



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

NAYANA SOARES GOMES

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E OXIDATIVAS NO
CÉREBRO E INTESTINO DE RATOS SUBMETIDOS A SEPARAÇÃO MATERNA:
INFLUÊNCIA DO SEXO E DO TRATAMENTO COM ESCITALOPRAM E
DOXICICLINA**

FORTALEZA –CE

2019

NAYANA SOARES GOMES

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E OXIDATIVAS NO
CÉREBRO E INTESTINO DE RATOS SUBMETIDOS A SEPARAÇÃO MATERNA:
INFLUÊNCIA DO SEXO E DO TRATAMENTO COM ESCITALOPRAM E
DOXICICLINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Danielle Macêdo Gaspar

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G615a Gomes, Nayana Soares.
AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E OXIDATIVAS NO CÉREBRO E
INTESTINO DE RATOS SUBMETIDOS A SEPARAÇÃO MATERNA: INFLUÊNCIA DO
SEXO E DO TRATAMENTO COM ESCITALOPRAM E DOXICICLINA / Nayana Soares
Gomes. – 2019.
95 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

1. experiência de adversidade precoce. 2. separação materna. 3. depressão. 4.
microbiota intestinal. 5. sexo. I. Título.

CDD 616.9

NAYANA SOARES GOMES

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E OXIDATIVAS NO
CÉREBRO E INTESTINO DE RATOS SUBMETIDOS A SEPARAÇÃO MATERNA:
INFLUÊNCIA DO SEXO E DO TRATAMENTO COM ESCITALOPRAM E
DOXICICLINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Aprovada em: 29 / 04 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Danielle Macêdo Gaspar
Universidade Federal do Ceará - UFC (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Adriana Rolim Campos Barros
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dedico este trabalho aos meus pais. A meus irmãos, minha avó, a família “que é ponto de partida. Contudo, ponto de chegada”.

AGRADECIMENTO

A Deus, pela presença, por me capacitar e me conceder força em todos os momentos da minha vida.

A minha Família, em especial a minha mãe, Carolinda Vilma Soares de Oliveira e ao meu padrasto Francisco Neudo, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos, Samara Soares e Rafael Soares, pela amizade e companheirismo.

A Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, representado pelos professores pelo empenho na formação científica dos pós-graduandos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A Professora Danielle Macedo Gaspar, pela dedicada orientação e incansável busca de extrair o que nós temos de melhor e pela acolhida no Laboratório de Neuropsicofarmacologia, em fim, por todo o apoio, confiança, ensinamentos, paciência e dedicação na orientação deste trabalho. Sua sabedoria foi fundamental na concretização desta etapa.

Ao Professor Fábio Miyajima pelos ensinamentos e por todas as contribuições científicas para a construção desse trabalho.

Aos professores do Laboratório de Neuropsicofarmacologia e Microbiologia Médica, pelas valiosas colaborações.

Aos técnicos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia e funcionários do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), pelo apoio.

Aos veterinários, Wesley Lyeverton e Gabriela Mariângela, pelas instruções relacionadas à ética no uso de animais.

Aos vários amigos do laboratório, com quem tive a alegria de conviver, Francisco Stefânio, Raimunda (Raica), Tatiane da Silva, Adriano José, Carlos Eduardo, Ayane Edwiges, Francisco Eliclécio, Levi Salvador, Marylane Viana, Germana Silva, Camila Nayane, Jaqueline Carletti, Cyntia Montenegro, Manuel Alves, Rafaela Carneiro, Roberta Oliveira, Ana Isabelle, Caren Nádia e Giovanna Riello. Agradeço pelo carinho com que me receberam e pela contribuição direta e indireta nesse projeto.

Aos Membros da Banca, pela presteza em aceitar o convite, pela cuidadosa leitura e pelas valiosas contribuições.

"Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar. Dê-me, Senhor, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir".

São Tomás de Aquino

RESUMO

Eventos de adversidade na vida precoce (EAP) podem desencadear vários transtornos mentais, dentre eles o transtorno depressivo. A separação materna (SM), como uma das formas de EAP, tem sido relacionada ao desenvolvimento de depressão e de doenças inflamatórias intestinais na idade adulta. A fisiopatologia da depressão envolve alterações em monoaminas, neuroinflamatórias, neuro-oxidativas/nitrosativas e redução de fatores neurotróficos. Apesar dos avanços no estudo da depressão, a influência do sexo na neurobiologia deste transtorno é algo ainda pouco estudada. As pesquisas mostram que bactérias intestinais regulam vários genes e neurotransmissores envolvidos na modulação de doenças psiquiátricas. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo verificar a influência do sexo nas alterações tipo-depressão e na memória de trabalho de animais expostos à SM e verificar alterações neuro-oxidativas/nitrosativas, inflamatórias, neurotróficas e intestinais, além de avaliar a reversão destas alterações pelas estratégias antidepressivas escitalopram (ESC) ou doxiciclina (Dox). Para a realização do trabalho ratos *Wistar* de ambos os sexos foram submetidos à separação materna ou deixados com suas mães (controles) entre os dias pós-natais 1 ao 15, na idade adulta entre os PN60 e 73, parte destes animais foi tratada com salina (controles) e outra parte com os antidepressivos ESC ou Dox. No PN74 os animais foram submetidos aos testes comportamentais de nado forçado (para avaliação da depressão), Y maze (memória de trabalho) e atividade locomotora. As fezes foram coletadas e as áreas cerebrais córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e corpo estriado (CE) foram dissecadas, além de segmentos do intestino. Foram realizados os testes de níveis de GSH, atividade da mieloperoxidase (MPO), peroxidação lipídica (PL) e nitrito nas áreas cerebrais e intestino (GSH e MPO), enquanto o BDNF e interleucina 6 (IL-6) foram avaliados no hipocampo. Até o momento foi realizada a determinação das bactérias totais, pela técnica de qPCR, no intestino como experimento inicial para a determinação de alterações em filos relevantes para a depressão. Os resultados mostraram que os animais SM machos e fêmeas apresentaram aumento do tempo de imobilidade no nado forçado quando comparado aos controles, um indicativo de comportamento tipo-depressão. Tanto ESC como Dox foram eficazes no tratamento das fêmeas e não dos machos. Não observamos alterações na memória de trabalho, enquanto a atividade locomotora dos animais tratados com Dox se mostrou reduzida nos machos tratados com Dox em relação aos controles. Nos machos SM, a Dox aumentou o número de groomings em relação aos controles, mostrando um possível comportamento ansioso, enquanto as fêmeas SM apresentaram redução da ansiedade evidenciada pelo aumento da permanência no centro do campo aberto. Nos parâmetros neuroquímicos, observamos que os animais apresentaram: aumento do BDNF (fêmeas) tanto em animais SM como nos tratados com ESC e dox; aumento da IL-6 (fêmeas) nos animais SM; redução do GSH que foi revertida pelo ESC e Dox (machos e fêmeas); aumento da peroxidação lipídica e nitrito (fêmeas) que foi revertida pelo ESC e Dox. No intestino observamos que ambos machos e fêmeas apresentaram aumento de MPO e redução de GSH no jejuno. Em conclusão, nossos resultados mostram que fêmeas adultas são susceptíveis a alterações tipo-depressão e a alterações neuroquímicas induzidas pela SM, enquanto ambos machos e fêmeas são susceptíveis a alterações intestinais desencadeadas pela SM.

Palavras-chave: experiência de adversidade precoce; separação materna; depressão; sexo; microbiota intestinal.

ABSTRACT

Early life adversity (ELA) events can trigger several mental disorders, such as anxiety and depressive disorder. Maternal separation (MS), one form of ELA, is related to the development of depression and development of inflammatory bowel disease in adulthood. The pathophysiology of depression involves changes in monoamines, neuroinflammation, neuro-oxidative/nitrosative stress, and reduction of neurotrophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Despite the advances in the understanding of depression, the influence of sex on the neurobiology of this disorder is not elucidated. The present study aimed to verify the influence of sex in the depressive-like and working memory alterations of animals exposed to MS and to verify alterations in neuro-oxidative/nitrosative stress, neuroinflammation, neurotrophic and intestinal microbiota, besides evaluating the reversal of these changes by the antidepressant strategies escitalopram (ESC) or doxycycline (Doxy). *Wistar* rats of both sexes were submitted to MS or left with their mothers (controls) between postnatal days (PNs) 1 to 15, and during adulthood between PN60 and 73. Part of these animals was treated with saline (controls) and other part with ESC or Doxy. On PN74, the animals were submitted to behavioral tests of forced swimming (for the evaluation of depression), Y maze (working memory) and locomotor activity. After the tests the feces were collected and the cerebral areas, namely prefrontal cortex (PFC), hippocampus and striatum (ST) were dissected, as well as segments of the intestine. The levels of GSH, myeloperoxidase activity, lipid peroxidation (PL) and nitrite were evaluated in the PFC, hippocampus, ST and intestine, while BDNF and interleukin 6 (IL-6) were evaluated in the hippocampus. To date, the determination of total bacteria by qPCR technique in the gut was performed as an initial experiment to determine changes in phyla relevant to depression. The results showed that male and female MS animals presented increased immobility time in forced swimming when compared to controls, an indicative of depressive-like behavior. Both ESC and doxy were effective in the treatment of females, but not males. We did not observe changes in working memory, while the locomotor activity of male animals treated with doxy was reduced relative to controls. Males MS treated with doxy increased the number of groomings in relation to controls, showing a possible anxious behavior, while the MS females presented anxiety reduction evidenced by the increase of permanence in the center of the open field. In the neurochemical parameters we observed that the animals showed: increase of BDNF (females) in both MS animals treated with ESC and doxy; increased IL-6 (females) in MS animals; reduction of GSH that was reversed by the ESC and doxy (males and females); increased lipid peroxidation and nitrite (females) that was reversed by ESC and doxy. In the gut, we observed that both males and females presented increased MPO activity and reduction of GSH in the jejunum. In conclusion, our results show that females are more susceptible to the effects of MS on symptoms of depression and neurochemical changes triggered by this disorder, while both males and females are susceptible to gut changes triggered by MS.

Palavras-chave: Early life adversity; maternal separation; depression; sex; intestinal microbiota.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Teorias que explicam as vias fisiopatológicas da depressão.....	20
Figura 2 - Mecanismo antioxidante do GSH.....	23
Figura 3 - Estrutura química do escitalopram.	28
Figura 4 - Estrutura química da doxiciclina.....	29
Figura 5 - Ilustração simplificado das divisões de grupos.....	34
Figura 6 - Cronograma do projeto do estudo. Representação esquemática da linha de tempo.	35
Figura 7 - Efeito do estresse por separação materna em neonatos na vida adulta, no número de crossing (a), rearing (b), grooming (c) e tempo no centro da arena (d) de animais tratados com salina (Sal), escitalopram (ESC) e doxiciclina (DOXY).....	43
Figura 8 - Tempo de imobilidade dos animais avaliados no teste de nado forçado.....	44
Figura 9 - Efeito do estresse por separação materna, avaliando a memória de trabalho em animais adultos pela taxa de alternância espontâneas no labirinto em Y.....	45
Figura 10 - Determinação dos níveis de BDNF na área hipocampal.....	47
Figura 11 - Determinação dos níveis de MPO nas áreas cerebrais: córtex pré-frontal (a), hipocampo (b) e corpo estriado (c).....	49
Figura 12 - Níveis Hipocampais de IL-6 em machos e fêmeas.....	50
Figura 13 - Níveis de Glutathiona Reduzida nas áreas cerebrais: córtex pré-frontal (a), hipocampo (b) e corpo estriado (c).....	53
Figura 14 - Níveis de Malonildialdeido no córtex pré-frontal.....	54
Figura 15 - Níveis de Malonildialdeido no hipocampo.....	55

Figura 16 - Níveis de Malonildialdeído no corpo estriado.....	56
Figura 17 - Concentração de nitrito/ nitrato no córtex pré-frontal.....	57
Figura 18 - Concentração de nitrito/ nitrato no hipocampo.....	58
Figura 19 - Concentração nitrito/ nitrato no corpo estriado.....	59
Figura 20 - Determinação dos níveis de MPO nos segmentos intestinais: duodeno (a), jejuno (b) e íleo (c).....	61
Figura 21 - Níveis de glutathiona reduzida nas áreas nos segmentos intestinais: duodeno (a), jejuno (b) e íleo (c).....	63
Figura 22. Valores de CT obtidos nos protocolos de PCR em tempo real.....	64
Figura 23. Valores de CT obtidos após normalização nos protocolos de PCR em tempo real.....	65
Figura 24. Quantificação relativa de DNA com base na média de CTs.....	66

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Representação esquemática dos efeitos da separação materna sobre os testes neuroquímicos.....92
- Quadro 2** - Representação esquemática dos efeitos dos tratamentos com escitalopram e doxiciclina sobre os testes neuroquímicos.....93
- Quadro 3** - Representação esquemática dos efeitos da separação materna sobre os testes bioquímicos nas áreas intestinais.....94
- Quadro 4** - Representação esquemática dos efeitos dos tratamentos com escitalopram e doxiciclina sobre os testes bioquímicos nas áreas intestinais.....94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADTs	Antidepressivos Tricíclicos
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
Cl ⁻	Ânion cloreto
CAT	Catalase
Cm	Centímetro
CEPA	Comitê de Ética de Pesquisa Animal
CE	Corpo estriado
CPF	Córtex pré-frontal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM	Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DOX	Doxiciclina
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ESC	Escitalopram
et al.	E colaboradores
F	Fêmea
FTN	Fator de necrose tumoral
GSH	Glutationa reduzida
HC	Hipocampo
HOCl	Ácido hipocloroso
HHA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IFN	Interferons
IL-6	Interleucina 6
iMAOs	Inibidores da Monoaminoxidase
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
Kg	Quilograma
M	Macho
MAO	Monoaminoxidase
MDA	Malonildialdeído
mg	Miligramas
MOP	Mieloperoxidase

NP-SH	Sulfidrídicos não proteicos
NO	Óxido Nítrico
NSM	Não separados matematicamente
O ²	Oxigênio
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Tampão de fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SAL	Solução Salina (0,9% p/v)
SM	Separado matematicamente
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico
TDM	Transtorno depressivo maior
TrkB	Tropomiosina quinase B
UFC	Universidade federal do Ceará
µL	microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Adversidade precoce de vida como fator de risco para o desenvolvimento de transtornos mentais.....	17
1.2	Transtorno depressivo maior.....	18
1.2.1	Neurobiologia da Depressão.....	20
1.2.1.1	Estresse oxidativo e nitrosativo na depressão.....	21
1.2.1.2	Hipótese das Citocinas na depressão.....	23
1.2.2	Influência do gênero na depressão.....	24
1.2.3	Eixo cérebro-intestino-microbiota e seu papel na depressão.....	25
1.3	Farmacoterapia do transtorno depressivo maior.....	27
1.3.1	Escitalopram.....	28
1.3.2	Doxiciclina.....	28
2.	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	30
2.1	OBJETIVOS.....	30
2.2	Objetivo geral.....	30
3	Objetivo específico.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Animais.....	33
4.2	Desenho experimental.....	33
4.3	Protocolo de tratamento para indução do transtorno depressivo maior	35
4.3.1	Separação materna (SM).....	35
4.3.2	Protocolo de tratamento com antidepressivo.....	36
4.3.3	Protocolo de tratamento com antibiótico	36
5	Testes comportamentais.....	36
5.1	Teste do campo aberto.....	36
5.2	Teste de nado forçado.....	37
5.3	Teste de labirinto em Y (y-maze).....	37
6	Coleta das amostras fecais.....	37
7	Extração do DNA.....	38
8	Análise por PCR tempo real.....	38
9	Testes neuroquímicos.....	38
9.1.	Nível de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).....	38
9.2.	Determinação da atividade da mieloperoxidase	39
9.3.	Teste de ELISA para dosagem dos níveis de IL-6.....	39

9.4.	Níveis de glutathiona reduzida (GSH).....	40
9.5.	Peroxidação lipídica (TBARS).....	40
9.6.	Determinações dos níveis de nitrito.....	41
10	Análise Estatística.....	41
11	RESULTADOS.....	42
11.1.	Avaliações comportamentais	42
11.1.1.	Campo aberto.....	42
11.1.2.	Nado forçado.....	44
11.1.3.	Labirinto em Y (y-maze).....	45
12	Avaliações neuroquímicas.....	46
12.1.	Nível de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).....	46
12.2.	Determinação da atividade da mieloperoxidase.....	48
12.3.	Teste de ELISA para dosagem dos níveis de IL-6.....	50
12.4.	Níveis de glutathiona reduzida (GSH).....	51
12.5.	Peroxidação Lipídica (TBARS).....	54
12.6.	Determinações dos níveis de nitrito.....	57
13.	Avaliação do processo inflamatório e estresse oxidativo no intestino.....	59
13.1.	Determinação da Atividade da Mieloperoxidase.....	59
13.2.	Níveis de glutathiona reduzida (GSH) nas áreas intestinais.....	62
14.	Bactérias totais.....	64
15.	DISCUSSÃO.....	67
15.1.	Alterações comportamentais induzidas pelo modelo de separação materna.....	67
15.2.	Alterações oxidativa e nitrosativa induzidas pelo modelo de separação materna nas áreas cerebrais.....	69
15.3.	Alterações oxidativa e nitrosativa induzidas pelo modelo de separação materna nas áreas intestinais.....	74
16.	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
	ANEXO.....	92
	ANEXO A- Quadros esquemáticos dos efeitos dos testes neuroquímicos e bioquímicos.....	92
	ANEXO B – Aprovação da pesquisa pela comissão de ética no uso de animais da universidade federal do ceará (ceua-ufc).....	95

INTRODUÇÃO

1.1. Adversidade precoce de vida como fator de risco para o desenvolvimento de transtornos mentais

A exposição a adversidades em fases precoces da vida leva ao desenvolvimento de transtornos mentais na idade adulta, como o transtorno de personalidade *borderline* (CRAWFORD et al., 2009), transtorno de ansiedade, pânico e depressão (LEWINSOHN et al., 2008). Estudos apontam que a ocorrência desses transtornos está ligada a mudanças neuroendócrinas, como a hiperatividade do eixo Hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA) levando a alterações na resposta ao estresse (BLEKER et al., 2018).

Pesquisas recentes têm mostrado que o neurodesenvolvimento pós-natal é altamente comprometido pela interação entre as experiências estressantes de vida precoce e os sistemas neuro-imunes imaturos. Sendo que o estresse crônico pode vir a desencadear uma desregulação no microbioma intestinal, este por sua vez está envolvido em um sistema de sinalização cérebro-intestino em que podem causar importantes efeitos fisiológicos no corpo. Evidências recentes sustentam que espécies microbianas, ligantes e/ou produtos dentro do intestino em desenvolvimento desempenham um papel fundamental na programação precoce do sistema nervoso central e na regulação da imunidade inata intestinal (CONG et al., 2015).

Para verificar essas desregulações, utiliza-se na pesquisa científica diversos modelos de experimentação animal. Dentre destes modelos à utilização de roedores como ratos e camundongos. Os neonatos de roedores precisam do constante cuidado materno, pois não possuem algumas condições essenciais para sobreviverem, a exemplo da falta de mecanismos termorreguladores durante a primeira semana de vida. Sendo a mãe fonte de nutrição, proteção e calor. Além disso, é durante os períodos iniciais que ocorre o desenvolvimento emocional e cognitivo dos filhotes (RÉUS et al., 2018). Todos esses fatores fazem com que o contato materno com a prole seja imprescindível para o desenvolvimento saudável dos mesmos (VETULANI, 2013).

A separação materna é um modelo de estresse neonatal onde a prole é separada da mãe diariamente durante um determinado tempo. A exposição prematura

a esse estresse leva a um prejuízo cognitivo na idade adulta (LEJEUNE, 2013). Esse modelo mimetiza, por exemplo, a situação de bebês nascidos prematuramente, que precisam sobreviver fora do ambiente intrauterino protetor. A maioria fica sujeita a vários estressores, incluindo repetidos procedimentos dolorosos invasivos, infecção, desconforto diário, luz, ruído e ausência do contato materno (CONG et al., 2015). De acordo com Jutapakdeegul (2003), a separação materna é um evento traumático e, dependendo do protocolo adotado, pode levar ao aparecimento de fenótipo tipo-depressão durante a vida adulta, que pode ser evidenciado por testes comportamentais e neuroquímicos. Neste contexto, foi observado que a separação materna por um período de 3 horas, durante 15 dias após o nascimento, consegue de causar sintomas tipo-depressão na idade adulta.

1.2. Transtorno depressivo maior

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma complexa doença mental, de alta incidência, que compromete significativamente a qualidade de vida dos pacientes. De etiologia multifatorial, acumulam-se estudos que evidenciam fatores de risco genéticos e ambientais (TOLENTINO & SCHMIDT, 2018).

O TDM é um transtorno incapacitante associado a uma alta taxa de não recuperação, recorrência, gravidade e cronicidade dos sintomas, como pensamentos suicidas (GILCHRIST & GUNN, 2007). A prevalência global de depressão e sintomas depressivos vem aumentando nas últimas décadas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2017), essa enfermidade afeta mais de 300 milhões de pessoas de todas as idades, número equivalente a 4,4% da população global.

Ao longo da vida, afeta entre 20 e 25% das mulheres e 7 a 12% dos homens, o que mostra que o TDM é duas vezes mais comum em mulheres (MCLEAN et al., 2011). Os estudos epidemiológicos mostram que a depressão é duas vezes mais prevalente em mulheres jovens do que homens na faixa etária de 14 a 25 anos, mas essa proporção diminui com o avanço da idade. De fato, a partir da puberdade, as mulheres jovens correm maior risco de depressão e transtornos mentais em todo o mundo (WHITEFORD et al., 2013).

Diferenças entre fatores socioeconômicos, incluindo abuso, educação e renda, impactam diretamente a taxa de depressão em mulheres. No entanto, o risco

diferencial de desenvolver depressão pode derivar, principalmente, de diferenças biológicas entre os sexos (ALBERT, 2015). As mulheres experimentam formas específicas de doenças relacionadas à depressão, incluindo transtorno disfórico pré-menstrual, depressão pós-parto e ansiedade pós-menopausa, as quais estão associadas a alterações nos hormônios ovarianos e podem contribuir para a prevalência da depressão entre mulheres (ALBERT, 2015).

Correlacionar alterações hormonais em mulheres, particularmente durante a puberdade, antes da menstruação, após a gravidez e na perimenopausa, sugere que as flutuações hormonais femininas, como o estrogênio, podem ser um fator desencadeante da depressão (ALBERT, 2015).

Um estudo com mulheres americanas entre 36-45 anos, sem histórico de depressão, mostrou que as mulheres que entraram mais cedo na transição da menopausa têm um risco maior de desenvolver depressão (COHEN et al., 2006). Outro trabalho evidenciou que a terapia de reposição hormonal, particularmente durante a perimenopausa, pode ser eficaz na prevenção da depressão pós-menopausa em mulheres (GORDON & GIRDLER, 2014). Cheslack-Postava e colaboradores (2015) concluíram diferenças entre aquelas que faziam uso de contraceptivo, as quais mostraram taxas reduzidas de depressão e ansiedade menores que mulheres não usuárias.

Os estudos supracitados sugerem que o estrogênio pode ter um efeito protetor na patologia subjacente à depressão e que a diminuição do estrogênio pode aumentar o risco de depressão. No entanto, não há estudos suficientes que expliquem o papel da diferença de gênero nesses casos uma vez que a maioria dos estudos pré-clínicos se concentram em machos, de modo a evitar variabilidade experimental decorrente das flutuações hormonais (DELISLE et. al., 2012).

De acordo com o DSM V (Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais V), o TDM é caracterizado por déficit de humor e perda de prazer em realizar atividades do cotidiano, sintomas conhecidos como anedonia. Além disso, os pacientes podem apresentar dificuldade de concentração, alteração do apetite e do sono, falta de energia, dores, sentimento de culpa e ideação suicida. Para pacientes que apresentam TDM, o tratamento de primeira linha recomendado é a psicoterapia ou o uso de antidepressivos, podendo ser implementados de forma isolada ou em combinação (SILVERMAN et. al., 2015).

