



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA – TRINDADE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

TAMIRES GREGORIO

Efeitos da suplementação gestacional com vitamina D no comportamento emocional e no sistema serotoninérgico de ratas submetidas à programação fetal induzida por dexametasona

Florianópolis

2020

Tamires Gregorio

Efeitos da suplementação gestacional com vitamina D no comportamento emocional e no sistema serotoninérgico de ratas submetidas à programação fetal induzida por dexametasona

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dra. Fernanda Barbosa Lima

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gregorio, Tamires

Efeitos da suplementação gestacional com vitamina D no comportamento emocional e no sistema serotoninérgico de ratas submetidas à programação fetal induzida por dexametasona / Tamires Gregorio ; orientadora, Fernanda Barbosa Lima, 2020.

78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. Vitamina D. 3. Dexametasona. 4. Depressão. 5. Sistema serotoninérgico. I. Barbosa Lima, Fernanda . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

Tamires Gregorio

Efeitos da suplementação gestacional com vitamina D no comportamento emocional e no sistema serotoninérgico de ratas submetidas à programação fetal induzida por dexametasona

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e **aprovado** por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a Dra. Pâmela Billing Mello Carpes (membro titular)
Universidade Federal do Pampa

Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (membro titular)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Andrei Mayer de Oliveira (membro suplente)
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Prof^a Dra. Fernanda Barbosa Lima
Coordenação do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico
em Ciências Fisiológicas - UFSC

Prof^a Dra. Fernanda Barbosa Lima
Orientadora

Florianópolis

2020

À minha avó Alzira, à minha mãe Silvia, ao meu pai Gilmar (*in memoriam*), ao meu irmão Gabriel e ao meu tio Luiz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar meus passos e sempre estar ao meu lado para enfrentar todos os desafios.

Agradeço a minha mãe Silvia, ao meu irmão Gabriel, minha avó Alzira e ao meu tio Luiz. Obrigada por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Sem vocês nada disso seria possível!

Ao meu pai Gilmar, que mesmo não estando mais entre nós, sempre me encorajou a seguir em frente.

À avó Nena, por sempre me colocar em suas orações.

À toda a Pavoada, obrigada por sempre estarem presentes em todos os momentos e por fazer meus dias ainda mais felizes.

Aos Bozelinhos, por sempre demonstrarem tanto carinho, amor e união.

À minha orientadora, professora Dra. Fernanda Barbosa Lima. Agradeço por mais uma vez acreditar e confiar em mim, por deixar eu trilhar novamente os caminhos da ciência no LENEC. Você me ensina diariamente e vai muito além da pesquisa. Só tenho a agradecer por todo o carinho e conhecimento durante esse tempo. Muito obrigada!

Ao meu amigo Flaviano, por estar ao meu lado todos os dias e dizer que eu posso sempre mais. Agradeço por todo o conhecimento e paciência que mostrou comigo desde a iniciação científica. Obrigada por confiar em mim e ser muito mais que um colega de laboratório! Você é incrível!

Às IC's Fernanda e a Rafaela, por toda a ajuda e comprometimento com a ciência, por sempre estarem presentes e deixarem os dias no laboratório ainda mais descontraídos.

Ao Ricardo e a Luiza, por mais que por pouco tempo juntos, colaboraram grandemente para essa pesquisa.

Aos demais integrantes do LENEC, obrigada pela parceria de sempre, seja nos cafés ou na pesquisa.

Ao professor Dr. Gustavo Jorge dos Santos, por todo o apoio, material e disponibilidade para auxiliar nos experimentos.

Ao professor Dr. Alex Rafacho, por sanar inúmeras dúvidas, ceder materiais e estar sempre disposto a ajudar no que fosse necessário.

À professora Dra. Cilene Lino de Oliveira, pelos materiais cedidos e sempre estar disposta a ajudar.

Ao professor Dr. Wagner L. Reis, por todo o auxílio e dedicação para realizar da melhor maneira os experimentos.

À professora Dra. Renata Maria Lataro, pelas ajudas durante todo o percurso, por ser minha parecerista e pelas considerações a este trabalho.

À professora Dra. Elisa Cristiana Winkelmann Duarte por todo o auxílio e materiais.

À professora Dra. Lígia, que esteve sempre disposta a ajudar.

Aos técnicos do laboratório de Anatomia e Histologia da UFSC.

Ao meu primo Jonatan, por todas as conversas e RU de sempre.

À minha amiga Nagilla, que mesmo de longe sempre esteve comigo em todos os momentos.

Ao João, que muitas vezes estava no laboratório nos ajudando e por todo o apoio.

Às meninas que me acolheram no retorno à Floripa, Giovana, Rafaela, Patrícia e Fernanda, obrigada pela estadia e por sempre estarem comigo dando boas gargalhadas.

Às meninas que moram/moravam comigo, Carol, Silvia, Andriele, Beatriz e Karine. Vocês tornam os dias mais leves, obrigada sempre!

À Laís Alflen, por toda a parceria nos dias de Western Blotting.

Aos integrantes do LIDoC, por todo o apoio e risadas durante esse período.

Às meninas da fisiologia, Sara, Thais, Liana e Fran, obrigada por tudo.

Aos amigos que fiz em Belo Horizonte, vocês tornaram esse período ainda mais incrível.

À banca avaliadora, que se dispuseram a estar presente e por todas as sugestões a este trabalho.

Ao LabNeC, ao Laboratório de Virologia Aplicada e ao GEIMM por todo o auxílio.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), por todo o apoio para a realização deste trabalho.

À UFSC pelas instalações físicas que possibilitaram esse trabalho e por ser um ambiente que privilegia o conhecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – UFSC pela oportunidade.

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos animais que mesmo sem entender, possibilitaram este trabalho.

“Diga-me eu esquecerei, ensina-me e eu poderei lembrar, envolva-me e eu aprenderei”.

Benjamin Franklin (1706-1790)

RESUMO

A dexametasona (DEX) é um glicocorticoide sintético (GC) que altera a neuroquímica do cérebro fetal, o que pode levar a distúrbios emocionais na vida adulta. A vitamina D (VitD) tem sido usada para atenuar os efeitos nocivos dos GC, principalmente por estimular o desenvolvimento neural do feto. Aqui, analisamos se a suplementação gestacional de VitD melhora as respostas emocionais relacionadas à depressão e anedonia na prole de ratas adultas que foram expostas à programação fetal induzida por DEX. Considerando que o sistema neurotransmissor serotoninérgico é um dos principais responsáveis pela regulação do comportamento emocional, avaliamos os efeitos da programação fetal induzida pela DEX sobre componentes do sistema serotoninérgico central e o possível papel protetor da VitD nesse processo. Também investigamos se os efeitos da VitD ocorrem de maneira tempo-dependente. Ratas Wistar grávidas foram tratadas com DEX ou veículo em água potável (por via oral) (0,1 mg / kg) durante o terço final da gravidez (14^o ao 19^o) + VitD (500 UI / dia) ou veículo durante toda a gestação. Os filhotes foram avaliados aos 3, 6 e 12 meses pós-natal (MPN). As fêmeas foram divididas em 4 grupos (n = 7-10 / grupo): CTL, DEX, VitD e DEXVitD. Anedonia e comportamentos do tipo-depressivo foram avaliados no teste de preferência pela sacarose (TPS) e no teste do nado forçado (TNF), respectivamente. Além disso, foi avaliada a expressão proteica de triptofano hidroxilase (TPH), receptor de serotonina (5-HT_{1A}), transportador de serotonina (SERT) e receptor de glicocorticoides (GR) no núcleo dorsal da rafe (NDR), por meio de Western Blotting. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina, protocolo número 7174170417. O tratamento pré-natal com VitD concomitante à DEX aumentou a preferência à sacarose aos 12 MPN. Com relação ao TNF, aos 3 MPN a VitD diminuiu a duração da imobilidade apenas no grupo DEXVitD. Já aos 12 MPN a VitD reduziu a duração da imobilidade no grupo VitD, mas nas ratas expostas à DEX houve efeito oposto, com aumento da duração. Além disso, a latência para a imobilidade foi aumentada pela suplementação pré-natal com VitD aos 6 e 12 MPN. Entretanto, quando os animais receberam tratamento pré-natal concomitante de DEX e VitD, a DEX impediu esse efeito da VitD aos 12 MPN. O comportamento proativo de natação foi alterado apenas aos 12 MPN, quando a VitD pré-natal aumentou a duração desse parâmetro. A latência para esse comportamento foi reduzida pela DEX pré-natal aos 3 MPN apenas nos animais sem tratamento prévio com VitD. Nem a DEX, nem a VitD alteraram o comportamento proativo de escalada. O tratamento pré-natal com DEX reduziu a expressão proteica de TPH e 5-HT_{1A} no NDR de fêmeas aos 6 MPN, mas não aos 12 MPN, não havendo efeito da VitD. Nosso trabalho mostrou que o tratamento pré-natal com DEX produz mudanças no comportamento emocional na vida adulta que podem ser resultado da redução de alguns componentes serotoninérgicos no NDR. No mesmo contexto, a suplementação gestacional com VitD apresentou ação neuroprotetora contra parte dos efeitos causados pela programação fetal da DEX, entretanto esta ação não parece ocorrer via modulação do sistema serotoninérgico no NDR.

Palavras-chave: dexametasona, vitamina D, programação fetal, serotonina, depressão, núcleo dorsal da rafe.

ABSTRACT

Dexamethasone (DEX) is a synthetic glucocorticoid (GC) that alters the neurochemistry of the fetal brain, which can lead to emotional disorders in adulthood. Vitamin D (VitD) has been used to reduce the harmful effects of GC, mainly by stimulating fetal brain development. Here, we analyzed whether the gestational supplementation of VitD improves the emotional responses related to anhedonia and depression in the female adult offspring exposed to fetal programming induced by DEX. Considering that the serotonergic neurotransmitter system is one of the main responsible for the regulation of emotional behavior, we evaluated the effects of fetal programming induced by DEX on components of the central serotonergic system, and the possible protective role of VitD in this process. We also tested whether the effects of VitD occur in a time-dependent manner. Pregnant Wistar rats were treated with DEX or vehicle in drinking water (0.1 mg / kg) during the final third of pregnancy + VitD (500 IU / day) or vehicle during the whole pregnancy. The pups were evaluated at 3, 6 and 12 postnatal months (PNM). The female offspring were divided into 4 groups (n = 7-10 / group): CTL, DEX, VitD and DEXVitD. Anhedonia and depressive behaviors were assessed in the sucrose preference test (SPT) and the forced swimming test (FST), respectively. In addition, the protein expression of tryptophan hydroxylase (TPH), serotonin receptor (5-HT_{1A}), serotonin transporter (SERT) and glucocorticoid receptor (GR) were evaluated in the dorsal raphe nucleus (DRN), using Western Blotting technique (Ethics Committee on Animal Use, Federal University of Santa Catarina, protocol number 7174170417). Prenatal treatment with VitD concomitant to DEX increased the preference for sucrose in females at 12 PNM. Regarding the FST, gestational supplementation with VitD decreased immobility time at 3 PNM in the DEXVitD group. However, although prenatal VitD reduced immobility time in the VitD group at 12 PNM, there was an opposite response in rats exposed to prenatal DEX, which showed an increased immobility time. In addition, latency to immobility was increased by prenatal supplementation with VitD at 6 and 12 PNM. Still, the concomitant treatment DEX suppressed the VitD effect at 12 PNM. The proactive swimming behavior was changed only at 12 PNM, when prenatal VitD increased the duration of this behavior. The latency for this parameter was reduced by prenatal exposure to DEX at 3 PNM only in rats without prenatal supplementation of VitD. Neither DEX nor VitD affected the proactive behavior of climbing. Prenatal treatment with DEX reduced the protein expression of TPH and 5-HT_{1A} in the DRN of females at 6 PNM, but not at 12 PNM, but there was no effect of VitD. Our work showed that prenatal treatment with DEX produces changes in the adult emotional behavior that might be due to a reduction of serotonergic components in the DRN. In this context, supplementation with VitD during pregnancy was neuroprotective against the effects caused by the prenatal exposure to DEX, but this effect does not seem to occur by modulation of the serotonergic system in the DRN.

Keywords: dexamethasone, vitamin D, fetal programming, serotonin, depression, dorsal raphe nucleus.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos primários, secundários e suas diluições.	40
Tabela 2. Resultados da média e desvio padrão para o teste de preferência pela sacarose dos animais estudados aos 3, 6 e 12 MPN.	73
Tabela 3. Resultados da ANOVA de duas vias para preferência pela sacarose dos animais estudados aos 3, 6 e 12 MPN.....	73
Tabela 4. Resultados da média e desvio padrão da duração das variáveis etológicas avaliadas no TNF (imobilidade, nado e escalada) aos 3, 6 e 12 MPN.....	73
Tabela 5. Resultados da ANOVA de duas vias da duração das variáveis etológicas avaliadas no TNF (imobilidade, nado e escalada) aos 3, 6 e 12 MPN.....	74
Tabela 6. Resultados da média e desvio padrão da latência das variáveis etológicas avaliadas no TNF (imobilidade, nado e escalada) aos 3, 6 e 12 MPN.....	75
Tabela 7. Resultados da ANOVA de duas vias da latência das variáveis etológicas avaliadas no TNF (imobilidade, nado e escalada) aos 3, 6 e 12 MPN.....	75
Tabela 8. Resultados da média e desvio padrão da frequência das variáveis etológicas avaliadas no TNF (imobilidade, nado e escalada) aos 3, 6 e 12 MPN.....	76
Tabela 9. Resultados da ANOVA de duas vias da frequência das variáveis etológicas avaliadas no TNF (imobilidade, nado e escalada) aos 3, 6 e 12 MPN.....	76
Tabela 11. Resultados da ANOVA de duas vias da expressão de TPH, 5-HT _{1A} , SERT e GR (respectivamente) nas fêmeas aos 6 e 12 MPN.	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do mecanismo de ação dos GC na célula.	17
Figura 2. Esquema da síntese e secreção de serotonina.	22
Figura 3. Síntese e catabolismo da 1,25(OH)2D.	25
Figura 4. Mecanismo de ação da 1,25(OH)2D.	26
Figura 5. Mecanismo de ação da 1,25(OH)2D no sistema serotoninérgico.	29
Figura 6. Desenho esquemático da divisão dos tratamentos realizados nas gestantes e separação dos animais para o seguimento do experimento.	33
Figura 7. Desenho experimental.	34
Figura 8. Desenho esquemático do teste de preferência pela sacarose	35
Figura 9. Desenho esquemático dos comportamentos analisados no TNF.	37
Figura 10. Localização do núcleo dorsal da rafe em encéfalo de roedor.	38
Figura 11. Preferência pela sacarose aos 3, 6 e 12 MPN	41
Figura 12. Duração e latência do comportamento de imobilidade durante o teste do nado forçado aos 3, 6 e 12 MPN	42
Figura 13. Duração e latência do comportamento de nado durante o teste do nado forçado aos 3, 6 e 12 MPN.	43
Figura 14. Duração e latência do comportamento de escalda durante o teste do nado forçado, aos 3, 6 e 12 MPN	44
Figura 15. Densidade óptica relativa do conteúdo proteico de TPH2, 5HT1A, SERT e GR no núcleo dorsal da rafe de fêmeas aos 6 MPN e aos 12 MPN.	46
Figura 16. Frequência do comportamento de imobilidade, nado e escalada durante o teste do nado forçado, aos 3, 6 e 12 MPN.	72
Figura 17. Certificado de aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais.	79

LISTA DE SIGLAS

- 1,25 diidroxicolecalciferol-** Calcitriol ou 1,25(OH)₂D
- 11β-hidroxilase-** 11β hidroxisteroide desidrogenase
- 25(OH)D-** calcidiol ou 25-hidroxicolicalciferol
- 5HIAA-** ácido hidróxilacético
- 5-HT-** serotonina
- 5-HT_{1A}-** receptor de serotonina do tipo 1
- 5-HT₃-** receptor de serotonina do tipo 3
- ACTH-** hormônio adrenocorticotrófico
- ADH-** vasopressina
- BDNF-** Brain-derived neurotrophic factor
- CRH-** hormônio liberador de corticotrofina
- CTL-** controle
- CY27A1-** enzima mitocondrial 24-hidroxilase
- CY27B1-** 1α-hidroxilase
- DA-** dopamina
- DBP-** proteína ligadora de vitamina D
- DEX-** dexametasona
- DEXVitD-** tratamento concomitante com dexametasona e vitamina D
- DHEA-** dehidroepiandrosterona
- DNA-** ácido desoxirribonucleico
- DOHaD-** estudo da origem e desenvolvimento da saúde e doença
- FGF23-** fator de crescimento do fibroblasto
- GC-** glicocorticoides
- GR-** receptor de glicocorticoides
- GRE-** elemento responsivo aos glicocorticoides
- HHA-** hipotálamo-hipófise-adrenal
- HSP-** proteínas de choque térmico
- LAMEB-** Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
- MAO-A-** monoamina oxidase A

MPN- meses pós-natal

NGF- fator de crescimento nervoso

NcoR- nuclear receptor copressor

MARRS- *membrane associated rapid response steroid-binding receptor*

OMS- Organização Mundial da Saúde

PN- pós-natal

PTH- paratormônio

PVN- núcleo paraventricular do hipotálamo

RNA- ácido ribonucleico

RT-PCR-RT- transcriptase reversa- reação em cadeia da polimerase em tempo real

RXR- receptor retnoide

SERT- transportador de serotonina

SNC- sistema nervoso central

SRC- steroid receptor coativador

TGF- β 1- transforming growth factor-1

TNF- teste do nado forçado

TPH2- triptofano hidroxilase do tipo 2

TPS- teste de preferência pela sacarose

UV-B- fótons ultravioleta B

VDR- receptor de vitamina D

VDRE- elemento responsivo a vitamina D

VitD- vitamina D

VMAT- transportador de monoaminas vesicular

WB- Western Blotting

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Gestação e os glicocorticoides	16
1.2	Efeitos Neurais dos glicocorticoides.....	20
1.3	Vitamina D.....	24
1.4	Justificativa	30
2	OBJETIVO GERAL	31
2.1	Objetivos específicos	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Grupos experimentais	32
3.2	Protocolo de acasalamento.....	32
3.3	Tratamento com dexametasona e suplementação com vitamina D ₃	33
3.4	Desenho Experimental	34
3.5	Testes Comportamentais.....	35
3.5.1	Teste de Preferência pela Sacarose	35
3.5.2	Teste do Nado Forçado	35
3.6	Eutanásia.....	37
3.7	Microdissecção do núcleo dorsal da rafe (NDR) - Técnica de Punch.....	38
3.8	Técnica de Western Blotting.....	38
3.9	Análise Estatística.....	40
4	RESULTADOS	41
4.1	Teste de Preferência pela Sacarose aos 3, 6 e 12 meses pós-natal	41
4.2	Teste do Nado Forçado aos 3, 6 e 12 meses pós-natal	41
4.3	Western Blotting aos 6 e 12 meses pós-natal.....	45
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO	56
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8	ANEXO	71
8.1	Frequência no Teste do Nado Forçado	71
8.2	Resultados ANOVA de duas vias	73
8.3	Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gestação e os glicocorticoides

O sistema nervoso central (SNC) regula a síntese de cortisol (em humanos) e corticosterona (em roedores), pois através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) ocorre a modulação da síntese e secreção dos glicocorticoides (GC). O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) é o responsável pela produção e liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina (ADH). A presença destes hormônios incita a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) através da hipófise anterior, promovendo então a síntese e secreção de cortisol ou de corticosterona pelas glândulas adrenais [para revisão ver (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009)].

A maior parte do cortisol que é liberado pelas glândulas adrenais (cerca de 90%) encontra-se no plasma ligado a albumina ou a globulina ligante de corticosteroide, a transcortina. O restante consegue atravessar livremente a membrana plasmática das células e se ligar ao receptor de glicocorticoides (GR) (COOLENS; VAN BAELEN; HEYNS, 1987). Os GR são um fator de transcrição dependente de ligante, pertencente à família dos receptores nucleares (VAN DER LAAN; MEIJER, 2008). Essa ligação faz com que ocorra uma alteração na conformação nas proteínas do GR, na qual possibilita que este complexo formado pelo ligante e o receptor possam comunicar-se com cofatores e ao elemento responsivo ao glicocorticoide (GRE), definidos por sequências específicas no DNA, incluindo regiões promotoras do gene alvo (ZHANG et al., 2004).

Existem duas isoformas de GR, sendo a α e a β muito semelhantes, porém a isoforma do tipo β é inativa, ou seja, inapta a se ligar aos GC e ativar a transcrição gênica para que haja os efeitos dos GC (CHARMANDARI; KINO; CHROUSOS, 2004; GIGUÈRE et al., 1986). Quando não está ligado ao GC, o GR fica inativo no citoplasma celular, ligado a proteínas de choque térmico (HSP) que evitam que os GR alterem qualquer estrutura do DNA e permitem que com essa estrutura adquira uma forma tridimensional, pronta para a ligação com o GC (BUTTGEREIT; WEHLING; BURMESTER, 1998). Após os GC entrarem na célula, o receptor então se dissocia das HSP e fica livre para se ligar ao GC. Quando ligados, este complexo se desloca até o núcleo celular e se liga ao GRE e fatores de transcrição, iniciando a transcrição gênica (BUTTGEREIT; WEHLING; BURMESTER, 1998) (Fig. 1).

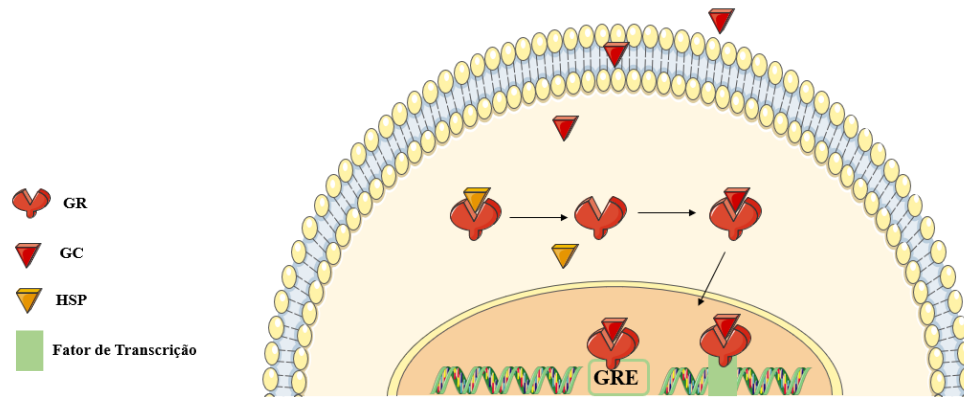


Figura 1. Esquema do mecanismo de ação dos GC na célula. Adaptado de Longui, 2007.

Não só os GC endógenos, mas também os sintéticos, como a dexametasona (DEX) e a betametasona, possuem uma alta afinidade pelos GR, fazendo com que tenham um importante papel em respostas anti-inflamatórias e imunossupressoras, atuando principalmente pela indução ou repressão da transcrição gênica (RHEN; CIDLOWSKI, 2005; STAHN; BUTTGEREIT, 2008). Isso permite que estes fármacos sejam utilizados para o controle de ações inflamatórias em diversas enfermidades, dentre elas, a psoríase, eczema, inflamações (KADMIEL; CIDLOWSKI, 2013) e leucemias (LIN; WANG, 2016), bem como para a imunossupressão após transplantes de órgãos (COUTINHO; CHAPMAN, 2011). Porém, essa alta afinidade aos GR, os GC sintéticos assemelham-se a um efeito de exposição em longo prazo a altos níveis de GC, podendo resultar em alguns efeitos colaterais adversos como hipertensão, diabetes mellitus, glaucoma, osteoporose e transtornos psíquicos (SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002).

