behaviors in cocaine withdrawn rats. v. 233, n. 7, p. 1279-1287, 2016.

HUGHES, R. N. Food deprivation and locomotor exploration in the white rat. **Anim Behav**, v. 13, p. 30-32, 1965a.

HUGHES, R. N. Food deprivation and locomotor exploration in the white rat. **Animal behaviour**, v. 13, n. 1, p. 30-32, 1965b.

HUGHES, R. N. Behaviour of male and female rats with free choice of two environments differing in novelty. **Anim Behav**, v. 16, n. 1, p. 92-96, Feb 1968.

ISINGRINI, E. et al. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10404, 2010.

JAGGAR, M. et al. 5-HT_{2A} receptor deficiency alters the metabolic and transcriptional, but not the behavioral, consequences of chronic unpredictable stress. **Neurobiology of stress**, v. 7, p. 89-102, 2017.

JANG, H. S. et al. CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. **Genes (Basel)**, v. 8, n. 6, p. 148, May 23 2017.

JANTHAKHIN, Y. et al. Maternal high-fat diet leads to hippocampal and amygdala dendritic remodeling in adult male offspring. **Psychoneuroendocrinology**, v. 83, p. 49-57, Sep 2017.

JAVKHEDKAR, A. A. et al. Resveratrol restored Nrf2 function, reduced renal inflammation, and mitigated hypertension in spontaneously hypertensive rats. v. 308, n. 10, p. R840-R846, 2015.

JEANDET, P. et al. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. v. 36, n. 5, p. 331-341, 2010.

JOËLS, M. et al. The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. **Trends in neurosciences**, v. 31, n. 1, p. 1-7, 2008.

JOHNSON, L.; VAN JAARSVELD, C. H. M.; WARDLE, J. Individual and family environment correlates differ for consumption of core and non-core foods in children. **British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 6, p. 950-959, Mar 2011.

JOHNSON, S. A. et al. Effects of a maternal high-fat diet on offspring behavioral and metabolic parameters in a rodent model. **J Dev Orig Health Dis**, v. 8, n. 1, p. 75-88, Feb 2017.

KALIN, N. H. et al. Brain regions associated with the expression and contextual regulation of anxiety in primates. **Biol Psychiatry**, v. 58, n. 10, p. 796-804, Nov 15 2005.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. **J. Neurosci. Methods**, v. 143, n. 2, p. 169-177, 2005.

KANG, S. S. et al. Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring. **J Neuroinflammation**, v. 11, p. 156, Sep 12 2014.

KARAYOL, R. et al. Serotonin receptor 4 in the hippocampus modulates mood and anxiety. **Mol Psychiatry**, v. 26, n. 6, p. 2334-2349, Jun 2021.

KELLEY, S. P.; BRATT, A. M.; HODGE, C. W. Targeted gene deletion of the 5-HT3A receptor subunit produces an anxiolytic phenotype in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 461, n. 1, p. 19-25, Feb 7 2003.

KEOGH, B. K. Hyperactivity and learning disorders: review and speculation. **Except Child**, v. 38, n. 2, p. 101-109, Oct 1971.

KJAERBY, C. et al. Serotonin 1B Receptors Regulate Prefrontal Function by Gating Callosal and Hippocampal Inputs. **Cell Rep**, v. 17, n. 11, p. 2882-2890, Dec 13 2016.

KOBAYASHI, K. et al. Chronic fluoxetine selectively upregulates dopamine D1-like receptors in the hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 6, p. 1500-1508, 2012.

KUBERA, M. et al. Effects of repeated fluoxetine and citalopram administration on cytokine release in C57BL/6 mice. **Psychiatry Res**, v. 96, n. 3, p. 255-266, Nov 20 2000.

LADER, M. The nature of anxiety. **Br J Psychiatry**, v. 121, n. 564, p. 481-491, Nov 1972.

LAUBACH, Z. M. et al. Epigenetics and the maintenance of developmental plasticity: extending the signalling theory framework. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v. 93, n. 3, p. 1323-1338, Aug 2018.

LEE, B. H. et al. Resveratrol enhances 5-hydroxytryptamine type 3A receptor-mediated ion currents: the role of arginine 222 residue in pre-transmembrane domain I. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 4, p. 523-527, 2011.

LEPICARD, E. M. et al. Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, n. 4, p. 739-748, Dec 2000.

LEVER, C.; BURTON, S.; O'KEEFE, J. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. **Rev Neurosci**, v. 17, n. 1-2, p. 111-133, 2006.

LEWIS, A. Problems presented by the ambiguous word "anxiety" as used in psychopathology. **Israel Annals of Psychiatry related disciplines**, 1967.

LI, G. et al. trans-Resveratrol ameliorates anxiety-like behaviors and fear memory deficits in a rat model of post-traumatic stress disorder. v. 133, p. 181-188, 2018.

LI, Q. et al. Anxiolytic effects of 5-HT_{1A} receptors and anxiogenic effects of 5-HT_{2C} receptors in the amygdala of mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 474-484, 2012.

LIN, C. et al. Maternal high fat diet programs stress-induced behavioral disorder in adult offspring. **Physiol Behav**, v. 152, n. Pt A, p. 119-127, Dec 1 2015.

LIPPERT, R. N. et al. Maternal high-fat diet during lactation reprograms the dopaminergic circuitry in mice. **J Clin Invest**, v. 130, n. 7, p. 3761-3776, Jul 1 2020.

LIU, D. et al. Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. **Behav Brain Res**, v. 264, p. 9-16, May 1 2014.

LIU, J. et al. Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: a comparison with fluoxetine. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 207, n. 4, p. 535-545, Jan 2010.

LIU, J.; JORDAN, L. M. Stimulation of the parapyramidal region of the neonatal rat brain stem produces locomotor-like activity involving spinal 5-HT₇ and 5-HT_{2A} receptors. **J Neurophysiol**, v. 94, n. 2, p. 1392-1404, Aug 2005.

LIU, L. et al. Resveratrol counteracts lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors via enhanced hippocampal neurogenesis. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 56045-56059, Aug 30 2016.

LIU, T. et al. Resveratrol ameliorates estrogen deficiency-induced depression-and anxiety-like behaviors and hippocampal inflammation in mice. v. 236, n. 4, p. 1385-1399, 2019.

LIU, T. Y. et al. Resveratrol intake during pregnancy and lactation re-programs adiposity and ameliorates leptin resistance in male progeny induced by maternal high-fat/high sucrose plus postnatal high-fat/high sucrose diets via fat metabolism regulation. **Lipids Health Dis**, v. 19, n. 1, p. 174, Jul 25 2020.

LOPES, L. T. et al. The interplay between 5-HT_{2C} and 5-HT_{3A} receptors in the dorsal periaqueductal gray mediates anxiety-like behavior in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 417, p. 113588, 2022.

LOWRY, C. A. et al. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1148, n. 1, p. 86-94, Dec 2008.

LV, X. et al. Resveratrol-enhanced SIRT1-mediated osteogenesis in porous endplates attenuates low back pain and anxiety behaviors. **FASEB J**, v. 35, n. 3, p. e21414, Mar 2021.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARKEL, A. L.; GALAKTIONOV IU, K.; EFIMOV, V. M. [Factor analysis of rat behavior in the open-field test]. **Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova**, v. 38, n. 5, p. 855-863, Sep-Oct 1988.

MATHERS, J. C.; STRATHDEE, G.; RELTON, C. L. Induction of epigenetic alterations by dietary and other environmental factors. **Adv Genet**, v. 71, p. 3-39, 2010.

MCAVOY, K. et al. Fluoxetine induces input-specific hippocampal dendritic spine remodeling along the septotemporal axis in adulthood and middle age. **Hippocampus**, v. 25, n. 11, p. 1429-1446, 2015.

MCDEVITT, R. A. et al. Serotonin 1B autoreceptors originating in the caudal dorsal raphe nucleus reduce expression of fear and depression-like behavior. **Biol Psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 780-787, Apr 15 2011.

MCGUIRK, J.; MUSCAT, R.; WILLNER, P. Effects of chronically administered fluoxetine and fenfluramine on food intake, body weight and the behavioural satiety sequence. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 106, n. 3, p. 401-407, 1992.

MCNEILLY, A. D. et al. High fat feeding is associated with stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and reduced anxiety in the rat. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 272-280, 2015.

MENDES-DA-SILVA, C. et al. Maternal high-fat diet during pregnancy or lactation changes the somatic and neurological development of the offspring. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 72, n. 2, p. 136-144, Feb 2014.

MENDEZ-DAVID, I. et al. Rapid anxiolytic effects of a 5-HT₄ receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 6, p. 1366-1378, 2014.

MISSLIN, R.; BELZUNG, C.; VOGEL, E. Behavioural validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents. **Behav Processes**, v. 18, n. 1-3, p. 119-132, 1989.

MOHAMMAD-ZADEH, L. F.; MOSES, L.; GWALTNEY-BRANT, S. M. Serotonin: a review. **J Vet Pharmacol Ther**, v. 31, n. 3, p. 187-199, Jun 2008.

MONTGOMERY, K. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. **Journal of comparative physiological psychology**, v. 48, n. 4, p. 254, 1955.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23-38, Jan 2013.

MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 17, n. 1, p. 91-128, Spring 1993.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n. 4, p. 471-483, Jun 2002.

MUSAZZI, L. et al. The action of antidepressants on the glutamate system: regulation of glutamate release and glutamate receptors. **Biol Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1180-1188, Jun 15 2013.

NAEF, L.; GRATTON, A.; WALKER, C. D. Exposure to high fat during early development impairs adaptations in dopamine and neuroendocrine responses to repeated stress. **Stress-the International Journal on the Biology of Stress**, v. 16, n. 5, p. 540-548, Sep 2013.

NAEF, L. et al. Maternal high-fat intake alters presynaptic regulation of dopamine in the nucleus accumbens and increases motivation for fat rewards in the offspring. **Neuroscience**, v. 176, p. 225-236, Mar 10 2011.

NAEF, L. et al. Maternal high fat diet during the perinatal period alters mesocorticolimbic dopamine in the adult rat offspring: reduction in the behavioral responses to repeated amphetamine administration. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 1, p. 83-94, Mar 2008.

NAUTIYAL, K. M. et al. A Lack of Serotonin 1B Autoreceptors Results in Decreased Anxiety and Depression-Related Behaviors. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 12, p. 2941-2950, Nov 2016.

NIKIFORUK, A.; KOS, T.; WESOŁOWSKA, A. The 5-HT₆ receptor agonist EMD 386088 produces antidepressant and anxiolytic effects in rats after intrahippocampal administration. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 217, n. 3, p. 411-418, Oct 2011.

NINAN, P. T. Recent perspectives on the diagnosis and treatment of generalized anxiety disorder. **Am J Manag Care**, v. 7, n. 11 Suppl, p. S367-376, Sep 2001.

O'CONNOR, R. M. et al. Impact of early-life stress, on group III mGlu receptor levels in the rat hippocampus: effects of ketamine, electroconvulsive shock therapy and fluoxetine treatment. **Neuropharmacology**, v. 66, p. 236-241, 2013.

OKAWARA, M. et al. Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. **Biochem Pharmacol**, v. 73, n. 4, p. 550-560, Feb 15 2007.

OLIVEIRA, T. et al. Differential effects of maternal high-fat/high-caloric or isocaloric diet on offspring's skeletal muscle phenotype. **Life Sci**, v. 215, p. 136-144, Dec 15 2018.

ORGANIZATION, W. H. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. 2017.

PAGE, K. C.; JONES, E. K.; ANDAY, E. K. Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 306, n. 8, p. R527-537, Apr 15 2014.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. J. O. M.; LONGEVITY, C. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PELEG-RAIBSTEIN, D.; LUCA, E.; WOLFRUM, C. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. **Behav Brain Res**, v. 233, n. 2, p. 398-404, Aug 1 2012.

PELEG-RAIBSTEIN, D. et al. Enhanced sensitivity to drugs of abuse and palatable foods following maternal overnutrition. **Translational Psychiatry**, v. 6, Oct 2016.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PENTTILÄ, J. et al. Effects of fluoxetine on dopamine D2 receptors in the human brain: a positron emission tomography study with [11C] raclopride. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 7, n. 4, p. 431-439, 2004.

PERANI, C. V. et al. High-fat diet prevents adaptive peripartum-associated adrenal gland plasticity and anxiolysis. **Sci Rep**, v. 5, p. 14821, Oct 7 2015.

PINEL, J. P.; TREIT, D. Burying as a defensive response in rats. **Journal of Comparative Physiological Psychology**, v. 92, n. 4, p. 708, 1978.

PINHEIRO, G. D. A. et al. Envolvimento dos receptores 5-HT₂ da amígdala nos níveis de ansiedade induzidos pela exposição de ratos ao labirinto em cruz elevado. v. 18, p. 329-335, 2002.

POPOVA, N. K.; ILCHIBAEVA, T. V.; NAUMENKO, V. S. Neurotrophic Factors (BDNF and GDNF) and the Serotonergic System of the Brain. **Biochemistry (Mosc)**, v. 82, n. 3, p. 308-317, Mar 2017.

