

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE SERTRALINA
ASSOCIADA OU NÃO A PROBIÓTICO EM RATAS NA
PERIESTROPAUSA: UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA**

ISABELLA CENA GUIMARÃES

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE SERTRALINA
ASSOCIADA OU NÃO A PROBIÓTICO EM RATAS NA
PERIESTROPAUSA: UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA**

ISABELLA CENA GUIMARÃES

Orientador: **Prof.^a Dr.^a Wilma De Grava Kempinas**

Coorientadora: **Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Quiarato Lozano**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Guimarães, Isabella Cena.

Avaliação da administração de sertralina associada ou não a probiótico em ratas na periostropausa : uma nova abordagem terapêutica / Isabella Cena Guimarães. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas Bacharelado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wilma De Grava Kempinas

Coorientador: Ana Flávia Quiarato Lozano

Capes: 20100000

1. Depressão. 2. Perimenopausa. 3. Probióticos.
4. Sertralina. 5. Tratamento.

Palavras-chave: Depressão; Perimenopausa; Probiótico; Sertralina; Terapia.

SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Metodologia	11
Animais e tratamentos	11
Determinação do ciclo estral	12
Coleta de órgãos e processamento histológico	12
Adrenal	12
Útero e Ovários	12
Análise Morfométrica das Adrenais	12
Testes Neurocomportamentais	13
Teste Labirinto em Cruz Elevado	13
Teste de Memória (Labirinto de Barnes)	13
Análise dos Resultados	13
Resultados	14
Evolução do peso corporal	14
Consumo de ração	14
Peso dos órgãos	15
Teste de Memória	15
Labirinto em Cruz Elevado	16
Morfometria das camadas Uterinas	16
Morfometria da Glândula Adrenal	17
Histologia dos Ovários, útero e adrenal	18
Discussão	21
Conclusão	22
Referências	23

RESUMO

A perimenopausa é uma fase de vida da mulher que ocorre nos anos finais do ciclo reprodutivo, iniciando com o primeiro aparecimento de irregularidade menstrual e terminando após 1 ano de amenorreia. As alterações fisiológicas desencadeadas durante este período predisõem a inúmeros eventos que prejudicam a saúde física e mental, tais como o desenvolvimento de depressão, sensações de “ondas de calor”, disfunções sexuais, declínios cognitivos e alterações ósseas. O tratamento utilizado durante a perimenopausa geralmente incluem antidepressivos e hormônios esteroides. A sertralina é um antidepressivo comumente recomendado a mulheres, no entanto alguns efeitos colaterais como alterações na tireoide, perda de peso e sangramento vaginal podem ocorrer. Nos últimos anos, estudos tem demonstrado o benefício que probióticos promovem à saúde humana, incluindo efeitos sobre a saúde mental e reprodutiva. Perante o exposto, o presente estudo tem como objetivo investigar efeitos reprodutivos e neurocomportamentais da exposição à sertralina e/ou probiótico em ratas na periostropausa (terminologia empregada para roedores). Para tanto, foram utilizadas 50 ratas Wistar que com 28 dias de idade receberam diariamente uma injeção subcutânea de óleo de milho ou diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) (na dose de 160 mg/Kg diluído em óleo) por 15 dias consecutivos para indução da periostropausa. Após 80 dias do início do tratamento com VCD ou óleo, as ratas foram distribuídas em 5 grupos experimentais (n=4-12/grupo) (1) Controle negativo (CO-) que recebeu óleo de milho por via subcutânea e recebeu por via oral gavagem água filtrada; os demais grupos que receberam VCD via subcutânea foram subdivididos em: (2) Controle positivo (CO) recebeu água filtrada via gavagem, (3) Sertralina (S) recebeu 20 mg/Kg de sertralina por via gavagem, (4) Probiótico (P) recebeu o *Lactobacillus rhamnosus* (10^9 CFU/100g de peso corporal) por via gavagem; (5) Probiótico e Sertralina (PS). Após 30 dias de tratamento, as ratas foram analisadas quanto ao seu neurocomportamento (labirinto em cruz elevado e memória). Com a finalização dos testes os animais foram eutanasiados para coleta de material biológico e foi realizada a análise histológica do ovário, útero e adrenal. A comparação estatística dos resultados foi realizada pelo teste ANOVA two-way (seguido de Tukey) ou Kruskal-Wallis (seguido de Dunn) ($p \leq 0,05$). Os resultados demonstraram que os animais do grupo S apresentaram hipofagia no início do tratamento comparado com os grupos CO e P, entretanto o grupo PS aumentou significativamente o consumo de ração entre os dia 20 e 30 comparado com os demais grupos. Também foram observadas alterações significativas nos testes neurocomportamentais de memória e labirinto em cruz elevado, onde no primeiro o grupo S apresentou uma maior latência para encontrar o esconderijo correto comparado com o grupo P, indicando déficit de memória. No segundo, o grupo que recebeu probiótico apresentou aumento no número de entradas no braço fechado comparado com o grupo CO, revelando perfil menos ansioso. As análises histomorfométricas não revelaram diferenças significativas entre os

grupos nos órgãos estudados. Nessas condições experimentais conclui-se que a sertralina não provocou danos ao sistema reprodutor e nas adrenais de ratas na periostropausa. Os resultados das avaliações neurocomportamentais, bem como do consumo de alimento demonstraram efeito adjuvante do probiótico, melhorando a ingestão de ração, a memória e diminuindo o perfil ansioso nas ratas que receberam sertralina. Embora este seja um estudo translacional preliminar já há indícios de que os probióticos possam ser utilizados como terapia alternativa para atenuar os efeitos colaterais do uso de sertralina por mulheres na perimenopausa.

Palavras-chave: Perimenopausa, depressão, sertralina, probiótico

ABSTRACT

Perimenopause is a phase of a woman's life that occurs in the final years of the reproductive cycle, starting with the first appearance of menstrual irregularity and ending after 1 year of amenorrhea. The physiological changes triggered during this period predispose to numerous events that harm physical and mental health, such as the development of depression, sensations of “hot flashes”, sexual dysfunctions, cognitive declines and bone changes. Treatment used during perimenopause generally includes antidepressants and steroid hormones. Sertraline is an antidepressant commonly recommended for women, however some side effects such as thyroid changes, weight loss and vaginal bleeding may occur. In recent years, studies have demonstrated the benefits that probiotics provide to human health, including effects on mental and reproductive health. In view of the above, the present study aims to investigate the reproductive and neurobehavioral effects of exposure to sertraline and/or probiotics in rats in periostropause (terminology used for rodents). To this end, 50 Wistar rats were used, at 28 days of age, receiving a daily subcutaneous injection of corn oil or 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) (at a dose of 160 mg/kg diluted in oil) for 15 consecutive days for induction. of the periostropause. After 80 days of starting treatment with VCD or oil, the rats were distributed into 5 experimental groups (n=4-12/group) (1) Negative control (CO-) that received corn oil subcutaneously and received intravenously oral gavage filtered water; the other groups that received VCD subcutaneously were subdivided into: (2) Positive control (CO) received filtered water via gavage, (3) Sertraline (S) received 20 mg/Kg of sertraline via gavage, (4) Probiotic (P) received *Lactobacillus rhamnosus* (109 CFU/100g body weight) via gavage; (5) Probiotic and Sertraline (PS). After 30 days of treatment, the rats were analyzed for their neurobehavior (elevated plus maze and memory). Upon completion of the tests, the animals were euthanized to collect biological material and histological analysis of the ovary, uterus and adrenal gland was carried out. Statistical comparison of results was performed using the two-way ANOVA test (followed by Tukey) or Kruskal-Wallis (followed by Dunn) ($p < 0.05$). The results demonstrated that animals in group S presented hypophagia at the beginning of treatment compared to groups CO and P, however group PS significantly increased food consumption between days 20 and 30 compared to the other groups. Significant changes were also observed in the neurobehavioral memory and elevated plus maze tests, where in the first group S showed a longer latency to find the correct hiding place compared to group P, indicating a memory deficit. In the second, the group that received probiotics showed an increase in the number of entries into the closed arm compared to the CO group, revealing a less anxious profile. Histomorphometric analyzes revealed no significant differences between groups in the organs studied. Under these experimental conditions, it is concluded that sertraline did not cause damage to the reproductive system and adrenal glands of rats during periostropause. The results of neurobehavioral assessments,

as well as food consumption, demonstrated an adjuvant effect of the probiotic, improving food intake, memory and reducing the anxious profile in rats that received sertraline. Although this is a preliminary translational study, there is already evidence that probiotics can be used as an alternative therapy to mitigate the side effects of the use of sertraline by perimenopausal women.

