

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

CAROLINA CADETE LUCENA CAVALCANTI

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DUAS DIETAS MATEERNAS HIPERLIPÍDICAS
COM DIFERENTES TEORES CALÓRICOS SOBRE A SENSIBILIDADE DO
SISTEMA SEROTONINÉRGICO NA PROLE ADULTO-JOVEM**

**RECIFE
2017**

CAROLINA CADETE LUCENA CAVALCANTI

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DUAS DIETAS MATERNAS HIPERLIPÍDICAS
COM DIFERENTES TEORES CALÓRICOS SOBRE A SENSIBILIDADE DO
SISTEMA SEROTONINÉRGICO NA PROLE ADULTO-JOVEM**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do Título de Mestre em Neurociência. Área de concentração: Neurociências.

Orientador: Prof^o Dr^o Raul Manhães de Castro. Professor Titular do Departamento de Nutrição da UFPE.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel da Silva Aragão. Professora Adjunta C-I do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão CAV-UFPE.

**RECIFE
2017**

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- C376e Cavalcanti, Carolina Cadete Lucena.
Estudo da influência de duas dietas maternas hiperlipídicas com diferentes teores calóricos sobre a sensibilidade do sistema serotoninérgico na prole adulto-jovem / Carolina Cadete Lucena Cavalcanti. – 2017.
80 f.: il.; 30 cm.
- Orientador: Raul Manhães de Castro.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2017.
- Inclui referências e anexos.
1. Dieta hiperlipídica. 2. Nutrição materna. 3. Comportamento animal. 4. Fluoxetina. I. Castro, Raul Manhães de (Orientador). II. Título.
- 612.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2017-261)

CAROLINA CADETE LUCENA CAVALCANTI

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DUAS DIETAS MATERNAS HIPERLIPÍDICAS
COM DIFERENTES TEORES CALÓRICOS SOBRE A SENSIBILIDADE DO
SISTEMA SEROTONINÉRGICO NA PROLE ADULTO-JOVEM**

Dissertação aprovada em 16/08/2017

Prof^ª. Dr^ª. Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro
Núcleo de Enfermagem – CAV / UFPE

Prof^ª Dr^ª. Kelli Nogueira Ferraz Pereira Althoff
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte - CAV/ UFPE

Dra. Tássia Karin Ferreira Borba
Departamento de Nutrição / UFPE

RECIFE

2017

*Dedico este estudo aos **meus pais (Durval e Danielle)**, que me fizeram lembrar que por pior que seja a tempestade, é sempre possível cantar e dançar na chuva. Ao meu **chato irmãozinho (Victor Dituito)** que, de sua maneira nada doce, mas muito adorável, me disse que só não vai dar certo quando não der certo. Até lá, não custa nada tentar. E ao meu **irmãozinho de quatro patinhas (Wintinho)**, o companheiro das madrugadas em claro.*

Agradecimentos

Aos meus **Pais (Durval e Danielle)** e ao meu **irmão (Victor)** que me fazem lembrar todos os dias que “as estrelas não podem brilhar sem a escuridão”. Ao meu **irmãozinho de quatro patinhas (Wintinho)** por me fazer companhia madrugada adentro. O abraço de vocês é meu porto seguro.

A minha **Tia Norminha** por me ajudar em momentos tão importantes do mestrado. Espero ser um dia, 1/3 da pesquisadora incrível que você é.

A **Rinaldo, o Homem do Crachá sempre no bolso**, que por destino, acaso ou pelo casamento dos dois, me trouxe até o grupo do professor Raul.

Ao Professor **Raul Manhães de Castro** por me dar a oportunidade de conhecer o mundo da pesquisa e de trabalhar com profissionais tão competentes. Agradeço também pelas vezes que o senhor reservou um pedacinho de seu tempo para conversar comigo quando a desesperança me desanimava.

A Professora **Raquel(is) Aragão** por todo os ensinamentos dos últimos cinco anos. Com a sua ajuda, consegui superar algumas manias (as mãos fechadas não contam) e percebi a importância de ser sempre mais leve e o valor de acreditar em si mesma (ok. Ainda estou trabalhando nessa última parte). Agradeço também por me mostrar a beleza que existe por trás da ciência (e dos ratinhos) e por me orientar, não apenas na parte experimental, mas também na parte teórica. Aprendi muito com você e fico até sem palavras “poéticas” para demonstrar o quanto sou grata. Muito obrigada!

Ao **Dr. Edeones França** por me ensinar sobre o cuidado para com os animais e por me fazer lembrar que toda a vida (da vida animal a humana) deve ser bem vivida.

A minha dupla de biotério e amiga de vida, **Erika Cadena**. Sem você, seria muito mais difícil ultrapassar a linha de chegada. Agradeço por me ensinar sobre comprometimento, responsabilidade e organização (você sabe que sou a desorganização em pessoa, ou era a desorganização em pessoa, ainda não sei). Sou grata também pela amizade que construímos nesses dois últimos anos. Tornou todos os momentos que passamos de domingo a domingo mais divertidos e menos cansativos. Estendo essa gratidão também a **Fábio**. Não há nada melhor do que crepe Recife sem azeitona no Ponto Açai com vocês **dois** depois de um fim de semana no biotério.

A **Thaynan Oliveira** e a **Jacqueline Silva** por toda a troca dos últimos anos. Foi muito bom poder aprender, crescer e amadurecer com vocês. Tão bom quanto foi cair na risada em todo final de tarde depois dos experimentos. Eu não sei se era o cansaço ou se as situações eram realmente tão engraçadas como eu me lembro, mas valeu a pena cada segundo. Ao noivo de Thaynan, **Eric**, por desenvolver um programa que atendesse as nossas necessidades. Sua colaboração foi imprescindível para chegarmos onde estamos.

As estagiárias **Raquel Benjamim** e **Amanda Braz** por dividirem conosco as tarefas do biotério nesses últimos dois anos. Foi muito bom poder compartilhar essas experiências com vocês e conhece-las melhor na bateria de experimentos.

Ao meu melhor amigo camarada, **Allan Lira**, por tornar o dia-a-dia no biotério inesquecível e por me fazer rir até não aguentar mais com as histórias mais engraçadas do mundo (pobre senhorinha da sopa). Agradeço também por você ter pintado um dos paradigmas. Pintar os dois teria sido horrível. A **Jéssica Fragoso** por me apresentar e me ensinar sobre a rotina do biotério, e por reforçar a beleza que é fazer pesquisa com roedores. Agradeço também pela amizade. Fez toda diferença. A **Tássia Borba** por ser para mim o que a **Dançarina** é para a **Menina**. Nada melhor do que poder trocar contigo experiências nos intervalos dos experimentos e ouvir “agora pode soltar”. A gente aprende muito com o outro, né? A **Henrique Josué** e a **Bárbara Rodrigues** pelos bons momentos em meio ao cansaço (incluindo os incontáveis sustos desse último ano) e pelas histórias compartilhadas que ficarão guardadas na memória até o tempo descansar. Agradeço também pela ajuda nos dias dos testes comportamentais e por todas as vezes que eu não precisei carregar o paradigma. A **Manuella da Luz** e a **Diego Lacerda** por me ajudarem na preparação das minhas primeiras aulas. Foi muito mais fácil superar o medo quando vocês estavam presentes. Agradeço também pelas trocas nos desencontros do multiusuário.

As minhas amigas do mestrado/ melhores espiãs demais da federal (**Maria Clara** e **Mariane**) por serem a Alex e a Clover da minha Sam. Nunca me esquecerei de Murilinho e de nossos momentos de gargalhadas. As aulas da pós não teriam sido tão divertidas sem vocês.

As minhas amigas D-I-V-I-N-A-S (**Bebels**, **Julleba**, **Yana**, **Tamara** e **Pâmella**) por todos os momentos de cumplicidade e companheirismo. Não há nada melhor do que nossas saídas estilo quinta série nas brechas da correria. Tão bom quanto é soltar a voz e desafinar no karaokê depois de um dia inteiro na federal. Não sei o que seria de mim se não fossem vocês.

As minhas amigas de infância (**Bibi**, **Carol** e **Bru**) por preencherem meus momentos livres com risadas e histórias memoráveis. Agradeço também por todas as vezes que nos encontramos na entrada/saída do prédio, quando mesmo apressadas para ir ou vir, paramos e compartilhamos tantas conversas felizes. O que é acompanhar as falas de Sherlock? Ou ouvir Sakura dizendo “ai, ai, ai, Yukito”?

Aos meus médicos **Amanda Sales** e **José Waldo Câmara** por me ajudarem em momentos tão difíceis, em que a ansiedade deixava tudo mais sufocante. Sem vocês, a estrada teria sido muito mais tortuosa.

A **Arte**, porque, como disse a **Sabedoria** a **Menina** uma vez, “a arte tem a função de preencher os vazios deixados pela vida”.

E ao **Céu** que, por vezes, foi fonte inesgotável de esperança.

“No one is moved to act, or resolves to speak a single word, who does not hope by means of this actions or word to release anxiety from de spirit” – Ali ibn Hazm (Escola Árabe)

Resumo

A exposição materna a dieta hiperlipídica durante os períodos de gestação e lactação pode alterar o comportamento associado à ansiedade da prole. Apesar disso, a influência que a dieta rica em lipídios tem sobre a resposta do sistema serotoninérgico aos fármacos ainda não está clara. Por isso, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência de duas dietas maternas hiperlipídicas com diferentes teores calóricos sobre a responsividade do sistema serotoninérgico avaliados a partir de parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade em ratos adultos jovens. Para isso, foram utilizadas 43 ratas da linhagem Wistar. Após a confirmação da gestação, as fêmeas foram divididas em três grupos, sendo classificadas de acordo com a dieta recebida durante a gestação e lactação, o controle (CTR=17), o hiperlipídico/isocalórico (DHI=12) e o hiperlipídico/hipercalórico (DHH=14). O peso corporal foi registrado a cada dois dias durante as três semanas da lactação e no 30°, 45°, 60° e 70° dia no período pós-desmame. Após o desmame, todos os animais receberam a dieta padrão do biotério. Para os procedimentos experimentais, apenas filhotes machos foram utilizados. Na nona semana pós-natal, cada grupo formado pela manipulação nutricional foi subdividido em três grupos de acordo com a manipulação farmacológica recebida: veículo, fluoxetina 1mg/kg e fluoxetina 10mg/kg. Considerando as duas manipulações (nutricional materna e farmacológica na prole), foram formados nove grupos experimentais. São eles: Controle – Veículo (CV, n=13); Controle – Fluoxetina 1mg (CF1, n=13); Controle – Fluoxetina 10mg (CF10, n=14); Hiperlipídico/Isocalórico – Veículo (HIV, n=11); Hiperlipídico/Isocalórico – Fluoxetina 1mg (HIF1, n=9); Hiperlipídico/Isocalórico – Fluoxetina 10mg (HIF10, n=10); Hiperlipídico/Hipercalórico – Veículo (HHV, n=11); Hiperlipídico/Hipercalórico – Fluoxetina 1mg (HHF1, n=11); Hiperlipídico/Hipercalórico – Fluoxetina 10mg (HHF10, n=10). Os machos foram expostos ao campo aberto (CA), ao labirinto elevado em cruz (LEC) e ao paradigma da exploração livre (PEL), enquanto eram filmados por uma câmera digital acoplada a um computador. A análise dos vídeos foi feita com auxílio de um cronômetro desenvolvido pelo próprio grupo de pesquisa. Ademais, foi registrado o peso corporal e o consumo durante esse período. Durante a lactação, filhotes do grupo DHH apresentaram maior peso corporal do que filhotes do grupo CTR no 21° dia pós-natal e do que filhotes DHI no 19° e 21° dia pós-natal. No campo aberto, o grupo CF10 apresentou menor número de bolos fecais do que os grupos CV e CF1. No labirinto elevado em cruz, por sua vez, o grupo CF10 expressou mais comportamentos associados à ansiedade do que os grupos CV (diminuição do número de entradas nos braços abertos, aumento do tempo e porcentagem de tempo nos braços fechados e diminuição da porcentagem de tempo na área central) e CF1 (diminuição do tempo de permanência nos braços fechados). Houve aumento da expressão de parâmetros relacionados ao comportamento ansioso para ratos HI10 em relação aos grupos HIV (diminuição do número de entradas e da porcentagem de tempo nos braços abertos) e HI1 (aumento do tempo de permanência nos braços fechados e do número total de entradas nos braços do labirinto). O grupo HI1 também apresentou menor porcentagem de tempo nos braços abertos do que o grupo HIV. Ademais, o grupo HH10 dispendeu mais tempo na área central do que o grupo HI10; e o grupo HHV obteve menor porcentagem de tempo nos braços fechados do que o grupo HIV. Por fim, no paradigma da exploração livre, o grupo CF10 demorou menos tempo para adentrar o ambiente novo do que o grupo CV. Em suma, ratos jovem-adultos DHH, nos três aparatos, e DHI, no campo aberto e no paradigma da exploração livre, foram resistentes à ação do fármaco, sugerindo diminuição da responsividade dos receptores serotoninérgicos as diferentes doses de fluoxetina.

Palavras-chaves: Dieta Hiperlipídica. Nutrição Materna. Comportamento Animal. Fluoxetina.

Abstract

Maternal exposure to a high-fat diet through gestation and lactation may alter the offspring anxiety-like behavior. Despite this, an influence of maternal high fat diet on offspring's serotonergic system response to drugs is not yet clear. Therefore, the general objective of this work is to evaluate the influence of two maternal high-fat diets with different caloric contents on the responsiveness of the serotonergic system to anxiety-like behavior in young adult rats. For this, 43 Wistar rats were used. After confirmation of gestation, females were divided into three groups, classified according to the diet received during gestation and lactation, control (CTR = 17), hyperlipid/isocaloric (DHI = 12) and hyperlipid/hypercaloric (DHH = 14). Body weight was recorded every two days through lactation and at the 30th, 45th, 60th and 70th day of life. After weaning, all animals received a standard diet until the end of experiments. For the experiments, only male were used. At the ninth postnatal week, each group formed by nutritional manipulation was subdivided into three groups according to pharmacological manipulation: vehicle, fluoxetine 1mg/kg and fluoxetine 10mg/kg. Considering as two manipulations (maternal nutrition and pharmacological in the offspring), nine experimental groups were formed: Control - Vehicle (CV, n = 13); Control - Fluoxetine 1mg (CF1, n = 13); Control - Fluoxetine 10mg (CF10, n = 14); Hyperlipid/Isocaloric - Vehicle (HIV, n = 11); Hyperlipid/Isocaloric - Fluoxetine 1mg (HIF1, n = 9); Hyperlipid/Isocaloric - Fluoxetine 10mg (HIF10, n = 10); Hyperlipid/Hypercaloric - Vehicle (HHV, n = 11); Hyperlipid/Hypercaloric - Fluoxetine 1mg (HHF1, n = 11); Hyperlipid/Hypercaloric - Fluoxetine 10mg (HHF10, n = 10). The males were exposed to open field (OF), elevated plus maze (EPM) and free exploratory paradigm (FEP), while being filmed by a digital camera coupled to a computer. The analyses were performed with the help of a timer developed by the research group itself. In addition, body weight and consumption were recorded during this period for FEP. During lactation, pups from the DHH group presented higher body weight than the CTR pups on the 21st postnatal day and then the DHI pups on the 19th and 21st postnatal days. In the open field, the CF10 group has lower number of fecal *boli* than the CV and CF1 groups. In the elevated plus maze, the CF10 group expressed more anxiety-like behavior than the CV (decreased number of entries in the open arms, increased time and percentage of time in the closed arms and decreased percentage of time in the central area) and CF1 groups (decreased length of stay in the closed arms). There was an increase in the expression of anxiety-related behavior for HI10 rats in relation to HIV (decreased number of entries and percentage of time in open arms) and HI1 groups (increased length of stay in the closed arms and number of total number of entries in the labyrinth arms). HI1 group also had a lower percentage of time in the open arms than the HIV group. In addition, the HH10 group spent more time in the central area than the HI10 group; and the HHV group had a lower percentage of time in the closed arms than the HIV group. Finally, in free exploratory paradigm, the CF10 group took less time to join the new environment than the CV group. In summary, rats from DHH, in all three tests, and from DHI, in open field and free exploratory paradigm, were resistant to the action of the drug, suggesting a decrease in the response of serotonergic receptors to different doses of fluoxetine.