PRIOR, L. J. et al. Exposure to a high-fat diet during development alters leptin and ghrelin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. **Hypertension**, v. 63, n. 2, p. 338-345, Feb 2014.

PRUT, L.; BELZUNG, C. J. E. J. O. P. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

PURCELL, R. H. et al. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. **Physiol Behav**, v. 104, n. 3, p. 474-479, Sep 1 2011.

RAMBOZ, S. et al. 5-HT_{1B} receptor knock out—behavioral consequences. **Behavioural brain research**, v. 73, n. 1-2, p. 305-312, 1995.

RAMIREZ-LOPEZ, M. T. et al. Exposure to a Highly Caloric Palatable Diet During Pregestational and Gestational Periods Affects Hypothalamic and Hippocampal Endocannabinoid Levels at Birth and Induces Adiposity and Anxiety-Like Behaviors in Male Rat Offspring. **Front Behav Neurosci**, v. 9, p. 339, 2015.

RASTOGI, R. et al. Rapamycin induces mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression through activation of protein kinase B and mitogen-

activated protein kinase kinase pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 47, p. 33966-33977, 2013.

RAYGADA, M.; CHO, E.; HILAKIVI-CLARKE, L. High maternal intake of polyunsaturated fatty acids during pregnancy in mice alters offsprings' aggressive behavior, immobility in the swim test, locomotor activity and brain protein kinase C activity. **J Nutr**, v. 128, n. 12, p. 2505-2511, Dec 1998.

RAYMOND, J. R. et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacol Ther**, v. 92, n. 2-3, p. 179-212, Nov-Dec 2001.

REDDY, B. R. et al. Sirtuin 1 and 7 mediate resveratrol-induced recovery from hyper-anxiety in high-fructose-fed prediabetic rats. **J Biosci**, v. 41, n. 3, p. 407-417, Sep 2016.

REYNOLDS, C. M. et al. Maternal high fat and/or salt consumption induces sex-specific inflammatory and nutrient transport in the rat placenta. **Physiological reports**, v. 3, n. 5, p. e12399, 2015.

RICE, D.; BARONE, S., JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect**, v. 108 Suppl 3, n. suppl 3, p. 511-533, Jun 2000.

RICHARDSON-JONES, J. W. et al. 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 40-52, Jan 14 2010.

ROBERTS, C. et al. GABAergic modulation of 5-HT₇ receptor-mediated effects on 5-HT efflux in the guinea-pig dorsal raphe nucleus. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 7, p. 935-941, Jun 2004.

ROCHA-GOMES, A. et al. LPS tolerance prevents anxiety-like behavior and amygdala inflammation of high-fat-fed dams' adolescent offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 411, p. 113371, 2021.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, n. 6, p. 801-810, Nov 1997.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, n. 2, p. 297-303, Oct 1995.

RODRIGUES-FILHO, R.; TAKAHASHI, R. N. Antinociceptive effects induced by desipramine and fluoxetine are dissociated from their antidepressant or anxiolytic action in mice. **Int J Neuropsychoph**, v. 2, n. 4, p. 263-269, 1999.

ROSEBOOM, P. H. et al. Predator threat induces behavioral inhibition, pituitary-adrenal activation and changes in amygdala CRF-binding protein gene expression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 1, p. 44-55, Jan 2007.

ROYCE, J. R. On the construct validity of open-field measures. **Psychological bulletin**, v. 84, n. 6, p. 1098, 1977.

RUTKOWSKA, M.; JAMONTT, J.; GLINIAK, H. Effects of cannabinoids on the anxiety-like response in mice. **Pharmacol Rep**, v. 58, n. 2, p. 200-206, Mar-Apr 2006.

SAITOH, A. et al. ROCK inhibition produces anxiety-related behaviors in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 188, n. 1, p. 1-11, Sep 2006.

SALIM, S.; CHUGH, G.; ASGHAR, M. Inflammation in anxiety. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v. 88, p. 1-25, 2012.

SANCHEZ, S. et al. Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of rats. **Mol Cell Biochem**, v. 317, n. 1-2, p. 105-111, Oct 2008.

SARKER, G. et al. Maternal overnutrition during critical developmental periods leads to different health adversities in the offspring: relevance of obesity, addiction and schizophrenia. **Scientific Reports**, v. 9, Nov 2019.

SARKISYAN, G.; ROBERTS, A. J.; HEDLUND, P. B. The 5-HT₇ receptor as a mediator and modulator of antidepressant-like behavior. **Behavioural brain research**, v. 209, n. 1, p. 99-108, 2010.

SASAKI, A. et al. Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. **Neuroscience**, v. 272, p. 92-101, Jul 11 2014.

SASAKI, A. et al. Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. **Neuroscience**, v. 240, p. 1-12, Jun 14 2013.

SASAKI, A.; MCGOWAN, P. O.; ERB, S. A study of the effects of maternal high fat diet on behavioural responses to acute and repeated administrations of cocaine in rat offspring. **Neuroscience Letters**, v. 673, p. 157-162, Apr 2018.

SAÚDE, M. D. Vigitel Brazil 2018: surveillance of risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey: estimates of frequency and sociodemographic distribution of risk and protective factors for chronic diseases in the capitals of the 26 Brazilian states and the Federal District in 2018. 2018.

SCHRÖDER, J. J. T. I. P. S. A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions. v. 2, n. 10, p. 373-378, 1997.

SGHENDO, L.; MIFSUD, J. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 317-325, 2012.

SHALEV, U. et al. Long-term physiological and behavioral effects of exposure to a highly palatable diet during the perinatal and post-weaning periods. **Physiology & Behavior**, v. 101, n. 4, p. 494-502, Nov 2010.

SHEN, J. D. et al. Effects of resveratrol on the levels of ATP, 5-HT and GAP-43 in the hippocampus of mice exposed to chronic unpredictable mild stress. **Neurosci Lett**, v. 735, p. 135232, Sep 14 2020.

SHISHKINA, G. T.; KALININA, T. S.; DYGALO, N. N. Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect. **Neuroscience**, v. 150, n. 2, p. 404-412, Dec 5 2007.

SHUTO, T. et al. Obligatory roles of dopamine D1 receptors in the dentate gyrus in antidepressant actions of a selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine. **Mol Psychiatry**, v. 25, n. 6, p. 1229-1244, Jun 2020.

SILVA, F. T. Alterações psicológicas e fisiológicas em voluntários saudáveis submetidos à situação ansiogênica do "Video-Recorded Stroop Color-Word Test": efeitos do diazepam. 2001.

SILVA, M. T.; ALVES, C. R.; SANTAREM, E. M. Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 3, p. 333-339, Mar 1999.

SIMIAND, J.; KEANE, P. E.; MORRE, M. The staircase test in mice: a simple and efficient procedure for primary screening of anxiolytic agents. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 84, n. 1, p. 48-53, 1984.

SŁAWIŃSKA, U.; JORDAN, L. M. Serotonergic influences on locomotor circuits. **Current Opinion in Physiology**, v. 8, p. 63-69, 2019.

SOARES, A. K. et al. Somatic and reflex development in suckling rats: effects of mother treatment with ketogenic diet associated with lack of protein. **Nutr Neurosci**, v. 12, n. 6, p. 260-266, Dec 2009.

SOMMER, R. J. Phenotypic Plasticity: From Theory and Genetics to Current and Future Challenges. **Genetics**, v. 215, n. 1, p. 1-13, May 2020.

SORREGOTTI, T. et al. Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice. **Behav Brain Res**, v. 246, p. 76-85, Jun 1 2013.

SORRELLS, S. F. et al. The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 33-39, 2009.

SOUTO, T. D. et al. Lard-rich and canola oil-rich high-fat diets during pregnancy promote rats' offspring neurodevelopmental delay and behavioral disorders. **Physiology & Behavior**, v. 213, Jan 2020.

SPENCER, S. J.; TILBROOK, A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 8, p. 1133-1143, Sep 2009.

SULLIVAN, E. L. et al. Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. **J Neurosci**, v. 30, n. 10, p. 3826-3830, Mar 10 2010.

SUN, B. et al. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. **Diabetes**, v. 61, n. 11, p. 2833-2841, Nov 2012.

TAYLOR, P.; POSTON, L. J. E. P. Developmental programming of obesity in mammals. v. 92, n. 2, p. 287-298, 2007.

TEIXEIRA-SILVA, F. et al. The free-exploratory paradigm as a model of trait anxiety in rats: test-retest reliability. **Physiol. Behav.**, v. 96, n. 4-5, p. 729-734, 2009.

THIEBOT, M. et al. Dissociation de deux composantes du comportement chez le rat sous l'effet de psychotropes. **Psychopharmacologia**, v. 31, n. 1, p. 77-90, 1973.

TOZUKA, Y. et al. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. **Neurochemistry International**, v. 57, n. 3, p. 235-247, Oct 2010.

TURCO, K. **Mapping the Serotonergic System: Topographical Organization of Serotonergic Projections from the Dorsal Raphe Nucleus**. 2013.

TYCE, G. M. Origin and metabolism of serotonin. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 16 Suppl 3, p. S1-7, 1990.

VEZINA, P.; KIM, J. H. Metabotropic glutamate receptors and the generation of locomotor activity: interactions with midbrain dopamine. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 4, p. 577-589, Mar 1999.

VICENTE, M. A.; ZANGROSSI, H. Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 15, n. 3, p. 389-400, Apr 2012.

VICKERS, M. H. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. **Nutrients**, v. 6, n. 6, p. 2165-2178, Jun 2 2014.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 322-328, 2007.

WANG, H. et al. cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia. **Front Mol Neurosci**, v. 11, p. 255, 2018.

WANG, J.; YANG, Y.; YAN, Y. Bioproduction of resveratrol. In: (Ed.). **Biotechnology of natural products**: Springer, 2018. p.61-79.

WANG, R. et al. Resveratrol improved hippocampal neurogenesis following lead exposure in rats through activation of SIRT1 signaling. **Environmental Toxicology**, v. 36, n. 8, p. 1664-1673, 2021.

WANG, X. et al. Resveratrol reverses chronic restraint stress-induced depression-like behaviour: Involvement of BDNF level, ERK phosphorylation and expression of Bcl-2 and Bax in rats. **Brain Res Bull**, v. 125, p. 134-143, Jul 2016.

WANG, Z. et al. Antidepressant-like activity of resveratrol treatment in the forced swim test and tail suspension test in mice: the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of ERK. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 112, p. 104-110, Nov 2013.

WEISSTAUB, N. V. et al. Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 536-540, Jul 28 2006.

WESOŁOWSKA, A.; NIKIFORUK, A. Effects of the brain-penetrant and selective 5-HT₆ receptor antagonist SB-399885 in animal models of anxiety and depression. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 5, p. 1274-1283, 2007.

WESOŁOWSKA, A.; NIKIFORUK, A.; STACHOWICZ, K. Potential anxiolytic and antidepressant effects of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 after intrahippocampal administration to rats. **European journal of pharmacology**, v. 553, n. 1-3, p. 185-190, 2006.

WESOŁOWSKA, A. et al. Effect of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 3, p. 578-586, 2006.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. J. N. The discovery of serotonin and its role in neuroscience. v. 21, n. 1, p. 2-8, 1999.

XIANG, M. et al. Serotonin receptors 2A and 1A modulate anxiety-like behavior in post-traumatic stress disorder mice. v. 11, n. 4, p. 2288, 2019.

XU, Y. et al. Antidepressant-like effect of trans-resveratrol: Involvement of serotonin and noradrenaline system. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 20, n. 6, p. 405-413, Jun 2010.

YAMAKUCHI, M. MicroRNA Regulation of SIRT1. **Front Physiol**, v. 3, p. 68, 2012.

YAN, Z. et al. Maternal Chronic Folate Supplementation Ameliorates Behavior Disorders Induced by Prenatal High-Fat Diet Through Methylation Alteration of BDNF and Grin2b in Offspring Hippocampus. **Mol Nutr Food Res**, v. 61, n. 12, Dec 2017.

YU, H. R. et al. Resveratrol Treatment Ameliorates Leptin Resistance and Adiposity Programmed by the Combined Effect of Maternal and Post-Weaning High-Fat Diet. **Mol Nutr Food Res**, v. 63, n. 13, p. e1801385, Apr 20 2019a.

YU, Y. et al. Resveratrol improves brain-gut axis by regulation of 5-HT-dependent signaling in the rat model of irritable bowel syndrome. v. 13, p. 30, 2019b.

ZAVVARI, F.; NAHAVANDI, A.; GOUDARZI, M. Fluoxetine attenuates stress-induced depressive-like behavior through modulation of hippocampal GAP43 and neurogenesis in male rats. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 103, p. 101711, 2020.

ZEMDEGS, J. et al. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. **Br J Pharmacol**, v. 173, n. 13, p. 2095-2110, Jul 2016.

ZHAO, X. et al. Chronic resveratrol treatment exerts antihyperalgesic effect and corrects comorbid depressive like behaviors in mice with mononeuropathy: involvement of serotonergic system. **Neuropharmacology**, v. 85, p. 131-141, Oct 2014.