Keywords: Perimenopause, depression, sertraline, probiotic

INTRODUÇÃO

A perimenopausa é um período da vida da mulher que ocorre nos anos finais da vida reprodutiva, iniciando com o primeiro aparecimento de irregularidade menstrual e terminando após 1 ano de amenorreia (SANTORO, 2016). Aproximadamente 1,2 bilhões de mulheres em todo o mundo estarão na menopausa ou pós-menopausa até o ano de 2030 e 85% apresentarão sinais “problemáticos” neste período (SANTORO et al., 2021). As alterações endócrinas, biológicas e clínicas durante a perimenopausa predispõe ao desenvolvimento de depressão, sensações de “ondas de calor”, suores noturnos, disfunções sexuais, declínios cognitivos, alterações ósseas, cardiovasculares e geniturinárias (SUSSMAN et al., 2015). Este processo fisiológico pode durar até 10 anos, durante os quais a qualidade de vida da paciente pode se deteriorar irremediavelmente. Tragicamente, o suicídio em mulheres de meia-idade está se tornando uma ocorrência comum (KULKARNI, 2018).

Existem inúmeros fatores que estão associados ao transtorno depressivo durante a perimenopausa, como características demográficas e sociais (estado civil, grau de escolaridade, condições financeiras), condições psicológicas (ansiedade e pessimismo) e hábitos de vida (sedentarismo, utilização de drogas lícitas e ilícitas) (BROMBERGER; EPPERSON, 2018). A aplicabilidade de roedores como modelo de estudo da senescência reprodutiva é amplamente utilizada por apresentarem ciclos ovulatórios e variações cíclicas hormonais (ciclo estral) similares ao da mulher (ciclo menstrual) (FERREIRA et al., 2015). A perimenopausa em roedores, é denominada de periropausa em decorrência do ciclo estral, e apresenta similaridades reprodutivas e psíquicas com a perimenopausa, no entanto o envelhecimento central e reprodutivo é assíncrono, sendo o contrário do observado em mulheres. Ou seja, a principal causa de perda da função ovariana em ratas idosas está na alteração da função hipotálamo-hipofisária (SANTOS, 2018). Um modelo experimental estabelecido na literatura capaz de eliminar a diferença assíncrona entre roedores e mulheres é a utilização do reagente químico diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) (KAPPELER; HOYER, 2012). O VCD é capaz de induzir a depleção dos folículos primordiais e primários e acelerar o processo de envelhecimento reprodutivo, de modo que o tratamento de ratas no início da vida com este composto pode induzir uma diminuição da função ovariana antes que as alterações centrais ocorram (KAPPELER; HOYER, 2012). Sendo assim, é o modelo experimental que mais se aproxima da progressão humana natural para a menopausa, imitando as alterações hormonais e comportamentais (como ansiedade, memória prejudicada, depressão e agressividade tipicamente manifestadas por mulheres na perimenopausa) (PESTANA-OLIVEIRA et al., 2021). Kalil et al. (2020) observaram que após 55-65 dias após a exposição ao VCD, houve falência ovariana em ratas além de comportamento do tipo depressivo. As concentrações de progesterona mostraram-se

diminuídas sem alterações significativas no FSH e LH (KALIL et al., 2020). Este perfil hormonal, semelhante ao ocorrido durante o período inicial e médio da perimenopausa/periostropausa, foi também observado em outros estudos que avaliaram as concentrações de hormônios gonadais e hipofisários após 80 dias do início do tratamento com VCD. Após 100 dias da primeira exposição, as concentrações de FSH tornam-se altas, correspondendo a perimenopausa/periostropausa no período tardio (CAROLINO et al., 2019; MAYER et al., 2002). O tratamento para a depressão na perimenopausa geralmente incluem antidepressivos e hormônios esteroides. Os antidepressivos indicados são os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), e como segunda opção utiliza-se os inibidores da recaptação da serotonina e noradrenalina. No entanto, ambas as classes podem ocasionar efeitos adversos graves (KULKARNI, 2018). A sertralina, um antidepressivo e ansiolítico, é um dos ISRS prescritos durante a perimenopausa. Estudos mostraram que o seu uso combinado com a terapia de reposição de estrogênio em mulheres idosas com depressão aumenta a resposta antidepressiva provocando uma melhora em termos de qualidade de vida (SCHNEIDER; SMALL; CLARY, 2001). Aedo et al. (2011) demonstraram que a sertralina também foi eficaz em amenizar queixas somáticas e psicológicas da síndrome do climatério. Embora apresente vantagens em relação a outros de sua classe, estudos anteriores apontam que a sertralina pode alterar o funcionamento da tireoide, diminuir peso corporal e provocar sangramento vaginal (LOZANO et al., 2021; ESCUDERO et al., 2013). A terapia hormonal tem sido o principal tratamento para os sinais decorrentes da menopausa. No entanto, muitas mulheres não podem ou optam por não usarem esse tipo de terapia principalmente por predispor a graves riscos à saúde. Em decorrência, mais de 50% das mulheres usam medicamentos alternativos para alívio dos sintomas da menopausa (POSADZKI et al., 2013).

Nos últimos anos o uso de probióticos tem se expandido para além de distúrbios gastrointestinais, e incluídos no tratamento de hipertensão, dislipidemias e condições imunológicas. Um estudo inédito realizado por Szydłowska et al. (2021) demonstrou que mulheres na perimenopausa e pós-menopausa que administraram por 5 semanas suplementação com probióticos tiveram seus níveis de FSH modulados, demonstrando uma potencial estratégia não invasiva para auxiliar na homeostase hormonal. Estudos recentes indicam que os probióticos regulam diretamente o eixo microbiota-intestino-cérebro e podem influenciar sintomas ansiosos e depressivos (LIU; WALSH; SHEEHAN, 2019). Sabendo que a perimenopausa é um período em que a mulher apresenta alterações fisiológicas que podem impactar negativamente sua saúde física e mental, e muitas vezes as terapias convencionais com hormônios podem provocar efeitos colaterais graves, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a ação dos probióticos associados a sertralina sobre ratas na periostropausa.

METODOLOGIA

Animais e Tratamentos

Cinquenta ratas Wistar foram alojadas sob condições controladas (22°C, 30% de umidade do ar, ciclo claro/escuro 12/12h), com alimentação e água *ad libitum*. A partir de 28 dias de idade, os animais receberam diariamente uma injeção subcutânea de óleo ou VCD (na dose de 160 mg/Kg diluído em óleo) por 15 dias consecutivos (CAROLINO et al., 2019). Após 80 dias do início do tratamento com VCD ou óleo de milho, as ratas foram distribuídas em 5 grupos experimentais (n=4-12/grupo) (1) Controle negativo (CO-) que recebeu óleo por via subcutânea e recebeu por via oral gavagem água filtrada; os demais grupos que receberam VCD via subcutânea foram subdivididos em: (2) Controle positivo (CO) recebeu água filtrada via gavagem, (3) Sertralina (S) recebeu 20 mg/Kg de sertralina por via gavagem, (4) Probiótico (P) recebeu *Lactobacillus rhamnosus* (10⁹ CFU/100g de peso corporal) por via gavagem; (5) Probiótico e Sertralina (PS). O tratamento ocorreu durante 30 dias e após este período, as ratas foram analisadas quanto ao seu neurocomportamento (labirinto em cruz elevado e teste de memória). Após estes testes, os animais foram eutanasiados no diestro por inalação de CO² seguida de decapitação para coleta do material biológico e pesagem de órgãos. Foi analisado a histologia dos ovários, útero e adrenais (Figura 1). Todos os procedimentos experimentais neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais Experimentais (CEUA: 9765030622)