Key words: Maternal High Fat Diet. Perinatal Exposure. Animal Behavior. Fluoxetine.

Sumário

1	Introdução.....	12
2	Revisão de literatura.....	14
2.1	Ansiedade.....	14
2.2	Sistema serotoninérgico.....	23
2.3	Dieta hiperlipídica e desenvolvimento da prole.....	30
3	Hipótese.....	38
4	Objetivos.....	39
4.1	Objetivo geral.....	39
4.2	Objetivos específicos.....	39
5	Métodos.....	40
5.1	Questões éticas.....	40
5.2	Animais.....	40
5.3	Manipulação nutricional.....	41
5.4	Manipulação farmacológica.....	42
5.5	Desenho experimental.....	43
5.6	Testes comportamentais.....	43
5.6.1	Campo aberto.....	44
5.6.2	Labirinto elevado em cruz.....	44
5.6.3	Paradigma da exploração livre.....	45
5.7	Análise estatística.....	46
6	Resultados.....	47
6.1	Peso corporal durante a lactação.....	47
6.2	Peso corporal pós-desmame.....	47
6.3	Consumo alimentar pós-desmame.....	48
6.4	Peso corporal durante as semanas de aplicação de fluoxetina.....	49
6.5	Número de bolos fecais no campo aberto.....	49
6.6	Número total de entradas nos braços do labirinto elevado em cruz.....	50
6.7	Entradas nos braços abertos e fechados.....	51
6.8	Permanência nos braços abertos e fechados e na área central.....	51
6.9	Tentativas de aproximação dos braços abertos.....	54
6.10	Latência para entrar no ambiente novo.....	54

6.11	Consumo alimentar no paradigma da exploração livre.....	55
7	Discussão	56
8	Considerações finais.....	65
	Referências.....	66
	Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	79
	Anexo B – Análise das dietas hiperlipídicas.....	80

1 Introdução

O início da vida, período correspondente à gestação, lactação e primeira infância é marcado por um conjunto de eventos importantes para o desenvolvimento da prole (DOBBING, 1965; RICE e BARONE JR, 2000; MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002; ANDERSEN, 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 JR, 2000). Por isso, qualquer insulto que atue durante essa fase do desenvolvimento pode alterar a maneira como a prole se desenvolve (DOBBING, 1965; MORGANE *et al.*, 1993). No que diz respeito à nutrição materna, a exposição a uma dieta balanceada durante a fase inicial da vida 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).

Com relação ao comportamento ansioso, estudos com roedores já destacaram a importância da nutrição materna, da prática de exercícios físicos e do ajuste do tamanho de ninhada durante o período perinatal (DIMITSANTOS *et al.*, 2007; WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT, 2011; KANG *et al.*, 2014; MUNIZ *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016a). Segundo Lader (1972), a ansiedade é um fenômeno ubíquo a todos os dias de vida (LADER, 1972), sendo necessário para adaptação do indivíduo ao meio em que vive (BELZUNG e GRIEBEL, 2001). A ansiedade torna-se anormal quando ocorre sem razão clara e objetiva ou quando as manifestações são excessivas em intensidade e duração, sendo intoleráveis para o indivíduo (LADER, 1972; HOEHN-SARIC, 1982). Por trás dessas manifestações, alterações nos sistemas de neurotransmissão (como, por exemplo, gabaérgico, noradrenérgico e serotoninérgico) estão entre os fatores capazes de modular o comportamento ansioso (HOEHN-SARIC, 1982).

Pesquisa com roedores, por exemplo, já demonstraram que a exposição à dieta hiperlipídica materna é capaz de alterar o comportamento emocional da prole (WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT, 2011; PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; BELLISARIO *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). O efeito ansiolítico ou ansiogênico dessas dietas podem estar relacionados 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.*, 2016a). São eles: exacerbação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA); aumento da expressão de receptores mineralocorticoides e glicocorticoides em

diferentes regiões do encéfalo; expressão aumentada dos fatores pró-inflamatórios; exposição elevada a leptina; níveis reduzidos dos principais endocanabinóides e alteração da expressão dos receptores GABAérgico e serotoninérgicos no encéfalo (SASAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014; PRIOR *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016a).

Apesar de todo conhecimento disponível na literatura a respeito do papel da dieta hiperlipídica materna sobre o desenvolvimento da prole, algumas lacunas permanecem em branco. Estudos com roedores que elucidem a influência da nutrição materna rica em lipídios sobre a sensibilidade/resistência dos receptores serotoninérgicos aos fármacos antidepressivos, como a fluoxetina, não são de nosso conhecimento. Tal abordagem se faz necessária devido à transição do perfil nutricional observada no cenário mundial, caracterizado pela elevada 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 (BRASIL, 2017), o mesmo acontece para o número de casos de pessoas com depressão ou algum transtorno ansioso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Portanto, é possível que o ambiente nutricional a que o paciente foi exposto no início da vida possa influenciar a maneira como ele responde a esses fármacos, sendo mais ou menos resistente a eles. Já foi observado, por exemplo, que camundongos BALB/c, quando expostos a dieta hiperlipídica e ao estresse crônico amento repetido durante o período pós-desmame, foram mais resistentes à aplicação crônica de fluoxetina (ISINGRINI *et al.*, 2010). Camundongos C57/B16 adultos, por sua vez, apresentaram diminuição da serotonina extracelular no hipocampo ventral e resposta acentuada a um agonista do auto-receptor 5-HT_{1A}, o que pode ser consequência da expressão ou função elevada desses auto-receptores na rafe (ZEMDEGS *et al.*, 2016). Ademais, estudo com primatas não humanos, expostos indiretamente a dieta hiperlipídica materna, revelou aumento da expressão gênica da enzima limitante da serotonina, a triptofano hidroxilase 2, e dos auto-receptores 5-HT_{1A} no núcleo rostral da rafe, sugerindo perturbação do sistema serotoninérgico (SULLIVAN *et al.*, 2010). Tais resultados reforçam que a exposição materna à dieta hiperlipídica durante o período perinatal pode alterar a sensibilidade aos fármacos. Além disso, trabalhos que façam distinção entre o efeito da gordura e da caloria ainda são escassos na literatura (CAN *et al.*, 2012a; RODRIGUEZ *et al.*, 2012; SASAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016a).

2 Revisão da 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 e NETO, 1996). Esse estado emocional é geralmente direcionado ao futuro e, às vezes, considerado desproporcional a uma ameaça real (LADER, 1972; GENTIL e NETO, 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 a 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 e NETO, 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 e NETO, 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 e NETO, 1996).

Além disso, a ansiedade pode ser dividida em dois subtipos, a ansiedade-estado e a ansiedade-traço (SPIELBERGER e SPIELBERGER, 1966). A primeira refere-se a um estado emocional passageiro, de intensidade variável, experimentado em um momento particular do tempo (ANDRADE e GORENSTEIN, 1998; GAMA *et al.*, 2008). A ansiedade-estado pode ser influenciada por um estímulo externo e é caracterizada por sentimentos subjetivos de tensão e apreensão (ANDRADE e GORENSTEIN, 1998; TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2004; GAMA *et al.*, 2008). Segundo Endler e Kocovski (2001), a ansiedade-estado apresenta duas facetas (características próprias): preocupação cognitiva e emoção autonômica (ENDLER e KOCOVSKI, 2001). A ansiedade-traço, por outro lado, é relativamente estável ao longo do tempo e é uma característica pessoal do indivíduo, que o leva a responder a situações estressantes com ansiedade (GAMA *et al.*, 2008; TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2009). Indivíduos com traço ansioso tendem a perceber um número maior de situações como ameaçadoras, sendo elas reais ou não (SPIELBERGER e SPIELBERGER, 1966). A ansiedade-traço é muito comum em pacientes com algum tipo de transtorno ansioso (LEWIS, 1967; TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2009). Esse subtipo apresenta, pelo menos, quatro facetas (ou

características próprias): avaliação social, perigo físico, ambiguidade e rotinas diárias (ENDLER e KOCOVSKI, 2001).

Além das diferenças conceituais, tem sido sugerido que a origem e os mecanismos biológicos por trás desses dois tipos de ansiedade (estado e traço) podem não ser os mesmos (LISTER, 1990). Isso porque a resposta ansiosa a estímulos de ameaça (ansiedade-estado) envolve estruturas cerebrais do sistema de inibição comportamental, como amígdala, septo, hipocampo, núcleo mediano do rafe, substância cinzenta periaquedutal ventral e locus coeruleus (BRANDÃO *et al.*, 2003; DAVIS, 2006). O perfil ansioso (ansiedade-traço), por sua vez, estaria relacionado ao córtex orbitofrontal, a amígdala e ao núcleo accumbens (KALIN *et al.*, 2005; KALIN, SHELTON e DAVIDSON, 2007; BLACKMON *et al.*, 2011; KUHN, SCHUBERT e GALLINAT, 2011; ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015). Por isso, é aceitável acreditar que uma droga eficaz em reduzir a ansiedade-estado em seres humanos submetidos a situações ameaçadoras, pode não ser eficiente para a redução da ansiedade duradoura, característica de pacientes cronicamente ansiosos (ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015). Portanto, os modelos experimentais que visam validar medicamentos contra ansiedade, precisam primeiro definir qual dos dois tipos de ansiedade está sendo testado e depois escolher qual dos modelos descrito na literatura será utilizado (TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2004; GOES *et al.*, 2014; ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015).

Quando a ansiedade torna-se 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) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). No capítulo de transtornos ansiosos, estão descritos 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 (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Além disso, o transtorno bipolar, a esquizofrenia e os transtornos depressivos podem estar acompanhados de características ansiosas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; ARAÚJO e LOTUFO NETO, 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 ansioso aumentou 14,9%, atingindo 3,6% da população global (264 milhões de pessoas) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Segundo a OMS, esse aumento está relacionado ao crescimento e ao envelhecimento populacional (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Além disso, o relatório destaca que os transtornos de ansiedade acometeram homens (2,6%) e mulheres (4,6%) em proporções diferentes (WORLD HEALTH 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 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Ademais, os transtornos de ansiedade aparecem em 6º lugar na listagem de doenças não fatais que contribuem para perda de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Em terras brasileiras, os transtornos ansiosos alcançam 9,3% da população, mais de 18 milhões de pessoas (WORLD HEALTH 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%) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017), pois o Brasil lidera a listagem com a maior porcentagem de pessoas que sofrem algum transtorno de ansiedade (WORLD HEALTH 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 às vivenciadas em situações ansiogênicas (HALL, 1934; HUGHES, 1965; 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 construto (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 a semelhança entre a etiologia e aos 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).

Dentre os testes comportamentais validados, existem aqueles capazes de identificar a ansiedade-estado e aqueles usados para avaliar a ansiedade-traço (HALL, 1934; HUGHES, 1965; 1968; THIEBOT *et al.*, 1973; CRAWLEY e GOODWIN, 1980; PELLOW *et al.*, 1985; PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012). Com relação aos modelos experimentais capazes de detectar a ansiedade-estado, destacam-se: teste em campo aberto, labirinto elevado em cruz, caixa de transição claro-escuro, *Staircase* 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, a ansiedade é induzida 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 YU e EFIMOV, 1989; 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 YU e EFIMOV, 1989; 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 a ansiedade (MARKEL, GALAKTIONOV YU e EFIMOV, 1989; 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*, (lambar/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). Isso quer dizer que os critérios selecionados podem traduzir ansiedade, exploração vertical, tomada de decisão, avaliação de risco e atividade locomotora (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).

Um terceiro 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 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* (exploração vertical sobre duas patas) sem reduzir, no entanto, o número de degraus escalados (THIEBOT *et al.*, 1973). Embasado nesses resultados, foi proposto que o número

de *rearing* (comportamento vertical sobre duas patas) 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 ansioso do animal (SIMIAND, KEANE e MORRE, 1984). No estudo, o uso de benzodiazepinas também diminuiu o número *rearing* (exploração vertical sobre duas patas) sem alterar a quantidade de degraus subidos (SIMIAND, KEANE e MORRE, 1984). Em outro trabalho, contudo, o número de *rearings* (exploração vertical sobre duas patas) 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 maior 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, 1965; 1968). Desenvolvido por Hughes (1965), 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, 1965). No caso do citado trabalho, o autor pretendeu avaliar a influência da privação alimentar sobre a atividade locomotora do rato branco (HUGHES, 1965). 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, 1965). 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, 1965). 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 (1993b) sugeriram que o aparato desenvolvido por Hughes poderia ser um método eficiente para estudar a ansiedade-traço (GRIEBEL *et al.*, 1993b). 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.*, 1993b). Em estudo mais recente sobre os componentes de análise, Clément e colaboradores (2007) sugeriram que o PEL poderia fornecer informações sobre ansiedade, 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 da ansiedade, estímulos, tanto externos quanto internos, são decisivos para a resposta do animal (LADER, 1972; GENTIL e NETO, 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 e NETO, 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 ansioso. 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; ROSEBOOM *et al.*, 2006; DIMITSANTOS *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 Sistema serotoninérgico

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 a 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).

A serotonina (5-HT) é uma amina biogênica derivada da hidroxilação e descarboxilação do aminoácido L-triptofano (MOHAMMAD-ZADEH, MOSES e GWALTNEY-BRANT, 2008). 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, a produção de serotonina é localizada principalmente nos neurônios pré-sinápticos (neurônios catecolaminérgicos, serotoninérgicos e neurônios da glândula pineal) dos núcleos da rafe no tronco cerebral (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964; MARTINOWICH e LU, 2008). Os núcleos da rafe apresentam projeções ascendentes de fibras serotoninérgicas inervando o prosencéfalo e fibras descendentes que se estendem até o bulbo raquidiano e a medula espinhal (DAHLSTRÖM e FUXE, 1964). 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 da serotonina sobre a ansiedade (RAMBOZ *et al.*, 1996; 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 papéis distintos dependendo do tipo de receptor estudado, da região do cérebro avaliada e da idade do animal utilizado (RAMBOZ *et al.*, 1996; 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, 4 e 7 (TURCO, 2013). O trabalho desenvolvido pelo grupo de Li (2012) com camundongos adultos (56 dias) injetados com um adenovírus recombinante encontrou papel ansiolítico para o auto-receptor 5-HT_{1A} no núcleo central e basomedial da amígdala (LI *et al.*, 2012). Isso porque a diminuição da 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 dos níveis do auto-receptor 5-HT_{1A} na vida adulta não alterou os níveis de ansiedade (RICHARDSON-JONES *et al.*, 2010). Esse resultado pode sugerir, segundo os autores, que o auto-receptor teria papel fundamental durante o desenvolvimento, no estabelecimento do circuito da ansiedade, e não na vida adulta (RICHARDSON-JONES *et al.*, 2010).

Estudos com o receptor 5-HT_{1B} 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 auto-receptor 5-HT_{1B} foram menos ansiosos 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 da função do transportador da serotonina (SERT) (NAUTIYAL *et al.*, 2016). Por fim, a resposta ansiolítica a depleção do auto-receptor 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 (1996) não observaram resposta ansiolítica de camundongos mutantes sem o receptor 5-HT_{1B} (RAMBOZ *et al.*, 1996). 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.*, 1996). 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 aumento dos comportamentos relacionados à menor ansiedade (KJAERBY *et al.*, 2016). Essa resposta ansiolítica poderia ser consequência da supressão do “*input*” do hipocampo ventral para o córtex pré-frontal medial (KJAERBY *et al.*, 2016).