ZHOU, R. et al. Abnormal synaptic plasticity in basolateral amygdala may account for hyperactivity and attention-deficit in male rat exposed perinatally to low-dose bisphenol-A. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 5, p. 789-798, 2011.

ZHU, X. et al. The antidepressant and anxiolytic-like effects of resveratrol: involvement of phosphodiesterase-4D inhibition. v. 153, p. 20-31, 2019.

ZIEBA, J. et al. Long-term behavioural effects of maternal obesity in C57BL/6J mice. **Physiol Behav**, v. 199, p. 306-313, Feb 1 2019.

ŻMUDZKA, E. et al. Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. **Life sciences**, v. 210, p. 106-124, 2018.

ANEXO A – PROTOCOLO REVISÃO SISTEMÁTICA



SYSTEMATIC REVIEW PROTOCOL FOR ANIMAL INTERVENTION STUDIES

FORMAT BY SYRCLE (WWW.SYRCLE.NL)
VERSION 2.0 (DECEMBER 2014)

Item #	Section/Subsection/Item	Description	Check for approval
A. General			
1.	Title of the review	Influence of maternal high fat diet intake on offspring's locomotor activity during anxiety-related behavior tests: a systematic review.	
2.	Authors (names, affiliations, contributions)	Carolina Cadete Lucena Cavalcanti (Graduate program in Neuropsychiatry and behavioral sciences, Fedral University of Pernambuco, 50670, 901, PE, Brail). Tássia Karin Ferreira Borba (Graduate program in Neuropsychiatry and behavioral sciences, Federal University of Pernambuco, 50670, 901, Recife, PE, Brasil). Raul Manhães-de-Castro (Graduate Program in Nutrition, Federal University of Pernambuco, 50670, 901, Recife, PE, Brasil). Raquel da Silva Aragão (Graduate Program in Nutrition, Federal University of Pernambuco, 50670, 901, Recife, PE, Brasil).	
3.	Other contributors (names, affiliations, contributions)	No one.	
4.	Contact person + e-mail address	+55 81 9 8856-1993; carolina.cadetelc@outlook.com	
5.	Funding sources/sponsors	CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil) CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil) FACEPE (Fundação de Amaro a Ciência e Tecnologia de Pernambuco – Brasil)	
6.	Conflicts of interest	There are no conflicts of interests.	
7.	Date and location of protocol registration	07/01/2019; Federal University of Pernambuco 50670, 901, Recife, PE, Brasil	
8.	Registration number (if applicable)	Not applicable	
9.	Stage of review at time of registration	We performed preliminary searches, piloting of the study selection process and formal screening of search results against of eligibility criteria	
B. Objectives			
Background			
10.	What is already known about this disease/model/intervention? Why is it important to do this review?	Nutritional profile transition observed in world scenario, characterized by high intake of saturated fats and refined sugars, is accompanied by an increase of overweight prevalence and by a growth of depressive and/or anxiety disorders. When this consumption is associated with early	

		life stages, a period marked by a set of important events for the offspring, changes on developmental trajectory can be observed. At this stage, central nervous system undergoes rapid changes, like proliferation, cell migration and differentiation, synaptogenesis, gliogenesis, myelination and apoptosis. With regard to maternal nutrition, exposure to a balanced diet during the early stages of life is essential for adequate (physical, physiological and ethological) development of the offspring. Studies with rodents, for example, have already shown that maternal exposure to high-fat diets can alter offspring serotonergic, GABAergic and endocannabinoid systems and these changes can be reflected on emotional behaviour. Despite this, locomotor activity evaluation can be still seen as a separate parameter of anxiety-related behaviours, not as part of it. Therefore, it is necessary to remember that the expression of behaviour is composed of several factors that communicate and influence each other.	
Research question			
11.	Specify the disease/health problem of interest	Offspring's locomotor activity during anxiety-related behavior tests after maternal exposure to high fat diet.	
12.	Specify the population/species studied	Rodents	
13.	Specify the intervention/exposure	Maternal exposure to diets which content of macronutrients or energy was modified from standard diets.	
14.	Specify the control population	Maternal exposure to control diet.	
15.	Specify the outcome measures	Evaluation of offspring's locomotor activity during anxiety-related behavior tests	
16.	State your research question (based on items 11-15)	1) What is the influence of maternal high fat diet on offspring's locomotor activity during anxiety-related behavior tests? 2) How the serotonergic system influence offspring's locomotor activity during anxiety-related behavior tests?	
C. Methods			
Search and study identification			
17.	Identify literature databases to search (e.g. Pubmed, Embase, Web of science)	☒ MEDLINE via PubMed ☒ Web of Science ☒ SCOPUS ☐ EMBASE Other, namely: Lilacs ☐ Specific journal(s), namely:	
18.	Define electronic search strategies (e.g. use the step by step search guide ¹⁵ and animal search filters ^{20,21})	When available, please add a supplementary file containing your search strategy: The search strategy will include terms relating to describing the population, intervention and outcomes. Combination of MeSH descriptors will be used: "diet, high-fat", "diet, western", "mothers", "maternal nutritional physiological phenomena", "pregnancy", "lactation", "breast feeding", "prenatal exposure delayed effects", "behavior",	

		"locomotion". With the aim of having greater sensitivity in the search will also be used all fields: "high fat diet", "western diet", "cafeteria diet", "obesogenic diet", "mothers", "maternal", "pregnancy", "gestation", "lactation", "breast feeding", "perinatal", "critical period", "maternal intake", "prenatal exposure", "behaviour", "behaviour" "behavioral test", "behavioural test", "ethological analysis", "behavioural specificity", "ethology", "locomotion", "locomotor activity", "activity, locomotor" and "hyperactivity", "open field", "free exploratory paradigm", "elevated plus maze", "light-dark box", "light/dark box", "staircase", "home cage task".	
19.	Identify other sources for study identification	☒ Reference lists of included studies ☐ Books ☐ Reference lists of relevant reviews ☐ Conference proceedings, namely: ☐ Contacting authors/ organisations, namely: ☐ Other, namely:	
20.	Define search strategy for these other sources	We will check the list of references of all articles to identify possible studies that may be included in this review.	
Study selection			
21.	Define screening phases (e.g. pre-screening based on title/abstract, full text screening, both)	The research and selection of the articles will be carried out in two stages. The first step will be to select the articles based through their title and abstract according to the inclusion and exclusion criteria. The second step will be to select the articles included based on the full text reading. Articles that complete the defined criteria will be included in this review.	
22.	Specify (a) the number of reviewers per screening phase and (b) how discrepancies will be resolved	The research will be conducted in electronic databases by two independent reviewers (Cavalcanti, CCL; Borba, TKF) based on a pre-defined protocol. A third reviewer (da Silva Aragão R) will be consulted when need as a mediator for the definition	
<i>Define all inclusion and exclusion criteria based on:</i>			
23.	Type of study (design)	Inclusion criteria: Experimental studies using animals. Exclusion criteria: Review of experimental studies.	
24.	Type of animals/population (e.g. age, gender, disease model)	Inclusion criteria: Rodent models Exclusion criteria: Genetically modified rodents.	
25.	Type of intervention (e.g. dosage, timing, frequency)	Inclusion criteria: Maternal exposure to high fat diets which content of macronutrients or energy was modified from standard diets. Exclusion criteria: Studies where maternal diet energy content was modified by reducing offer; studies where macronutrient or energy manipulation was performed using beverage drinks (eg. water with glucose); studies where the only diet manipulation occurred in micronutrients content.	
26.	Outcome measures	Inclusion criteria: Evaluation of locomotor activity on described behavioural apparatuses.	

		Exclusion criteria: None.	
27.	Language restrictions	Inclusion criteria: All language will be included. Exclusion criteria: None	
28.	Publication date restrictions	Inclusion criteria: All years will be included. Exclusion criteria: None.	
29.	Other	Inclusion criteria: None. Exclusion criteria: None.	
30.	Sort and prioritize your exclusion criteria per selection phase	Selection phase: Title and abstract screening. 1. Not an original primary study. 2. Not in vivo rodents study. 3. Do not use maternal high fat diet. Selection phase: Full-text 1. Genetically modified rodents. 2. Diet with alteration of micronutrient. 3. No appropriate control group. 4. Those studies without baseline or basal group data. 5. No outcome regarding locomotor activity.	
Study characteristics to be extracted (for assessment of external validity, reporting quality)			
31.	Study ID (e.g. authors, year)	The following data will be extracting: article name, authors, year of publication and journal.	
32.	Study design characteristics (e.g. experimental groups, number of animals)	The following data will be extracting: Period of exposure to maternal high fat diet, number of groups, number of dams in each experimental group formed, control group, experimental groups, number of animals per group, diet offered after weaning.	
33.	Animal model characteristics (e.g. species, gender, disease induction)	The following data will be extracting: Strain, sex, age, killing age.	
34.	Intervention characteristics (e.g. intervention, timing, duration)	The following data will be extracting: Phase and duration of exposure to diet, source of macronutrient in diet, macronutrient percentage distribution, and energetic value of the experimental diet.	
35.	Outcome measures	The following data will be extracting: behavioural tests descriptions, age of the animal, time of exposure according to the dark-light cycle.	
36.	Other (e.g. drop-outs)	None.	
Assessment risk of bias (internal validity) or study quality			
37.	Specify (a) the number of reviewers assessing the risk of bias/study quality in each study and (b) how discrepancies will be resolved	The risk assessment of bias will be performed by two reviewers (Cavalcanti CCL and Borba TKF). To describe the intensity of agreement between the two reviewers we will use the kappa index. The calculation of the kappa will be performed to measure the degree of agreement beyond what would be expected by random chance. In case of discrepancies, a third reviewer (da Silva Aragão R) will be consulted to resolve the discrepancy.	

38.	Define criteria to assess (a) the internal validity of included studies (e.g. selection, performance, detection and attrition bias) and/or (b) other study quality measures (e.g. reporting quality, power)	☒ By use of SYRCLE's Risk of Bias tool⁴ ☐ By use of SYRCLE's Risk of Bias tool, adapted as follows: ☐ By use of CAMARADES' study quality checklist, e.g.²² ☐ By use of CAMARADES' study quality checklist, adapted as follows: ☐ Other criteria, namely:	
Collection of outcome data			
39.	For each outcome measure, define the type of data to be extracted (e.g. continuous/dichotomous, unit of measurement)	For all outcomes, continuous variables will be extracted. Although, when plotting information in tables, data will be presented as dichotomous.	
40.	Methods for data extraction/retrieval (e.g. first extraction from graphs using a digital screen ruler, then contacting authors)	The extraction of the results of the articles will be carried out from the screening of the results presented from texts, graphs and tables.	
41.	Specify (a) the number of reviewers extracting data and (b) how discrepancies will be resolved	The extraction of data from the results will be performed by two reviewers (Cavalcanti CCL and Borba TKF). To describe the intensity of agreement between the two reviewers we will use the kappa index. The calculation of the kappa will be performed to measure the degree of agreement beyond what would be expected by random chance. In case of discrepancies, a third reviewer (da Silva Aragão R) will be consulted to resolve the discrepancy.	
Data analysis/synthesis			
42.	Specify (per outcome measure) how you are planning to combine/compare the data (e.g. descriptive summary, meta-analysis)	We will provide a descriptive summary of the findings of the included studies, structured around the type of maternal high fat diet, rodent species and age, behavioural test used and parameters evaluated on the apparatuses.	
43.	Specify (per outcome measure) how it will be decided whether a meta-analysis will be performed	No meta-analysis will be performed.	
<i>If a meta-analysis seems feasible/sensible, specify (for each outcome measure):</i>			
44.	The effect measure to be used (e.g. mean difference, standardized mean difference, risk ratio, odds ratio)	No meta-analysis will be performed.	
45.	The statistical model of analysis (e.g. random or fixed effects model)	No meta-analysis will be performed.	
46.	The statistical methods to assess heterogeneity (e.g. I^2 , Q)	No meta-analysis will be performed.	
47.	Which study characteristics will be examined as potential source of heterogeneity (subgroup analysis)	No meta-analysis will be performed.	
48.	Any sensitivity analyses you propose to perform	No meta-analysis will be performed.	
49.	Other details meta-analysis (e.g. correction for multiple testing, correction for multiple use of control group)	No meta-analysis will be performed.	