Como falado anteriormente, os GC podem agir em diversos sistemas no organismo, principalmente relacionados ao SNC, cardiovascular, reprodutivo (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000) e também durante a gestação (BUSADA; CIDLOWSKI, 2017), o que pode levar a alterações no desenvolvimento da prole. A gravidez é um processo fisiológico em que o corpo da mãe passa por diversas mudanças desde a fecundação. Com isso, o organismo feminino começa a se preparar para desenvolver uma vida, alterando principalmente o SNC e endócrino abruptamente. Alterações inadequadas durante o período gestacional, como por exemplo: mudanças com o cuidado materno, estresse ou administração exógena de GC podem alterar o desenvolvimento do fetal repercutindo em alterações físicas e comportamentais na prole na vida adulta [para revisão ver (BUSADA; CIDLOWSKI, 2017)].

Os GC no adulto, regulam inúmeros processos biológicos, englobando o metabolismo energético, no sistema cardíaco, em processos de inflamação e imunidade. Além disso, os GC são essenciais durante a gestação e no desenvolvimento fetal. Os GC séricos aumentam rapidamente nas últimas semanas de gravidez, auxiliando o feto na vida pós-natal. Porém, quando esse aumento de GC é insuficiente, pode ser fatal para o desenvolvimento do feto, principalmente por prejudicar o desenvolvimento pulmonar. Por outro lado, o excesso de GC provenientes do estresse materno crônico ou do tratamento pré-natal com GC sintéticos podem alterar o crescimento fetal e também levar ao aparecimento de doenças na vida adulta da prole [para revisão ver (BUSADA; CIDLOWSKI, 2017)]. Mães que correm o risco de terem um parto prematuro, também são tratadas com GC, os quais são necessários para o desenvolvimento do surfactante pulmonar e além disso, auxiliam na formação de alguns órgãos, como por exemplo, a tireoide, rins, cérebro e a hipófise (FOWDEN; LI; FORHEAD, 1998). Além disso, ainda durante a gestação, mães cujos fetos podem apresentar hiperplasia adrenal congênita também são tratadas com GC sintético (LAJIC; NORDENSTRÖM; HIRVIKOSKI, 2008).

A sinalização dos GC ao longo de toda a gestação é complicada, pois depende do momento, da intensidade e a duração do sinal de para suprir o desenvolvimento adequado do feto. Em humanos, a sinalização de GC ocorre em três tempos durante o desenvolvimento embrionário e fetal, mudando as concentrações séricas de GC [para revisão ver (BUSADA; CIDLOWSKI, 2017)].

Num primeiro momento, a sinalização de GC ocorre no início da gravidez e auxilia na implantação do embrião, na decídua e suprime o sistema imunológico da mãe para que não ocorra a rejeição da implantação (MASTORAKOS et al., 1996). Uma nova de sinalização de GC vai ocorrer durante a 7^o e 14^o semana do desenvolvimento fetal em humanos, mas não em roedores (GOTO et al., 2006). Neste período, os GC começam a ser produzidos em resposta ao eixo HHA que está sendo desenvolvido e são necessários suprimir a produção adrenal de dehidroepiandrosterona (DHEA) e auxiliar no desenvolvimento da glândula adrenal (GOTO et al., 2006). O terceiro aumento dos níveis de GC endógenos, vai acontecer no terço final da gestação, em humanos e roedores. As glândulas suprarrenais fetais começam a produzir GC na semana 24 em humanos e a partir do dia 15 em camundongos, e há um aumento na circulação fetal de GC, alcançando concentrações maiores entre a 38^o e 40^o semana de gestação. Sendo este pico de GC necessário, principalmente, para a maturação pulmonar (LOCKWOOD et al., 1996; MESIANO; JAFFE, 1997).

Apesar dos benefícios dos GC durante o período gestacional, a exposição excessiva a eles pode ser prejudicial tanto para a mãe quanto para o feto. A gestação é um período crítico, onde diversos fatores podem interferir na estabilidade da homeostase materna e principalmente no desenvolvimento fetal [para revisão ver (VAN BEL; HEIJNEN, 2009)].

Em diversos estudos animais, já foi visto que a exposição pré-natal aos GC, foi relacionado com o aparecimento de diversas mudanças físicas e comportamentais, como restrição do crescimento intrauterino (MOSS et al., 2001), intolerância à glicose (NYIRENDA et al., 1998), diminuição da função renal (DICKINSON et al., 2007), alterações no funcionamento do eixo HHA e funções cardíacas na prole na vida adulta (DE VRIES et al., 2007). Além disso, comportamentos do tipo ansioso foi mais comum na prole em que a progenitora foi tratada com DEX (HOUGAARD et al., 2005). Contudo, o corpo materno passa por mudanças que permitem a proteção do feto ao excesso de GC. Uma das principais mudanças é a presença da 11- β hidroxisteroide desidrogenase do tipo 2 (11 β -hidroxilase-2), uma enzima placentária que inativa o cortisol materno (EDWARDS et al., 1993; MEANEY; SZYF, 2005), deixando o feto menos exposto ao cortisol materno (BENEDIKTSSON et al., 1997). No entanto, os GC sintéticos, como a DEX não são afetados por esta enzima, passando livremente para o feto através da placenta (BRUSCHETTINI et al., 2006) e expondo o mesmo a elevadas concentrações de GC.

Estudos já vem demonstrando que a redução da atividade da 11 β -hidroxilase-2 resulta em altos níveis de GC que ao atingirem o feto, pode levar ao retardo do crescimento e maior susceptibilidade ao aparecimento de doenças (BENEDIKTSSON et al., 1997; EDWARDS et al., 1993). Corroborando essa hipótese, outros estudos mostram que mulheres com baixa função enzimática da 11 β -hidroxilase-2, apresentam fetos com peso baixo ao nascer, comparados àquelas que em que a atividade da enzima era considerada normal (TERNAN et al., 2001). Neste contexto, considerando-se que a DEX não sofre a ação protetora da 11 β -hidroxilase-2, o uso excessivo de DEX durante o período pré-natal tem sido utilizado como um modelo de restrição de crescimento intrauterina em roedores. É importante notar que a exposição precoce a altos níveis de GC na gestação pode levar a desordens psíquicas na vida adulta (THOMPSON et al., 2001), como por exemplo, ansiedade, dificuldade de aprendizagem e depressão (RÄIKKÖNEN et al., 2008; WÜST et al., 2005).

1.2 Efeitos Neurais dos glicocorticoides

A exposição pré-natal a elevadas taxas de GC interfere diretamente no desenvolvimento neural, o que como citado anteriormente, pode levar ao desenvolvimento de doenças psicológicas (HARRIS; SECKL, 2011), incluindo a depressão (MICHAEL et al., 1963).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017) a depressão é o transtorno mental mais comum em todo o mundo, sendo que mais de 300 milhões de pessoas são acometidas por essa doença. No entanto, o Brasil possui a maior incidência de depressão no continente latino-americano (OMS, 2017) e, a região sul apresenta o índice mais elevado dessa doença (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014). Apesar de já existirem tratamentos bastante consolidados, menos da metade da população afetada recebe recurso terapêutico ou sequer é diagnosticada corretamente. Além disso, a aderência ao tratamento vai reduzindo ao longo do tempo, seja pela falta de eficiência do mesmo, ou pelo tempo prolongado. Portanto, a depressão se caracteriza um problema importante de saúde pública (OMS, 2017).

Ainda, segundo a OMS (2017), mulheres são mais acometidas com os transtornos psíquicos. A depressão tem sido muito estudada, e em diversos trabalhos epidemiológicos, mostram que mulheres apresentam duas vezes mais prevalência quando comparada a homens (GALZIN et al., 1992; WEISSMAN et al., 1996). Além disso, na adolescência há sinais que o sexo feminino é mais suscetível a eventos estressantes provenientes do meio em que vivem quando comparado ao sexo masculino, mostrando maior prevalência ao aparecimento de sintomas associados à depressão (HANKIN; ABRAMSON, 2001).

Além disso, em modelos animais, já vem sendo demonstrado essa maior susceptibilidade de transtornos psiquiátricos no sexo feminino. Nos últimos tempos, o estudo da origem das doenças do desenvolvimento da saúde e da doença (DOHaD) vem sendo bastante estudada em diversos contextos. Um estudo publicado em 2016, que teve como objeto avaliar o comportamento do tipo ansioso e depressivo em roedores, mostrou que o tratamento pré-natal com DEX aumentava o comportamento do tipo depressivo e ansioso apenas em fêmeas (HIROI et al., 2016). Além disso, outro estudo publicado em 2016, mostrou que fêmeas de porcos da Guiné, apresentavam um aumento do comportamento do tipo ansioso quando comparado aos machos que também receberam o tratamento pré-natal com DEX (OWEN et al., 2011). Mostrando então, a susceptibilidade de fêmeas a desenvolverem transtornos psiquiátricos.

A serotonina 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma monoamina, que desempenha papel crucial na modulação da depressão, além de regular processos fisiológicos como sono, apetite e humor (ŽMUDZKA et al., 2018). Em 1967, Coppen demonstrou que o déficit de 5-HT é uma das principais causas da depressão, tornando o sistema serotoninérgico um alvo importante no tratamento de transtornos psiquiátricos (COPPEN, 1967).

A síntese de 5-HT se dá principalmente nos núcleos da Rafe, sendo o núcleo dorsal da rafe (NDR) (JACOBS; AZMITIA, 1992), o maior centro serotoninérgico, contendo grande parte dos neurônios de 5-HT no SNC em ratos (WIKLUND; RKLUND, 1980). Além disso, o NDR envia projeções serotoninérgicas para o córtex pré-frontal, septo lateral, estriado dorsal, córtex entorrinal, amígdala e o hipocampo ventral (AZMITIA; SEGAL, 1978; MCQUADE; SHARP, 2002; POMPEIANO; PALACIOS; MENGOD, 1994).

Sua produção se dá no neurônio pré-sináptico a partir do aminoácido triptofano, que é convertido a 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano-hidroxilase-2 (TPH2) (enzima limitadora para a biossíntese de 5-HT). O 5-hidroxitriptofano é então convertido em 5-HT pela ação da L-aminoácido descarboxilase. A partir disso, a 5-HT é encapsulada por vesículas sinápticas, através do transportador de monoaminas vesicular (VMAT). Assim, seguem até a membrana do neurônio pré-sináptico onde se fundem, através de um processo dependente de cálcio e então as moléculas de 5-HT são liberadas na fenda sináptica. Após sua liberação, a 5-HT fica livre para se ligar aos seus receptores ou ser recapturada pelo transportador SERT. Se recapturada pelo SERT, a 5-HT pode ser novamente encapsulada pelas vesículas sinápticas ou então sofrer a degradação pela enzima monoaminoxidase (MAO), formando ácido hidróxiindolacético (5-HIAA) (CHASE; MURPHY, 1973; HERVÁS; ARTIGAS, 1998) (Fig. 2).

Atualmente são conhecidos alguns subtipos de receptores de 5-HT, de 1 a 7. A maioria está acoplada a proteína G, com exceção do receptor 5-HT₃, que age por um canal iônico controlado por um ligante. Um dos receptores serotoninérgicos mais estudados, é o 5-HT_{1A}, que age como um receptor pré-sináptico inibitório, controlando a liberação de 5-HT na fenda sináptica (BAUER, 2015; CELADA; ARTIGAS, 1993). O receptor 5-HT_{1A} pré-sináptico é encontrado nos núcleos da rafe e os pós-sinápticos são distribuídos em regiões que recebem inervação serotoninérgica dos núcleos da rafe: o córtex frontal, septo, amígdala, hipocampo e hipotálamo (LESCH; GUTKNECHT, 2004; SHARP et al., 2007). Assim, o receptor 5-HT_{1A} também serve como um autoreceptor, podendo reduzir a taxa de disparo desses neurônios, a quantidade de 5-HT liberada por potencial de ação e conseqüentemente diminuindo a atividade

serotonérgica de suas áreas de projeção (SPROUSE; AGHAJANIAN, 1986; STAUDERMAN; JONES, 1985).

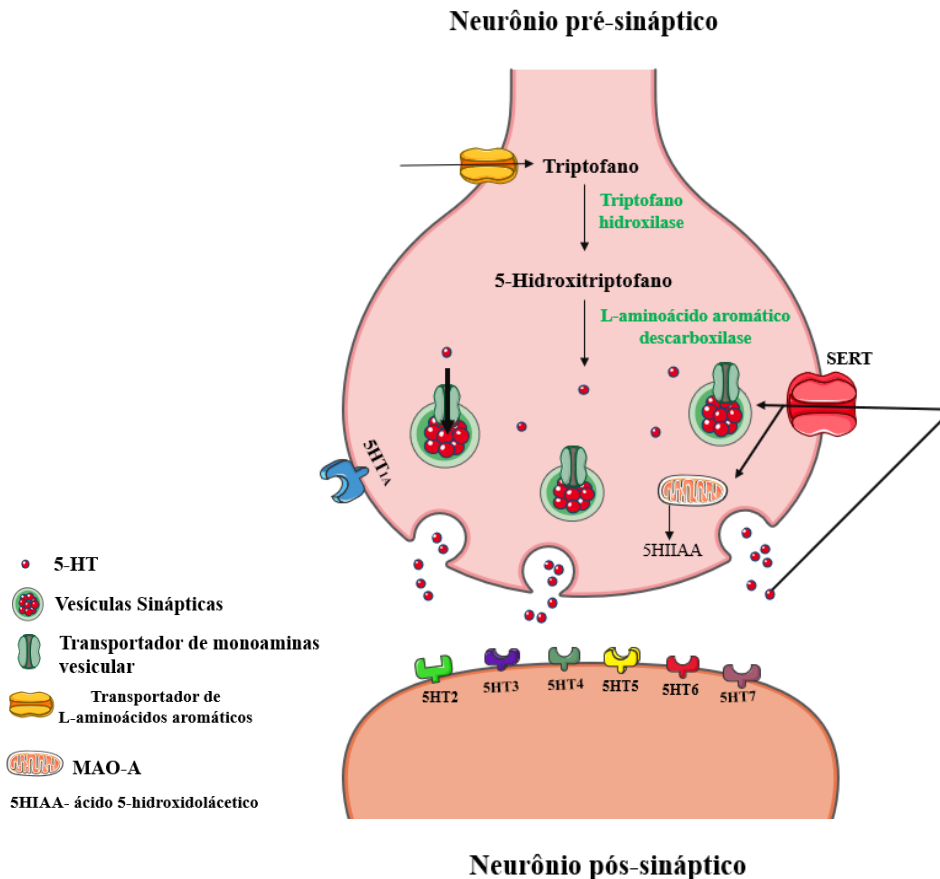


Figura 2. Esquema da síntese e secreção de serotonina. Adaptado de GOLAN, D. E. et. al. Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. 2ª ed. Guanabara Koogan, 2009.

De fato, já se sabe que a programação pré-natal com DEX na última semana de gestação em roedores provoca um aumento na expressão do SERT e conseqüentemente a diminuição de 5-HT na fenda sináptica (FUMAGALLI et al., 1996), deixando a prole mais susceptível ao desenvolvimento de depressão na vida adulta.

Altas concentrações de GC podem provocar um mecanismo celular estressor que reduz a atividade dos neurônios serotonérgicos e inibe a liberação de 5-HT em suas áreas de projeção (ADELL; CASANOVAS; ARTIGAS, 1997; KIRBY; ALLEN; LUCKI, 1995). Ainda, altos níveis de GC causam redução da cognição, associada à redução da atividade de neurônios do hipocampo (HUNTER et al., 2012) e redução da neurogênese no sistema límbico, podendo ser uma das causas da depressão (BANASR; DWYER; DUMAN, 2011).

Além da fonte materna de 5-HT que atravessa a barreira placentária e alcança o feto, a placenta ainda possui um mecanismo de produção da sua própria 5-HT utilizando o triptofano

materno, sendo sintetizada a partir da enzima placentária TPH1. Em roedores, a placenta também já produz 5-HT, sendo a principal fonte no cérebro fetal nos estágios iniciais do desenvolvimento (BONNIN et al., 2011). Portanto, a 5-HT secretada pela placenta é um fator importante para o desenvolvimento cerebral fetal e quando estímulos estressores na mãe interferem negativamente na síntese da 5-HT, a prole pode, na vida adulta, desenvolver transtornos psíquicos (ST-PIERRE et al., 2016). Do mesmo modo, uma desregulação na formação do sistema serotoninérgico fetal pode acarretar em mudanças durante o desenvolvimento, repercutindo na vida adulta, principalmente relacionado a saúde mental (PAQUETTE; MARSIT, 2014).

A 5-HT é expressa precocemente durante o desenvolvimento embrionário, sendo que em roedores, o aparecimento de TPH2, SERT e MAO-A no cérebro ocorre antes mesmo de neurônios serotoninérgicos. Humanos apresentam um modelo bastante semelhante, onde o aparecimento de SERT ocorre com 8 semanas de gestação e os corpos celulares de neurônios serotoninérgicos surgem no NDR em 15 semanas (SEIGER; OLSON, 1973).

Deste modo, visando encontrar um meio para que pudesse atenuar ou extinguir os efeitos causados pela DEX pré-natal, a vitamina D (VitD) vem sendo mostrada como um importante fator neuroprotetor, visto que a deficiência de VitD em diversos estágios da vida pode estar associada com alguns mecanismos cerebrais divergentes (KESBY et al., 2010).

A VitD é um hormônio pluripotente, com ações neurais que impedem a atrofia neural causada por GC (OBRADOVIC et al., 2006). Desta forma, estudos já mostram que ratos neonatais com deficiência de VitD apresentam uma anormalidade no desenvolvimento dos ventrículos laterais e diferenciação celular reduzida no encéfalo (EYLES et al., 2003). Ainda assim, níveis adequados de VitD são essenciais para o funcionamento neuropsiquiátrico do cérebro, além de uma associação entre baixos níveis de VitD e casos de depressão (PARKER; BROTHIE; GRAHAM, 2017). Neste sentido, no presente estudo hipotetizamos que a VitD poderia cessar ou ao menos atenuar os efeitos causados pela exposição aos GC durante a gestação.

1.3 Vitamina D

A VitD é reconhecidamente importante para a regulação da homeostase do metabolismo de cálcio e fosfato e vem sendo usada para o tratamento de osteoporose ocasionada por GC (COMPSTON, 2019). Nos seres humanos, a produção de VitD se dá de forma endógena, através da alimentação encontrada principalmente em peixes e de forma exógena em sua maioria, através da exposição solar (HOLICK, 2006).

A vitamina D₃ é encontrada na forma de 7-dehidrocolesterol (pró-vitamina D₃, precursor do colesterol). Ao longo da exposição solar, os fótons ultravioletas (UV-B) com energia entre 290 e 315nm estimulam a fotólise do 7-dehidrocolesterol até pré-vitamina D₃. Esta molécula é termoinstável e passa por uma reação de isomerização induzida pelo calor, assumindo uma configuração espacial mais estável, a vitamina D₃ (ou colecalciferol) ou isômeros biologicamente inativos (lumisferol e/ou taquisferol) (HOLICK; MACLAUGHLIN; DOPPELT, 1981). Assim, no plasma o colicalciferol é transportado através de uma glicoproteína ligadora de VitD (DBP) e futuramente passará por duas hidroxilações feitas por oxidases distintas. No fígado, a VitD é hidroxilada formando a 25-hidroxicolecalciferol (calcidiol ou 25(OH)D), através da enzima mitocondrial CYP27A1 e microsomal CYP2R1, chamada de 25 hidroxilase vitamina D. Apesar de ser encontrada em maior quantidade no organismo, esta molécula não é metabolicamente ativa, porém, serve como um marcador biológico para dosagem de VitD. A nível renal, especificamente nas mitocôndrias dos túbulos contorcidos proximais, ocorrerá a segunda hidroxilação pela ação da 1 α -hidroxilase (CYP27B1), onde o calcidiol é transformado a 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitriol ou 1,25(OH)₂D) sendo esta a molécula biologicamente ativa e com ações hormonais (HADDAD et al., 1986; HUNTER et al., 2012; JONES, 2007) (Fig. 3).

Além dos rins, a CYP27B1 é encontra em outros órgãos, como mama, próstata, cólon, células beta (β) pancreáticas, paratireoides e placenta. O paratormônio (PTH) sérico e o fósforo estimulam, nos rins, a liberação de CYP27B1, o que permite maior reabsorção de cálcio, enquanto o fator de crescimento do fibroblasto 23 (FGF23) inibe essa liberação (WÖHRLE et al., 2011). Nos outros órgãos, a 1,25 dihidroxicolecalciferol exerce funções autócrinas e parácrinas, sendo então independente de PTH, regulada principalmente por interleucina 1 (HEWISON, 2010).

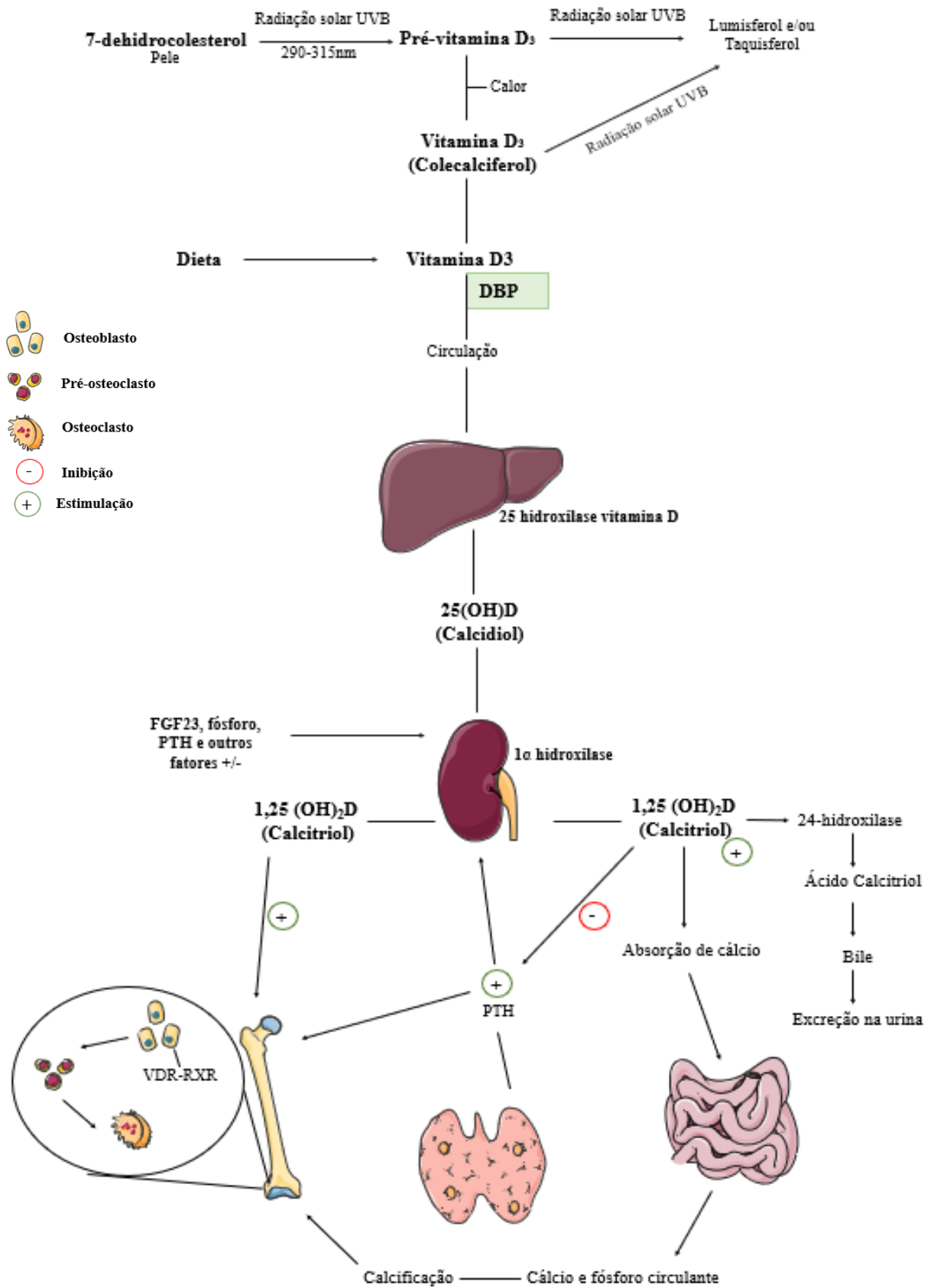


Figura 3. Síntese e catabolismo da 1,25(OH)₂D. Adaptado de Michael F. Holick, 2007.