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 a ansiedade poderia estar relacionada a 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, foram mais ansiosos no labirinto elevado em cruz e no campo aberto (LI *et al.*, 2012).

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 a 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 a 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). Porém, quando o antagonista foi associado à fluoxetina, o efeito ansiolítico observado no grupo exposto a fluoxetina não foi observado (MENDEZ-DAVID *et al.*, 2014).

Por fim, o receptor 5-HT₇, assim com o subtipo 4, ainda não foi muito estudado quanto ao seu papel sobre a 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; GUSCOTT *et al.*, 2005; HEDLUND *et al.*, 2005; WESOLOWSKA *et al.*, 2006; ABBAS *et al.*, 2009; SARKISYAN, ROBERTS e HEDLUND, 2010)]. O único estudo encontrado para ansiedade mostrou que camundongos adultos da linhagem albina Swiss (24-28g) foram menos ansiosos para algumas doses do antagonista SB269970 (0,5 mg/kg e 1 mg/kg) (WESOLOWSKA *et al.*, 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 0,5mg/kg (WESOLOWSKA *et al.*, 2006).

Como demonstrado acima, a procura pelo papel dos receptores serotoninérgicos sobre a ansiedade motiva a comunidade científica (RAMBOZ *et al.*, 1996; PINHEIRO *et al.*, 2002; WESOLOWSKA *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2010; RICHARDSON-JONES *et al.*, 2010; CHEGINI, NASEHI e ZARRINDAST, 2014; MENDEZ-DAVID *et al.*, 2014; VICENTE e ZANGROSSI, 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 recaptção da serotonina (NADAL-VICENS, CHYUNG e TURNER, 2008).

Com relação aos inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRS), 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 ISRS (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 da 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) foram mais ansiosos 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) foram mais ansiosos (BELZUNG *et al.*, 2001). Foi observada diminuição na proporção de tempo gasto nas unidades novas do teste e redução do 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 do tempo total e da 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 (2009), 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 10mg/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 (0,5mg/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 (5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/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 (10mg/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 (10mg/kg/dia e 20mg/kg/dia durante 10 dias) apresentaram aumento de comportamento relacionado a 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 da ansiedade no labirinto elevado em cruz, diminuindo o tempo gasto nos braços abertos, o número de head-dippings (movimento descendente da cabeça para fora dos braços abertos) (AMODEO *et al.*, 2015). No estudo de Durand e colaboradores (1999), o tratamento com fluoxetina (5mg/kg/dia) durante 13 dias alterou a resposta ansiosa da linhagem WKY, 30 horas depois da aplicação (56-63 dias) (DURAND *et al.*, 1999). Houve diminuição do número total de entradas nos braços do labirinto e aumento do número de

entradas nos braços fechados, indicando menor locomoção e maior ansiedade, respectivamente (DURAND *et al.*, 1999). O aumento da ansiedade também foi observado em ratos Sprague-Dawley (250-275g) submetidos à fluoxetina 10mg/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 ansiosas 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) foi ansiolítica (GRIEBEL *et al.*, 1999). Tal resultado foi expresso pela diminuição do 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). O estudo desenvolvido por Sorregotti e colaboradores (2013) com camundongos Swiss adultos (25-35g) também observou diminuição da ansiedade (SORREGOTTI *et al.*, 2013). O tratamento com dose de fluoxetina 20mg/kg/dia durante 15 dias foi capaz de aumentar o número de *head-dippings* (movimento descendente da cabeça para fora dos braços abertos) (SORREGOTTI *et al.*, 2013). Por fim, a aplicação de dose 18mg/kg/dia de fluoxetina durante 20 dias em camundongos BALB/c adultos (75-90 dias) aumentou a expressão de comportamentos associados a menor ansiedade, 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 (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) (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). Mas 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.

2.3 Dieta hiperlipídica materna e desenvolvimento da prole

O início da vida – gestação, lactação e primeira infância - é marcado por uma série precisa e sincronizada de eventos que permite o desenvolvimento adequado do animal (DOBBING, 1965; RICE e BARONE JR, 2000; MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002; ANDERSEN, 2003). Portanto, qualquer insulto que venha a interferir no desdobramento dessa sequência de acontecimentos pode acarretar em alterações permanentes na estrutura e função do indivíduo (DOBBING, 1965; 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 são susceptíveis a fatores intrínsecos e extrínsecos (DOBBING, 1965; ANDERSEN, 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 do período perinatal para o desenvolvimento da prole (WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT, 2011; CAN *et al.*, 2012a; PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; BALSEVICH *et al.*, 2016a). Contudo, muitas vezes os resultados dos trabalhos são contraditórios, visto que as dietas utilizadas para explorar o tema não são totalmente padronizadas (WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT, 2011; CAN *et al.*, 2012a; PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; BALSEVICH *et al.*, 2016a). Ademais, os períodos de intervenção também variam entre os trabalhos, gerando resultados que podem diferir entre a literatura (SASAKI *et al.*, 2013; BELLISARIO *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2014; RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015; BALSEVICH *et al.*, 2016a).

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 (CAN *et al.*, 2012a; RODRIGUEZ *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015; BALSEVICH *et al.*, 2016a). 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; CAN *et al.*, 2012a; PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; GIRIKO *et al.*,

2013; SASAKI *et al.*, 2013; BELLISARIO *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2014; PERANI *et al.*, 2015; OHLAND *et al.*, 2016).

Dentre os aspectos estudados, a influência que a dieta com alto teor de lipídios tem sobre o comportamento dos filhotes na adolescência ou na vida adulta revela resultados contraditórios entre os trabalhos dispostos na literatura (WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT, 2011; KANG *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). A exposição materna a dieta com alto teor de lipídio antes e durante a gestação resultou em resposta mais ou menos ansiosa dependendo do sexo e da idade dos filhotes avaliados (BELLISARIO *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016b). O estudo desenvolvido por Bellisario e colaboradores (2014) com camundongos, por exemplo, obteve perfis comportamentais distintos para machos e fêmeas (entre P84 e P97) do grupo hiperlipídico (proteína 16,4%, lipídio 58%, 5,56 kcal) (BELLISARIO *et al.*, 2014). No labirinto elevado em cruz, os machos foram considerados mais ansiosos, pois passaram mais tempo imóveis e em *self-grooming* (lamber/coçar) (BELLISARIO *et al.*, 2014). As fêmeas, por outro lado, exibiram menor comportamento relacionado à ansiedade, passando menos tempo em *self-grooming* (lamber/coçar) (BELLISARIO *et al.*, 2014). No estudo de Balsevich e colaboradores (2016b), camundongos (C57BL/6J) adultos jovens (P90) de mães expostas à dieta hiperlipídica (lipídio 58% de kcal) foram menos ansiosos (BALSEVICH *et al.*, 2016b). Isso porque os animais despenderam mais tempo e entraram mais vezes nos braços abertos do labirinto (BALSEVICH *et al.*, 2016b). De maneira contrária, em adultos velhos (P365) do mesmo grupo experimental, o efeito da dieta foi avaliado como ansiogênico (BALSEVICH *et al.*, 2016b). Essa resposta foi expressa pelo aumento do tempo gasto nos braços fechados e pela diminuição do número de entradas nos braços abertos do aparato (BALSEVICH *et al.*, 2016b).

Os efeitos da manipulação nutricional materna antes da concepção até o final da lactação também foi influenciado pelo sexo e pela idade dos animais (RODRIGUEZ *et al.*, 2012; SASAKI *et al.*, 2014). Ratos adolescentes (entre P35 e 45) de mães expostas à dieta rica em lipídio (proteína 20%, lipídio 60%, 5,24 Kcal) expressaram aumento de comportamentos associados a menor ansiedade (SASAKI *et al.*, 2014). Machos e fêmeas exibiram maior número de entradas na área central do campo aberto, as fêmeas entraram mais vezes nos braços abertos do labirinto elevado em cruz e os machos despenderam mais tempo na área clara da caixa de transição claro-escuro (SASAKI *et al.*, 2014). De maneira contrária, em outro estudo com ratos jovens (entre P49 e P62), a exposição materna a dieta rica em

lipídio (proteína 23,5%, lipídio 25%, 4,9 kcal) aumentou o número de entradas na área periférica no campo aberto (RODRIGUEZ *et al.*, 2012).

Animais adultos (P90) provenientes de mães que receberam dieta hiperlipídica (proteína 20%, lipídio 60%, 5,24 Kcal, antes da gestação até o fim da lactação) apresentaram, no campo aberto, menor tempo no centro (SASAKI *et al.*, 2013). No labirinto elevado em cruz, por sua vez, houve menor número de *head entries* (tentativas de aproximação dos braços abertos) para ambos os sexos e as fêmeas entraram menos vezes nos braços abertos (SASAKI *et al.*, 2013). Por fim, na caixa de transição claro-escuro, o número de bolos fecais foi maior para o grupo hiperlipídico (SASAKI *et al.*, 2013). Em conjunto, esses animais apresentaram mais comportamentos relacionados à ansiedade (SASAKI *et al.*, 2013). No estudo de Peleg-Raibstein e colaboradores (2012) (camundongo - lipídio 60% Kcal), filhotes também adultos (P90) foram mais ansiosos (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012). Nesse caso, tal resultado foi traduzido pelo teste de neofobia alimentar, em que animais do grupo hiperlipídico aumentaram a latência para consumir alimentos novos (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012).

A exposição materna (camundongo C57BL/6J) à dieta hiperlipídica (proteína 20%, lipídio 60% kcal, 5,24 kcal) somente durante a gestação e a lactação resultou em filhotes adolescentes (entre P32 e P35) com maior ansiedade (KANG *et al.*, 2014). Machos e fêmeas passaram mais tempo em *rearing* (exploração vertical sobre duas patas) e as fêmeas exibiram proporção entre distância percorrida no centro e distância total no campo aberto reduzida (KANG *et al.*, 2014). Quando a manipulação nutricional materna foi feita durante o conjunto gestação/lactação e o período pós-desmame, o estudo de Can e colaboradores (2012a) corrobora o efeito ansiogênico da dieta hiperlipídica (*Sprague-Dawley* - lipídio 65% Kcal) (CAN *et al.*, 2012b). Os filhotes, quando submetidos ao labirinto elevado em cruz (P119), apresentaram menor porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos (CAN *et al.*, 2012b).

Estudos com dieta de cafeteria (DC), também ricas em lipídio, ajudam a fomentar as discussões a respeito do papel da nutrição materna sobre o desenvolvimento da prole (WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT, 2011; RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). Wright, Langley-Evans e Voigt (2011) observaram efeito ansiolítico em filhotes (P70) de mães expostas a dieta de cafeteria durante períodos diferentes (WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT, 2011). Fêmeas de mães sujeitas a DC antes e durante a gestação, e fêmeas expostas a DC antes do acasalamento até o final da lactação gastaram menos tempo em *grooming* (lamber/coçar) no labirinto elevado em cruz (WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT,

2011). Machos e fêmeas de mães expostas a DC durante a gestação e a lactação, por sua vez, passaram menos tempo em *rearing* (exploração vertical sobre duas patas) no campo aberto (WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT, 2011). Ademais, as fêmeas também despenderam menor quantidade de tempo em *grooming* (lamber/coçar) (WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT, 2011). O trabalho de Ramírez-López, também com dieta de cafeteria (proteína 6%, lipídio 24,45% g/g), entretanto, apresentou aumento dos comportamentos relacionados a ansiedade (RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). Ratos (P49-62) do grupo de mães expostas à dieta de cafeteria entraram mais vezes e passaram mais tempo nos braços fechados; e gastaram menos tempo nos braços abertos do labirinto (RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). Ademais, os mesmos filhotes gastaram menos tempo no centro do campo aberto (RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015).

Como pôde ser visto acima, os efeitos da exposição materna a dietas ricas em lipídios sobre o comportamento da prole variam de trabalho para trabalho (WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT, 2011; CAN *et al.*, 2012a; PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; RODRIGUEZ *et al.*, 2012; SASAKI *et al.*, 2013; BELLISARIO *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015; BALSEVICH *et al.*, 2016a). 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.*, 2016a). É sabido, por exemplo, que a exposição a situações estressantes ativam 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.*, 2014); 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.*, 2014). 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.*, 2014). Ademais, filhotes machos exibiram corticosterona basal atenuada (SASAKI *et al.*, 2013).

A exacerbção do eixo HPA citada acima está relacionada ao aumento da expressão de receptores específicos em regiões do encéfalo (SASAKI *et al.*, 2013). O receptor mineralocorticoide (RM) 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 (RG), 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 observada nos testes comportamentais poderia ser explicado pelo aumento dos RG no hipocampo desses animais (SASAKI *et al.*, 2014). Nos animais adultos (P90) do grupo hiperlipídico, o aumento dos comportamentos relacionados a maior ansiedade pode ser correlacionado a expressão elevada de RM e de RG na amígdala (SASAKI *et al.*, 2013). O aumento da expressão desses receptores em diferentes estruturas do encéfalo e sua associação com os níveis de ansiedade precisam, entretanto, 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 indicaram aumento dos comportamentos ansiosos (BALSEVICH *et al.*, 2016a).

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 do cérebro (SORRELLS *et al.*, 2009). Para que isso aconteça, no entanto, o aumento da 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 maior ansiedade em descendentes de mães expostas a dieta hiperlipídica (SASAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014). O aumento da IL-6 pode estar associado ao aumento do fator de transcrição nuclear kappa β (NkF- β) e a não inibição do NkF- 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 microgliciais, 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 da transcrição do fator NkF- β e da IL-6 em ambos os sexos e do IkB- α em machos no hipocampo sugeriram diminuição dos comportamentos associados a ansiedade (SASAKI *et al.*, 2014). A diminuição da expressão dos receptores antagonistas de

IL-1 em fêmeas e do fator NkF- β em machos e fêmeas na amígdala também dão suporte 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 detrimenais 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 da expressão do BDNF no hipocampo dorsal (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012). Tal aumento é expresso através de perfis mais ansiosos 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 contribuinte para o aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade (BELLISARIO *et al.*, 2014). 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 de ansiedade (PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). Com relação ao sistema endocanabinóide, a diminuição do 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 da 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 ansioso (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 não são de nosso conhecimento. 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 da 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 do nível basal de serotonina no hipocampo ventral (HPC) (ZEMDEGS *et al.*, 2016). Como os auto-receptores 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 auto-receptores 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 da enzima limitante para síntese de serotonina, a triptofano hidroxilase 2 (TPH2) e da expressão dos auto-receptores 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, é possível hipotetizar que descendentes de mães que foram expostas a dietas hiperlipídicas durante o período perinatal podem ser mais resistentes à ação do fármaco. Essa ideia torna-se mais interessante enquanto acompanhamos a mudança do perfil nutricional ocorrida no Brasil e no mundo, em que há ingestão elevada de gorduras saturadas e açúcares refinados (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012). Ademais, além do aumento do consumo de lipídios, há ainda o crescimento no número de casos de pessoas com depressão ou com algum tipo de transtorno ansioso (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Em suma, a manipulação nutricional materna durante o período crítico pode alterar o comportamento da prole (WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT, 2011; CAN *et al.*, 2012a; PELEG-RAIBSTEIN, LUCA e WOLFRUM, 2012; RODRIGUEZ *et al.*, 2012;

RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). A maneira como essas alterações ocorrem, entretanto, ainda não está clara aos olhos dos pesquisadores (SASAKI *et al.*, 2013; BELLISARIO *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2014; PRIOR *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016a). Como foi descrito acima, os protocolos experimentais adotados variaram desde a manipulação nutricional (fontes de nutrientes, composição, período de exposição) até a avaliação comportamental (idade, experimento, parâmetros) produzindo resultados, às vezes, controversos. Por isso, antes de assumir como verdade este ou aquele resultado, é necessário que novas pesquisas sejam feitas, integrando comportamento, fisiologia, bioquímica, etc. a fim de preencher o maior número de lacunas possível e, quem sabe assim, responder os questionamentos existentes.