50.	The method for assessment of publication bias	We will look at how the authors describe the results, the sample size, and the statistical analysis applied to investigate whether the authors have done a selective description of the outcomes. Time permitting; a funnel plot analysis will be performed.	
Final approval by (names, affiliations):			Date:

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA APROVADO



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 20 de julho de 2019

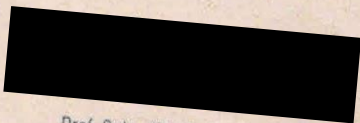
Ofício nº 40/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Raquel da Silva Aragão**
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0046/2019

Certificamos que a proposta intitulada **“Diets hiperlipídicas maternas com ou sem resveratrol: estudo comportamental e molecular da responsividade do sistema serotoninérgico em ratos adultos-jovens”**, registrado com o nº 0046/2019 sob a responsabilidade de **Prof. Raquel da Silva Aragão** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 02/07/2019

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1/09/2019 a 30/11/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico
Nº de animais	260
Peso/Idade	220-225 greprodutor e 4,5- 8,5 filhote ao nascimento
Sexo	Macho (180) e (80) fêmea
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Nutrição
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Nutrição

Atenciosamente,


Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

ANEXO C – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO

Behavioural Brain Research 403 (2021) 113141



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

High-caloric or isocaloric maternal high-fat diets differently affect young-adult offspring behavior in anxiety-related tests and offspring sensitivity to acute fluoxetine

Carolina Cadete Lucena Cavalcanti^a, Raquel Da Silva Aragão^{b,c,f,*},
Erika Vanesa Cadena-Burbano^c, Thaynan Raquel dos Prazeres Oliveira^c,
Jacqueline Maria Silva^c, Raquel de Arruda Campos Benjamin^d, Amanda Braz Lago^d,
Eric Henrique Moraes Silva^e, Thuani Lamenha Costa^f, Raul Manhães-De-Castro^{a,c}

^a Graduate Program of Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^b Graduate Program of Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

^c Graduate Program of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^d Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^e Informatic Center, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^f Physical Education and Sport Science Nucleus Academic Center of Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Maternal diet
Serotonin
State anxiety
Trait anxiety

ABSTRACT

Objective: to evaluate the influence of two maternal high-fat diets with different caloric contents on anxiety-like behavior in young-adult offspring and their sensitivity to acute fluoxetine.

Methods: females Wistar rats were used and divided according to diet received during gestation and lactation: Control (CTR), high-fat/isocaloric (HI) and high-fat/high-caloric (HH). Offspring were subsequently divided into three subgroups according to acute administration of vehicle or fluoxetine (1 or 10 mg/kg). To assess animals' anxiety-like behaviors, three tests were used: open field (OF), elevated plus-maze (EPM) and free-exploratory paradigm (FEP).

Results: In OF, HI and HH showed increased hyperactivity- and anxiety-related behaviors, HI being more hyperactive than HH. In response to fluoxetine, HI offspring decreased number of quadrants entered, decreased number of central entries and spent less time in rearing in peripheral areas, while HH offspring showed less time spent in rearing in the OF peripheral area. In EPM test, HI pups spent more time in closed arms than the HH pups. Fluoxetine decreased number of open arms entries for HI offspring and increased percentage of time spent in central area for HH animals. Maternal diet did not influence FEP test, neither HI nor HH presented a response after fluoxetine acute administration.

Conclusion: Maternal high-fat diets influence offspring anxiety-like behavior in state-anxiety tests but not in trait-anxiety test. Responsiveness to acute fluoxetine depended on maternal diet, dose and which behavioral tests were being evaluated.

1. Introduction

Nutritional profile transition observed in the world scenario, characterized by high intake of saturated fats and sugar [1], is accompanied by an increase in the prevalence of overweight [2] and by a growth in

depressive and/or anxiety disorders [3]. Changes in the developmental trajectory can be observed when this consumption is associated with early life stages [4]. Studies with rodents have already shown that maternal exposure to high-fat and cafeteria diets can alter offspring serotonergic, GABAergic and endocannabinoid systems and these

* Corresponding author at: Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, CEP 55608-680, Brazil.

E-mail addresses: carolina.cadete@ufpe.br (C.C.L. Cavalcanti), raquel.aragao@ufpe.br (R. Da Silva Aragão), erika.cadena@ufpe.br (E.V. Cadena-Burbano), thaynan.raquel@ufpe.br (T.R.P. Oliveira), jacqueline.silva@ufpe.br (J.M. Silva), raquel.a.benjamin@gmail.com (R.A.C. Benjamin), amandablago@gmail.com (A.B. Lago), ehms@cin.ufpe.br (E.H.M. Silva), thuani.lamenha@ufpe.br (T.L. Costa), raul.castro@ufpe.br (R. Manhães-De-Castro).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113141>

Received 7 July 2020; Received in revised form 14 December 2020; Accepted 18 January 2021

Available online 27 January 2021

0166-4328/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

changes can be reflected in emotional behavior [5,6].

Some studies have shown that a maternal high-fat diet can either increase or decrease offspring anxiety-like behavior [7–9]. These discrepancies in results may be related to the differences in period and duration of maternal exposure to diet, offspring evaluation (age) and apparatus used [8,10]. Moreover, the high-fat diets used are not fully standardized among published studies [8,10], nor did we find either studies that distinguished between the effects of fat from calorie intake on emotional behavior or studies that differentiated between the effect of maternal diet on state-anxiety or trait-anxiety. In fact, studies that analyze these two types of anxiety are rare [11]. State-anxiety refers to a transient emotional state, of variable intensity, experienced at a particular moment in time [12]. Trait anxiety, on the other hand, is relatively stable over time and is a personal trait of the individual, which leads it to respond to stressful situations with anxiety [12].

Finally, since the serotonergic system may be associated with emotional behavior, studies evaluating the influence of high-fat diet on serotonergic receptors responsiveness are important. Some studies have already shown, for example, that a post-weaning high-fat diet increased resistance to fluoxetine and escitalopram administration [13,14]. Nevertheless, the influence that maternal exposure to high-fat diet has on the responsiveness of the serotonergic system of the offspring is not yet clear. Thus, we evaluated the influence of two maternal high-fat diets with different caloric content on both state and trait anxiety and on the responsiveness of the serotonergic system to acute fluoxetine in the young-adult offspring.

2. Material and methods

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Biosciences Center of the Federal University of Pernambuco, Brazil (UFPE) (process no 23076.049825/2015-39) and followed the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [15].

2.1. Animals

Forty-three virgin female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) aged 90–120, weighing 220–250 g, were obtained from the Department of Nutrition, at UFPE. Animals were maintained on a 12h:12 h light-dark cycle (lights off 8:00 am – 8:00pm) at a room temperature of 23 ± 2 °C with *ad libitum* access to food and filtered water. The females were mated in a ratio of 2:1. The day on which spermatozoa were present in vaginal smear was designated as day 0 of pregnancy. Pregnant dams were immediately housed individually and were divided into one of three groups according to diet received during pregnancy and lactation: Control (CTR, $n = 17$), high-fat/high-caloric (HH, $n = 14$) or high-fat/isocaloric (HI, $n = 12$).

On postnatal day 1 (PND1), the litters were adjusted to eight pups with at least two females always included in each litter. At the PND22, pups were separated from their mothers and kept together (2–4 males per cage) until the end of the experiments. After weaning, all animals received the same standard animal diet (Presença - Purina®, Brazil). For the experimental procedures, only male pups were considered. Female offspring's were used in another experiment right after weaning. The body weight of the pups was measured on postnatal day 1 and every two days until PND21. After weaning, body weight was assessed weekly for three consecutive weeks (animals aged 9–11 weeks).

2.2. Diets

Three different maternal diets were used: Control diet (19 % Kcal from protein, 18 % Kcal from lipid, 3.60 kcal/g), proposed by Reeves, Nielsen [16], and two experimental high-fat diets: High-fat/High-caloric (19 % Kcal from protein, 51 % Kcal from lipid, 4.62 kcal/g) and High-fat/Isocaloric (19 % Kcal from protein, 51 % Kcal from lipid, 3.64 kcal/g) [17]. Diets composition is shown in Table 1.

Table 1
Composition of Experimental diets.

Ingredients	Control AIN-93 G (g/100 g)*	High-fat/Isocaloric (g/100 g)*	High-fat/High-caloric (g/100 g)*
Casim (>85 % protein)	20.00	20.00	25.20
Corn starch (87 % carbohydrate)	39.75	19.30	24.50
Dextrinized starch (92 % carbohydrate)	13.20	6.40	8.00
Sucrose	10.00	4.85	6.17
Soybean oil	7.00	7.00	7.00
Lard (100 % lipid)	–	13.40	19.00
Cellulose	5.00	24.00	5.00
Mineral mix (AIN-93 G)	3.50	3.50	3.50
Vitamin Mix	1.00	1.00	1.00
L-Methionine	0.30	0.30	0.38
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
TBHQ	0.0014	0.0014	0.0014
Calories (g/100 g)	3.60	3.64	4.62
Composition of macronutrients according to total energy (%)			
Protein	19	19	19
Carbohydrate	63	30	30
Lipid	18	51	51

Source: *From Reeves, Nielsen and Fahey [16]. *From Oliveira et al. [17]. TBHQ=Terbutylhydroquinone.

2.3. Acute pharmacological administration

Each group formed by maternal diet was divided into three subgroups according to acute pharmacological administration that offspring received. Administration was always acute, between 9:30am to 10:00am, thirty minutes before behavioral test performed in the 9th, 10th and 11th weeks of life. A period of one week was used to allow the drug to washout. Time of applications was defined according to light/dark cycle transition, since the peak of serotonin in plasma and in the hypothalamus occurs two hours after lights off [18]. Two doses of fluoxetine were used, a well-established dose [19] and a non-explored dose. Groups were subdivided as followed:

- Vehicle: animals received intraperitoneal saline solution (NaCl 0.9 %) in the volume of 1 mL / 100 g of body weight.
- Fluoxetine 1 mg: animals received intraperitoneal fluoxetine solution dose at 1 mg/kg of body weight in the volume of 1 mL / 100 g of body weight.
- Fluoxetine 10 mg: animals received intraperitoneal fluoxetine solution dose at 10 mg/kg of body weight in the volume of 1 mL / 100 g of body weight [19].

2.4. Experimental design

Considering the two manipulations (maternal diet and acute pharmacological administration in the offspring), nine experimental groups were formed. Information about groups and number of animals can be observed in Table 2.

2.5. Behavioral tests

Behavioral tests were performed between the 9th and 11th weeks of

Table 2
Experimental groups.

Diet/Drug	Vehicle	Fluoxetine 1 mg	Fluoxetine 10 mg
Control	CV ($n = 13$)	CF1 ($n = 13$)	CF10 ($n = 14$)
High-fat/high-caloric	HHV ($n = 11$)	HH1 ($n = 11$)	HH10 ($n = 10$)
High-fat/isocaloric	HIV ($n = 11$)	HI1 ($n = 9$)	HI10 ($n = 10$)

life. Each animal was evaluated in one test per week being exposed to the apparatus only once. All tests were performed and filmed during the dark phase of the light/dark cycle, thirty minutes after drug administration. Between filming, each apparatus was cleaned to eliminate odors that could influence behavior of the following animal. At the end of the experiments, all videos were renamed to avoid biases in analysis. Videos were blinded-analyzed using a digital counter developed by the research group. Fig. 1 shows a summary of all experimental procedures.

2.5.1. Open field test

The open field apparatus consists of a wooden dark circular field (61 m) covered by EVA, delimited by walls of 30 cm in height [20]. To facilitate ambience, animals were moved to the behavioral analysis room 1 h before test. At the end of this period, each animal received an intraperitoneal injection of drug and returned to cage. Half an hour later, rodent was placed on central area of field and allowed to move freely for 15 min. Rat behavior was continuously recorded in dark by a digital infrared camera placed over the apparatus. Numbers of fecal boli were counted at the end of filming. The following spatiotemporal and ethological parameters were evaluated off-line: 1) total number of quadrants entered by the animal with all four paws – two straight lines (61 m) perpendicular to each other were drawn to form four quadrants of equal areas; 2) number of central entries and 3) time spent in central area – defined by a circle with an approximate area of $0.11\pi \text{ cm}^2$; and 4) time spent in grooming and rearing.

2.5.2. Elevated plus-maze test

The elevated plus-maze apparatus was made of wooden and elevated to height of 50 cm with two open ($50 \times 10 \text{ cm}$) and closed arms ($50 \times 10 \times 40 \text{ cm}$), connected by a central area ($10 \times 10 \text{ cm}$). To reduce the possibility of accidents, exploration of the open arms was encouraged by the inclusion of slight edge (1 cm) around their perimeter. In addition, surface of all the arms was covered by EVA. To facilitate ambience, animals were moved to the behavioral analysis room 1 h before test. At the end of this period, each animal received an intraperitoneal injection of drug and returned to cage. Half an hour later, the rodent was placed in central area, facing one of the open arms and allowed to move freely for 5 min. A red 15-watt light, positioned above the central area, was kept on during experiment. Rat behavior was continuously recorded by an infrared imaging system placed above the apparatus. The following spatiotemporal and ethological parameters were evaluated off-line: 1) number of total arms entries; 2) number and percentage of open and closed arms entries; 3) percentage of time (s) spent in open and closed arms and in the central area; 4) attempts to approach open arms; 5) time spent in grooming, head-dipping (in unprotected or protected areas) and rearing.