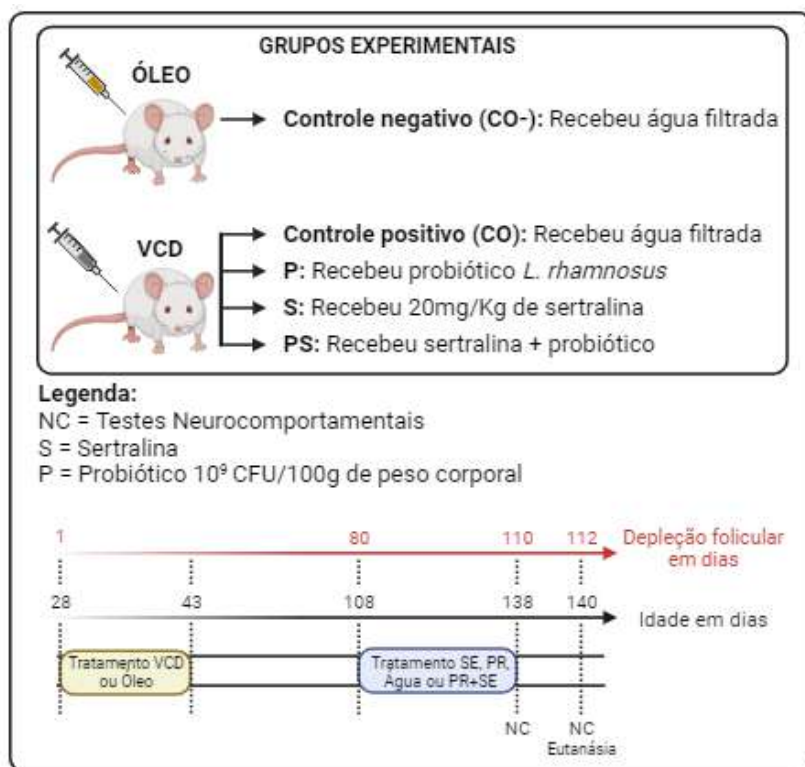


Figura 1. Desenho experimental.

Determinação do Ciclo Estral

Com a rata contida pelo dorso, expondo a vagina a ponta de uma pipeta plástica, medindo menos de 2mm de diâmetro, cheia com 100µL de água destilada foi introduzida no canal suavemente e o bulbo da pipeta foi levemente pressionado 2 ou 3 vezes coletando o fluido vaginal. O material foi inserido em lâminas de vidro e o ciclo estral determinado com base nas características citológicas, sendo que o diestro caracterizou-se pela presença majoritária de leucócitos (BECEGATO et al., 2021).

Foi coletada uma única gora por animal com ponteira diferente para cada rata e o fluido vaginal não corado passou por observação em microscópio de luz, sem uso de lente condensadora, com lentes objetivas de 10 e 40x (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Coleta de órgãos e processamento histológico

Adrenal

Para avaliação histológica, as adrenais foram fixadas em solução de Bouin, desidratadas em etanol, incluídas em Paraplast® e seccionadas em 5 µm (três cortes por animal, cada corte será coletado a uma distância de mais 10 cortes), e coradas com hematoxilina e eosina (SOUZA et al., 2001).

Útero e Ovários

Conforme metodologia descrita por Barros et al. (2020) foram coletados o ovário e corno uterino esquerdo na porção mediana, durante a fase diestral da rata, os órgãos foram imersos em solução fixadora de Bouin para que pudessem ser processados histologicamente e finalmente incluídos em parafina Paraplast®. Após a inclusão do material biológico, foram realizadas três secções de cada órgão submetidas à cortes de 5 µm de espessura, com distância de 50 µm, em lâminas silanizadas e coradas com hematoxilina e eosina (H & E).

As análises uterinas foram realizadas com o auxílio de um microscópio de luz com os pacotes de software Leica QWin 3 e ImageJ 1.48, medindo a altura do perimétrio, miométrio e endométrio em 3 secções por animal (E SILVA et al., 2016). No total foram analisadas 15 medidas por animal, resultado de 5 pontos em cada uma das secções nas diferentes regiões.

Análise Morfométrica das Adrenais

As lâminas das adrenais foram analisadas em microscópio óptico, em corte transversal, em sua porção cortical e fotografadas em aumento de 4x. Suas zonas glomerulosa, fasciculada e

reticulada foram medidas em sua espessura, em 10 pontos distribuídos aleatoriamente em cada uma delas, em 5 campos diferentes para cada animal (ROSA, 2013).

Testes Neurocomportamentais

Teste do labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado foi realizado utilizando-se um aparato composto por dois braços abertos e dois fechados de igual comprimento e largura (50 × 10 cm). Cada rata foi colocada no centro do labirinto em cruz elevado de frente para um dos braços fechados. Os seguintes parâmetros foram observados por 5 min: Número de entradas e tempo gasto (segundos) nos braços aberto e fechado; número de espreitas, levantamentos, e mergulho de cabeça (TERÇARIOL; GODINHO, 2011).

Teste de Memória (Labirinto de Barnes)

O labirinto de Barnes é um teste utilizado para avaliar a memória em roedores (BARNES, 1979). O teste consistiu em uma plataforma circular de 120 cm de diâmetro, 90 cm acima do solo, com 18 aberturas de 9 cm de diâmetro espaçadas equidistantemente ao longo do perímetro do dispositivo. Uma das aberturas se conecta a um compartimento esconderijo localizado abaixo da plataforma. O dispositivo é branco e está localizado em uma sala com paredes brancas, sendo que 3 delas possuem formas geométricas fixadas nas paredes para servir de referência visual para que os roedores localizem o compartimentos esconderijo.

O experimento consistiu em colocar o animal no centro do equipamento sob uma caixa plástica preta (17 x 13 x 11 cm) por 30 segundos. Passado o tempo, a caixa plástica foi retirada e o animal foi observado por 5 minutos, tempo durante o qual o animal deveria encontrar o compartimento esconderijo. Caso o animal não entrasse no compartimento esconderijo dentro do prazo de 5 minutos, era gentilmente guiado até o mesmo onde permanecia por pelo menos 30 segundos antes de retornar à sua gaiola. As ratas foram submetidas a quatro dias de treinamento e um dia de testes (quinto dia), passando pelo aparelho pela manhã e à tarde.

Os parâmetros avaliados foram a latência para entrar no compartimento esconderijo (em segundos) e o número de erros, ou seja, o número de aberturas que a rata cheirou antes de encontrar o local correto para se esconder (BARNES, 1979; MAGALHÃES; SPINOSA, 2016).

Análise dos Resultados

Para comparação dos resultados entre os grupos experimentais, foi utilizado teste paramétrico ANOVA two-way, seguido do teste de Tukey ou, teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido

de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism (versão 8).

RESULTADOS

Evolução do peso corporal

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o peso corporal dos grupos experimentais ao longo dos trinta dias de tratamento (Figura 2). Também não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CO e CO- (dados não apresentados).