3 Hipótese

Filhotes adultos jovens de mães expostas à dieta hiperlipídica/hipercalórica ou à dieta hiperlipídica/isocalórica, durante os períodos de gestação e lactação, são mais resistentes à ação aguda de um inibidor seletivo da recaptção da serotonina (fluoxetina) sobre comportamentos relacionados à ansiedade.

4 Objetivos

4.1 Geral

Avaliar a influência de duas dietas maternas hiperlipídicas com diferentes teores calóricos sobre a responsividade do sistema serotoninérgico avaliada a partir de parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade em ratos adultos jovens.

4.2 Específicos

Avaliar em ratos provenientes de ninhadas expostas a diferentes dietas:

- Evolução do peso corporal;
- Consumo alimentar pós-desmame;
- Resposta à aplicação aguda de diferentes doses de um inibidor seletivo de recaptção de serotonina (fluoxetina) sobre comportamentos relacionados a ansiedade:
 - Número de bolos fecais no campo aberto.
 - Número de entradas, tempo e porcentagem de tempo nas áreas do labirinto e o número de tentativas de aproximação dos braços abertos.
 - Latência para entrar no ambiente novo e consumo alimentar no paradigma da exploração livre.

5 Métodos

5.1 Questões éticas

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), processo 23076.049825/2015-39 (ANEXO A). A manipulação e os cuidados para com os animais seguiram as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal (CONCEA).

5.2 Animais

Foram utilizadas 43 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) não possuir parentesco familiar, 2) estar entre 90-120 dias de vida, 3) pesar entre 220-250 gramas e 4) ser nulípara. Tais cuidados foram adotados para minimizar possíveis influências genéticas e fisiológicas nos resultados. (BENTO-SANTOS *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 12/12h [ciclo claro (20:00h as 08:00h) e ciclo escuro (08:00h as 20:00h)]. 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 (50x36x15cm) 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 com peso entre 4,5 e 8,5 g. A ninhada foi ajustada para oito filhotes e as fêmeas foram utilizadas para completa-la quando necessário. Filhotes supranumerários foram sacrificados por decapitação. Os neonatos foram amamentados durante os 21 dias pós-natal (período de lactação), sendo expostos indiretamente às dietas experimentais através do leite materno. 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 do biotério (Presence – Purina®, Brasil). Para os procedimentos experimentais só foram considerados os filhotes machos.

5.3 Manipulação nutricional

Para a manipulação dietética, foram utilizadas três dietas: a dieta controle (n=17), proposta por Reeves, Nielson e Fahey (1993), e duas dietas experimentais hiperlipídicas confeccionadas em parceria com o Laboratório de Nutrição Experimental e Dietética (LNED) do Departamento de Nutrição da UFPE, a dieta hiperlipídica hipercalórica (n=14) e a dieta hiperlipídica isocalórica (n=12) (adaptada de DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO (1997)). A diferença entre as dietas está no teor de lipídio e caloria. A composição centesimal e de macronutrientes das dietas está disposta nas tabelas abaixo:

Tabela 1. Composição centesimal das dietas experimentais.

Ingredientes	Controle	Hiperlipídica	Hiperlipídica
	AIN-93G	Isocalórica	Hipercalórica
	(g/100g)*	(g/100g)	(g/100g)
Caseína (>85% proteína)	20,00	20,00	25,20
Amido de milho (87% carboidrato)	39,75	19,30	24,50
Amido dextrinizado (92% carboidrato)	13,20	6,40	8,00
Sacarose	10,00	4,85	6,17
Óleo de soja	7,00	7,00	7,00
Banha animal (100% lipídeo)	-	13,40	19,00
Celulose	5,00	24,00	5,00
Mix mineral (AIN-93G)	3,50	3,50	3,50
Mix vitamínico	1,00	1,00	1,00
L-Metionina	0,30	0,30	0,38
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25
TBHQ	0,0014	0,0014	0,0014
Calorias (g/100g)	3,60	3,64	4,62

Fonte: *Adaptado de Reeves, Nielsen e Fahey (1993). Os cálculos da composição centesimal foram baseados nas informações nutricionais enviadas pela empresa fornecedora dos produtos.

Tabela 2. Composição de macronutrientes das dietas segundo o Valor Energético Total (VET).

VET por Macronutrientes	Controle	Hiperlipídica	Hiperlipídica
	AIN-93G	Isocalórica	Hipercalórica
VET (kcal/g)	3,60	3,64	4,62
Proteína (% kcal VET)	19	19	19
Carboidrato (% kcal VET)	63	30	30
Lipídeo (% kcal VET)	18	51	51

O teor e a composição bioquímica dos ácidos graxos das dietas foram analisados e atestados pelo Laboratório de Análise de Planta, Ração e Água (LAPRA) do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA (ANEXO B).

Tabela 3. Composição de macronutrientes da dieta pós-desmame (Presence – Purina®)

Macronutrientes	Dieta padrão de biotério		
	g	kcal	Kcal%
Proteína	23	92	26
Carboidrato	58	36	64
Lipídeo	4	232	10
Total	18	360	100
Kcal/g		3,6	

5.4 Manipulação Farmacológica

Na nona semana pós-natal (ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015), cada grupo formado pela manipulação nutricional foi subdividido em três subgrupos, de acordo com a manipulação farmacológica recebida durante três semanas consecutivas. As administrações ocorreram sempre de forma aguda, das 09:00 às 10:00, 30 minutos antes dos testes comportamentais (GRIEBEL *et al.*, 1999; DRAPIER *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010; SORREGOTTI *et al.*, 2013). O horário das aplicações foi definido de acordo com a mudança de ciclo de luz do biotério, pois o pico de serotonina em regiões do encéfalo, como cerebelo, hipocampo e hipotálamo, ocorre duas horas depois do apagar das luzes (MATEOS *et al.*, 2009). As manipulações farmacológicas foram as seguintes:

- Veículo: recebeu solução salina (NaCl a 0,9%), por via intraperitoneal, no volume de 1ml/100g de peso corporal;
- Fluoxetina 1mg: recebeu solução de fluoxetina na dose de 1mg/Kg (ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015) de peso corporal, por via intraperitoneal, no volume de 1ml/100g de peso corporal;
- Fluoxetina 10mg: recebeu solução de fluoxetina na dose de 10mg/Kg de peso corporal (DRAPIER *et al.*, 2007; BALU *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2010; SORREGOTTI *et al.*, 2013; AMODEO *et al.*, 2015), por via intraperitoneal, no volume de 1ml/100g de peso corporal.

5.5 Desenho experimental

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

- Controle – Veículo (CV, n=13);
- Controle – Fluoxetina 1mg (CF1, n=13);
- Controle – Fluoxetina 10mg (CF10, n=14);
- Hiperlipídico/Isocalórico – Veículo (HIV, n=11);
- Hiperlipídico/Isocalórico – Fluoxetina 1mg (HI1, n=9);
- Hiperlipídico/Isocalórico – Fluoxetina 10mg (HI10, n=10);
- Hiperlipídico/Hiperclórico – Veículo (HHV, n=11);
- Hiperlipídico/Hiperclórico – Fluoxetina 1mg (HH1, n=11);
- Hiperlipídico/Hiperclórico – Fluoxetina 10mg (HH10, n=10).

5.6 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados por todos os animais durante três semanas consecutivas, na fase escura do ciclo de luz, 30 minutos após a manipulação farmacológica (GRIEBEL *et al.*, 1999; DRAPIER *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010; SORREGOTTI *et al.*, 2013). Para evitar que o fármaco fosse aplicado muito após o pico de serotonina foram filmados de dois a três ratos por dia, dependendo do teste comportamental avaliado. Entre as filmagens, os aparatos foram limpos com hipoclorito 2% para eliminar odores que pudessem influenciar o comportamento do animal seguinte.

5.6.1 Campo aberto

Na nona semana (ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015), o animal foi submetido ao teste em campo aberto. O sistema consiste em um campo circular escuro (ϕ 1m) coberto por EVA, delimitado por paredes de 30 cm de altura (ARAGAO RDA *et al.*, 2011). Uma hora antes da manipulação farmacológica, os animais em suas gaiolas foram transferidos para a sala de análise comportamental para ambientação (CHEGINI, NASEHI e ZARRINDAST, 2014). Ao final desse período, o fármaco foi injetado e o animal permanecia na gaiola. Meia hora depois (GRIEBEL *et al.*, 1999; DRAPIER *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010; SORREGOTTI *et al.*, 2013), o roedor foi posicionado no centro do campo e sua trajetória registrada por uma câmera digital durante 15 minutos (SASAKI *et al.*, 2013; BELLISARIO *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014), enquanto se locomovia livremente. Por conta do pico de serotonina, de um a três animais eram filmados por dia. A gravação era realizada em ambiente escuro e a câmera possuía iluminação infravermelha. Os vídeos foram armazenados para futuras análises. O parâmetro avaliado foi:

- Número de bolos fecais.

5.6.2 Labirinto elevado em cruz

Na décima semana (ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015), sete dias depois da exposição ao campo aberto, o animal foi submetido ao teste de labirinto elevado em cruz (PELLOW *et al.*, 1985). O aparato consiste em uma estrutura de madeira com quatro braços de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, 50 cm acima do chão. Dois desses braços possuem paredes de 40 cm de altura e são chamados “braços fechados”. Os outros dois não possuem essa proteção, sendo os “braços abertos” do labirinto. Para diminuir a possibilidade de acidentes, bordas de 1 cm ladeavam os braços abertos. O encontro entre os quatro braços é denominado “área central” e tem 10x10 cm. Ademais, a superfície de todos os braços era coberta por EVA. Uma hora antes da aplicação da droga (CHEGINI, NASEHI e ZARRINDAST, 2014), os animais eram transferidos para a sala de análise comportamental para ambientação. Ao final desse período, o fármaco era administrado e o animal devolvido para gaiola. Trinta minutos depois da injeção, o roedor era posicionado na área central, com a face voltada para um dos braços abertos, durante um período de 5 minutos (SASAKI *et al.*, 2013; BELLISARIO *et al.*, 2014; SASAKI *et al.*, 2014; RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2015). Uma luz vermelha de 15 watts posicionada acima da área central era mantida acesa durante todo o tempo do experimento. A filmagem foi registrada por um sistema de captação de

imagens com infravermelho acoplado a um computador situado fora da sala de teste. Por conta do pico de serotonina, de um a três animais eram filmados por dia. As análises dos vídeos foram realizadas com auxílio de um cronômetro digital desenvolvido pelo grupo de pesquisa. Ao final dos experimentos, todos os vídeos foram renomeados por outra pessoa para evitar vieses de análise. Os parâmetros avaliados foram (PELLOW *et al.*, 1985; ESPEJO, 1997; WALF e FRYE, 2007):

- Número total de entradas nos braços do labirinto: somatório do número de vezes que os animais entravam com as quatro patas em qualquer um dos braços do labirinto.
- Número de entradas: número de vezes em que o animal entra com as quatro patas nos braços abertos ou nos braços fechados;
- % 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;
- % de tempo de permanência: % de tempo gasto nos braços abertos e fechados, e na área central;
- Tentativa de aproximação dos braços abertos: número de vezes que os animais tentavam se aproximar dos braços abertos recuando logo em seguida.

5.6.3 Paradigma da exploração livre

Na décima primeira semana, sete dias depois do teste do labirinto elevado em cruz, o animal foi submetido ao paradigma de exploração livre (TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2009). O aparelho consiste em uma caixa de madeira dividida em duas partes, uma familiar e uma nova, sendo cada uma delas subdivididas em três unidades exploratórias de 20x20 cm (TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2009). Cada área menor conecta-se as áreas adjacentes por passagens de 10 cm de largura e comprimento. As duas metades eram separadas por uma divisória removível e o chão estava protegido por EVA. O ambiente familiar era também coberto por maravalha esterilizada. Vinte e quatro horas antes do teste, o animal era colocado em uma das metades da caixa (com livre acesso à água e ração) para se familiarizar com o ambiente (área familiar). Ao término desse período, foi realizada a aplicação do fármaco. Trinta minutos depois da manipulação farmacológica (GRIEBEL *et al.*, 1999; DRAPIER *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010; SORREGOTTI *et al.*, 2013; ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015), a parede removível era retirada e o animal podia explorar

livremente o aparato durante 15 minutos (ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015). O aparato era mantido no biotério e as filmagens eram feitas no escuro. Um ou dois animais eram filmados por dia. Depois de cada filmagem, a maravalha utilizada era descartada e as superfícies do paradigma e os emborrachados eram higienizados com hipoclorito 2%. Os vídeos foram capturados com ajuda de um sistema composto por câmera digital com iluminação infravermelha e computador. As análises foram feitas com ajuda de um cronômetro digital desenvolvido pelo grupo de pesquisa. Ao final dos experimentos, todos os vídeos foram renomeados por outra pessoa para evitar vieses de análise. Foram avaliados os seguintes parâmetros (HUGHES, 1965; GRIEBEL *et al.*, 1993b; BELZUNG e LE PAPE, 1994):

- Latência para entrar no ambiente novo: tempo (s) gasto pelo animal para sair do ambiente familiar e entrar com as quatro patas no ambiente novo;
- Consumo alimentar ao final da filmagem.

5.7 Análise estatística

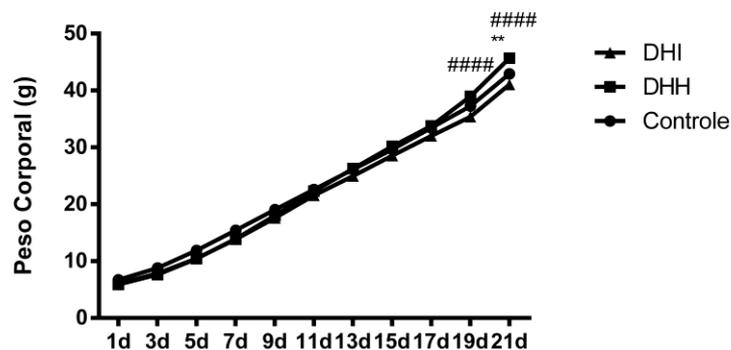
Os dados foram analisados estatisticamente através dos softwares GraphPad Prism 6® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) e SigmaStat 3.5. Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para todas as análises. Os dados de peso corporal durante a lactação, peso e consumo alimentar pós-desmame foram analisados utilizando-se o teste ANOVA *two-way* medidas repetidas (fatores dieta x tempo), seguido do pós-teste de Tukey. O peso corporal durante as semanas dos testes comportamentais (9^o, 10^o e 11^o) foi analisado pelo teste ANOVA *three-way* (fatores dieta x droga x tempo) com pós-teste de Tukey. Os parâmetros avaliados nos testes comportamentais - campo aberto, labirinto elevado em cruz e paradigma da exploração livre - foram analisados através do teste ANOVA *two-way* (fatores dieta x droga), seguido do pós-teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6 Resultados

6.1 Peso corporal durante lactação

Para o peso corporal durante a lactação, o teste ANOVA *Two-way* medidas repetidas (dieta x idade) revelou interação entre os fatores ($p < 0,0001$) e efeito significativo da idade ($p < 0,0001$). Filhotes do grupo DHH foram mais pesados do que os filhotes do grupo Controle no 21º dia pós-natal ($p < 0,01$). Ademais, filhotes DHH também foram mais pesados do que filhotes DHI nos dias 19 ($p < 0,0001$) e 21 ($p < 0,0001$) (Fig. 1).

Figura 1. Peso corporal dos filhotes durante a lactação.