Sendo a depressão um problema de múltiplas causas, é uma doença que fisiopatologicamente não está devidamente desvendada, apesar da enorme quantidade de trabalhos científicos publicados nessa área. Muitas teorias tentam explicar o que acontece no quadro depressivo, como pressuposto da desregulação do fator neurotrófico derivado do cérebro, disfunção do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), o aumento de estresse oxidativo, o desequilíbrio de citocinas pró-inflamatórias (como o aumento de IL-6 observado em desordens mentais, como o TDM), a hipótese da desregulação da via do óxido nítrico e a hipótese das monoaminas (BENTLEY, PAGALILAUAN, SIMPSON, 2014), conforme pode ser verificado na figura 1.

Figura 1: Teorias que explicam as vias fisiopatológicas da depressão.



Fonte: Do autor.

1.2.1. Neurobiologia da depressão

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma neurotrofina de fundamental importância para o neurodesenvolvimento, pois está diretamente envolvido na formação de redes neuronais e também na plasticidade neuronal (CHEN et al., 2008; WALZ et al., 2000). Sua produção ocorre nas células da glia e nos núcleos neuronais, sendo mais expressos no hipocampo, neocórtex, amígdala e cerebelo (SHIMIZU et al., 2003).

Estudos em depressão mostram que o tratamento com antidepressivos aumentam a sinalização da tropomiosina quinase B (TrkB), sendo este, dependente da concentração de BDNF (SAARELAINEN et al., 2003; KOZISEK et al., 2008; JIAWEN et al., 2018). Esta via de sinalização tem influência na prevenção contra a morte celular inibindo a cascata de apoptose. Além disso, também fornece as proteínas necessárias para a sobrevivência das células auxiliando na proliferação e manutenção dos neurônios do SNC (BRIGITTA B., 2002). O estresse crônico diminui a expressão do BDNF, o qual leva a alterações morfológicas dos neurônios no hipocampo (MURAKAMI et al., 2005).

Estudo mostra que diversas regiões cerebrais, como córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado estão envolvidas nos sintomas depressivos. O córtex pré-frontal possui conexões com estruturas envolvidas na constituição da personalidade, tomada de decisões, respostas autonômicas, controle emocional e respostas neuroendócrinas a estressores (ESPERIDIÃO-ANTONIO et al., 2008). O hipocampo, uma das regiões cerebrais envolvida no processo de neurogênese pós-natal, está envolvido na modulação do comportamento, memória e sistema imunológico (ESPERIDIÃO-ANTONIO et al., 2008).

Outras áreas que estão relacionadas com a depressão são: corpo estriado (importante para a memória emocional), amígdala, hipotálamo lateral, núcleo accumbens, núcleos serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos do tronco cerebral (MALETIC; RAISON, 2014; RAJKOWSKA, 2004; DREVETS et al., 2000).

1.2.1.1. Estresse oxidativo e nitrosativo na depressão

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção celular de espécies reativas de oxigênio e os mecanismos antioxidantes. Ou seja, a desregulação é induzida pela produção de radicais livres, que são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, tornando-as instáveis. Devido à presença desses elétrons livres, são capazes de reagir com diversos compostos ou alvos celulares (HALLIWELL, 2001).

Em condições normais, o organismo produz espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), pois são subprodutos da fosforilação oxidativa, participando de vários processos celulares homeostáticos, como: apoptose, mitose e

resposta a lesões ou infecções (HALLIWELL, 2010). Da mesma forma, o próprio corpo elabora enzimas antioxidantes para reparar os danos causados por estes radicais livres. Assim, o estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio do sistema oxidativo e antioxidativo, ou seja, um desbalanceamento na relação de geração e eliminação destas espécies reativas (MAES et al., 2011; VALKO et al., 2007).

O cérebro com seu alto consumo de oxigênio e um ambiente rico em lipídios é considerado altamente suscetível ao estresse oxidativo. O desequilíbrio oxidativo quando excessivo leva a alterações na membrana celular ocasionando a peroxidação lipídica. Fatores que contribuem ativamente para este desequilíbrio são: redução das enzimas antioxidantes e o aumento do catabolismo de monoaminas (BILICI et al., 2001). Considerando isso, o estresse oxidativo está implicado na fisiopatologia de vários transtornos mentais, como depressão, transtornos de ansiedade, esquizofrenia e transtorno bipolar. Embora vários estudos tenham estabelecido uma ligação entre o estresse oxidativo e os distúrbios psiquiátricos, a relação causal não é totalmente determinada (SALIM, 2014; DOMAGALA-KULAWIK, 2008).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima capaz de oxidar o ânion cloreto (Cl^-) em ácido hipocloroso (HOCl), além de produzir outras espécies oxidativas. Possui uma ação catalisadora para a produção de radicais livres, sendo normalmente expresso em neutrófilos, monócitos e macrófagos. A análise de sua atividade é eficaz para a observação da produção de EROS em amostras biológicas (FURTMULLER et. al.; HANSSON et. al., 2006).

O ácido hipocloroso, além de possuir ação microbicida, está envolvido na sinalização apoptótica de vários tipos celulares, incluindo as células do sistema imune. O HOCl pode reagir com duplas ligações de lipídios, ocasionando a peroxidação lipídica, levando ao aumento da permeabilidade de membranas celulares (SGARBI et. al., 2006; HALLIWELL, 2001).

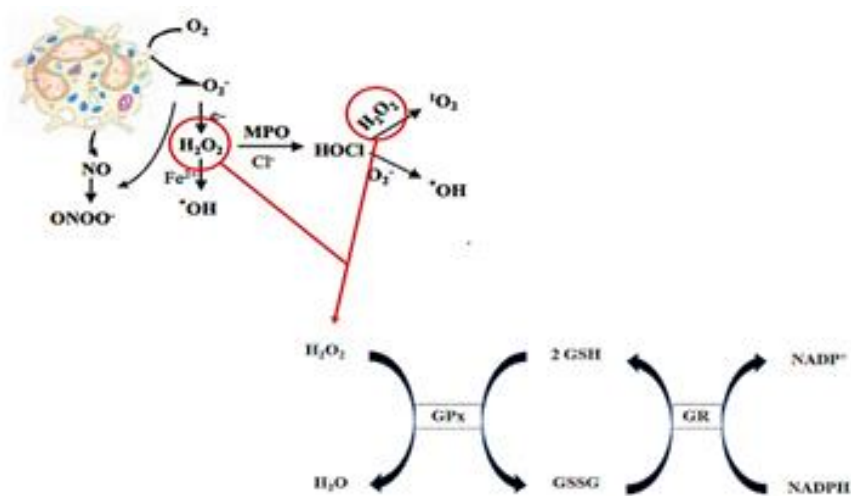
Outro radical livre presente no estresse é o óxido nítrico (NO), que executa um papel essencial na neurotransmissão e vasorregulação. Quando em excesso, o NO pode inibir a citocromo oxidase na mitocôndria, levando ao aumento do vazamento de elétrons e à maior formação de O_2^- , podendo reagir com o mesmo formando ONOO^- .

Os antioxidantes são substâncias que, dependendo de sua concentração no meio, irá ter ação de protelar ou impedir a oxidação de um substrato (ROHENKOH et. al., 2011). Esses agentes antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos,

como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e não enzimáticos, como a glutationa reduzida (GSH) e as vitaminas E e C (VALKO et. al., 2007).

No sistema antioxidante não enzimático temos um tripeptídeo chamado glutationa (GSH), este é formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico (figura 2), sendo um excelente agente redox, ajudando na remoção das espécies reativas (DICKINSON & FORMAN, 2002).

Figura 2. Mecanismo antioxidante do GSH.



Fonte: Adaptado de CRUZ, 2010; DELAPEDRA, 2015.

O GSH tem participação em diversas funções celulares, atuando, por exemplo, como modulador da proliferação celular, resposta imune, síntese proteica, ácidos nucleicos e na regulação da apoptose (BALATOR et. al., 2008).

1.2.1.2. Hipótese das citocinas na depressão

Uma das características da depressão é ativação da resposta imune, ou seja, a hipótese das citocinas também conhecida como hipótese inflamatória tem como base a hiperativação imune e a produção desregulada de citocinas pró-inflamatórias que estão envolvidas na depressão (MAES et. al., 2011).

As citocinas são moléculas proteicas ou glicoproteicas variando entre 6 e 70 kDa que podem ser produzidas por células do sistema imune ou células endoteliais e epiteliais da mucosa. Essas moléculas possuem a função de regular a duração e

intensidade de respostas específicas, bem como recrutar células efetoras para as áreas responsáveis e induzir a geração e maturação de novas células a partir de precursores. Ademais, podem agir sobre a própria célula que as produzem pelo mecanismo autócrino, sobre uma célula próxima por mecanismo parácrino ou agir como hormônios, atuando em órgãos distantes pelo mecanismo endócrino (LIN et. al. 2000; SOMMER & WHITE 2010).

As citocinas têm como papel principal conduzir a resposta inflamatória aos locais de suposta lesão, que pode ser causada por diversos agentes lesivos, como por exemplo microorganismos, queimaduras, traumas físicos, entre outros (LIN et. al. 2000; SOMMER & WHITE 2010). E são agrupadas em interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (FNT), quimiocinas (quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal. Dentro do grupamento de interleucinas tem-se as interleucinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-8, IL-10 e IL-13) (SOMMER & WHITE 2010; DINARELLO, 1997).

O presente estudo abordou o envolvimento da IL-6 visto que é uma interleucina pró-inflamatória e estudos relatam a sua associação a depressão em que seus níveis se encontram elevados em pacientes deprimidos (DOWLATI et. al. ,2010; CIZZA et. al., 2008; HOWREN et.al.,2009).

1.2.2. Influência do sexo na depressão

Essau et al. (2010), avaliaram o número de episódios depressivos maiores ao longo da vida em dois períodos de tempo, a adolescência e a idade adulta, podendo observar diferenças significativas entre os gêneros tanto na adolescência como na idade adulta, em que as mulheres apresentaram a ocorrência de mais episódios que os homens bem como o percentual da incidência de novos casos e recorrência. O gênero feminino é mais propenso ao desenvolvimento e ter mais episódios de depressão duradouros que o gênero masculino.

Um estudo realizado por Schuch et al. (2014), observou-se que as mulheres apresentaram um número médio de tentativas de suicídio superior ao dos homens, porém não foram observadas diferenças em relação a gravidade da depressão e também não foi possível estabelecer um potencial risco de ideação suicida entre os gêneros. Já Picco et al. (2017), em uma amostra com 6.616 participantes,

apresentaram que o transtorno TDM foi maior entre as mulheres (7,2%) que em homens (4,3%) em relação a prevalência do transtorno ao longo da vida.

Diversos fatores podem estar envolvidos para as respostas diferenciadas entre os gêneros, dentro dos aspectos feminino por exemplo, podem ser citados o fator genético, o ciclo menstrual, história de cirurgia ou doença médica, tratamentos com drogas que afetam os hormônios entre outros. Em resumo um importante fator a ser frisado é a questão hormonal, pois possuem ações reguladoras que determinam o desenvolvimento do cérebro, bem como o funcionamento e o bem-estar mental (BROTTO et al. 2010; KUEHNER et al. 2017).

A diferença entre os gêneros, bem como essa possível tendência alta das mulheres desenvolver esse transtorno ainda é um fato a ser estudado, pois é difícil avaliar os aspectos que cercam essa “perturbação mental”, dentre elas os fatores sociais, biológicos, possíveis traumas, entre outros fatores. No entanto não há estudos suficientes que expliquem o papel da diferença de gênero nestes casos (DELISLE et. al., 2012).

1.2.3. Eixo cérebro-intestino-microbiota e seu papel na depressão

Os seres humanos, assim como outros mamíferos, vivem em uma associação de coevolução com uma enorme quantidade de microrganismos que residem em uma variedade de microambientes teciduais (WANG & KASPER, 2014).

A microbiota consiste de uma comunidade microbiana multiespécie que vive dentro de um nicho particular, em sinergia mútua com o organismo hospedeiro (LAZAR et al., 2018).

O perfil da microbiota é moldado por fatores do hospedeiro, como a genética e os nutrientes adquiridos. Os microrganismos presentes na microbiota realizam uma série de funções essenciais e benéficas, sendo capazes de influenciar o estado de saúde do hospedeiro. Considerando isso, o microbioma intestinal tem desempenhado um papel crucial no eixo bidirecional intestino-cérebro, que integra as atividades do sistema nervoso central e do intestino (ROGERS et al., 2016).

O trato gastrointestinal (TGI), um complexo e integrado ecossistema, contém, pelo menos, 10^{14} microrganismos pertencentes a cerca de 2.000 espécies e 12 diferentes filos. O microbioma associado contém de 150 a 500 vezes mais genes do

que o DNA humano (HUTTENHOWER, 2012). Isso mostra a enorme diversidade existente nesse sistema e, que é modelada individualmente por numerosos fatores, como a genética do hospedeiro, sexo, idade, sistema imunológico, estado de saúde, fatores geográficos, socioeconômicos, tratamentos farmacológicos e dieta (ARDISSONE et al., 2014).

Várias vias aferentes ou eferentes estão envolvidas no eixo cérebro-intestino-microbiota, como: Antibióticos, agentes ambientais e infecciosos, neurotransmissores/neuromoduladores intestinais, fibras vagais sensoriais, citocinas e todos os metabólitos essenciais que transmitem informações ao sistema nervoso central sobre o estado intestinal (PETRA et al., 2015).

O desequilíbrio da população microbiana, ou disbiose intestinal, vem chamando a atenção de pesquisadores nos últimos anos devido a sua relação com o desenvolvimento de inúmeras patologias (ALMEIDA et al., 2009). A disbiose intestinal é caracterizada pelo acúmulo anormal ou aumento da virulência de certas populações de bactérias, ocasionando alteração da microbiota intestinal, onde ocorre predomínio de bactérias patogênicas sobre as bactérias benéficas (KAMADA et al., 2013).

O sistema imune da mucosa intestinal é altamente especializado, suas funções são amplamente independentes do sistema imune sistêmico e sofre grandes alterações após a colonização bacteriana do trato intestinal, o que evidencia que a microbiota também pode influenciar o sistema imunológico do hospedeiro (WOOF & KERR, 2006; KABAT, STRINIVASAN & MALOY, 2014).

Estudos pré-clínicos sugerem que a microbiota e seu genoma podem desempenhar um papel fundamental nos transtornos neurodesenvolvimentais e neurodegenerativos. Além disso, alterações na composição da microbiota intestinal em humanos também foram associadas a uma variedade de condições neuropsiquiátricas, incluindo depressão, autismo e Doença de Parkinson. No entanto, ainda não está claro se essas alterações no microbioma estão causalmente relacionadas a tais doenças (CENIT & CODONER-FRANCH, 2017; FOSTER & NEUFELD, 2013). Sendo assim, a microbiota intestinal é essencial para a saúde humana, desempenhando um papel importante na comunicação bidirecional entre o TGI e o sistema nervoso central (BORRE et al., 2014; MACEDO et al., 2016).

Estudo recente mostrou que pacientes com síndrome depressivo/ansiosa apresentaram aumento de permeabilidade intestinal, disbiose e aumento de LPS

sanguíneo, mostrando a presença de translocação bacteriana neste transtorno mental (OHLSSON et al., 2019).

1.3. Farmacoterapia do transtorno depressivo maior

Os primeiros fármacos usados para o tratamento da depressão foram os antidepressivos inibidores de monoaminoxidase (IMAOs), que, embora eficazes, apresentavam efeitos colaterais indesejáveis, causados pela inespecificidade de sua ação farmacológica (KESSEL & SIMPSON, 1995). Em seguida, foram desenvolvidos os antidepressivos pertencentes à classe dos tricíclicos (ADTs), que atuavam no bloqueio do mecanismo de recaptação neuronal para várias aminas biogênicas, principalmente de serotonina e noradrenalina na fenda sináptica (KENNEDY, 2013).

A primeira medicação a ser utilizada no tratamento da depressão, ainda na década de 50, foi a iproniazida, um fármaco tuberculostático, que foi identificado como o inibidor da enzima monoamina oxidase (MAO), dando surgimento à classe dos iMAOs. Portanto, os fármacos desta classe, bem como os seus derivados, apresentam potência antimicrobiana (STAHL, 1998).

Embora eficazes, o uso dos ADTs foi limitado em função do bloqueio de receptores de histamina, colinérgicos e α -adrenérgicos, que acarretam em efeitos colaterais e risco de toxicidade. O uso dos IMAOs foi limitado devido a interação desses fármacos com a tiramina e o risco de desenvolvimento de crises hipertensivas potencialmente fatais. Sendo assim, surgiram novas classes de antidepressivos a partir da pesquisa de moléculas desprovidas dos efeitos colaterais das classes supracitadas (MORENO, MORENO & SOARES, 1999). A fluoxetina, antidepressivo de nova geração, pertence à classe dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), sendo o antidepressivo mais utilizado no tratamento do TDM (MORENO, MORENO & SOARES, 1999).

Estudos mostram que os antidepressivos têm uma ação imunoestimulante, assim como propriedades antimicrobianas que podem ser eficazes contra uma gama de microrganismos (LIEB, 2004). Vários fármacos antidepressivos de nova geração, tais como, sertralina, fluoxetina e escitalopram, assim como fármacos mais antigos, a exemplo de tranilcipromina e imipramina, apresentam efeitos antimicrobianos,

principalmente contra bactérias gram-positivas (MUNOZ-BELLIDO et. al., 2000; MACEDO et al., 2016).

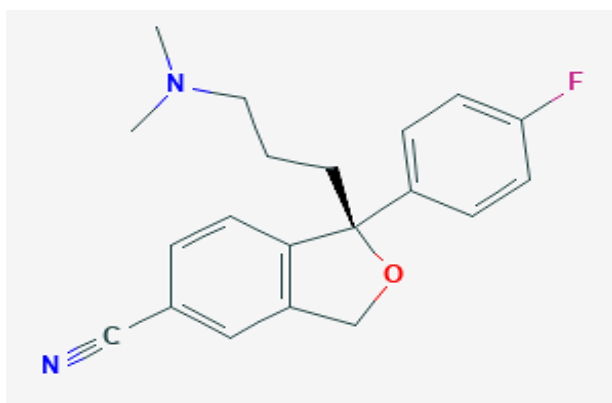
A seguir esta uma descrição mais detalhada dos fármacos utilizados na presente pesquisa por seu efeito antidepressivo.

1.3.1. Escitalopram

Os primeiros inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) a serem sintetizados para estudos foram a fluoxetina, paroxetina e a sertralina, antidepressivos de segunda geração nos meados da década de 1970 (GRIMSLEY & JANN, 1992; JOHNSON, 1992). Em 1983 o citalopram foi desenvolvido, sendo um fármaco ISRSs na superfície dos neurônios, aumentando a resposta à serotonina (BITTENCOURT et. al., 2013).

Surgiu mais recentemente o S-enantiômero do citalopram, chamado escitalopram, fármaco de segunda geração, é o ISRS introduzido no mercado em 2002 (GILLMAN, 2007). Há evidências de que o escitalopram é mais eficaz do que uma série de outros antidepressivos, sendo indicado para transtorno de ansiedade, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de pânico, transtorno disfórico pré-menstrual e transtorno depressivo (KIMURA, 2012).

Figura 3: Estrutura química do escitalopram.



Fonte: Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Escitalopram>

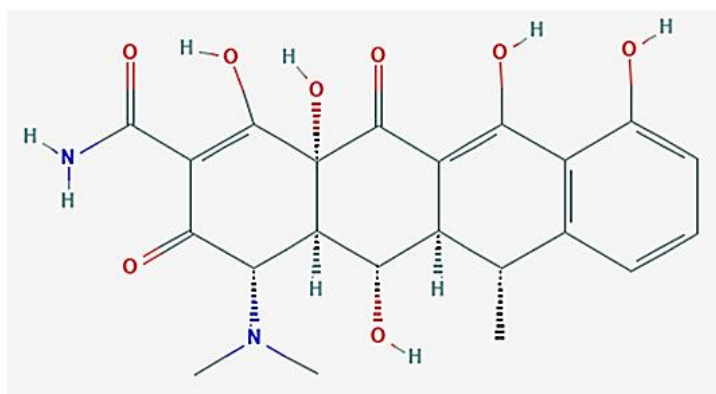
Atualmente, a literatura reporta que drogas psicotrópicas (antidepressivos, ansiolíticos, anticonvulsivantes/estabilizadores de humor, analgésicos opióides e etc.)

como a fluoxetina e o escitalopram, apresentam efeitos antimicrobianos *in vitro*. *In vivo*, essas drogas são capazes de influenciar diferencialmente a composição da microbiota intestinal (CUSSOTTO et. al., 1018). Esses achados dão suporte às crescentes evidências de que os microrganismos do TGI podem metabolizar drogas, como as citadas, e as drogas podem modificar a composição da microbiota intestinal.

1.3.2. Doxiciclina

A doxiciclina é um antibiótico de amplo espectro derivado sinteticamente da oxitetraciclina. Esta droga é uma tetraciclina de segunda geração, exibindo menor toxicidade que as tetraciclina de primeira geração (JAVED & ZAHIR, 2017).

Figura 4: Estrutura química da doxiciclina.



Fonte: Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/doxycycline>

As tetraciclina são os protótipos dos antimicrobianos de amplo espectro, sendo muito eficazes no tratamento de diversas patologias. É um bacteriostático cujo mecanismo de ação ocorre pela penetração nos microorganismos. Após sua entrada, estes fármacos fazem ligação com a subunidade 30S ribossomal, inibindo, desta maneira, a síntese proteica bacteriana. Esse efeito impede a replicação bacteriana, levando a morte celular. Apresenta alto grau de lipossolubilidade, sendo bem absorvido por via oral (DOMERCQ & MATUTE, 2004; MOREJON et al., 2003; CUNHA et al., 2006; ROBERTS, 2003).

Estudos mostram que a doxiciclina apresenta atividade anti-inflamatória (YI et al., 2011), imunomoduladora (ANLAR et al., 2007) e, apresenta também, efeitos

neuroprotetores em diversas desordens, o que mostra que esse fármaco pode ser redirecionado para o tratamento de desordens neurais, como a depressão (YRJANHEIKKI et al., 1998; TIKKA, KOS).

Nosso grupo de pesquisa mostrou que a doxiciclina apresenta efeitos antidepressivos em modelo animal de depressão induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Como possível mecanismo envolvido na ação deste fármaco, evidenciamos a prevenção e reversão de alterações em citocinas cerebrais, bem como efeito antioxidante (MELLO et al., 2013)

Diante do exposto, no presente estudo, o desfecho primário foi avaliar a influência do sexo no comportamento tipo-depressão induzido pela separação materna, bem como o efeito do escitalopram e da doxiciclina na reversão destas alterações. Como desfecho secundário avaliamos alterações imuno-inflamatórias a longo prazo no cérebro e intestino dos ratos como também na microbiota intestinal. De forma geral, o presente estudo representa uma importante ferramenta no entendimento da fisiopatologia da depressão e na relação que se estabelece entre o sistema nervoso central e o sistema gastrointestinal, o que pode viabilizar intervenções farmacológicas mais eficazes no TDM.

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A exposição a experiências de adversidade na vida precoce é um fator de risco para a depressão (KLEIN & KOTOV, 2016). No momento atual se procura entender as alterações neurobiológicas a longo prazo subjacentes ao desenvolvimento da depressão desencadeada por este fator de risco. Sabe-se também que a, longe de suas mães, o que leva a graves consequências durante toda a vida. Um maior conhecimento das bases biológicas subjacentes a estas alterações durante o neurodesenvolvimento pode levar ao desenvolvimento de estratégias de prevenção.

Ademais, pouco ou nada se sabe a respeito da influência do sexo nas alterações a longo prazo induzidas pela separação materna. Como já é evidente na literatura que a separação materna causa sintomas tipo-depressão além de doença inflamatória intestinal e sabendo que mulheres têm maior propensão a alterações de humor do que homens (WHITEFORD et al., 2013), o melhor entendimento dos mecanismos subjacentes a alterações cerebrais e intestinais e a influência do sexo nessas alterações é algo de grande importância a ser estudado.