2.5.3. Free-exploratory paradigm test

The free-exploratory apparatus consists of a wooden box divided into two equal rectangular parts, a familiar area and a novel area, each of which is subdivided into three equal square exploratory units ($20 \times 20 \times 40 \text{ cm}$), interconnected by small openings ($10 \times 10 \text{ cm}$) [21]. The two halves were separated by a removable partition and the floor was protected by EVA. Twenty-four hours before testing, each animal was placed in familiar side and left there until the test time, to become familiarized with it. The familiar area had food and water *ad libitum* and the floor was covered by sterilized wood. At the end of this period, each animal received an intraperitoneal injection of drug and returned to the familiar area of the apparatus. Half-hour later, the partition was removed, and the animal could freely explore the entire apparatus area for 15 min. The apparatus was kept in the rat homeroom and recording was made in the dark by a digital infrared camera placed over the apparatus. Twenty-four-hour food consumption was also registered. The following spatiotemporal and ethological parameters were evaluated off-line: 1) total number of units entered; 2) percentage of units entries in novel and familiar areas; 3) percentage of time spent in novel and familiar areas; 4) latency to enter the novel area; 5) time in rearing in familiar and novel areas.

2.6. Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was performed to determine if the data were normally distributed. Body weight during lactation was analyzed using the two-way repeated measures ANOVA (diet $\times$ age), followed by the Tukey's post hoc test. Body weight during the weeks of the behavioral tests (aged 9–11 weeks) was analyzed by the two-way ANOVA test (diet $\times$ drug), followed by Tukey's post hoc test. As each behavioral test was performed at different age, spatiotemporal and ethological parameters of open-field, elevated plus-maze, and free-exploratory paradigm tests were analyzed by the two-way ANOVA test (diet $\times$ drug), followed by the Tukey's post hoc test. All data are presented as mean $\pm$ S.E.M. Significance was always set at $p < 0.05$. Data analyses were performed using GraphPad Prism 6® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Evaluation of offspring

When body weight was analyzed during lactation, two-way RM ANOVA showed effect of age [$F(10, 890) = 3.51$; $p < 0.0001$] and interaction between factors [$F(20, 890) = 5.904$; $p < 0.0001$]. There was no effect of maternal diet [$F(2,89) = 2.25$; $p = 0.114$]. HH pups were heavier than CTR pups at PND21 ($p < 0.01$). In addition, HH pups were

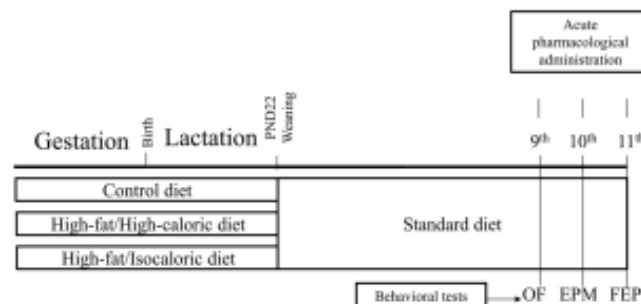


Fig. 1. Experimental procedure. Maternal diet was manipulated during gestation and lactation. Offspring were divided into three groups according to acute pharmacological administration received at 9th, 10th and 11th weeks of life: Vehicle, Fluoxetine 1 mg/kg or Fluoxetine 10 mg/kg. Each behavioral test was realized once, thirty minutes after pharmacological administration. PND = postnatal day; OF = open field; EPM = elevated plus-maze; FEP = free exploratory paradigm.

also heavier than HI pups at PND19 ($p < 0.0001$) and PND21 ($p < 0.0001$) (Fig. 2). For post-weaning body weight evaluation, two-way RM ANOVA did not show any effect of maternal diet, fluoxetine administration or interaction between factors on weeks 9 [$F_{\text{diet}}(2,84) = 0.033$; $p = 0.967$; $F_{\text{drug}}(2,84) = 1.605$; $p = 0.207$; $F_{\text{interaction}}(4,84) = 0.801$; $p = 0.528$], 10 [$F_{\text{diet}}(2,84) = 0.207$; $p = 0.813$; $F_{\text{drug}}(2,84) = 1.733$; $p = 0.183$; $F_{\text{interaction}}(4,84) = 0.137$; $p = 0.968$] and 11 [$F_{\text{diet}}(2,83) = 0.251$; $p = 0.779$; $F_{\text{drug}}(2,83) = 1.191$; $p = 0.309$; $F_{\text{interaction}}(4,83) = 0.277$; $p = 0.892$] (Fig. 3).

3.2. Open field test (OF)

When we analyzed spatiotemporal parameters, the two-way ANOVA indicated effects of diet [$F(2,73) = 12.42$; $p < 0.0001$], drug [$F(2,73) = 14.13$; $p < 0.0001$], and interaction of factors [$F(4,73) = 3.916$; $p = 0.0062$] on the number of quadrants entered. Diet [$F(2,76) = 4.541$; $p = 0.0137$] and drug [$F(2,76) = 13.65$; $p < 0.0001$] influence was also observed by number of central entries, while time in the central area was influenced by drug [$F(2,67) = 4.759$; $p = 0.0117$] and there was an interaction of factors [$F(4,67) = 3.163$; $p = 0.0193$]. Regarding the diet effect, HHV animals entered more quadrants than HHV ($p < 0.01$) and CV ($p < 0.0001$) and had more central entries than CV ($p < 0.05$). When we analyzed the response to acute fluoxetine administration, CF10 animals had entered fewer quadrants and had fewer central entries than CF1 ($p < 0.01$). Regarding high-fat diet groups, HH10 ($p < 0.01$) and HH1 ($p < 0.05$) animals entered fewer quadrants than HHV, while the HH10 had fewer central entries than HH1 ($p < 0.05$) and HHV ($p < 0.01$) and spent less time in the central area than HH1 ($p < 0.05$). The HH animals did not show any difference in response to fluoxetine in terms of the spatiotemporal parameters (Table 3).

The ethological parameter of time spent in rearing was influenced by diet [$F(2,62) = 8.060$; $p = 0.0008$], drug [$F(2,62) = 25.87$; $p < 0.0001$], and there was an interaction between factors [$F(4,62) = 3.863$; $p = 0.0073$]. Two-way ANOVA indicated significant effect of diet [$F(2,65) = 0.0012$; $p = 0.0012$] and drug [$F(2,65) = 0.013$; $p = 0.0130$] on time spent in grooming in peripheral area. Post-test analysis showed that the HHV ($p < 0.05$) and HHV ($p < 0.01$) groups spent more time in rearing in the peripheral area than CV. Both maternal high-fat diets influenced the response to acute fluoxetine administration while control offspring did not show any difference in rearing. HH10 and HH10 spent less time in rearing than their littermates that had received vehicle ($p < 0.01$, $p < 0.0001$, respectively). The HH10 animals' time spent in rearing was also lower than HH1 ($p < 0.001$). CF10 animals spent more time in grooming than C1 ($p < 0.05$). Furthermore, HH10 spent less time in grooming than CF10 ($p < 0.01$) (Table 3).

There was a significant effect of drug [$F(2,76) = 8.007$; $p < 0.0007$]

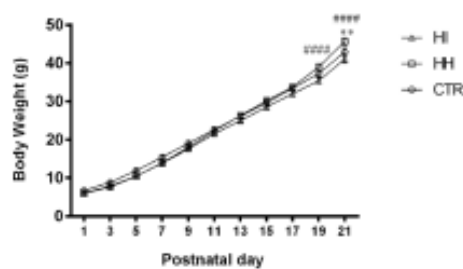


Fig. 2. Offspring body weight evolution during lactation. Body weight from 1st to 21st PND. Pups were fed by mothers submitted to different types of diet during gestation and lactation: Control diet (CTR, $n = 17$), High-fat/High-caloric diet (HH, $n = 14$) or High-fat/Isocaloric (HI, $n = 12$). Values expressed as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA test (diet $\times$ age) repeated measures, followed by Tukey post-test. $p < 0.05$, *vs. CTR; ** vs. HI.

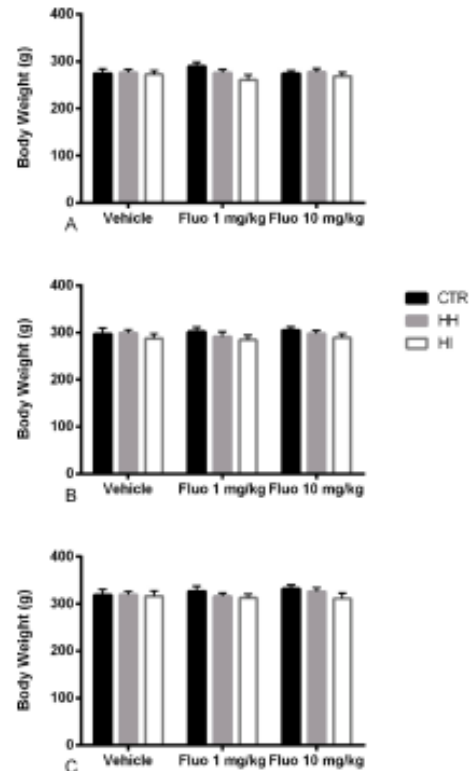


Fig. 3. Offspring body weight post weaning. Body weight at 9th (A), 10th (B) and 11th (C) weeks. Pups were fed by mothers submitted to different types of diet during gestation and lactation. Pharmacological administration was made acutely before exposure to behavioral tests: Control diet (CTR, $n = 17$), High-fat/High-caloric diet (HH, $n = 14$) or High-fat/Isocaloric (HI, $n = 12$). Values expressed as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA test (diet $\times$ drug) repeated measures, followed by Tukey post-test.

and drug $\times$ diet interaction [$F(4,76) = 3.093$; $p < 0.0205$] on the number of fecal boli. Only control animals that had received the highest dose of fluoxetine produced a reduced number of fecal boli compared to CV ($p < 0.01$) and CF1 ($p < 0.001$) animals (Table 3).

3.3. Elevated plus-maze test (EPM)

Two-way ANOVA showed that acute administration of fluoxetine influenced number of total entries [$F(2,75) = 15.43$; $p < 0.0001$] and number of open arms entries [$F(2,75) = 14.70$; $p < 0.0001$]. The number of closed arms entries was influenced by diet [$F(2,74) = 6.739$; $p = 0.0020$] and drug [$F(2,74) = 6.992$; $p = 0.0017$]. When time spent in different EPM areas was evaluated, the drug influenced the percentage of time spent in open arms [$F(2,69) = 5.187$; $p < 0.05$]. Both diet [$F(2,74) = 7.911$; $p = 0.0008$] and drug [$F(2,70) = 12.29$; $p < 0.0001$] influenced percentage of time spent in closed arms, while percentage of time spent in central area was influenced by diet [$F(2,73) = 6.03$; $p < 0.0037$] and there was an interaction of factors [$F(4,73) = 5.943$; $p = 0.0003$] (Table 4).

On the subject of ethological parameters, two-way ANOVA showed that time spent in head-dipping in the unprotected areas was influenced by drug [$F(2,83) = 5.083$; $p = 0.0083$]. Nevertheless, the post-hoc test

Table 3
Spatiotemporal and ethological behaviors displayed by male albino Wistar (N = 100) rats in a 15-min Open Field test.

	Control	HH	HI
Spatiotemporal parameters			
<i>Number of quadrants entered</i> ^d			
Vehicle	56.10 ± 2.397	70.00 ± 5.292	98.57 ± 6.651**
Fluoxetine 1 mg/kg	68.42 ± 2.397	72.40 ± 2.553	68.86 ± 6.638 ^A
Fluoxetine 10 mg/kg	40.22 ± 3.022 ^A	54.00 ± 3.645	63.33 ± 5.533 ^A
<i>Number of central entries</i> ^d			
Vehicle	17.13 ± 0.581	22.00 ± 2.578	29.22 ± 2.360*
Fluoxetine 1 mg/kg	24.00 ± 2.860	23.00 ± 1.880	26.63 ± 2.563
Fluoxetine 10 mg/kg	12.10 ± 0.882 ^A	19.63 ± 1.972	15.11 ± 2.731 ^{AB}
<i>Time spent in central area (s)</i> ^d			
Vehicle	101.3 ± 10.90	128.0 ± 19.74	170.4 ± 20.27
Fluoxetine 1 mg/kg	167.3 ± 21.42	160.1 ± 22.88	216.7 ± 16.36
Fluoxetine 10 mg/kg	157.8 ± 13.05	165.8 ± 17.01	120.0 ± 25.70 ^B
Ethological parameters			
<i>Time spent in rearing in peripheral area (s)</i> ^d			
Vehicle	34.00 ± 4.728	71.14 ± 8.972*	64.63 ± 5.852*
Fluoxetine 1 mg/kg	48.88 ± 4.715	51.57 ± 6.622	74.29 ± 11.53
Fluoxetine 10 mg/kg	26.30 ± 3.113	22.14 ± 4.783 ^A	29.89 ± 5.295 ^{AB}
<i>Time spent in grooming in peripheral area (s)</i> ^d			
Vehicle	60.82 ± 8.371	42.71 ± 14.07	52.57 ± 12.33
Fluoxetine 1 mg/kg	41.56 ± 4.200	25.50 ± 5.628	23.83 ± 2.487
Fluoxetine 10 mg/kg	83.73 ± 9.918 ^A	47.00 ± 13.54	28.86 ± 6.449*
<i>Fecal boli</i> ^d			
Vehicle	5.20 ± 0.573	5.86 ± 0.553	4.67 ± 0.687
Fluoxetine 1 mg/kg	5.80 ± 0.663	5.00 ± 0.447	4.62 ± 0.680
Fluoxetine 10 mg/kg	2.23 ± 0.508 ^{AB}	3.67 ± 0.707	2.23 ± 0.508

Data are presented as mean ± standard error of mean. HH: High-fat/High-calorie diet. HI: High-fat/Isocaloric diet. Two-way ANOVA: *d* influence of maternal diet, *f* influence of acute fluoxetine administration, *i* interaction of factors. Tukey's post hoc test: * vs. Control, # vs. HH, in the same line. A vs. Vehicle, B vs. 1 mg/kg, in the same column. *p* < 0.05.

did not show any difference between groups. Attempts to approach open arms [$F_{diet}(2,74) = 0.7158$; $p = 0.7932$; $F_{drug}(2,74) = 1.282$; $p = 0.2836$; $F_{interaction}(4,74) = 0.4207$; $p = 0.7932$]; time in grooming [$F_{diet}(2,81) = 1.780$; $p = 0.1752$; $F_{drug}(2,81) = 2.744$; $p = 0.0703$; $F_{interaction}(4,81) = 1.456$; $p = 0.2234$], head-dipping in the protected areas [$F_{diet}(2,90) = 0.6266$; $p = 0.5367$; $F_{drug}(2,90) = 1.525$; $p = 0.2233$; $F_{interaction}(4,90) = 1.614$; $p = 0.1775$] and rearing [$F_{diet}(2,87) = 2.366$; $p = 0.0999$; $F_{drug}(2,87) = 0.4460$; $p = 0.6417$; $F_{interaction}(4,87) = 0.3265$; $p = 0.8595$] were not influenced by any factor (Table 4).