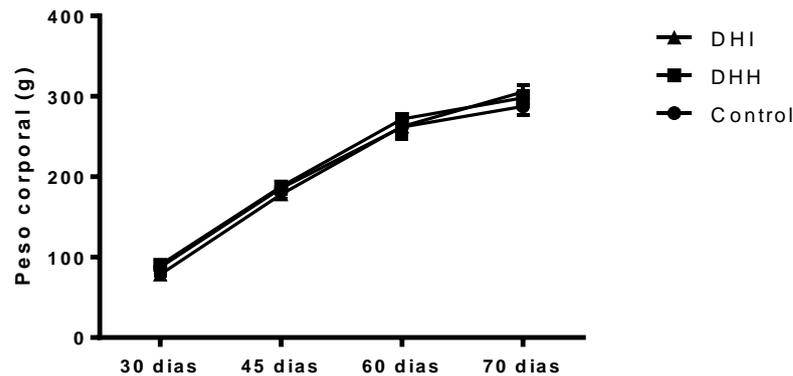


Os filhotes foram alimentados por mães submetidas a diferentes tipos de dieta durante os períodos de gestação e lactação, controle ($n=17$), DHH ($n=14$) ou DHI ($n=12$). Valores expressos em média \pm EPM. Teste ANOVA *two-way* (dieta x idade) medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey. $p < 0,05$, *vs. Controle; # vs. DHI.

6.2 Peso corporal pós-desmame

Nenhum efeito ou interação envolvendo os fatores (dieta x idade) foram encontrados no teste ANOVA *two-way* para o peso corporal dos grupos estudados no 30º, 45º e 60º dia de vida pós-natal.

Figura 2. Peso corporal pós-desmame.

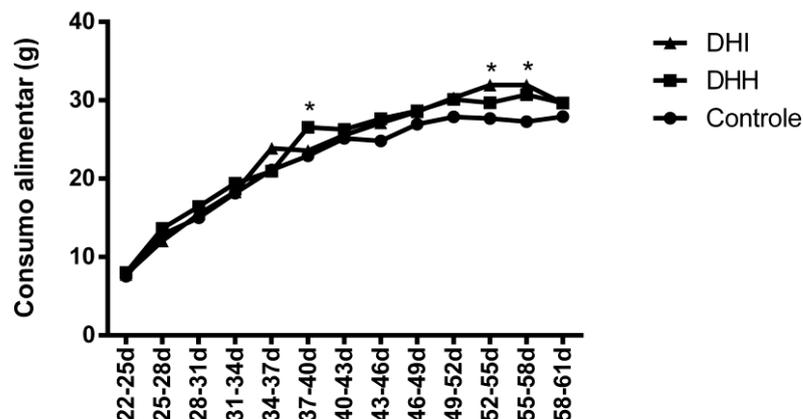


Os filhotes foram alimentados por mães submetidas a diferentes tipos de dieta durante os períodos de gestação e lactação, Controle (n=17), DHH (n=14) ou DHI (n=12). Valores expressos em média \pm EPM. Teste ANOVA *two-way* (dieta x idade) medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey.

6.3 Consumo alimentar pós-desmame

ANOVA *Two-way* revelou efeito da idade sobre o consumo alimentar ($p < 0001$). O consumo alimentar pós-desmame foi maior para o grupo DHH entre o 37°-40° dia pós-natal quando comparado com o grupo Controle ($p < 0,05$). Entre o 52°-55° dia pós-natal, o grupo DHI ingeriu maior quantidade de ração do que o grupo Controle ($p < 0,05$). Ademais, entre o 55°-58° dia pós-natal, os grupos hiperlipídicos apresentaram maior consumo do que o grupo Controle ($p < 0,05$) (Fig. 3).

Figura 3. Consumo alimentar pós-desmame.



Os filhotes foram alimentados por mães submetidas a diferentes tipos de dieta durante os períodos de gestação e lactação, Controle (n=17), DHH (n=14) ou DHI (n=12). Valores expressos em média \pm EPM. Teste ANOVA *two-way* (dieta x idade) medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey. $p < 0,05$, *vs. Controle.

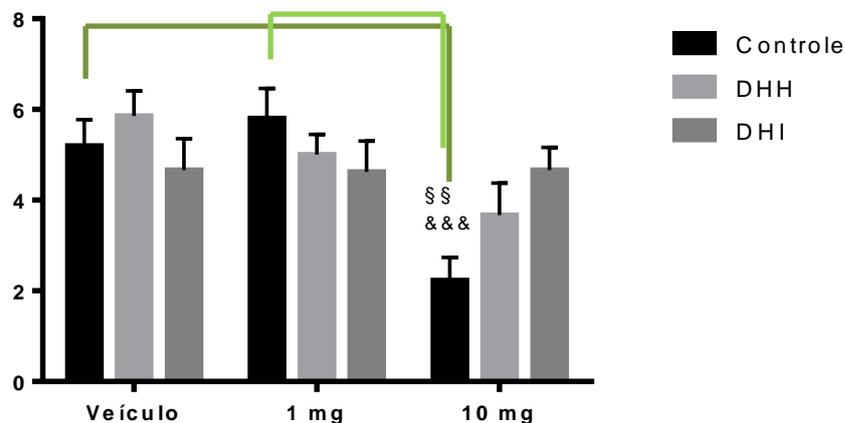
6.4 Peso corporal durante as semanas de aplicação de Fluoxetina

Nenhum efeito ou interação envolvendo os fatores (dieta x idade x droga) foram encontrados no teste ANOVA *three-way* para o peso corporal dos grupos estudados durante a 9^o, 10^o e 11^o semana (gráfico não mostrado).

6.5 Número de bolos fecais no campo aberto

Houve interação entre os fatores (dieta x droga) ($p < 0,0205$) e efeito da droga ($p < 0,0007$) sobre o número de defecações no campo aberto na 9^o semana pós-natal. O grupo CF10 apresentou menor número de bolos fecais do que os grupos CV ($p < 0,01$) e CF1 ($p < 0,001$) (Fig.4).

Figura 4. Número de bolos fecais no campo aberto (CA).

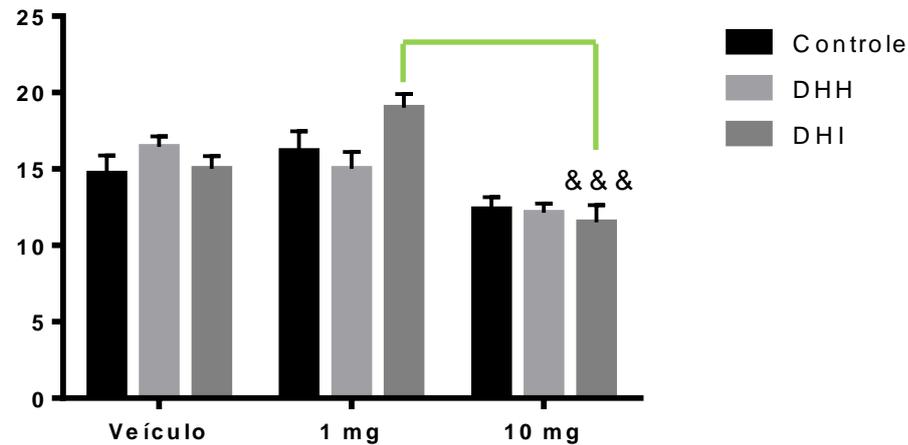


Os filhotes foram alimentados por mães submetidas a diferentes tipos de dieta durante os períodos de gestação e lactação, Controle (n=17), DHH (n=14) ou DHI (n=12). Na 9^a semana, os grupos formados durante a manipulação nutricional foram subdivididos em mais três subgrupos de acordo com o fármaco utilizado (veículo, fluoxetina 1mg/kg e Fluoxetina 10mg/kg), formando nove grupos experimentais, CV (n=13), CF1 (n=13), CF10 (n=14), HHV (n=11), HH1 (n=11), HH10 (n=10), HIV (n=11), HI1 (n=9), HI10 (n=10). Valores expressos em média \pm EPM. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido do pós-teste de Tukey. $p < 0,05$, § vs. Veículo para mesma dieta; & vs. Fluoxetina 1mg/Kg para a mesma dieta.

6.6 Número total de entradas nos braços do labirinto elevado em cruz

Houve efeito da droga ($p < 0,0001$) sobre o número total de entradas nos braços do LEC na 10^a semana pós-natal. Ratos HI10 entraram menos vezes nos braços do LEC do que ratos HI1 ($p < 0,01$) (Fig. 5).

Figura 5. Número total de entradas nos braços do labirinto elevado em cruz (LEC).



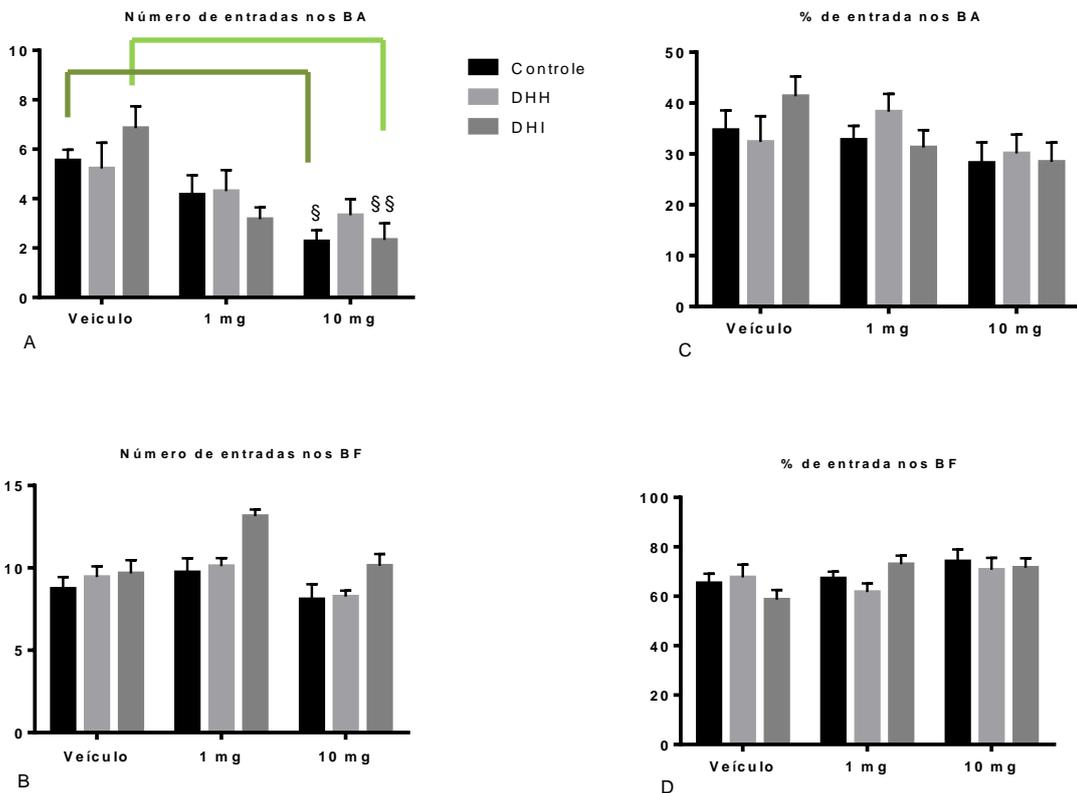
Os filhotes foram alimentados por mães submetidas a diferentes tipos de dieta durante os períodos de gestação e lactação, Controle (n=17), DHH (n=14) ou DHI (n=12). Na 10ª semana, os grupos formados durante a manipulação nutricional foram subdivididos em mais três subgrupos de acordo com o fármaco utilizado (veículo, fluoxetina 1mg/kg e Fluoxetina 10mg/kg), formando nove grupos experimentais, CV (n=13), CF1 (n=13), CF10 (n=14), HHV (n=11), HH1 (n=11), HH10 (n=10), HIV (n=11), HI1 (n=9), HI10 (n=10). Valores expressos em média \pm EPM. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido do pós-teste de Tukey. $p < 0,05$. & vs. Fluoxetina 1mg/kg para mesma dieta.

6.7 Entradas nos braços abertos e fechados

Houve efeito da droga sobre o número de entradas nos braços abertos (BA) ($p < 0,0001$). Ratos CF10 entraram menos vezes nos BA do que ratos CV ($p < 0,05$). Ademais, ratos HI10 entraram menos vezes nos BA do que ratos HIV ($p < 0,01$) (Fig. 6A).

Nenhum efeito ou interação envolvendo os fatores (dieta x droga) foram encontrados para a porcentagem de entrada nos braços abertos (6C), para o número de entradas nos braços fechados (6B) e porcentagem de entradas nos braços fechados do labirinto (Fig. 6D).

Figura 6. Número de entrada nos BA (6A), número de entradas nos BF (6B), % de entrada nos BA (6C) e % de entrada nos BF (6D)



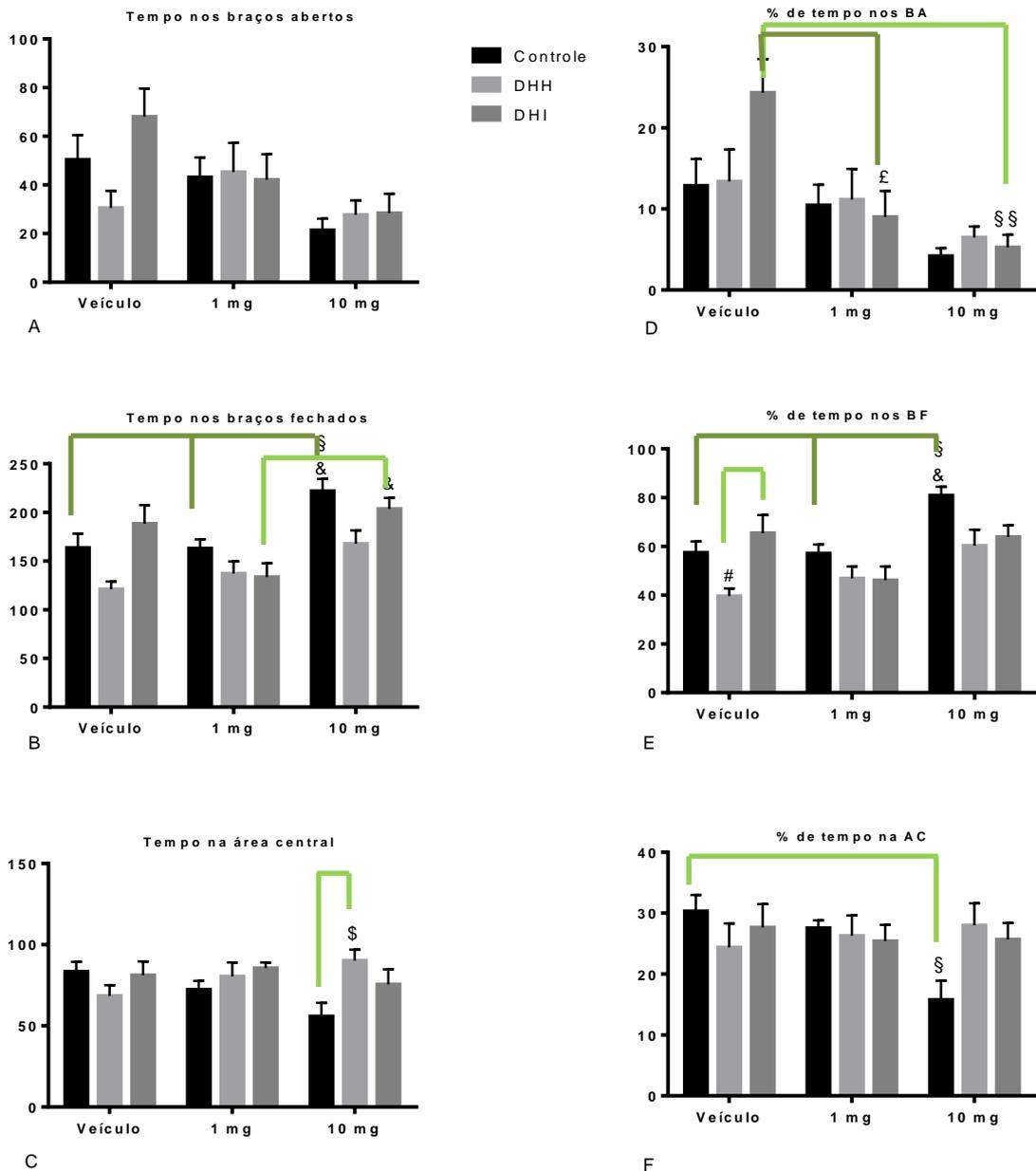
Os filhotes foram alimentados por mães submetidas a diferentes tipos de dieta durante os períodos de gestação e lactação, Controle (n=17), DHH (n=14) ou DHI (n=12). Na 10^a semana, os grupos formados durante a manipulação nutricional foram subdivididos em mais três subgrupos de acordo com o fármaco utilizado (veículo, fluoxetina 1mg/kg e Fluoxetina 10mg/kg), formando nove grupos experimentais, CV (n=13), CF1 (n=13), CF10 (n=14), HHV (n=11), HH1 (n=11), HH10 (n=10), HIV (n=11), HI1 (n=9), HI10 (n=10). Valores expressos em média \pm EPM. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido do pós-teste de Tukey. $p < 0,05$. § vs. Veículo para a mesma dieta. BA = Braços Abertos; BF = Braços Fechados.