Por fim, no momento atual o desequilíbrio da microbiota intestinal, ou seja, disbiose está relacionado ao transtorno depressivo maior (TDM) (FOSTER & NEUFELD, 2013). Estudos mostram que os antidepressivos têm uma ação imunopotenciadora, assim como propriedades antimicrobianas que podem ser eficazes contra uma gama de microrganismos (MUNOZ-BELLIDO et al., 2000). Portanto, qualquer fator externo que possa alterar o equilíbrio da microbiota intestinal, tais como a dieta ou o tratamento com antibióticos e o uso de antidepressivos, deve ser considerado como potencial fator de risco para o desenvolvimento dessas doenças inflamatórias. Sendo assim é necessário a análise da disbiose intestinal e a influência do uso de antidepressivos na composição da microbiota intestinal. Este estudo pode representar uma importante fonte de pesquisa para a intervenção do tratamento do distúrbio TDM, além de ressaltar a utilização destes fármacos para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes que apresentam esse transtorno.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar alterações oxidativas, inflamatórias cerebrais, tecido intestinal e avaliação da microbiota de ratos machos e fêmeas submetidos à separação materna, tratados com a estratégia antidepressiva com escitalopram e o uso do antibiótico doxiciclina, com o intuito de contribuir para o entendimento das alterações a longo prazo induzidas pela exposição a adversidades precoces de vida, bem como para o tratamento da depressão.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar a influência do sexo na manifestação dos sintomas tipo-depressão, nas alterações locomotoras e na memória de trabalho, em ratos submetidos à separação materna;
- 2) Determinar a influência do sexo nas alterações oxidativas através dos níveis de GSH e MPO em áreas cerebrais como córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado e nos segmentos do intestino duodeno, jejuno e íleo, de ratos submetidos à separação materna;
- 3) Avaliar a influência do sexo nos níveis hipocampais de BDNF e IL-6 de ratos submetidos à separação materna;
- 4) Quantificar os níveis de nitrito e peroxidação lipídica no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de ratos submetidos à separação materna;
- 5) Avaliar o efeito da separação materna sobre a microbiota intestinal;
- 6) Avaliar a influência do sexo no efeito antidepressivo do escitalopram e da doxiciclina em ratos submetidos à separação materna.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas provenientes do Biotério Central no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos em um ciclo de claro/escuro de 12 horas e ambientados em grupos de 5 animais em caixas mantidos em racks com microisoladores, à temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com livre acesso a água e ração.

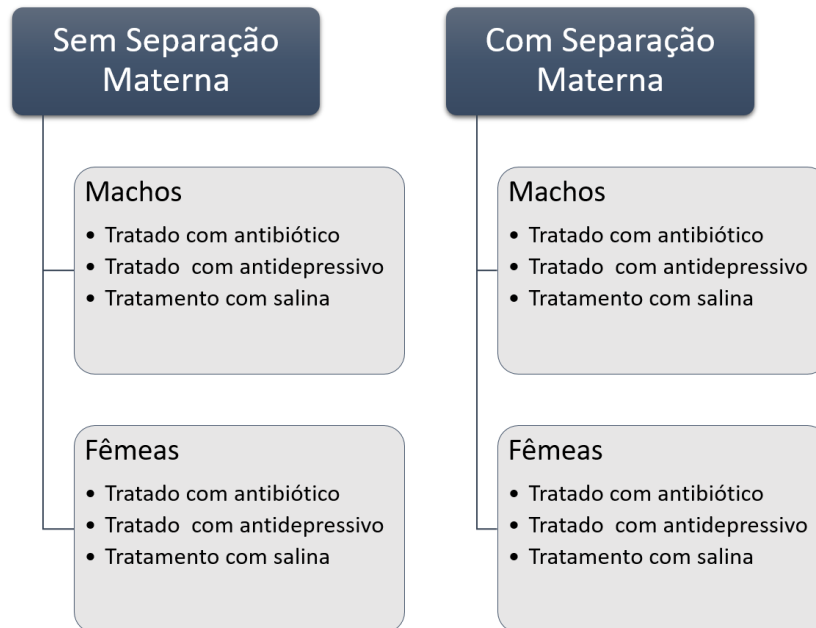
Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animal da Universidade Federal do Ceará (CEUA – UFC) com número de protocolo N° 84/2017. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (NIH, 1996) bem como de acordo com as diretrizes do Conselho Animal de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2. Desenho experimental

Para a realização do estudo, foram utilizados 10 casais para procriação, pois o protocolo se baseou na indução da depressão por separação materna. Como o projeto iniciou com neonatos, a quantidade de casais solicitados justificou-se pela necessidade de aumentar a variabilidade genética dos animais.

Os animais recém-nascidos foram randomizados em dois grandes grupos: Grupo 1- grupo controle que não foram separados maternalmente (NSM) e grupo 2- grupo que passou pela modelo de estresse por separação materna (SM). Dentro destes grupos principais os neonatos foram separados por sexo masculino (M) e feminino (F), em seguida foram randomizados em três grupos de tratamentos: tratado com solução salina, tratado com antidepressivo e tratado com o antibiótico doxiciclina, como ilustrado na figura 5.

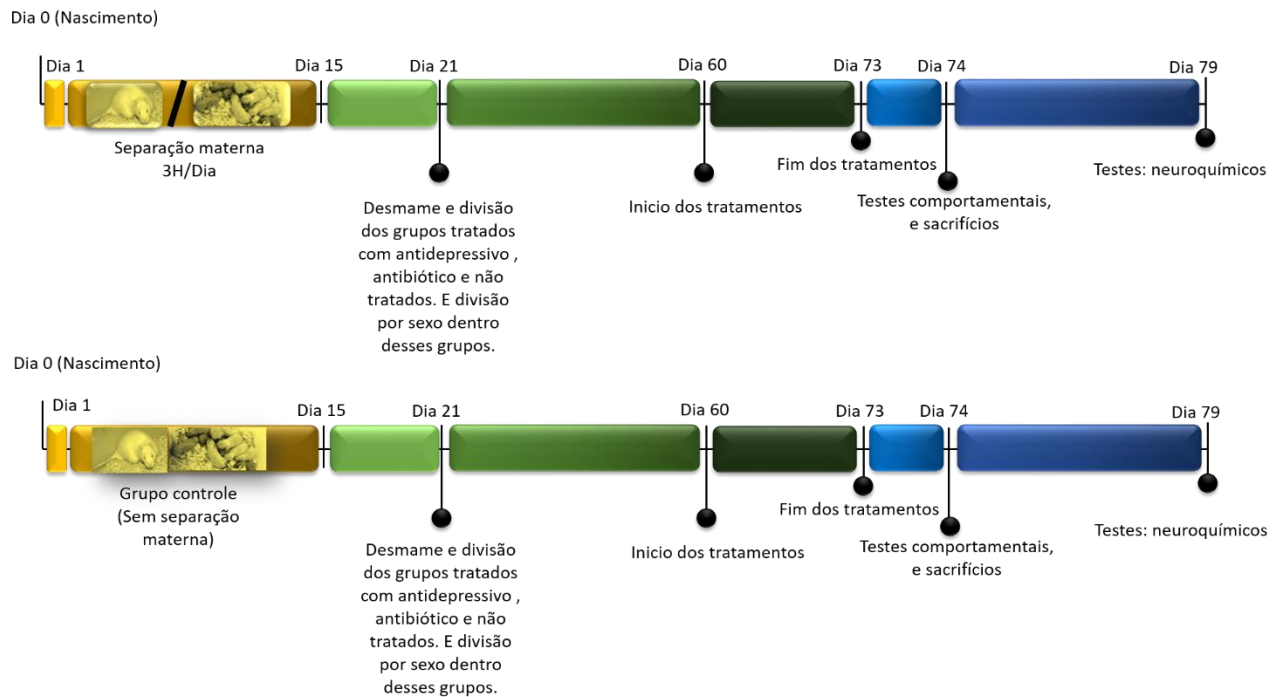
Figura 5: Ilustração simplificado das divisões de grupos



Fonte: autor

O início do estresse por separação ocorreu no Dia 1 após o dia de nascimento (Dia 0), sendo feito no decorrer de 15 dias após o nascimento. No 21º dia ocorreu o desmame dos animais e feito uma subdivisão dos grandes grupos, simultaneamente a separação de machos e fêmeas. Dentro dessa subdivisão, houve os grupos de tratados e não tratados com antidepressivo escitalopram (Cipralex®, Lexapro®) o grupo não tratado administrado solução salina e um outro grupo tratado com doxiciclina. No dia 50 foram feitos testes comportamentais (Teste do Campo Aberto, Nado Forçado e Y-maze) e realizada a coleta de fezes, sendo coletada a cada 72 h para análise perdurando até dia 79. No 60º dia deu-se o início do tratamento com antidepressivo por 14 dias consecutivos, encerrando no Dia 73. Após o fim do tratamento, no Dia 74 foram repetidos os testes comportamentais e nova coleta de fezes, os animais foram sacrificados e dissecados para a realização dos testes neuroquímicos.

Figura 6: Cronograma do estudo. Representação esquemática da linha de tempo.



Fonte: autor

*Houve coleta de fezes a cada 72h durante o período do dia 50 até dia 79.

4.3. Protocolo experimental

4.3.1. Separação materna

O modelo de separação materna baseia-se na premissa de que diversos eventos no início da vida contribuem para a predisposição ao desenvolvimento de doenças na vida adulta. Este modelo de estresse precoce de vida tem sido utilizado para estudar distúrbio tipo depressivo (PALMA et al., 2015).

Para este trabalho seguimos os seguintes procedimentos: O estresse por separação materna iniciou-se no primeiro dia pós-natal, contando o dia do nascimento como dia zero, essa separação teve duração de 180 minutos, durante este período os filhotes permaneceram acondicionados em uma manta térmica afim de manter os

filhotes aquecidos, após esse tempo estipulado, os neonatos retornam a caixa com sua mãe, isso se repetiu por quinze dias. Os animais não-privados (grupo controle) permanecem inalterados em uma gaiola com suas mães, (O'MAHONY et al., 2011; ABELAIRA et al., 2012) e no dia 21 ocorreu o desmame dos animais.

4.3.2. Protocolo de tratamento com antidepressivo

Os animais foram tratados com escitalopram (Cipralex[®], Lexapro[®]), recebendo diariamente por via oral, esse fármaco foi diluído em solução salina (0,9% NaCl) na dose de 0,5 mg/Kg. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de solução salina. O tratamento teve duração de 14 dias consecutivos de acordo com autor Shahzad (2014).

4.3.3. Protocolo de tratamento com antibiótico doxiciclina

Os animais foram tratados com doxiciclina, diariamente por via oral, esse fármaco foi diluído em solução salina (0,9%NaCl) na dose de 5 mg/Kg. O tratamento teve duração de 14 dias consecutivos de acordo com autor Klomp (2014).

5. Testes comportamentais

5.1. Teste do campo aberto

Com finalidade de observar os efeitos dos tratamentos sobre a atividade locomotora, os animais foram avaliados no teste de campo aberto. A arena para este teste é feita de acrílico (40 x 50 x 60 cm) com o chão dividido em quatro quadrantes iguais. A atividade exploratória foi registrada por 5 minutos (ARCHER, 1973). Os parâmetros avaliados foram: o número de quadrados atravessados pelo animal, número de *groomings* (comportamentos estereotipados) e *rearings* (atividade exploratória vertical). Os experimentos foram realizados em uma sala de som atenuada, sob luz vermelha de baixa intensidade.

5.2. Teste de nado forçado

O procedimento consistia em colocar os animais individualmente em cilindros de acrílico (25 cm de altura, 10 cm de diâmetro), contendo 13,5 cm de água em temperatura ambiente, por um período de 5 minutos no qual foi registrado o tempo total de imobilidade para cada animal, além da latência para apresentação de tal comportamento, a partir do segundo minuto (PORSOLT et al., 1978).

5.3. Teste de labirinto em Y (y-maze)

A memória operacional ou de trabalho foi avaliada pela taxa de alternância espontâneas no labirinto em Y. Este aparato consiste em três braços idênticos (40 x 5 x 16 cm) posicionados em ângulos iguais (SARTER; BODEWITZ; STEPHENS, 1988). Antes do teste, os braços foram numerados, sendo o animal colocado em um deles e deixado para explorar o ambiente. A duração do teste foi de 8 minutos.

Uma alternância é considerada correta se o animal visitar um novo braço e não retornar ao braço anteriormente visitado. Assim, a percentagem das alternâncias foi calculada como a razão entre as alterações corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação (n-2), multiplicado por 100.

$$\% \text{ Alternâncias espontâneas} = n / (n-2) \times 100$$

O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância no grupo controle negativo, indicando que os animais podem lembrar em qual braço eles entraram por último. Entre cada sessão, o labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 70% e secado com toalhas de papel.

6. Coleta das amostras fecais

Para a coleta das amostras fecais, adotado o método utilizado por Vaahtovuori et al. (2003), em que foi coletado três a quatro pelotas fecais por rato, estas amostras foram retiradas diretamente do ânus para tubos de plástico e armazenadas a -80°C.

7. Extração do DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada utilizando QIAamp DNA Stool Mini kit (QIAGEN®), segundo as recomendações do fabricante (BRANDT et al., 2012). A extração é finalizada com etapas de purificação do DNA liberado na solução.

8. Análise por PCR tempo real

As etapas para a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) utilizamos o kit SYBR® Green PCR Master Mix, de acordo com as recomendações do fabricante Applied Biosystems® para amplificação e quantificação de ácidos nucleicos. A mistura contém uma DNA polimerase de início rápido, mediada por anticorpos, dNTPs, MgCl₂, potenciadores e estabilizadores. Foi utilizado o sistema TaqMan®, este sistema utiliza a atividade exonucleásica 5'-3' da *Taq* DNA polimerase, juntamente com os iniciadores forward e reverse para bactérias totais.

As condições para reação foram: 10 minutos a 95°C para a desnaturação, 40 ciclos 10 segundos a 95°C para o anelamento e 10 segundos a 62°C para a extensão da nova fita de DNA e 10 segundos a 72°C para etapa final da extensão (LEE et al., 2006). Após a amplificação, o produto final foi armazenado a -20°C.

9. Testes neuroquímicos e bioquímicas

Os ratos foram decapitados e as áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo) e intestinais (duodeno, jejuno e íleo) coletadas e acondicionadas a -80°C, para a realização das análises.

9.1. Nível de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

Após homogeneização das áreas cerebrais a 20 volumes de tampão PBS pH 7,4 foram adicionados inibidores de proteases (Sigma-Aldrich), o nível de BDNF de cada amostra e quantificado por ensaio imunoenzimático (ELISA; R&D Systems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em

pictogramas de BDNF/mg de proteína total determinada pelo método de (LOWRY et al., 1951).

9.2. Determinação da atividade da mieloperoxidase

As amostras foram mantidas em gelo durante todo o procedimento. Utilizando as seguintes áreas cerebrais neste teste (córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo) e áreas intestinais (duodeno, jejuno e íleo).

A determinação da atividade da MPO é realizada pela ação da enzima presente no tecido na presença do peróxido de hidrogênio, no qual o diidrocloreto de θ -dianisidina reage com o radical oxigênio resultante da reação formando um composto colorido. Este composto é medido ao longo do tempo por um espectrofotômetro para determinar a atividade da MPO no teste (BRADLEY, 1982).

Para os homogenatos, foi adicionado uma solução (1ml do tampão para cada 50mg de tecido) consistindo em brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) em tampão fosfato 50mM, pH 6,0. Os homogenatos sendo centrifugados (14000rpm, 2 min a 4°C). Um total de 30 μ l do sobrenadante das amostras foram adicionadas em cada poço e, em seguida, 200 μ l da solução contendo 0,167mg/ml de hidrocloreto de θ -dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi mensurada em 0, 1 e 3 minutos usando um leitor de ELISA a 460nm (BRADLEY, 1982).

9.3. Teste de ELISA para dosagem dos níveis de IL-6

As áreas cerebrais dissecadas (córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo) foram homogeneizadas em 8 volumes de tampão PBS com protease (EMD Biosciences) e fosfatase (Sigma-Aldrich) e inibidores, foram centrifugadas (10000rpm, 5min). O plasma foi usado sem diluição. A concentração das citocinas, em 50 μ L de amostras será determinada por ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante e expressa em pg/g de tecido.

9.4. Níveis de glutathiona reduzida (GSH)

A concentração de GSH nos segmentos intestinais foi avaliada utilizando o ensaio para determinação de grupos sulfidrílicos não proteicos (NP-SH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais e intestinais (100mg/ml de tecido intestinal congelado) foram homogeneizados a 10% em EDTA 0,02M. Retirando-se 400µL e desses homogenatos e foi adicionado 320µL de água destilada e mais 80µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000rpm por 15 minutos. Em seguida recolhido 400µL do sobrenadante e acrescidos 800µL de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e mais 20µL de ácido 5,5-ditiobis- (2-nitrobenzóico) (DTNB 0,01M) e após 1min da reação foi realizada a leitura da coloração em 412nm através de espectrofotômetro. A concentração de glutathiona reduzida é expressa em nanogramas de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão. Para a concentração de GSH no intestino foi expressa por µg/mg de tecido a partir de uma curva padrão (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

9.5. Peroxidação lipídica (TBARS)

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais foi medido através da determinação dos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper & Hadley (1990). O protocolo consistiu na preparação dos homogenatos das áreas cerebrais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. 0,25mL do homogenato misturado a 1mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido de 1mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100°C) por 15min., adicionado o n-butanol (2:1 v/v), a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente centrifugada (800xg, 5min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535nm. Os resultados expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de proteína.

9.6. Determinação dos níveis de nitrito

Esta determinação baseou-se no método descrito por Green et al. (1982). O ensaio foi baseado na reação de Griess para determinar a produção de nitrito, uma forma indireta de se avaliar os níveis de NO. Resumidamente, foram preparados os homogenatos das áreas cerebrais centrifugados (800xg, 10 min) e coletado 100µl dos sobrenadantes e em seguida incubados com 100µl do reagente de Griess, que consistia em partes iguais (1: 1: 1: 1) de 1% de sulfanilamida dissolvida em 1% de H₃PO₄, 0,1% de dicloridrato de N- (1-naftil) –tietenodiamina e água destilada à temperatura ambiente por 10 min. A absorbância foi medida a 560nm num leitor de microplacas. Nitrito conteúdo foi determinado a partir de uma curva padrão de nitrito gerada usando NaNO₂ (variando de 0,75 a 100mM) como padrão e foi expresso como mM/mg de tecido.

10. Análise estatísticas

A análise dos resultados foi realizada por UNIANOVA de três vias com teste *post hoc* de Bonferroni considerando sexo (macho e fêmea), separação materna (separados e não separados) e tratamento (salina, escitalopram e doxiciclina). O programa de computador foi o SPSS 21.0. O software GraphPadPrism 5.0 foi utilizado para a construção das Figuras. O critério de significância foi de $p < 0,05$.

11. RESULTADOS

11.1. Avaliações comportamentais

11.1.1. Campo aberto

Pode ser observado em relação a atividade locomotora expresso pelo números de cruzamentos (Figura 7a), os machos que não passaram pelo estresse de separação materna (NSM), quando tratados com o antibiótico doxiciclina, tiveram uma redução significativa ($[F(6,217) = 3,184 \text{ p} = 0,002]$) na atividade locomotora quando comparado ao grupo NSM tratado com salina. Já no grupo das fêmeas que passaram pelo estresse de separação materna (SM), quando tratadas com doxiciclina tiveram sua atividade locomotora aumentada ($[F(4,758) = 3,454 \text{ p} = 0,031]$) em relação ao grupo NSM tratado com doxiciclina.

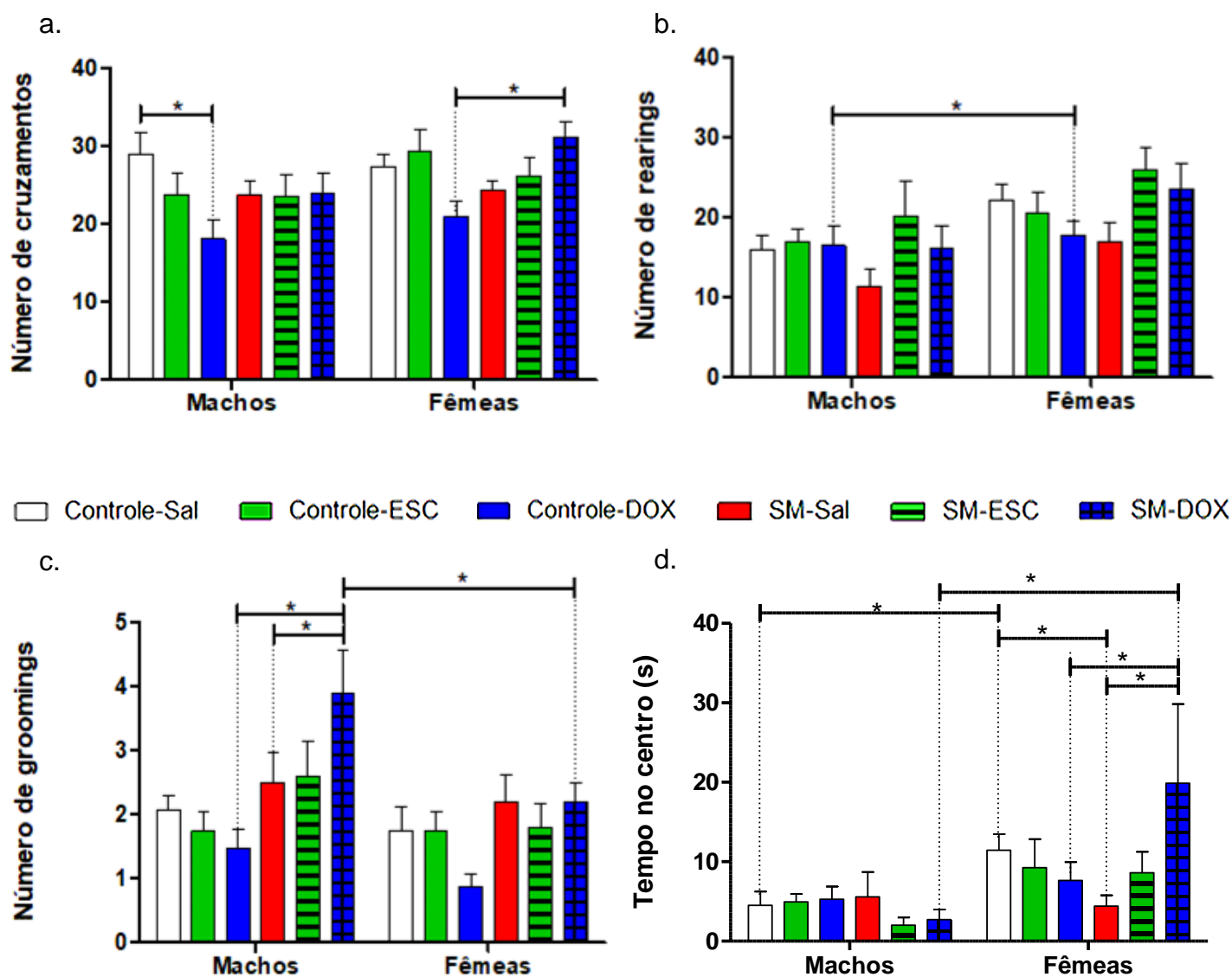
Já em relação ao comportamento de *rearing* houve somente uma diferença estatística ($[F(5,270) = 2,821, \text{ p} = 0,023]$) entre os grupos NSM machos, que apresenta uma menor atividade, quando comparado às fêmeas NSM, em resposta ao tratamento com doxiciclina (Figura 7b).

Seguindo para o movimento de *grooming* (Figura 1c) apresentou diferença entre os sexos, em que nos animais SM tratados com doxiciclina, os machos apresentaram maior atividade ($[F(9,050) = 0,565, \text{ p} = 0,003]$). Continuando com o sexo masculino quando comparado entre grupo SM e NSM tratados com o antibiótico, o grupo NSM tem menor atividade ($[F(25,388) = 0,498, \text{ p} = 0,000]$). E dentro do grupo dos machos SM houve uma diferença significativa entre o tratado com salina que apresenta menos movimentos que os SM tratados com doxiciclina ($[F(3,820) = 0,565, \text{ p} = 0,043]$).

Em relação a permanência do animal no centro da arena (Figura 7d), pode-se observar, que as fêmeas pertencentes ao grupo salina NSM, tiveram a tendência de permanecer no centro ($[F(9,881) = 3,501 \text{ p} = 0,007]$) em comparação aos machos sob as mesmas condições. No grupo SM tratados com doxiciclina, observou-se a mesma tendência na relação macho e fêmea ($[F(13,695) = 4,999 \text{ p} = 0,000]$). Continuando com o sexo feminino, as ratas tratadas com salina, quando feito a comparação entre os grupos SM e NSM, às SM permaneceram menos tempo no centro que as NSM

([F(5,765) = 4,263 p = 0,017]). Já no grupo tratado com doxiciclina, as fêmeas SM apresentaram maior permanência no centro ([F(7,863) = 4,295 p = 0,006]), ocorrendo o inverso aos tratados com salina.