Os efeitos biológicos da 1,25 (OH)₂D ocorrem por meio do receptor de VitD (VDR), que é um fator de transcrição pertencente à família dos receptores hormonais nucleares 1. O VDR é expresso em praticamente todas as células humanas, regulando cerca de 3% do genoma humano (BOUILLON et al., 2008). Apenas hemácias, células musculares estriadas maduras e células bastante diferenciadas do SNC, como as células de Purkinje não apresentam VDR (EYLES et al., 2005). A 1,25 (OH)₂D se liga a porção hidrofóbica do VDR, o que induz uma mudança conformacional e o desenvolvimento do complexo transcrricional hormônio-receptor (ROCHEL; HOURAI; MORAS, 2010). Este complexo age através da heterodimerização com uma das três isoformas do receptor do retnoide X (RXR), apresentando dois domínios específicos para a ligação da 1,25 (OH)₂D. Após a ligação e heterodimerização com o RXR, o complexo 1,25 (OH)₂D-VDR-RXR se liga a uma sequência específica do DNA nos seus genes-alvos denominados VDRE (*vitamin D response element*) e ativa a transcrição gênica (BOUILLON et al., 2008). Porém, para ocorrer a ativação ou a repressão gênica, já que o complexo heterodímero pode recrutar tanto moléculas corregulatórias ativadoras pertencentes a família SRC (*steroid receptor coativador*) quanto correpressoras, como o NcoR (*nuclear receptor corepressor*) do VDR, provocando assim a resposta biológica (MCKENNA; O'MALLEY, 2002) (Fig. 4).

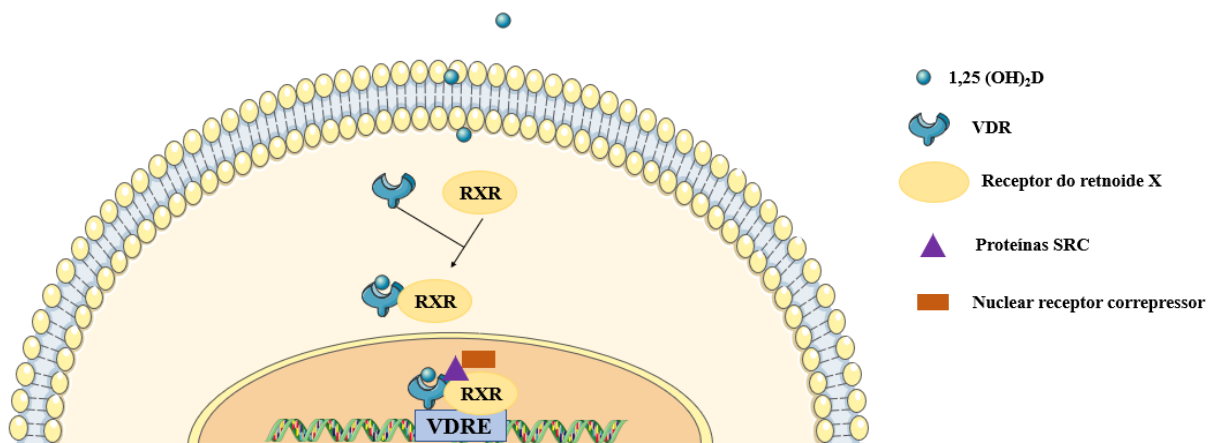


Figura 4. Mecanismo de ação da 1,25(OH)₂D. Adaptado de Bellan *et al.*, 2015.

O VDR, também apresenta respostas rápidas não genômicas, pela ligação da 1,25(OH)₂D com o VDR presente em invaginações da membrana celular ricas em esfingolípídeos e colesterol (HUHTAKANGAS et al., 2004). Assim, a sinalização intracelular acontece por meio da indução de canais voltagem-dependente de transporte de íons transmembrana (Ca⁺², Cl⁻), do controle do influxo e da quantidade de Ca⁺² no citosol e da

ativação de segundos mensageiros, como o AMP cíclico, proteína quinase A e fosfolipase C, respostas essas que acontecem entre alguns segundos a 60 minutos (NORMAN, 2006). Exemplos dessas ações rápidas não genômicas do VDR são a rápida absorção de cálcio pelo epitélio duodenal e a liberação de insulina pelas células β pancreáticas.

Contudo, o processo de catalisar a 25(OH)D e da 1,25(OH)₂D é feito através da enzima mitocondrial 24-hidroxilase (CYP24A1), presente em grandes quantidades nos rins e intestino, sendo sua expressão regulada pela 1,25(OH)₂D e pelo PTH (ZIEROLD; MINGS; DELUCA, 2003). A 24-hidroxilase converte a 25(OH)D em 24,25 dihidroxivitamina D considerado um metabólito inativo (REICHEL; KOEFFLER; NORMAN, 1989). Após o catabolismo da 1,25(OH)₂D em compostos hidrossolúveis, a VitD é excretada através da bile e da urina, sendo esse mecanismo essencial para prevenir a intoxicação por VitD e consequentemente ajudando na regulação da calcemia (HOLICK, 2007).

A função classicamente conhecida da VitD é no metabolismo mineral, tendo como alvos os ossos, intestino e glândulas paratireoides. Nos ossos, a VitD é responsável pela estimulação da osteoclastogênese e a também pela reabsorção do cálcio, sendo assim utilizada como um auxiliar no tratamento para osteoporose (HOLICK, 2007). No intestino, ela age através da entrada nos enterócitos a VitD aumenta a síntese de calbidina D9K na qual facilita o acesso de cálcio, consequentemente aumentando a sua absorção (COMPSTON, 2019). Já nas glândulas paratireoides, a queda da VitD estimula a síntese e a secreção do paratormônio (PTH), que impulsiona a secreção de CYP27B1, fazendo com que aumente as concentrações de calcitriol (PREMAOR et al., 2008). Entretanto, mais recentemente tem-se demonstrado outras funções importantes da VitD. Por exemplo, concentrações excelentes de VitD são essenciais para a função cerebral, pois ela tem papel fundamental na sinalização do cálcio para ações neurotróficas e neuroprotetoras, além de maturação, diferenciação e crescimento dos neurônios (GROVES; MCGRATH; BURNE, 2014).

Como falado anteriormente, a expressão de VDR se dá basicamente em todos os tecidos do organismo, incluindo pâncreas, coração, células do sistema imunológico e SNC (DI ROSA et al., 2012; EYLES et al., 2014; VEENSTRA et al., 1998), inclusive no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG), indicando um papel na função reprodutiva (EYLES et al., 2003; WRZOSEK et al., 2013), incluindo o período gestacional e o desenvolvimento do feto.

Em adultos, os níveis de VitD abaixo de 50nmol/L são considerados deficientes, entre 50nmol/L e 74nmol/L são considerados insuficientes e entre 75nmol/L e 100nmol/L níveis

suficientes (HOLICK, 2007; HOLICK et al., 2011). Gestantes também se enquadram nesses níveis, sendo que a deficiência de VitD abrange de 20% a 85% das mulheres, dependendo do país em que vivem, estação do ano, latitude, quantidade de melanina e entre outros (ADEKUNLE DAWODU; CAROL L WAGNER, 2007).

A deficiência de VitD em gestantes pode ocasionar alterações do desenvolvimento fetal, como a redução do peso em recém-nascido, desenvolvimento anormal do esqueleto fetal e o aborto (BAKER et al., 2010; PAFFONI et al., 2014). Além disso, esse déficit de VitD foi associado ao desenvolvimento mental, psicomotor (ZHU et al., 2015) e redução da cognição de crianças (HART et al., 2015). A VitD influencia na ativação de uma série de sistemas de transdução de sinal como o influxo do íon cálcio, liberação de cálcio das reservas intracelulares, modulação da adenilato ciclase, fosfolipase C, proteína cinase C, proteína cinase D e MAP cinase (HARMS et al., 2011; SHIPTON; SHIPTON, 2015), podendo interferir nos sistemas dos neurotransmissores como acetilcolina, 5-HT e dopamina (CASS et al., 2012; LUNDWALL et al., 2015; PATRICK; AMES, 2014), sendo que desregulações nesses sistemas de neurotransmissores pode levar ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos.

Alguns estudos em animais já demonstraram que a deficiência de VitD pode aumentar as chances de desenvolvimento de problemas cerebrais. Se levarmos em consideração o período neonatal, a deficiência de VitD afeta negativamente a diferenciação e a proliferação celular das células neurais, além de, dependente do momento da correção dos níveis de VitD, pode acarretar a persistência das alterações bioquímicas e comportamentais dos animais (EYLES; BURNE; MCGRATH, 2013).

Além disso, desde muito cedo, já vem sido demonstrado na literatura que a deficiência de VitD durante o período gestacional, principalmente no terceiro semestre, pode ser um fator de risco para o desenvolvimento do feto para o aparecimento de esquizofrenia na vida adulta (MCGRATH et al., 2004). Diante do todo, uma parcela relativamente grande é composta por pessoas de pele escura, pessoas que vivem em altas altitudes e em metrópoles, onde a duração à exposição solar é relativamente baixa e conseqüentemente apresentam deficiência de VitD, apresentam um alto índice de esquizofrenia (MCGRATH et al., 2004)(HARMS et al., 2011).

Além do mais, o excesso de GC pode causar alterações no metabolismo local da VitD no hipocampo e no córtex pré-frontal de roedores, auxiliando nas evidências do envolvimento da VitD no aumento da vulnerabilidade para transtornos emocionais induzidos pelo excesso de GC (JIANG et al., 2014a). Ainda em relação aos GC, a VitD, é capaz de reduzir a expressão

dos GR e inibir a translocação destes para o núcleo celular de células sanguíneas mononucleadas (HIDALGO et al., 2011), suprimindo a transcrição gênica e consequentemente, inativando a sua função.

Estudo recente já demonstra um efeito protetor da VitD no SNC, principalmente relacionado aos transtornos psíquicos, como a depressão (SABIR et al., 2018). Em relação ao sistema serotoninérgico, as concentrações de 5-HT são, em parte, controladas pela 1,25(OH)₂D, a qual induz a expressão do gene para TPH2 em células serotoninérgicas RN46A-B14 da Rafe (KANEKO et al., 2015). *In vivo*, foi demonstrado aumento da expressão de mRNA de TPH2 no córtex pré-frontal de ratos após a administração crônica de 1,25(OH)₂D (JIANG et al., 2014b). Com isso, os mesmos autores hipotetizaram que poderia haver uma associação entre baixas concentrações de 5-HT e VitD podendo agravar esses distúrbios psíquicos (PATRICK; AMES, 2015). Outras evidências corroboram a hipótese de um efeito estimulador da VitD sobre o sistema serotoninérgico. Foi observada a repressão de 59% do mRNA de SERT em células RN46A-B14 da rafe de ratos, tratados com 1,25(OH)₂D, indicando que a VitD pode agir como um inibidor seletivo da recaptação de 5-HT (ISRS), potencializando a neurotransmissão serotoninérgica (SABIR et al., 2018) (Fig. 5)

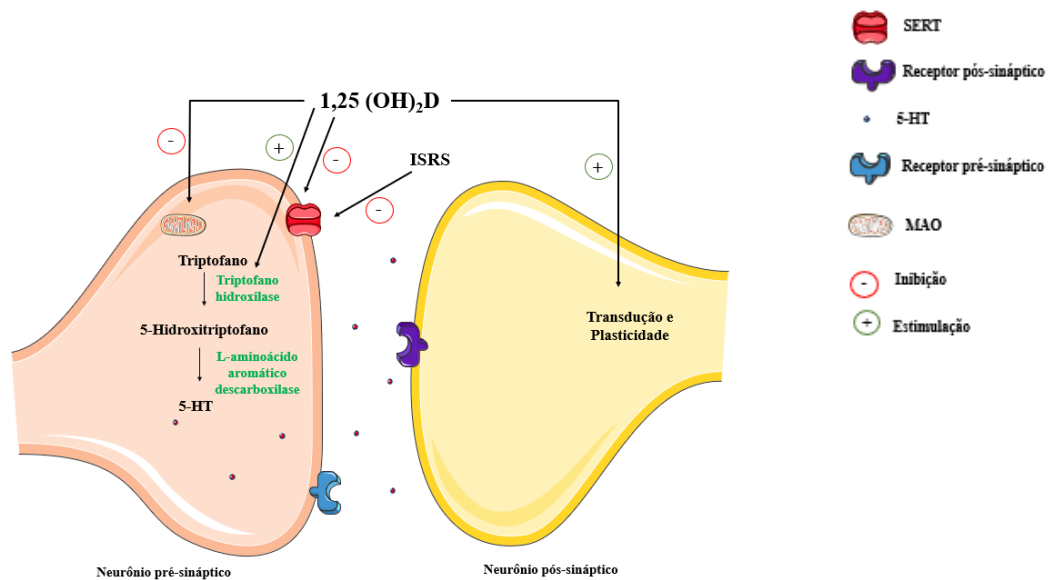


Figura 5. Mecanismo de ação da 1,25(OH)₂D no sistema serotoninérgico. Adaptado de Sabir *et al.* 2018.

Em conjunto, estes dados mostram que o sistema serotoninérgico também se encontra sob modulação da VitD, a qual pode consequentemente contribuir para a melhora de quadros de desordens psiquiátricas.

1.4 Justificativa

Os GC constituem o tratamento padrão para prevenção da síndrome respiratória neonatal em crianças com parto pré-termo, auxiliando no surfactante pulmonar (FOWDEN; LI; FORHEAD, 1998). Se considerarmos os altos índices de estresse materno na gestação, existe uma população ainda maior de fetos que fica exposta ao excesso de GC endógeno em consequência desse estresse. Apesar de sua importância para o bom desenvolvimento fetal e para uma resposta adequada ao estresse, os efeitos colaterais dos GC podem incluir doenças cardiovasculares, osteoporose e transtornos psíquicos (BRAUN et al., 2013; CHAPMAN; HOLMES; SECKL, 2013). Quando estes problemas se originam durante o desenvolvimento intrauterino, este fenômeno é chamado de programação fetal, que podem permanecer ao longo da vida.

O tratamento pré-natal com DEX parece modificar o desenvolvimento neural, o que pode induzir programação fetal e refletir em maior vulnerabilidade para distúrbios emocionais na vida adulta (DIAZ; BROWN; SECKL, 1998; SLOTKIN; SEIDLER, 2007). Assim, os resultados deste trabalho poderão contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos no tratamento pré-natal com GC, permitindo uma melhor avaliação dos riscos deste tratamento na gestação, tendo em vista que este grupo de crianças nascidas pré-termo representa uma significativa parcela da população dos recém-nascidos.

Além disso, grande parte da população mundial possui deficiência em VitD e, em gestantes esse pode alcançar até 85% das mulheres em todo o mundo (ADEKUNLE DAWODU; CAROL L WAGNER, 2007) e essa deficiência de VitD foi associada a diversos transtornos no desenvolvimento mental, psicomotor (ZHU et al., 2015) e de aprendizado em crianças (HART et al., 2015). Com isso, visando trabalhos que mostram o papel neuroprotetor da VitD no contexto emocional, no mecanismo serotoninérgico (KANEKO et al., 2015; SABIR et al., 2018) e os efeitos deletérios causados pela exposição pré-natal aos GC levando a distúrbios psíquicos.

Desta maneira, fez-se necessário investigar se a suplementação de VitD durante toda a gestação é capaz de atenuar ou cessar os efeitos neurais causados pelos GC durante a gestação na prole na vida adulta. Com isso, o presente estudo focou em estudar os aspectos comportamentais associados à depressão. Ainda, dada a importância do sistema serotoninérgico no controle do estado emocional, pretendeu-se avaliar os efeitos da programação fetal induzida

por DEX sobre a expressão de componentes do sistema serotoninérgico no NDR, bem como o possível papel protetor da VitD sobre este sistema.

2 OBJETIVO GERAL

Verificar se a exposição pré-natal à DEX altera a neurotransmissão serotoninérgica de ratas, com repercussões no comportamento emocional da prole na vida adulta (3, 6 e 12 meses pós-natal), bem como, se a suplementação pré-natal com VitD tem possíveis efeitos neuroprotetores neste contexto.

2.1 Objetivos específicos

- avaliar se a exposição pré-natal à DEX na prole adulta feminina com 3, 6 e 12 meses pós-natal apresenta comportamentos do tipo depressivo e anedônico;
- investigar se a exposição pré-natal à DEX altera o conteúdo de TPH, 5-HT_{1A}, SERT e GR, em fêmeas com 6 e 12 meses pós-natal;
- analisar se a suplementação pré-natal com VitD reverte ou ao menos atenua as possíveis alterações, tanto comportamentais quanto neuroquímicas, encontradas em animais expostos à programação fetal induzida por DEX.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 15 ratos machos e 120 fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (30 x 19 x 13 cm), forradas com maravalha, dispondo de água e ração *ad libitum*, permanecendo no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro invertido de 12 horas (luz acesa a partir das 18:00h e se apagada a partir das 6:00h). Três vezes por semana, no período da manhã, as caixas de polipropileno foram higienizadas, havendo reposição de água e alimento. Os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC – protocolo N° 7174170417.

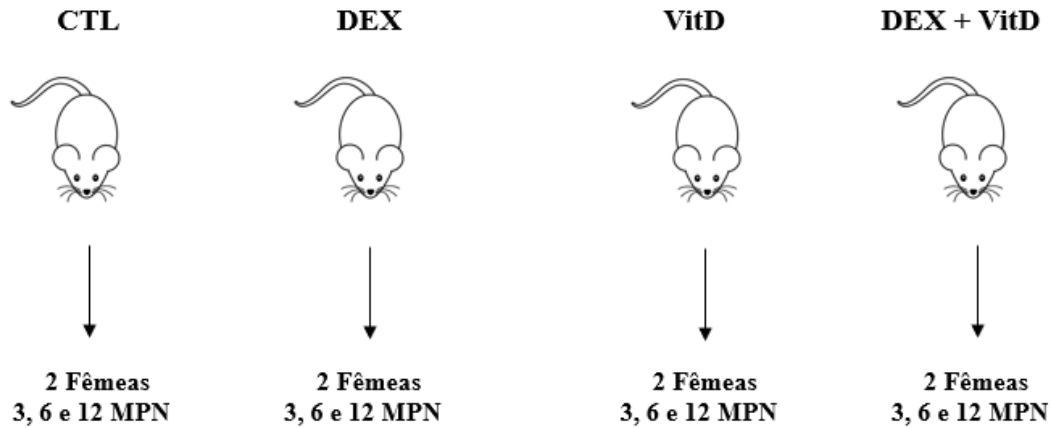
3.1 Protocolo de acasalamento

Os animais tinham em média 90 dias de idade, sendo as fêmeas com peso ≥ 180 gramas e os machos entre 200 e 350 gramas. Após pareamento das caixas de machos e fêmeas por 7 dias, três fêmeas e um macho foram postos em uma caixa, iniciando o acasalamento, por 8 dias consecutivos. Todos os dias no final da tarde, foi feito o lavado vaginal e quando encontrados espermatozoides e células corneificadas, mostrando que a rata se encontrava em estro, ou seja, no período fértil, foi considerado como dia 0 da gestação. Assim, os animais foram alocados no máximo 3 fêmeas/caixa até o 13° dia de gestação, quando então foram realocadas individualmente.

3.2 Grupos experimentais

As gestantes (90 dias de idade) foram divididas em quatro grupos: as que receberam água pura e óleo de girassol durante toda a gestação (CTL), as que receberam dexametasona (0,1 mg/kg) através da água de beber do 14° ao 19° dia da gestação (DEX), as que receberam água pura e suplementação com VitD (500UI) durante toda a gestação (VitD) e as que receberam dexametasona (0,1 mg/kg) através da água de beber do 14° ao 19° dia da gestação, de acordo com protocolo prévio (TEIXEIRA, C *et al*; 2020), mais suplementação com VitD (500UI) durante toda a gestação (DEXVitD) (Fig. 6). A dose de VitD foi determinada após a realização de uma curva dose-resposta de 50, 250 e 500 UI, onde a dose mais alta resultou em uma tendência na melhora do peso das gestantes. As proles foram divididas em grupos de

acordo com o sexo e a idade em que os parâmetros seriam avaliados. Para a avaliação comportamental, as fêmeas foram estudadas aos 3, 6 e 12 meses pós-natal (MPN), enquanto para as análises neuroquímicas os animais foram estudados quando completaram 6 e 12 MPN.



Além disso, os mesmos roedores foram utilizados para o desenvolvimento de outra pesquisa em paralelo, corroborando os 3R's em pesquisa com experimentação animal.

Figura 6. Desenho esquemático da divisão dos tratamentos realizados nas gestantes e separação dos animais para o seguimento do experimento.

Após o nascimento, os animais foram separados, formando os grupos experimentais e seguindo da seguinte maneira:

♀ **3, 6 e 12 MPN**

CTL: progenitora recebeu óleo de girassol;

DEX: progenitora recebeu dexametasona + óleo de girassol;

VitD: progenitora recebeu apenas vitamina D₃;

DEXVitD: progenitora recebeu dexametasona + vitamina D₃.

Assim, foram feitos dois lotes experimentais, os grupos de animais de 3 MPN e 6 MPN, foram eutanasiados para a coleta de tecidos aos 6 MPN. O outro lote, os animais seguiram até completar 12 MPN, feito novamente a eutanásia e coleta de materiais.

3.3 Tratamento com dexametasona e suplementação com vitamina D₃

A DEX foi administrada na dose de 0,1mg/kg (LIN et al., 2018), diluída na água de beber. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, para controle da ingestão e

consequentemente da dosagem do GC. Foi realizado um cálculo levando-se em conta a concentração do fármaco, peso do animal e volume de água ingerida. O volume foi corrigido para 200mL de água, para caso ocorresse uma ingestão maior do que a do dia anterior, não houvesse falta de líquido para os animais. Durante o 14º e 19º dias de gestação a quantidade de água ingerida foi averiguada e esta foi trocada diariamente, adequando a concentração de DEX. A VitD foi suplementada na forma de vitamina D₃ (Colecalciferol- Addera D3- FARMASA) na dose de 500UI/dia durante toda a gestação do 1º ao 20º dia, por via oral/gavagem.

No dia do nascimento, os animais foram separados por sexo, pesados e medidos individualmente. As ninhadas foram reduzidas à 8 filhotes por mãe, sempre que possível 4 machos e 4 fêmeas. No final da lactação, apenas duas fêmeas foram utilizadas para composição dos grupos experimentais do presente trabalho, evitando assim possíveis efeitos estatísticos da ninhada. Os outros filhotes foram utilizados no protocolo experimental de outros trabalhos.

3.4 Desenho Experimental

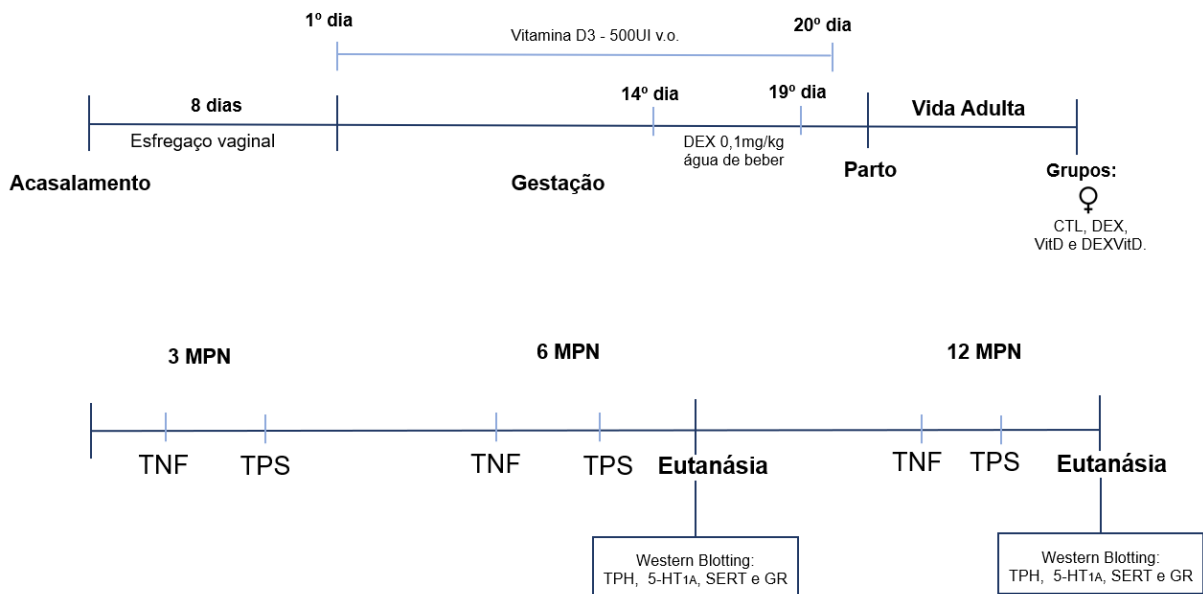


Figura 7. Desenho experimental. TNF: teste do nado forçado; TPS: teste de preferência pela sacarose.