6.8 Permanência nos braços abertos e fechados e na área central

Nenhum efeito ou interação envolvendo os fatores (dieta x droga) foram encontrados para o tempo de permanência nos braços abertos (Fig. 7A). Houve efeito da dieta ($p < 0,0008$) e da droga ($p < 0,0001$) sobre o tempo de permanência nos braços fechados. Ratos CF10 passaram mais tempo nos braços fechados do que ratos CV ($p < 0,05$) e CF1 ($p < 0,05$) (Fig. 7B). Ademais, ratos HI10 gastaram mais tempo nos braços fechados do que ratos HI1 ($p < 0,05$) (Fig. 7B). Houve interação entre os fatores dieta e droga ($p < 0,0326$) sobre o tempo de permanência na área central (Fig. C). Ratos HH10 permaneceram mais tempo na área central do que ratos CF10 ($p < 0,05$) (Fig. C).

Em relação à porcentagem de tempo nos braços abertos foi observado efeito da droga ($p < 0,0001$). A porcentagem de tempo nos braços abertos de ratos HI10 foi menor que a porcentagem de ratos HIV ($0 < 0,01$) (Fig. 7D). Ademais, a porcentagem de tempo nos braços abertos de ratos HI1 foi menor que a porcentagem de ratos HIV ($p < 0,05$) (Fig. 7D). Houve efeito da dieta ($p = 0,0006$) e da droga ($p < 0,0001$) sobre a porcentagem de tempo despendida nos braços fechados (%TBF). Ratos CF10 apresentaram maiores %TBF do que a porcentagem de ratos CV ($p < 0,05$) e CF1 ($p < 0,05$) (Fig. 7E). Além disso, ratos HHV apresentaram menores %TBF do que HIV ($p < 0,05$) (Fig. 7E). Houve interação entre a dieta e a droga sobre a porcentagem de tempo na área central ($p = 0,0328$). Ratos CF10 apresentaram menor porcentagem de tempo na área central que ratos CV ($p < 0,05$) (Fig. 7F).

Figura 7. Tempo nos braços abertos (7A), tempo nos braços fechados (7B), tempo na área central (7C), % de tempo nos BA (7D), % de tempo nos BF (7E) e % de tempo na AC (7F).

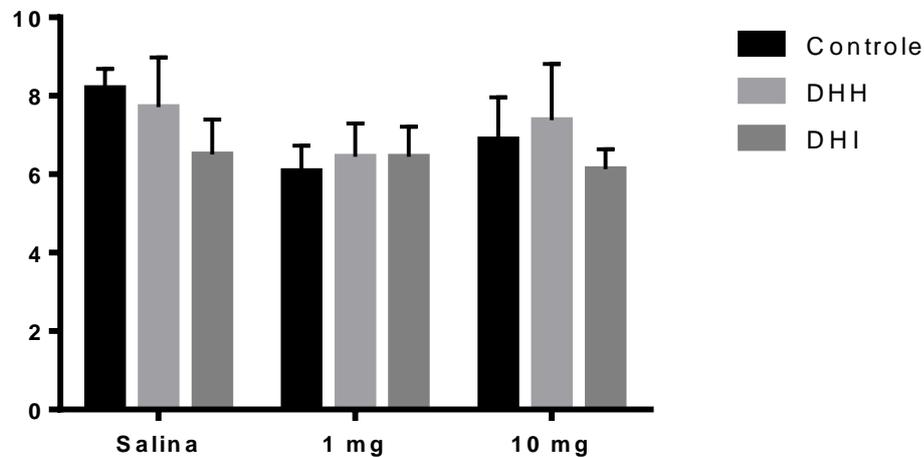


Os filhotes foram alimentados por mães submetidas a diferentes tipos de dieta durante os períodos de gestação e lactação, Controle (n=17), DHH (n=14) ou DHI (n=12). Na 10ª semana, os grupos formados durante a manipulação nutricional foram subdivididos em mais três subgrupos de acordo com o fármaco utilizado (veículo, fluoxetina 1mg/kg e Fluoxetina 10mg/kg), formando nove grupos experimentais, CV (n=13), CF1 (n=13), CF10 (n=14), HHV (n=11), HH1 (n=11), HH10 (n=10), HIV (n=11), HI1 (n=9), HI10 (n=10). Valores expressos em média \pm EPM. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido do pós-teste de Tukey. $p < 0,05$, £ vs. Fluoxetina 1mg/kg na mesma dieta; §§ vs Veículo na mesma dieta; & vs. Fluoxetina 1mg/kg na mesma dieta; # vs. Veículo Hiperlipídica/Isocalórica. BA = Braços Abertos; BF = Braços Fechados; AC = Área Central.

6.9 Tentativas de aproximação dos braços abertos

Nenhum efeito ou interação envolvendo os fatores (dieta e droga) foram encontrados no teste ANOVA *two-way* para o número de tentativas de aproximação dos braços abertos dos grupos estudados (Fig. 8).

Figura 8. Tentativas de aproximação dos braços abertos.

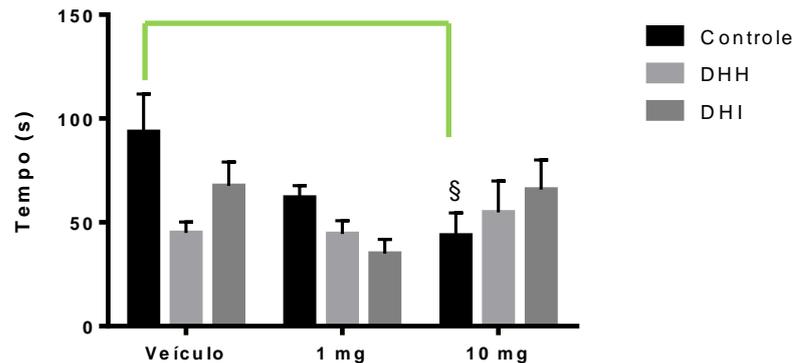


Os filhotes foram alimentados por mães submetidas a diferentes tipos de dieta durante os períodos de gestação e lactação, Controle (n=17), DHH (n=14) ou DHI (n=12). Na 10ª semana, os grupos formados durante a manipulação nutricional foram subdivididos em mais três subgrupos de acordo com o fármaco utilizado (veículo, fluoxetina 1mg/kg e Fluoxetina 10mg/kg), formando nove grupos experimentais, CV (n=13), CF1 (n=13), CF10 (n=14), HHV (n=11), HH1 (n=11), HH10 (n=10), HIV (n=11), HI1 (n=9), HI10 (n=10). Valores expressos em média \pm EPM. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido do pós-teste de Tukey. $p < 0,05$.

6.10 Latência para entrar no ambiente novo

Nenhum efeito ou interação envolvendo os fatores (dieta x droga) foram encontrados no teste ANOVA *two-way* para a latência para entrar no ambiente novo do paradigma da exploração livre na 11ª semana pós-natal. Pós-teste de Tukey revelou que ratos CF10 levaram menos tempo para deixar o ambiente familiar do que ratos CV ($p < 0,05$) (Fig. 9).

Figura 9. Latência para entrar ambiente novo do paradigma da exploração livre (PEL).

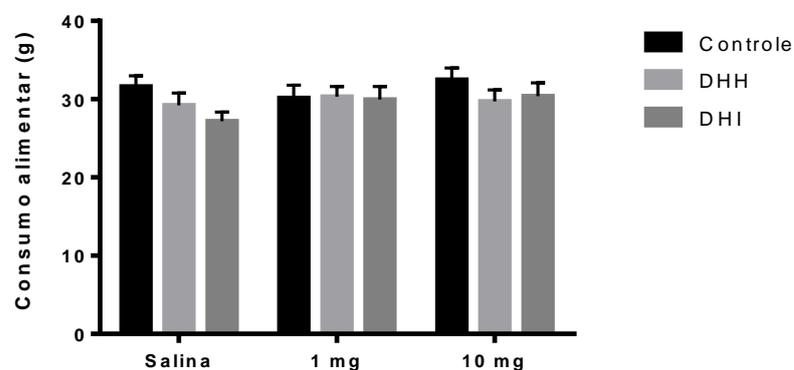


Os filhotes foram alimentados por mães submetidas a diferentes tipos de dieta durante os períodos de gestação e lactação, Controle (n=17), DHH (n=14) ou DHI (n=12). Na 11^a semana, os grupos formados durante a manipulação nutricional foram subdivididos em mais três subgrupos de acordo com o fármaco utilizado (veículo, fluoxetina 1mg/kg e Fluoxetina 10mg/kg), formando nove grupos experimentais, CV (n=13), CF1 (n=13), CF10 (n=14), HHV (n=11), HH1 (n=11), HH10 (n=10), HIV (n=11), HI1 (n=9), HI10 (n=10). Valores expressos em média \pm EPM. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido do pós-teste de Tukey. $p < 0,05$. § vs. Veículo na mesma dieta.

6.11 Consumo alimentar no paradigma da exploração livre

Nenhum efeito ou interação envolvendo os fatores (dieta e droga) foram encontrados no teste ANOVA *two-way* para o consumo alimentar no paradigma da exploração livre (Fig. 10).

Figura 10. Consumo alimentar no paradigma da exploração livre (PEL).



Os filhotes foram alimentados por mães submetidas a diferentes tipos de dieta durante os períodos de gestação e lactação, Controle (n=17), DHH (n=14) ou DHI (n=12). Na 11^a semana, os grupos formados durante a manipulação nutricional foram subdivididos em mais três subgrupos de acordo com o fármaco utilizado (veículo, fluoxetina 1mg/kg e Fluoxetina 10mg/kg), formando nove grupos experimentais, CV (n=13), CF1 (n=13), CF10 (n=14), HHV (n=11), HH1 (n=11), HH10 (n=10), HIV (n=11), HI1 (n=9), HI10 (n=10). Valores expressos em média \pm EPM. Teste ANOVA *two-way* (dieta x droga), seguido do pós-teste de Tukey.

7 Discussão

A exposição materna a dieta hiperlipídica/hipercalórica influenciou o peso corporal dos filhotes no final da lactação. No período pós-desmame, por sua vez, o consumo alimentar foi maior para ratos provenientes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica/hipercalórica ou hiperlipídica/isocalórica em alguns pontos. No campo aberto, ratos jovem-adultos provenientes dos grupos Hiperlipídico/Hipercalórico e Hipercalórico/Isocalórico foram resistentes à ação do fármaco, não havendo diferença para o número de bolos fecais. Os grupos CF1 e CF10, por sua vez, defecaram menos que o grupo CV. No labirinto elevado em cruz, a aplicação de fluoxetina 10mg/kg nos grupos DHI e Controle aumentou os comportamentos associados à ansiedade. Houve diminuição do número de entradas (CF10 x CV; HI10 x HIV) e da porcentagem de tempo nos braços abertos (HI10 x HIV; HI1 x HIV), e aumento do tempo (CF10 x CV; CF10 x CF1) e da porcentagem de tempo (CF10 x CV) nos braços fechados. Ademais, o grupo HI10 entrou menos vezes nos braços do labirinto e passou mais tempo nos braços fechados do que o grupo HI1. Com relação aos grupos controles hiperlipídicos, a porcentagem de tempo nos braços fechados foi menor para os ratos do grupo Hiperlipídico/Hipercalórico do que para o grupo Hiperlipídico/Isocalórico. Além disso, os grupos HH10 e CF10 responderam de maneira distinta a aplicação do fármaco em relação ao grupo CF10. Nesse caso, o tempo gasto na área central foi maior para o grupo HH10. Por fim, no paradigma da exploração livre, o grupo CF10 demorou menos tempo para entrar no ambiente novo do que o grupo CV.

O peso corporal dos filhotes de mães DHH, DHI e CTR não foi diferente ao nascer. De maneira semelhante, outros estudos com dieta hiperlipídica/hipercalórica ou hiperlipídica/isocalórica materna também não observaram diferença entre peso corporal no primeiro dia pós-natal dos filhotes do grupo experimental e do grupo controle (DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO, 1997; GIRIKO *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2013); (CADENA-BURBANO *et al.*, 2017). Segundo Sasaki (2013), a semelhança entre os pesos corporais dos grupos avaliados sugerem que o modelo experimental adotado pelo presente estudo não envolve restrição proteica. Isso porque dietas hiperlipídicas/hipoproteicas são capazes de reduzir o peso corporal da prole (MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014). De maneira diferente, o estudo de Mendes-da-Silva e colaboradores (2014) observou menor peso da descendência proveniente de mães expostas à dieta hiperlipídica/hipercalórica durante a gestação (MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014); enquanto o consumo de dieta ocidentalizada

durante o período perinatal resultou em filhotes mais pesados no primeiro dia pós-nascimento (CAVALCANTE *et al.*, 2013).

Ao decorrer da lactação, filhotes de mães DHH foram mais pesados do que filhotes de mães CTR no 21º dia pós-natal. Cadena-Burbano e colaboradores (2017) observaram resposta similar, em que a prole DHH também apresentou maior peso do que a prole CTR no último dia da lactação. Ademais, na mesma idade, a exposição materna a dieta ocidentalizada ou a dieta hiperlipídica produziu filhotes também mais pesados (CAVALCANTE *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2014). Porém, essa diferença foi observada em todo o período de aleitamento (CAVALCANTE *et al.*, 2013) ou a partir do oitavo dia pós-natal (SASAKI *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2014). De maneira contrária, o peso de filhotes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação ou a lactação foi menor ao desmame do que o peso do grupo controle (MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014). Entretanto, é importante ressaltar que nesse estudo, a diferença também foi revelada em quase toda lactação (MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014). Por outro lado, em estudos com dieta com alto teor de lipídio, o peso dos filhotes não foi diferente entre os grupos estudados no 21º dia pós-natal ou durante as três semanas pós-nascimento (GIRIKO *et al.*, 2013; BALSEVICH *et al.*, 2016a).

Ademais, filhotes do grupo DHH foram mais pesados do que filhotes do grupo DHI no 19º e 21º dia pós-natal. Resultado semelhante foi revelado no trabalho de Cadena-Burbano e colaboradores (2017). Essa diferença entre os grupos hiperlipídicos sugere que, apesar de terem a mesma porcentagem de lipídio, os demais componentes da dieta podem ter interferido no resultado obtido. Tal discrepância pode ser resultado do aumento da quantidade de fibra insolúvel (celulose) utilizada na preparação da dieta hiperlipídica/isocalórica, através da diminuição da quantidade de lipídios disponíveis para a prole via placenta na gestação e leite materno na lactação. Apesar disso, a avaliação do leite materno no estudo de DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO (1997) revelou que mães do grupo hiperlipídico/isocalórico (25,7g de celulose/100g de dieta) disponibilizavam mais lipídios para prole do que mães do grupo hipolipídico (3,6g de celulose/100g de dieta). Ademais, a digestibilidade de lipídios e proteínas também foi avaliada, não obtendo diferença na porcentagem desses macronutrientes nas fezes dos grupos estudados (DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO, 1997). Outra possibilidade explorada para explicar a diferença entre os grupos hiperlipídicos refere-se às propriedades da celulose sobre a absorção de micronutrientes (TRUMBO *et al.*, 2001). A revisão de Christian (2010), por exemplo, destaca o possível papel de micronutrientes essenciais, como vitaminas e minerais, sobre o adequado desenvolvimento fetal. Segundo o

trabalho, devido às inúmeras funções desempenhadas pelos micronutrientes, especialmente sobre proteína e energia, é possível que certos micronutrientes sozinhos ou a combinação de micronutrientes possam limitar eficácia de alguns macronutrientes (CHRISTIAN, 2010).