Figura 7. Efeito do estresse por separação materna no número de crossings (a), rearing (b), grooming (c) e tempo no centro da arena (d) de animais adultos tratados com salina (Sal), escitalopram (ESC) ou doxiciclina (DOX).



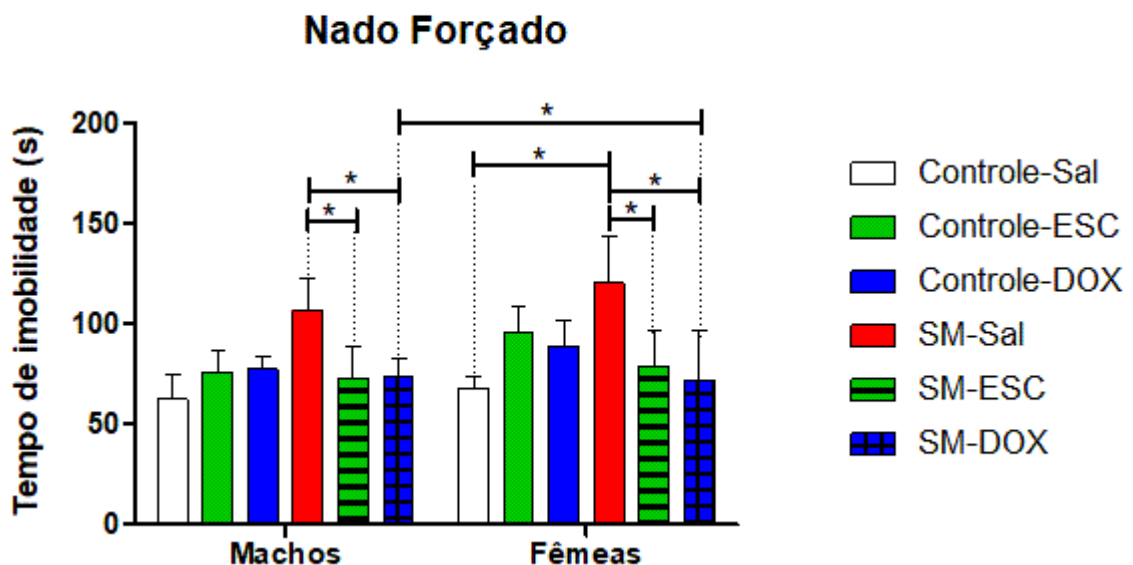
Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. (n= 10-15 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P < 0,05. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

11.1.2. Nado forçado

Na avaliação do comportamento tipo-depressivo pelo tempo de imobilidade no teste de nado forçado, foi observado que na comparação entre os sexos somente houve diferença estatística no grupo tratado com doxiciclina em que os machos SM apresentam maior tempo de imobilidade em relação às fêmeas SM ([F(4,319) = 17,203 p = 0,041]).

Somente as fêmeas apresentaram diferença quando comparado entre os dois grupos SM e NSM, onde o grupo SM permaneceu mais tempo imóvel SM ([F(28,587) = 15,150 p = 0,000]). Ainda nas fêmeas SM, tanto as tratadas com escitalopram ([F(26,658) = 17,027 p = 0,000]) quanto as tratadas com doxiciclina ([F(26,658) = 16,486 p = 0,000]) apresentaram uma redução no tempo de mobilidade em comparação às fêmeas tratadas com salina. Os machos machos SM apresentaram a mesma resposta aos fármacos escitalopram ([F(5,589) = 16,486 p = 0,015]) e doxiciclina ([F(5,589) = 17,203 p = 0,019]) em relação aos tratados com salina.

Figura 8. Efeito do estresse por separação materna no tempo de imobilidade no teste de nado forçado dos animais adultos tratados com salina (Sal), escitalopram (ESC) ou doxiciclina (DOX).

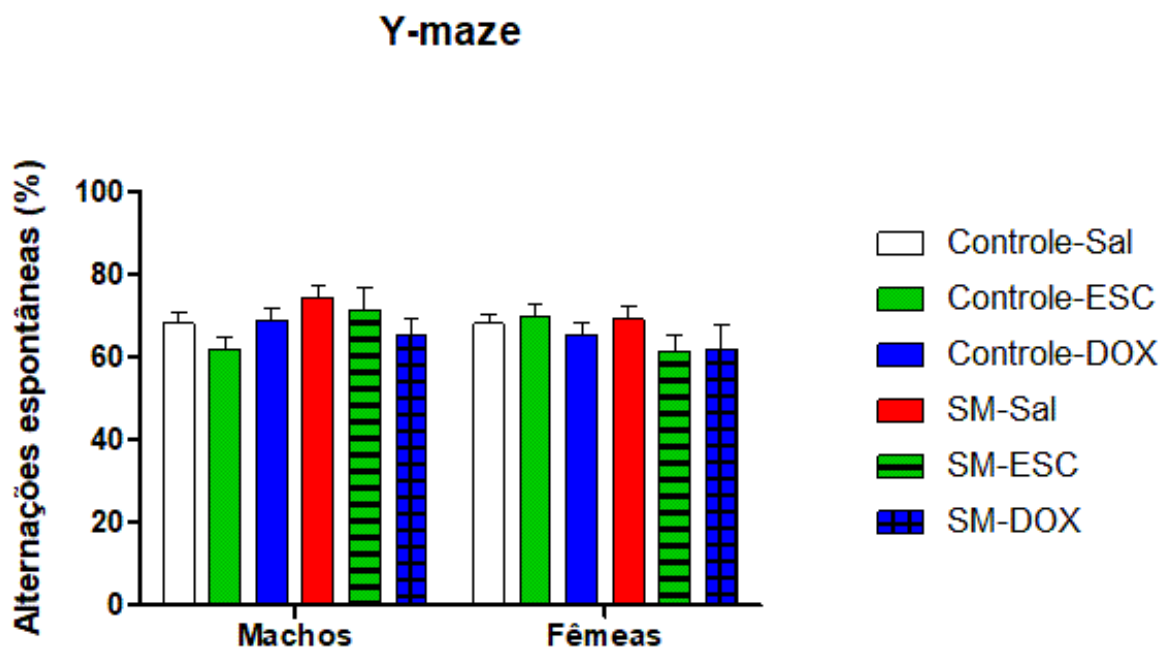


Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M (n= 10-15 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P <0,05. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

11.1.3. Labirinto em Y (y-maze)

Como pode se observar no Figura 9, a memória de trabalho não houve nenhuma alteração, portanto neste teste não houve interação significativa entre nenhum dos parâmetros avaliados.

Figura 9: Efeito do estresse por separação materna na memória de trabalho pelo teste do Y maze dos animais adultos tratados com salina (Sal), escitalopram (ESC) ou doxiciclina (DOXY).



Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M (n= 10-15 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P <0,05. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

12. Avaliações neuroquímicas

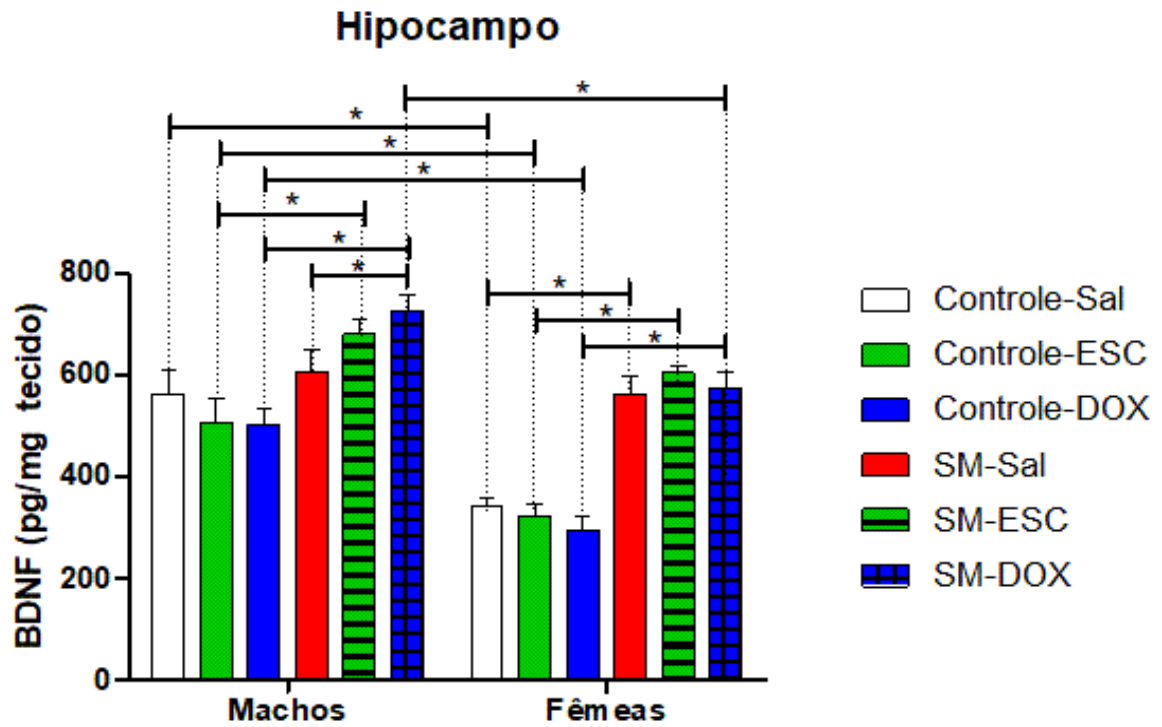
12.1. Nível de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

As análises dos níveis de BDNF realizada no hipocampo (Figura 10) mostrou uma diferença entre sexos no grupo SM tratados com doxiciclina, em que o macho apresenta maior nível de BDNF ($[F(10,355) = 46,456 \text{ p} = 0,002]$). Já no grupo NSM todos os machos tratados com salina ($[F(22,922) = 46,456 \text{ p} = 0,000]$), escitalopram ($[F(15,479) = 46,456 \text{ p} = 0,000]$) e doxiciclina ($[F(19,514) = 46,456 \text{ p} = 0,000]$) apresentam maiores níveis, quando comparado às fêmeas.

Fazendo comparação entre fêmeas NSM e SM, pode-se constatar que os animais SM tratados com salina ($[F(22,669) = 46,253 \text{ p} = 0,000]$), escitalopram ($[F(36,738) = 46,253 \text{ p} = 0,000]$) e doxiciclina ($[F(36,484) = 46,253 \text{ p} = 0,000]$) apresentaram os níveis de BDNF maiores que o grupo NSM.

Analisando a comparação entre os machos NSM e SM, pode-se observar que os animais SM tratados com escitalopram ($[F(14,097) = 46,253 \text{ p} = 0,000]$) e doxiciclina ($[F(23,433) = 46,253 \text{ p} = 0,000]$) também apresentaram os níveis de BDNF maiores que o grupo NSM. E quando comparado machos SM em relação ao tratamento só há diferença estatísticas entre os grupos tratados com salina e doxiciclina ($[F(3,321) = 46,253 \text{ p} = 0,039]$), com apresentação de maior níveis no grupo tratado com doxiciclina.

Figura 10. Determinação dos níveis de BDNF na área hipocampal.

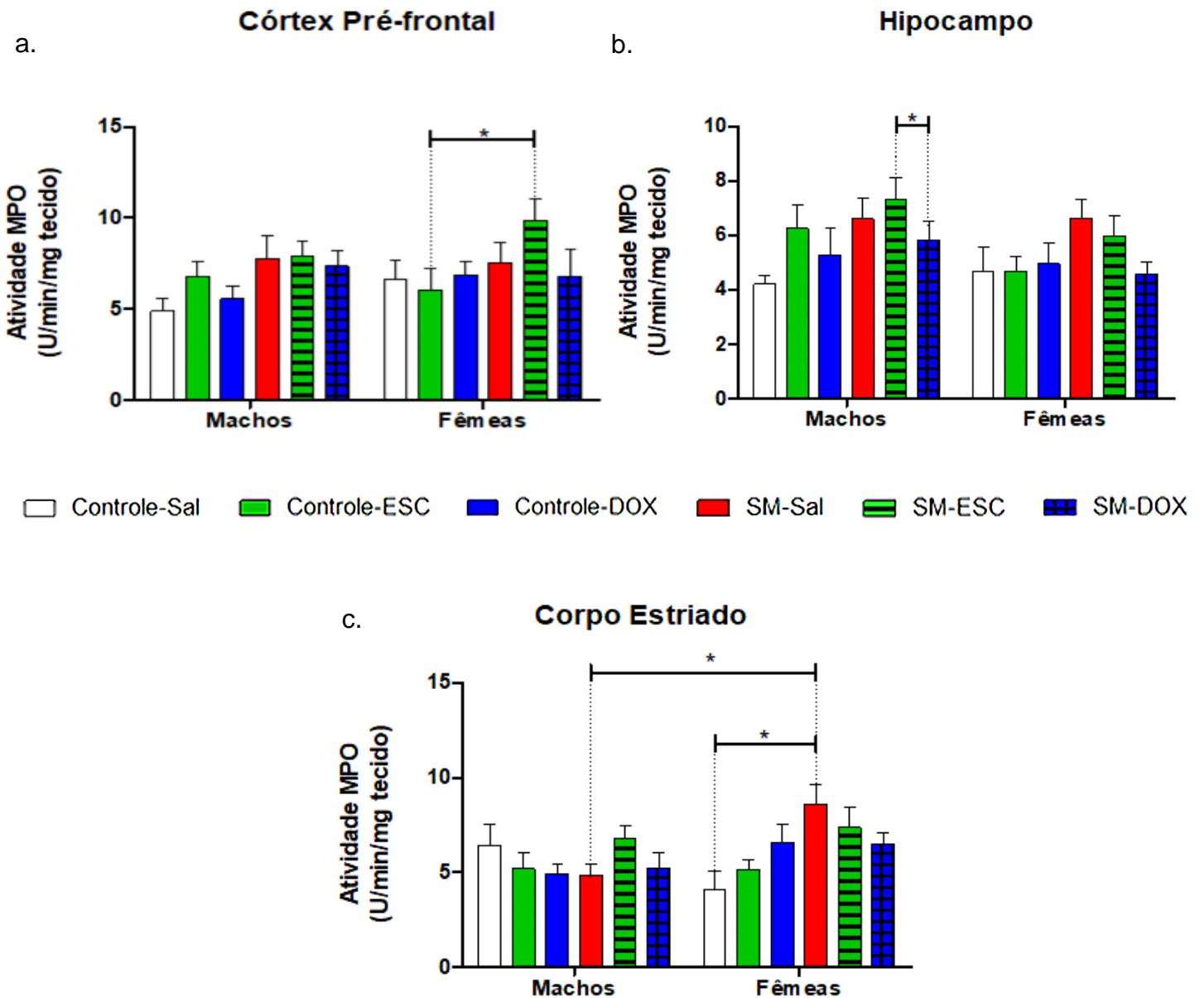


Níveis de BDNF com resultados expressos como a média \pm E.P.M ($n= 7-8$ animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * $P < 0,05$. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

12.2. Determinação da atividade da mieloperoxidase

Pode ser observado nas áreas cerebrais houve diferença entre os sexos somente na área do corpo estriado no grupo SM tratados com salina (Figura 11c), em que a fêmea apresentou maiores níveis de MPO ($[F(5,935) = 1,524 \text{ p} = 0,017]$) em relação aos machos. Quando comparado nas fêmeas SM e NSM, observou-se diferenças entre os tratamento salina ($[F(8,668) = 1,524 \text{ p} = 0,004]$) na área do corpo estriado (Figura 11c) e escitalopram ($[F(6,742) = 1,467 \text{ p} = 0,011]$) na área do córtex pré-frontal (Figura 11a), em que as fêmeas SM apresentaram maiores níveis de MPO em relação às fêmeas NSM. Nos machos houve somente relação estatística no grupo SM na região hipocampal (Figura 11b), quando comparado os tratamentos escitalopram e doxiciclina ($[F(3,792) = 1,532 \text{ p} = 0,034]$), onde os níveis de MPO está aumentada nos animais tratados com escitalopram.

Figura 11. Determinação dos níveis de MPO nas áreas cerebrais: córtex pré-frontal (a), hipocampo (b) e corpo estriado (c).



As áreas cerebrais: córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram removidos para realização do ensaio de mieloperoxidase (MPO). Os resultados foram expressos como média±E.P.M. de neutrófilos/mg de tecido (n= 7-8 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P <0,05. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

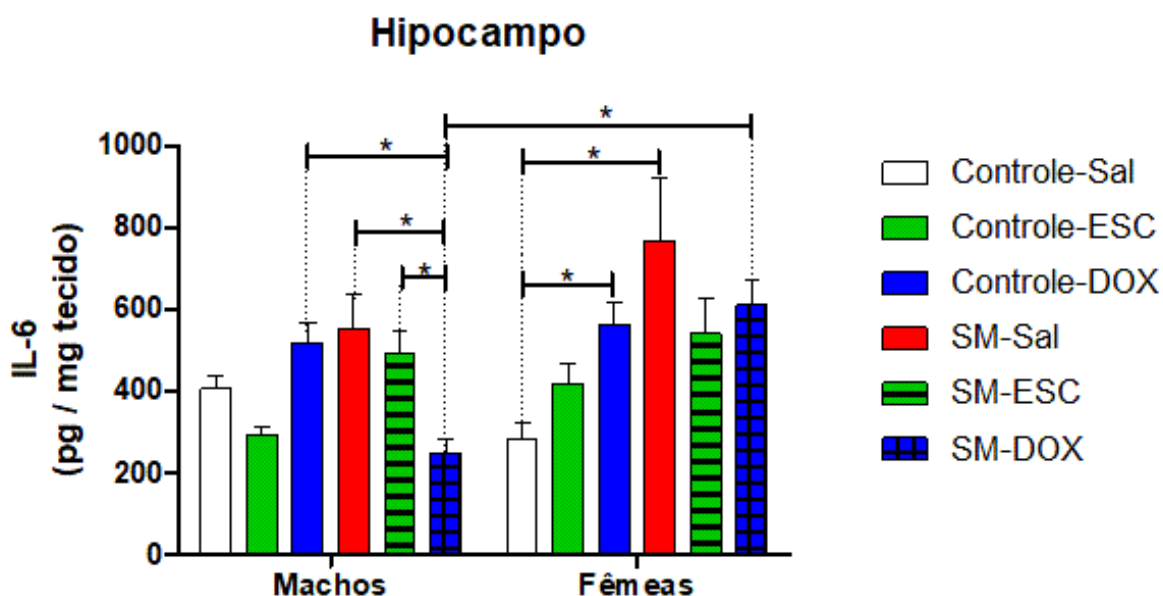
12.3. Teste de ELISA para dosagem dos níveis de IL-6

Comparando entre os sexos observa-se um aumento significativo nos níveis de IL-6 somente nas fêmeas SM tratadas com doxiciclina quando comparado com os machos SM com mesmo tratamento ($[F(13,484) = 91,134 p = 0,000]$) como pode ser observado no Figura 12.

Passando para comparações entre os parâmetros de estresse (SM e NSM), as fêmeas tratadas com salina, às SM apresentaram maior nível em relação às NSM ($[F(3,792) = 1,532 p = 0,034]$). Os machos apresentaram diferença nos animais tratados com doxiciclina ($[F(11,184) = 87,559 p = 0,001]$), onde o grupo NSM mostrou níveis elevados de IL-6 em relação aos SM.

Estatisticamente podemos inferir ainda, que as fêmeas NSM tratadas com doxiciclina, tiveram um aumento nos níveis de IL-6 na área hipocampal quando comparado às fêmeas NSM tratadas com salina ($[F(5,101) = 87,559 p = 0,006]$). E nos machos SM tratados com doxiciclina, apresentaram níveis mais baixos quando comparado com machos SM tratados com salina ($[F(5,814) = 87,559 p = 0,009]$) e escitalopram ($[F(5,814) = 87,559 p = 0,020]$).

Figura 12. Níveis hipocampais de IL-6 em machos e fêmeas.



Nível de citocina IL-6 resultados expressos como a média \pm E.P.M (n= 7-8 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P

<0,05. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

12.4. Níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Foram observados os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal (Figura 13a) obtivemos os seguintes resultados: Os machos NSM tratados com escitalopram ([F(9,642) = 395,064 p = 0,003]) e doxiciclina ([F(4,321) = 395,064 p = 0,041]) exibiram maiores níveis que as fêmeas NSM com mesmo tratamento respectivamente.

Comparando entre os grupos estressados e não estressados, as fêmeas SM salina apresentaram baixos níveis de GSH em comparação às fêmeas NSM salina ([F(5,983) = 395,064 p = 0,017]), e as fêmeas tratadas com o escitalopram exibiu maiores níveis em relação as NSM de mesmo tratamento ([F(7,370) = 395,064 p = 0,008]). Nos machos SM salina mostraram menores níveis de GSH comparado aos machos NSM ([F(12,254) = 395,064 p = 0,001]).

Somente nos grupos MS, as fêmeas tratadas com escitalopram ([F(7,903) = 395,064 p = 0,004]) e doxiciclina ([F(7,903) = 395,064 p = 0,002]) exibiram maiores níveis de GSH em relação as fêmeas tratadas com salina. A mesma correlação pode ser observada nos machos SM tratados com escitalopram ([F(8,021) = 395,064 p = 0,012]) e doxiciclina ([F(8,021) = 395,064 p = 0,001]) em comparação aos machos salina.

Na área do hipocampo (Figura 13b) pode-se evidenciar a diferença entre os sexos, os machos do grupo SM tratado do doxiciclina mostraram maiores níveis de GSH quando comparado as fêmeas SM tratadas com doxiciclina ([F(5,315) = 791,003 p = 0,029]). Nos machos pertencentes ao grupo NSM tratados com escitalopram exibiram maiores níveis de GSH quando comparado as fêmeas NSM com mesmo tratamento ([F(5,714) = 791,003 p = 0,019]).

As fêmeas SM tratadas com salina expressou baixos níveis de GSH em comparação as fêmeas NSM salina ([F(66,180) = 791,003 p = 0,012]). As fêmeas SM que foram tratadas com escitalopram exibiu menores níveis em relação as fêmeas NSM que receberam o mesmo tratamento ([F(5,334) = 791,003 p = 0,023]). Nos machos SM tratados com salina os níveis de GSH foram menores comparado aos níveis apresentado pelos machos NSM salina ([F(12,777) = 791,003 p = 0,000]). Com

os machos SM tratados com doxiciclina, mostraram maiores níveis comparados aos machos NSM que receberam o mesmo tratamento ([F(25,168) = 791,003 p = 0,001]).

Encontramos ainda diferenças estatísticas nas fêmeas SM salina, que exibiram baixos níveis de GSH em relação as fêmeas SM tratadas com doxiciclina ([F(6,484) = 791,003 p = 0,002]). As fêmeas do grupo NSM mostraram diferenças nas tratadas com escitalopram, que apresentaram menores níveis quando comparado as fêmeas salina ([F(6,484) = 791,003 p = 0,020]). Também houve disparidade entre as fêmeas NSM tratadas com escitalopram que apresentou menores níveis de GSH em comparação as tratadas com doxiciclina ([F(7,782) = 791,003 p = 0,001]).

No sexo masculino pertencente ao grupo SM apresentaram diferenças entre os tratamentos. Os machos SM tratados com escitalopram ([F(20,958) = 791,003 p = 0,003]) e doxiciclina ([F(20,958) = 791,003 p = 0,000]) demonstraram maiores níveis de GSH em relação aos machos que receberam salina. Os que receberam doxiciclina exibiram maiores níveis de GSH quando comparados os que receberam escitalopram ([F(20,958) = 791,003 p = 0,001]).