3.5 Testes Comportamentais

3.5.1 Teste de Preferência pela Sacarose

O teste de preferência de sacarose (TPS) é um modelo usado em roedores para analisar anedonia (WILLNER et al., 1987), ou seja, a redução da preferência pela solução de sacarose reflete uma redução da busca pelo prazer, o que é considerado um dos principais sintomas da depressão em humanos (GOÑI-BALENTZIAGA et al., 2018). O teste consiste em uma versão modificada do procedimento de escolha por duas garrafas (BOLAÑOS et al., 2003). Foi oferecida aos animais a escolha entre uma garrafa com 200ml de água e uma garrafa com 200ml de solução de sacarose 2% por 24 horas (HASEGAWA; TOMITA, 1986). Após 12 horas de oferta, as garrafas tiveram suas posições invertidas, evitando o viés da preferência do animal por um lado da caixa (Fig. 8). Ao término do protocolo, foi mensurado o consumo de água e de sacarose. A preferência à sacarose foi calculada como a porcentagem de solução de sacarose consumida pelo total de líquidos ingeridos, pela fórmula que segue: $[\text{consumo de sacarose}/\text{consumo total de líquido (sacarose + água)}]*100$

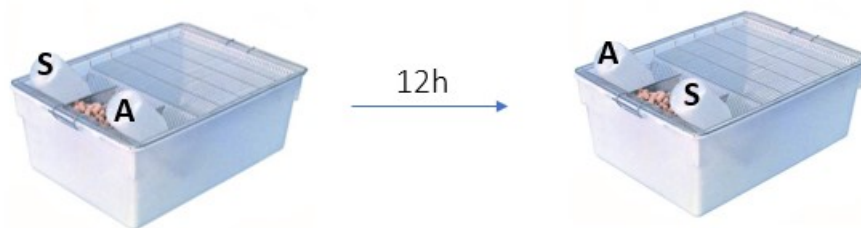


Figura 8. Desenho esquemático do teste de preferência pela sacarose. S: sacarose – A: água.

3.5.2 Teste do Nado Forçado

O teste do nado forçado (TNF) é amplamente utilizado para se estudar o comportamento do tipo depressivo em roedores e avaliar a estratégia de enfrentamento de um estresse agudo inescapável (PORSOLT, 2000; PORSOLT et al., 1978, 1979), visto que em humanos o estresse contribui significativamente para depressão. Além disso, em roedores, testes farmacológicos utilizando medicamentos para o tratamento da depressão em humanos apresentam melhora no desempenho durante o TNF (COMMONS et al., 2017).

Apesar da dificuldade da criação de modelos experimentais que sejam válidos para comprovar psicopatologias, visto que inúmeros sintomas aparentes em pessoas depressivas

como transtorno de humor, alucinações, tristeza e culpa são impossíveis de observar em animais (NESTLER, E. J.; HYMAN, 2010), o TNF já está bastante consolidado na literatura como uma ferramenta para estudar o comportamento do tipo depressivo em roedores.

O TNF foi aplicado quando os animais completaram 3, 6 e 12 MPN. Visto que roedores são excelentes nadadores, os animais foram expostos a duas sessões de nado forçado, sendo a primeira de duração de 15 minutos, chamada de pré-teste e reexposto após 24 horas ao mesmo aparato por 5 minutos, sessão chamada de teste. Apenas a sessão de teste foi gravada e analisada (MEZADRI et al., 2011). Os animais foram colocados individualmente em um tanque cilíndrico (PVC), opaco, marrom com capacidade para 50 litros. A água estava em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com volume suficiente para evitar que os animais se apoiassem no fundo do cilindro ou que escapassem do mesmo. Após o experimento, os animais foram cuidadosamente secos e alocados em suas respectivas caixas.

Os comportamentos analisados foram:

-Imobilidade: foi definido pela ausência de movimentos ativos (apenas aquele que o animal precisa para manter a cabeça para fora d'água) e sem deslocamento pela cuba (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).

-Nado: foi definido pela movimentação horizontal das patas dianteiras e com deslocamento pela cuba (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).

-Escalada: foi definido pelo movimento vertical das patas dianteiras, independentemente da localização do animal na cuba (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).

Também foram analisados para cada categoria comportamental os parâmetros de:

Duração: é dado pelo tempo gasto pelo animal executando um determinado comportamento durante o período de teste (MEZADRI et al., 2011).

Latência: é dado pelo tempo entre o início do teste e a primeira ocorrência de um comportamento (MEZADRI et al., 2011).

Frequência: é dado pelo número de vezes em que o animal iniciou um determinado comportamento durante o período do teste (MEZADRI et al., 2011) (os dados encontram-se em anexo).

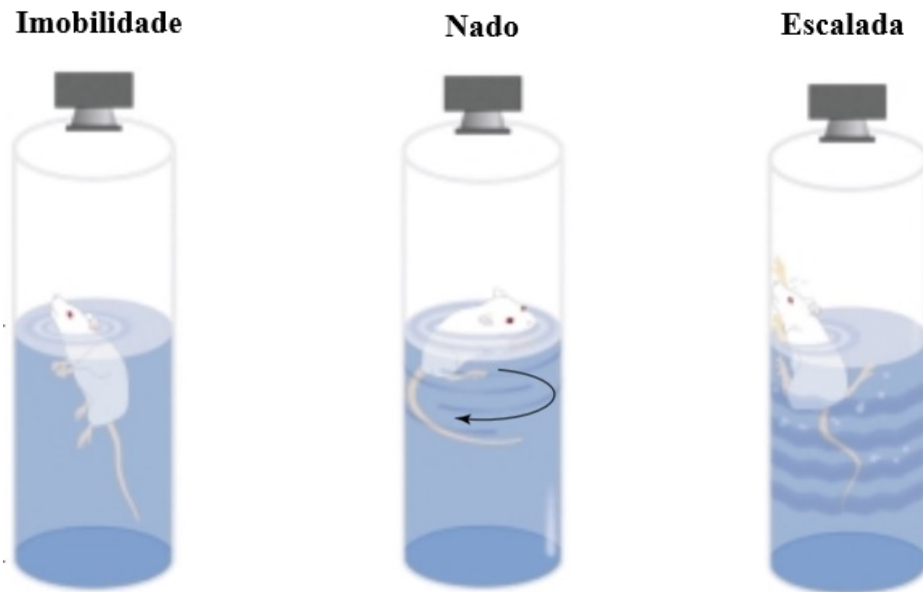


Figura 9. Desenho esquemático dos comportamentos analisados no TNF. Adaptado de Cryan; Markou; Lucky, 2002.

Para a gravação dos vídeos, uma câmera foi colocada 30cm acima da cuba de água, a fim de pegar todo o aparato e movimentação do animal. Os testes comportamentais foram gravados por meio do programa Virtual Dub e posteriormente analisados por meio do software Ethowatcher® (CRISPIM JUNIOR et al., 2012). O software permite a criação de um catálogo comportamental com as variáveis de acordo com o teste utilizado. Terminada a análise, o programa criou um arquivo contendo duração, latência e frequência para cada uma das categorias comportamentais salvas previamente.

3.6 Eutanásia

Dois lotes de animais foram eutanasiados, um aos 6 MPN e outro aos 12 MPN. Os animais eutanasiados aos 6 meses são os mesmos que foram submetidos aos testes comportamentais aos 3 meses. Como eles foram mantidos até os 6 meses, não há análises bioquímicas dos mesmos aos 3 meses de idade. Os animais foram anestesiados com cetamina (80mg/kg i.p.) e xilazina (12mg/kg i.p.), e então foram avaliados os reflexos palpebral, pupilar e interdigital para determinação do nível de anestesia. Com o animal não apresentando nenhum reflexo, o plano anestésico cirúrgico foi determinado. Com isso, foi realizada coleta de sangue intracárdica e a eutanásia se deu por decapitação usando guilhotina. Para esse estudo, foi utilizado apenas o cérebro, porém outros órgãos foram retirados para trabalhos posteriores. Os cérebros foram retirados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para análise posterior.

3.7 Microdissecção do núcleo dorsal da rafe (NDR) - Técnica de *Punch*

Foi realizada a microdissecção do NDR em Criostato Thermo Scientific Hm525 Nx (-18°C). Foram utilizadas as seguintes coordenadas para a localização do NDR: plano frontal (posterior a Bregma) -6,84mm a -8,40mm, plano latero lateral 0,4mm a 0,4mm e crânio caudal 5,8mm a 4,4mm abaixo do aqueduto do mesencéfalo (PAXINOS & WATSON 2007) (Fig.10). Quando atingida a região do NDR, o encéfalo foi cortado na espessura de 1.500µm. O NDR de cada animal foi retirado pela técnica de *punch* com o uso de uma agulha (diâmetro 1.5 mm, -18° C) que foi inserida no tecido (extensão rostro-caudal do NDR). O material contendo o NDR foi armazenado em ependorfes e conservado em -80°C para a posterior realização da técnica de Western Blotting.

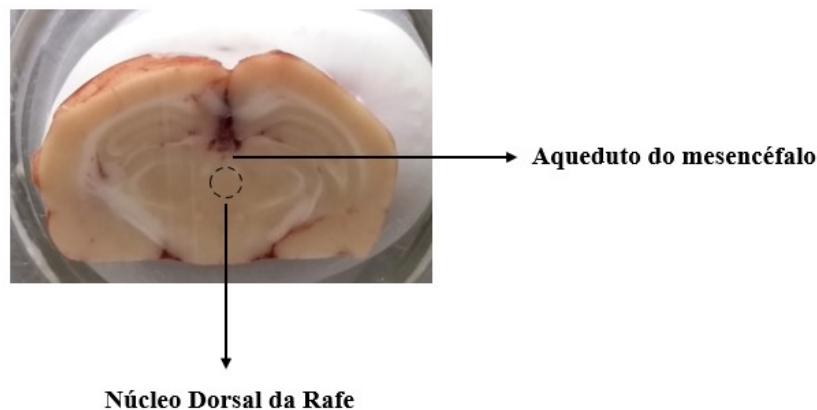


Figura 10. Localização do núcleo dorsal da rafe em encéfalo de roedor. Fonte: Elaborada pela autora.

3.8 Técnica de Western Blotting

A técnica de Western Blotting (WB) foi uma importante criação na biologia molecular, utilizada para imunodeteção e semi-quantificação de proteínas após a separação por eletroforese em gel e transferência para membrana de nitrocelulose (KURIEN; SCOFIELD, 2006).

Para quantificar as proteínas contidas no NDR, as amostras foram homogeneizadas em solução anti-protease, contendo: 10mM EDTA, 100mM de Tris base, 100mM de Pirofosfato de Sódio, 100mM de Fluoreto de Sódio, 10mM de Ortovanato de Sódio, 2mM de PMSF, água MILIQ e 10% de Triton. Após isso, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 14.000G por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, foi feita a quantificação das proteínas por meio do método de Bradford, utilizando-se concentrações conhecidas de albumina. Diante disto, foi

utilizado 4 animais por grupo experimental. A quantidade de proteína extraída foi de 30µg por NDR.

As amostras foram incubadas à 70°C por 8 minutos em tampão de LAEMMLI 4x (Azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1M, glicerol 50%, SDS 10%). Para a corrida eletroforética, foi utilizado gel de acrilamida bifásico, sendo um de empacotamento (água deionizada, tampão de gel para empacotamento, acrilamida, Temed e APS 10%) e um de resolução a 10% (água deionizada, glicerol, tampão de gel para resolução, acrilamida, Temed e APS 10%). Após a aplicação das amostras e do marcador de peso molecular (BioRad Cat. #1610375), a eletroforese foi realizada em tampão de corrida 1X (125mM de Tris base, 950mM de glicina, 0,25% de SDS, água deionizada) e com o pH 8,3 por 15 min a 60 volts, seguida de aproximadamente 90 min a 140 volts. Após a corrida, foi realizado o processo de eletrotransferência das amostras para uma membrana de nitrocelulose (BioRad 0.45µm) banhada em tampão de transferência 1X (125mM de Tris base, 950mM de glicina, 0,25% de SDS, água deionizada), em 100 volts por 2h. Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceu para confirmação da presença de proteínas. Logo em seguida, as membranas foram lavadas em solução TBST (Tris-HCl MW 157,6; Tris base MW 121,1; NaCl MW 58,4; H₂O₂ e Tween 20), bloqueadas por 2h em solução bloqueio composta por leite desnatado 5% e TBST.

A imunodeteção das proteínas TPH, 5-HT_{1A}, SERT, GR e GAPDH foi realizada por meio da incubação das membranas de nitrocelulose com os respectivos anticorpos primários em tampão de incubação constituído por leite em pó desnatado 3% e TBST 1X, por 15h, à 4°C. Após lavagem em TBST, durante 3 vezes de 5 minutos, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários apropriados, em tampão de incubação constituído por leite em pó desnatado 1% e TBST, durante 2h em temperatura ambiente (Tabela 1).

Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 3 vezes durante 5 minutos em TBST, incubadas por 90 segundos com os reagentes de quimiluminescência (Clarity Western ECL Substrate – BioRad) e reveladas por quimioluminescência no equipamento Fotodocumentador Chemidoc MP (BioRad) durante o período de 5 segundos até 1 minuto, dependendo do anticorpo e revelados conforme instrução do fabricante. A quantificação da intensidade das bandas foi feita por densitometria (ImageJ – Wayne Rasband – National Institute of Health, USA), onde os valores de densitometria encontrados nas bandas de interesse foram normalizados pelos valores encontrados na marcação para a proteína constitutiva GAPDH.

*Ainda, cada membrana passou por dois *strippings* para a marcação de todos os anticorpos.

Proteínas	Anticorpo Primário	Anticorpo secundário	Diluições anticorpo primário	Diluições anticorpo secundário
TPH (ab1541)	Sheep	Rabbit Anti-sheep (ab97130)	TPH2: 1:2000	Anti-sheep: 1:20000
5HT_{1A} (ab15350)	Rabbit	Goat Anti-rabbit (sc2004)	5HT1A: 1:2000	Anti-rabbit 1:5000
SERT (abcam102048)	Rabbit	Goat Anti-rabbit (sc2004)	SERT: 1:2000	Anti-rabbit 1:5000
GR (sc393232)	Mouse	Goat Anti-mouse (BioRad 1706516)	GR: 1:1000	Anti-mouse 1:10000
GAPDH (abcam9484)	Mouse	Goat Anti-mouse (BioRad 1706516)	GAPDH: 1:5000	Anti-mouse 1:10000

Tabela 1. Anticorpos primários, secundários e suas diluições.

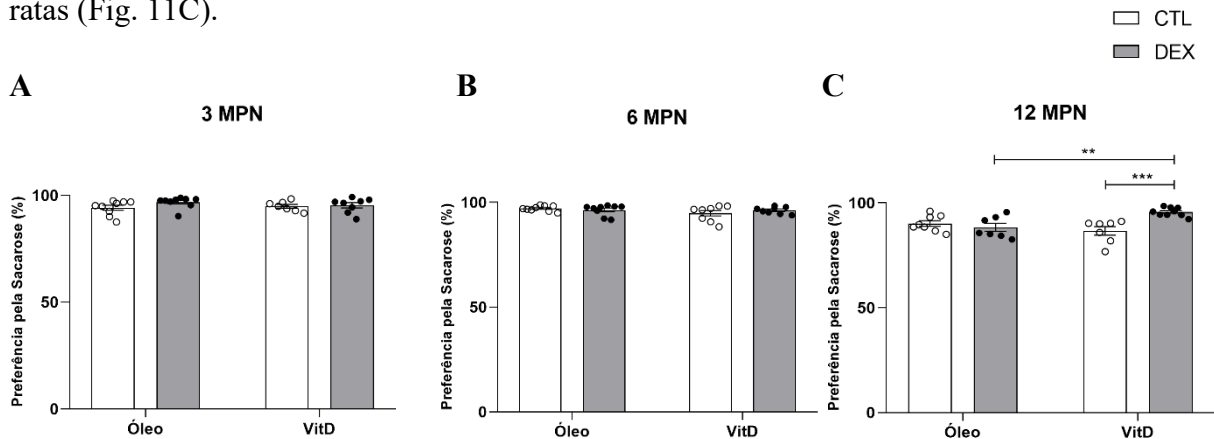
3.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Além disso, foram retirados os outliers de cada grupo pelo uso da fórmula Média \pm 2 x Desvio Padrão da Média para cada conjunto de dados. Valores acima do valor máximo ou abaixo do valor mínimo dado pela fórmula foram retirados da análise. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (Prisma Graph-Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi de $P < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Teste de Preferência pela Sacarose aos 3, 6 e 12 meses pós-natal

Os resultados mostraram que os efeitos do tratamento e da suplementação pré-natal com DEX e VitD sobre a prole feminina foi tempo-dependente, visto que não afetou a preferência à sacarose aos 3 MPN (Fig. 11A) e nem aos 6 MPN (Fig. 11B). Porém, aos 12 MPN a ANOVA mostrou efeito do tratamento gestacional com DEX ($p=0,02$; $F(1,27)=5,71$; $r^2=11,66$) e interação dos fatores DEX e VitD ($p=0,001$; $F(1,27)=13,23$; $r^2=27$), o que foi confirmado no pós-teste uma vez que o grupo DEX foi diferente do grupo DEXVitD ($p=0,001$) e o grupo VitD foi diferente do grupo DEXVitD ($p=0,0002$). Esse resultado indica que apenas o tratamento pré-natal concomitante de DEX e VitD foi capaz de aumentar a preferência pela sacarose em ratas (Fig. 11C).



4.2 Teste do Nado Forçado aos 3, 6 e 12 meses pós-natal

Em relação ao comportamento de imobilidade, a ANOVA mostrou efeito da VitD ($p=0,01$; $F(1,30)=6,72$ $r^2=16,64$) aos 3 MPN. O pós-teste mostrou uma diferença entre os grupos DEX e DEXVitD, (Fig. 12A) mostrando que a VitD foi capaz de diminuir a duração da imobilidade apenas no grupo que sofreu programação fetal pela exposição à DEX. Foi interessante notar que, apesar desse efeito ter desaparecido aos 6 MPN (Fig. 12B), aos 12 MPN ocorreu uma interação entre os tratamentos com VitD e DEX ($p=0,01$; $F(1,29)=7,58$; $r^2=19,66$). Isto é mostrado na figura 12C, onde a VitD reduziu a duração da imobilidade quando administrada sozinha ($p=0,005$), mas quando o tratamento foi concomitante ao da DEX, a resposta foi inversa, ou seja, houve um aumento da duração da imobilidade ($p=0,02$) (Fig. 12C).

Ainda com relação ao comportamento de imobilidade, os resultados referentes à latência mostraram que não houve efeito da DEX ou da VitD aos 3 MPN (Fig. 12D), mas aos 6 MPN, a ANOVA mostrou um efeito da VitD pré-natal levando ao aumento da latência ($p=0,01$; $F(1,31)=6,53$; $r^2=17,28$), independente do tratamento pré-natal com DEX (Fig. 12E), o que foi confirmado pelo pós-teste ($p=0,04$). Já aos 12 MPN, novamente encontramos uma interação entre os fatores VitD e DEX ($p=0,004$; $F(1,29)=9,77$; $r^2=18,13$), além de um efeito significativo da DEX ($p=0,001$; $F(1,29)=13,31$; $r^2=24,68$) e ainda uma tendência de efeito da VitD ($p=0,07$; $F(1,29)=3,30$; $r^2=6,12$). Entretanto, os resultados do pós-teste confirmaram apenas os resultados da interação e do efeito da VitD, onde o grupo CTL foi diferente do grupo VitD ($p=0,002$) e o grupo VitD foi diferente de DEXVitD ($p=0,0001$). Dessa forma, a VitD aumentou a latência para imobilidade no grupo sem tratamento pré-natal com DEX (Fig. 12F), mas quando os tratamentos foram concomitantes, a DEX suprimiu esse efeito da VitD, impedindo o aumento da latência (Fig. 12F).

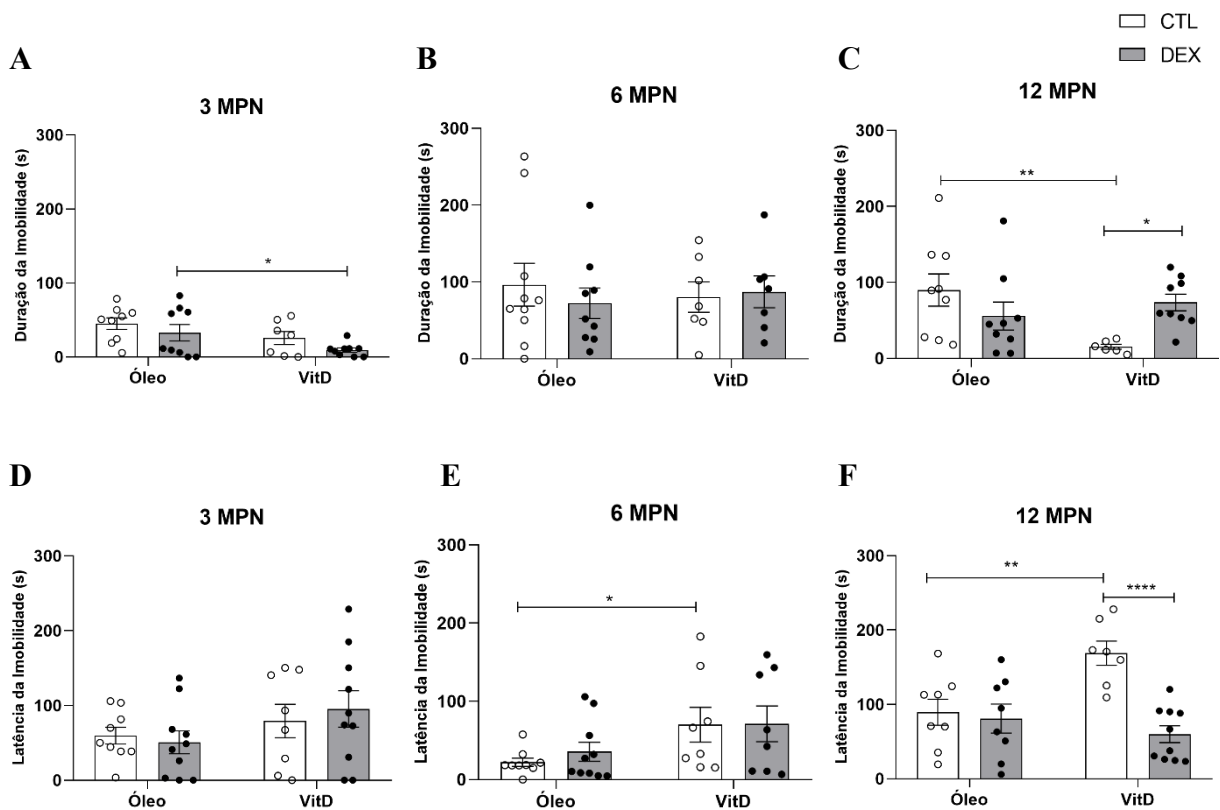


Figura 12. Duração e latência do comportamento de imobilidade durante o teste do nado forçado aos 3, 6 e 12 MPN (A, B e C, D, E e F, respectivamente) na prole de fêmeas expostas à DEX e/ou suplementadas com VitD na gestação. ANOVA two-way seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como: média \pm EPM, $p < 0,05$ ($n = 7-10$). * $p < 0,05$ ** $p \leq 0,009$; **** $p \leq 0,0001$.