Com relação ao peso corporal pós-desmame, não houve diferença entre os grupos DHH, DHI e CTR para o 30°, 45°, 60° e 70° dia pós-natal. Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos com dietas também ricas em lipídios (WRIGHT, LANGLEY-EVANS e VOIGT, 2011; SASAKI *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2014; BALSEVICH *et al.*, 2016a). Segundo Sasaki e colaboradores, a semelhança entre os pesos dos grupos hiperlipídico e controle no período pós-desmame implica que a diferença observada no período de aleitamento pode ser atribuída à exposição materna *in utero* (SASAKI *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2014).

Quanto aos testes comportamentais, foram avaliados o campo aberto, o labirinto elevado em cruz e o paradigma da exploração livre, pois esses aparatos analisam tipos diferentes de ansiedade. O campo aberto e o labirinto elevado em cruz avaliam a ansiedade-estado, que pode ser caracterizada como: estado emocional passageiro, de intensidade variável, experimentado em um momento particular do tempo. Enquanto o paradigma da exploração livre analisa a ansiedade traço, em que a ansiedade é relativamente estável ao longo do tempo e é uma característica pessoal do indivíduo. No que diz respeito ao campo aberto, o número de bolos fecais foi menor para o grupo CF10 do que para os grupos CV e CF1, sugerindo menor “emocionalidade” para os ratos CF10. Segundo Hall (1934), medidas como defecação e urinação podem identificar estados emocionais diferentes, sendo mais comuns em animais menos inibidos emocionalmente durante períodos considerados estressantes (HALL, 1934). Na revisão de Kalueff e Tuohimaa (2004), o aumento de número de bolos fecais também caracterizava animais com maior expressão de comportamentos relacionados à ansiedade. Tal ideia pode ser corroborada por quatro linhas de evidências obtidas por Hall (1934): (1) ocorrem em situações reconhecidas como emocionalmente excitantes em caráter, (2) estão associadas a outras reações, desencadeadas por impulsos que viajam pelos sistemas nervosos autônomos, (3) tendem a ser eliminada após a exposição repetida a situação originalmente desconhecida, e (4) à medida que o número de animais defecando e urinando diminui, o número de animais comendo aumenta (HALL, 1934). De modo similar, Walsh e Cummins (1976) consideraram a quantidade de defecações como parâmetro do sistema nervoso autônomo. Ademais, estudo sobre o campo aberto mostrou que para o primeiro dia de exposição ao aparato, o número de defecações foi relacionado à

“emocionalidade” (ou reatividade emocional), enquanto a atividade locomotora foi associada a “emocionalidade” e a exploração (WHIMBEY e DENEMBERG, 1967; WALSH e CUMMINS, 1976). De maneira semelhante, em trabalho mais recente sobre os principais componentes de análise, o número de bolos fecais foi associado tanto à atividade locomotora quanto a análise de risco (ou tomada de decisão) e exploração (CAROLA *et al.*, 2002). Por fim, segundo Clément e colaboradores, tanto a atividade locomotora, quanto a análise de risco são considerado componentes dos comportamentos relacionados à ansiedade (CLEMENT *et al.*, 2007).

Os grupos hiperlipídicos, por sua vez, não responderam às doses de fluoxetina utilizadas, sugerindo diminuição da responsividade dos receptores serotoninérgicos ao fármaco. No estudo de Sasaki e colaboradores (2013), entretanto, quando a prole foi exposta indiretamente a dieta hiperlipídica, antes da concepção até o final da lactação, o grupo hiperlipídico apresentou maior número de bolos fecais no teste de transição claro-escuro, sugerindo aumento de comportamentos relacionados à ansiedade (SASAKI *et al.*, 2013). Análise dos principais componentes do campo aberto e do teste de transição claro-escuro revelou que o número de defecações em ambos os aparatos mensuravam o mesmo aspecto do comportamento (RAMOS *et al.*, 2007). Por isso, a discrepância entre nossos resultados e os obtidos pelo grupo de Sasaki (2013) pode estar relacionado ao protocolo experimental adotado, que difere desde a composição da dieta até a idade em que os animais foram expostos aos testes comportamentais.

Com relação ao labirinto elevado em cruz, o grupo CF10 apresentou mais comportamentos associados à ansiedade do que os grupos CV e CF1. O número de entradas nos braços abertos foi menor para o CF10 do que para o CV, o que refletiu na porcentagem de tempo de permanência nos braços fechados, sendo maior para o grupo de maior dose (CRUZ, FREI e GRAEFF, 1994; ESPEJO, 1997; CAROLA *et al.*, 2002; CLEMENT *et al.*, 2007). Ademais, a porcentagem de tempo na área central foi menor para esse mesmo grupo, consequência da alteração observada para os parâmetros dos braços fechados, pois, como foi mostrado no estudo de Rodgers e Johnson (1995), existe uma correlação negativa moderada entre o tempo nos braços fechados e na área central (CRUZ, FREI e GRAEFF, 1994; ESPEJO, 1997; CAROLA *et al.*, 2002; CLEMENT *et al.*, 2007). O grupo CF10 também apresentou mais comportamentos relacionados à ansiedade do que o grupo CF1, despendendo mais tempo e porcentagem de tempo nos braços fechados do

labirinto (CRUZ, FREI e GRAEFF, 1994; ESPEJO, 1997; CAROLA et al., 2002; CLEMENT et al., 2007).

De maneira semelhante ao que foi observado para o grupo controle, ratos adulto-jovens HI10 e HI1 também revelaram aumento da expressão de comportamentos relacionados a ansiedade (CRUZ, FREI e GRAEFF, 1994; ESPEJO, 1997; CAROLA et al., 2002; CLEMENT et al., 2007). O número total de entradas nos braços do labirinto foi menor para o grupo HI10 do que para o grupo HI1, sugerindo comprometimento da atividade locomotora desses animais, assim como aumento do comportamento associado a ansiedade. Isso porque, como foi demonstrado no estudo de Rodgers e Johnson (1995), o número total de entradas não está restrito aos parâmetros locomotores do animal. Além disso, o tempo nos braços fechados foi maior para o grupo HI10 do que para o grupo HI1. O número de entradas nos braços abertos, por sua vez, foi menor para o grupo de maior dose. A diferença, no entanto, foi encontrada comparando-se o grupo HI10 ao grupo HIV. Essa diminuição do número de entradas nos braços abertos refletiu na porcentagem de tempo despendido neles, sendo menor para o grupo HI10. Ademais, para esse parâmetro, o grupo HI1 também gastou menor porcentagem de tempo do que o grupo HIV nos braços aberto. Somado ao que foi discutido acima, apesar de os grupos hiperlipídicos apresentarem a mesma quantidade de lipídio, o grupo HHV apresentou menor porcentagem de tempo nos braços fechados do que o grupo HIV. Por fim, a resposta a dose de 10mg/kg foi diferente entre os grupos CF10 e HH10, pois o tempo de permanência na área central foi maior para o hiperlipídico/hipercalórico. Juntos esses resultados sugerem que ratos adultos jovens com DHH expressaram menos parâmetros comportamentais associados a ansiedade do que ratos adultos jovens DHI e CTR. Esse parâmetro está associado à tomada de decisão/análise de risco (CAROLA *et al.*, 2002) que, segundo Espejo (1997), é considerado um dos componentes do comportamento relacionado a ansiedade.

Baseado nesses resultados, a resposta comportamental a fluoxetina foi diferente para o teste em campo aberto e para o labirinto elevado em cruz. No labirinto elevado em cruz, a fluoxetina 10mg/kg, quando aplicada no grupo controle, aumentou a expressão de comportamentos associados à ansiedade quando comparado aos grupos que receberam veículo e fluoxetina 1mg/kg. Ademais, as doses de fluoxetina (1mg/kg e 10mg/kg), quando injetadas nos grupos hiperlipídico/isocalórico, aumentaram os valores dos parâmetros relacionados ao comportamento ansioso. Apesar disso, é necessário salientar que os aparatos têm características diferentes e respostas discrepantes já foram observadas em estudos que

avaliavam ambos os testes (LIU *et. al.*, 2010). Um estudo dos principais componentes de análise do campo aberto e do labirinto elevado em cruz observou que existe correlação entre alguns dos conjuntos de parâmetros avaliados nesses aparatos (CAROLA *et al.*, 2002). Segundo Carola e colaboradores (2002), a falta de qualquer correlação negativa entre fatores que envolviam o número de entrada e o tempo de permanência nos braços abertos, e o número de bolos fecais sugere que os animais podem reagir ao mesmo estímulo através de diferentes comportamentos associados a ansiedade, a partir da inibição ou da estimulação da atividade locomotora (CAROLA *et al.*, 2002). Os grupos hiperlipídicos/hipercalóricos (HHV, HH1 e HH10), por sua vez, não responderam a droga para os parâmetros avaliados no labirinto elevado em cruz, assim como ocorreu no campo aberto. Por isso, essa resposta pode ser resultado da diminuição da sensibilidade desse grupo ao fármaco utilizado em decorrência da exposição indireta a dieta hiperlipídica materna.

No paradigma da exploração livre, por sua vez, a latência para entrar no ambiente novo foi menor para o grupo CF10 do que para o grupo CV, o que sugere diminuição do comportamento associado à ansiedade. Segundo estudos disponíveis na literatura sobre os principais componentes de análise, esse parâmetro está associado à aversão a novidade, um dos elementos relacionado ao comportamento ansioso (BELZUNG e LE PAPE, 1993; CLEMENT *et al.*, 2007). A discrepância encontrada para os resultados dos parâmetros do labirinto elevado em cruz e do paradigma da exploração livre para o grupo CF10 pode ser resultado da diferença entre os testes comportamentais. Como foi descrito acima, o paradigma da exploração livre avalia a ansiedade-traço, enquanto o labirinto analisa a ansiedade-estado (GRIEBEL *et al.*, 1993a; CLEMENT *et al.*, 2007; ALMEIDA-SOUZA, GOES e TEIXEIRA-SILVA, 2015). Além disso, a aplicação de diferentes doses de fluoxetina não alterou a resposta comportamental dos grupos hiperlipídicos, sugerindo que a exposição materna a dieta rica em lipídios pode ter alterado a responsividade dos receptores serotoninérgicos a fluoxetina. É importante salientar, entretanto, que, por enquanto, nosso trabalho avaliou apenas um parâmetro do aparato. Por isso, é muito cedo para assumir que animais do grupo CF10 expressaram, de fato, menos comportamentos associados à ansiedade do que o grupo CV; ou que os representantes dos grupos hiperlipídicos foram menos sensíveis ao efeito do fármaco.

Por fim, o consumo alimentar no paradigma, desde o momento em que o animal foi colocado no ambiente familiar até o final das filmagens, não foi diferente para os grupos estudados. Tal resultado sugere que nem a dieta materna, nem o fármaco aplicado no rato

jovem-adulto tiveram efeito sobre o comportamento alimentar quando mensurados ao final do teste. Apesar disso, é possível que durante as filmagens, o número de “alimentações” seja diferente entre os grupos. Hughes (1968), por exemplo, observou que machos e fêmeas exibiram número de consumos diferente para o intervalo de tempo (15 minutos) em que foram analisados. Além disso, os animais analisados não passaram por nenhuma manipulação experimental como no presente estudo e o parâmetro foi avaliado para os ambientes familiar e novo do aparato (HUGHES, 1968).

Em suma, a falta de efeito das doses de 1mg/kg e 10mg/kg de fluoxetina sobre o grupo hiperlipídico/hipercalórico nos três aparatos e sobre o grupo hiperlipídico/isocalórico no campo aberto e no paradigma da exploração livre pode ser consequência da influência do lipídio sobre a sensibilidade/resistência dos receptores serotoninérgicos, o que corrobora a hipótese proposta pelo estudo. Em um estudo com camundongos BALB/c (49-56 dias), a oferta de dieta hiperlipídica durante o período pós-desmame, revelou que a aplicação crônica de fluoxetina (10mg/kg) não foi capaz de reverter os efeitos depressivos provocados pela exposição crônica repetida ao estresse ameno imprevisível (ISINGRINI *et al.*, 2010). Segundo os autores, a associação entre manipulação nutricional e estresse crônico (modelo validado para depressão) implicaria que animais do grupo hiperlipídico foram mais resistentes à fluoxetina (ISINGRINI *et al.*, 2010). É claro que a comparação do trabalho citado com o nosso deve ser feita com cautela, pois, além de a exposição à dieta ser feita no período pós-desmame, animais machos adolescentes, a manipulação farmacológica durou sete semanas, não sendo, portanto, aguda. Porém, tais constatações não excluem a possibilidade de que a dieta hiperlipídica/hipercalórica e a dieta hiperlipídica/isocalórica ofertadas, durante os períodos de gestação e lactação, tenham alterado a sensibilidade desses receptores a fluoxetina.

Com relação à sensibilidade, uma possibilidade explorada pelo grupo de Sullivan (2010), refere-se a perturbações do sistema serotoninérgico em decorrência da dieta hiperlipídica materna gestacional (SULLIVAN *et al.*, 2010). No estudo, primatas não humanos expostos indiretamente ao alto teor de lipídio, apresentaram aumento da expressão gênica da enzima limitante para síntese de serotonina, a triptofano hidroxilase 2 (TPH2) e da expressão dos auto-receptores inibitórios de 5-HT_{1A} no núcleo rostral da rafe, primeira fonte hipotalâmica de 5-HT (SULLIVAN *et al.*, 2010). Segundo os autores, esse resultado associado a mudanças observadas nos testes comportamentais sugeriram que o sistema serotoninérgico da prole está suprimido (SULLIVAN *et al.*, 2010). Ademais, o aumento de

TPH2 poderia ser interpretado como uma resposta compensatória do organismo ao aumento dos receptores 5-HT_{1A} dentro do núcleo dorsal da rafe (SULLIVAN *et al.*, 2010). O subgrupo 5-HT_{1A}, está localizado nos níveis pré e pós-sináptico. No primeiro caso, age como auto-receptor em neurônios serotonérgicos nos núcleos de rafe, impedindo a liberação de serotonina por *feedback* negativo. No segundo, por outro lado, o receptor 5-HT_{1A} atua como mediador da ação da serotonina sobre neurônios corticais e límbicos. Outra ideia sugere que o aumento de TPH2 nessa região do encéfalo é uma resposta a situações estressantes, pois o estresse agudo regula a expressão de TPH2 no núcleo rostral da rafe (SULLIVAN *et al.*, 2010). Ademais, é possível que a exposição prolongada ao estresse durante o período pós-natal leve a morte de neurônios 5-HT e a diminuição da modulação serotonérgica (SULLIVAN *et al.*, 2010). Isso porque já foi revelado que a maior atividade serotonérgica durante o estresse leva a maior degradação da serotonina (KIYOHARA e YOSHIMASU, 2009). Além disso, o estresse crônico diminui a quantidade de serotonina disponível para uso, pois a taxa de síntese de 5-HT torna-se menor do que sua taxa de degradação (KIYOHARA e YOSHIMASU, 2009). Assim, é possível que o estresse crônico possa resultar na escassez funcional da supressão de serotonina (KIYOHARA e YOSHIMASU, 2009).