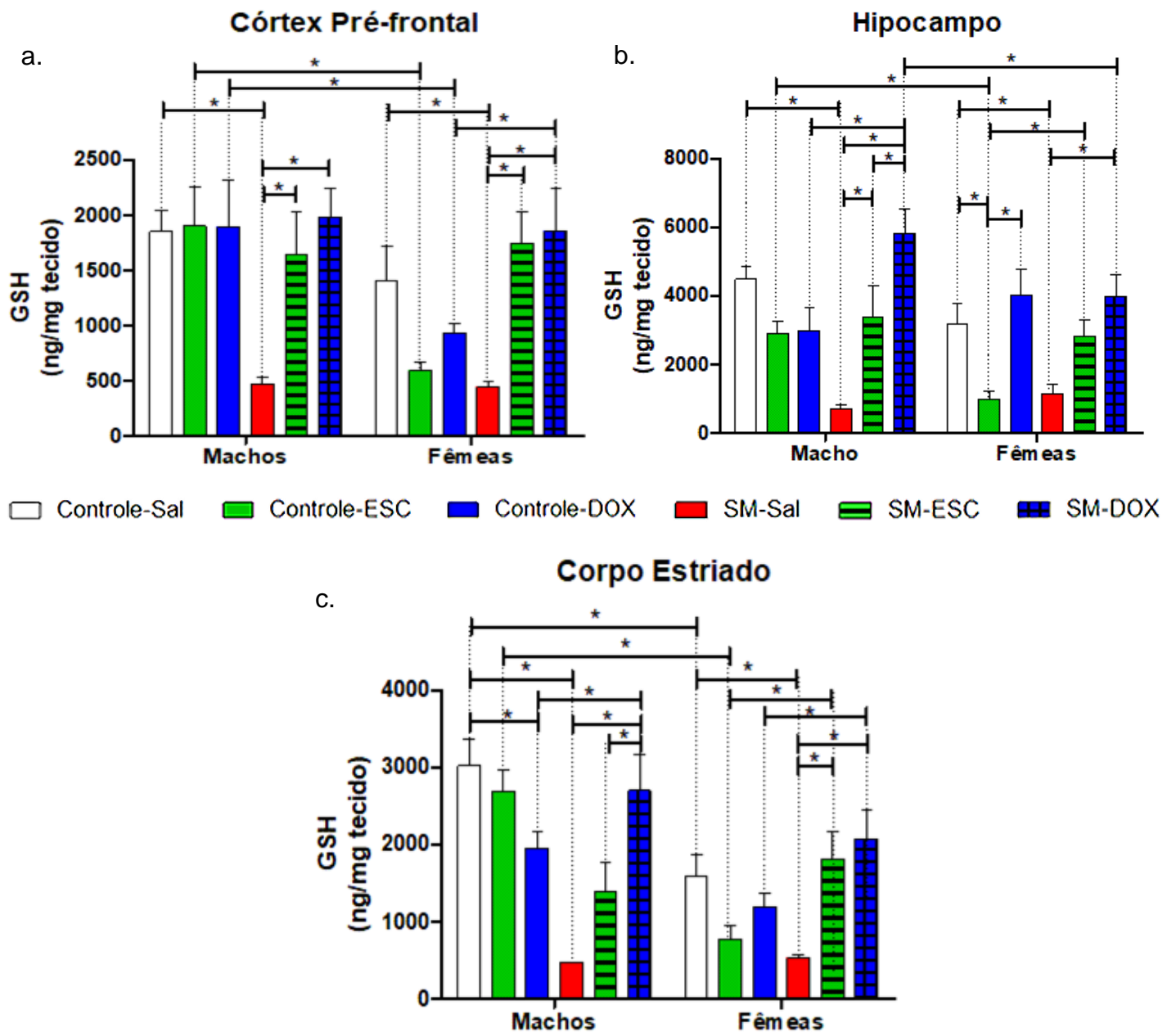
Por fim, nas análises de GSH nas áreas cerebrais, na região do corpo estriado (Figura 13c), foi possível observar diferenças no grupo NSM tratados com salina ([F(12,308) = 411,350 p = 0,001]) e escitalopram ([F(21,723) = 411,350 p = 0,000]) em que ambos mostraram níveis de GSH maiores nos machos em relação as fêmeas NSM de mesmo tratamento.

As fêmeas apresentaram diferença quando comparado entre os dois grupos SM e NSM, as fêmeas do grupo SM salina denotou menores níveis de GSH em relação as fêmeas salinas NSM ([F(6,585) = 411,350 p = 0,012]). As fêmeas SM tratadas com escitalopram ([F(6,375) = 411,350 p = 0,014]) e doxiciclina ([F(4,581) = 411,350 p = 0,035]) mostraram maiores níveis em comparação as fêmeas NMS com mesmo tratamento respectivamente. Nos machos SM que receberam tratamento com escitalopram ([F(9,901) = 411,350 p = 0,002]) e doxiciclina ([F(38,601) = 411,350 p = 0,000]) exibiu menor nível de GSH, comparando com os machos NSM com mesmo tratamento respectivamente.

Outra distinção encontrada nesta pesquisa que fêmeas SM salina apresentaram menores níveis de GSH em relação as fêmeas SM tratadas com escitalopram ([F(8,090) = 411,350 p = 0,007]) e doxiciclina ([F(8,090) = 411,350 p = 0,001]). E os machos SM salina exibiu baixos níveis em relação aos que receberam

tratamento com doxiciclina ([F(14,822) = 411,350 p = 0,000]). Ainda entre os tratamentos, escitalopram demonstrou menores níveis em comparação tratados com doxiciclina dentro do grupo SM ([F(14,822) = 411,350 p = 0,007]). Também houve diferenças dentro do machos pertencente ao grupo NSM, em que os machos que receberam doxiciclina apresentou menores níveis de GSH em relação ao tratados com salina ([F(3,548) = 411,350 p = 0,033]).

Figura 13: Níveis de glutatona reduzida nas áreas cerebrais: córtex pré-frontal (a), hipocampo (b) e corpo estriado (c),



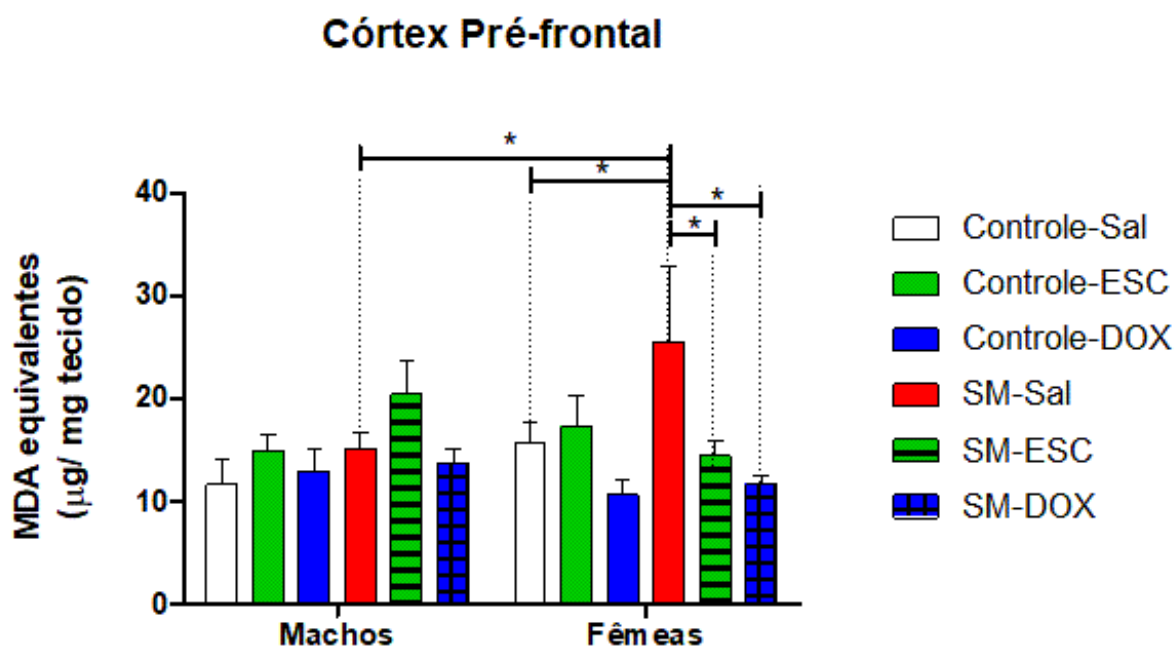
Ensaio de glutatona reduzida. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de $\mu\text{g/g}$ de tecido ($n= 7-8$ animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * $P < 0,05$. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

12.5. Peroxidação lipídica (TBARS)

Na região do córtex pré-frontal (Figura 14) foi observado uma que os machos SM tratados com salina, exibiram menores níveis de malonildialdeído (MDA) em relação às fêmeas SM com mesmo tratamento ([$F(6,469) = 4,086$ $p = 0,013$]).

Somente nas fêmeas SM, tratadas com escitalopram ([$F(6,416) = 4,086$ $p = 0,024$]) quanto com doxiciclina ([$F(6,416) = 4,086$ $p = 0,003$]), tiveram redução dos níveis de MDA comparando-as com as fêmeas tratadas com salina.

Figura 14: Níveis de malonildialdeído no córtex pré-frontal.

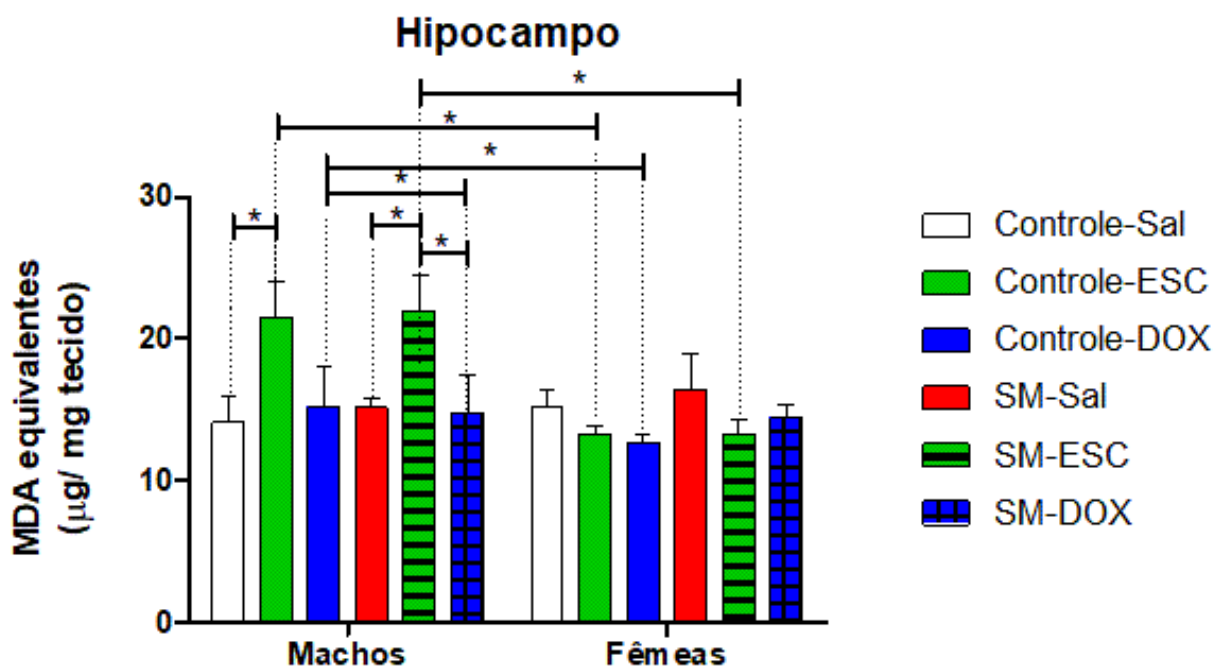


Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex pré-frontal com resultados expressos como a média \pm E.P.M ($n= 7-8$ animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * $P < 0,05$. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

Na região do hipocampo (Figura 15) foi observado diferença entre os sexos no grupo SM e grupo NSM. Os machos SM tratados com escitalopram, exibiu um maiores níveis de malonildialdeído (MDA) em relação às fêmeas SM com mesmo tratamento ([F(14,232) = 2,301 p = 0,000]). Já no grupo NSM os machos tratados com escitalopram ([F(12,832) = 2,301 p = 0,001]) e doxiciclina ([F(6,160) = 2,486 p = 0,015]) apresentaram maiores níveis de MDA em comparação às fêmeas de mesmos tratamentos respectivamente.

Somente nas machos SM tratados com doxiciclina ([F(6,637) = 2,561 p = 0,012]), tiveram redução dos níveis de MDA comparando com os machos NSM que tiveram o mesmo tratamento. Continuando com o sexo masculino, no grupo NSM, os animais tratados com escitalopram apresentou maior níveis de MDA em relação ao grupo tratado com salina.

Figura 15: Níveis de malonildialdeído no hipocampo.



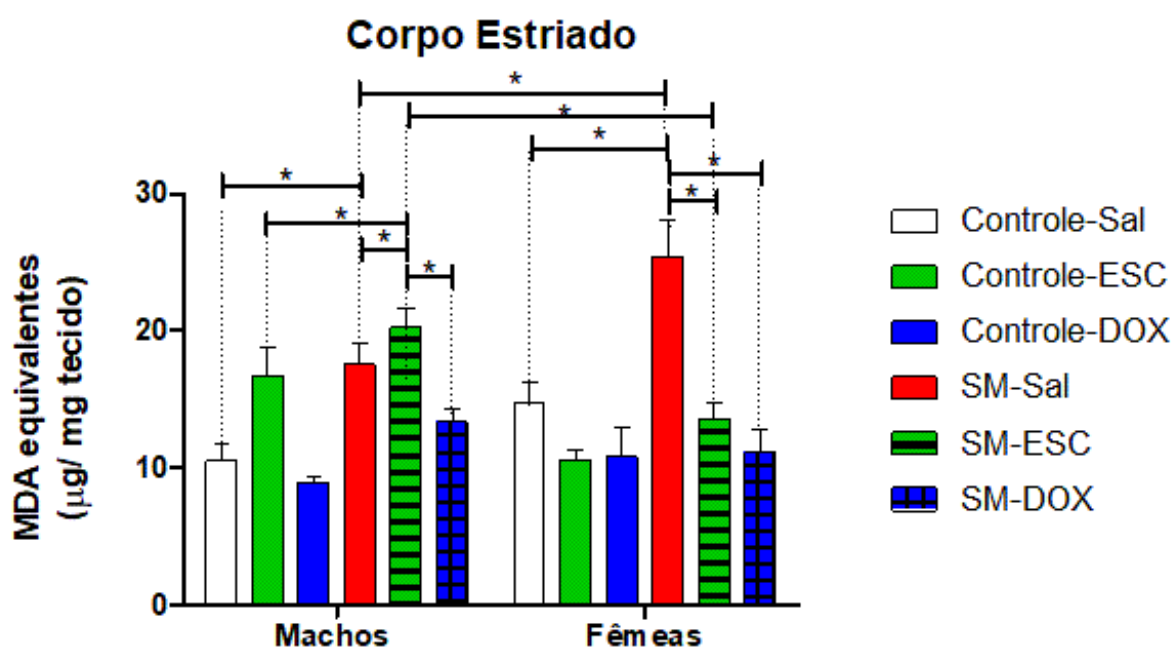
Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo com resultados expressos como a média \pm E.P.M (n= 7-8 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P <0,05. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

Na região do corpo estriado (Figura 16) foi observado somente no grupo SM tratado do com salina exibiram diferença entre os sexos, as fêmeas apresentaram maior nível de MDA em comparação aos machos ([F(5,704) = 3,292 p = 0,019]). Diferentemente aos animais tratados escitalopram ([F(14,374) = 3,292 p = 0,000]) em que os machos apresentaram maior nível que as fêmeas.

Em relação às comparações entre os grupos SM e NSM, houve diferença estatística entres as fêmeas (SM x NSM) tratadas com salina, as fêmeas estressadas apresentaram maior nível de MDA em comparação às NSM ([F(10,454) = 3,292 p = 0,002]). Nos machos também houve diferença no grupo SM x NSM tratados com salina ([F(6,720) = 3,292 p = 0,011]) e escitalopram ([F(7,999) = 3,292 p = 0,066]) onde os níveis nos machos SM são maiores.

Em relação aos tratamentos, as fêmeas SM tratadas com salina exibiram maiores níveis de MDA comparada as fêmeas tratadas com escitalopram ([F(10,766) = 3,292 p = 0,002]) e doxiciclina ([F(7,999) = 3,292 p = 0,000]) que apresentaram menores níveis. Os machos SM apresentaram que os animais tratados com salina também tiveram maiores níveis de MDA em comparação aos tratados com escitalopram ([F(7,769) = 3,292 p = 0,034]) que foram menores. Ainda se observou diferença entre os tratamentos com escitalopram e doxiciclina, quando comparadas entre se, o antidepressivo apresentou maior nível de MDA ([F(7,769) = 3,292 p = 0,001]).

Figura 16: Níveis de malonildialdeído no corpo estriado.

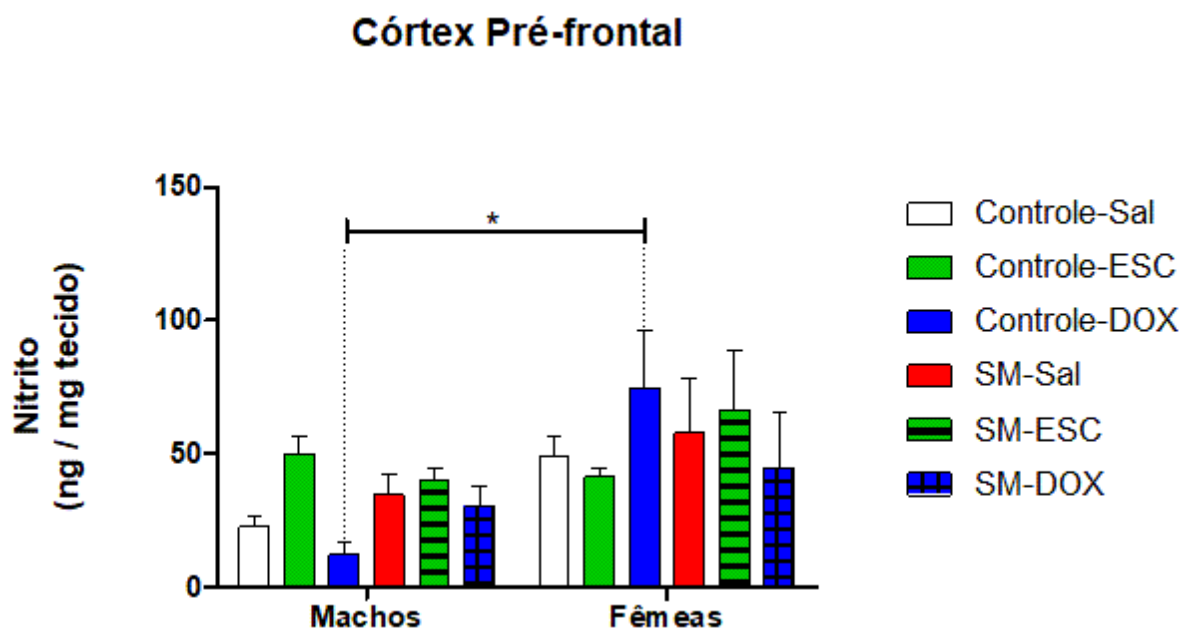


Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo com resultados expressos como a média \pm E.P.M (n= 7-8 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P <0,05. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

12.6. Determinações dos níveis de nitrito

Unicamente foi possível observar diferença nos grupos NSM em relação ao parâmetro sexo (macho x fêmea), em que a concentração dos níveis de nitrito/nitrato nos machos tratado com doxiciclina é menor que nas fêmeas ([F(11,015) = 18,756 p = 0,001]) conforme apresenta a Figura 17 .

Figura 17: Concentração de nitrito/ nitrato no córtex pré-frontal.

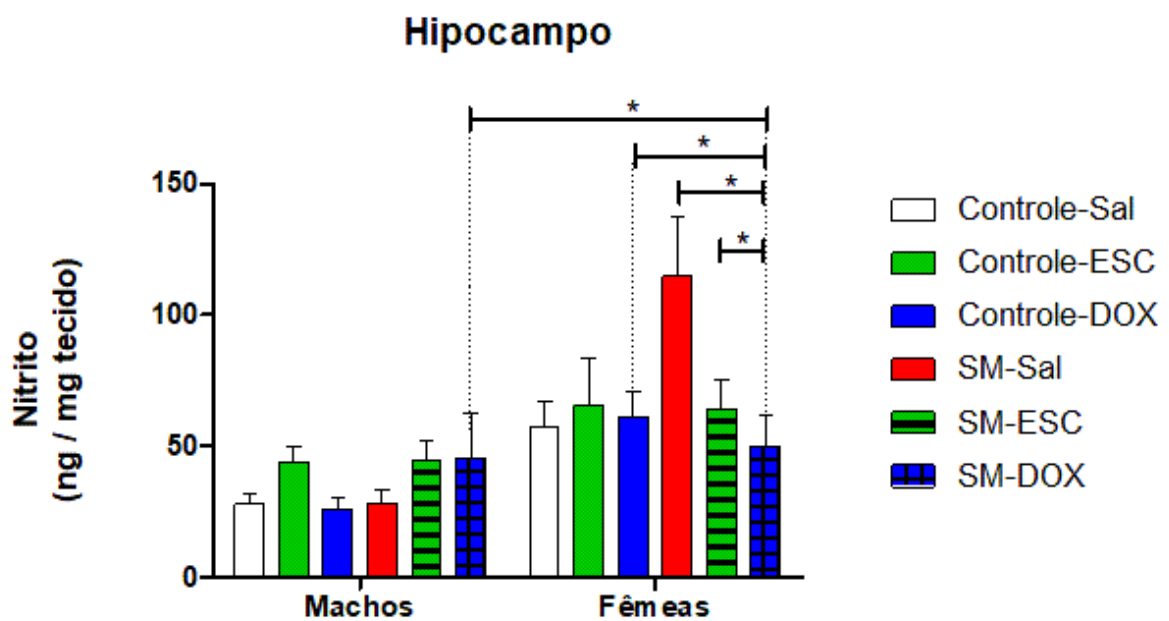


Níveis de nitrito/nitrato resultados expressos como a média \pm E.P.M (n= 7-8 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P <0,05. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

Quando comparado relação entre os sexos, as fêmeas MS tratadas com doxiciclina tiveram maior níveis de nitrito/ nitrato no hipocampo (Figura 18) que os machos SM de mesmo tratamento ([F(16,807) = 62,197 p = 0,000]).

Na comparação SM x NSM, entre as fêmeas tratadas com doxiciclina, as pertencentes ao grupo SM, tiveram maior níveis de nitrito/ nitrato ([F(14,791) = 62,197 p = 0,000]). E entre os tratamentos dentro do grupo das fêmeas SM, as tratadas com doxiciclina tiveram maior níveis de nitrito/ nitrato, tanto quando comparados às que tiveram tratamento com salina ([F(7,864) = 62,197 p = 0,011]) quanto as tratadas com escitalopram ([F(14,791) = 62,197 p = 0,001]).

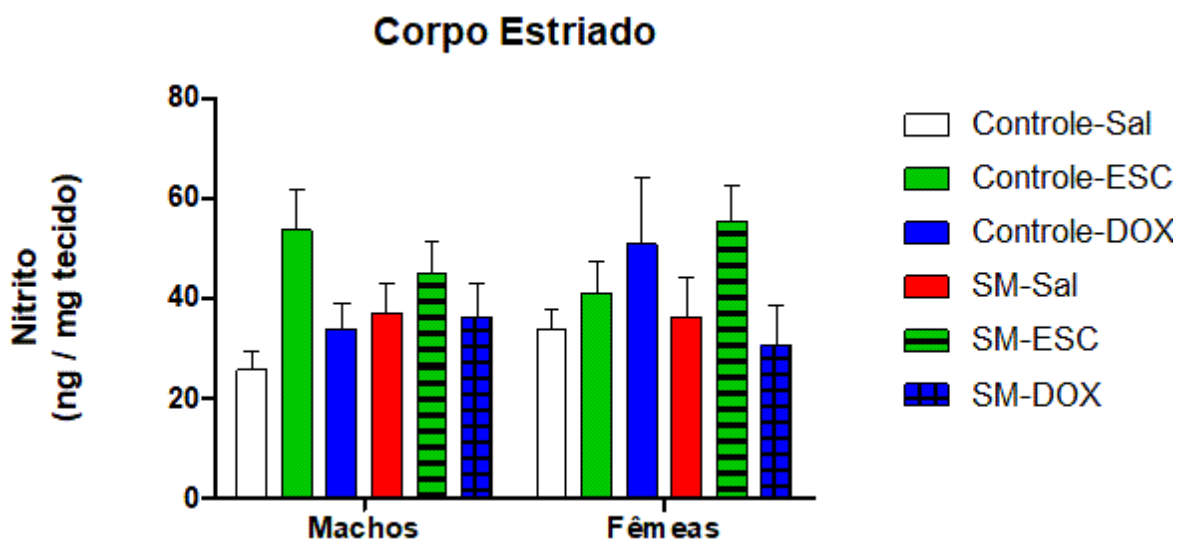
Figura 18: Concentração de nitrito/ nitrato no hipocampo.



Níveis de nitrito/nitrato resultados expressos como a média \pm E.P.M (n= 7-8 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P <0,05. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

Na região do corpo estriado como mostra a Figura 19, neste teste não houve interação significativa entre nenhum dos parâmetros avaliados.

Figura 19: Concentração nitrito/ nitrato no corpo estriado.



Níveis de nitrito/nitrato resultados expressos como a média \pm E.P.M (n= 7-8 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P <0,05. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

13. Avaliação do processo inflamatório e estresse oxidativo no intestino

13.1. Determinação da atividade da mieloperoxidase

Na região duodenal (Figura 20a) não mostrou nenhuma estatística referente a comparação entre os sexos. Contudo, os machos pertencentes ao grupo SM com tratamento salina ([F(61,346) = 2,558 p = 0,000]) e escitalopram ([F(13,400) = 2,683 p = 0,000]), apresentaram maiores níveis de MPO em relação aos machos que pertencente ao grupo NSM de mesmo tratamento. Também foi observado nas fêmeas a mesma tendência, às pertencentes do grupo SM tratadas com salina ([F(65,113) = 2,683 p = 0,000]) e escitalopram ([F(22,406) = 2,558 p = 0,000]) exibiram maiores níveis de MPO em relação às fêmeas do grupo NSM de mesmo tratamento.

Visto ainda que as fêmeas SM tratadas com doxiciclina ([F(35,962) = 2,558 p = 0,000]) e escitalopram ([F(35,962) = 2,558 p = 0,000]) exibiram menores níveis de MPO em relação às tratadas com salina. E quando comparado entre os

medicamentos, doxiciclina exibiu menores níveis em relação ao tratamento com escitalopram ([F(35,962) = 2,558 p = 0,004]).

Os machos SM tratados com escitalopram ([F(35,962) = 2,683 p = 0,000]) e doxiciclina ([F(23,376) = 2,558 p = 0,000]) expressaram menores níveis de MPO em comparação ao grupo SM salina.

No jejuno (Figura 20b) foi possível observar que houve diferença entre os sexos masculino e feminino somente nos animais SM tratados com salina, as fêmeas exibiram maiores níveis de MPO ([F(13,331) = 2,621 p = 0,001]).

Seguindo na comparação entre grupos SM e NSM, obtivemos que as fêmeas SM nos tratamentos com salina ([F(111,001) = 2,749 p = 0,000]), escitalopram ([F(6,229) = 2,621 p = 0,015]) e doxiciclina ([F(4,070) = 2,621 p = 0,048]) exibiram taxas elevadas de MPO em relação às fêmeas NSM de mesmos tratamento respectivamente. Nos machos SM foi observado a mesma inclinação nos animais tratados com salina ([F(56,653) = 2,621 p = 0,000] e escitalopram ([F(13,759) = 2,749 p = 0,000] em comparação aos machos NSM.

Foi possível evidenciar estatisticamente que as fêmeas SM tratadas com escitalopram ([F(51,632) = 2,621 p = 0,000]) e doxiciclina ([F(51,632) = 2,621 p = 0,000]) tiveram diminuição dos níveis de MPO quando comparado às fêmeas tratadas com salina. O mesmo foi demonstrado nos machos SM tratados com escitalopram ([F(18,954) = 2,749 p = 0,001]) e doxiciclina ([F(18,954) = 2,621 p = 0,000]) em relação aos machos tratados somente com salina.

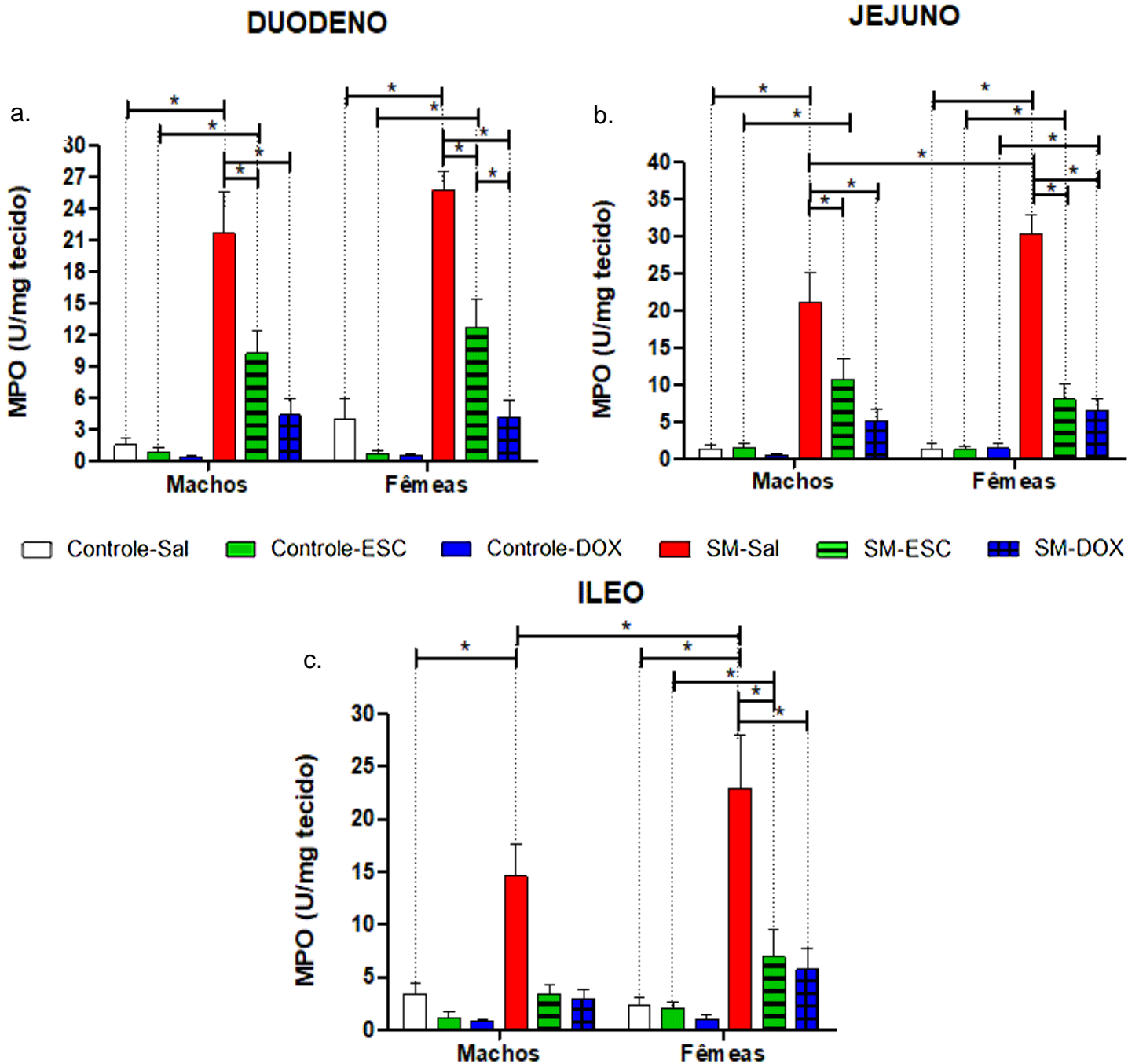
No segmento do íleo (Figura 20c) também tivemos evidências que aponta para a possível diferença de respostas ao estresse entre os sexos. Nos machos do grupo SM salina mostraram níveis de MPO mais baixos em relação às fêmeas SM salina ([F(8,281) = 2,904 p = 0,006]).

As análises mostraram que as fêmeas SM tratadas com salina ([F(46,154) = 3,045 p = 0,000]) e escitalopram ([F(4,232) = 2,904 p = 0,044]) demonstraram níveis mais altos de MPO em relação às fêmeas NSM de mesmo tratamento. Os machos SM exibiram o mesmo comportamento somente nos tratados com salina ([F(14,281) = 2,904 p = 0,000]).

As fêmeas SM tratadas com escitalopram ([F(21,938) = 2,904 p = 0,000]) e doxiciclina ([F(21,938) = 2,904 p = 0,000]) mostraram baixos níveis de MPO, quando comparada às tratadas com salina, da mesma forma ocorreu com os machos tratados

com escitalopram ([F(9,938) = 3,045 p = 0,002]) e doxiciclina ([F(9,938) = 2,904 p = 0,001]).

Figura 20. Determinação dos níveis de MPO nos segmentos intestinais: duodeno (a), jejuno (b) e íleo (c).



Os segmentos intestinais: duodeno, jejuno, e íleo foram removidos para realização do ensaio de mieloperoxidase (MPO). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de neutrófilos/mg de tecido. (n= 6 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando

UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P <0,05. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

13.2. Níveis de glutathiona reduzida (GSH) nas áreas intestinais

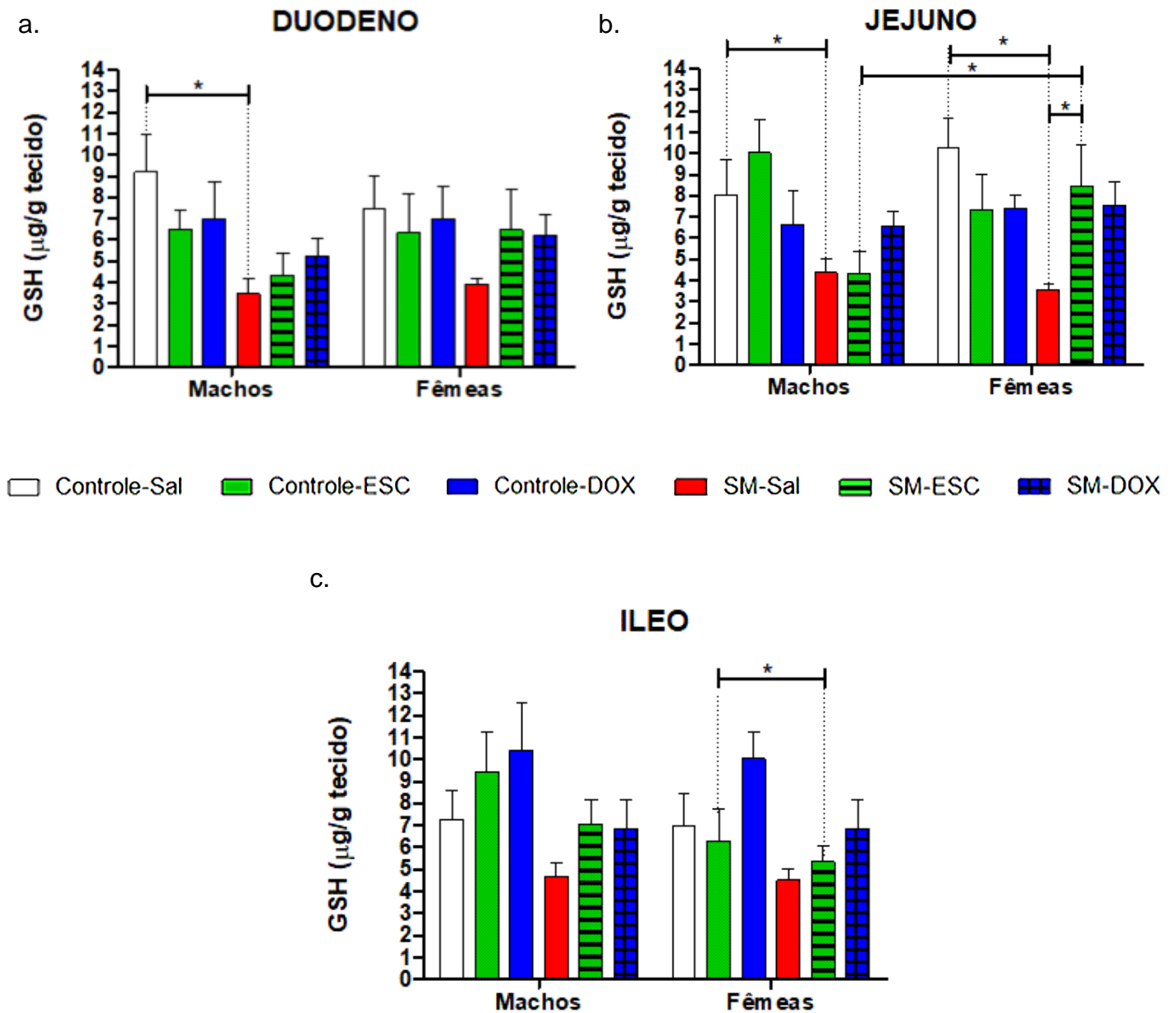
A análise no duodeno (Figura 21a) só foi possível observar diferença entre os machos SM que apresentou o conteúdo de GSH diminuído em comparação aos animais NSM ([F(5,458) = 1,937 p = 0,023]).

No jejuno (Figura 21b) as fêmeas MS tratadas com escitalopram exibiu níveis mais altos de GSH em comparação aos machos SM com mesmo tratamento NSM ([F(5,185) = 1,809 p = 0,026]).

Os machos ([F(4,157) = 1,809 p = 0,046]) e fêmeas ([F(12,559) = 1,897 p = 0,001]) tratadas com salina pertencente ao grupo SM apresentou menores níveis de GSH comparado os machos e fêmeas pertencentes ao grupo NSM. Já as fêmeas SM tratadas com escitalopram apresentaram níveis baixos de GSH em comparação às fêmeas tratadas com salina ([F(4,163) = 1,809 p = 0,026]).

Na porção do íleo (Figura 21c), a análise mostrou que as fêmeas tratadas com escitalopram SM possuem menores níveis de GSH em relação às fêmeas NSM ([F(6,182) = 1,890 p = 0,016]).

Figura 21: Níveis de glutathiona reduzida nas áreas nos segmentos intestinais: duodeno (a), jejuno (b) e íleo (c).



Os segmentos intestinais: duodeno, jejuno, e íleo foram removidos para realização do ensaio de glutathiona reduzida. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de $\mu\text{g/g}$ de tecido. ($n=6$ animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * $P < 0,05$. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias. Animais na fase adulta.

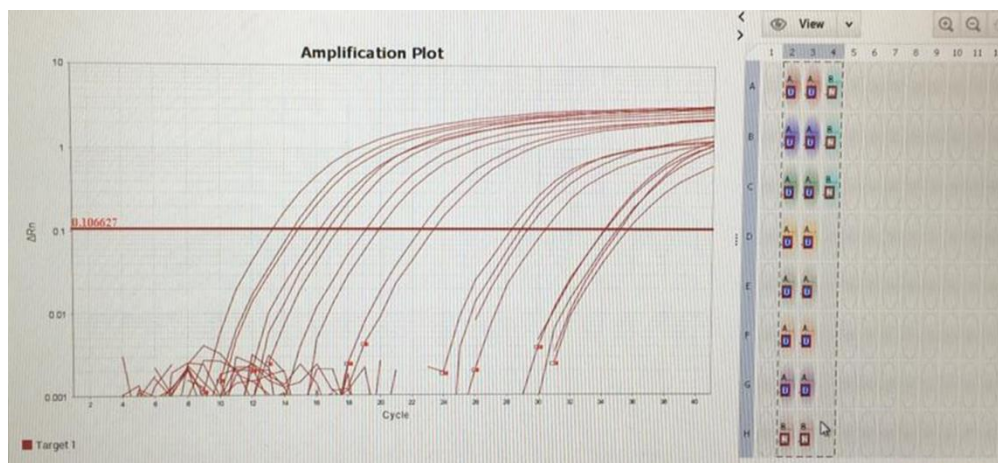
14. Bactérias totais

As amostras fecais foram processadas na extração do DNA bacteriano. Após a extração do DNA das amostras, uma quantidade deste DNA foi utilizada nas reações de PCR para a análise da presença e da ausência das bactérias.

O CT é número do ciclo em que a curva de amplificação cruzou o limiar de referência chamado Threshold (linha vermelha horizontal). Este cresce de forma proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de expressão do gene que está sendo pesquisado, no caso a presença de genes bacterianos provenientes das amostras fecais. Quanto menor for o número inicial do CT obtido, é porque houve maior amplificação do gene-alvo e, assim sendo, o mesmo apresenta maior expressão.

Como podemos observar na figura 22 podemos observar a presença de genes bacterianos as amostras fecais demonstraram pontos de CTs.

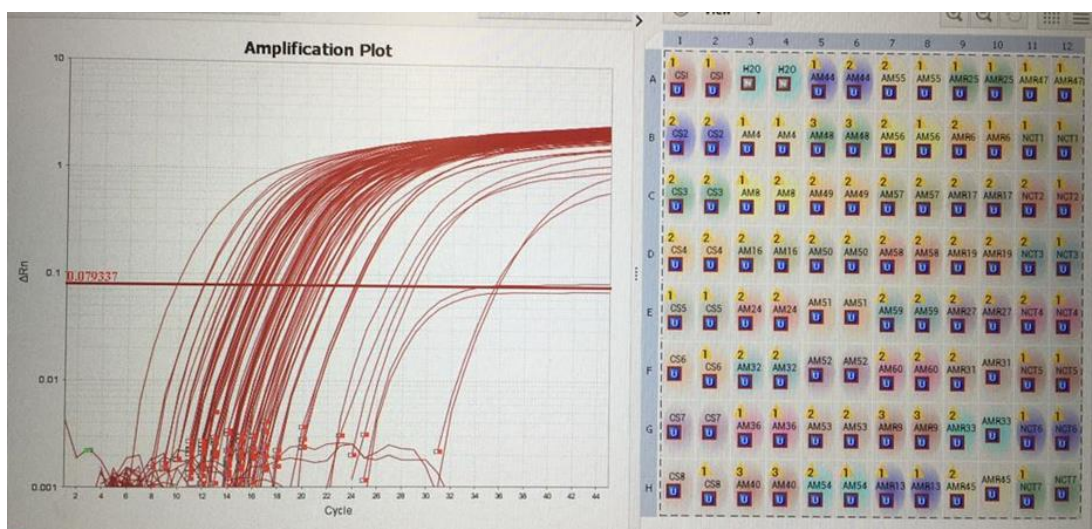
Figura 22. Valores de CT obtidos nos protocolos de PCR em tempo real.



Fonte: Feito pelo autor. Sinal da absorbância emitida durante cada ciclo no protocolo de PCR em tempo real.

Por apresentarem CTs muito distintos as amostras passaram por uma normalização, com o intuito de deixar os pontos de CTs mais homogêneos, como pode ser observado na figura 23. Isto é importante para os próximos passos deste projeto que é avaliar o efeito da separação materna sobre a microbiota intestinal.

Figura 23. Valores de CT obtidos após normalização nos protocolos de PCR em tempo real.

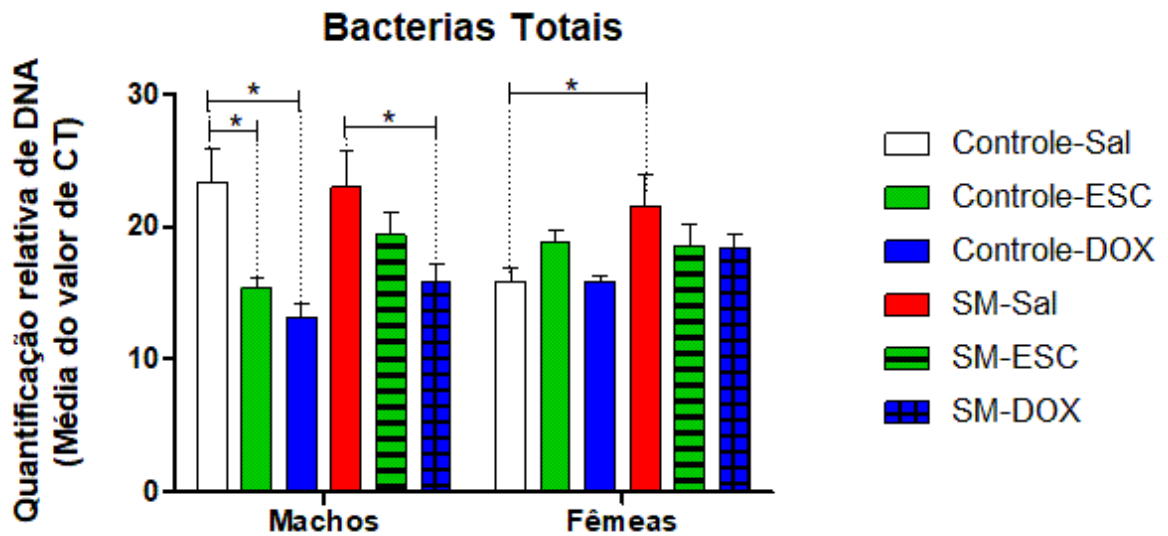


Fonte: Feito pelo autor. Sinal da absorbância emitida durante cada ciclo no protocolo de PCR em tempo real.

Com as primeiras apresentações de CTs sem a normalização, calculou-se a média destes valores para cada grupo, a fim de se observar o impacto da separação materna e do tratamento tanto por doxiciclina e escitalopram nos machos e fêmeas como pode ser observado na figura 24.

Com base na análise da quantificação relativa de DNA com base na média de CTs (Figura 24) foi possível observar diferença entre as fêmeas SM tem um aumento da quantidade relativa de DNA em comparação as fêmeas NSM ([F(6,230) = 2,579 p = 0,016]). Nos machos SM a quantidade relativa foi menor nos machos doxiciclina comparado ao controle ([F(4,117) = 2,579 p = 0,031]). Já nos machos NSM tanto os machos tratados com escitalopram ([F(13,011) = 2,579 p = 0,001]) quanto os machos tratados com doxiciclina ([F(13,011) = 2,579 p = 0,000]) foram menores quando comparados ao controle.

Figura 24. Quantificação relativa de DNA com base na média de CTs.



Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 5 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando UNIANOVA seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. *P <0,05. Modelo de depressão induzido por separação materna por 3h/dia por 15 dias.

15. DISCUSSÃO

15.1 Alterações comportamentais induzidas pelo modelo de separação materna

De acordo com a literatura, pode-se ressaltar que os efeitos da separação materna em ratos são melhor evidenciados em fêmeas. Sendo assim, pode-se observar comportamento tipo-ansioso (SHENGTAO et al., 2018) e tipo-depressivo (MOURLON et al., 2010) dependendo do desenho experimental adotado no estudo. No presente trabalho foi observado alterações comportamentais no campo aberto e no nado forçado, testes para avaliar comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo em estudos pré-clínicos, em ambos os sexos.

No teste do campo aberto foi observado déficit de locomoção nos machos submetidos à separação materna, conforme Figura 7a. Além disso, os machos submetidos ao estresse e tratados com doxiciclina apresentaram aumento no número de groomings (Figura 7c). As Fêmeas que passaram pelo estresse neonatal tiveram aumento da locomoção quando receberam o tratamento com doxiciclina (Figura 7b e 7d).

No teste do nado forçado foi observado aumento do tempo de imobilidade tanto nos machos como nas fêmeas, sendo mais evidente nestas, efeito revertido após tratamento com escitalopram e doxiciclina (Figura 8). Esses resultados corroboram com dados prévios da literatura, onde ratas fêmeas submetidas ao protocolo de separação materna apresentaram aumento significativo do tempo de imobilidade, comportamento não observado nos machos (PATERNAIN et al., 2016). Ademais, Ignácio e colaboradores (2017) observaram que a separação materna também promove comportamento tipo-depressivo em ratos machos *Wistar*.

O teste do Y-maze avalia a função executiva do córtex pré-frontal, como atenção e memória de trabalho, processos neurobiológicos importantes dessa área cerebral (BIZON et al., 2012). Nesse teste, não foi possível observar nenhuma alteração entre os grupos analisados, resultado confirmado por trabalhos prévios, como o estudo conduzido por Cunha (2018), que realizou o teste do labirinto em Y e não obteve diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Com os resultados obtidos, foi possível observar que, as fêmeas não estressadas demonstraram ser menos ansiosas que os machos, adquirindo maior capacidade exploratória ao serem tratadas com doxiciclina após o evento estressor. Além disso, os animais não tiveram alteração da capacidade cognitiva.

De acordo com estudos prévios, drogas pertencentes à classe das tetraciclinas (como a minociclina, antibiótico de segunda-geração com pronunciado efeito inibitório sobre a micróglia) possuem efeitos antidepressivos, reduzindo o tempo de imobilidade e a anedonia dos roedores nos testes comportamentais (REIS, CASTEEN & ILARDI, 2019). Seguindo essa linha de pesquisa, Mello e colaboradores (2013) mostraram que a doxiciclina preveniu e reverteu o comportamento tipo-depressivo induzido por administração de LPS em camundongos.