Em relação ao comportamento natatório, os resultados referentes à duração mostraram que nem o tratamento pré-natal com DEX e nem com a VitD afetaram este parâmetro aos 3 e aos 6 MPN (Fig. 13A e B, respectivamente). Já aos 12 MPN, a ANOVA mostrou que a VitD pré-natal aumentou a duração do comportamento natatório ($p=0,04$; $F(1,30)=4,35$; $r^2=11,09$) (Fig. 13C). Ainda, houve interação entre os tratamentos pré-natais com DEX e VitD ($p=0,025$; $F(1,30)=5,51$; $r^2=14,03$), mostrando que esse efeito da VitD foi atenuado pelo tratamento concomitante com a DEX. Ambos os efeitos foram confirmados pelo pós-teste, visto que o grupo CTL foi diferente do grupo VitD ($p=0,004$) e que houve uma diferença com p marginal de 0,05 entre os grupos VitD e DEXVitD. Quando a latência para o nado foi avaliada, a ANOVA mostrou interação entre os tratamentos pré-natais com DEX e VitD ($p=0,03$; $F(1,30)=4,8$; $r^2=13,26$) aos 3 MPN. No pós-teste, observou-se que o tratamento pré-natal com DEX reduziu este parâmetro apenas nos animais sem tratamento com VitD ($p=0,03$) e teve um p marginal de 0,05 na diferença entre os grupos CTL e VitD (Fig. 13D). Aos 6 (Fig. 13E) e 12 MPN (Fig. 13F) não foi possível observar efeito de nenhum dos dois tratamentos pré-natais sobre a latência para o comportamento natatório.

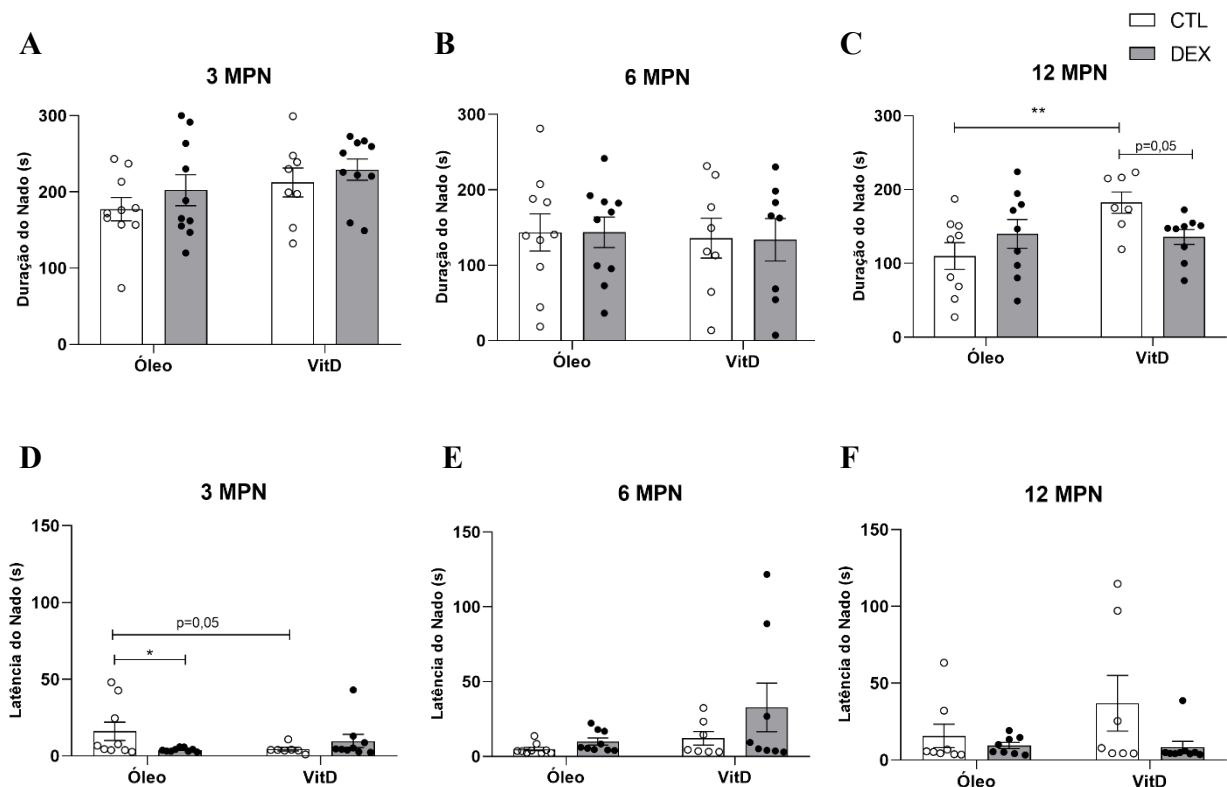


Figura 13. Duração e latência do comportamento de nado durante o teste do nado forçado aos 3, 6 e 12 MPN (A, B e C, D, E e F, respectivamente) na prole de fêmeas expostas à DEX e/ou suplementadas com VitD na gestação. ANOVA two-way seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como: média \pm EPM, $p < 0,05$ ($n = 7-10$). * $p < 0,05$ ** $p \leq 0,009$; p marginal de 0,05.

No que se refere ao comportamento proativo de escalada, nem o tratamento pré-natal com DEX e nem a suplementação com VitD durante o período gestacional foram capazes de alterar a duração deste parâmetro aos 3 (Fig. 14A), 6 (Fig. 14B), ou 12 MPN (Fig. 14C). O mesmo ocorreu com relação à latência do comportamento escalada, tanto aos 3 MPN (Fig. 14D) quanto aos 6 (Fig. 14E) e aos 12 MPN (Fig. 14F).

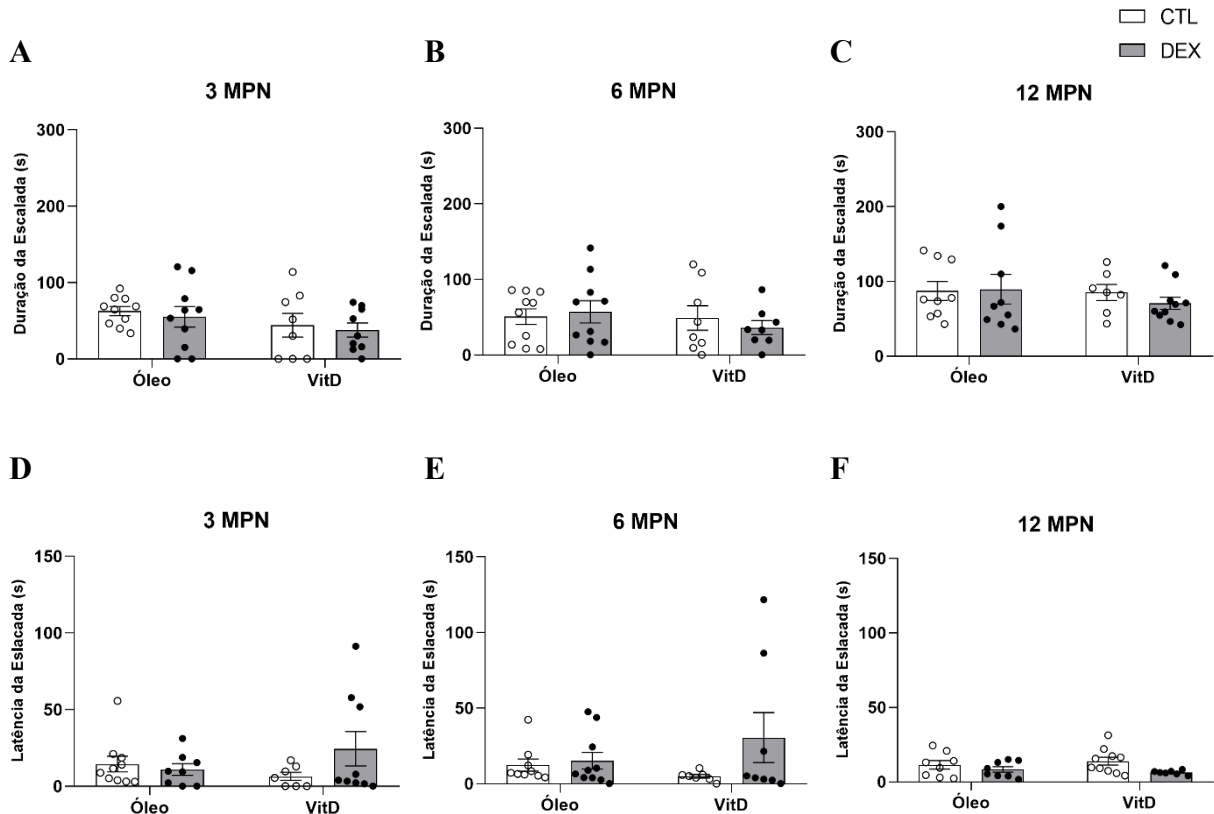


Figura 14. Duração e latência do comportamento de escada durante o teste do nado forçado, aos 3, 6 e 12 MPN (A, B e C, D, E e F, respectivamente) na prole de fêmeas expostas à DEX e/ou suplementadas com VitD na gestação. ANOVA two-way seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como: média \pm EPM, $p < 0,05$ ($n = 7-10$).

4.3 Western Blotting aos 6 e 12 meses pós-natal

Em relação a dosagem de proteínas, a ANOVA mostrou que fêmeas que receberam o tratamento pré-natal com DEX, apresentaram uma diminuição do conteúdo de TPH no NDR aos 6 MPN, ($p=0,01$; $F(1,11)=9,54$; $r^2=46,04$), o que foi corroborado com o pós-teste ($p=0,02$) (Fig. 15A). Este efeito do tratamento pré-natal com DEX desapareceu aos 12 MPN (Fig. 15B). A suplementação gestacional de VitD não teve nenhum efeito significativo sobre o conteúdo de TPH no DRN dos animais aos 6 ou aos 12 MPN (Fig. 15 A e B, respectivamente).

O mesmo padrão de resposta pode ser observado na figura 15C, onde o tratamento pré-natal com DEX levou à redução do conteúdo de 5-HT_{1A} no NDR aos 6 MPN ($p=0,004$; $F(1,11)=12,61$; $r^2=51,07$). Neste caso a análise pós-teste mostrou um efeito com significância marginal ($p=0,05$) (Fig. 15C). Os resultados também mostraram que esse efeito da DEX ocorreu independentemente da suplementação com VitD ($p=0,01$) (Fig. 15C). Esta resposta desapareceu aos 12 MPN (Fig. 15D). A suplementação pré-natal com VitD não teve nenhum efeito significativo sobre o conteúdo de 5-HT_{1A} no NDR dos animais aos 6 ou aos 12 MPN (Fig. 15 C e D, respectivamente).

Houve um efeito com significância marginal ($p=0,06$; $F(1,12)=4,28$; $r^2=22,34$) do tratamento gestacional de DEX reduzindo o conteúdo de SERT no NDR aos 6 MPN, confirmado pelo pós-teste ($p=0,02$) (Fig. 15E), o qual não ocorreu aos 12 MPN (Fig. 15F). Novamente, a administração pré-natal apenas de VitD não provocou nenhum efeito sobre este parâmetro aos 6 ou aos 12 MPN (Fig. 15 E e F, respectivamente).

Além disso, nem o tratamento pré-natal com DEX e nem a suplementação com VitD foram capazes de alterar de maneira significativa o conteúdo de GR no NDR dos animais nem aos 6 MPN (Fig. 15G) e nem aos 12 MPN (Fig. 15H).

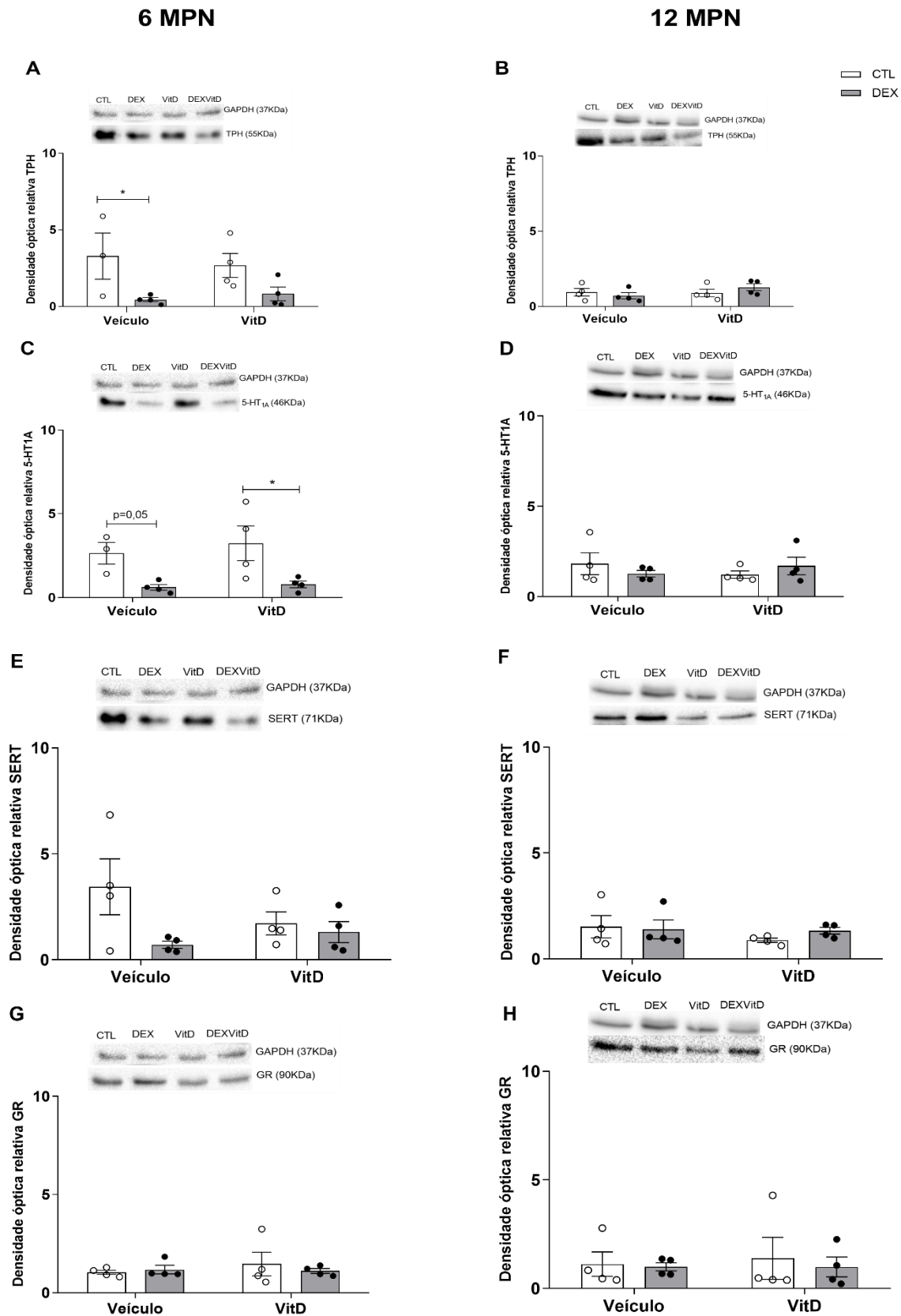


Figura 15. Densidade óptica relativa do conteúdo proteico de TPH, 5-HT_{1A}, SERT e GR no núcleo dorsal da rafe de fêmeas aos 6 MPN (A, C, E e G, respectivamente) e aos 12 MPN (B, E, F e H respectivamente) nascidas de ratas expostas à DEX e/ou suplementadas com VitD na gestação. ANOVA two-way seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como: média ± EPM, $p < 0,05$ ($n = 3-4$).

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou tanto um efeito anti-anedônico no tratamento concomitante de DEX e VitD, quanto antidepressivo da VitD *per se* no modelo de programação fetal induzida por DEX. Nossos dados sugerem que as respostas aos tratamentos parecem ser tempo-dependentes já que: i) o efeito anti-anedônico da VitD+DEX ocorreu apenas aos 12 MPN e ii) o efeito antidepressivo da VitD foi dual e transitório, ou seja, ele ocorre nas ratas submetidas à programação fetal por DEX aos 3 MPN, mas é suprimido neste mesmo grupo aos 12 MPN. Além disso, alterações encontradas nas avaliações neuroquímicas do sistema serotoninérgico ocorreram aos 6 MPN, diferentemente da maior parte das respostas comportamentais.

A depressão é caracterizada por um distúrbio psíquico, que envolve alterações de humor, anedonia, defeitos nos circuitos neurais de recompensa e transmissão da 5-HT no NDR e suas projeções, como hipocampo e córtex pré-frontal (COPPEN, 1967; GOÑI-BALENTZIAGA et al., 2018; ŽMUDZKA et al., 2018). Além disso, nos últimos anos, o TNF tem sido utilizado por diversos grupos de pesquisa, não só para avaliar o potencial antidepressivo dos fármacos, mas também a investigação dos seus mecanismos de ação (BOURIN et al., 2005). Da mesma forma, o TPS é bastante utilizado para avaliar a anedonia em roedores, sendo este um dos principais fatores da depressão em humanos (WILLNER et al., 1987).

Dados da literatura mostram que a administração pré-natal de diferentes doses de DEX leva a alterações no comportamento emocional da prole na vida adulta. Liu, W *et al*, (2012), por exemplo, demonstraram que ratas com nove semanas de idade, em que a progenitora recebeu DEX (1mg/kg) do 14º ao 21º dia de gestação, apresentaram aumento do comportamento anedônico no TPS. (LIU et al., 2012). Casarotto & Andreatini (2007) também demonstraram que DEX nas doses de 5mg e 10mg/i.p, induz anedonia em ratos, pela diminuição da preferência pela sacarose (CASAROTTO; ANDREATINI, 2007). Ainda, um grupo chinês mostrou que roedores nascidos de progenitoras que receberam DEX na dose de 0,13mg/kg do 14º ao 21º dia de gestação também apresentam diminuição da preferência pela sacarose e, conseqüentemente o aumento da anedonia (WU et al., 2019). Entretanto, além de termos realizado uma análise temporal desses efeitos, em 3 fases diferentes da vida adulta, demonstramos pela primeira vez que a suplementação de VitD, quando administrada concomitantemente com DEX ao longo da gestação, exerce um efeito anti-anedônico. A

literatura é escassa no que diz respeito à investigação dos efeitos neurais e comportamentais da prole de mães submetidas a suplementação gestacional com VitD. Fora do contexto de gestação, entretanto, recentemente essa ação anti-anedônica foi confirmada por Sedaghat *et al* (2019), que demonstraram que a administração de VitD a ratos submetidos a estresse melhora a anedonia (SEDAGHAT *et al.*, 2019). Tendo em vista que no presente trabalho a exposição à VitD foi pré-natal, podemos sugerir que a VitD tenha ocasionado uma programação fetal, que permitiu alterações do desenvolvimento neurocomportamental, repercutindo em uma melhora da anedonia na vida adulta. Os mecanismos epigenéticos pelos quais a programação fetal ocorre ainda necessitam ser estudados. Contudo, esta ideia de programação fetal da VitD sobre o desenvolvimento neural está de acordo com dados recentes mostrando que a deficiência materna de VitD prejudica o desenvolvimento neurocomportamental em camundongos, levando inclusive ao aumento da anedonia (FU *et al.*, 2017).

É interessante notar que os efeitos da programação fetal podem se estender às próximas gerações e serem provenientes não só da exposição materna à DEX, mas também da exposição paterna na fase pré-coito. Este fenômeno foi demonstrado por XU *et al.*, (2018) em experimentos em animais machos e fêmeas da geração F2 de progenitores expostos à DEX, onde ambos apresentaram diminuição da preferência pela sacarose, ou seja, aumento da anedonia. Estes dados sugerem que as alterações comportamentais causadas pela exposição pré-natal podem ser transmitidas à geração F2 também de forma hereditária (XU *et al.*, 2018).

Como mencionado anteriormente, o comportamento depressivo pode ser estudado em modelos animais por meio de testes comportamentais específicos, incluindo o teste do nado forçado, avaliando-se principalmente o comportamento de imobilidade, que se refere ao desespero comportamental (PORSOLT *et al.*, 1978), e os comportamentos de nado e escalada, que se referem a estratégias proativas durante o teste (DETKE; LUCKI, 1995). Nossos resultados mostraram um efeito antidepressivo da VitD no tratamento concomitante com a DEX, reduzindo o comportamento de imobilidade aos 3 MPN. Aos 12 MPN, a suplementação com VitD por si só teve efeito antidepressivo, o qual foi suprimido nos animais expostos à DEX na gestação, indicando uma interação dos dois tratamentos na programação fetal e um efeito deletério da DEX pré-natal sobre o comportamento do tipo depressivo na vida adulta. Este efeito negativo da DEX está em acordo com dados da literatura que mostram que a administração de DEX no 18º e 19º dia de gestação, aumenta o tempo de duração da imobilidade no TNF em machos adultos da linhagem Wistar (BORGES *et al.*, 2013).

O possível efeito antidepressivo da VitD já tem sido explorado na clínica fora do contexto epigenético, onde ela é utilizada como uma terapia auxiliar em pacientes com depressão, (KHORAMINYA et al., 2013). Mas, em estudos experimentais, a suplementação de $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ na dose de $1\mu\text{g}/\text{kg}$ é capaz, por si só, de diminuir o tempo de duração da imobilidade no TNF em camundongos com 5 semanas de idade, mostrando que os efeitos da VitD podem ser independentes dos efeitos de medicamentos antidepressivos (KAWAURA et al., 2017).

O resultado encontrado no presente trabalho relacionado à interação entre os tratamentos com DEX e VitD corrobora aqueles encontrados por Jiang, P. *et al*, (2014). Estes autores mostraram que a exposição à DEX na vida adulta na dose de $2\text{mg}/\text{kg}$ durante 10 dias aumenta o tempo de imobilidade nesses animais e prejudica o mecanismo cerebral da VitD no córtex pré-frontal e hipocampo, por diminuir a expressão proteica de VDR, CYP27B1 e CYP24A1 em ambas as regiões (JIANG et al., 2014). Estes achados indicam que diversas regiões do cérebro, principalmente a região hipocampal, um centro ligado ao sistema límbico e conseqüentemente à modulação do comportamento depressivo, são susceptíveis ao excesso de GC, o que pode estar associado a expressão de GR e à sinalização excessiva de GC nessa área cerebral (ANACKER et al., 2013).

A modulação do comportamento depressivo é complexa, sendo o sistema monoaminérgico um alvo bastante importante. Os fármacos antidepressivos tem como principal ação o sistema das monoaminas (DEAKIN; GRAEFF, 1991), além disso, a hipótese monoaminérgica, está relacionada com o aparecimento da depressão perante a diminuição da quantidade central das monoaminas (SCHILDKRAUT; KETY, 1967). Assim, esta hipótese é corroborada pelo fato de a maioria dos fármacos antidepressivos prescritos na clínica aumentarem os níveis de monoaminas no encéfalo, podendo agir através da inibição da recaptação de 5-HT, noradrenalina ou dopamina (DA) e ainda agir como inibidor da enzima MAO [para revisão ver (NEMEROFF, 2007)].

Sendo assim, o sistema serotoninérgico é um dos principais responsáveis por este controle na modulação da depressão. Desta forma, alterações neurobiológicas no sistema serotoninérgico estão relacionadas com o melhora no tratamento antidepressivo (ELHWUEGI, 2004), deixando quantidades maiores de 5-HT à nível central. Diante disto, aprofundar o conhecimento do sistema serotoninérgico é grande aliado para auxiliar na modulação da depressão.