Somado aos fatores acima, é de conhecimento científico que a exposição animal a diferentes estressores pode aumentar o *turnover* (circulação) de serotonina no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo lateral (INOUE, TSUCHIYA e KOYAMA, 1994). No entanto, já foi revelado que o efeito desses diferentes tipos de estresse sobre a ativação do sistema serotonérgico pode estimular tanto as vias ansiogênicas, quanto as ansiolíticas, dependendo do tipo de receptores de serotonina estimulado (LEONARD, 2005). É sabido, por exemplo, que a inervação serotonérgica da amígdala e do hipocampo atua como mediador do efeito ansiogênico do neurotransmissor, ativando os receptores 5-HT_{2A}, enquanto a ativação do receptor 5-HT_{1A} no hipocampo suprime a expressão de eventos aversivos (GRAEFF *et al.*, 1993). Em situações de estresse crônico, por sua vez, a expressão dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} é alterada pela situação experimentada (LEONARD, 2005), diminuindo a densidade do subtipo 1A e aumentando a densidade do subtipo 2A (WATANABE *et al.*, 1993). Resumindo, é possível que a exposição indireta as dietas hiperlipídicas durante o período perinatal tenha influenciado a densidade dos receptores serotonérgicos em áreas do encéfalo, como amígdala e hipocampo.

8 Considerações finais

A exposição indireta a duas dietas hiperlipídicas de diferentes teores calóricos não influenciou o comportamento animal relacionado à ansiedade quando comparada a dieta controle. Com relação ao fármaco, ratos adultos jovens do grupo controle responderam a aplicação aguda da maior dose de fluoxetina (10mg/kg) de maneira diferente quando os testes comportamentais foram comparados entre si, diminuindo os comportamentos associados à ansiedade no campo aberto e no paradigma da exploração livre, e aumentando no labirinto elevado em cruz. Por sua vez, ratos adultos jovens DHH, nos três aparatos comportamentais avaliados, e ratos adultos jovens DHI, no campo aberto e no paradigma da exploração livre, foram resistentes à ação do fármaco, sugerindo diminuição da sensibilidade dos receptores serotoninérgicos as diferentes doses de fluoxetina, possivelmente em decorrência da exposição perinatal ao alto teor de lipídio e/ou caloria. Contudo, é importante salientar que as conclusões obtidas no campo aberto e no paradigma da exploração livre devem ser feitas com cautela, pois foram avaliados no máximo dois parâmetros desses testes.

Apesar do que foi exposto acima, os resultados expostos no presente trabalho representam apenas o início da avaliação da influência de dietas hiperlipídicas materna sobre a sensibilidade dos receptores serotoninérgicos. A adição de novos parâmetros espaço-temporais e etológicos às análises dos testes comportamentais (campo aberto, labirinto elevado em cruz e paradigma da exploração livre) permitirão o entendimento mais completo de como o alto teor de lipídio, durante o período perinatal, pode afetar o desenvolvimento da prole. Ademais, análises da expressão dos receptores serotoninérgicos de regiões do encéfalo como córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, hipotálamo e núcleo do estriado prometem esclarecer características desse sistema de neurotransmissão dos ratos provenientes dos diferentes grupos nutricionais.

Referências

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

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.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais DSM-5**: Porto Alegre: Artmed 2014.

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

ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1-2, p. 3-18, 2003.

ANDRADE, L. H. S. G. D.; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Rev. psiquiatr. clín.(São Paulo)**, p. 285-290, 1998.

ARAGAO RDA, S. et al. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents--a reproducibility study. **J Neurosci Methods**, v. 195, n. 2, p. 216-221, Feb 15 2011.

ARAÚJO, Á. C.; LOTUFO NETO, F. A nova classificação americana para os transtornos mentais: o DSM-5. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. 16, n. 1, p. 67-82, 2014.

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? **J Physiol**, v. 561, p. 355-377, 2004.

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

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, 2016a.

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, 2016b.

BALU, D. T. et al. Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. **Brain Res**, v. 1211, p. 37-43, May 23 2008.

BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, v. 261, n. 5, p. 412-417, May 2007.

BELLISARIO, V. et al. Gender-dependent resiliency to stressful and metabolic challenges following prenatal exposure to high-fat diet in the p66(Shc^{-/-}) mouse. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 285, 2014.

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 01 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. **Physiol Behav**, v. 56, n. 3, p. 623-628, Sep 1994.

BENTO-SANTOS, A. et al. Critérios para escolha da amostra em experimentos com ratos Wistar. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 1, n. 1, p. 121-129, 2012.

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

BLACKMON, K. et al. Structural evidence for involvement of a left amygdala-orbitofrontal network in subclinical anxiety. **Psychiatry Res**, v. 194, n. 3, p. 296-303, Dec 30 2011.

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.

BRANDÃO, M. L. et al. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 25, n. Supl II, p. 36-41, 2003.

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. **Nutritional Neuroscience**, p. 1-12, 2017.

CAN, O. D. et al. The effect of simvastatin treatment on behavioral parameters, cognitive performance, and hippocampal morphology in rats fed a standard or a high-fat diet. **Behav Pharmacol**, v. 23, n. 5-6, p. 582-592, Sep 2012a.

CAN, Ö. D. et al. The effect of simvastatin treatment on behavioral parameters, cognitive performance, and hippocampal morphology in rats fed a standard or a high-fat diet. **Behavioural pharmacology**, v. 23, n. 5 and 6, p. 582-592, 2012b.

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.

CAVALCANTE, T. C. F. et al. Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. **Lipids**, v. 48, n. 11, p. 1157-1168, 2013.

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.

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. **Behav Brain Res**, v. 261, p. 114-126, Mar 15 2014.

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.

CHRISTIAN, P. Micronutrients, birth weight, and survival. **Annual review of nutrition**, v. 30, p. 83-104, 2010.

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

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.

DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 20, n. 7, p. 398-399, 1964.

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. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 3, p. 458-462, 1997.

DIMITSANTOS, E. et al. Litter size affects emotionality in adult male rats. **Physiology & Behavior**, v. 92, n. 4, p. 708-716, 2007.

DOBBING, J. The effect of undernutrition on myelination in the central nervous system. **Neonatology**, v. 9, n. 1-6, p. 132-147, 1965.

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.

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.

FINGER, B. C.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. High-fat diet selectively protects against the effects of chronic social stress in the mouse. **Neuroscience**, v. 192, p. 351-360, Sep 29 2011.

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

GENTIL, V.; NETO, F. L. **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, 2007.

GIRIKO, C. A. 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.

GOES, T. C. et al. Comportamento de ratos Wistar no Paradigma da Exploração Livre. **Scientia Plena**, v. 9, n. 12, 2014.

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 01 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. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. suppl 1, p. s3-s6, 2007.

GRAEFF, F. G. et al. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1, p. 123-131, 1993.

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. **Behavioural Pharmacology**, v. 4, n. 6, p. 637-644, 1993a.

_____. 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 1993b.

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

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.

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.

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

HOEHN-SARIC, R. Neurotransmitters in anxiety. **Archives of General Psychiatry**, v. 39, n. 6, p. 735-742, 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.

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

_____. 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.

INOUE, T.; TSUCHIYA, K.; KOYAMA, T. Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 4, p. 911-920, 1994.

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.

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

KALIN, N. H.; SHELTON, S. E.; DAVIDSON, R. J. Role of the primate orbitofrontal cortex in mediating anxious temperament. **Biol Psychiatry**, v. 62, n. 10, p. 1134-1139, Nov 15 2007.

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.

KANG, S. S. et al. Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring. **Journal of neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 156, 2014.

KIYOHARA, C.; YOSHIMASU, K. Molecular epidemiology of major depressive disorder. **Environmental health and preventive medicine**, v. 14, n. 2, p. 71-87, 2009.

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.

KUHN, S.; SCHUBERT, F.; GALLINAT, J. Structural correlates of trait anxiety: reduced thickness in medial orbitofrontal cortex accompanied by volume increase in nucleus accumbens. **J Affect Disord**, v. 134, n. 1-3, p. 315-319, Nov 2011.

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

LEONARD, B. The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. **European Psychiatry**, v. 20, p. S302-S306, 2005.

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.

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

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

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther**, v. 46, n. 3, p. 321-340, 1990.

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.

MARKEL, A. L.; GALAKTIONOV YU, K.; EFIMOV, V. M. Factor analysis of rat behavior in an open field test. **Neurosci Behav Physiol**, v. 19, n. 4, p. 279-286, Jul-Aug 1989.

MARTINOWICH, K.; LU, B. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 73-83, Jan 2008.

MATEOS, S. S. et al. Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 104, n. 1, p. 52-59, 2009.

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, Nov 2015.

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, Feb 2015.

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

MENDEZ-DAVID, I. et al. Rapid anxiolytic effects of a 5-HT(4) receptor agonist are mediated by a neurogenesis-independent mechanism. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 6, p. 1366-1378, May 2014.

MISSLIN, R.; BELZUNG, C.; VOGEL, E. Behavioural Validation of a Light/Dark Choice Procedure for Testing Anti-Anxiety Agents. **Behavioural 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 and physiological psychology**, v. 48, n. 4, p. 254, 1955.

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.

MUNIZ, G. S. et al. Active maternal phenotype is established before breeding and leads offspring to align growth trajectory outcomes and reflex ontogeny. **Physiology & behavior**, v. 129, p. 1-10, 2014.

NADAL-VICENS, M.; CHYUNG, J. H.; TURNER, T. J. Pharmacology of Serotonergic and Central Adrenergic Neurotransmission. **Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy**, p. 207, 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.

NINAN, P. T. Recent perspectives on the diagnosis and treatment of generalized anxiety disorder. **AMERICAN JOURNAL OF MANAGED CARE**, v. 7, n. 11; SUPP, p. S367-S376, 2001.

OHLAND, C. L. et al. Western diet-induced anxiolytic effects in mice are associated with alterations in tryptophan metabolism. **Nutr Neurosci**, v. 19, n. 8, p. 337-345, Oct 2016.

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 01 2012.

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

PERANI, C. V. et al. High-fat diet prevents adaptive peripartum-associated adrenal gland plasticity and anxiolysis. **Sci Rep**, v. 5, p. 14821, Oct 07 2015.

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. **Psicol. teor. pesqui**, v. 18, n. 3, p. 329-335, 2002.

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. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

RAMBOZ, S. et al. 5-HT1B receptor knock out--behavioral consequences. **Behav Brain Res**, v. 73, n. 1-2, p. 305-312, 1996.

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.

RAYMOND, J. R. et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacology & therapeutics**, v. 92, n. 2, p. 179-212, 2001.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., 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**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov 1993.

RICE, D.; BARONE JR, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental health perspectives**, v. 108, n. Suppl 3, p. 511, 2000.

RICHARDSON-JONES, J. W. et al. 5-HT1A 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.

RODGERS, R.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801-810, 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. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 2, n. 4, p. 263-269, 1999.

RODRIGUEZ, J. S. 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**, v. 30, n. 2, p. 75-81, Apr 2012.

ROSEBOOM, P. H. et al. Predator threat induces behavioral inhibition, pituitary-adrenal activation and changes in amygdala CRF system gene expression. **NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY**, 2006. NATURE PUBLISHING GROUP MACMILLAN BUILDING, 4 CRINAN ST, LONDON N1 9XW, ENGLAND. p.S225-S225.

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. **Pharmacological reports**, v. 58, n. 2, p. 200, 2006.

SARKISYAN, G.; ROBERTS, A. J.; HEDLUND, P. B. The 5-HT(7) receptor as a mediator and modulator of antidepressant-like behavior. **Behav Brain Res**, v. 209, n. 1, p. 99-108, May 01 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.

SHALEV, U. et al. Long-term physiological and behavioral effects of exposure to a highly palatable diet during the perinatal and post-weaning periods. **Physiol Behav**, v. 101, n. 4, p. 494-502, Nov 02 2010.

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

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.

SORREGOTTI, T. et al. Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice. **Behav Brain Res**, v. 246, p. 76-85, Jun 01 2013.

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

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

SPIELBERGER, C. D.; SPIELBERGER, C. D. Theory and research on anxiety. **Anxiety and behavior**, v. 1, p. 3-20, 1966.

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.

TAYLOR, P.; POSTON, L. Developmental programming of obesity in mammals. **Experimental physiology**, v. 92, n. 2, p. 287, 2007.

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

TEIXEIRA-SILVA, F. et al. The anxiogenic video-recorded Stroop Color-Word Test: psychological and physiological alterations and effects of diazepam. **Physiol Behav**, v. 82, n. 2-3, p. 215-230, Sep 15 2004.

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

TRUMBO, P. et al. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, n. 3, p. 294-301, 2001.

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. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 16, p. S1-S7, 1990.

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.

VICENTE, M. A.; ZANGROSSI, H., JR. Involvement of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 127-135, Apr 2014.

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

WATANABE, Y. et al. Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors and transport sites for serotonin. **Brain research**, v. 615, n. 1, p. 87-94, 1993.

WESOLOWSKA, 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, Sep 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and other common mental disorders: global health estimates 2017**.

WRIGHT, T.; LANGLEY-EVANS, S. C.; VOIGT, J. P. The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. **Physiol Behav**, v. 103, n. 2, p. 164-172, May 03 2011.

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.

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em pesquisa



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 15 de dezembro de 2015.

Ofício nº 131/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Raul Manhaes de Castro**
Departamento de Nutrição
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.049825/2015-39

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **“Manipulação do sistema serotoninérgico: efeitos agudos sobre a ansiedade em filhotes de mães submetidas a dietas hiperlipídicas”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

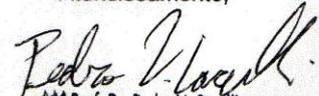
Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição – CCS/UFPE; Animais: ratos heterogênicos Wistar; idade; 60 dias; peso; 200-250g (reprodutores), 5,5-8,5g (filhotes ao nascimento); Nº total de animais a ser utilizado; 240 (195 machos e 45 fêmeas).

11/03/2015

Carolina Cadete Loureiro Cavalcanti

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

Anexo B – Análise das dietas hiperlipídicas

 INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO - IPA Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE PLANTA, RAÇÃO E ÁGUA - LAPRA BOLETIM DE ANÁLISE DE RAÇÃO										
INTERESSADO		Raquel da Silva Aragão								
PROCEDÊNCIA		UFPE								
MUNICÍPIO		Recife		QUANTIDADE DE AMOSTRA			02		MATERIAL	Ração animal
REMESSA		028		DATA DE ENTRADA			11/12/2015		DATA DE SAÍDA	17/12/2015
Nº AMOSTRA	REFERÊNCIA	MS Matéria Seca (105 °C) %	MM Matéria Mineral %	NT Nitrogênio Total %	PT Proteína Total %	FDA Fibra Detergente Ácido %	FDN Fibra Detergente Neutro %	ENN Extrato não Nitrogenado %	FT Fibra Total %	EE Extrato Etéreo %
646	Dieta Hiperlipídica C24	95,42	2,70	3,10	19,37	11,03	18,92	51,87	8,12	17,94
647	Dieta Hiperlipídica C19	95,67	2,66	3,12	19,50	4,71	6,70	45,46	6,15	26,23

De acordo com A.O.A.C. *Official Methods of Analysis. Association of Official Agricultural Chemists*. 18. ed. (2007)
 Obs.: Os resultados são expressos em matéria seca e se aplicam tão somente à amostra trazida pelo interessado.

Marilene Pimentel Ferreira
 Fábio César Teixeira de Santana
 ANALISTA

Dr. José de Paula Oliveira
 Dr.ª Arminda Saconi Messias
 RESPONSÁVEL TÉCNICO

Av. Gal. San Martín, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022 – CNPJ 10.912.293/0001-37
 Telefone: (081) 3184-7200 PABX: (81) 3184-7211 – Site: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br