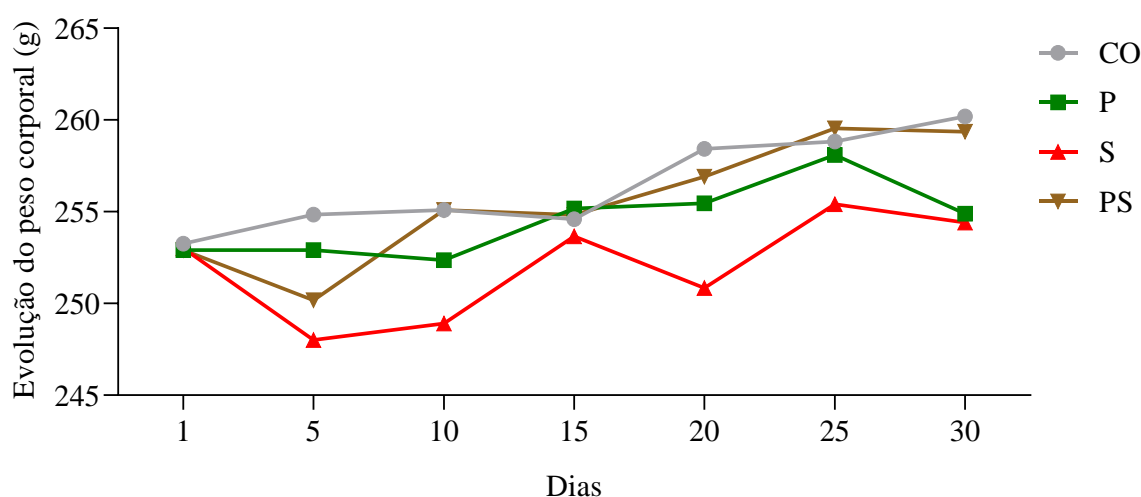


Figura 2.

Evolução do peso corporal (n=10-12/grupo). Valores expressos como média. Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (comparação entre grupos CO, P, S e PS) ($p > 0,05$). Teste t-Student (comparação entre os grupos CO e CO-) ($p > 0,05$) dados não apresentados.

Consumo de ração

No início do tratamento (dia 1 ao 5) foi observado um menor consumo de ração no grupo S comparado com CO e P ($p \leq 0,05$). O aumento no consumo de ração pelo grupo PS comparado com P e S ocorreu de forma estatisticamente significativa entre os dias 15 ao 20. Do dia 25 ao 30 o grupo PS apresentou aumento no consumo de ração comparado com todos os grupos experimentais (CO, P e S).

Não houve diferenças estatísticas entre o consumo de ração do grupo CO- e CO. (Tabela 1).

Tabela 1. Consumo de ração

Dias	CO- (N=10)	CO (n=10)	P (n=9)	S (n=12)	PS (n=11)
1 - 5	84,1 ± 3,6	84,0 ± 2,1 ^a	82,4 ± 3,9 ^a	64,1 ± 3,2 ^b	78,2 ± 5,4 ^{ab}
5 - 10	86,3 ± 1,4	83,5 ± 1,0	81,7 ± 0,5	78,8 ± 5,2	80,5 ± 1,7
10 - 15	80,3 ± 1,6	77,4 ± 3,2	82,0 ± 4,3	85,3 ± 2,3	86,0 ± 1,6
15 - 20	86,0 ± 1,4	87,3 ± 2,1 ^{ab}	82,7 ± 3,7 ^a	79,6 ± 1,5 ^a	93,0 ± 2,4 ^b
20 - 25	88,2 ± 1,5	85,9 ± 1,3	85,2 ± 3,0	84,6 ± 1,0	87,2 ± 2,7
25 - 30	82,7 ± 1,8	79,9 ± 1,4 ^a	73,1 ± 3,3 ^a	82,1 ± 1,5 ^a	90,7 ± 2,6 ^b

Tabela 1. Consumo de ração (n=10-12/grupo). Valores expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (comparação entre grupos CO, P, S e PS) (*p ≤ 0,05. Teste t-Student (comparação entre os grupos CO e CO-) dados não apresentados.

Peso de órgãos

O peso de órgãos não foi estatisticamente diferente entre os grupos experimentais. (Tabela 2).

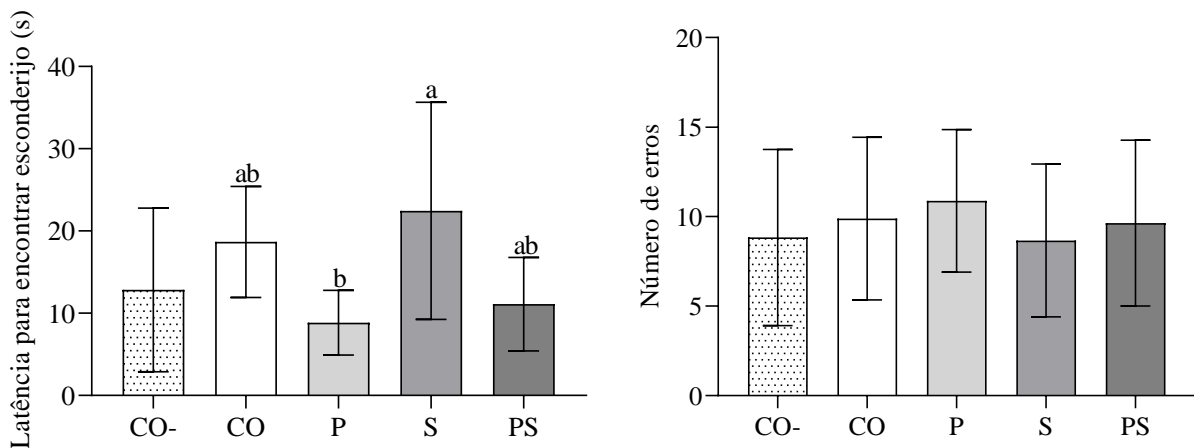
Tabela 2. Peso de Órgãos

Órgãos	CO- (n=9)	CO (n=11)	P (n=10)	S (n=12)	PS (n=11)
Útero (mg)	450,3 ± 34,3	358,9 ± 22,7	357,5 ± 31,4	378,8 ± 19,9	354,2 ± 13,4
Ovários (mg)	72,1 ± 3,1	64,5 ± 2,4	56,9 ± 1,8	60,5 ± 1,7	64,7 ± 4,4
Fígado (g)	8,9 ± 0,2	9,6 ± 0,2	8,7 ± 0,2	8,8 ± 0,1	9,1 ± 0,2
Rins (g)	1,9 ± 0,4	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1
Cérebro (g)	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1
Adrenais (mg)	88,3 ± 3,5	86,1 ± 4,4	82,8 ± 3,2	93,1 ± 2,3	83,8 ± 1,9
Tireóides (mg)	7,5 ± 0,6	7,9 ± 1,0	8,6 ± 0,6	8,9 ± 0,7	8,5 ± 0,9
Hipófise (mg)	13,3 ± 0,6	12,2 ± 0,6	12,7 ± 0,7	11,4 ± 0,9	12,0 ± 0,4

Tabela 2. Representação do peso dos órgãos nos diferentes grupos (n=9-12/grupo). Valores expressos como média ± EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (comparação entre grupos CO, P, S e PS) (p > 0,05). Teste t-Student (comparação entre os grupos CO e CO-) (p > 0,05).

Teste de Memória

O grupo S apresentou uma maior latência para encontrar o esconderijo correto comparado com o grupo P (p ≤ 0,05). O número de erros foi semelhante entre os grupos experimentais (p > 0,05). Estatisticamente não foram observadas diferenças entre os grupos CO e CO-. (Figura 3).



Figura

3. Teste de memória (n=6-12/grupo). Valores expressos como média \pm EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (comparação entre grupos CO, P, S e PS) (Diferentes letras $p \leq 0,05$). Teste t-Student (comparação entre os grupos CO e CO-) ($p > 0,05$).

Labirinto em Cruz Elevado

O teste do labirinto em cruz elevado demonstrou que o grupo P apresentou diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo CO, houve aumento no número de entradas no braço fechado do primeiro sob segundo. Também houve alterações estatisticamente significativas entre os grupos CO- e CO, onde o controle positivo apresentou diminuição no número de entradas no braço fechado comparado com o controle negativo. (Tabela 3).