No presente trabalho mostramos uma diminuição do conteúdo de TPH e 5-HT_{1A} no NDR de ratas nascidas de mães tratadas com DEX na gestação. Dados da literatura confirmam esse efeito da DEX, demonstrando que o tratamento pré-natal com este GC durante o 16º e 21º dia gestacional na dose de 50µg/kg reduz o conteúdo de 5-HT no hipocampo, além de diminuir a expressão do mRNA de 5-HT_{1A} e a expressão da proteína BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) no córtex pré-frontal de roedores (NAGANO et al., 2012). Os efeitos da DEX sobre o sistema serotoninérgico já foram demonstrados também em outros contextos que não o gestacional. Azmitia *et al*, demonstraram em 1993, que fêmeas da linhagem Sprague-Dawley que passaram pela cirurgia da retirada das adrenais e receberam tratamento com DEX (10mg/L), apresentam aumento da expressão de TPH no NDR. Considerou-se que esse aumento pode ter ocorrido em consequência da hipertrofia celular causada pelo tratamento com DEX nos ratos adrenalectomizados (AZMITIA; LIAO; CHEN, 1993).

A modulação dos componentes do sistema serotoninérgico pela DEX já foi demonstrada anteriormente em outras áreas que não o NDR. Slotikin *et al*, mostraram que o tratamento com DEX, tanto na fase pré-natal (18º e 19º dias de gestação) quanto pós-natal (dias 1-3 e 7-9) aumenta as concentrações de 5-HT_{1A} e SERT no hipocampo e córtex cerebral. Curiosamente, o tratamento pré-natal com DEX, não alterou os níveis de 5-HT no córtex cerebral e hipocampo, porém, o tratamento pós-natal levou a aumentos significantes de 5-HT nos dias 1-3 e a diminuição nos dias 7-9 nestas áreas (SLOTKIN et al., 2006). Em conjunto, esses dados dão suporte para a ideia de que talvez as alterações encontradas nos componentes serotoninérgicos no presente trabalho não tenham se refletido em alterações comportamentais aos 6 MPN porque analisamos apenas o NDR e não outras áreas importantes para o controle emocional como o córtex pré-frontal.

Um estudo publicado em 2016, por Hiroi *et al.*, demonstrou que fêmeas apresentam maior comportamento do tipo depressivo e ansioso, além da exposição gestacional com DEX diminuir a expressão do mRNA para TPH2 nas partes caudal e rostral do NDR (HIROI et al., 2016). Assim, esses resultados corroboram a evidência de que fêmeas são mais sensíveis ao tratamento pré-natal com DEX (RICHARDSON et al., 2006), pelo menos no que diz respeito aos distúrbios emocionais.

O auto-receptor 5-HT_{1A} aparece precocemente durante o período pré-natal em roedores e humanos, mais precisamente entre a 16º e 22º semanas de gestação (BAR-PELED et al., 1991). Assim, esses receptores desempenham um papel inibitório como autorregulador na síntese e secreção de 5-HT e na inibição do disparo de neurônios serotoninérgicos (GALZIN et

al., 1992; RUMAJOGEE et al., 2004), deixando maiores concentrações de 5-HT na fenda sináptica.

Nossos dados demonstraram a diminuição do auto-receptor inibitório 5-HT_{1A} causada pela DEX pré-natal, o que poderia estar relacionado com um mecanismo compensatório devido a diminuição de TPH. Corroborando com nossos achados, Nagano *et al* (2012), mostraram que o tratamento de DEX durante a gestação (16º ao 21º dia) na dose de 50µg foi capaz de diminuir a expressão de 5-HT_{1A} no córtex pré-frontal de roedores com 4 e 12 semanas de idade (NAGANO et al., 2012). Diferentemente, Stolkin *et al*, mostraram que o tratamento gestacional com DEX nas doses de 0,05-0,8/mg/kg não mostrou diferença no *turnover* de 5-HT no córtex cerebral e no hipocampo, mas aumentava a quantidade de 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e SERT nas primeiras semanas de vida (SLOTKIN et al., 2006). Em outro trabalho, a dose de DEX pré-natal de 0,2mg/kg foi capaz de diminuir a quantidade de 5-HT no mesencéfalo, estriado e córtex na vida adulta (SLOTKIN; SEIDLER, 2010). Assim, podemos sugerir que dependendo da dosagem ou período em que o tratamento ocorre, diferentes mudanças podem ser encontradas a nível comportamental e da funcionalidade do sistema serotoninérgico neste modelo de programação fetal induzida pela DEX.

As evidências do papel da VitD na regulação do desenvolvimento e função das células nervosas são corroboradas pela presença da enzima 1α-hidroxilase, responsável pela conversão da forma ativa da VitD e, também da ampla expressão de VDR no cérebro, principalmente no hipotálamo e neurônios monoaminérgicos (EYLES et al., 2005). Além disso, a VitD desempenha um papel parecido com os neuroesteroides, dada a sua interação com os receptores de ligação a esteroides de resposta rápida (MARRS - *membrane associated rapid response steroid-binding receptor*), podendo em sua forma hormonal, agir em várias vias metabólicas intracelulares (KHANAL et al., 2008; NEMERE et al., 2010).

Ainda que nossos dados não tenham mostrado um efeito protetor da VitD sobre a ação da DEX de reduzir componentes do sistema serotoninérgico, existem estudos mostrando que a VitD pode modular tal agrupamento neuronal. Em um estudo publicado em 2018, pesquisadores demonstraram a relação na recaptação da 5-HT pelo SERT e MAO-A com a VitD em células serotoninérgicas. Desta forma, os grupos que receberam VitD tiveram a diminuição da expressão de SERT e MAO-A nas células serotoninérgicas e conseqüentemente maior tempo de exposição na fenda sináptica de 5-HT (SABIR et al., 2018). Um estudo recente com homens e mulheres que apresentam depressão maior mostrou que, após suplementação

com VitD (50000 UI por 3 meses) houve aumento significativo dos níveis séricos de 5-HT e melhora na severidade dos sintomas depressivos (ALGHAMDI et al., 2020).

Nossos resultados sugerem que o efeito antidepressivo da VitD parece não ser via sistema serotoninérgico, indicando que este efeito pode estar ocorrendo via outros sistemas de neurotransmissores ou via outras células nervosas. É importante lembrar que a enzima 1 α -hidroxilase e os VDR também são expressos na micróglia, ou seja, nas células não neuronais do SNC, indicando funções autócrinas e parácrinas do calcitriol nessas células nervosas (BROWN et al., 2003). Além de tudo, VitD pode estar relacionada à produção e liberação de fatores neurotróficos, como o fator de crescimento nervoso (NGF), muito importante para a diferenciação celular (BROWN et al., 2003). Outro importante papel da VitD na diminuição do comportamento do tipo depressivo, se relaciona ao fato de que a VitD está envolvida na síntese de proteínas que se ligam aos íons de cálcio, como a parvoalbumina e, dessa maneira, consegue manter a homeostase celular de cálcio, que é extremamente importante para o funcionamento das células neurais (DE VIRAGH; HAGLID; CELIO, 1989; FERNANDES DE ABREU; EYLES; FÉRON, 2009; TUOHIMAA et al., 2009). Por fim, o efeito protetor da VitD neste caso poderia também estar relacionado a sua ação de atenuar a morte neural causada pela DEX, papel que já foi demonstrado em outros estudos (GUIDOTTI et al., 2013; OBRADOVIC et al., 2006).

A VitD apresenta ainda funções de diferenciação celular no cérebro, promovendo o crescimento de neuritos através, por exemplo, da estimulação de fatores de crescimento (BROWN et al., 2003), como o BDNF. O BDNF é uma neurotrofina que auxilia na proteção dos neurônios, sendo altamente importante para o SNC na vida adulta (MURER; YAN; RAISMAN-VOZARI, 2001), além disso, é muito importante para a plasticidade sináptica e formação da memória (COWANSAGE; LEDOUX; MONFILS, 2010).

Pacientes depressivos apresentam níveis séricos diminuídos de BDNF (YOSHIMURA et al., 2011), e conseqüentemente, diminuição da manutenção dos neurônios cerebrais e da neurogênese. Além disso, a expressão de TGF- β 1 (*transforming growth factor-1*), um fator de crescimento, pode estimular o aumento de BDNF quando os níveis de VitD encontram-se adequados no organismo (HAWES et al., 2015; LABELLE; LECLERC, 2000). Ainda assim, outro estudo foi capaz de mostrar que o aumento da expressão de BDNF é capaz de melhorar os tratamentos antidepressivos (HUANG et al., 2011).

Hawes *et al* (2015) demonstraram que em roedores fêmeas submetidas a uma dieta deficiente de VitD (0UI) ou normal (2195UI) durante 5 semanas antes do acasalamento e durante a gestação, a deficiência de VitD foi capaz de diminuir a expressão do mRNA de BDNF no dia 14 do período embrionário (HAWES et al., 2015). Esses autores correlacionaram este efeito a alterações no neurodesenvolvimento dos animais.

Além disso, um outro mecanismo que pode estar associado a regulação dos transtornos psíquicos é o sistema dopaminérgico. A DA é um neurotransmissor que tem diversas funções no SNC, como relacionado à atividade motora, processos cognitivos, e à funções relacionadas à recompensa (STUCHLIK et al., 2007). Os principais agrupamentos dopaminérgicos se encontram na substância negra e na área tegmental ventral. A substância negra é responsável por inervar o núcleo caudado e putâmen, formando a via mesoestriatal, enquanto a área tegmental ventral inerva, núcleo accumbens, hipocampo e córtex pré-frontal, formando as vias mesolímbica e mesocortical (OADES; HALLIDAY, 1987).

Como citado anteriormente, a DA está relacionada com a hipótese monoaminérgica e, também é foco de ação de fármacos antidepressivos (DEAKIN; GRAEFF, 1991; NEMEROFF, 2007). Mais precisamente, ela está relacionada com os mecanismos neurais por trás da anedonia, segundo a “hipótese da desregulação dopaminérgica”, que se baseia na ideia de que alterações na sinalização dopaminérgica levam à disfunções neurais que geram a anedonia (SZCZYPIŃSKI; GOLA, 2018). O sistema mesolímbico tem sido bastante estudado em relação à recompensa e junto com o sistema mesocortical estão envolvidos na modulação das emoções [para revisão ver (BERRIDGE; KRINGELBACH, 2008; WISE, 2004)].

Curiosamente, crianças (6-12 anos) com déficit de atenção e hiperatividade suplementadas durante 12 semanas com 2000 UI de VitD (25(OH)D) apresentam aumento dos níveis de DA plasmática, mas não de 5-HT (SEYEDI et al., 2019). Além disso, já foi demonstrado na literatura que a deficiência de VitD reduz a expressão gênica da tirosina hidroxilase, que é responsável pela síntese a DA, no cérebro fetal de camundongo fêmeas no dia 17 do período embrionário (HAWES et al., 2015). Assim, tendo em vista que no presente trabalho a VitD mostrou um efeito anti-anedônico que não se refletiu em alterações de componentes serotoninérgicos, podemos inferir que este efeito possa ter ocorrido devido a alterações na neurotransmissão dopaminérgica via VitD. Mais estudos com foco no sistema dopaminérgico são necessários para testar esta hipótese.

Sabe-se que a exposição pré-natal a DEX no último trimestre da gestação aumenta a expressão de mRNA para CRH no PVN hipotalâmico e reduz os níveis de GR no hipocampo (LEVITT et al., 1996). As implicações são de que a exposição gestacional tardia à DEX pode alterar definitivamente a janela de ajuste do eixo HHA a nível hipotalâmico, diminuindo a sensibilidade ao feedback e elevando a atividade basal do HHA. Por outro lado, a exposição de DEX durante todo o período gestacional pode aumentar a atividade do eixo HHA, talvez aumentando a sensibilidade de diversas áreas aos GC (WÜST et al., 2005).

Com base nisso, esperávamos encontrar uma alteração na expressão de GR no DRN em nosso modelo experimental. Entretanto, esta hipótese não foi confirmada, pois não encontramos nenhum efeito da DEX ou da VitD sobre a expressão de GR no NDR. Os neurônios serotoninérgicos do NDR expressam GR (HARFSTRAND et al., 1986) e as mudanças dos níveis sistêmicos de GC alteram a atividade do NDR em roedores (DONNER et al., 2012; WASELUS; VALENTINO; VAN BOCKSTAELE, 2011). Isso pode ter contribuído no mecanismo que levou às mudanças causadas pela DEX na expressão de TPH e 5-HT_{1A} aos 6 MPN. Sendo assim, um estudo mostrou que a exclusão do gene de GR no NDR reduz o comportamento do tipo ansioso e do tipo depressivo em camundongos (WASELUS; VALENTINO; VAN BOCKSTAELE, 2011). Mais tarde mostrou-se que, essa depleção de GR aumenta a expressão de mRNA de TPH2 nas partes dorsal, lateral e caudal dos núcleos da rafe, sem alterar as concentrações de 5-HT e 5-HIAA (VINCENT et al., 2018).

Neste trabalho não avaliamos a ciclicidade estral e não realizamos as dosagens hormonais dos animais, porém, alguns estudos demonstram que as variações de hormônios durante o ciclo poderiam mostrar efeitos distintos em relação à exposição aos GC, mostrando diferenças entre o comportamento ansiolítico em diferentes fases do ciclo estral (MARCONDES et al., 2001). Ainda, o estradiol parece ter um efeito ansiolítico e antidepressivo (HIROI; NEUMAIER, 2006; LUND et al., 2005). Por outro lado, a progesterona apresenta efeitos antiestrogênicos em comportamentos que avaliam ansiedade (DIAZ-VÉLIZ et al., 1994; HIROI; NEUMAIER, 2006).

A neurotransmissão serotoninérgica no NDR pode servir como uma região crítica para o desenvolvimento de doenças psíquicas (HORNUNG, 2003). Num estudo em humanos, foi observado que mulheres apresentavam taxa reduzida de 5-HT comparada a homens em níveis basais (OKAZAWA et al., 2000). Em animais também foi demonstrado que a taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos é maior em machos em comparação com fêmeas ovariectomizadas, mostrando um efeito estimulatório do estradiol sobre a atividade

serotonérgica (KLINK; ROBICHAUD; DEBONNEL, 2002; ROBICHAUD; DEBONNEL, 2005). Este efeito estimulatório do estradiol sobre o sistema serotonérgico também já foi demonstrado em primatas (BETHEA et al., 2002). Não podemos excluir a possibilidade de que as variações hormonais possam ter mascarado parte dos efeitos da VitD sobre o sistema serotonérgico, tendo em vista que as avaliações neuroquímicas não foram feitas de acordo com as diferentes fases do ciclo estral.

Desta maneira, a exposição pré-natal a elevadas concentrações de GC, seja pela administração sintética ou como resultado do estresse materno, está associada com o processo de desenvolvimento neural e conseqüentemente, é um fator de risco para diagnóstico de distúrbios psicológicos como a depressão na vida adulta (LANGLEY; JACKSON, 1994; ROSENFELD; SUCHECKI; LEVINE, 1992). Logo, os resultados do presente estudo sugere que a suplementação de VitD durante a gestação pode desempenhar um papel importante em termos de neuroproteção e de estimulação do desenvolvimento e função cerebral (FÉRON et al., 2005) em situação de exposição excessiva à GC na fase pré-natal.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que a administração pré-natal de DEX causa uma alteração no conteúdo de componentes do sistema serotoninérgico no NDR, mas sem repercussões sobre comportamentos relacionados à depressão e anedonia. Apesar da suplementação gestacional com VitD mostrar efeitos antidepressivos, estes são suprimidos pela exposição pré-natal à DEX.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEKUNLE DAWODU; CAROL L WAGNER. Mother-child vitamin D deficiency: an international perspective. **Archive of Disease in Childhood**, v. 1, p. 1, 2007.
- ADELL, A.; CASANOVAS, J. M.; ARTIGAS, F. Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 4–5, p. 735–741, 1997.
- ALGHAMDI, S. et al. Vitamin D Supplementation Ameliorates Severity of Major Depressive Disorder. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 70, n. 2, p. 230–235, 2020.
- ANACKER, C. et al. Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 5, p. 872–883, 2013.
- AZMITIA, E. C.; LIAO, B.; CHEN, Y. S. Increase of tryptophan hydroxylase enzyme protein by dexamethasone in adrenalectomized rat midbrain. **Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 5041–5055, 1993.
- AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 179, n. 3, p. 641–667, 1978.
- BAKER, A. M. et al. A nested case-control study of midgestation vitamin D deficiency and risk of severe preeclampsia. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 11, p. 5105–5109, 2010.
- BANASR, M.; DWYER, J. M.; DUMAN, R. S. Cell atrophy and loss in depression: Reversal by antidepressant treatment. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 6, p. 730–737, 2011.
- BAR-PELED, O. et al. Fetal human brain exhibits a prenatal peak in the density of serotonin 5-HT_{1A} receptors. **Neuroscience Letters**, v. 127, n. 2, p. 173–176, 1991.
- BAUER, E. P. Serotonin in fear conditioning processes. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 68–77, 2015.
- Bellan M, Pirisi M, Sainaghi PP. Osteoporosis in Rheumatoid Arthritis: role of the vitamin D/parathyroid hormone system. **Rev Bras Reumatol**, v.55(3):256-263, 2015.
- BENEDIKTSSON, R. et al. Placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: A key regulator of fetal glucocorticoid exposure. **Clinical Endocrinology**, v. 46, n. 2, p. 161–166, 1997.
- BERRIDGE, K. C.; KRINGELBACH, M. L. Affective neuroscience of pleasure: Reward in humans and animals. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 457–480, 2008.
- BETHEA, C. L. et al. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 23, n. 1, p. 41–100, 2002.
- BOLAÑOS, C. A. et al. Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 12, p.

1317–1329, 2003.

BONNIN, A. et al. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. **Nature**, v. 472, n. 7343, p. 347–350, 2011.

BORGES, S. et al. Dopaminergic modulation of affective and social deficits induced by prenatal glucocorticoid exposure. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 10, p. 2068–2079, 2013.

BOUILLON, R. et al. Vitamin D and human health: Lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 6, p. 726–776, 2008.

BOURIN, M. et al. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behavioural Brain Research**, v. 164, n. 2, p. 266–269, 2005.

BRAUN, T. et al. Early-life glucocorticoid exposure: The hypothalamic-pituitary-adrenal axis, placental function, and longterm disease risk. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 6, p. 885–916, 2013.

BROWN, J. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. **Neuroscience Letters**, v. 343, n. 2, p. 139–143, 2003.

BRUSCHETTINI, M. et al. Lowering the dose of antenatal steroids: The effects of a single course of betamethasone on somatic growth and brain cell proliferation in the rat. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, n. 5, p. 1341–1346, 2006.

BUSADA, J. T.; CIDLOWSKI, J. A. **Mechanisms of Glucocorticoid Action During Development**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 125

BUTTGEREIT, F.; WEHLING, M.; BURMESTER, G. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions. **Arthritis and rheumatism**, v. 41, n. 5, p. 761–767, 1998.

CASAROTTO, P. C.; ANDREATINI, R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 11, p. 735–742, 2007.

CASS, W. A. et al. Evoked dopamine overflow is augmented in the striatum of calcitriol treated rats. **Neurochemistry International**, v. 60, n. 2, p. 186–191, 2012.

CELADA, P.; ARTIGAS, F. Monoamine oxidase inhibitors increase preferentially extracellular 5-hydroxytryptamine in the midbrain raphe nuclei. A brain microdialysis study in the awake rat. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 347, n. 6, p. 583–590, 1993.

CHAPMAN, K.; HOLMES, M.; SECKL, J. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 3, p. 1139–1206, 2013.

CHARMANDARI, E.; KINO, T.; CHROUSOS, G. P. Familial/sporadic glucocorticoid resistance clinical phenotype and molecular mechanisms. **Annals of the New York Academy**

of **Sciences**, v. 1024, p. 168–181, 2004.

CHASE, T. N.; MURPHY, D. L. Serotonin and central nervous system function. **Annual review of pharmacology**, v. 13, p. 181–197, 1973.

COMMONS, K. G. et al. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 955–960, 2017.

COMPSTON, J. Management of glucocorticoid-induced osteoporosis: What is new? **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 22, n. 9, p. 1595–1597, 2019.

COOLENS, J. L.; VAN BAELEN, H.; HEYNS, W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 197–202, 1987.

COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 113, n. 504, p. 1237–1264, 1967.

COUTINHO, A. E.; CHAPMAN, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 1, p. 2–13, 2011.

COWANSAGE, K.; LEDOUX, J.; MONFILS, M.-H. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Dynamic Gatekeeper of Neural Plasticity. **Current Molecular Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 12–29, 2010.

CRISPIM JUNIOR, C. F. et al. ETHOWATCHER: Validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in Biology and Medicine**, v. 42, n. 2, p. 257–264, 2012.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238–245, 2002.

DE VIRAGH, P. A.; HAGLID, K. G.; CELIO, M. R. Parvalbumin increases in the caudate putamen of rats with vitamin D hypervitaminosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 10, p. 3887–3890, 1989.

DE VRIES, A. et al. Prenatal dexamethasone exposure induces changes in nonhuman primate offspring cardiometabolic and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 1058–1067, 2007.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. CRITIQUE: 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 305–315, 1991.

DETKE, M. J.; LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. **Behavioural Brain Research**, v. 73, n. 1–2, p. 43–46, 1995.

DI ROSA, M. et al. Immuno-modulatory effects of vitamin D3 in human monocyte and macrophages. **Cellular Immunology**, v. 280, n. 1, p. 36–43, 2012.

DIAZ-VÉLIZ, G. et al. Progesterone effects on the acquisition of conditioned avoidance responses and other motoric behaviors in intact and ovariectomized rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 4, p. 387–394, 1994.

DIAZ, R.; BROWN, R. W.; SECKL, J. R. Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11β -hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 2570–2580, 1998.

DICKINSON, H. et al. Maternal dexamethasone treatment at midgestation reduces nephron number and alters renal gene expression in the fetal spiny mouse. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. 453–461, 2007.

DONNER, N. C. et al. Chronic non-invasive corticosterone administration abolishes the diurnal pattern of tph2 expression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 5, p. 645–661, 2012.

EDWARDS, C. R. W. et al. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? **The Lancet**, v. 341, n. 8841, p. 355–357, 1993.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435–451, 2004.

EYLES, D. et al. Vitamin D3 and brain development. **Neuroscience**, v. 118, n. 3, p. 641–653, 2003.

EYLES, D. W. et al. Distribution of the Vitamin D receptor and 1α -hydroxylase in human brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 29, n. 1, p. 21–30, 2005.

EYLES, D. W. et al. Intracellular distribution of the vitamin D receptor in the brain: Comparison with classic target tissues and redistribution with development. **Neuroscience**, v. 268, p. 1–9, 2014.

EYLES, D. W.; BURNE, T. H. J.; MCGRATH, J. J. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 34, n. 1, p. 47–64, 2013.

FERNANDES DE ABREU, D. A.; EYLES, D.; FÉRON, F. Vitamin D, a neuro-immunomodulator: Implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. SUPPL. 1, 2009.

FÉRON, F. et al. Developmental Vitamin D3 deficiency alters the adult rat brain. **Brain Research Bulletin**, v. 65, n. 2, p. 141–148, 2005.

FOWDEN, A. L.; LI, J.; FORHEAD, A. J. Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, n. 01, p. 113–122, 1998.

FUMAGALLI, F. et al. Expression of mRNA coding for the serotonin transporter in aged vs. young rat brain: Differential effects of glucocorticoids. **Brain Research**, v. 719, n. 1–2, p. 225–

228, 1996.

GALZIN, A. M. et al. Characterization of the 5-Hydroxytryptamine Receptor Modulating the Release of 5-[3H]Hydroxytryptamine in Slices of the Human Neocortex. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, n. 4, p. 1293–1301, 1992.

GIGUÈRE, V. et al. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. **Cell**, v. 46, n. 5, p. 645–652, 1986.

GOLAN, D. E. et al. **Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2^a ed. Guanabara Koogan, 2009.

GOÑI-BALENTZIAGA, O. et al. Social instability in female rodents as a model of stress related disorders: A systematic review. **Physiology and Behavior**, v. 196, p. 190–199, 2018.

GOTO, M. et al. In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual development. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 4, p. 953–960, 2006.