Regarding maternal diet influence, the percentage of time spent in closed arms in HHV group was higher than HHV ($p < 0.05$) while the HH10 group spent less time in closed arms than CF10 ($p < 0.0001$). When we analyzed the influence of fluoxetine administration, HH10 rats had fewer total arms entries than HH1 rats ($p < 0.01$), while CF10 and HH10 had fewer open arms entries than their vehicle counterparts ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively). HH animals did not change the number of entries in response to fluoxetine. Only control animals that received the

Table 4
Spatiotemporal and ethological behaviors displayed by male albino Wistar (N = 100) rats in a 5-min Elevated Plus-Maze test.

	Control	HH	HI
Spatiotemporal parameters			
<i>Number of total arms entries</i> ^f			
Vehicle	14.62 ± 1.200	16.44 ± 0.689	15.00 ± 0.845
Fluoxetine 1 mg/kg	16.18 ± 1.278	15.00 ± 1.106	19.00 ± 0.900
Fluoxetine 10 mg/kg	12.36 ± 0.789	12.13 ± 0.610	11.50 ± 1.134 ^B
<i>Number of open arms entries</i> ^f			
Vehicle	5.54 ± 0.434	5.22 ± 1.038	6.86 ± 0.884
Fluoxetine 1 mg/kg	4.17 ± 0.777	4.30 ± 0.857	3.17 ± 0.477
Fluoxetine 10 mg/kg	2.27 ± 0.449 ^A	3.33 ± 0.645	2.33 ± 0.667 ^A
<i>% of open arms entries</i>			
Vehicle	34.70 ± 3.841	32.34 ± 5.106	41.35 ± 3.882
Fluoxetine 1 mg/kg	32.77 ± 2.766	38.30 ± 3.516	31.25 ± 3.444
Fluoxetine 10 mg/kg	28.22 ± 4.034	30.10 ± 3.693	28.22 ± 4.034
<i>Number of closed arms entries</i> ^f			
Vehicle	8.73 ± 0.715	9.444 ± 0.648	9.67 ± 0.7993
Fluoxetine 1 mg/kg	9.73 ± 0.834	10.11 ± 0.484	13.14 ± 0.404
Fluoxetine 10 mg/kg	8.09 ± 0.919	8.250 ± 0.366	10.13 ± 0.718
<i>% of closed arms entries</i>			
Vehicle	65.30 ± 3.841	67.66 ± 5.106	58.65 ± 3.882
Fluoxetine 1 mg/kg	67.23 ± 2.766	61.10 ± 3.516	72.96 ± 3.536
Fluoxetine 10 mg/kg	74.15 ± 4.831	70.68 ± 4.899	71.58 ± 3.796
<i>% of time spent in open arms</i> ^f			
Vehicle	16.51 ± 3.284	14.66 ± 3.425	18.77 ± 4.160
Fluoxetine 1 mg/kg	14.34 ± 2.717	16.98 ± 4.003	14.07 ± 3.498
Fluoxetine 10 mg/kg	9.587 ± 2.119	11.54 ± 2.859	9.587 ± 2.119
<i>% of time spent in closed arms</i> ^f			
Vehicle	50.22 ± 4.511	40.20 ± 2.620	62.89 ± 6.385*
Fluoxetine 1 mg/kg	54.21 ± 3.120	45.00 ± 4.143	47.21 ± 4.889
Fluoxetine 10 mg/kg	73.83 ± 4.177 ^{AB}	53.48 ± 5.394*	64.92 ± 4.271
<i>% of time spent in central area</i> ^d			
Vehicle	27.74 ± 2.002	24.92 ± 2.946	27.08 ± 2.833
Fluoxetine 1 mg/kg	23.52 ± 1.675	26.84 ± 2.899	27.00 ± 1.828
Fluoxetine 10 mg/kg	18.57 ± 2.783	40.55 ± 3.908 ^{AB**}	25.09 ± 3.071
Ethological parameters			
<i>Attempts to approach open arms</i>			
Vehicle	8.20 ± 0.4899	7.714 ± 1.267	6.50 ± 0.8975
Fluoxetine 1 mg/kg	6.077 ± 0.655	6.44 ± 0.8517	6.44 ± 0.7658
Fluoxetine 10 mg/kg	6.889 ± 1.073	7.375 ± 1.438	6.125 ± 0.515
<i>Time spent in rearing in protected areas</i>			
Vehicle	15.85 ± 1.970	14.11 ± 1.744	17.00 ± 1.488
Fluoxetine 1 mg/kg	14.15 ± 1.315	11.64 ± 2.880	19.57 ± 3.291
Fluoxetine 10 mg/kg	13.85 ± 3.186	12.00 ± 2.530	15.40 ± 3.088

(continued on next page)

Table 4 (continued).

	Control	HH	HI
<i>Time spent in grooming in protected areas</i>			
Vehicle	9.000 ± 3.115	2.375 ± 1.117	3.200 ± 1.073
Fluoxetine 1 mg/kg	2.900 ± 1.269	0.40 ± 0.3055	2.286 ± 1.209
Fluoxetine 10 mg/kg	6.154 ± 1.811	8.300 ± 3.187	1.625 ± 1.487
<i>Time spent in head-dipping in protected areas</i>			
Vehicle	6.077 ± 1.323	8.800 ± 2.010	5.800 ± 1.519
Fluoxetine 1 mg/kg	5.231 ± 1.063	3.727 ± 1.342	7.333 ± 2.154
Fluoxetine 10 mg/kg	4.077 ± 0.9836	6.800 ± 2.070	3.60 ± 0.9214
<i>Time spent in head-dipping in unprotected areas^f</i>			
Vehicle	5.833 ± 1.542	6.200 ± 1.298	4.000 ± 1.027
Fluoxetine 1 mg/kg	3.167 ± 0.588	3.000 ± 1.014	4.875 ± 1.827
Fluoxetine 10 mg/kg	1.462 ± 0.452	4.556 ± 1.375	1.40 ± 0.5617

Data are presented as mean ± standard error of mean. HH: High-fat/High-caloric diet. HI: High-fat/isocaloric diet. Two-way ANOVA: *d* influence of maternal diet, *f* influence of acute fluoxetine administration, *i* interaction of factors. Tukey's post hoc test: * vs. Control, # vs. HH, in the same line. A vs. Vehicle, B vs. 1 mg/Kg, in the same column. *p* < 0.05.

highest dose of fluoxetine responded in EPM, increasing percentage of time spent in closed arms compared to vehicle and lowest dose of fluoxetine (*p* < 0.05). Meanwhile only HH animals that received fluoxetine at 10 mg/Kg of body weight increased percentage of time spent in the central area compared to HHV and HH1 animals (*p* < 0.01 and *p* < 0.05, respectively) (Table 4).

3.4. Free-exploratory paradigm test (FEP)

Spatiotemporal parameter two-way ANOVA analysis showed that acute fluoxetine administration influenced total number of units entered [$F(2,73) = 8.343$; *p* = 0.0005] and percentage of familiar area unit entered [$F(2,77) = 6.721$; *p* = 0.0020], although the post-hoc test showed no difference among groups. Regarding ethological parameters, there were interactions of factor in latency to enter the novel area [$F(4,62) = 2.983$; *p* = 0.0256] and in time spent in rearing in the novel area [$F(2,68) = 3.317$; *p* = 0.0153]. Fluoxetine administration decreased time spent in rearing in the novel [$F(2,68) = 3.462$; *p* = 0.0370] and familiar [$F(2,65) = 15.64$; *p* < 0.0001] areas. There was no difference in relative food intake among groups [$F_{\text{diet}}(2,66) = 0.9538$; *p* = 0.3905; $F_{\text{mg}}(2,66) = 0.3939$; *p* = 0.6760; $F_{\text{interaction}}(4,66) = 0.5230$; *p* = 0.7191] (Table 5).

There was no difference among the groups influenced by maternal diet. HH and HI animals did not change their behavior in the free-exploratory paradigm in response to acute fluoxetine administration. The control animals that received the highest dose of fluoxetine, however, spent less time in rearing in the familiar area than those animals that received vehicle (*p* < 0.05). When compared to CF1, CF10 animals spent less time in rearing in both the familiar (*p* < 0.0001) and novel areas (*p* < 0.05) (Table 5).

4. Discussion

We assessed the influence of two maternal high-fat diets with different caloric content and pharmacological acute application of a selective serotonin reuptake inhibitor (fluoxetine) on young-adult offspring behavior in three different behavioral tests: OF, EPM, and

Table 5
Spatiotemporal and ethological behaviors displayed by male albino Wistar (N = 99) rats in a 15-min Free-Exploratory Paradigm test.

	Control	HH	HI
<i>Spatiotemporal parameters</i>			
<i>Total number of units entered^f</i>			
Vehicle	100.7 ± 9.508	100.0 ± 9.503	107.1 ± 6.820
Fluoxetine 1 mg/kg	88.89 ± 9.762	80.00 ± 7.639	106.0 ± 7.639
Fluoxetine 10 mg/kg	63.40 ± 8.870	72.13 ± 6.142	83.00 ± 8.083
<i>% of novel area units entered</i>			
Vehicle	72.54 ± 2.703	73.20 ± 2.578	74.03 ± 3.696
Fluoxetine 1 mg/kg	71.87 ± 3.961	71.40 ± 2.925	75.69 ± 2.289
Fluoxetine 10 mg/kg	81.06 ± 2.714	81.46 ± 2.278	73.38 ± 4.762
<i>% of familiar area units entered^f</i>			
Vehicle	27.46 ± 2.703	26.80 ± 2.578	25.97 ± 3.696
Fluoxetine 1 mg/kg	28.13 ± 3.961	28.60 ± 2.925	24.31 ± 2.289
Fluoxetine 10 mg/kg	20.43 ± 2.513	16.22 ± 3.044	17.83 ± 5.108
<i>Time spent in novel area (s)</i>			
Vehicle	656.4 ± 41.93	756.0 ± 22.95	756.4 ± 27.10
Fluoxetine 1 mg/kg	708.1 ± 57.28	671.0 ± 40.80	774.6 ± 26.87
Fluoxetine 10 mg/kg	686.0 ± 52.90	759.3 ± 24.70	679.1 ± 49.18
<i>% of time spent in novel area</i>			
Vehicle	72.93 ± 4.659	84.00 ± 2.550	84.04 ± 3.019
Fluoxetine 1 mg/kg	78.66 ± 6.365	72.43 ± 4.437	86.06 ± 2.985
Fluoxetine 10 mg/kg	76.22 ± 5.878	84.36 ± 2.744	75.46 ± 5.465
<i>Ethological parameters</i>			
<i>Latency to enter novel areaⁱ</i>			
Vehicle	83.67 ± 17.27	44.88 ± 5.283	75.38 ± 12.68
Fluoxetine 1 mg/kg	61.89 ± 5.839	53.00 ± 10.18	34.88 ± 6.993
Fluoxetine 10 mg/kg	43.67 ± 10.89	54.83 ± 15.09	96.00 ± 32.37
<i>Time spent in rearing in novel area (s)^f</i>			
Vehicle	38.80 ± 7.349	50.00 ± 10.94	38.75 ± 6.296
Fluoxetine 1 mg/kg	53.13 ± 5.540	31.33 ± 2.977	46.86 ± 9.535
Fluoxetine 10 mg/kg	17.83 ± 3.721 ^a	27.71 ± 4.622	44.86 ± 8.007
<i>Time spent in rearing in familiar area (s)^f</i>			
Vehicle	32.20 ± 4.022	28.43 ± 4.498	20.29 ± 6.516
Fluoxetine 1 mg/kg	27.00 ± 2.824	27.89 ± 6.165	29.43 ± 5.209
Fluoxetine 10 mg/kg	7.111 ± 2.182 ^{ab}	6.714 ± 2.368	14.33 ± 5.377

Data are presented as mean ± standard error of mean. HH: High-fat/High-caloric diet. HI: High-fat/isocaloric diet. Two-way ANOVA: *f* influence of acute fluoxetine administration, *i* interaction of factors. Tukey's post hoc test: A vs. Vehicle, B vs. 1 mg/Kg, in the same column. *p* < 0.05.

FEP. OF and EPM evaluate state-anxiety, while FEP assesses trait-anxiety behavior. We chosen two parameters of each test to represent our main results and they are shown in Fig. 4. Caloric content in maternal high-fat diet differently affected offspring behavior in OF and EPM tests, while both diets did not interfere in response at FEP. Thus, high-fat diet groups showed an increase of hyperactivity- and anxiety-related behaviors in OF. Regarding EPM, high-fat groups were different from each other.

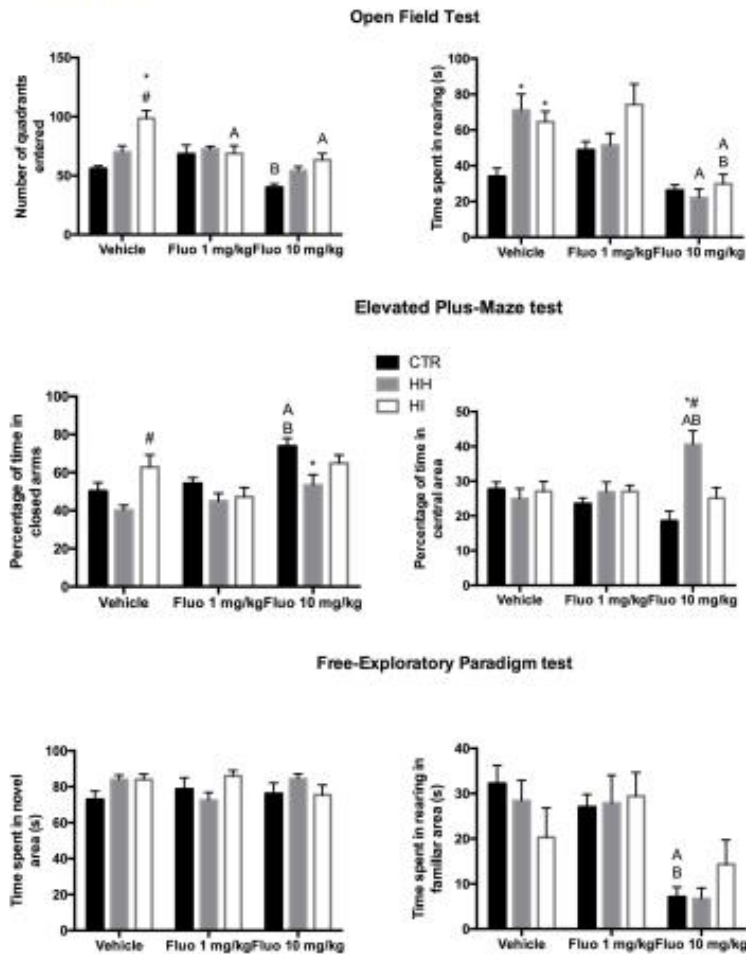


Fig. 4. Main behavioral results. Pups were fed by mothers submitted to different types of diet during gestation and lactation. Pharmacological administration was made acutely before exposure to behavioral tests: Control diet (CTR, $n = 17$), High-fat/High-caloric diet (HH, $n = 14$) or High-fat/Isocaloric (HI, $n = 12$). Values expressed as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA test (diet $\times$ drug), followed by Tukey post-test. * vs. Control, # vs. HH, in the pharmacologic group. A vs. Vehicle, B vs. 1 mg/Kg, in the same dietary group. $p < 0.05$.

Isocaloric offspring showed more anxiety-like behavior than high-caloric offspring. Regarding pharmacological administration, behavioral response depended on the dose applied and the behavioral test evaluated.

As we used a maternal diet manipulation, we accompanied the pup offspring body weight during lactation and then later during pharmacological administration. Pups' body weight was not different at birth. Similarly, other studies with high-fat/high-caloric or high-fat/isocaloric maternal diets also did not observe differences between the experimental and control group at the birth [4,7,8,22]. According to Sasaki, de Vega [9] no differences in body weight at birth suggests that the experimental model does not involve protein restriction, as a high-fat/low protein diet is known to reduce it [23]. HH pups were heavier than CTR and HI pups at the end of lactation. At the same age, maternal exposure to high-fat (high-caloric or isocaloric) diet produced heavier puppies [4,8]. Differences between high-fat groups suggest that, despite having same percentage of lipid, other components of diet may have interfered with the result obtained. Regarding post-weaning body weight, there was no difference between HH, HI and CTR body weight

groups during postnatal days. Other studies have also observed no differences in adolescent or adult offspring body weight [7–9]. Similarity between high-fat diet and control groups body weight in post-weaning period implies that the differences observed in lactation period could be attributed to maternal exposure itself [7,8].

For behavioral analysis, three tests were used, taking into consideration the anxiety type evaluated. Open field and elevated plus maze tests assess state-anxiety and can be characterized by forcing animals into a new environment [24,25]. The free exploratory paradigm, on the other hand, analyzes trait-anxiety and gives animals the opportunity to choose within an environment either familiar or novel areas (neophobic response evaluation) [21]. Beyond conceptual differences, the biological mechanisms behind these two types of anxiety (state and trait) may not be the same [12,26], since anxious response to threat stimuli (state-anxiety) involves the behavioral inhibition system's brain structures, such as the amygdala, pre-frontal cortex, septum, hippocampus, raphe median nucleus, ventral periaqueductal grey matter and locus coeruleus [27,28]. The anxious profile (trait-anxiety), on the other hand, would be related to the orbitofrontal cortex, amygdala and nucleus accumbens

[29–31].

In the OF test, both high-fat groups were more active and presented more anxiety-like behavior than control group. Hyperactivity and anxiety-like behaviors were associated with parameters related to locomotor activity (number of quadrants entered) and exploratory behavior (rearing). HIV entered more quadrants entered than either the HHV or the CV, and spent more time in rearing on peripheral area than the CV. Similarly, HHV spent more time in rearing on peripheral area than CV. However, HIV also made more center entries than CV – usually an anxiolytic-related behavior, although this kind of increase may be a consequence of elevated locomotor activity and not a diet-related anxiolytic response. This interpretation can be reinforced when observing HHV group, where an increased time spent on rearing was not accompanied by a high locomotor activity, or by an elevated number of central entries. Increased distance travelled and/or augmented time spent in rearing and/or elevated average speed has been observed in some studies with maternal high-fat diets [4,9,10,32,33]. On the other hand, decreased locomotor activity [34] or no difference [8] have already been reported by other studies. In the EPM test, which also evaluates state-anxiety, the HIV group spent more time in the closed arm than HHV, with the HIV tending to spend a little more time there than the CV. This parameter is related to scanning and to end-exploring and could be interpreted as a component of anxiety-like behavior [11,35]. Interestingly, increased anxiety-like behavior in EPM has been observed in some studies that used maternal high-fat [36] or high-fat/high-caloric [34] diets, while other works have shown decreased [7] or no difference [37] in anxiety-like behavior in response to high-fat diet. Taken together with our results, we can suggest that differences among the composition of experimental diets, the periods of maternal exposure and offspring evaluation can influence the results observed. Finally, no differences were found in FEP for spatiotemporal or ethological parameters in response to the maternal high-fat diet. Studies investigating an effect of maternal exposure to high-fat diet on FEP were not found up to the point of this writing.

To achieve our second goal, we evaluated the effect of a maternal high-fat diet on the offspring's serotonergic system responsiveness. For this, we used two doses, a well-known dose (10 mg/kg of body weight) [38] and a dose not yet explored in the accessible literature (1 mg/kg of body weight). We observed that acute fluoxetine administration often increased anxiety-like behaviors among the different diet groups, although the results depended on maternal diet, the dosage and which one of the three behavioral tests was being evaluated. Our data revealed that control animals who received the highest dose of fluoxetine entered fewer quadrants, decreased the number of central entries and fecal boli and increased time spent in grooming in OF. This contrasted with those animals that were injected with lower dose. Also, CF10's number of fecal boli was lower than CV. Together these results suggest that CF10 moved less than CF1 and was less emotional than CV and CF1. In a review by Kalueff and Tuohimaa [39], an increased number of fecal boli also characterized animals who displayed more anxiety-related behaviors. Similarly, the number of fecal boli was associated with both locomotor activity and anxiety-like behavior [40]. Furthermore, the increased time spent in grooming observed here (CF10 versus CF1) could also support our interpretation. Previous studies have already shown that grooming activity can be generally increased in two opposite situations: under high- and low-stress conditions [39], differentiated by using the grooming analysis algorithm, a qualitative evaluation of this parameter [For more information see Kalueff and Tuohimaa [39]]. When exposed to spontaneous or low stress conditions, grooming is considered a "comfort activity", being characterized as a transition from rest to activity, and following a cephalocaudal rule [39].

Differently from those subjected to the control diet, the maternal high-fat/isocaloric offspring showed an opposite reaction to fluoxetine in OF. HH10 young-adult rats had fewer central entries, spent less time in the central area and less time in rearing than the HH1. Also, HH10 had fewer quadrant and central entries, and spent less time in rearing than

the HIV. In addition, HH1 entered fewer quadrants than HIV. Together, the data may indicate decreased locomotor activity and exploratory behavior. Nevertheless, we cannot exclude the possible sedative effects of fluoxetine on offspring behavior (HIV vs. HH10), since the decreased number of central entries and less time spent in rearing were accompanied by decreased number of quadrants entered. Regarding high-fat/high-caloric diet, acute administration of fluoxetine revealed a similar effect on offspring behavior when compared to CTR offspring. HH10 spent less time in rearing than HHV, suggesting lower exploratory behavior, a response found in less emotional rats [10].

In EPM, CF10 had a smaller number of open arm entries than CV and spent a higher percentage of time in closed arms than CF1 and CV. Similarly, HH10 animals entered the open arms fewer times than the HIV and had fewer entries than HH1. Taken together, these data suggest that the higher dose of fluoxetine not only impairs locomotor activity but also increases anxiety-related behavior in both dietary groups, given that the total number of entries do not just reflect locomotor activity [41]. In its turn, as observed in percentage of time spent in closed arms for control animals who received fluoxetine in a dose 10 mg/kg of body weight, HH10 animals spent a higher percentage of time in the central area than HHV and HH1, implying an anxiety-like response, since this parameter is a valid anxiety index as demonstrated by Rodgers and Johnson [41]. Other studies also have revealed no response to fluoxetine acute administration [42,43]. This discrepancy may lie in the methodological procedures adopted by each work [43,44]. Finally, in FEP, CF10 spent less time in rearing in the familiar area than CV. Also, CF10 spent less time in rearing in both the familiar and novel areas than the CF1. Reduced time spent in rearing can be interpreted as amelioration of some anxiety-like measures [10]. Some other works have also shown an anxiety-like behavior response to fluoxetine in a dose dependent manner when animals were exposed to FEP [12,45].

As maternal high-fat diet only affected the response in OF and EPM tests, this suggests that this influence could be related to state-anxiety. Furthermore, our results revealed that calorie content may play a role in the influence of a maternal high-fat diet on offspring behavior since the HIV group revealed a behavioral profile slightly different from HHV in the open field test. It should be noted that to obtain an isocaloric diet, it was necessary to use a large amount of cellulose. Although we did not find any study about the role of insoluble fiber on animal behavior, we cannot exclude that the amount of cellulose used could contribute to our results. Similarly, CD-1 offspring exposed to isocaloric maternal high (n-6) polyunsaturated fatty acids (PUFA), in which the calorie content was adjusted by using fiber (alphacel), showed increased locomotor activity in the open field [32]. Although the source of lipid is not the same, it has been shown that n-6 PUFA also has pro-inflammatory effects [46].

Therefore, to assess whether an environmental insult acts on state anxiety or trait anxiety, assessment of parameters associated with related-brain structures provides valuable data. For example, a high-fat/high-glucose protocol showed that adult male offspring had less serotonin in the hippocampus and cerebral cortex [47]. Moreover, adult male offspring exposed indirectly to a high-fat/high-caloric before and during lactation periods revealed an elevated 5-HT_{1A} receptor gene expression in ventral hippocampus [5]. In addition, a non-human primate study, showed that offspring exposed to a maternal high-fat diet during gestation had an increased gene expression of rate-limiting enzyme for serotonin synthesis, the tryptophan hydroxylase 2 (TPH2), and enhanced expression of 5-HT_{1A} inhibitory self-receptors in rostral nucleus of raphe, the first hypothalamic source of 5-HT [48,49]. Thus, increased anxiety-like behavior in the state-anxiety tests, as observed in the present study, may be associated with deregulation of the serotonergic system.

5. Conclusion

In summary, we observed that the maternal diet only influenced offspring response to the state-anxiety test. Both high-fat groups were

hyperactive and had an anxiety-like phenotype when compared to control group on the open field test. On the elevated plus-maze, the high-fat/isocaloric offspring showed increased anxiety-like behavior when compared to high-fat/high-caloric offspring. When pharmacological administration was evaluated, control, high-fat/high-caloric, and high-fat/isocaloric groups revealed decreased emotional behavior on the open field test and increased anxiety-like behavior on the elevated-plus maze test. Only the control group responded to pharmacological administration on the free exploratory paradigm test, being less emotional. Thus, our data showed that increased lipid content in the maternal diet modulates offspring behavior and serotonergic system responsiveness in state anxiety tests. Caloric content, however, influenced the role that diet has on offspring behavior, although it does not affect the response to the drug. Regarding trait anxiety test, both high-fat/high-caloric and high-fat/isocaloric diets revealed decreased responsiveness to the drug.

CRedit authorship contribution statement

Carolina Cadete Lucena Cavalcanti: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. Raquel Da Silva Aragão: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Resources, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. Erika Vanesa Cadena-Burbano: Investigation. Thaynan Raquel dos Prazeres Oliveira: Investigation. Jacqueline Maria Silva: Investigation. Raquel de Arruda Campos Benjamin: Investigation. Amanda Braz Lago: Investigation. Eric Henrique Moraes Silva: Software, Data curation. Thuan Lamienha Costa: Validation. Raul Manhães-De-Castro: Resources, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgments

Carolina Cadete Lucena Cavalcanti (IBPG-0417-4.05/ 15) and Thaynan Raquel dos Prazeres Oliveira (IBPG-1367-4.05/15) received master fellowships from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brazil), Erika Vanesa Cadena Burbano (CEI-P40078955) received a master fellowship from Instituto Ecuatoriano de Crédito Educativo y Becas (IECE, Ecuador), Jacqueline Maria Silva (132514/2016-8) received a master fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Finance code 001), FACEPE (APQ-0201-4.05/14,) and CNPq (408506/2016-4).

References

- [1] E.P. de Oliveira, R.C. McAllan, L. Van de Arruda Silveira, R.C. Barini, Dietary factors associated with metabolic syndrome in Brazilian adults, *Nutr. J.* 11 (2012) 15.
- [2] M.J. Siqueira, *Vigilant Brazil 2018: Surveillance of Risk and Protective Factors for Chronic Diseases by Telephone Survey: Estimates of Prevalence and Sociodemographic Distribution of Risk and Protective Factors for Chronic Diseases in the Capitals of the 26 Brazilian States and the Federal District in 2018*, 2018, Organization WHI, Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates, 2017.
- [3] E.V. Cadena-Burbano, C.C.L. Cavalcanti, A.B. Lago, R.A.C. Benjamin, T. Oliveira, J.M. Silva, et al., A maternal high-fat/high-calorie diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats, *Nutr. Neurosci.* 22 (2) (2019) 98–109.
- [4] D. Peleg-Rambin, E. Luca, C. Wullimann, Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood, *Behav. Brain Res.* 233 (2) (2012) 398–404.
- [5] M.T. Ramirez-Lopez, M. Vazquez, L. Binslis, E. Lemazzo, C. Hofmann, R.N. Sileanu, et al., Exposure to a highly caloric palatable diet during pregestational and gestational periods affects hypothalamic and hippocampal endocannabinoid levels at birth and induces adiposity and anxiety-like behaviors in male rat offspring, *Front. Behav. Neurosci.* 9 (2015) 339.
- [6] A. Sasaki, W. de Vega, S. Sivasubhan, S. Se-Cyr, P.D. McGowan, Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring, *Neuroscience* 272 (2014) 92–101.
- [7] A. Sasaki, W.C. de Vega, S. Se-Cyr, P. Pan, P.D. McGowan, Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood, *Neuroscience* 240 (2013) 1–12.
- [8] G. Balazs, V. Baumann, A. Uribe, A. Chen, M.V. Schmidt, Prenatal exposure to maternal obesity alters anxiety and stress coping behaviors in aged mice, *Neuropsychopharmacology* 103 (3–4) (2016) 354–368.
- [9] S.S. Kang, A. Kuri, D.A. Fair, J.D. Fryer, Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring, *J. Neuroinflammation* 11 (2014) 156.
- [10] Y. Clement, C. Joubert, C. Kopp, E.M. Lepicard, P. Vessali, R. Maudin, et al., Anxiety in mice: a principal component analysis study, *Neural Plast.* 2007 (2007) 35457.
- [11] T.H. Almeida-Souza, T.C. Goes, F. Teixeira-Silva, Pharmacological validation of the free-exploratory paradigm in male Wistar rats: a proposed test of trait anxiety, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 133 (2015) 114–120.
- [12] E. Isgrini, V. Camus, A.-M. Le Guisquet, M. Pingaud, S. Devaux, C. Belzung, Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice, *PLoS One* 5 (4) (2010) e10494.
- [13] J. Zemdegs, G. Quenzerwar, D. Jarrinath, L. Pericoud, X. Fumaz, R.P. Guard, High-fat diet-induced metabolic disorders impair 5-HT function and anxiety-like behavior in mice, *Br. J. Pharmacol.* 173 (13) (2016) 2095–2110.
- [14] *Care for Animals, Animals Unit, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National, 1986.
- [15] P.G. Reeves, F.H. Nielsen, G.C. Fahey Jr., AIN-93 Purified diets for laboratory rodents final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, *J. Nutr.* 123 (11) (1993) 1939–1961.
- [16] T. Oliveira, R. Manhães-de-Castro, J.M. Silva, E.V. Cadena-Burbano, C.C. L. Cavalcanti, R.A.C. Benjamin, et al., Differential effects of maternal high-fat/high-calorie or isocaloric diet on offspring's skeletal muscle phenotype, *Life Sci.* 215 (2018) 136–144.
- [17] S. Sanchez, C. Sanchez, S.D. Paredes, J. Calero, A.B. Rodriguez, C. Barriga, Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of rats, *Mol. Cell. Biochem.* 317 (1–2) (2008) 105–111.
- [18] J. Liu, J.C. Garza, J. Brenner, C.S. Kim, W. Zhang, X.Y. Lu, Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: a comparison with fluoxetine, *Psychopharmacology (Berl.)* 207 (4) (2010) 535–545.
- [19] R. da Silva Aragão, M.A.B. Rodrigues, K.M.F.T. de Barros, S.H.F. Silva, A. E. Tozcano, R.E. de Souza, et al., Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents—a reproducibility study, *J. Neurosci. Methods* 195 (2) (2011) 216–221.
- [20] F. Teixeira-Silva, F.D. Antunes, P.R.S. Silva, T.C. Goes, E.C. Dantua, M.P. Santiago, et al., The free-exploratory paradigm as a model of trait anxiety in rats: test-retest reliability, *Physiol. Behav.* 96 (4–5) (2009) 729–734.
- [21] C.A. Griko, C.A. Andreoli, L.V. Menniti, L.F. Honório, S. Souto Tdon, A.V. Silva, et al., Delayed physical and neurobehavioral development and increased aggressive and depression-like behaviors in the rat offspring of dams fed a high-fat diet, *Int. J. Dev. Neurosci.* 31 (8) (2013) 731–739.
- [22] C. Mendes-da-Silva, C.A. Griko, L.V. Menniti, L.F. Honório, S. Souto Tdon, A.V. Silva, Maternal high-fat diet during pregnancy or lactation changes the somatic and neurological development of the offspring, *Arg. Neuropsychiatr.* 72 (2) (2014) 136–144.
- [23] G. Griebel, C. Belzung, E. Maudin, E. Vogel, The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs, *Behav. Pharmacol.* 4 (6) (1993) 637–644.
- [24] D.F. Avramis, T.V. Lipina, N.P. Baidar, O.V. Abukayir, N. N. Kudryavtseva, Features of the genetically defined anxiety in mice, *Behav. Genet.* 30 (2) (2000) 101–109.
- [25] D. Treit, E. Ergon, K. McEwen, *Animal Models of Anxiety and Anxiolytic Drug Action*, Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment, Springer, 2009, pp. 121–160.
- [26] M. Davis, Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle, *Am. Psychol.* 61 (8) (2006) 741–750.
- [27] J. Gray, M. McNaughton, *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-hippocampal System*, 2nd edn. ed, Oxford University Press, Oxford, 2000.
- [28] N.H. Kalin, S.E. Shelton, R.J. Davidson, Role of the primate orbitofrontal cortex in mediating anxious temperament, *Biol. Psychiatry* 62 (10) (2007) 1134–1139.
- [29] K. Blackmon, W.B. Barr, C. Carlson, O. Devinsky, J. Daffos, D. Popadi, et al., Structural evidence for involvement of a left amygdala-orbitofrontal network in subclinical anxiety, *Psychiatry Res.* 194 (3) (2011) 296–303.
- [30] S. Kuhn, F. Schubert, J. Gallinat, Structural correlates of trait anxiety: reduced thickness in medial orbitofrontal cortex accompanied by volume increase in nucleus accumbens, *J. Affect. Disord.* 134 (1–3) (2011) 315–319.
- [31] M. Baygözü, E. Cho, L. Hilakivi-Clark, High maternal intake of polyunsaturated fatty acids during pregnancy in mice alters offspring's aggressive behavior, immobility in the swim test, locomotor activity and brain protein kinase C activity, *J. Nutr.* 128 (12) (1998) 2505–2511.

- [33] K.C. Fago, E.K. Jones, E.K. Anday, Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 306 (8) (2014) R527–37.
- [34] Z. Yan, F. Jiao, X. Yan, H. Ou, Maternal chronic folate supplementation ameliorates behavior disorders induced by prenatal high-fat diet through methylation alteration of BDNF and Grin2b in offspring hippocampus, *Mol. Nutr. Food Res.* 61 (12) (2017).
- [35] A.F. Cruz, F. Frei, F.G. Graeff, Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49 (1) (1994) 171–176.
- [36] J. Zieba, G.M. Uddin, N.A. Youngson, T. Karl, M.J. Morris, Long-term behavioural effects of maternal obesity in C57BL/6J mice, *Physiol. Behav.* 199 (2019) 306–313.
- [37] J.S. Rodriguez, G.L. Rodriguez-Gonzalez, L.A. Reyes-Castro, C. Iñiguez, A. Ramirez, R. Chavira, et al., Maternal obesity in the rat programs male offspring exploratory, learning and motivation behavior: prevention by dietary intervention pre-gestation or in gestation, *Int. J. Dev. Neurosci.* 30 (2) (2012) 75–81.
- [38] L. Prut, C. Belzung, The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behavior: a review, *Eur. J. Pharmacol.* 463 (1–3) (2003) 3–33.
- [39] A.V. Kalashev, P. Tuzhima, The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research, *J. Neurosci. Methods* 143 (2) (2005) 169–177.
- [40] V. Carola, F. D'Olimpio, E. Brunamonti, F. Margia, P. Renzi, Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice, *Behav. Brain Res.* 134 (1–2) (2002) 49–57.
- [41] R.J. Rodgers, N.J. Johnson, Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52 (2) (1995) 297–303.
- [42] T. Sorregotti, J. Mendes-Gomes, J.L. Rico, R.J. Rodgers, R.L. Nunes-de-Souza, Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice, *Behav. Brain Res.* 246 (2013) 76–85.
- [43] R. Rodrigues-Filho, R.N. Takahashi, Antinociceptive effects induced by desipramine and fluoxetine are dissociated from their antidepressant or anxiolytic action in mice, *Int. J. Neuropsychoph.* 2 (4) (1999) 263–268.
- [44] G. Griebel, C. Cohen, G. Perrault, D.J. Sanger, Behavioral effects of acute and chronic fluoxetine in White-Kyoto rats, *Physiol. Behav.* 67 (3) (1999) 315–320.
- [45] C. Belzung, A.M. Le Guisquet, S. Barreau, F. Calatayud, An investigation of the mechanisms responsible for acute fluoxetine-induced anxiogenic-like effects in mice, *Behav. Pharmacol.* 12 (3) (2001) 151–162.
- [46] G. Schmitz, J. Ecker, The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids, *Prog. Lipid Res.* 47 (2) (2006) 147–152.
- [47] B. Martin, M. Pearson, L. Kebejian, E. Golden, A. Kesselman, M. Bender, et al., Sex-dependent metabolic, neuroendocrine, and cognitive responses to dietary energy restriction and excess, *Endocrinology* 148 (9) (2007) 4318–4333.
- [48] E.L. Sullivan, B. Gruyssen, D. Takahashi, N. Robertson, A. Maier, C.L. Bethua, et al., Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring, *J. Neurosci.* 30 (10) (2010) 3826–3830.
- [49] J.O. Willoughby, W.W. Blewett, Origin of serotonergic innervation of the arcuate and ventromedial hypothalamic region, *Brain Res.* 418 (1) (1987) 170–173.