Adicionalmente, foi relatado que a minociclina também age indiretamente sobre o sistema monoaminérgico implicado na sintomatologia da depressão, modulando a cascata da serotonina, dopamina e norepinefrina (SLAVICH & IRWIN, 2014). A minociclina, em combinação com antidepressivos, reduz os sintomas da depressão em indivíduos com sintomas de depressão psicótica (MIYAOKA et al., 2012). Assim, os resultados obtidos com a doxiciclina na avaliação comportamental do presente trabalho podem ser devidos ao potencial antidepressivo da droga estudada.

O BDNF está envolvido em atividades importantes para o desenvolvimento neuronal, desempenhando um papel na regulação da estrutura e função neural, participando da plasticidade sináptica (GUPTA et al., 2013), estando envolvido em doenças psiquiátricas, como a depressão. Devido a esta importância, decidimos investigar o impacto da separação materna sobre os níveis de BDNF, onde foi possível observar que, nos animais que não passaram pelo estresse neonatal, os machos apresentaram um padrão elevado de BDNF em relação às fêmeas.

Houve um aumento de BDNF no hipocampo das fêmeas separadas matematicamente comparada as fêmeas que não passaram pelo estresse de vida precoce. Wang et al., 2015 pode observar, em ratos *Wistar* de ambos os sexos, o aumento da expressão de BDNF na região hipocampal decorrente da separação materna, e uma diminuição no córtex pré-frontal medial. Récamier-Carballoet e colaboradores (2017) realizaram experimentos com camundongos machos, em que também verificaram o aumento dos níveis de BDNF no hipocampo.

O aumento dos níveis de BDNF na região do hipocampo pode ser uma resposta adaptativa do animal como uma forma de compensação para melhorar a funcionalidade nesta região, tendo em vista que o BDNF tem como ação principal fazer com que o órgão se organize para se adaptar ao ambiente, e para se recuperar de lesões durante o desenvolvimento (COUPERUS & NELSON, 2006). Ademais, o excesso de BDNF pode estar relacionado a falha de mecanismos de poda sináptica ao longo do neurodesenvolvimento, o que deve ser melhor avaliado em estudos futuros.

Com relação aos tratamentos, os animais controles que receberam doses de escitalopram e doxiciclina não apresentaram alteração na expressão de BDNF, no entanto, os animais (machos e fêmeas) que foram submetidos ao protocolo da separação materna tiveram aumentos consideráveis nos níveis dessa neurotrofina após o tratamento com escitalopram e doxiciclina. Resultado semelhante foi obtido por Mello e colaboradores (2013) após indução de depressão por administração de LPS. Em geral, estes resultados obtidos no modelo de SM e do LPS mostram que os níveis de BDNF na depressão, aumentados ou reduzidos, dependem do fator de risco relacionado ao desenvolvimento deste transtorno mental.

15.2. Alterações neuro-oxidativas e nitrosativas induzidas pelo modelo de separação materna

A mieloperoxidase (MPO) está envolvida na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Esta enzima pode participar tanto do processo de morte de patógenos, quanto da sinalização de eventos da inflamação (FAITH et al., 2008; MAES et al., 2011), estando associada à depressão e outros transtornos. Para verificar o papel da MPO no processo fisiopatológico desencadeado pela separação materna, foi avaliada a atividade enzimática no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Não foi observada atividade da enzima no córtex pré-frontal e hipocampo, sendo observado apenas no corpo estriado das fêmeas separadas matematicamente, sendo mais alta que os machos que passaram pelo estresse neonatal.

No trabalho apresentado por Kim et al. (2016) que abordou a atividade da MPO no acidente vascular isquêmico indicam que a atividade da MPO está inversamente relacionada à neurogênese, sendo assim um forte indicador de alterações na região

neuronal. Neste estudo, a atividade elevada da MPO na área do corpo estriado pode estar ligada ao comportamento tipo-depressivo, uma vez que a região está relacionada a regulação do comportamento emocional (YELNIK, 2008).

Pode-se observar nesta pesquisa que os tratamentos com doxiciclina e escitalopram sozinho não apresentaram nenhuma alteração significativa na atividade da MPO em ambos os sexos. Em estudo realizado por Pinheiro et.al. (2008) em que utilizou o tratamento subcrônico de escitalopram (medicação de 14 dias), em ratos do sexo masculino, também não obteve eficácia em alterar a atividade da MPO. E o tempo de administração pode ter interferido na resposta.

Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, são comumente encontradas no plasma de pacientes com TDM (DANTZER et al., 2007). E seus níveis podem ser um indicador do estado agudo da depressão (FROMMBERGER et al., 1997; SOWA-KUCMA et al., 2017). Como um possível biomarcador dessa doença, foi investigada sua presença na região hipocampal dos animais em ambos os sexos, podendo assim relatar que houve maiores níveis de IL-6 nas fêmeas que passaram pelo estresse neonatal, não sendo capaz de observar estatisticamente o aumento dos níveis nos machos.

De acordo com O'brien et al. (2007) as mulheres apresentaram maiores níveis circulantes de IL-6R do que os homens, sendo este efeito relacionado aos estágios do ciclo menstrual, é importante ressaltar que o fator hormonal nas fêmeas pode implicar em uma influência positiva, contribuindo com a maior ocorrência de depressão em mulheres.

Os tratamentos com doxiciclina nos machos SM diminuíram os níveis de IL-6 significativamente do que os tratados com escitalopram, porém os NSM quando tratados com doxiciclina os níveis de IL-6 foram altos comparado aos que sofreram estresse e tratados com doxiciclina. O mesmo aconteceu com as fêmeas NSM e foram tratadas com doxiciclina, contudo não houve efeito tanto da doxiciclina quanto do escitalopram nas fêmeas separadas matematicamente. Este resultado mostra a ocorrência de alterações importantes pelo uso das medicações em animais não expostos a fatores de risco.

A glutatona reduzida faz parte de umas das vias antioxidantes, com o papel importante na eliminação de espécies reativas (DICKINSON & FORMAN, 2002), estas são capazes de reagir com diversos compostos ou alvos celulares (HALLIWELL,

2001) se ocorrer uma diminuição dos níveis de GSH pode desencadear um aumento dos radicais livres que leva à morte celular (MICHEL et al., 2012).

Com os resultados obtidos, foi possível observar estatisticamente a diminuição dos níveis de GSH nas três áreas cerebrais: córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em animais de ambos os sexos que passaram pelo estresse de separação materna. Esses resultados corroboram com dados encontrados na literatura, em que a separação materna causou um aumento nas espécies reativas de oxigênio e diminuiu GSH no hipocampo em ratos machos *Wistar* (MENEZES et al., 2017), resultado semelhante também encontrado em camundongos machos separados matematicamente pelo trabalho de Amini-Khoei et al., (2017) que mostrou os níveis de GSH diminuídos no hipocampo. Este trabalho indica, portanto, um desequilíbrio em um dos marcadores antioxidantes e um possível estresse oxidativo consequentemente levando a danos nas regiões aqui estudadas do sistema nervoso central.

Como mencionado anteriormente a SM provocou a diminuição de GSH. Nos grupos SM que foram administrados doxiciclina e escitalopram, podemos observar uma reversão significativa na área do córtex pré-frontal em ambos os sexos, em que os medicamentos aumentaram os níveis de GSH. No hipocampo, tanto doxiciclina quanto escitalopram conseguiram aumentar os níveis nos machos, entretanto nas fêmeas somente a doxiciclina teve maior eficácia. No corpo estriado tanto o tratamento com doxiciclina quanto escitalopram conseguiram aumentar os níveis nas fêmeas, porém nos machos somente a doxiciclina teve a ação de aumentar os níveis de GSH.

Estudo realizado por Yeh et al. (2007) abordou o pré-tratamento com doxiciclina sobre os efeitos oxidativos e apoptóticos induzidos pela doxorubicina em testículos de camundongos, e pode observar um potencial efeito antioxidante da doxiciclina. Também Ben-Azu et al. (2016) avaliaram o efeito da doxiciclina em comportamentos esquizofrênicos, bem como biomarcadores do estresse oxidativo em cérebros de camundongos, observando que a doxiciclina diminuiu as concentrações de malondialdeído de uma maneira relacionada à dose e preveniu a diminuição da glutatona. Relatos que corroboram com os achados deste trabalho, pode-se observar o efeito antioxidante nas áreas cerebrais em ratos *Wistar* de ambos os sexos, principalmente nos aumentos dos níveis de GSH.

As propriedades antioxidantes da doxiciclina, está ligada ao fato de possuir um anel de fenol que é capaz de reagir com um radical livre gerando um radical fenólico que se torna relativamente estável e não reativo (ELEWA et al. 2015). Os resultados aqui obtidos nos levam a acreditar no ótimo potencial da doxiciclina na ação antioxidante.

Um estudo realizado por Eren e colaboradores (2007) observou os efeitos da administração de lamotrigina, aripiprazol e escitalopram no tratamento da depressão, e o seu impacto na peroxidação lipídica (PL) e níveis antioxidantes no córtex cerebral em ratos *Wistar* machos, o tratamento com o escitalopram resultou em diminuição significativa na atividade de GSH e PL. Este achado corrobora com este estudo, em que observamos que o escitalopram diminuiu os níveis de GSH em ambos os sexos.

Como já é sabido na literatura, as membranas neuronais são ricas em ácidos graxos poliinsaturados, sendo muito propensas à peroxidação lipídica, esta, opera aumentando a permeabilidade, levando a morte celular (MAZZA et al., 2007). E a peroxidação lipídica faz parte da teoria dos conceitos inflamatórios por vias de estresse oxidativo e nitrosativo, que se associa a neurodegeneração e diminuição da neurogêneses (MAES et al., 2011).

A peroxidação lipídica foi avaliada nas áreas cerebrais e medida através da determinação dos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressas por malonildialdeído (MDA), e observamos que a separação materna influenciou no aumento dos níveis de MDA córtex pré-frontal (CPF) somente nas fêmeas. No hipocampo não foi observado nenhuma alteração significativa em ambos os sexos, quando comparado os grupos SM e NSM. Já no corpo estriado o estresse de vida precoce causou o aumento de MDA em ambos os sexos, ressaltado que nas fêmeas, os níveis de MDA são maiores que os níveis apresentados nos machos SM.

Em estudo realizado por Réus et al. (2015), foi encontrado um aumento nos níveis de MDA no CPF, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens (NAc) de ratos machos adultos com privação materna. Já Marković e colaboradores (2017) observaram que a privação materna é capaz de aumentar os níveis de MDA no córtex e tálamo de ratos machos, mas não observou essas mudanças no hipocampo e núcleo caudado.

No presente estudo, como anteriormente mencionado, observamos o aumento dos níveis de MDA no CPF somente nas fêmeas, enquanto no hipocampo não foi

observado nenhuma alteração estando em concordância com o trabalho apresentado por Marković e colaboradores (2017).

Frente aos tratamentos, este trabalho pode observar que, o tratamento com doxiciclina ou escitalopram reduziu a níveis basais os níveis de MDA córtex pré-frontal das fêmeas. No hipocampo não foi observado nenhuma alteração significativa em ambos os sexos, quando comparado os grupos SM e NSM, porém foi observado que o escitalopram administrado tanto nos machos SM como nos NSM aumentaram os níveis de MDA nesta área. Já no corpo estriado os níveis de MDA foram reduzidos a níveis basais somente nas fêmeas em ambos os tratamentos, nos machos SM não houve redução, contudo observou-se um aumento dos níveis de MDA tanto nos machos SM como nos machos NSM quando tratados com escitalopram.

Ben-Azu e colaboradores (2016) observaram que a doxiciclina diminuiu as concentrações de MDA nas áreas cerebrais em comportamentos esquizofrênicos de camundongos. A doxiciclina já se mostrou ser eficaz antioxidante em vários tratamentos como modelo de hipertensão (ANTONIO et al., 2014), e a minociclina que pertencente a classe das tetraciclinas de segunda geração, a qual a doxiciclina faz parte, apresentou efeito antioxidante em tratamento para a doença de Alzheimer (Budni et al., 2016) e esclerose múltipla (METZ et al., 2017). Podemos inferir que a doxiciclina pode moderar os níveis de radicais livres e assim diminuir o estresse oxidativo e a inflamação.

Eren e colaboradores (2007) observaram a ação do escitalopram no tratamento da depressão, e o seu impacto na peroxidação lipídica (PL) no córtex cerebral em ratos *Wistar* machos, que resultou em diminuição significativa na atividade de PL. Cimen et al. (2015) observaram o efeito do tratamento com escitalopram em pacientes (10 mulheres, 8 homens) com depressão, onde os níveis de MDA no plasma estavam aumentadas, e foram reduzidas após o tratamento. Nesta pesquisa o efeito antioxidante do antidepressivo escitalopram corrobora com as descrições relatadas nas literaturas mencionadas anteriormente.

O óxido nítrico (NO) é produzido durante os processos fisiológicos normais e desempenha papéis importantes no controle da função celular (MAES et al., 2011), como na plasticidade sináptica, neuromodulação e outros papéis fisiológicos, porém quando em altas concentrações, ele pode combinar com O_2^- e formar o peroxinitrito ($ONOO^-$) altamente reativo e tóxico (PATELAND DARLEY-USMAR, 1996). Foi

avaliado nesta pesquisa os níveis de nitrito nas três áreas cerebrais, porém não observamos nenhuma alteração no córtex pré-frontal e corpo estriado, em ambos os sexos, mas no hipocampo, as fêmeas SM apresentaram maiores níveis de nitrito, mostrando que a separação materna influenciou no aumento dos níveis de nitrito somente nas fêmeas na área hipocampal. Não foi observado alterações significativas em ambos os tratamentos. O aumento do nitrito associado a queda dos níveis de GSH pode levar a formação do peroxinitrito.

Diferentemente aos resultados obtidos nesta pesquisa, Marković e colaboradores (2017) mostrou em seu trabalho que ratos machos SM apresentaram maiores níveis de nitrito no córtex pré-frontal e hipocampo. Já Oliveira et al. (2008) analisou de expressão de nNOS, e constatou que é aumentada no hipocampo, obtido *post mortem* de pacientes que sofrem de depressão maior e transtorno bipolar, também relatou que não houve diferença na expressão entre os sexos. Lee et al. (2006) observaram que os níveis plasmáticos de NO foram significativamente maiores em pacientes suicidas do que pacientes psiquiátricos não-suicidas ou indivíduos controle normais. Talvez os níveis de nitrito possa ser um indicativo do estágio mais grave da depressão maior, que leva ao sintoma de ideação suicida.

Portanto, a adversidade de vida precoce pode vir a afetar vários parâmetros de formas diferenciadas em cada estrutura cerebral específica, indicando uma maior complexidade para elucidação e envolvimento dos mecanismos oxidativo e nitrosativo na fisiopatologia do transtorno depressivo.

15.3. Alterações oxidativas e nitrosativas induzidas pelo modelo de separação materna nos segmentos intestinais

A literatura tem demonstrado que existe uma comunicação bidirecional entre o cérebro e o intestino (ROGERS et al., 2016), que animais submetidos ao estresse precoce de vida como a separação materna leva ao comportamento tipo-depressivo e ansiedade (MOURLON et al., 2010; SHENGTAO et al., 2018), além da apresentação desses comportamentos, também a relatos de que a SM, promove o estresse oxidativo levando ao desenvolvimento da ruptura epitelial colônica e aumento da permeabilidade na parede intestinal no íleo e cólon (ZANI et.al.2016). Com intuito de avaliarmos os possíveis impactos da SM no intestino conduzimos os testes de

avaliação da atividade MPO nos segmentos intestinais: duodeno (figura 20a), jejuno (figura 20b) e íleo (figura 20c). Constatamos a presença de elevados níveis de MPO nas três áreas mencionadas anteriormente em animais de ambos os sexos, destacando maiores níveis de MPO no sexo feminino nas regiões do jejuno e íleo. Confirmando, portanto, que a SM pode provocar danos nos tecidos intestinais e um maior impacto sobre o sexo feminino. Podemos observar que o tratamento tanto com escitalopram e doxiciclina diminuem os níveis de MPO em ambos os sexos, com destaque na eficiência da doxiciclina na área do duodeno.

Barreau et al. (2004) relataram que a separação materna ocasionou alterações a um aumento na atividade da MPO no cólon e associadas a algumas lesões macroscópicas, promovendo alterações a longo prazo na barreira epitelial do cólon em ratos *Wistar* machos. Gareau et al. (2006) também observou a atividade da MPO na mucosa intestinal do cólon estava aumentada em ratos que passaram pelo estresse de vida precoce, sugerindo um grau de resposta inflamatória à absorção de micróbios / produtos microbianos.

O protocolo de 3 horas de separação diária da mãe mostrou, em estudo prévio, a capacidade de aumentar a permeabilidade do intestino nas células de ratos machos (SODERHOLM et al.,2002; ØINES et al.,2012). É possível que a atividade da MPO elevada nas três regiões intestinais: duodeno, jejuno e íleo, achadas neste trabalho são indícios de inflamação da parede intestinal e danos celulares, podendo levar ao aumento da permeabilidade da barreira, facilitando a translocação bacteriana e/ou produtos microbianos como o LPS para a corrente sanguínea (OHLSSON et al., 2019), em que esses produtos possam chegar ao cérebro e levando a ativação inflamatória neural e por fim a indução de uma sintomatologia depressiva.

Para caracterizar bem a evidência de que a SM pode de fato atuar no estresse oxidativo, o qual é caracterizado como um desequilíbrio entre a produção celular de espécies reativas de oxigênio e os mecanismos antioxidantes (HALLIWELL, 2001), foram avaliados os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e obtendo as seguintes observações: na região do duodeno, somente foi possível observar diferença estatísticas nos machos SM onde apresentaram baixos níveis de GSH, no jejuno ambos os sexos que passaram pelo estresse precoce apresentaram menores níveis de GSH, porem no íleo não foi observada nenhuma alteração. Em resposta aos

tratamentos somente escitalopram teve eficácia em aumentar os níveis de GSH nas fêmeas SM na região do jejuno.

É imperativo frisar a importância da integridade da parede intestinal. Dentro desta importância, ressaltar que é no intestino delgado onde ocorre maior parte do transporte de nutrientes, em que duodeno e jejuno tem maior contribuição à nutrição, e o cólon é o principal responsável pelo transporte de água e eletrólitos (KIELA & GHISHAN, 2016). E que suas células epiteliais estão constantemente a interagir com o sistema imune da mucosa via interação célula a célula e sinalização de citocinas. Essa comunicação é essencial para o estabelecimento da tolerância oral, a indução da inflamação intestinal e a regulação da proliferação epitelial e da morte celular na homeostase (WITTKOPF et al.,2014).

Outro fato importante é que ao longo do trato gastrointestinal encontramos as bactérias que participam das funções antibacteriana/proteção, imunomoduladora, nutricional e metabólica (WALL et al., 2009), assegurando o seu papel, sendo capazes de influenciar o estado de saúde do hospedeiro.

Este presente estudo apresentou que o estresse de vida precoce, no modelo animal de separação materna, leva ao desequilíbrio oxidante e antioxidante no intestino delgado nas três regiões anatômicas o duodeno, jejuno e íleo. E que, através de interações com o eixo intestino-cérebro, o sistema de comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central e o trato gastrointestinal, pode ter influências no desenvolvimento dos sintomas tipo-depressivo e alterações neuroquímicas aqui expostas.

16. Conclusão

A exposição a SM causa sintomas tipo-depressão em animais adultos machos e fêmeas acompanhadas de alterações neuro-oxidativas e nitrosativas em fêmeas. O tratamento com doxiciclina ou escitalopram, na idade adulta, foi capaz de reverter estas alterações. A SM também causou alterações oxidativas no intestino de animais machos e fêmeas, as quais também foram revertidas pelo tratamento com doxiciclina e escitalopram. De forma geral, os dados da presente pesquisa mostram que fêmeas são mais susceptíveis a alterações oxidativas cerebrais desencadeadas pela SM, enquanto animais de ambos os sexos têm a mesma susceptibilidade ao desenvolvimento de alterações intestinais, mostrando uma importante influência do sexo nas consequências da SM em animais adultos.

REFERÊNCIAS

ABELAIRA H. M., et al. Lamotrigine treatment reverses depressive-like behavior and alters BDNF levels in the brains of maternally deprived adult rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v.101, p.348–353, 2012.

ALBERT P.R. Why is depression more prevalent in women?. **J Psychiatry Neurosci**. v. 40(4), p.219–221, 2015.

ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V. B. P. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v. 24, n. 1, p. 58-65, 2009.

ALTMAN J, DAS GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol**. v.124(3),p.319-35,1965.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fifth ed. Washington, DC: British Library, 2014.

ANLAR B, SENBIL N, GUVEN A. Doxycycline in autoimmune central nervous system disorders in children: an in vitro study. **Turkish Journal of Pediatrics**. v.49, p.274-7, 2007.

ARCHER, J. Test for emotionality in rats and mices. A Reviem. **Anim. Beha**. v. 21, p. 205-235, 1973.

BALTENBERGER E. P. et al. Review of antidepressants in the treatment of neuropathic pain. **Mental Health Clinician**. v. 5, n ° 3, p. 123-133, 2015.

BARREAU et al., Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. **Gut**. v.53(4). p.501–506. 2004.

BELLISSIMO, M.I.et al. Is the unilateral lesion of the substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? **Neurobiol. Learn. Mem**. v. 82, p. 150-8, 2004.

BEN-AZU et al. Doxycycline Ameliorates Schizophrenia-Like Behaviors in Experimental Models in Mice by Targeting Underlying Oxidative Stress. **Journal of Behavioral and Brain Science**. v. 6. p.539-562. 2016.

BENTLEY, S. M.; PAGALILAUAN, G. L.; SIMPSON, S. A. Major depression. **Med Clin North Am**, v. 98, n. 5, p. 981-1005, 2014.

- BERCIK, P. et al. The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotropic Factor and Behavior in Mice. **Gastroenterology**, v.141, p.599–609, 2011.
- BILICI M, et at. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **J Affect Disord**. v.64(1), p.43-51, 2001.
- BIZON J. L. Characterizing cognitive aging of working memory and executive function in animal models. **Front Aging Neurosci**. v.4(19). p.1-14.2012.
- BLEKER L.S. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system reactivity in children prenatally exposed to maternal depression: A systematic review of prospective studies. **Neurosci Biobehav Rev**. 2018.
- BORRE, Y. E. et a. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. **Trends in Molecular Medicine**. v. 20, p. 509–518, 2014.
- BRIGITTA, B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 7–20, 2002.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, V. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.
- BRANDT, K. et al. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in Brazilian newborns. **Clinics**. v.67, n.2, p.113-123, 2012.
- BUDNI et al. The Anti-Inflammatory Role of Minocycline in Alzheimer’s Disease. **Current Alzheimer Research**. v.13(12).p 1319 – 1329.2016.
- CARLYLE B.C. et al. Maternal separation with early weaning: a rodent model providing novel insights into neglect associated developmental deficits. **Dev Psychopathol**. v. 24(4), p.1401-16. 2012.
- CARVALHO, H. W. DE et al. The joint structure of major depression, anxiety disorders, and trait negative affect. **Revista brasileira de psiquiatria** (São Paulo, Brazil : 1999), v. 36, n. 4, p. 285–92, 2014.
- CENIT M. C., SANZ Y., CODOÑER-FRANCH P. Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. **World J Gastroenterol**. v. 23(30), p.5486–5498, 2017.
- CHEN Z.Y. et al. Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. **Novartis Found Symp**. v.289, p.180-95, 2008.

- CHOPRA, K.; KUMAR, B.; KUHAD, A. Pathobiological targets of depression. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 15, n. 4, p. 379–400, 2011.
- CHU, H., WILLIAMS, B., SCHNABL, B. Gut microbiota, fatty liver disease, and hepatocellular carcinoma. **Liver Res.** v. 2(1), p. 43-51, 2018.
- CIZZA G, et al. Elevated neuroimmune biomarkers in sweat patches and plasma of premenopausal women with major depressive disorder in remission: the POWER study. **Psiquiatria Biol**; v. 64 (10): p.907-11, 2008.
- COHEN L.S. Risk for new onset of depression during the menopausal transition: the Harvard study of moods and cycles. **Arch Gen Psychiatry.** v.63(4). p. 385-90, 2006.
- CONG X., HENDERSON W.A., GRAF J., MCGRATH J.M. Early Life Experience and Gut Microbiome: The Brain-Gut-Microbiota Signaling System. **Adv Neonatal Care.** v.15(5) p.314-23, 2015.
- CRYAN, JOHN F. & DINAN, TIMOTHY G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour . **Nature Reviews Neuroscience.** v. 13, p. 701 – 712, 2012.
- CUNHA, BA. Minocycline Versus Doxycycline in the Treatment of Lyme Neuroborreliosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 237-238, 2000.
- CUSSOTTO S. et al. Differential effects of psychotropic drugs on microbiome composition and gastrointestinal function. **Psychopharmacology.** p 1432-2072. 2018.
- DANTZER R, KELLEY KW. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behav Immun.** v.21(2) p.153-60. 2007.
- DELISLE, V.C. et al. Resisting gender differences in somatic symptoms of depression: much ado about nothing?. **PLoS One.** v. 7, n.2, p. e 32490, 2012.
- DREVETS, W. C. Neuroimaging studies of mood disorders. **Biological psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 813–29, 2000.
- DOMAGALA-KULAWIK, J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 59, n.6, p.19–34, 2008.
- DOMERCQ M, MATUTE C. Neuroprotection by tetracyclines. **Trends in Pharmacological Sciences.** v.25, p.609-12, 2004.

DONG, C; et al.. Effects of escitalopram, R-citalopram, and reboxetine on serum levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-10, and depression-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 144, p. 7-12, 2016.

DOWLATI Y. et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. **Psiquiatria Biol** v. 67, p. 446–457,2010.

ELEWA et al. Hepatoprotective and anti-tumor effects of targeting MMP-9 in hepatocellular carcinoma and its relation to vascular invasion markers. **Clin Exp Metastasis**. v.32. p.479–493. 2015.

EREN et al. Protective Effects of Lamotrigine, Aripiprazole and Escitalopram on Depression-induced Oxidative Stress in Rat Brain. **Neurochem Res** v. 32. p.188–1195. 2007.

ERIKSSON P. S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med**. v.4(11). p.1313-7. 1998.

ESPERIDIÃO-ANTONIO V. et al. Neurobiology of the emotions. **Rev. Psiq. Clín** v.35 (2), p.55-65, 2008.

ESSAU C.A. et al. Gender differences in the developmental course of depression. **J Affect Disord**. v.127(1-3), p.185-90; 2010.

FAITH, et.al. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? **Clinica Chimica Acta**. v.396.p.23–25. 2008.

FERREIRA MELLO, B. S. et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 10, p. 1521–1529, 2013.

FOSTER, J.A.; NEUFELD, K.-A. M. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. **Trends Neurosci**. v. 36, p. 305–12, 2013.

FRANKS, A.H.; HARMSEN, H.J.; RAANGS, G.C.; JANSEN, G.J.; SCHUT, F. & WELLING, G.W. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Appl Environ Microbiol**. v.64, p. 3336–3345,1998.

FROMMBERGER, et.al. Interleukin-6-(IL-6) plasma levels in depression and schizophrenia: comparison between the acute state and after remission. *Eur Arch Psychiatry Ctin Neurosci* v.247.p.228-233.1997.

FURET, J.P.; QUENEE, P. & TAILLIEZ, P. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using realtime quantitative PCR. *Int J Food Microbiol.* v.2, p.197–207, 2004.

FURET, J.P. et al. G. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol.* v.68, p. 351–362, 2009.

FURTMÜLLER P.G. et al. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases, *Arch. Biochem. Biophys.* v.445, p.199-213, 2006.

GAREAU et al. Neonatal Maternal Separation Causes Colonic Dysfunction in Rat Pups Including Impaired Host Resistance. *Pediatric Research.* v.59 , p 83 – 88. 2006.

GILLMAN, P. K. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *British Journal of Pharmacology.*v.151 737–748. 2007.

GORDON J.L., GIRDLER S.S. Hormone replacement therapy in the treatment of perimenopausal depression. *Curr Psychiatry Rep.* v.16(12), p.517, 2014.

GREEN LC, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry.* p. 126:131e8. 1982.

GRIMSLEY S.R., JANN M.W. Paroxetine, sertraline, and fluvoxamine: new selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin Pharm* 11:930–957. 1992.

GUPTA, et. al. TrkB Receptor Signalling: Implications in Neurodegenerative, Psychiatric and Proliferative Disorders. *Int J Mol Sci.* v. 14(5). p. 10122–10142. 2013.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun,* v. 393, n. 4, p. 561-4, 2010.

HALLIWELL B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging,* v.18, p.685-716, 2001.

HANSSON M., I. OLSSON, W.M. Nauseef, Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* v.445, p.214-224,2006.

HOLTZHEIMER P. et al. Emerging treatments for depression, **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.7:17, p. 2323-2339, 2006.

HOWREN, M B. et al. Associations of Depression With C-Reactive Protein, IL-1, and IL-6: A Meta-Analysis. **Psychosomatic Medicine**. – V.71. p 171-186, 2009.

HUIJSDENS, X.W.; LINKENS, R.K.; MAK, M.; NEUWISSEN, S.G.; VANDERBROUCKE-GRAULS, C.M. & SAVELKOUL, P.H. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. **J Clin Microbiol**. v.40, p. 4423–4427, 2002.

HUTTENHOWER, C. et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature** v.486, p.207–214, 2012.

JAVED, J; ZAHIR, E. Thermodynamic studies of iron chelation with doxycycline in acidic medium. **Russian Journal of Physical Chemistry A**. v. 91(6), p.1045-1050, 2017.

JIAWEN W.; HONG S.; SHENGXIANG X.; JING L. Depression- and anxiety-like behaviour is related to BDNF/TrkB signalling in a mouse model of psoriasis. **Clin Exp Dermatol**. v.43(3), p.254-261. 2018.

JOHNSON A. M. Paroxetine: a pharmacological review. **Int Clin Psychopharmacol** v.6 , p.15–24.1992.

JUTAPAKDEEGULA S.O.N. et al. Postnatal Touch Stimulation Acutely Alters Corticosterone Levels and Glucocorticoid Receptor Gene Expression in the Neonatal Rat **Dev Neurosci**. v.25, p.26–33, 2003.

KABAT A. M., SRINIVASAN N., MALOY K.J. Modulation of immune development and function by intestinal microbiota. **Trends Immunol**. v.35(11), p. 507-17, 2014.

KAIDANOVICH-BEILIN, O.; LIPINA, T.; VUKOBRADOVIC, I.; RODER, J.; WOODGETT, J.R. Assessment of Social Interaction Behaviors. **J. Vis. Exp**. v. 48, p.1–6, 2011.

KAMADA, N.; SEO, S.U.; CHEN, G.Y. AND NÚÑEZ, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**. v. 13, p. 321- 335, 2013.

- KESSLER, R.C. et al. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **Int J Methods Psychiatr Res.** v.21, n.3, p.169–184, 2012.
- KIELA & GHISHAN, Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.** v. 30(2). p.145–159. 2016.
- KIM, ET.AL. Myeloperoxidase Inhibition Increases Neurogenesis after Ischemic Stroke **J Pharmacol Exp Ther.** v. 359(2).p. 262–272. 2016.
- KIMURA M. Escitalopram oxalate. **J Jpn Soc Hosp Pharm.** v. 48, p.371–5; 2012.
- KLEIN DN, KOTOV R. Course of depression in a 10-year prospective study: Evidence for qualitatively distinct subgroups. **Journal of Abnormal Psychology.** v.125, p.337–348. 2016.
- KLOMP, A.; et al. Effects of Chronic Fluoxetine Treatment on Neurogenesis and Tryptophan Hydroxylase Expression in Adolescent and Adult Rats. **Plos One.** v.9, p. e97603, 2014.
- KOZISEK M.E.; MIDDLEMAS D.; BYLUND D.B. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. **Pharmacol Ther.** v.117(1), p.30-51. 2008.
- LEE, C.; KIM, J.; SHIN, S.G.; HWANG, S. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in Escherichia coli. **Journal of Biotechnology.** v.123, p. 273–280, 2006.
- LEJEUNE, S., et al.. The dopamine D1 receptor agonist SKF 38393 improves temporal order memory performance in maternally deprived rats. **Neurobiology of Learning and Memory,** v.106, p.268–273, 2013.
- LIEB, J. The immunostimulating and antimicrobial properties of lithium and antidepressants. **J. Infect.** v.49, p.88–93, 2004.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with follin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.
- MACEDO, D. et al. Antidepressants, antimicrobials or both? Gut microbiota dysbiosis in depression and possible implications of the antimicrobial effects of antidepressant drugs for antidepressant effectiveness. **J Affect Disord.** v. 208, p.22-32, 2016.

MAES M, GALECKI P, CHANG YS, BERK M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. V.35(3), p.676-92. 2011.

MAHONY, S.M.O.; HYLAND, N.P.; DINAN, T.G.; CRYAN, J. F. Maternal separation as a model of brain–gut axis dysfunction. **Psychopharmacology**. v. 214, p. 71–88, 2011.

MALETIC, V.; RAISON, C. Integrated Neurobiology of Bipolar Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, 2014.

MANZ, W.; et al. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga–Flavobacter–Bacteroides in the natural environment. **Microbiology**. v.142, p. 1097–1106, 1996.

MARKOVIĆ et al. Long-Term Effects of Maternal Deprivation on Redox Regulation in Rat Brain: Involvement of NADPH Oxidase. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**.v.2107.p1-13.2017.

MAZZA M.et.al. Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: an overview. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.31(1).p.12-26. 2007.

MCDANIEL, J.S., MUSSELMAN, D.L., PORTER, M.R. Depression in patients with cancer. Diagnosis, biology, and treatment. **Arch. Gen. Psychiatry**. v.52, p.89–99, 1995.

MCLEAN, C.P.; ASNAANI, A.; LITZ, B.T.; HOFMANN, S.G. Gender differences in anxiety disorders: prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. **J Psychiatr Res**. v. 45, p. 1027-1035, 2011.

MELLO BS, et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research**. V.47(10), p.1521-1529. 2013.

MENEZES et al. Green tea protects against memory deficits related to maternal deprivation. **Physiology & Behavior Volume** v.182. p. 121-127.2017.

MESSIHA, F.S. Fluoxetine: A spectrum of clinical applications and postulates of underlying mechanisms. **Neuroscience and Behavioral Reviews**. v. 17, p. 385-396, 1993.

METZ et al. Trial of Minocycline in a Clinically Isolated Syndrome of Multiple Sclerosis. **N Engl J Med**. v.376. p 2122- 2133. 2017.

MICHEL. et.al The Role of Oxidative Stress in Depressive Disorders Current **Pharmaceutical Design**. v.18. p.5890-5899, 2012.

MIYAOKA T. et al. Minocycline as adjunctive therapy for patients with unipolar psychotic depression: an open-label study. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.37(2). p.222-226.2012.

MONTEGGIA L M, et al. Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. **Biol Psychiatry**. V. 61, p. 187-197, 2007.

MOREJÓN G. et al. Actualización en tetraciclinas. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 37, n. 3, p. 1-1, 2003.

MOURLON, et.al. Maternal deprivation induces depressive-like behaviours only in female rats. **Behav Brain Res**. v. 213(2). p. 278-287. 2010.

MUELLER, T.I. et al. Recurrence after recovery from major depressive disorder during 15 years of observational follow-up. **Am J Psychiatry**. v.156, p.1000-1006, 1999.

MUIR A.B., BENITEZ A.J., DODS K., SPERGEL J.M., FILLON S.A. Microbiome and its impact on gastrointestinal atopy. **Allergy** . v. 71(9), p.1256-63, 2016.

MUNOZ-BELLIDO, J.L.; MUNOZ-CRIADO, S.; GARCÍA-RODRIGUEZ, J.A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs. **Int. J. Antimicrob. Agents**. v. 14, p.177–180, 2000.

MURRAY, C.J.; LOPEZ, A.D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study. **Lancet**. v. 349, p. 498- 504, 1997.

O'BRIEN SM, FITZGERALD P., SCULLY P., LANDERS A., SCOTT LV, DINAN TG. Impacto do sexo e fase do ciclo menstrual nas concentrações plasmáticas de citocinas. **Neuroimunomodulação**.v.14. p.84-90. 2007.

OHLSSON L. et al. Biomarcadores intestinais com perdas na depressão e comportamento suicida. **Acta Psychiatr Scand.** V. 139 (2): p.185-193, 2019.

ØINES et al. Neonatal maternal separation in male rats increases intestinal permeability and affects behavior after chronic social stress. **Physiology & Behavior** v.105 p.1058–1066.2012.

OITZL, M. et al. Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent Brown Norway rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 3771–3780, 2000.

OVREÅS, L. et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Appl Environ Microbiol.** v.63, p. 3367–3373, 1997.

PALMA, G. et al. Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. **Nature Communications.** v., p. 1–13, 2015.

PARK A.J. ; et al. Altered colonic function and microbiota profile in a mouse model of chronic depression. **Neurogastroenterol Motil.** V.25, p.733–e575, 2013.

PETRA, A. I. et al. Gut-microbiota-brain axis and its effect on neuropsychiatric disorders with suspected immune dysregulation. **Clinical Therapeutics.** v. 37, N. 5, p. 984-995, 2015.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: strain differences and the effects of imipramine. **European Journal of Pharmacology.** v. 51, p. 291–294, 1978.

RAKIC P. Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.92(25), p.11323-7. 1995.

RANDENBORGH, A.V. et al. Contrasting chronic with episodic depression: An analysis of distorted socio-emotional information processing in chronic depression. **Journal of Affective Disorders.** v.141, p.177–184, 2012.

RÉCAMIER-CARBALLO et al. Maternal separation induces long-term effects on monoamines and brain-derived neurotrophic factor levels on the frontal cortex, amygdala, and hippocampus: differential effects after a stress challenge. **Behavioural Pharmacology.** v. 28(7). p.545-557.2017.

REIS D J , CASTEEN E J , ILARDI S S. The antidepressant impact of minocycline in rodents: A systematic review and meta-analysis. **Sci Rep**. v.9:261.p.1-11.2019.

RÉUS, G. Z. et al. Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 3, p. 460–466, 2011.

RÉUS et al. A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. **Developmental Neurobiology**.v.75(11).p 1268-1281. 2015.

RÉUS, G. Z. et al. Early Maternal Deprivation Induces Microglial Activation, Alters Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactivity and Indoleamine 2,3-Dioxygenase during the Development of Offspring Rats. **Molecular Neurobiology**, p. 1–13, 2018.

RINTTILA, T. et al. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **J Appl Microbiol**. v.97, p. 1166–1177, 2004.

RODRIGUES, M.J.S.F. O diagnóstico de depressão. **Psicologia USP**. v. 11, N° 1, p 155-187, 2000.

ROGERS, G.B. et al. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. **Molecular Psychiatry**. v.21, p.738 – 748, 2016.

SALIM S. Estresse oxidativo e distúrbios psicológicos. **Curr Neuropharmacol**. V.12 (2): p.140-7, 2014.

SÁNCHEZ C. ET AL. Escitalopram, the S-(+)-enantiomer of citalopram, is a selective serotonin reuptake inhibitor with potent effects in animal models predictive of antidepressant and anxiolytic activities. **Psychopharmacology**. V. 167, p. 353–362, 2003.

SANTOS, A.C.A. Uso de Probióticos na recuperação da flora intestinal, durante a antibioticoterapia. Dissertação (Especialização em Microbiologia) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94(4), p. 491–5, 1988.

SCHAAF, M. J. M. et al. Correlation between hippocampal BDNF mRNA expression and memory performance in senescent rats. **Brain Research**, v. 915(2), p. 227–233, 2001.

SCHWENGER, K.J.P., BOLZON, C.M., LI, C., ALLARD, J.P. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: the role of the gut bacteria. **European Journal of Nutrition**. P.1-14, 2018.

SEDLAK J & LINDSAY RH. Estimation of total, proteinbound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem** v.25, p.192–205 1968.

SGARBI, M.W.M. et. al. The importance of systemic inflammatory response (SIRS) in the prognosis of polytraumatized patients. **Rev Bras Ortop**, v.41, n.2, p.1-6, 2006.

SHENGTAO J. et al. Anxiety-like behaviour assessments of adolescent rats after repeated maternal separation during early life. **Neuroreport**. v.29(8). p.643–649.2018.

SHIMIZU E. et al Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in de-pressed patients with or without antidepressants. **Biol Psychiatry**. V.54, p.70–75. 2003.

SILVERMAN, J.J. et al. The american psychiatric association practice guidelines for the psychiatric evaluation of adults. **The American Journal of Psychiatry**. v. 172, n°8, p. 798-802, 2015.

SLAVICH G M, IRWIN M R. From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. **Psychol Bull**. v.40(3). p.774-815.2014.

SODERHOLM et al Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** v.283. p.1257–1263, 2002.

SOUSA, C. N. S. Efeitos Comportamentais E Neuroquímicos De Ácido Alfa – Lipóico E Desvenlafaxina Em Modelo Animal De Depressão Induzido Por Corticosterona. Universidade Federal do Ceará, 2015.

SOWA-KUĆMA, M. et al. “A peroxidação lipídica e os biomarcadores imunológicos estão associados à depressão maior e seus fenótipos, incluindo depressão e

melancolia resistentes ao tratamento”. **Neurotoxicity research** v.33,2. p.448-460. 2017.

STAHL, S.M. Basic psychopharmacology of antidepressants, Part 1: Antidepressants have seven distinct mechanisms of action. **The Journal of Clinical Psychiatry**. v.4, p.5-14, 1998.

STOCKMEIER A., RAJKOWSKA G. Cellular abnormalities in depression: evidence from postmortem brain tissue. **Dialogues Clin Neurosci**. V. 6(2), p. 185–197. 2004.

SUZUKI, M.T.; TAYLOR, L.T. & DELONG, E.F. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 50S-nuclease assays. **Appl Environ Microbiol**. v. 11, p. 4605–4614, 2000.

TOLENTINO & SCHMIDT. DSM-5 Criteria and Depression Severity: Implications for Clinical Practice. **Front Psychiatry**. v.9(450), P 1-9, 2018.

VAAHTOVUO J.; TOIVANEN P.; EEROLA E. Bacterial composition of murine fecal microflora is indigenous and genetically guided. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 44(1), p.131–136, 2003.

VALKO, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol**. V.39, p.44–84. 2007.

VETULANI J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. **Pharmacological Reports** , v.65, p.1451-1461; 2013.

WALZ R, et al. Activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats. **Eur J Neurosci**. V.12(6), p.2185-9, 2009.

WANG, Y.; KASPER, L.H. The role of microbiome in central nervous system disorders. **Brain Behav Immun**. v. 38, p. 1–12, 2014.

WANG, et. al. Maternal separation produces alterations of forebrain brain-derived neurotrophic factor expression in differently aged rats. **Front Mol Neurosci**. v.8(49). p.1-8.2015.

WHITEFORD H.A. et al. Carga global da doença atribuível a transtornos mentais e de uso de substâncias: resultados do estudo Global Burden of Disease 2010. **Lanceta**. v.382 (9904), p. 1575-86, 2013.

WILLEM M DE VOS, ELISABETH AJ DE VOS; Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation, **Nutrition Reviews** , V.70. P. S45 – S56. 2012.

WITTKOPF N, NEURATH M, BECKER C. Immune-epithelial crosstalk at the intestinal surface. **J. Gastroenterol.** v.49 p.375–387. 2014.

WOOF J.M., KERR M.A. The function of immunoglobulin A in immunity. **J Pathol.** V.208(2), p.270-82. 2006.

WRAY, N.R.; et al. Genome-wide association study of major depressive disorder: new results, meta-analysis, and lessons learned. **Molecular Psychiatry.** v.17, p.36–48, 2012.

YEH et al. Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes. **biochemical pharmacology.** v.74. p.969–980. 2007.

YELNIK J. Modeling the organization of the basal ganglia Une modélisation de l'organisation des ganglions de la base *revue neurologique.*v.164. p. 969–976. 2008.

YI C, ZHANG Z, WANG W, ZUG C, SCHLUESENER HJ. Doxycycline attenuates peripheral inflammation in rat experimental autoimmune neuritis. **Neurochemical Research.** V.36, p.1984-90, 2011.

YRJÄNHEIKKI, J.; KEINÄNEN, R.; PELLIKKA, M.; HÖKFELT, T.; KOISTINAHO, J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 26, p. 15769-15774, 1998.

ZANI et.al A spectrum of intestinal injury models in neonatal mice. **Pediatr Surg Int**, v. 32(1). p. 65–70.2016.

ANEXO

ANEXO A- Quadros esquemáticos dos efeitos dos testes neuroquímicos e bioquímicos.

Quadro 1 - Representação esquemática dos efeitos da separação materna sobre os testes neuroquímicos.

Áreas Testes	CPF		HP		CE	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
MPO	↔	↔	↔	↔	↔	↑
GSH	↓	↓	↓	↓	↓	↓
TBARS	↔	↑	↔	↔	↔	↑
NITRITO	↔	↔	↔	↔	↔	↔
BDNF			↔	↑		
IL-6			↔	↑		

Fonte: Elaborado pelo autor. Diminuição (↓); aumento (↑); ausência de efeitos estatisticamente significantes (↔).

Quadro 2 - Representação esquemática dos efeitos dos tratamentos com escitalopram e doxíciclina sobre os testes neuroquímicos.

Testes	Áreas	CPF		HP		CE	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
MPO	SM	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔
	NSM	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔
GSH	SM	↑↑	↑↑	↑↑	↔↔↑	↔↔↑	↑↑
	NSM	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔	↓↔↔	↔↔↓	↔↔↔
TBARS	SM	↔↔↔	↓↓	↑↔↔	↔↔↔	↑↔↔	↓↓
	NSM	↔↔↔	↔↔↔	↑↔↔	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔
NITRITO	SM	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↓	↔↔↔	↔↔↔
	NSM	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔	↔↔↔
BDNF	SM			↑↑	↔↔↔		
	NSM			↔↔↔	↔↔↔		
IL-6	SM			↔↔↓	↔↔↔		
	NSM			↔↔↔	↔↔↑		

Fonte: Elaborado pelo autor. Separados maternalmente (SM); não separados maternalmente (NSM); diminuição (↓); aumento (↑); ausência de efeitos estatisticamente significantes (↔). Cor azul resposta ao tratamento com escitalopram; Cor vermelha resposta ao tratamento com doxíciclina.

Quadro 3 - Representação esquemática dos efeitos da separação materna sobre os testes bioquímicos nas áreas intestinais.

Áreas	Duodeno		Jejuno		Íleo	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
MPO	↑	↑	↑	↑	↑	↑
GSH	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Fonte: Elaborado pelo autor. Diminuição (↓); aumento (↑); ausência de efeitos estatisticamente significantes (↔).

Quadro 4 - Representação esquemática dos efeitos dos tratamentos com escitalopram e doxíciclina sobre os testes bioquímicos nas áreas intestinais.

Testes	Áreas	Duodeno		Jejuno		Íleo	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
MPO	SM	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
	NSM	↔↔	↔↔	↔↔	↔↔	↔↔	↔↔
GSH	SM	↔↔	↔↔	↔↔	↑↔	↔↔	↔↔
	NSM	↔↔	↔↔	↔↔	↔↔	↔↔	↔↔

Fonte: Elaborado pelo autor. Separados matematicamente (SM); não separados matematicamente (NSM); diminuição (↓); aumento (↑); ausência de efeitos estatisticamente significantes (↔). Cor azul resposta ao tratamento com escitalopram; Cor vermelha resposta ao tratamento com doxíciclina.

ANEXO B – Aprovação da pesquisa pela comissão de ética no uso de animais da universidade federal do ceará (ceua-ufc)



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-270 Fone: 33668331 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “ESTUDO DE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES NA MICROBIOTA INTESTINAL DESENCADEADAS POR MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO E PELO TRATAMENTO ANTIDEPRESSIVO.”, protocolo nº84/2017, sob responsabilidade da Profa. Dra. Danielle Macedo Gaspar, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 21 de setembro de 2017.

Vigência do projeto	01/10/2017 a 30/11/2019
Espécie/Linhagem	Ratos heterogênico wistar
Nº de Animais	304
Peso/Idade	200- 300g
Sexo	152 - Machos e 152 - Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 22 de setembro de 2016.

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

ALEXANDRE HAVT BINDÁ

COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1666982