GROVES, N. J.; MCGRATH, J. J.; BURNE, T. H. J. Vitamin D as a Neurosteroid Affecting the Developing and Adult Brain. **Annual Review of Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 117–141, 2014.

GUIDOTTI, G. et al. Glucocorticoid receptor and fkbp5 expression is altered following exposure to chronic stress: Modulation by antidepressant treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 4, p. 616–627, 2013.

HADDAD, P. et al. Influence of calcium or 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplementation on the hepatic microsomal and in vivo metabolism of vitamin D₃ in vitamin D-depleted rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 78, n. 6, p. 1529–1537, 1986.

HANKIN, B. L.; ABRAMSON, L. Y. Development of Gender Differences in Depression: An Elaborated Cognitive Vulnerability-Transactional Stress Theory. **Psychological Bulletin**, v. 127, n. 6, p. 773–796, 2001.

HARFSTRAND, A. et al. Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 24, p. 9779–9783, 1986.

HARMS, L. R. et al. Vitamin D and the brain. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 657–669, 2011.

HARRIS, A.; SECKL, J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. **Hormones and Behavior**, v. 59, n. 3, p. 279–289, 2011.

HART, P. H. et al. Vitamin D in fetal development: Findings from a birth cohort study. **Pediatrics**, v. 135, n. 1, p. e167–e173, 2015.

HASEGAWA, H.; TOMITA, H. Assessment of Taste Disorders in Rats by Simultaneous Study of the Two-Bottle Preference Test and Abnormal Ingestive Behavior. **Auris Nasus Larynx**, v. 13, p. S33–S41, 1986.

HAWES, J. E. et al. Maternal vitamin D deficiency alters fetal brain development in the

- BALB/c mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 286, p. 192–200, 2015.
- HERVÁS, I.; ARTIGAS, F. Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 358, n. 1, p. 9–18, 1998.
- HEWISON, M. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 321, n. 2, p. 103–111, 2010.
- HIDALGO, A. A. et al. Dexamethasone enhances $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ effects by increasing vitamin D receptor transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 42, p. 36228–36237, 2011.
- HIROI, R. et al. Sex-dependent programming effects of prenatal glucocorticoid treatment on the developing serotonin system and stress-related behaviors in adulthood. **Neuroscience**, v. 320, p. 43–56, 2016.
- HIROI, R.; NEUMAIER, J. F. Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. **Behavioural Brain Research**, v. 166, n. 1, p. 93–100, 2006.
- HOLICK, M. F. Science in medicine Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **Science in Medicine**, v. 116, n. 8, p. 2062–2072, 2006.
- HOLICK, M. F. Vitamin D Deficiency. **Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation**, p. 115–127, 2007.
- HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911–1930, 2011.
- HOLICK, M. F.; MACLAUGHLIN, J. A.; DOPPELT, S. H. Regulation of cutaneous previtamin D₃ photosynthesis in man: Skin pigment is not an essential regulator. **Science**, v. 211, n. 4482, p. 590–593, 1981.
- HORNUNG, J. P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 26, n. 4, p. 331–343, 2003.
- HOUGAARD, K. S. et al. Prenatal stress may increase vulnerability to life events: Comparison with the effects of prenatal dexamethasone. **Developmental Brain Research**, v. 159, n. 1, p. 55–63, 2005.
- HUANG, Z. et al. Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats. **Neuroscience Letters**, v. 493, n. 3, p. 145–148, 2011.
- HUHTAKANGAS, J. A. et al. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D₃ in vivo and in vitro. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 11, p. 2660–2671, 2004.
- HUNTER, R. G. et al. Acute stress and hippocampal histone H3 lysine 9 trimethylation, a retrotransposon silencing response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

United States of America, v. 109, n. 43, p. 17657–17662, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Rio de Janeiro: IBGE; 2014.

ISHIMOTO, H.; JAFFE, R. B. Development and function of the human fetal adrenal cortex: A key component in the feto-placental unit. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 3, p. 317–355, 2011.

JACOBS, B. L.; AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 1, p. 165–230, 1992.

JIANG, P. et al. Dysregulation of vitamin D metabolism in the brain and myocardium of rats following prolonged exposure to dexamethasone. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 17, p. 3445–3451, 2014a.

JIANG, P. et al. Neurochemical effects of chronic administration of calcitriol in rats. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6048–6059, 2014b.

JONES, G. Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: Importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 α -Hydroxylase in the Classical and Nonclassical Actions of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃. **Seminars in Dialysis**, v. 20, n. 4, p. 316–324, 2007.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 9, p. 518–530, 2013.

KANEKO, I. et al. 1,25-DihydroxyVitamin D regulates expression of the tryptophan hydroxylase 2 and leptin genes: Implication for behavioral influences of Vitamin D. **FASEB Journal**, v. 29, n. 9, p. 4023–4035, 2015.

KAWAURA, A. et al. Antidepressant-like effect of 1 α -hydroxyvitamin D₃ on mice in the forced swimming test. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 63, n. 1, p. 81–84, 2017.

KESBY, J. P. et al. Developmental vitamin D deficiency alters dopamine-mediated behaviors and dopamine transporter function in adult female rats. **Psychopharmacology**, v. 208, n. 1, p. 159–168, 2010.

KHANAL, R. C. et al. Membrane receptor-initiated signaling in 1,25(OH)₂D₃-stimulated calcium uptake in intestinal epithelial cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 4, p. 1109–1116, 2008.

KHORAMINYA, N. et al. Therapeutic effects of vitamin D as adjunctive therapy to fluoxetine in patients with major depressive disorder. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 47, n. 3, p. 271–275, 2013.

KIRBY, L. G.; ALLEN, A. R.; LUCKI, I. Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. **Brain Research**, v. 682, n. 1–2, p. 189–196, 1995.

KLINK, R.; ROBICHAUD, M.; DEBONNEL, G. Gender and gonadal status modulation of

- dorsal raphe nucleus serotonergic neurons. Part I: Effects of gender and pregnancy. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1119–1128, 2002.
- KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western blotting. **Methods**, v. 38, n. 4, p. 283–293, 2006.
- LABELLE, C.; LECLERC, N. Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. **Developmental Brain Research**, v. 123, n. 1, p. 1–11, 2000.
- LAJIC, S.; NORDENSTRÖM, A.; HIRVIKOSKI, T. Long-term outcome of prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia. **Endocrine Development**, v. 13, p. 82–98, 2008.
- LANGLEY, S. C.; JACKSON, A. A. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. **Clinical Science**, v. 86, n. 2, p. 217–222, 1994.
- LESCH, K. P.; GUTKNECHT, L. Focus on the 5-HT_{1A} receptor: Emerging role of a gene regulatory variant in psychopathology and pharmacogenetics. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 7, n. 4, p. 381–385, 2004.
- LEVITT, N. S. et al. Dexamethasone in the Last Week of Pregnancy Attenuates Hippocampal Glucocorticoid Receptor Gene Expression and Elevates Blood Pressure in the Adult Offspring in the Rat. **Neuroendocrinology**, v. 64, n. (6), p. 412–418, 1996.
- LIN, K. T.; WANG, L. H. New dimension of glucocorticoids in cancer treatment. **Steroids**, v. 111, n. February, p. 84–88, 2016.
- LIN, Y. J. et al. Early postweaning treatment with dimethyl fumarate prevents prenatal dexamethasone- and postnatal high-fat diet-induced programmed hypertension in male rat offspring. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.
- LIU, W. et al. Swimming exercise ameliorates depression-like behaviors induced by prenatal exposure to glucocorticoids in rats. **Neuroscience Letters**, v. 524, n. 2, p. 119–123, 2012.
- LOCKWOOD, C. J. et al. Corticotropin-releasing hormone and related pituitary-adrenal axis hormones in fetal and maternal blood during the second half of pregnancy. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 243–251, 1996.
- LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. **J Pediatr (Rio J)**, v. 83(5 Suppl):S163-S177, 2007.
- LUND, T. D. et al. Novel actions of estrogen receptor- β on anxiety-related behaviors. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 797–807, 2005.
- LUNDWALL, K. et al. Paricalcitol, Microvascular and Endothelial Function in Non-Diabetic Chronic Kidney Disease: A Randomized Trial. **American Journal of Nephrology**, v. 42, n. 4, p. 265–273, 2015.
- MARCONDES, F. K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology and Behavior**, v. 74, n. 4–5, p. 435–440, 2001.
- MASTORAKOS, G. et al. Presence of Immunoreactive Corticotropin-Releasing Hormone in

- Human Endometrium. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, n. 3, p. 1046–1050, 1996.
- MCGRATH, J. et al. Vitamin D supplementation during the first year of life and risk of schizophrenia: A Finnish birth cohort study. **Schizophrenia Research**, v. 67, n. 2–3, p. 237–245, 2004.
- MCKENNA, N. J.; O'MALLEY, B. W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 465–474, 2002.
- MCQUADE, R.; SHARP, T. Functional Mapping of Dorsal and Median Raphe 5-Hydroxytryptamine Pathways in Forebrain of the Rat Using Microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 2, p. 791–796, 2002.
- MEANEY, M. J.; SZYF, M. Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity? **Trends in Neurosciences**, v. 28, n. 9, p. 456–463, 2005.
- MESIANO, S.; JAFFE, R. B. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 3, p. 378–403, 1997.
- MEZADRI, T. J. et al. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p. 200–205, 2011.
- MICHAEL, B. R. P. et al. INTERRELATIONSHIPS BETWEEN THE ENDCXRINE. n. 1896, 1963.
- MOSS, T. J. M. et al. Programming effects in sheep of prenatal growth restriction and glucocorticoid exposure. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, n. 3 50-3, p. 960–970, 2001.
- MURER, M. G.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 63, n. 1, p. 71–124, 2001.
- NAGANO, M. et al. Early intervention with fluoxetine reverses abnormalities in the serotonergic system and behavior of rats exposed prenatally to dexamethasone. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 2, p. 292–300, 2012.
- NEMERE, I. et al. Intestinal cell calcium uptake and the targeted knockout of the 1,25D 3-MARRS (Membrane-associated, Rapid Response Steroid-binding) receptor/PDIA3/Erp57. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 41, p. 31859–31866, 2010.
- NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **Journal of Psychiatric Research**, v. 41, n. 3–4, p. 189–206, 2007.
- NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2010.
- NORMAN, A. W. Minireview: Vitamin D receptor: New assignments for an already busy receptor. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5542–5548, 2006.

- NYIRENDA, M. J. et al. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 10, p. 2174–2181, 1998.
- OADES, R. D.; HALLIDAY, G. M. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. **Brain Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 117–165, 1987.
- OBRADOVIC, D. et al. Cross-talk of vitamin D and glucocorticoids in hippocampal cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, n. 2, p. 500–509, 2006.
- OKAZAWA, H. et al. Statistical mapping analysis of serotonin synthesis images generated in healthy volunteers using positron-emission tomography and α -[¹¹C]methyl-L-tryptophan. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 25, n. 4, p. 359–370, 2000.
- OWEN, M. J. et al. Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. **British Journal of Psychiatry**, v. 198, n. 3, p. 173–175, 2011.
- PAFFONI, A. et al. Vitamin D deficiency and infertility: Insights from in vitro fertilization cycles. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 11, p. E2372–E2376, 2014.
- PAQUETTE, A. G.; MARSIT, C. J. The developmental basis of epigenetic regulation of HTR2A and psychiatric outcomes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 12, p. 2065–2072, 2014.
- PARKER, G. B.; BROTCHE, H.; GRAHAM, R. K. Vitamin D and depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 208, p. 56–61, 2017.
- PATRICK, R. P.; AMES, B. N. Vitamin D hormone regulates serotonin synthesis. Part 1: Relevance for autism. **FASEB Journal**, v. 28, n. 6, p. 2398–2413, 2014.
- PATRICK, R. P.; AMES, B. N. Vitamin D and the omega-3 fatty acids control serotonin synthesis and action, part 2: Relevance for ADHD, bipolar disorder, schizophrenia, and impulsive behavior. **FASEB Journal**, v. 29, n. 6, p. 2207–2222, 2015.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edn. Vol. 70. 2006.
- POMPEIANO, M.; PALACIOS, J. M.; MENGOD, G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. **Molecular Brain Research**, v. 23, n. 1–2, p. 163–178, 1994.
- PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, 1978.
- PORSOLT, R. D. et al. Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 2–3, p. 201–210, 1979.
- PORSOLT, R. D. Animal models of depression: Utility for transgenic research. **Reviews in the**

Neurosciences, v. 11, n. 1, p. 53–58, 2000.

PREMAOR, M. O. et al. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of a general hospital in southern Brazil. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 31, n. 11, p. 991–995, 2008.

RÄIKKÖNEN, K. et al. Depression in young adults with very low birth weight: The Helsinki study of very low-birth-weight adults. **Archives of General Psychiatry**, v. 65, n. 3, p. 290–296, 2008.

REICHEL, H.; KOEFFLER, H. P.; NORMAN, A. W. The Role of the Vitamin D Endocrine System in Health and Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 15, p. 980–991, 1989.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 2005.

RICHARDSON, H. N. et al. Exposure to repetitive versus varied stress during prenatal development generates two distinct anxiogenic and neuroendocrine profiles in adulthood. **Endocrinology**, v. 147, n. 5, p. 2506–2517, 2006.

ROBICHAUD, M.; DEBONNEL, G. Oestrogen and testosterone modulate the firing activity of dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in both male and female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 17, n. 3, p. 179–185, 2005.

ROCHEL, N.; HOURAI, S.; MORAS, D. Crystal structure of hereditary vitamin D-resistant rickets-Associated mutant H305Q of vitamin D nuclear receptor bound to its natural ligand. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, n. 1–2, p. 84–87, 2010.

ROSENFELD, P.; SUCHECKI, D.; LEVINE, S. Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 16, n. 4, p. 553–568, 1992.

RUMAJOGEE, P. et al. Adaption of the serotonergic neuronal phenotype in the absence of 5-HT autoreceptors or the 5-HT transporter: Involvement of BDNF and cAMP. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 937–944, 2004.

SABIR, M. S. et al. Optimal vitamin D spurs serotonin: 1,25-dihydroxyvitamin D represses serotonin reuptake transport (SERT) and degradation (MAO-A) gene expression in cultured rat serotonergic neuronal cell lines. **Genes and Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2018.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W.-D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of gl... [Pharmacol Ther. 2002] - PubMed - NCBI. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 23–43, 2002.

SCHILDKRAUT, J. J.; KETY, S. S. Biogenic Amines and Emotion Pharmacological studies

suggest a relationship between brain biogenic amines and affective state. v. 156, n. 3771, p. 21–30, 1967.

SEDAGHAT, K. et al. **Mesolimbic dopamine system and its modulation by vitamin D in a chronic mild stress model of depression in the rat.** [s.l.] Elsevier B.V., 2019. v. 356

SEIGER, Å.; OLSON, L. Late prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: Fluorescence histochemical observations. **Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, v. 140, n. 3, p. 281–318, 1973.

SEYEDI, M. et al. The Effect of Vitamin D3 Supplementation on Serum BDNF, Dopamine, and Serotonin in Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 18, n. 6, p. 496–501, 2019.

SHARP, T. et al. Important messages in the “post”: recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 12, p. 629–636, 2007.

SHIPTON, E. A.; SHIPTON, E. E. Vitamin D and pain: Vitamin D and its role in the aetiology and maintenance of chronic pain states and associated comorbidities. **Pain Research and Treatment**, v. 2015, 2015.

SLOTKIN, T. A. et al. Critical prenatal and postnatal periods for persistent effects of dexamethasone on serotonergic and dopaminergic systems. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 5, p. 904–911, 2006.

SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J. Prenatal chlorpyrifos exposure elicits presynaptic serotonergic and dopaminergic hyperactivity at adolescence: Critical periods for regional and sex-selective effects. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 3, p. 421–427, 2007.

SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J. Mimicking maternal smoking and pharmacotherapy of preterm labor: Interactions of fetal nicotine and dexamethasone on serotonin and dopamine synaptic function in adolescence and adulthood. **Brain Research Bulletin**, v. 82, n. 1–2, p. 124–134, 2010.

SPROUSE, J. S.; AGHAJANIAN, G. K. (-)-Propranolol blocks the inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing by 5-HT_{1A} selective agonists. **European Journal of Pharmacology**, v. 128, n. 3, p. 295–298, 1986.

ST-PIERRE, J. et al. Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. **Placenta**, v. 48, p. S66–S71, 2016.

STAHN, C.; BUTTGEREIT, F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 4, n. 10, p. 525–533, 2008.

STAUDERMAN, K. A.; JONES, D. J. Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT(1A) subtype. **European Journal of Pharmacology**, v. 113, n. 3, p. 463–464, 1985.

STUHLIK, A. et al. Manipulation of D2 receptors with quinpirole and sulpiride affects locomotor activity before spatial behavior of rats in an active place avoidance task.

Neuroscience Research, v. 58, n. 2, p. 133–139, 2007.

SZCZYPIŃSKI, J. J.; GOLLA, M. Dopamine dysregulation hypothesis: The common basis for motivational anhedonia in major depressive disorder and schizophrenia? **Reviews in the Neurosciences**, v. 29, n. 7, p. 727–744, 2018.

TEIXEIRA, C., SANTOS-SILVA, J., DE SOUZA, D., RAFACHO, A., ANHE, G., & BORDIN, S. Dexamethasone during pregnancy impairs maternal pancreatic β -cell renewal during lactation, **Endocrine Connections**, 8(2), 120-131., 2020.

TERNAN, C. L. M. C. et al. Type 2 mRNA Levels in Human Pregnancies Complicated by Intrauterine Growth Restriction : An Analysis of Possible Mechanisms. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4979–4983, 2001.

THOMPSON, C. et al. Birth weight and the risk of depressive disorder in late life. **British Journal of Psychiatry**, v. 179, n. NOV., p. 450–455, 2001.

TUOHIMAA, P. et al. Vitamin D, nervous system and aging. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. 278–286, 2009.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009.

VAN BEL, F.; HEIJNEN, C. J. Perinatal programming and reprogramming by glucocorticoid therapy and perinatal stress. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 14, n. 3, p. 127–129, 2009.

VAN DER LAAN, S.; MEIJER, O. C. Pharmacology of glucocorticoids: Beyond receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, n. 2–3, p. 483–491, 2008.

VEENSTRA, T. D. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in the central nervous system of the rat embryo. **Brain Research**, v. 804, n. 2, p. 193–205, 1998.

VINCENT, M. Y. et al. Dorsal raphe nucleus glucocorticoid receptors inhibit tph2 gene expression in male C57BL/6J mice. **Neuroscience Letters**, v. 665, n. July 2017, p. 48–53, 2018.

WASELUS, M.; VALENTINO, R. J.; VAN BOCKSTAELE, E. J. Collateralized dorsal raphe nucleus projections: A mechanism for the integration of diverse functions during stress. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 41, n. 4, p. 266–280, 2011.

WEISSMAN, M. M. et al. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. **Journal of the American Medical Association**, v. 276, n. 4, p. 293–299, 1996.

WIKLUND, L.; RKLUND, A. B. J. MECHANISMS OF R E G R O W T H IN THE BULBOSPINAL SEROTONIN. v. 191, p. 129–160, 1980.

WILLNER, P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358–364, 1987.

- WISE, R. A. Dopamine, learning and motivation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 483–494, 2004.
- WÖHRLE, S. et al. FGF receptors control vitamin D and phosphate homeostasis by mediating renal FGF-23 signaling and regulating FGF-23 expression in bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 10, p. 2486–2497, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, Depression and Other Common Mental Disorders. **Global Health Estimates**. Geneva: 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- WRZOSEK, M. et al. Vitamin D and the central nervous system. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 2, p. 271–278, 2013.
- WU, T. et al. Treadmill Exercise Ameliorates Depression-Like Behavior in the Rats With Prenatal Dexamethasone Exposure: The Role of Hippocampal Mitochondria. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. March, p. 1–10, 2019.
- WÜST, S. et al. Birth weight is associated with salivary cortisol responses to psychosocial stress in adult life. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 6, p. 591–598, 2005.
- XU, Y. J. et al. CRH/CRHR1 mediates prenatal synthetic glucocorticoid programming of depression-like behavior across 2 generations. **FASEB Journal**, v. 32, n. 8, p. 4258–4269, 2018.
- YOSHIMURA, R. et al. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) polymorphism Val66Met is associated with neither serum BDNF level nor response to selective serotonin reuptake inhibitors in depressed Japanese patients. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 4, p. 1022–1025, 2011.
- ZHANG, Z. et al. Genomic analysis of the nuclear receptor family: New insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. **Genome Research**, v. 14, n. 4, p. 580–590, 2004.
- ZHU, P. et al. Cord Blood Vitamin D and Neurocognitive Development Are Nonlinearly Related in Toddlers. **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 6, p. 1232–1238, 2015.
- ZIEROLD, C.; MINGS, J. A.; DELUCA, H. F. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, n. 2, p. 234–237, 2003.
- ŻMUDZKA, E. et al. Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. **Life Sciences**, v. 210, p. 106–124, 2018.

8 ANEXO

8.1 Frequência no Teste do Nado Forçado

Em relação a frequência de imobilidade, nado e escalada, foi observado uma diferença tempo-dependente, não aparecendo diferença estatística aos 3MPN (Fig. 16 A, D e G) e nem aos 6MPN (Fig. 16 B, E e H), aparecendo apenas aos 12 MPN. Quando observado a frequência de imobilidade aos 12MPN, a ANOVA mostrou efeito da DEX ($p=0,003$; $F(1,30)=9,94$; $r^2=21,46$) e interação entre o tratamento com DEX e a suplementação com VitD gestacional ($p=0,03$; $F(1,30)=5,1$; $r^2= 11,01$). Porém, quando observado o pós-teste foi visto o efeito da VitD diminuindo a frequência de imobilidade ($p=0,009$) e no grupo tratado com DEX gestacional a DEX não permitiu esse efeito ($p=0,0008$) (Fig. 16C). Na frequência do nado aos 12 MPN, a ANOVA apresentou efeito do tratamento pré-natal com DEX ($p=0,002$; $F(1,31)=11,33$; $r^2=25,17$), porém, o pós-teste mostrou que apenas no grupo suplementado com VitD ($0,001$), a DEX foi capaz de aumentar a frequência da natação (Fig. 16F). Já no comportamento de escalada aos 12 MPN, a ANOVA mostrou efeito da DEX ($p=0,01$; $F(1,30)=6,79$; $r^2=15,28$) e interação ($p=0,006$; $F(1,30)=8,62$; $r^2=19,39$). Porém, o pós-teste-teste confirmou apenas o efeito da interação, onde a suplementação gestacional com VitD diminui a frequência de escalada ($p=0,009$) e no grupo tratado com DEX pré-natal a VitD não foi capaz de barrar esse efeito ($p=0,0007$) (Fig. 16I).