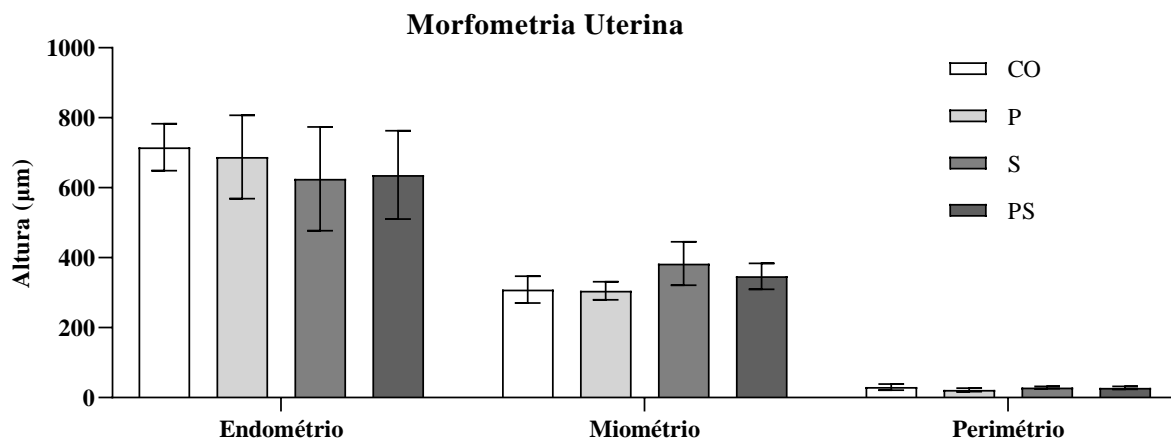
Tabela 3. Labirinto em Cruz Elevado

Parâmetros	CO- (n=6)	CO (n=9)	P (n=8)	S (n=12)	PS (n=11)
Tempo no BA (s)	45,1 \pm 9,5	41,3 \pm 7,0	42,7 \pm 9,5	26,2 \pm 8,0	38,5 \pm 9,3
Nº de entradas no BA	4,4 \pm 0,7	2,4 \pm 0,2	4,4 \pm 0,9	3,3 \pm 0,5	3,3 \pm 0,4
Nº de entradas no BF	9,5 \pm 1,5	4,0 \pm 0,8a*	7,6 \pm 1,2b	5,0 \pm 1,0ab	6,0 \pm 0,9ab
Nº de levantamentos	15,6 \pm 2,3	15,1 \pm 2,1	12,9 \pm 2,0	11,5 \pm 0,8	12,1 \pm 2,1
Nº de espreitas	8,8 \pm 1,0	5,8 \pm 1,0	9,0 \pm 1,3	6,1 \pm 0,8	8,8 \pm 1,8
Nº de mergulhos	8,5 \pm 1,5	7,1 \pm 1,0	5,3 \pm 0,9	7,1 \pm 1,8	6,8 \pm 1,2

Tabela 3. Labirinto em Cruz Elevado (n=6-12/grupo). Valores expressos como média \pm EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (comparação entre grupos CO, P, S e PS) (Diferentes letras $p \leq 0,05$). Teste t-Student (comparação entre os grupos CO e CO-) (* $p \leq 0,05$). BA= braço aberto; BF= braço fechado.

Morfometria das camadas uterinas

A análise morfométrica das camadas uterinas não demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Também não foram observadas diferenças entre os grupos CO e CO- (dados não apresentados) (Figura 4).



Figura

4. Medidas morfométricas das camadas uterinas (n=4-7/grupo). Valores expressos como média \pm EPM. Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (comparação entre grupos CO, P, S e PS). Teste t-Student (comparação entre os grupos CO e CO- dados não apresentados) ($p > 0,05$).

Morfometria da Glândula Adrenal

A análise morfométrica da glândula adrenal não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CO- e CO. (Figura 5).

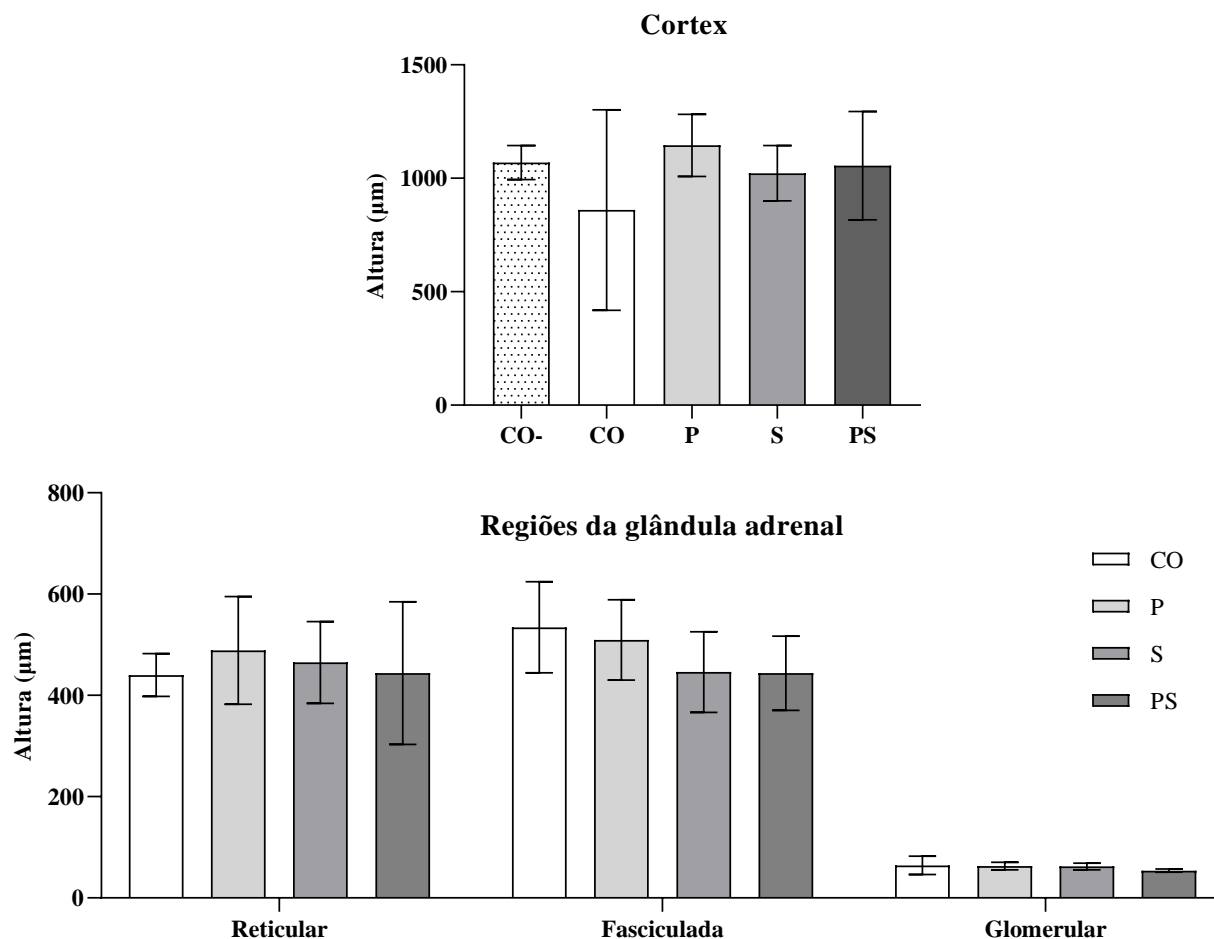


Figura 5. Medidas histomorfométricas das diferentes regiões da glândula adrenal (n=4-9/grupo). Valores expressos como

média ± EPM. Teste Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (comparação entre grupos CO, P, S e PS) ($p > 0,05$). Teste t-Student utilizado na análise entre os grupos CO e CO- ($p > 0,05$).

Histologia dos Ovários, útero e adrenal

A avaliação histológica nos tecidos ovariano (Figura 6), uterino (Figura 7) e da glândula adrenal (Figura 8) dos grupos CO-, CO, P, S e OS demonstrou ausência de alterações morfológicas pela exposição à sertralina, probióticos e suas combinações.

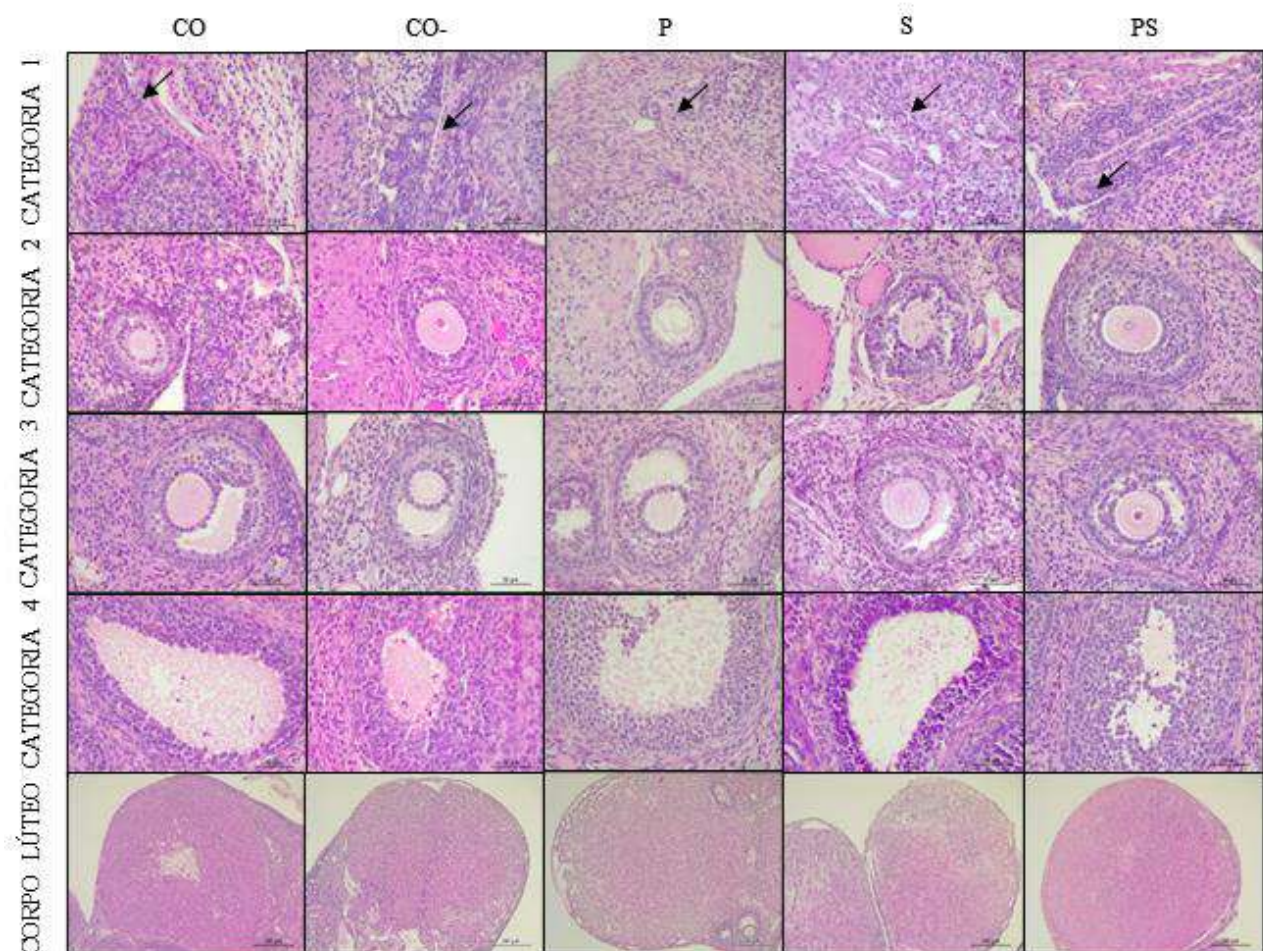


Figura 6. Fotomicrografias de folículos ovarianos. Categoria 1 – folículos primordiais e primários, indicados pela seta preta; Categoria 2 – Folículos pré-antrais; Categoria 3 – folículos antrais; Categoria 4 – Folículos atrésicos; Corpo lúteo.

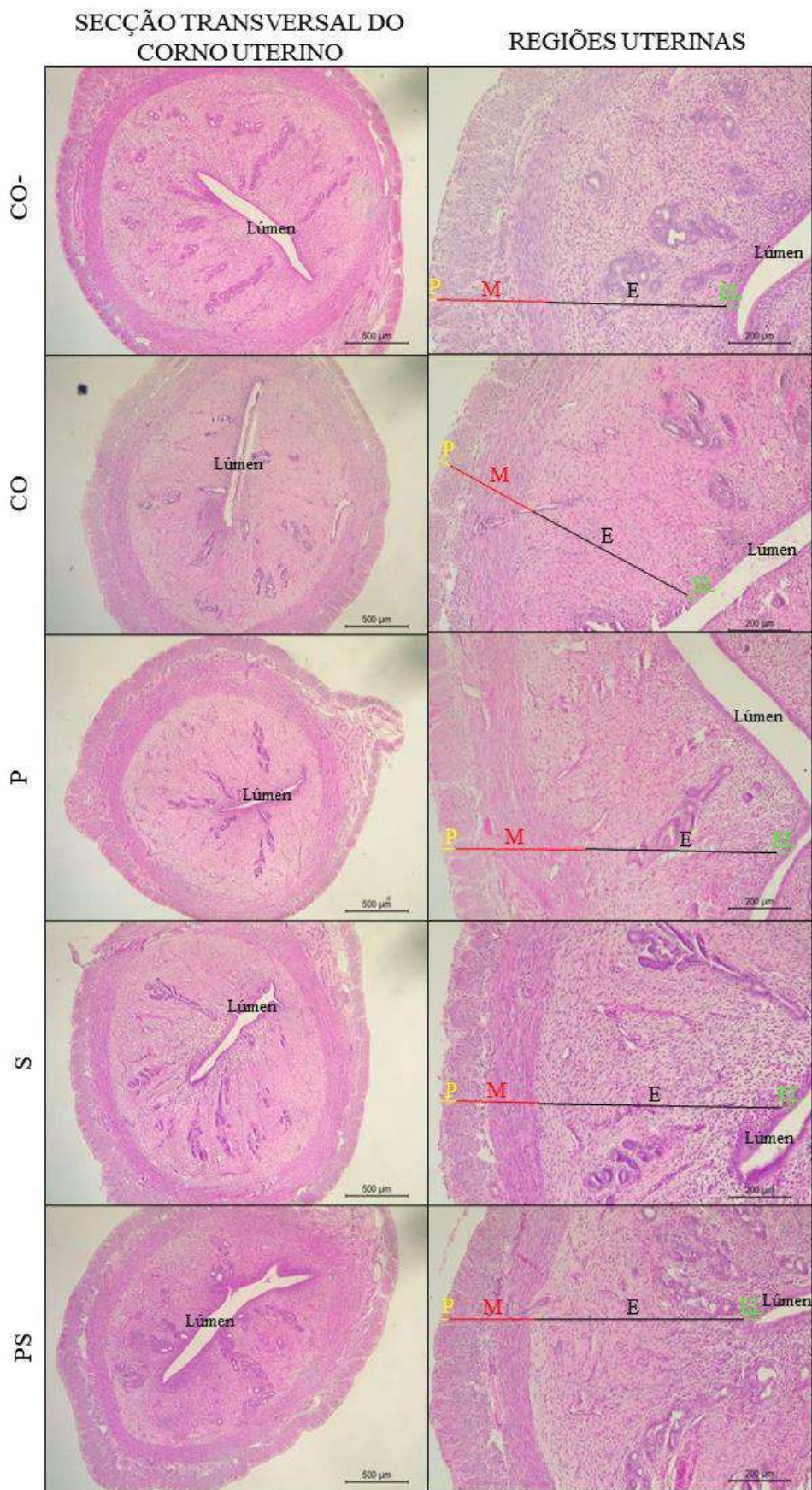


Figura 7. Fotomicrografias de secções do útero. Perimétrio (P - amarelo); Miométrio (M - vermelho); Endométrio (E - preto); Epitélio Luminal (EL - verde).

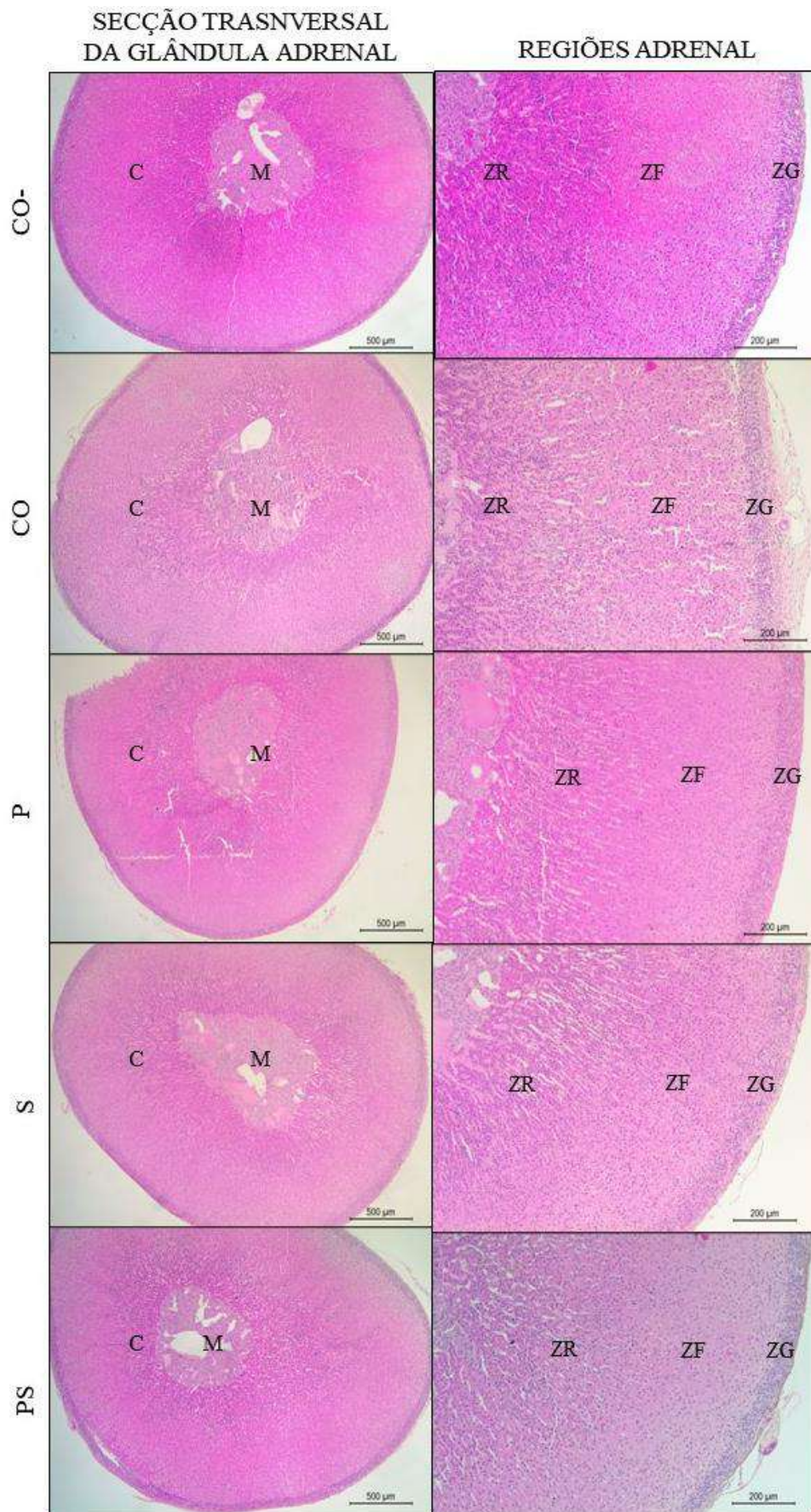


Figura 8. Fotomicrografias de secções da Glândula Adrenal indicando: Córtex (C) e Medula (M); Regiões (ZG) Zona Glomerulosa, (ZF) Zona Fasciculada e (ZR) Zona Reticular.

DISCUSSÃO

Devido às graves alterações metabólicas provocadas pela depressão, o consumo de antidepressivos tem aumentado nos últimos anos, tanto que na América tem sido a terceira medicação mais prescrita, principalmente para mulher (PRATT; BRODY, 2014).

Buscando a melhora dos sintomas depressivos, são utilizados com frequência os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs), a sertralina (S), um dos três ISRSs comumente prescritos, é utilizada no tratamento da doença obsessivo-compulsiva, ansiedade e depressão. Porém, apesar das vantagens alguns estudos comprovam que a sertralina pode causar diminuição no peso corporal e provocar sangramentos (ESCUADERO et al., 2013; LOZANO et al., 2021).

No presente estudo, os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas no peso corporal dos grupos experimentais ao longo do tratamento, assim também ocorreu quando foram comparados os grupos CO- e CO. Embora, os dados sobre peso corporal tenham demonstrado resultados inalterados, observou-se um menor consumo de ração no grupo S comparado com CO e P no início do tratamento, especificamente entre os dias 1 e 5.

Alguns estudos elucidam a participação dos neurônios serotoninérgicos na regulação do consumo alimentar em animais (NIELSEN et al., 1992). A sertralina, por ser um inibidor seletivo da recaptação da serotonina, causa diminuição no apetite por conta de manter o neurotransmissor por um maior período de tempo na fenda sináptica. O estudo realizado por Nielsen et.al (1992) comprovou que o tratamento agudo com ISRS em questão, produziu uma diminuição do comportamento alimentar em ratos e camundongos, isso por conta de que a hipofagia é observada após o aumento da neurotransmissão de serotonina (5-HT) pela administração da mesma e seus precursores, agonistas dos receptores, um liberador de serotonina ou um inibidor do metabolismo de 5-HT (a sertralina por exemplo). Em contrapartida, observou-se o aumento no consumo de ração pelo grupo PS de forma significativa entre os dias 20 e 30 de tratamento, comparado com os demais grupos experimentais, podendo evidenciar atenuação do efeito de hipofagia em animais que receberam a combinação entre sertralina e probiótico.

Os probióticos vem ganhando a atenção da comunidade científica na área da saúde, pesquisas emergentes revelaram a relação entre a microbiota intestinal e quadros depressivos (DINAN; CRYAN, 2013). Como relatado no trabalho de Liu et al. (2019), tem sido comprovado que os probióticos, além de agir na fisiologia gastrointestinal, possui a capacidade de regular diretamente o eixo microbiota-intestino-cérebro, podendo influenciar nos sintomas ansiosos e depressivos de forma positiva.

Um trabalho recentemente publicado por Anagha et al. (2021), onde participaram 100 pacientes fazendo uso de 3 tipos ISRSs, sendo que 53% faziam uso de sertralina, demonstrou frequência de alguns efeitos colaterais, entre eles sonolência (59%), comprometimento da memória (51%), diminuição da concentração (50%), bocejos (47%), fadiga (45%), boca seca (45%), tontura (43%) e sudorese (38%).

Com base em estudos anteriores com a utilização da sertralina e sabendo que o medicamento pode causar comprometimento da memória, mesmo que os resultados obtidos em relação a este teste tenham demonstrado número de erros semelhante entre os grupos experimentais, o grupo S apresentou maior latência para encontrar o esconderijo correto comparado com o grupo P, mais uma vez trazendo indicativos de que a utilização do probiótico pode atenuar efeitos colaterais da utilização da sertralina.

De acordo com Moysés (2010), um comportamento que indica maior ansiedade, está no animal retirar-se do segmento do braço fechado, colocando a cabeça e as patas dianteiras na plataforma central ou na entrada do braço aberto, geralmente acompanhado de extensão do corpo, porém, o teste do labirinto em cruz elevado, realizado neste estudo, demonstrou que o grupo P apresentou aumento no número de entradas no braço fechado comparado com o grupo CO, e a mesma alteração foi observada entre os grupos CO- e CO, onde o primeiro também demonstrou aumento no número de entradas no braço fechado, comportamento interpretado como um indicativo de menor perfil ansioso no grupo que recebeu probiótico comparado com o controle.

As análises morfométricas e histológicas relacionadas às glândulas adrenais realizadas neste experimento, não demonstraram diferenças entre os grupos experimentais, incluindo entre os grupos CO- e CO, indicando que nessas condições experimentais a sertralina utilizada na dosagem de 20 mg/Kg não causa efeitos colaterais expressivos.

CONCLUSÃO

Nessas condições experimentais conclui-se que a sertralina não provocou danos ao sistema reprodutor e nas adrenais de ratas na periostropausa. Os resultados das avaliações neurocomportamentais, bem como do consumo de alimento demonstraram efeito adjuvante do probiótico, melhorando a ingestão de ração, a memória e diminuindo o perfil ansioso nas ratas que receberam sertralina. Embora este seja um estudo translacional preliminar já há indícios de que os probióticos possam ser utilizados como terapia alternativa para atenuar os efeitos colaterais do uso de sertralina por mulheres na perimenopausa.

REFERÊNCIAS

- AEDO, S. *et al.* Sertraline improves the somatic and psychological symptoms of the climacteric syndrome. **Climacteric: The Journal of the International Menopause Society**, v. 14, n. 5, p. 590–595, out. 2011.
- ANAGHA, K.; SHIHABUDHEEN, P.; UVAIS, N. A. Side Effect Profiles of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: A Cross-Sectional Study in a Naturalistic Setting. **The primary care companion for CNS disorders**, v. 23, n. 4, p. 20m02747, 29 jul. 2021.
- BARNES, C. A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 93, n. 1, p. 74–104, fev. 1979.
- BARROS, J. W. F. *et al.* Short- and long-term effects on reproductive parameters of female Wistar rats after exposure to rosuvastatin starting in pre-puberty. **Current Research in Toxicology**, v. 1, p. 149–160, 27 nov. 2020.
- BECEGATO, M. *et al.* Impaired discriminative avoidance and increased plasma corticosterone levels induced by vaginal lavage procedure in rats. **Physiology & Behavior**, v. 232, p. 113343, 1 abr. 2021.
- BROMBERGER, J. T.; EPPERSON, C. N. Depression During and After the Perimenopause: Impact of Hormones, Genetics, and Environmental Determinants of Disease. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 663–678, dez. 2018.
- CAROLINO, R. O. G. *et al.* Endocrine profile of the VCD-induced perimenopausal model rat. **PLoS ONE**, v. 14, n. 12, p. e0226874, 30 dez. 2019.
- DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression? **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 9, p. 713–719, 2013.
- E SILVA, P. V. *et al.* Sexual differentiation and reproductive development of female rat offspring after paternal exposure to the anti-tumor pharmaceutical cisplatin. **Reproductive Toxicology**, v. 60, p. 112–122, 1 abr. 2016.
- ESCUADERO, G. E. *et al.* Sertraline and its iodine product: experimental and theoretical vibrational studies: potential in vitro anti-thyroid activity of sertraline and iodine product toxicity with respect to male Wistar rats. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 104, p. 271–279, mar. 2013.
- FERREIRA, L. B. *et al.* Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: Preliminary findings. **Experimental Gerontology**, v. 72, p. 157–161, 1 dez. 2015.
- KALIL, B. *et al.* MON-017 Effect of Estradiol Therapy on Depressive like Behavior in an Ovarian Intact Rat Model of Perimenopause. **Journal of the Endocrine Society**, v. 4, n. Suppl 1, p. MON-017, 8 maio 2020.
- KAPPELER, C. J.; HOYER, P. B. 4-Vinylcyclohexene Diepoxide: A Model Chemical for Ovotoxicity. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 58, n. 1, p. 57–62, fev. 2012.
- KULKARNI, J. Perimenopausal depression – an under-recognised entity. **Australian Prescriber**, v. 41, n. 6, p. 183–185, dez. 2018.

- LIU, R. T.; WALSH, R. F. L.; SHEEHAN, A. E. Prebiotics and probiotics for depression and anxiety: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 102, p. 13–23, jul. 2019.
- LOZANO, A. F. Q. et al. Exposure of pregnant rats to stress and/or sertraline: Side effects on maternal health and neurobehavioral development of male offspring. **Life Sciences**, v. 285, p. 119960, 15 nov. 2021a.
- LOZANO, A. F. Q. et al. Exposure of pregnant rats to stress and/or sertraline: Side effects on maternal health and neurobehavioral development of male offspring. **Life Sciences**, v. 285, p. 119960, 15 nov. 2021b.
- MAGALHÃES, J. Z.; SPINOSA, H. DE S. Exposição prolongada de ratos a vareniclina: avaliação comportamental, níveis de neurotransmissores cerebrais e estudo bioquímico e anatomopatológico. 2016.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 609–614, nov. 2002.
- MAYER, L. P. et al. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. **Reproductive Toxicology**, v. 16, n. 6, p. 775–781, 1 nov. 2002.
- MOYSÉS, F. DOS S. **Rato como modelo animal para avaliação da toxicidade induzida pela exposição crônica a efluentes de curtumes: parâmetros comportamentais e bioquímicos**. Dissertação de Mestrado—Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
- NIELSEN, J. A. et al. Sertraline, a serotonin-uptake inhibitor, reduces food intake and body weight in lean rats and genetically obese mice. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 55, n. 1 Suppl, p. 185S-189S, jan. 1992.
- OWUSU-AKYAW, A. et al. The role of mesenchymal–epithelial transition in endometrial function. **Human Reproduction Update**, v. 25, n. 1, p. 114–133, 1 jan. 2019.
- PESTANA-OLIVEIRA, N. et al. Development of a Chemical Reproductive Aging Model in Female Rats. **Bio-protocol**, v. 11, n. 8, p. e3994, 20 abr. 2021.
- POSADZKI, P. et al. Prevalence of complementary and alternative medicine (CAM) use by menopausal women: A systematic review of surveys. **Maturitas**, v. 75, n. 1, p. 34–43, 1 maio 2013.
- PRATT, L. A.; BRODY, D. J. Depression in the U.S. household population, 2009-2012. **NCHS data brief**, n. 172, p. 1–8, dez. 2014.
- ROSA, A. M. Efeito da dexametasona sobre a morfofisiologia testicular e cortical da adrenal em ratos wistar (*Rattus norvegicus*). 24 maio 2013.
- SANTORO, N. Perimenopause: From Research to Practice. **Journal of Women’s Health**, v. 25, n. 4, p. 332–339, 1 abr. 2016.
- SANTORO, N. et al. The Menopause Transition: Signs, Symptoms, and Management Options. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 106, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 2021.
- SANTOS, I. R. DOS. **Efeitos da terapia hormonal na resposta ao estresse em modelo animal de perimenopausa**. Dissertação de Mestrado—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 5 jun. 2018.

SCHNEIDER, L. S.; SMALL, G. W.; CLARY, C. M. Estrogen Replacement Therapy and Antidepressant Response to Sertraline in Older Depressed Women. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 9, n. 4, p. 393–399, 1 set. 2001.

SOUZA, E. DE et al. Ação da Betametasona em Ratas Prenhes: Impacto sobre os Níveis de Corticosterona e Glândulas Adrenais Maternas e Fetais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, p. 667–673, dez. 2001.

SUSSMAN, M. et al. Prevalence of menopausal symptoms among mid-life women: findings from electronic medical records. **BMC Women's Health**, v. 15, p. 58, 13 ago. 2015.

SZYDŁOWSKA, I. et al. Effects of probiotics supplementation on the hormone and body mass index in perimenopausal and postmenopausal women using the standardized diet. A 5-week double-blind, placebo-controlled, and randomized clinical study. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 10, p. 3859–3867, maio 2021.

TALSNESS, C. E. et al. Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. **Toxicology Letters**, v. 157, n. 3, p. 189–202, 4 jul. 2005.

TERÇARIOL, P. R. G.; GODINHO, A. F. Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 3, p. 221–225, 1 mar. 2011.