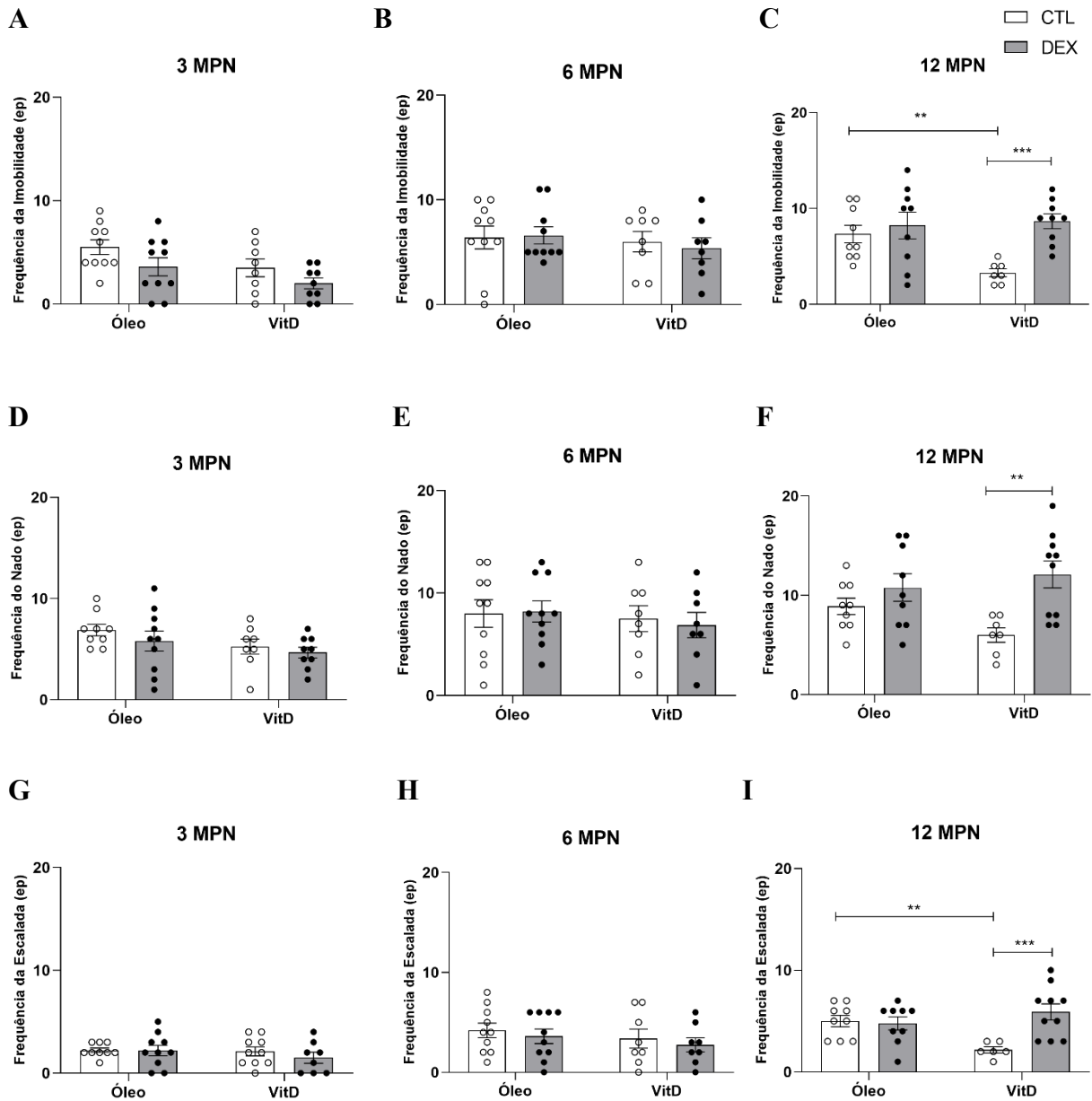


Figura 16. Frequência do comportamento de imobilidade, nado e escalada durante o teste do nado forçado, aos 3, 6 e 12 MPN (A, B e C, D, E e F, G, H e I respectivamente) na prole de fêmeas expostas à DEX e/ou suplementadas com VitD na gestação. ANOVA two-way seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados estão expressos como: média \pm EPM, $p < 0,05$ ($n = 7-10$) ** $p \leq 0,009$; *** $p \leq 0,0009$.

8.2 Resultados ANOVA de duas vias

Preferência pela Sacarose:

	CTL	DEX	VitD	DEXVitD	Valor de P
3 MPN	94,2 ± 3,4	96,8 ± 2,6	94,9 ± 2,3	95,3 ± 3,4	NS
6 MPN	97,1 ± 1,2	96,3 ± 2,5	94,7 ± 3,7	96,2 ± 1,6	NS
12 MPN	90,2 ± 3,8	88,3 ± 5 ^a	86,6 ± 5,4	95,7 ± 2 ^{ab}	P ^a = 0,0241 P ^{ab} = 0,001

Tabela 2. Resultados da média e desvio padrão para o teste de preferência pela sacarose dos animais estudados aos 3, 6 e 12 MPN.

	ANOVA two-way		
	Interação	VitD	DEX
3 MPN	F _{1,29} =1,020 P=0,3208 R ² =3,140	F _{1,29} =0,1139 P=0,7382 R ² =0,3506	F _{1,29} =2,065 P=0,1614 R ² =6,355
6 MPN	F _{1,30} =1,699 P=0,2023 R ² =5,010	F _{1,30} =2,112 P=0,1565 R ² =6,226	F _{1,30} =0,1673 P=0,6854 R ² =0,4932
12 MPN	F _{1,27} =13,23 P=0,0011 ^{ab} R ² =27	F _{1,27} =1,597 P=0,2171 R ² =3,260	F _{1,27} =5,711 P=0,00241 ^a R ² =11,66

Tabela 3. Resultados da ANOVA de duas vias para preferência pela sacarose dos animais estudados aos 3, 6 e 12 MPN.

Nado Forçado

Duração:

	Variáveis (Duração)	CTL	DEX	VitD	DEXVitD	Valor de P
3 MPN	Imobilidade	45 ± 23,7	32,8 ± 33,4	25,5 ± 23,2 ^b	9,3 ± 8,7	P=0,0146
	Nado	177,4 ± 48,2	202,4 ± 64,6	212,2 ± 53,6	229,1 ± 43,9	NS
	Escalada	62,6 ± 18,9	55,1 ± 42,9	44,1 ± 43,7	37,8 ± 27,8	NS
6 MPN	Imobilidade	96,4 ± 87,9	72,2 ± 59,6	80,3 ± 52,2	87,1 ± 54,7	NS
	Nado	143,4 ± 77,7	143,5 ± 64	135,9 ± 74,5	133,7 ± 79,5	NS
	Escalada	50,5 ± 33,1	57,1 ± 46,3	48,8 ± 45,9	36,2 ± 26,1	NS
12 MPN	Imobilidade	89,9 ± 63,6	55,5 ± 55,4	15,1 ± 7,8	73,6 ± 32,5 ^{ab}	P=0,01
	Nado	110,1 ± 54,2	140 ± 58	182,2 ± 38,4 ^b	135,8 ± 30,3 ^{ab}	P ^b =0,04 P ^{ab} =0,02
	Escalada	87,2 ± 37,6	89,7 ± 60,3	85 ± 28,3	70,7 ± 25,7	NS

Tabela 4. Resultados da média e desvio padrão da duração das variáveis etológicas avaliadas no TNF (imobilidade, nado e escalada) aos 3, 6 e 12 MPN.

ANOVA two-way				
	Variáveis (Duração)	Interação	VitD	DEX
3 MPN	Imobilidade	F _{1,30} =0,056 P=0,8131 R ² =0,1408	F _{1,30} =6,721 P=0,0146 ^b R ² =16,64	F _{1,30} =2,951 P=0,0961 R ² =7,304
	Nado	F _{1,34} =0,054 P=0,8173 R ² =0,1393	F _{1,34} =3,151 P=0,0848 R ² =8,096	F _{1,34} =1,457 P=0,2358 R ² =3,743
	Escalada	F _{1,33} =0,002 P=0,9611 R ² =0,006	F _{1,33} =2,453 P=0,1268 R ² =6,837	F _{1,33} =0,3662 P=0,5492 R ² =1,021
6 MPN	Imobilidade	F _{1,29} =0,422 P=0,5210 R ² =1,424	F _{1,29} =0,0006 P=0,97950 R ² =0,002	F _{1,29} =0,1330 P=0,7180 R ² =0,4487
	Nado	F _{1,32} =0,001 P=0,9647 R ² =0,006	F _{1,32} =0,1216 P=0,7296 R ² =0,3786	F _{1,32} =0,001 P=0,9661 R ² =0,005
	Escalada	F _{1,32} =0,5386 P=0,4683 R ² =1,618	F _{1,32} =0,7373 P=0,3969 R ² =2,214	F _{1,32} =0,052 P=0,8210 R ² =0,1563
12 MPN	Imobilidade	F _{1,29} =7,508 P=0,01 ^{ab} R ² =19,66	F _{1,29} =2,839 P=0,1027 R ² =7,357	F _{1,29} =0,5107 P=0,4806 R ² =1,323
	Nado	F _{1,30} =5,516 P=0,0256 ^{ab} R ² =14,03	F _{1,30} =4,359 P=0,0454 ^b R ² =11,09	F _{1,30} =0,2574 P=0,6156 R ² =0,6547
	Escalada	F _{1,31} =0,3680 P=0,5485 R ² =1,140	F _{1,31} =0,5858 P=0,4499 R ² =1,815	F _{1,31} =0,1822 P=0,6724 R ² =0,5646

Tabela 5. Resultados da ANOVA de duas vias da duração das variáveis etológicas avaliadas no TNF (imobilidade, nado e escalada) aos 3, 6 e 12 MPN.

Latência:

	Variáveis (Latência)	CTL	DEX	VitD	DEXVitD	Valor de P
3 MPN	Imobilidade	59,6 ± 33,5	50,7 ± 48,3	79,3 ± 63,2	95,3 ± 75,7	NS
	Nado	16 ± 17,9	3,9 ± 1,2	4,3 ± 3	9,7 ± 12,9 ^{ab}	P=0,0363
	Escalada	14,4 ± 15,8	10,8 ± 10,7	6,4 ± 6,9	24,4 ± 33,7	NS
6 MPN	Imobilidade	22,1 ± 15,6	35,5 ± 38,4	68,81 ± 64 ^b	71,3 ± 64,6	P=0,01
	Nado	4,9 ± 3,7	9,9 ± 7	12 ± 11,8	32,7 ± 46,2	NS
	Escalada	12,3 ± 12,1	15,1 ± 17,4	4,9 ± 3,1	30,4 ± 46,8	NS
	Imobilidade	89,2 ± 49,4	80,9 ± 54,9 ^a	168,8 ± 43,1	59,8 ± 35,6 ^{ab}	P ^a =0,001 P ^{ab} =0,004

12 MPN	Nado	15,6 ± 21,5	9,4 ± 5,8	36,9 ± 48	8,4 ± 11,3	NS
	Escalada	11,4 ± 8,2	8,3 ± 5,2 ^a	13,9 ± 8,3	6,2 ± 1,3	P=0,03

Tabela 6. Resultados da média e desvio padrão da latência das variáveis etológicas avaliadas no TNF (imobilidade, nado e escalada) aos 3, 6 e 12 MPN.

ANOVA two-way				
	Variáveis (Latência)	Interação	VitD	DEX
3 MPN	Imobilidade	F _{1,33} =0,4256 P=0,5187 R ² =1,166	F _{1,33} =2,820 P=0,1025 R ² =7,727	F _{1,33} =0,033 P=0,855 R ² =0,092
	Nado	F _{1,30} =4,803 P=0,0363 ^{ab} R ² =13,26	F _{1,30} =0,5483 P=0,4648 R ² =1,513	F _{1,30} =0,7222 P=0,4021 R ² =1,993
	Escalada	F _{1,30} =2,354 P=0,1354 R ² =7,030	F _{1,30} =0,1516 P=0,699 R ² =0,4526	F _{1,30} =1,036 P=0,3169 R ² =3,094
6 MPN	Imobilidade	F _{1,31} =0,1070 P=0,7457 R ² =0,2854	F _{1,31} =6,238 P=0,0180 ^b R ² =16,63	F _{1,31} =0,2315 P=0,6338 R ² =0,6172
	Nado	F _{1,29} =0,8945 P=0,3521 R ² =2,512	F _{1,29} =3,250 P=0,0818 R ² =9,127	F _{1,29} =2,393 P=0,1327 R ² =6,720
	Escalada	F _{1,30} =1,673 P=0,2058 R ² =4,900	F _{1,30} =0,2017 P=0,6566 R ² =0,5908	F _{1,30} =2,619 P=0,1160 R ² =7,672
12 MPN	Imobilidade	F _{1,29} =9,775 P=0,004 ^{ab} R ² =18,13	F _{1,29} =3,304 P=0,07 R ² =6,127	F _{1,29} =13,31 P=0,001 ^a R ² =24,68
	Nado	F _{1,28} =1,504 P=0,2303 R ² =4,428	F _{1,28} =1,242 P=0,2746 R ² =3,657	F _{1,28} =3,641 P=0,0667 R ² =10,72
	Escalada	F _{1,29} =0,9318 P=0,3424 R ² =2,640	F _{1,29} =0,004 P=0,9446 R ² =0,013	F _{1,29} =5,173 P=0,0305 ^a R ² =14,65

Tabela 7. Resultados da ANOVA de duas vias da latência das variáveis etológicas avaliadas no TNF (imobilidade, nado e escalada) aos 3, 6 e 12 MPN.

Frequência:

	Variáveis (Frequência)	CTL	DEX	VitD	DEXVitD	Valor de P
3 MPN	Imobilidade	5,5 ± 2,2	3,6 ± 2,7 ^a	3,5 ± 2,4 ^b	2 ± 1,5	P ^a =0,032 P ^b =0,023
	Nado	6,8 ± 1,6	5,8 ± 3,1	5,2 ± 2,1	4,6 ± 1,5	NS
	Escalada	2,2 ± 0,6	2,2 ± 1,3	2,1 ± 1,3	1,5 ± 1,5	NS
	Imobilidade	6,4 ± 3,4	6,6 ± 2,5	6 ± 2,7	5,3 ± 2,8	NS

6 MPN	Nado	8 ± 4,2	8,2 ± 3,2	7,5 ± 3,5	6,8 ± 3,4	NS
	Escalada	4,2 ± 2,3	3,6 ± 2,3	3,3 ± 2,6	2,7 ± 1,9	NS
12 MPN	Imobilidade	7,3 ± 2,7	8,2 ± 4,1 ^a	3,2 ± 1,1 ^b	8,6 ± 2,2 ^{ab}	P ^a =0,003 P ^b =0,07 P ^{ab} =0,03
	Nado	8,8 ± 2,4	10,7 ± 4,1 ^a	6 ± 1,9	12,1 ± 4,2	P=0,002
	Escalada	5 ± 1,6	4,7 ± 1,9 ^a	2,1 ± 0,7 [*]	5,9 ± 2,5 ^{ab}	P ^a =0,01 P ^{ab} =0,006 P [*] =0,009

Tabela 8. Resultados da média e desvio padrão da frequência das variáveis etológicas avaliadas no TNF (imobilidade, nado e escalada) aos 3, 6 e 12 MPN.

ANOVA two-way				
	Variáveis (Frequência)	Interação	VitD	DEX
3 MPN	Imobilidade	F _{1,33} =0,069 P=0,7941 R ² =0,1570	F _{1,33} =5,607 P=0,0239 ^b R ² =12,71	F _{1,33} =5,001 P=0,0322 ^a R ² =11,34
	Nado	F _{1,32} =0,111 P=0,7406 R ² =0,3040	F _{1,32} =3,353 P=0,0764 R ² =9,141	F _{1,32} =1,220 P=0,2776 R ² =3,326
	Escalada	F _{1,33} =0,4206 P=0,5211 R ² =1,216	F _{1,33} =0,8518 P=0,3627 R ² =2,462	F _{1,33} =0,4878 P=0,4898 R ² =1,41096,
6 MPN	Imobilidade	F _{1,32} =0,1737 P=0,6796 R ² =0,5283	F _{1,32} =0,6738 P=0,4178 R ² =2,050	F _{1,32} =0,046 P=0,8314 R ² =0,1402
	Nado	F _{1,32} =0,1119 P=0,7402 R ² =0,3425	F _{1,32} =0,5476 P=0,4647 R ² =1,676	F _{1,32} =0,029 P=0,8643 R ² =0,090
	Escalada	F _{1,32} =0,0002 P=0,9873 R ² =0,0007	F _{1,32} =1,151 P=0,2914 R ² =3,407	F _{1,32} =0,6155 P=0,4385 R ² =1,823
12 MPN	Imobilidade	F _{1,30} =5,106 P=0,0313 ^{ab} R ² =11,01	F _{1,30} =3,285 P=0,0799 R ² =7,086	F _{1,30} =9,947 P=0,0036 ^a R ² =21,46
	Nado	F _{1,31} =3,149 P=0,0858 R ² =6,994	F _{1,31} =0,4369 P=0,5140 R ² =0,9681	F _{1,31} =11,33 P=0,002 ^a R ² =25,17
	Escalada	F _{1,30} =8,627 P=0,0063 ^{ab} R ² =19,39	F _{1,30} =1,614 P=0,2136 R ² =3,628	F _{1,30} =6,797 P=0,0141 ^a R ² =15,28

Tabela 9. Resultados da ANOVA de duas vias da frequência das variáveis etológicas avaliadas no TNF (imobilidade, nado e escalada) aos 3, 6 e 12 MPN.

Western Blotting

		CTL	DEX	VitD	DEXVitD	Valor de P
6 MPN	TPH	3,2±2,6	0,4±0,2 ^a	2,6±1,5	0,8±0,8	p=0,0103
	5-HT _{1A}	2,6±1,2	0,6±0,3 ^a	3,2±2	0,7±0,4	p=0,0045
	SERT	3,4±2,6	0,7±0,3	1,7±1	1,3±0,9	NS
	GR	1±0,2	1,1±0,4	1,4±1,2	1,1±0,2	NS
12 MPN	TPH	0,9±0,4	0,7±0,4	0,9±0,4	1,2±0,4	NS
	5-HT _{1A}	1,8±1,2	1,2±0,3	1,2±0,4	1,7±0,97	NS
	SERT	1,5±1	1,3±0,8	0,8±0,2	1,3±0,3	NS
	GR	1,1±1,1	0,9±0,3	1,3±1,9	0,9±0,9	NS

Tabela 10. Resultados da média e desvio padrão na densidade óptica de TPH, 5-HT_{1A}, SERT e GR (respectivamente) nas fêmeas aos 6 e 12 MPN.

ANOVA two way				
	Proteínas	Interação	VitD	DEX
6 MPN	TPH	F _{1,11} =0,4231 p=0,5288 r ² =2,041	F _{1,11} =0,0236 p=0,8805 r ² =0,1143	F _{1,11} =9,544 p=0,0103 ^a r ² =46,04
	5-HT _{1A}	F _{1,11} =0,1092 p=0,7473 r ² =0,4421	F _{1,11} =0,3734 p=0,5536 r ² =1,512	F _{1,11} =12,61 p=0,0045 ^a r ² =51,07
	SERT	F _{1,12} =2,351 p=0,1511 r ² =12,25	F _{1,12} =0,5579 p=0,4695 r ² =2,906	F _{1,12} =4,289 p=0,0606 r ² =22,34
	GR	F _{1,12} =0,555 p=0,4706 r ² =4,289	F _{1,12} =0,2781 p=0,6076 r ² =2,149	F _{1,12} =0,1064 p=0,7499 r ² =0,8226
12 MPN	TPH	F _{1,12} =1,653 p=0,2228 r ² =11,08	F _{1,12} =1,175 p=0,2998 r ² =7,876	F _{1,12} =0,0859 p=0,7744 r ² =0,5761
	5-HT _{1A}	F _{1,12} =1,584 p=0,2321 r ² =11,62	F _{1,12} =0,0479 p=0,8303 r ² =0,3518	F _{1,12} =0,006 p=0,9349 r ² =0,051
	SERT	F _{1,12} =0,6307 p=0,4425 r ² =4,568	F _{1,12} =0,9739 p=0,3432 r ² =7,053	F _{1,12} =0,2026 p=0,6606 r ² =1,468
	GR	F _{1,12} =0,053 p=0,8215 r ² =0,4331	F _{1,12} =0,044 p=0,8358 r ² =0,3655	F _{1,12} =0,1810 p=0,6781 r ² =1,474

Tabela 11. Resultados da ANOVA de duas vias da expressão de TPH, 5-HT_{1A}, SERT e GR (respectivamente) nas fêmeas aos 6 e 12 MPN.

8.3 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos efeitos da administração de dexametasona durante a gravidez sobre a cognição, o comportamento e metabolismo energético de ratas Wistar e suas proles.", protocolada sob o CEUA nº 7174170417, sob a responsabilidade de **Fernanda Barbosa Lima Christian** e equipe; Flaviano Lorenzon - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 05/06/2017.

We certify that the proposal "Study of the effects of dexamethasone used during pregnancy on cognition, behavior and metabolism of Wistar female rats and their offsprings.", utilizing 370 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 7174170417, under the responsibility of **Fernanda Barbosa Lima Christian** and team; Flaviano Lorenzon - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 06/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2017** a **06/2021**

Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 2 meses**

N: **370**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **100 a 200 g**

Resumo: Os glicocorticoides (GCs) são hormônios importantes para o desenvolvimento fetal, além de participarem da homeostase glicêmica e da resposta adequada ao estresse ao longo da vida. Porém, seu uso na clínica como droga anti-inflamatória e imunossupressora tem provocado efeitos colaterais que incluem alterações do metabolismo que podem levar à síndrome metabólica, bem como a doenças cardiovasculares, osteoporose e transtornos psíquicos. A exposição pré-natal a concentrações elevadas de GC tem efeitos deletérios na prole, podendo leva-los à morte, ou, em caso de sobrevivência, a danos metabólicos e neurais que repercutem em diversas áreas na vida adulta. A vitamina D tem sido sugerida como um tratamento coadjuvante para amenizar os efeitos colaterais dos glicocorticoides, principalmente no que tange a osteoporose, visto a sua participação na homeostase do cálcio e fósforo. Recentemente a vitamina D tem sido sugerida como um hormônio pluripotente com atividade em diversos sistemas, incluindo o sistema nervoso central, participando inclusive no desenvolvimento do cérebro fetal. A deficiência de vitamina D está se tornando cada vez mais frequente em mulheres em idade reprodutiva. Por um lado, poucos alimentos contêm quantidades adequadas ou são suplementados com vitamina D para suprir as necessidades dietéticas diárias. Por outro as altas taxas de incidência de tumores cutâneos devido à alta exposição solar têm levado a comportamentos de evitar a exposição ao sol e ao uso de filtros de proteção solar. Com isso, a síntese endógena de vitamina D é prejudicada, contribuindo para deficiência da mesma. Os conhecidos efeitos deletérios dos glicocorticoides administrados na gravidez levam a prole a desenvolver desordens metabólicas similares àquelas encontradas na diabete e obesidade, bem como levam a mãe a desenvolver desordens psíquicas que podem interferir nas funções cognitivas, afetando o cuidado com a prole e levando às neuropatias associadas. Nós hipotetizamos que a suplementação de vitamin D durante a gravidez de ratas expostas a altas doses de dexametasona, uma droga com potente ação glicocorticóide, poderá reverter, ou ao menos atenuar os efeitos deletérios dos glicocorticoides tanto nas gestantes quanto na prole de ratos Wistar. Nossa proposta visa estudar ainda se a prole apresenta diferenças sexuais na susceptibilidade aos efeitos da dexametasona e ou nas postostas à intervenção com vitamin D. O trabalho será realizado com ratas Wistar com 70-150 dias e machos adultos para o protocolo de acasalamento (com duração de 6 dias). Parte das fêmeas prenhes receberão suplementação de vitamina D via oral, por gavagem (15 UI) durante todo o período gestacional e/ou dexametasona nas doses de 0,1 e 0,2 mg/kg na da água de beber, entre o 14º e 19º dia de gestação. Após o parto, as fêmeas serão submetidas aos seguinte testes comportamentais: teste de comportamento materno, onde serão avaliados a condução dos filhotes até o ninho, amamentação e ato de lambar os filhotes; teste do ninho, onde o grau de complexidade do ninho construído será avaliado; labirinto em cruz-elevado, avaliando-se variáveis etológicas e espaço-temporais para análise de comportamento do tipo ansioso; teste do nado forçado repetido, pra avaliação de comportamento do tipo depressivo através de análise de imobilidade; e o teste de reconhecimento de objetos, para avaliação da cognição e memória dos animais. As proles serão avaliadas desde o período pré-natal com relação a parâmetros de desenvolvimento neural, testes comportamentais como os aplicados nas mães, bem como dados murinométricos e parâmetros metabólicos tais como níveis plasmáticos de glicose e triacilglicerol, conteúdo de gordura



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



hepática, tolerância à insulina, massa de células β pancreáticas e massas absoluta e relativa de órgãos metabólicos.

Local do experimento: CFS-CCB-UFSC, (na ala antiga do CCB, no antigo prédio da Técnica Operatório) com aproximadamente 6 m² cada sala de animais.

Florianópolis, 05 de junho de 2017

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Figura 17. Certificado de aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais.