

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO EM NEUROPSIQUIATRIA

E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

**TRATAMENTO NEONATAL COM FLUOXETINA: AVALIAÇÃO
EXPERIMENTAL DE MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO E
ANSIEDADE EM RATOS ADULTOS**

VALDENILSON RIBEIRO RIBAS

RECIFE

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO EM NEUROPSIQUIATRIA

E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

**TRATAMENTO NEONATAL COM FLUOXETINA: AVALIAÇÃO
EXPERIMENTAL DE MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO E
ANSIEDADE EM RATOS ADULTOS**

VALDENILSON RIBEIRO RIBAS

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências, sob a Orientação do Prof. Dr Raul Manhães de Castro.

-
-

RECIFE

2006

Ribas, Valdenilson Ribeiro

Tratamento neonatal com fluoxetina : avaliação experimental de modelos animais de depressão e ansiedade em ratos adultos / Valdenilson Ribeiro Ribas. – Recife : O Autor, 2006.

58 folhas : il., fotos, gráf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Neuropsiquiatria, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Neuropsiquiatria – Depressão e ansiedade experimentais. 2. Modelos experimentais com ratos. 3. Drogas – Efeitos fisiológicos e Comportamentais. 4. Drogas – Tratamento - Neonatal. I. Título.

616.89-008.441.1	CDU (2.ed.)	UFPE
616.89	CDD (22.ed.)	BC2006-226



Serviço Público Federal
Universidade Federal de Pernambuco
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA
E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRANDO: Valdenilson Ribeiro Ribas

TÍTULO: "TRATAMENTO NEONATAL COM FLUOXETINA: AVALIAÇÃO
EXPERIMENTAL DE TRANSTORNOS DE HUMOR"

Orientador: Prof. RAUL MANHÃES DE CASTRO

BANCA EXAMINADORA:

Prof. ELIZABETH DO NASCIMENTO - UFPE

Prof. MARCELO MORAES VALENÇA - UFPE

Prof. EVERTON BOTELHO SOUGEY - UFPE

LOCAL: Auditório Murilo La Greca - CCS

Horário: 9h

Dia: 20.01.2006

Comentários: A Banca considera que existem alguns pontos de melhoria a serem atendidos, já reconhecidos pelo orientador. Portanto, o candidato demonstrou grande domínio do conteúdo e foi considerado

Aprovado

Presidente:

Examinador:

Examinador:

Dedicatória

Aos meus avós paternos **Eurico Ribeiro Ribas** e **Rita de Souza Silva Ribas** (*in memoriam*) e aos meus avós maternos **Urgel Danôa Santos** e **Áurea de Lima Santos** (*in memoriam*). Sem dúvida nenhuma, que sem eles, não teríamos construído e vivido a linda história de toda a nossa família.

Aos meus pais **Valderico Ribeiro Ribas** e **Maria dos Anjos Danôa Ribas**, Pelo amor oferecido como exemplo de abnegação, deixando até, muitas vezes, de comprar suas próprias vestes em prol da minha e da educação dos meus irmãos.

À minha tia **Abigail Ribeiro Ribas** (*in memoriam*) Por ter ajudado aos meus pais na nossa preciosa criação e ter sido um exemplo de luta pela vida na época em que fiz a seleção para este Mestrado. Saudades!

À minha esposa **Renata de Melo Guerra Ribas** pelo constante incentivo, compreensão, apoio em todas dificuldades e pelas crianças que ampliam a nossa felicidade que são: Mayara Guerra (enteada), Mayanna Guerra (enteada) e José Victor (meu filho).

Aos meus irmãos **Valberto Ribeiro Ribas** e **Valéria Ribeiro Ribas** por termos compartilhado e vivenciado juntos nossos sonhos, nossas dificuldades e, sobretudo, por nossa união.

A meu Sogro **José Mário Guerra** (*in memoriam*) e à minha Sogra **Terezinha de Jesus Melo Guerra** por terem me acolhido em sua família, presenteando-me com a companhia de uma de suas jóias mais raras, Renatinha.

A minha cunhada **Angélica da Fonseca Sobrinho Ribas** e seus pais: **Sr Horácio** (*in memoriam*) e **Sra Yara** e meus sobrinhos: **Ketlin Helenise, Ana Ludmila, Ana Carolina e Valberto Júnior.**

Aos meus amigos **Reginaldo Santino da Costa Lira Filho, Nivaldo Alexandre da Silva, José Fernando da Silva, Severino Marcos de Oliveira Carneiro, Hugo Martins, Lisandra Mendonça de Carvalho, Giancarlo Fulco, Isaac Araújo de Miranda, Cibele Barbosa, Carlos Frederico de Oliveira Alves, Giovana Gama, Cristiano dos Anjos Lopes e Marcelo Viana** que acompanham a minha luta, fortalecendo-me com suas alegrias, palavras consoladoras e o verdadeiro bálsamo, que alivia a dor, que são suas amizades.

Agradecimento Especial

Ao Senhor Deus, nosso Pai, nosso Criador que vem permitindo todos os avanços da ciência e todas as nossas realizações pessoais.

Ao Professor Dr Raul Manhães de Castro pelo acolhimento, pela compreensão, pelos ensinamentos e pela relação, que a todo o momento, se traduz de pai para filho, mostrando que ciência se faz com ética, dedicação e muito amor.

Ao Professor Cristiano Mendes da Silva por sua participação importantíssima no meu processo de crescimento científico.

A minha família inteira que representa a minha história de vida e me dá forças para continuar nessa caminhada.

Agradecimentos

A Deus por permitir a realização de mais um sonho, sobretudo, com a presença dos meus pais, que estão podendo ver de perto o resultado de suas abnegações e expressões de amor.

A Solange pela forma competente que conduz o seu trabalho, informando-nos e orientando-nos sobre documentações, seminários, congressos, palestras, aulas e, às vezes, promovendo sessões de aconselhamentos, buscando sempre a justiça, pela excelente educação e pelas boas idéias.

Aos Professores Marcelo Valença e Everton Sougey por conduzirem, com muita competência, a Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do comportamento, inclusive estando presentes em sala de aula, ensinando-nos a fazer ciência com dignidade e respeito.

Aos Professores Murilo Costa Lima e Wilson de Farias por ministrarem suas disciplinas com muita excelência.

À Fátima e a Juarez que, com muita gentileza e educação, sempre nos atendem.

À Lúcia Pires Ferreira pela orientação no uso do material de laboratório e na análise estatística.

À Fernanda, secretária da pós-graduação de Nutrição, pela paciência e pelos constantes favores, sem sequer mencionar alguma dificuldade.

A Dr França (Médico Veterinário responsável pelo Biotério do Departamento de Nutrição) por sua enorme atenção, competência e, sobretudo, amizade.

A todos os colegas do Mestrado, principalmente, a Hugo André de L. Martins, Andréia Lígia V. Correia, Joacil Carlos da Silva Júnior, Karllus Leite de M. Santos, Jaéllya Rodrigues de Sousa, Amdore Guescel C. Asano, Cláudio Henrique F. Vidal, Suzana Maria Bezerra Serra, Aurilene de Siqueira Guerra, Ana Cláudia de C. Vieira, Daniella Araújo de Oliveira, Michelly Cauás, Marcelo Bezerra Mendonça, Ilduara Valéria Sidrim, André Luiz S. Brasil Ribeiro, Hercília R. X. de Albuquerque e Mauricéa Tabosa F. Santos.

Aos Mestrandos e Doutorandos de Nutrição Luziane, Marco, Solange, Sebastião Rogério, Roberta Leite, Cristiano Mendes, Sandra, Soninha e Wylla.

Aos meus amigos da Aeronáutica André Luiz da Cunha Braga, Marcelo Costa Magalhães, Roberval de Souza Lima, Helmut Muniz, João Paulino Bahia Filho, Fábio Luiz de Paula Ramos, Jaci Martins da Silva Filho, Edvar Valença Maranhão, Sérgio Teixeira da Cunha, Geovar Maia dos Santos, Dílson Nunes da Cruz, Wanderley Ludvig, Carlos Augusto Pinheiro do Nascimento, Márcio Lima da Silva, José Carlos Bastos, Darlan Guedes e Carlos José de Farias Júnior.

Aos meus amigos Reginaldo Santino da Costa Lira Filho, Hugo Martins, Marcelo Tavares Viana, Lisandra Mendonça de Carvalho, Giancarlo Fulco, José Roberto Cajueiro, José Roberto Cajueiro Júnior, Nivaldo Alexandre da Silva e José Fernando da Silva.

Às minhas estagiárias de Fisiologia da Nutrição Ana Carolina Cirino, Karoline de Moura Ramos, Fernanda Tatiane Medeiros de Oliveira, Alicinez Guerra, Ana késia de Souza Lima, Viviane Regina de Souza Santos e Suênia Xavier Gonçalves.

“O que esperamos quando estamos desesperados e, mesmo assim, procuramos um outro homem? Certamente uma presença, por meio da qual somos informados de que, apesar de tudo, há significado”.

Martin Buber, 1973.

- **Resumo**

A serotonina participa do controle de várias funções do sistema nervoso central. A manipulação do sistema nervoso com drogas no período neonatal induz alterações morfofisiológica e comportamental. A fluoxetina tem sido amplamente prescrita para tratamento de depressão e ansiedade. O objetivo deste trabalho foi avaliação comportamental da depressão e ansiedade experimentais em ratos adultos tratados, do primeiro ao 21º dia, com fluoxetina em administração crônica de 10 mg/Kg (sc, diariamente). A depressão experimental foi induzida pelo teste do nado forçado. A latência da tentativa de fuga e o tempo de imobilidade foram avaliados durante 5 minutos. O grupo tratado com fluoxetina apresentou maior latência de tentativa de fuga ($157,04 \pm 17,99$, $p=0,035$) e menor tempo de imobilidade ($9,42 \pm 1,19$, $p=0,001$) comparado ao controle ($108,62 \pm 13,16$; $40,23 \pm 8,02$). A avaliação da ansiedade, utilizando o labirinto elevado em cruz, foi realizada em duas etapas. Na primeira, os animais eram ingênuos. Na segunda, os ratos eram submetidos a estímulo estressante, ou seja, choque nas patas. Os percentuais do tempo de permanência e do número de entrada nos braços abertos do labirinto foram usados como índices de ansiedade e número de entrada nos braços fechados e número total de entradas foram parâmetros para avaliação da atividade locomotora. Não foi observada significância estatística, em ambas as etapas, com os percentuais do tempo de permanência e do número de entrada nos braços abertos no grupo fluoxetina, quando comparado ao grupo controle. Foram observadas reduções, no grupo fluoxetina, do número de entradas nos braços fechados ($2,35 \pm 0,33$, $p=0,001$) e também no número total de entradas ($3,96 \pm 0,61$, $p=0,010$) em relação aos grupos de controles respectivamente ($4,65 \pm 0,52$; $6,96 \pm 0,94$). Todavia, esse resultado foi obtido apenas na segunda etapa do experimento de ansiedade, após o estímulo do choque elétrico. A administração neonatal crônica com fluoxetina apresentou menor susceptibilidade à depressão no modelo do nado forçado, não apresentou alteração na ansiedade no labirinto elevado em cruz e produziu uma redução na atividade locomotora do animal que recebeu o estímulo estressante.

Abstract

• The serotonin controls several functions in the central nervous system. The nervous system manipulation with drugs in the neonatal period induces morphologic and behavioral alterations. The fluoxetine has been widely prescribed for depression and anxiety-related disorders. The objective of this work was behavioral evaluation of experimental depression and anxiety in adult rats treated from the first to the 21st postnatal day with fluoxetine chronic (10 mg/Kg, sc, daily). The experimental depression was induced by the forced swim test. The latency of the attempt of escape and behavioral immobility were evaluated during 5 minutes. The fluoxetine group showed increase in latency of the attempt of escape ($157,04 \pm 17,99$, $p=0,035$) and decrease in behavioral immobility ($9,42 \pm 1,19$, $p=0,001$), when compared to the control group ($108,62 \pm 13,16$; $40,23 \pm 8,02$). The anxiety evaluation, using the plus-maze elevated, was performed in two stages. In the first, the animals were pure. In the second, the rats received an incentive foot shock. The percentage of time spent in the open arms and the percentage of open arm entries were used as anxiety indexes and the closed arms entries number and the total entries number were used as locomotor activity. There was not statistical significance, in both stages, with the fluoxetine group percentage of time spent in the open arms and the percentage of open arms entries, when compared to the control group. There were reductions within the fluoxetine group in the number of entries in the closed arms ($2,35 \pm 0,33$, $p=0,001$) and in the total of entries ($3,96 \pm 0,61$, $p=0,010$) only in the second stage of the anxiety experiment after the foot electrical shock stimulus, when compared to the control group ($4,65 \pm 0,52$; $6,96 \pm 0,94$). The fluoxetine chronic neonatal administration showed smaller propensity to the depression induced by forced swimming test, did not alter anxiety in the plus maze and yielded a reduction on the locomotor activity in the animal with stress.

LISTA DE SIGLAS

5-HT	5-Hidroxitriptamina
5-HTP	5-Hidroxitriptofano
5-HIAA	Ácido 5-Hidroxindolacético
FLU	Fluoxetina
ISRS	Inibidor seletivo de recaptção de serotonina
Lafinnt	Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
LTF	Latência da Tentativa de Fuga
MAO	Monoaminoxidase
Neba	Número de entrada nos braços abertos
Nebf	Número de entrada nos braços fechados
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
TBA	Tempo de permanência nos braços abertos
TBF	Tempo de permanência nos braços fechados
TI	Tempo de Imobilidade
TNF	Teste do Nado Forçado.
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

RESUMO	X
SUMMARY	XI
LISTA DE SIGLAS	XII
INTRODUÇÃO	13
JUSTIFICATIVA	16
OBJETIVOS	17
HIPÓTESES	18
MATERIAIS E MÉTODOS	19
TRATAMENTO ESTATÍSTICO	24
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÕES	48
PERSPECTIVAS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

Estudos envolvendo crescimento e desenvolvimento dos sistemas fisiológicos e orgânicos, dentre eles, o sistema nervoso, com modelos experimentais de laboratório, estão aumentando. Sobretudo, porque, em alguns animais, o sistema nervoso parece cumprir as mesmas etapas da maturação em seres humanos. O crescimento dos órgãos compreende o aumento do número e tamanho das células, o desenvolvimento, por sua vez, promove diferenciação de tecidos e órgãos, seguidos de suas funções específicas (1).

Nessa relação entre crescimento e desenvolvimento parece haver uma seqüência temporal bem determinada entre eles em período pré e pós-natal (2).

No SN, essa seqüência ocorre de forma acelerada e é dividida em eventos, tais como: neurogênese, gliogênese, diferenciação neuronal, migração de neurônios, mielinização e sinaptogênese. Esses eventos determinam a composição neuroquímica e a estrutura morfofuncional definitiva presente no adulto (3) e são sensíveis às agressões nutricionais (4,5) e farmacológicas (6,7,8).

A vulnerabilidade deste sistema fisiológico, no início do seu desenvolvimento biológico, permitiu que se denominasse de período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso (9,10). No entanto, este período pode variar entre as espécies; no homem, tem início no último trimestre gestacional continuando até 2 a 4 anos de vida (11) e no rato, corresponde às três primeiras semanas de vida pós-natal que coincide com o período de lactação (9). Essas características tornam o rato um dos animais escolhidos para estudos da ontogênese nervosa.

A velocidade, a multiplicidade e a importância funcional dos eventos do SN caracterizam o chamado período crítico como sendo de alta vulnerabilidade às agressões nutricionais e farmacológicas; estas poderão conduzir à drásticas alterações morfológicas (12, 13), funcionais (12, 6) e comportamentais (14, 8). Estas mudanças poderão se tornar irreversíveis dependendo da magnitude da agressão (9, 15). Dessa forma, fatores que possam alterar o desenvolvimento do SN terão conseqüências variadas, a depender do período de ocorrência, de sua duração e da espécie estudada (9).

Nestes processos de crescimento cerebral e embriogênese, o sistema serotoninérgico tem participação especial (16, 17); possivelmente, exerce um efeito neurotrófico (18) ou sinalizador para o desenvolvimento de neurônios durante a fase embrionária (19, 20). No rato, os primeiros neurônios produtores de serotonina aparecem entre o 12^o e 14^o dia de gestação (21). Portanto, fatores epigenéticos na fase tanto pré quanto pós-natal poderão afetar em particular, este sistema neurotransmissor (3, 10).

O sistema serotoninérgico é constituído por neurônios que liberam o neurotransmissor 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT), assim como pelos seus receptores (22). A síntese de 5-HT cerebral ocorre *in situ* no SNC a partir do aminoácido essencial L-triptofano (23 - 25) e depende de fatores exógenos, como a dieta. Esse aminoácido é transportado para o interior do neurônio serotoninérgico onde no citoplasma, sofre a ação da enzima triptofano-hidroxilase, transformando-se em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) (26). O 5-HTP é descarboxilado através de ação inespecífica da enzima aminoácido-descarboxilase e, após a ação enzimática é convertido em serotonina (5-HT), (26). O processo de degradação e

inativação da 5-HT é realizado por um mecanismo de recaptação, onde a 5-HT passa através de um transportador de membrana e após duas reações resulta no seu principal metabólito, o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (26 - 29). Atualmente existem cerca de sete tipos de receptores serotoninérgicos identificados, são eles: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ (30). Vários subtipos de receptores também já foram descritos e devidamente classificados (30), como por exemplo, 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} (31, 32) entre outros.

Uma ampla diversidade de funções do sistema nervoso central tem a participação da serotonina (33). Algumas destas funções estão relacionadas com a sensibilidade dolorosa, com processos de aprendizagem e memória e com os comportamentos alimentar e emocional (33 - 38). É importante ressaltar o papel deste sistema de neurotransmissão no controle da agressividade (39), do humor (40, 41) e ansiedade (42 - 44).

Estudos em animais e em seres humanos demonstraram o papel da serotonina em transtornos afetivos, como a depressão (41, 45, 46, 47), na regulação do comportamento agressivo (8, 33, 48, 49, 50) e ansiedade (42 - 44).

Para se viabilizar o estudo dessas alterações e se observar os fenômenos biológicos, pesquisadores fazem uso de fármacos como instrumentos de manipulação do SN.

Nesse estudo, utilizamos a fluoxetina para avaliação da depressão e ansiedade experimentais.

2 - JUSTIFICATIVA

Este estudo pretende principalmente contribuir para compreensão da função modulatória da serotonina, no início do desenvolvimento do sistema nervoso, e as possíveis repercussões comportamentais que a manipulação farmacológica neonatal do sistema de neurotransmissão serotoninérgica poderá ocasionar na idade adulta.

Contudo, é importante ter também em mente que é crescente a utilização de inibidores seletivos de recaptção de serotonina nos transtornos afetivos, sobretudo, na depressão e ansiedade. Além das adversidades advindas dessas enfermidades, ambas ainda proporcionam uma sensação psicofisiológica de profundo desconforto.

Neste contexto, vale salientar que não apenas a “cultura” da utilização de psicofármacos tem sido amplamente difundida no mundo moderno, mas também o uso cada vez mais precoce desta classe de medicamentos, inclusive em períodos fisiológicos de desenvolvimento como a gestação e a lactação. Todavia, ainda se sabe muito pouco sobre eventuais efeitos, ao longo da vida, do tratamento farmacológico com essas drogas em relação ao sistema nervoso.

Objetivos

3 - OBJETIVO GERAL

Avaliar, em modelos experimentais, depressão e ansiedade em animais adultos submetidos, no período neonatal, a tratamento com fluoxetina.

3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o comportamento depressivo dos animais, aos 60 dias de vida, utilizando o teste de Natação Forçada, analisando os seguintes parâmetros:

- Tempo de Imobilidade
- Latência da Tentativa de Fuga

- Estudar a ansiedade, utilizando labirinto elevado em cruz, em animais submetidos ou não a choques elétricos nas patas, analisando os parâmetros abaixo:

- (1) Percentuais do tempo de permanência e do número de entradas nos braços abertos.
- (2) Número de entradas nos Braços e Fechados.
- (3) Número total de entradas.

Hipóteses

4 – HIPÓTESES

- O tratamento neonatal crônico com ISRS reduz a susceptibilidade à depressão, avaliada no teste do nado forçado, indicando a gênese de perfil ansiogênico;
- Tratamento neonatal com fluoxetina acarreta perfil ansiogênico e neofobia no teste do Labirinto elevado em cruz no adulto;
- A manipulação farmacológica do sistema serotoninérgico durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso acarreta transtornos do humor em longo prazo, avaliados em modelos experimentais.

Materiais e métodos

5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 - Animais - Foram utilizados 104 ratos albinos, da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Esses animais foram acasalados e mantidos sob condições padrão do biotério, em sala à temperatura de $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, submetidos, a um ciclo artificial claro-escuro de 12/12 horas (o escuro iniciando-se às dezenove horas) com água e comida *ad libitum*. As ninhadas obtidas foram reduzidas para 6 filhotes/mãe, esta proporção de filhotes por mãe parece ser a ideal para o aleitamento (51). O tratamento farmacológico foi iniciado 24 horas após o nascimento, correspondendo ao primeiro dia de vida, considerando-se assim, o dia do nascimento como dia zero. O animal, com peso corporal inferior a 6g, foi excluído do estudo.

5.2 - Grupos Experimentais - Filhotes machos de cada ninhada foram divididos em 2 experimentos:

Experimento 1 - avaliação da depressão experimental, utilizando o teste de natação forçada.

Experimento 2 - avaliação da ansiedade, utilizando o modelo do labirinto elevado em cruz, em duas etapas. Etapa 1(sem estímulo estressante) e Etapa 2 (com estímulo estressante de choque nas patas). Para ambos os experimentos os grupos experimentais foram divididos de forma semelhante conforme descrito abaixo:

* **Grupo Fluoxetina** (n= 52) recebeu o antidepressivo fluoxetina (10 mg/Kg, sc, dissolvida em solução salina, 1ml/Kg).

* **Grupo Controle** (n= 52) recebeu um volume equivalente de salina (NaCl 0,9%).

Em ambos os experimentos, os animais foram tratados diariamente do primeiro ao 21º dia pós-natal (período de lactação) e divididos, conforme ilustra o fluxograma:

Teste de Nado Forçado		Labirinto Elevado em Cruz	
Grupo Fluoxetina (n= 26)	Grupo Controle (n= 26)	Grupo Fluoxetina (n= 26)	Grupo Controle (n= 26)

Os grupos, assim formados, foram avaliados conforme procedimentos abaixo:

5.3 – Medidas Murinométricas

O peso corporal foi aferido diariamente, no período, das 12h 00 às 14h 00, do primeiro ao 21º dia pós - natal (desmame), aos 60 e entre 90 e 120 dias de idade, utilizando balança eletrônica Marte, modelo: AS (1000 g - acuracidade de 0, 001g).

5.4 – Avaliação Comportamental:

5.4.1 - Depressão Experimental

Os animais aos 60 dias de idade, pesando entre 220–240g foram submetidos ao teste do nado forçado, método de Porsolt et al (1977) para avaliar a depressão experimental. O teste do nado forçado consiste de um pré-teste de habituação com duração de 15 min, e 24 horas depois uma sessão de avaliação (período teste) é realizada durante 5 min (52). As dimensões do tanque foram: altura 60 cm, diâmetro 45 cm e nível da água 40 cm. A temperatura da água foi mantida em 25 °C. Ao término do pré-teste e do teste, os animais foram secados em uma câmara de aquecimento (32°C/15 min), retornando em seguida para suas gaiolas. Os parâmetros comportamentais avaliados foram a latência da tentativa de fuga (natação + fuga) e o tempo de imobilidade, ambos quantificados em segundos usando um cronômetro digital (47). A **imobilidade** (Figura 1A) foi medida quando o animal boiava passivamente e/ou apresentava movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água (52). A **natação** foi medida quando o animal nadava ativamente ao redor do tanque apresentando movimentos mais intensos do que aqueles necessários para ficar apenas boiando. A **fuga** foi medida quando o animal produzia movimentos vigorosos com as patas anteriores na tentativa de subir pelas paredes do tanque (53). O somatório desses dois últimos parâmetros corresponde à latência de tentativa de fuga (Figura 1B e 1C).

Quanto menor for a latência de tentativa de fuga e maior o tempo de imobilidade mais intenso será o comportamento hipoteticamente depressivo do animal (54).

5.4.2 - Ansiedade Experimental

A partir dos 90 dias de vida, pesando entre 310-330g os animais foram submetidos ao teste de ansiedade através do modelo do Labirinto Elevado em Cruz.

O labirinto elevado em cruz foi construído com dois braços abertos (50 x 10 - cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 - cm) (Figura 2A) e se estendem a partir de uma plataforma central comum (10 x 10 cm) com piso e paredes escuros, elevado a uma altura de 50 cm a partir do nível do piso e iluminado sob uma luz branca de baixa voltagem (15 W), colocada acima da área central (55).

Este modelo experimental é baseado no medo inato que os roedores têm pelo espaço aberto e elevado, preferindo ficar nos braços fechados. Quando confinados nos braços abertos, mostram manifestações comportamentais e psicofisiológicas de medo, tais como: congelamento, defecações e aumento de corticosteróides (56). A aversão a esses braços abertos ocorre, em princípio, porque eles impedem os ratos de se engajarem num comportamento, planejado e instintivo, de defesa dos predadores (57, 58).

O procedimento para realização do teste consistia em colocar os animais, individualmente, no espaço central do aparelho onde eram observados durante 5 minutos, entre 12h 00 e 14h 00, por uma pessoa treinada, a 1,5 m de distância do centro do labirinto. O avaliador desconhecia as condições experimentais dos animais e registrava o tempo de permanência e o número de entradas em cada braço. O registro de cada entrada só tinha validade, a partir do momento que o animal se encontrava com as 4 patas (2 anteriores/2 posteriores) em um dos

braços do Labirinto (Figura 2B). Os dados foram registrados em protocolo previamente estabelecido e analisados estatisticamente.

A literatura vem mostrando que as drogas ansiolíticas aumentam o número de entradas e o tempo de permanência de cada animal nos braços abertos, enquanto as ansiogênicas fazem o oposto (59).

A proporção e a percentagem do total de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos têm sido usadas como índice de ansiedade. Estes índices são relacionados com fármacos usados na ansiedade, porque aumentam com a ação dos ansiolíticos e diminuem com as drogas ansiogênicas (44).

Entre 90 e 120 dias de vida a avaliação da ansiedade experimental foi respectivamente realizada em 2 etapas:

Etapa 1 – avaliação do comportamento sem estímulo estressante.

Etapa 2 – avaliação do comportamento com aplicação de estímulo estressor, por meio de choques elétricos nas patas (intensidade 1,6 mA / duração 2 segundos)(figura 3), antes do teste no labirinto elevado em cruz.

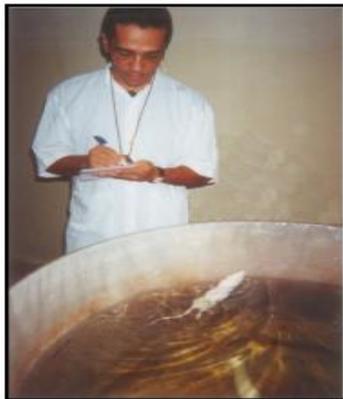
Tratamento estatístico

5.5. Tratamento Estatístico:

Foi utilizado teste "t"- Student bicaudal para os dados referentes à avaliação do peso corporal e para avaliação dos parâmetros comportamentais, os quais foram expressos como média e erro padrão ($\bar{x} \pm EP$). O nível mínimo de significância utilizado foi de $p < 0,05$.



Figura 1A. Esta figura representa o tempo de imobilidade. Neste parâmetro comportamental, o animal apresenta-se boiando passivamente e/ou executando movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água.



Figuras 1B e 1C. Estas figuras correspondem à latência de tentativa de fuga. Este parâmetro de comportamento é constituído com a soma da natação com a fuga. Na natação, figura 1B, o animal executa movimentos mais intensos do que aqueles necessários para ficar apenas boiando. Na fuga, figura 1C, o animal produz movimentos vigorosos com as patas anteriores na tentativa de subir pelas paredes do tanque.



Figura 2A. Labirinto elevado em cruz com o animal na plataforma central.



Figura 2B. O animal no braço aberto do labirinto elevado em cruz.



Figura 3. Gaiola de Skinner proporcionando estímulo estressor por meio de choques elétricos nas patas.

Resultados

6. RESULTADOS:

6.1. EVOLUÇÃO PONDERAL:

6.1.1. Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina (10 mg/Kg, sc) sobre o peso corporal:

Os animais tratados com fluoxetina apresentaram pesos corporais médios menores ($19,58 \pm 0,31$; $41,12 \pm 0,92$, $p < 0,05$) que os do grupo controle ($22,17 \pm 0,42$; $51,29 \pm 1,08$), do nono ao 21º dia de vida respectivamente (Figura 4)

6.2. EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA DEPRESSÃO:

6.2.1. Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina (10 mg/kg sc) sobre a latência de tentativa de fuga e o tempo de imobilidade no teste de nado forçado:

Ratos tratados com fluoxetina apresentaram maior duração da latência de tentativa de fuga em segundos ($157,04 \pm 17,99$, $p = 0,035$) (Figura 5) e menor duração do tempo de imobilidade ($9,42 \pm 1,19$, $p = 0,001$) (Figura 6), quando comparados aos animais dos grupos controles respectivamente ($108,62 \pm 13,16$; $40,23 \pm 8,02$).

6.3. EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE:

6.3.1. Etapa 1 (sem estímulo de estressante):

Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina (10 mg/kg sc) sobre as percentagens do tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos do labirinto elevado em cruz:

Não houve diferença significativa entre os grupos, embora, os animais tratados com fluoxetina tenham apresentado menor percentual do tempo de permanência nos braços abertos ($30,93 \pm 2,45$, $p=0,527$) (Figura 7) e menor percentual do número de entradas nos braços abertos ($37,16 \pm 1,91$, $p=0,210$) (Figura 8), quando comparados a seus grupos controles respectivamente ($33,81 \pm 3,80$) ($40,64 \pm 1,97$).

Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina (10 mg/kg sc) sobre o número de entradas nos braços fechados e sobre o número total de entradas do labirinto elevado em cruz:

Embora, não tenha sido observada significância estatística, o grupo fluoxetina apresentou o mesmo número de entradas nos braços fechados (Figura 9) ($10,15 \pm 0,51$, $p=1.000$) e menor número total de entradas (Figura 10) ($16,04 \pm 0,53$, $p=0,379$), quando comparados, respectivamente, ao grupo Controle ($10,15 \pm 0,63$) e ($16,92 \pm 0,84$).

6.3.2. Etapa 2 (com estímulo de estressante):

Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina (10 mg/kg sc) sobre as percentagens do tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos do labirinto elevado em cruz:

Não foi observada significância estatística nesses grupos, contudo, os animais tratados com fluoxetina apresentaram maior percentual do tempo de permanência nos braços abertos ($20,79 \pm 5,71$, $p=0,648$) (Figura 11) e maior percentual do número de entradas nos braços abertos ($30,95 \pm 5,34$, $p=0,302$) (Figura 12), quando comparados aos animais dos grupos de controle respectivamente ($17,34 \pm 4,86$) e ($23,97 \pm 4,04$).

Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina (10 mg/kg sc) sobre o número de entradas nos braços fechados e sobre o número total de entradas do labirinto elevado em cruz:

Os animais do grupo fluoxetina apresentaram menor número de entradas nos braços fechados ($2,35 \pm 0,33$, $p=0,001$) (Figura 13) e menor número total de entradas ($3,96 \pm 0,61$, $p=0,011$) (Figura 14), quando comparados, respectivamente, aos grupos de controle ($4,65 \pm 0,52$) e ($6,96 \pm 0,94$).

Evolução Ponderal

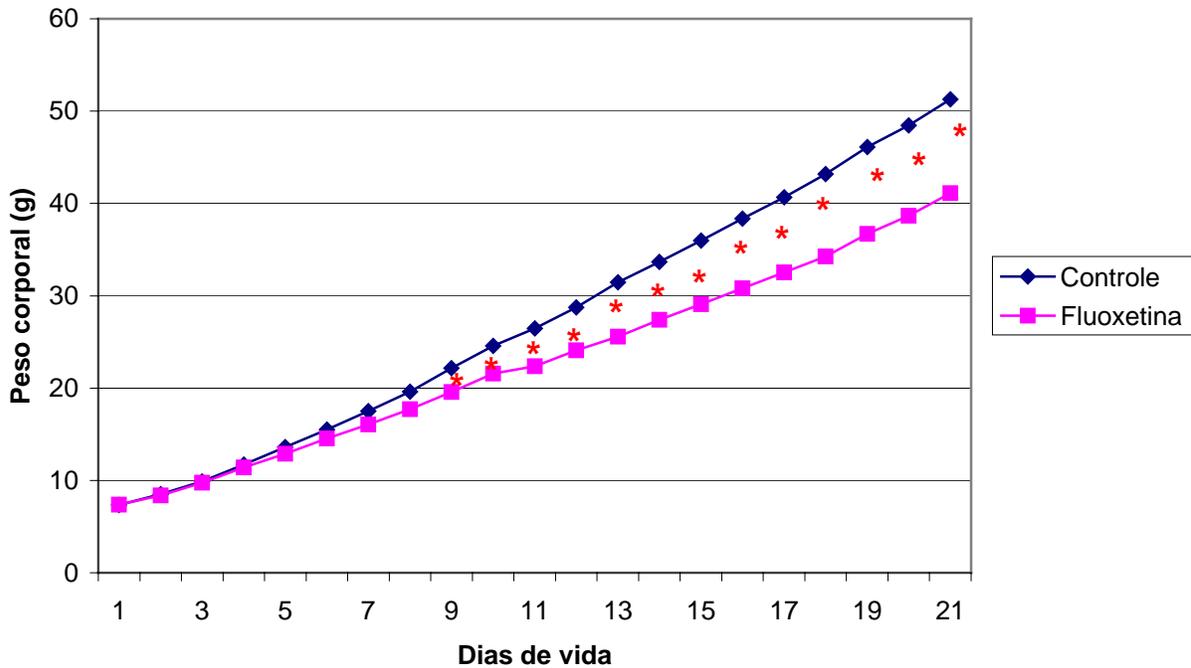


Figura 4. Efeito do tratamento com a fluoxetina, durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso, sobre o crescimento ponderal de ratos. Os animais receberam, via subcutânea, 10 mg/kg de fluoxetina (grupo fluoxetina, n=26) ou de salina (grupo controle, n=26), diariamente do primeiro ao 21º dia de idade. Todos os animais foram pesados diariamente. Os dados estão representados como $\bar{x} \pm EP$ do peso corporal em gramas. * $p < 0,05$.

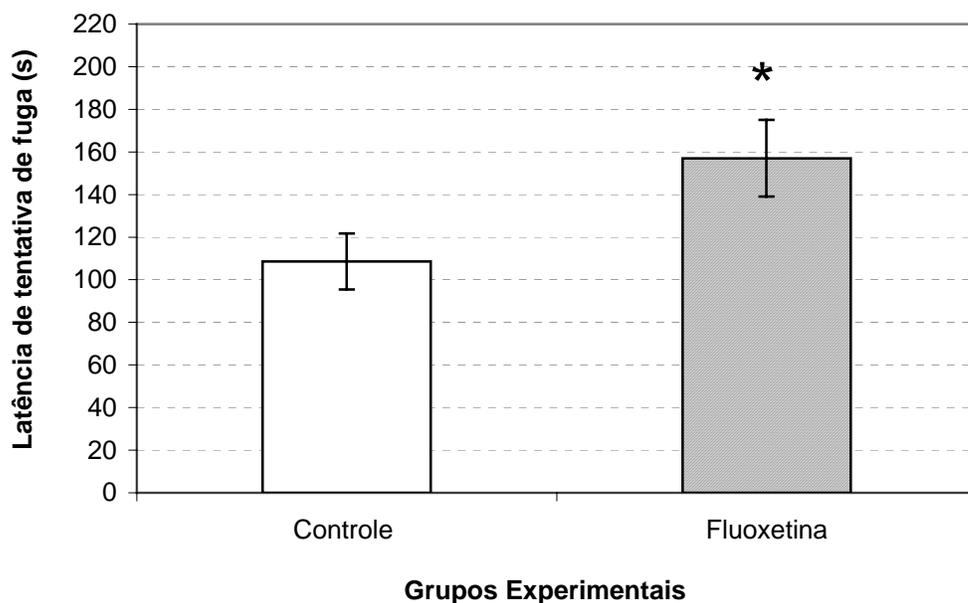


Figura 5. Medida da latência de tentativa de fuga avaliada no teste do nado forçado. Efeito do tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg, dia, sc; n=26), durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso comparado ao grupo controle tratado com salina (NaCl 0,9%, 1ml/Kg, dia; n=26). Dados representados como $\bar{x} \pm EP$ do tempo de tentativa de fuga em segundos no teste *t*-student. * $p=0,035$.

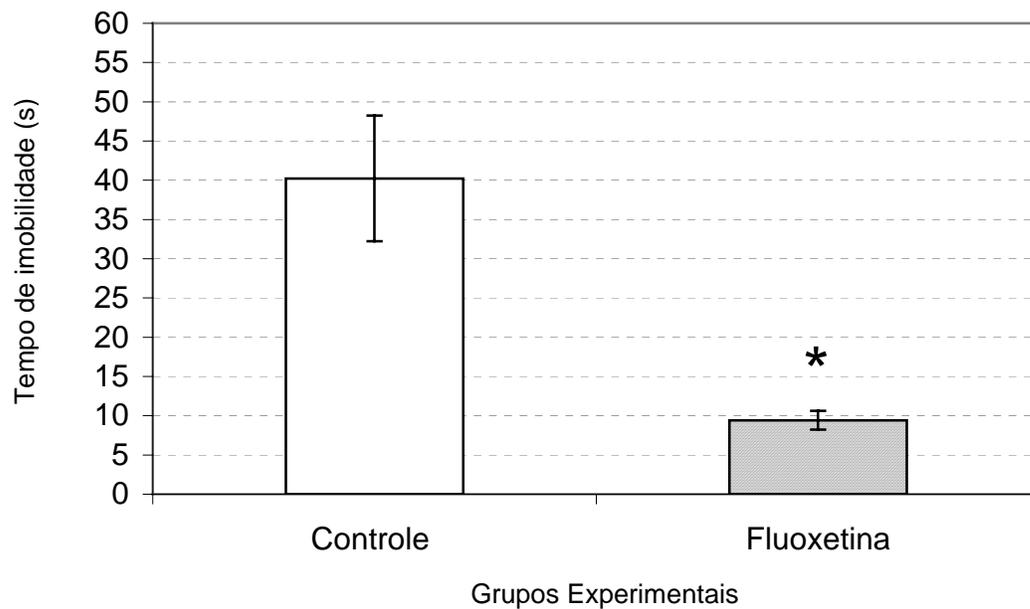


Figura 6. Medida do tempo de imobilidade avaliada no teste do nado forçado. Efeito do tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg, dia, sc; n=26), durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso comparado ao grupo controle tratado com salina (NaCl 0,9%, 1ml/Kg, dia; n=26). Dados representados como $\bar{x} \pm EP$ do tempo de imobilidade, em segundos, no teste *t*-student. * $p=0,001$.

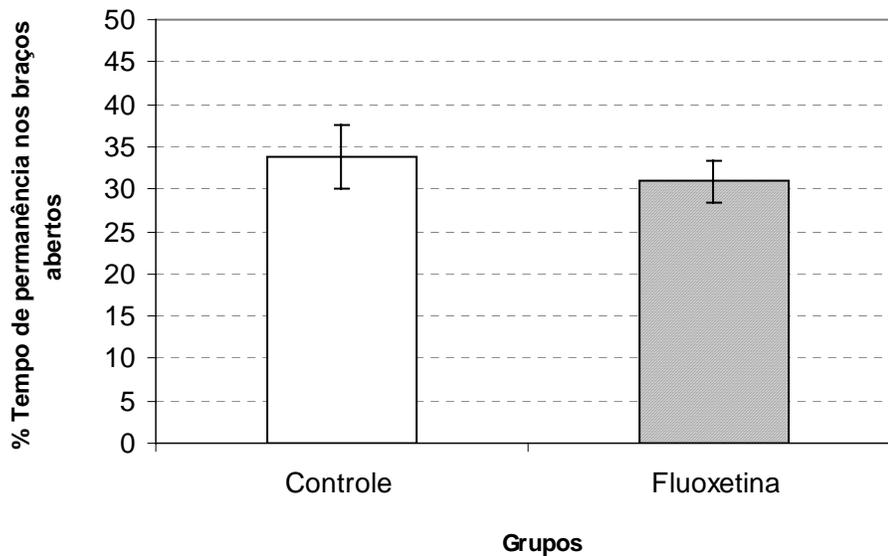


Figura 7. Medida do percentual do tempo de permanência nos braços abertos, avaliada no labirinto elevado em cruz. Efeito do tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg, dia, sc; n=26), durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso comparado ao grupo controle tratado com salina (NaCl 0,9%, 1ml/Kg, dia; n=26). Dados representados como $\bar{x} \pm EP$ do percentual do tempo de permanência nos braços abertos, em segundos, no teste *t*-student. $p=0,527$.

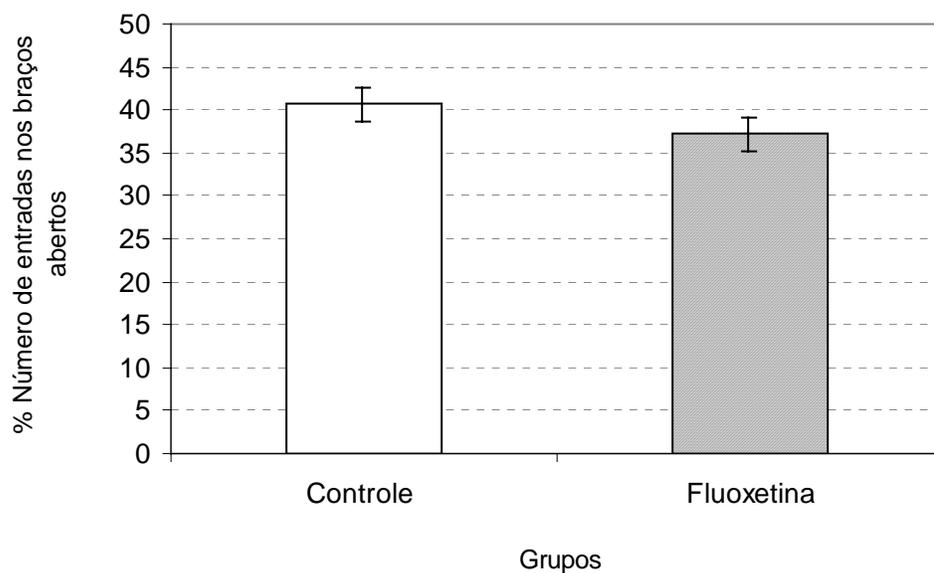


Figura 8. Medida do percentual do número de entradas nos braços abertos, avaliada no labirinto elevado em cruz. Efeito do tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg, dia, sc; n=26), durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso comparado ao grupo controle tratado com salina (NaCl 0,9%, 1 ml/Kg, dia; n=26). Dados representados como $\bar{x} \pm EP$ do percentual do número de entradas nos braços abertos, em segundos, no teste *t*-student. $p=0,210$.

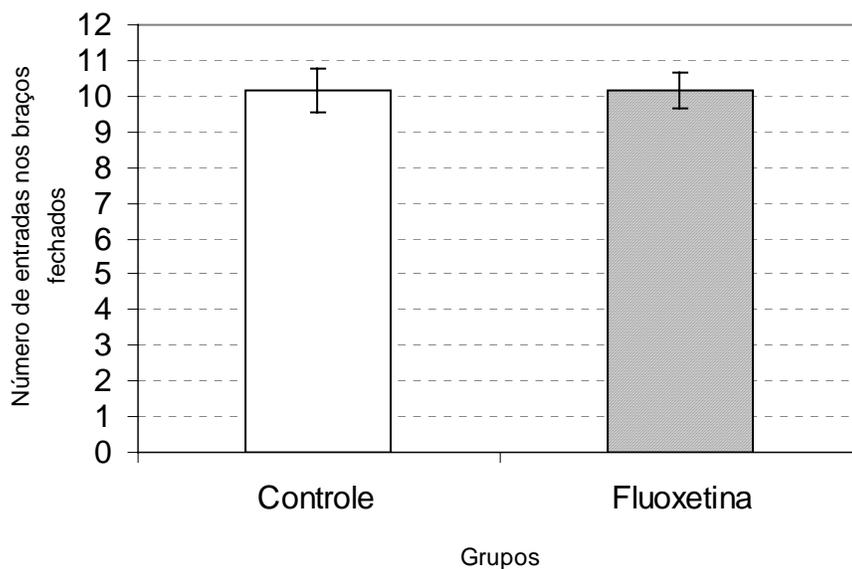


Figura 9. Medida do número de entradas nos braços fechados, avaliada no labirinto elevado em cruz. Efeito do tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg, dia, sc; n=26), durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso comparado ao grupo controle tratado com salina (NaCl 0,9%, 1ml/Kg, dia; n=26). Dados representados como $\bar{x} \pm EP$ do número de entrada nos braços fechados, em segundos, no teste *t*-student. $p=1.000$.

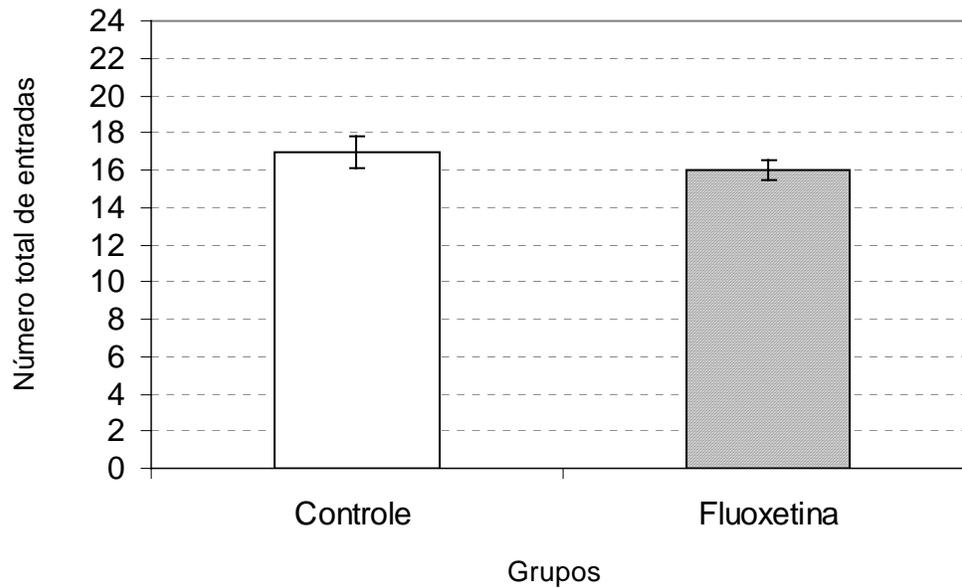


Figura 10. Medida do número total de entradas, avaliada no labirinto elevado em cruz. Efeito do tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg, dia, sc; n=26), durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso comparado ao grupo controle tratado com salina (NaCl 0,9%, 1ml/Kg, dia; n=26). Dados representados como $\bar{x} \pm EP$ do número total de entradas, em segundos, no teste *t*-student. $p=0,379$.

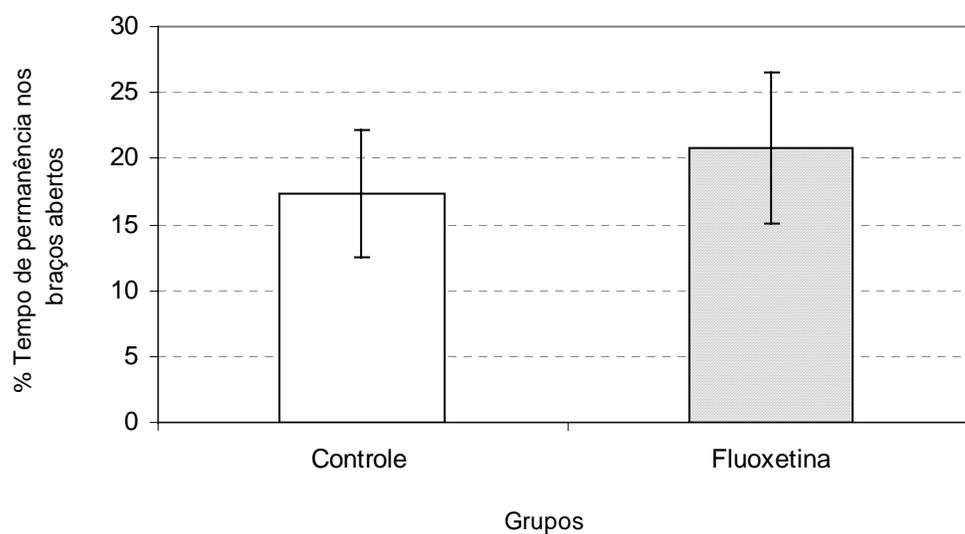


Figura 11. Medida do percentual do tempo de permanência nos braços abertos, avaliada no labirinto elevado em cruz. Efeito do tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg, dia, sc; n=26), durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso comparado ao grupo controle tratado com salina (NaCl 0,9%, 1 ml/Kg, dia; n=26). Dados representados como $\bar{x} \pm EP$ do percentual do tempo de permanência nos braços abertos, em segundos, no teste *t*-student. $p=0,648$.

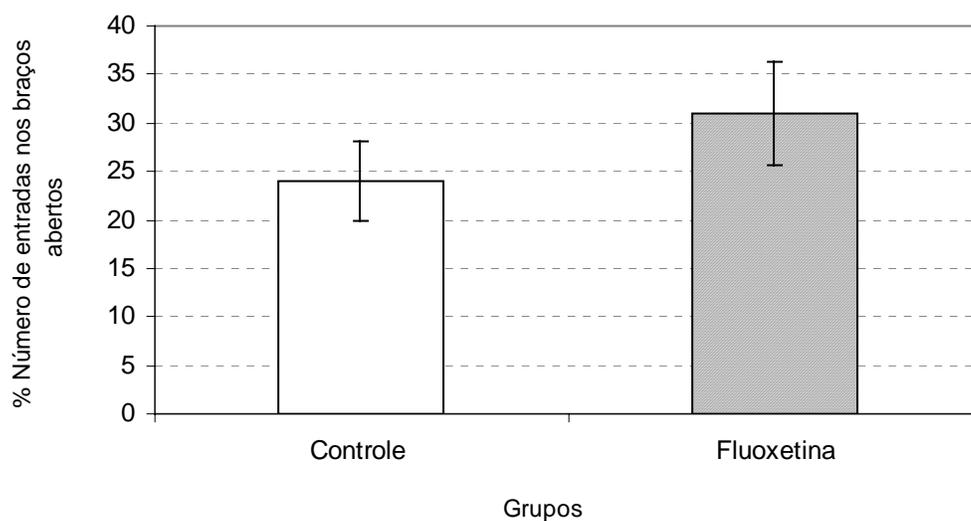


Figura 12. Medida do percentual do número de entradas nos braços abertos, avaliada no labirinto elevado em cruz. Efeito do tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg, dia, sc; n=26), durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso comparado ao grupo controle tratado com salina (NaCl 0,9%, 1ml/Kg, dia; n=26). Dados representados como $\bar{x} \pm EP$ do percentual do número de entradas nos braços abertos, em segundos, no teste *t*-student. $p=0,302$.

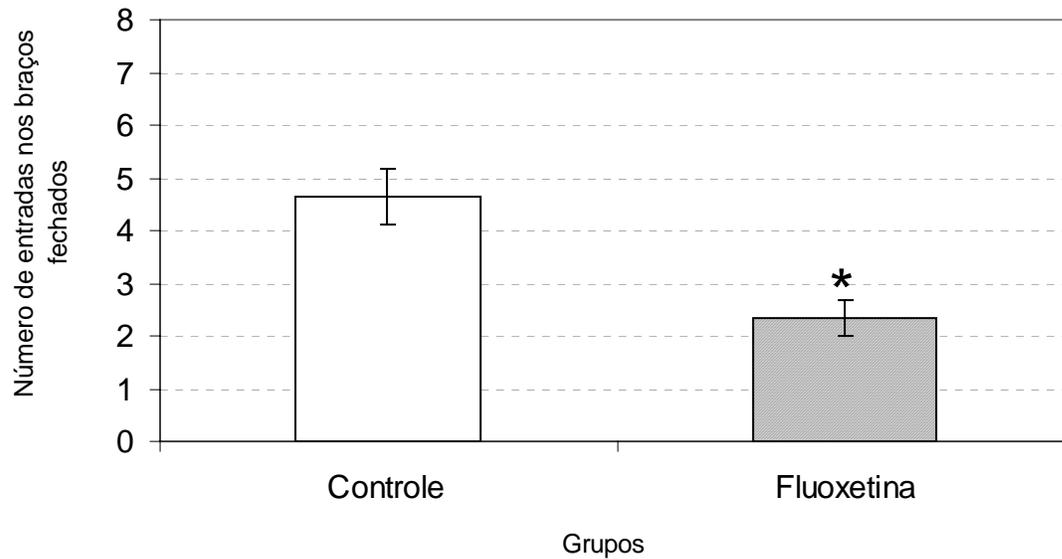


Figura 13. Medida do número de entradas nos braços fechados, avaliada no labirinto elevado em cruz. Efeito do tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg, dia, sc; n=26), durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso comparado ao grupo controle tratado com salina (NaCl 0,9%, 1 ml/Kg, dia; n=26). Dados representados como $\bar{x} \pm EP$ do número de entradas nos braços fechados, em segundos, no teste *t*-student. * $p=0,001$.

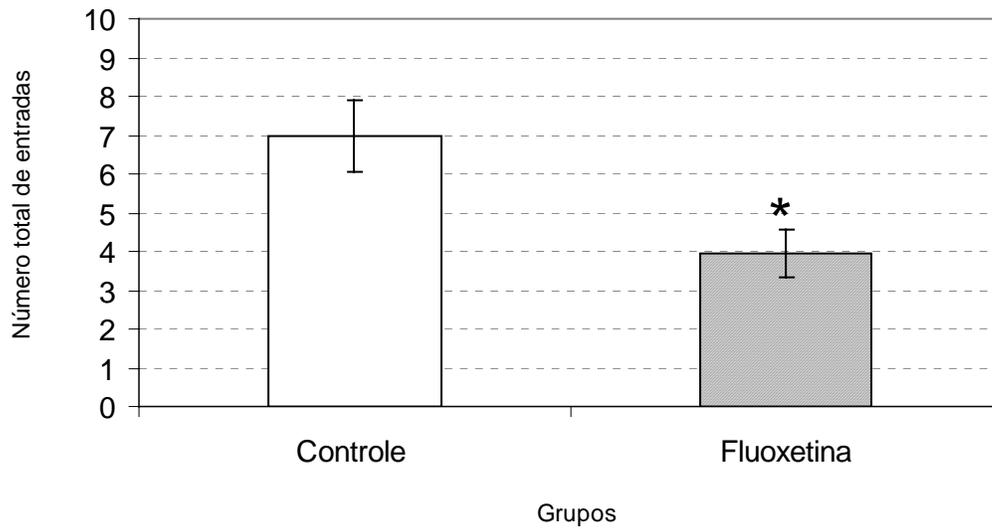


Figura 14. Medida do número total de entradas, avaliada no labirinto elevado em cruz. Efeito do tratamento com fluoxetina (10 mg/Kg, dia, sc; n=26), durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso comparado ao grupo controle tratado com salina (NaCl 0,9%, 1ml/Kg, dia; n=26). Dados representados como $\bar{x} \pm EP$ do número total de entradas, em segundos, no teste *t*-student. * $p=0,011$.

Discussão

7. DISCUSSÃO:

Este trabalho constatou que a administração crônica de fluoxetina, durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso, retardou a evolução ponderal e reduziu o comportamento depressivo. No que se refere à ansiedade experimental, em animais tratados com fluoxetina, no período neonatal, não foi observada alteração dos efeitos comportamentais. Entretanto, foi encontrada redução da atividade locomotora dos ratos submetidos aos estímulos estressantes (choque nas patas).

A redução do peso corporal observada, a partir das primeiras semanas de vida até o desmame, possivelmente, está relacionada ao efeito hipofágico da droga serotoninérgica, corroborando alguns achados (60,61,47). E, desta forma, parece indicar que esses animais foram responsivos à droga serotoninérgica administrada.

No comportamento depressivo induzido pelo teste do nado forçado, a administração da fluoxetina durante o período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso reduziu o tempo de imobilidade e aumentou a duração da latência de fuga no adulto, corroborando alguns trabalhos (47). Este resultado também concorda com vários estudos com doses moderadas de inibidores seletivos de recaptção de serotonina, como fluoxetina, sertralina e paroxetina que revelam atenuação do tempo de imobilidade no teste do nado forçado (62).

HANSEN *et al.* (1997), na mesma época dos nossos primeiros resultados, observaram que ratos neonatos tratados com Lu 10-134-C, um inibidor seletivo de recaptção de serotonina, apresentaram, um tempo de imobilidade prolongado

quando comparados aos controles. Assim, o estudo feito com Lu 10-134-C, no período neonatal, produziu aumento do comportamento depressivo (63), contrariando os nossos resultados. Contudo, em outro estudo com a mesma droga, Lu 10-134-C, houve redução no tempo de imobilidade, assemelhando-se aos nossos resultados (62).

Embora ambos os trabalhos supracitados tenham sido realizados com inibidores seletivos de recaptção de serotonina, no período neonatal, utilizando o modelo do nado forçado, um discordando (63) e o outro concordando (62) com os nossos resultados, faz-se necessário salientar algumas diferenças metodológicas. A primeira diferença refere-se a dose utilizada e a segunda ao período do teste. O primeiro utilizou doses de 2,5 - 15 mg/kg, sendo os testes realizados entre 18 - 20 semanas de vida, o segundo com 20 mg/Kg em 8 semanas de vida. Talvez as diferenças nos tempos de avaliação e nas doses dos inibidores seletivos de recaptção de serotonina, justifiquem a contraposição dos resultados ou ainda que haja possibilidade de interferência advinda do entendimento do padrão convencional dos seus parâmetros de avaliação, sobretudo, o tempo de imobilidade. A descrição de imobilidade está, exclusivamente, na necessidade do animal manter a cabeça fora da água, essa afirmação pode trazer uma variedade de interpretações subjetivas (64).

De qualquer forma, os resultados encontrados neste estudo podem estar relacionados ao aumento, pela influência dos inibidores seletivos de recaptção da serotonina, da disponibilidade sináptica da serotonina e do seu desempenho funcional em diferentes regiões do cérebro (65, 66), principalmente, se essa

manipulação farmacológica se der no período de desenvolvimento do sistema nervoso, possibilitando a ocorrência de alterações permanentes (6, 7).

A manipulação da neurotransmissão serotoninérgica ainda vem produzindo resultados contraditórios no que se refere aos efeitos sobre a ansiedade. Há altos índices de variação nos efeitos das drogas (67), sobretudo, em estudos pré-clínicos com modelos experimentais de ansiedade (68).

É bem estabelecido que administração de fluoxetina no animal adulto, aumenta os níveis de 5-HT, possibilitando, conseqüentemente efeito ansiogênico, nos modelos experimentais de ansiedade (55). Esse efeito pode ser produzido tanto após administração aguda, quanto após administração crônica. Neste estudo, a ferramenta utilizada para a manipulação do sistema serotoninérgico, no período de desenvolvimento rápido do sistema nervoso, foi a fluoxetina.

A administração aguda produz aumento extracelular de serotonina em várias regiões subcorticais do cérebro devido ao bloqueio da proteína transmembranar, evitando a degradação e inativação da 5-HT (69).

Em administração crônica, há estudos demonstrando que o efeito ansiogênico provocado pelos inibidores seletivos de recaptação da serotonina seria devido a dessensibilização dos autoreceptores 5-HT_{1A} e a conseqüente redução dos efeitos inibitórios nos núcleos da rafe, causando uma liberação exacerbada de 5-HT. Ou ainda, que tais efeitos possam estar relacionados a dessensibilização dos receptores 5-HT_{1B} resultando na diminuição da inibição de retro-comunicação de serotonina liberada (69, 70, 71).

Diferentemente dos nossos resultados, Ansorge *et al.*(2004) encontraram efeito ansiogênico em ratos testados no labirinto elevado em cruz, entretanto,

nossos achados corroboram o trabalho de Silva & Brandão (1999), que, através da administração crônica de fluoxetina (10 mg/Kg, PO) não encontrou efeito de nenhuma das medidas espaço-temporais, ou seja, de entrada e saída dos braços e de tempo gasto em algum braço do labirinto. Resultados similares, utilizando também o labirinto elevado em cruz, foram apresentados por Handley & Mcblane (1993) e Kshama & Munonyedi (1990).

A partir do exposto e ainda de outros dados obtidos em pesquisas com animais tratados com inibidores seletivos de recaptção de serotonina, observa-se que resultados de estudos dessa natureza ainda são contraditórios, especialmente, quando envolve fluoxetina e modelos experimentais de ansiedade (68, 72, 73).

A obtenção de efeito ansiogênico após administração aguda de drogas serotoninérgica em modelos animais do labirinto elevado em cruz parece ser uma constância (63). Porém, o efeito ansiogênico obtido em tratamento crônico é compatível com relatos de tratamento com seres humanos na clínica de aumento de ansiedade, somente durante os primeiros dias de administração (74). Outra questão a ser considerada, é a heterogeneidade de sintomas apresentados pelos transtornos ansiosos. A fluoxetina, por exemplo, não responde adequadamente no tratamento da ansiedade generalizada. No entanto, é usada com eficácia em transtorno obsessivo compulsivo, fobia social, distúrbio de pânico e bulimia nervosa (55, 66).

A partir da experiência com a utilização experimental e clínica dos inibidores seletivos de recaptção da serotonina, quer seja como instrumento farmacológico de pesquisa em nível celular, ou, seja como arsenal farmacoterápico, temos

evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico na gênese do substrato anátomo-funcional da ansiedade.

Apesar da escassez de estudos envolvendo ansiedade e antidepressivos no período neonatal, testamos, nesse modelo, a hipótese de que a administração, no início da vida, de fluoxetina acarreta perfil ansiogênico e neofobia, para corroborar a participação de mecanismos serotoninérgicos na ontogênese da depressão e da ansiedade.

Com os resultados deste estudo, observa-se que a manipulação precoce do sistema nervoso com inibidores seletivos de recaptção de serotonina parece aumentar a disponibilidade sináptica da 5-HT, reduzindo o comportamento depressivo no teste de nado forçado (75,76). Essa redução observada, através dos testes comportamentais, parece estar associada com mecanismos neuroadaptativos desenvolvidos no período neonatal. Estes processos parecem persistir até a vida adulta e possivelmente envolvem a participação do sistema serotoninérgico, que embora não seja o único neurotransmissor a mediar os efeitos encontrados, não há dúvida da sua participação. Os resultados deste trabalho corroboram com outros trabalhos já publicados (77,76,47).

Nesse sentido, surgiu dos resultados desse trabalho uma questão: será que a diminuição do comportamento depressivo estaria associada à presença de um perfil ansiogênico? Ao testarmos essa hipótese através da avaliação da ansiedade no labirinto elevado em cruz, a administração da fluoxetina no período neonatal não provocou alteração. Estes resultados confirmam e corroboram os achados de Silva & Brandão (1999) e contrapõem-se àqueles de Poltronieri *et al.* (2003) e Ansorge *et al.* (2004) (78,79). Contudo, ao se submeter os animais tratados com

fluoxetina, no período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso, a estímulo estressante de choque nas patas, observou-se menor percentual do número de entradas nos braços fechados e menor percentual do número total de entradas. Este resultado parece indicar redução da atividade locomotora, sugerindo um efeito sedativo. Ademais, há achados na literatura com a hipótese de que efeitos de drogas sobre o sistema serotoninérgico são mais evidentes, quando o animal é submetido a agentes estressores (62).

Conclusões

7. CONCLUSÕES:

- A administração crônica de fluoxetina (FLU) durante o período crítico de desenvolvimento do SN acarreta alterações ao desenvolvimento-somático, provocando redução do peso corporal.
- O tratamento crônico com a FLU, durante o período crítico do desenvolvimento do SN, induz a alteração comportamental permanente, no modelo experimental do Nado Forçado, como: diminuição da susceptibilidade à depressão.
- O tratamento neonatal crônico com FLU 10 mg/Kg não altera a ansiedade, no Labirinto elevado em cruz, mas reduz a atividade locomotora de ratos estressados.
- A agressão farmacológica durante o período crítico do desenvolvimento do SN resulta em alterações no desenvolvimento deste sistema. Tais alterações ao que parece persistem até a vida adulta e possivelmente envolvem a modificações no sistema serotoninérgico.

Perspectivas

8. PERSPECTIVAS:

O papel do sistema serotoninérgico no comportamento emocional envolve mecanismos complexos e ainda não totalmente esclarecidos, estimulando a contínua busca de explicações. A utilização de fármacos como instrumento para investigação deste sistema é ainda uma forma bastante contundente. Desta forma, sugerimos algumas perspectivas para futuros trabalhos:

- (1) Fazer curva dose-resposta com 5 mg/Kg, 15 mg/Kg e 20 mg/Kg para melhor visualizar alterações comportamentais de depressão e ansiedade experimentais;
- (2) Investigar a participação de receptores serotoninérgicos nos aspectos estudados, para isso utilizando drogas agonistas e/ou antagonistas destes receptores;
- (3) Estudar os efeitos dos ISRS em outros testes como: labirinto em T-elevado e open field, com o objetivo de avaliar se estes aspectos teriam influenciado os resultados apresentados;
- (4) Estudar os efeitos morfofisiológicos dos ISRS nas regiões cerebrais que envolvem a ansiedade.

Referências Bibliográficas

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. KOLETZKO B AP, BINDELS JG, BUNG P, FERRÉ P, GIL A, LENTZE M J, ROBERFROID M, STROBEL S. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *British Journal of Nutrition*. 1998;80:S5 - S45.
2. TURLEJSKI K. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 1996;56:619-636.
3. MORGANE PJ, AUSTIN-LAFRANCE RJ, BRONZINO J, TONKISS J, DIAZ-CINTRA S, CINTRA L, KEMPER T, GALLER JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1993;17:91-128.
4. WINICK M. Malnutrition and brain development. *The Journal of Pediatrics* 1969;34(5).
5. DOBBING J. Undernutrition and the developing brain. *American Journal of Diseases in Children*. 1970;120(1):411-415.
6. MANHÃES DE CASTRO R, CABRAL FILHO JE, COSTA JA, COSTA FBR, GALINDO MAC, HECKSHER CA. Neonatal treatment with naloxone causes permanent hyperalgesia in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1993;26:747-751.
7. YAN W, WILSON CC, HARING JH. Effects of neonatal serotonin depletion on the development of rat dentate granule cells. *Developmental Brain Research* 1997a;98:177-184.
8. MANHÃES DE CASTRO R, BARRETO MEDEIROS JM, MENDES DA SILVA, C, PIRES LMP, GUEDES RCA, CABRAL FILHO JE, COSTA JA. Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective reuptake inhibitor. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2001;34(1):121-124.

* A formatação deste trabalho foi feita de acordo com as normas padronizadas em Vancouver.

9. MORGANE PJ, MILLER M, KEMPER T, STERN W, FORBES W, HALL R, BRONZINO J, KISSANE J, HAWRYLEWICK, RESNICK O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1978;2:137-230.
10. SMART JL, DOBBING J. Vulnerability of developing brain. VI. Relative effects of fetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Research* 1971;33:303 - 314.
11. DUBOVICKY M, UJHÁZY E, JEZOVÁ D. Perinatal Brain damage and neurobehavioral alterations in postnatal development. *Slovakofarma Revue* 1996;6(2-3):46-49.
12. RESNICK O, MILLER M, FORBES W, HALL R, KEMPER T, BRONZINO J, MORGANE PJ. Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1979;3:233-246.
13. PICANÇO-DINIZ CW, ARAÚJO MS, BORBA JMC, GUEDES RCA. NADPH-Diaphorase containing and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutritional Neuroscience* 1998;1:35-48.
14. SOBOTKA TJ, COOK MP, BRODIE RE. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Research* 1974;65:443-457.
15. GUEDES R. O cérebro desnutrido. *Ciência Hoje* 1985;3(18):61-65.
16. PÁLEN K, THÖRNEBY L, EMANUELSSON H. Effects of serotonin antagonists on chick embryogenesis. *Wilhelm Roux's Archives Developmental Biology* 1979;187:89-103.
17. WHITAKER-AZMITIA PM. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacological Reviews* 1991;43(4):553-561.

18. YAN W, WILSON CC, HARING JH. 5-HT_{1a} receptors mediate the neurotrophic effect of serotonin on developing dentate granule cells. *Developmental Brain Research* 1997b;98:185-190.
19. LAUDER JM. Ontogeny of serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;600:297-314.
20. LIU J & LAUDER JM. Serotonin promotes region-specific glial influences on cultures serotonin and dopamine neurons. *Glia* 1992;5:306-317.
21. LIDOV HGW & MOLLIVER ME. A immunohistochemical study of serotonin in neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res.* 1982;8:389-416.
22. MANHÃES DE CASTRO R. Etude de la Participation des Recepteurs centraux de la serotonine du type 5-HT_{1b} dans les reactions cerebrales au stress et dans le mecanisme d'action des antidepressiveurs. Paris, France. 1995. Universite Pierre et Marie Curie.
23. GRAHAME-SMITH DG. Tryptophan hydroxylation in brain. *Biochemical Biophysical Research Communications* 1964;16:586.
24. YOUNG SN, SOURKES, TL. Tryptophan in the central nervous system: regulation and significance. *Advances in Neurochemistry.* 1977;2.
25. KUHN DM, WOLF WA, YODIM MBH. Serotonin neurochemistry revisited- a look at some new axioms. *Neurochemistry International.* 1986;8:141.
26. COOPER JR, BLOOM FE, ROTH RH. Serotonin (5-Hydroxytryptamine). *The Biochemical Basis of Neuropharmacology.* New York: Oxford University Press 1978(3).
27. FERNSTROM JD. Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiological Reviews* 1983;63(2):484-546.
28. BORNE RF. Serotonin: the neurotransmitter for the '90s. *Drugs Topics* 1994;10:108.

29. GRAEFF FG. Sistemas serotoninérgicos. In: MIGUEL, E.C., RAUCH, S.L., LECKMAN, J.F. (Eds.). Neuropsiquiatria dos Gânglios da Base. 2a edição traduzida. São Paulo. Lemos Editorial 1998;2:59-79.
30. BARNES NM ST. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999;38:1083-1152.
31. MANHÃES DE CASTRO R, BOLANOS-JIMENEZ F, SEGUIN L, SARHAN H, DRIEU K, FILLION G. Sub-chronic cold stress reduces 5-HT_{1a} receptor responsiveness in old but not in the young rat. *Neuroscience Letters* 1996;203(1):21-24.
32. BOLANOS-JIMENEZ F, MANHÃES DE CASTRO R, SEGUIN L, CLOEZ-TAYARANI I, MONNERET V, DRIEU K, FILLION G. Effects of stress on functional properties of pre- and postsynaptic 5-HT_{1b} receptors in the rat brain. *European Journal of Pharmacology* 1995;294(2):531-540.
33. CHOPIN P, MORET C, BRILEY M. Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine_{1B/1D} receptor ligands. *Pharmacology & Therapeutics* 1994;62:385-405.
34. BLUNDELL JE, LAWTON CL, HALFORD JCG. Serotonin, Eating Behavior and Fat Intake. *Obesity Research* 1995;3.
35. DE VRY J. 5-HT_{1A} receptor agonists. Recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology* 1995;121:1-26.
36. MICZEC KA. The psychopharmacology of aggression. In: *Handbook of Psychopharmacology, Vol. 19. New Directions in Behavioral Pharmacology.* Iversen, L.L., Iversen, S. D., Zinder, S. H. (Eds.). Plenum Press: New York 1987:183-328.
37. YUSUF HKM. Malnutrition, environment, and brain function. In: *Understanding the brain and its development.* 1992.
38. TEODÓSIO NR, CABRAL FILHO JE, GUEDES RCA, COSTA JA, COSTA FRB, SILVA AT. Learned and emotional behavior in chronically malnourished rats. *Acta Physiological Latinoamericana* 1979;29:255-262.

39. FERRIS CF, STOLBERG T, DELVILLE Y. Serotonin regulation of aggressive behavior in male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Behavioral Neuroscience* 1999;113(4):804-815.
40. MELTZER HY. Role of serotonin in depression. *Annals New York Academy of Sciences* 1990;600:486-495.
41. MANHÃES DE CASTRO R, PEREGRINO A, SOURCEY E, BARRETO MEDEIROS JM, DEIRÓ TCBJ. Depression: Repercussion In Serotonergic System. *Neurobiologia* 1998;61(2):45-55.
42. JAISWAL AK, UPADHYAY SN, SATYAN KS, BHATTACHARYA SK. Behavioural effects of prenatal and postnatal undernutrition in rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 1996;34(12):1216-1219.
43. ALLIKMETS L, MATTO V, HARRO J. Do the antidepressants have anxiogenic action? *Biol Psychiatry. Department of Pharmacology.* 1996;39:500 - 666.
44. SILVA RCB, BRANDÃO ML. Acute and chronic effects of Gepirone and Fluoxetine in rats tested in the Elevated Plus - Maze: an ethological analyses. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2000;65(2):209 - 216.
45. NEWMAN ME, LERER B, SHAPIRA B. 5-HT_{1A} receptors-mediated effects of antidepressants. *Biol. Psychiatry.* 1993;17:1-19.
46. RUDOLPH RL, FEIGER AD. Estudo duplo-cego, randomizado, placebo-controlado de venlafaxina de liberação controlada (XR) administrada uma vez ao dia e fluoxetina para o tratamento de depressão. *Journal of Affective Disorders* 1999;56:171-181.
47. MENDES DA SILVA C, LOPES DE SOUZA S, BARRETO-MEDEIROS JM, FREITAS-SILVA SR, ANTUNES DEC, CUNHA ADU, RIBAS VR, FRANÇA MFS, NOGUEIRA MI, MANHÃES DE CASTRO R. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 2002;60(4):928 - 931.

48. ASBERG M, TRASKMAN L, THOREN P. 5-HIAA in the cerebrospinal fluid: a biochemical suicide predictor? *Archives of General Psychiatry* 1976;33:1193-1197.
49. MOELLER FG, ALLEN T, CHEREK DR, DOUGHERTY DM, LANE S, SWANN AC. Ipsapirone neuroendocrine challenge: relationship to aggression as measured in the human laboratory. *Psychiatry Research, Annals New York Academy of Sciences* 1998;81:31-38.
50. EVENDEN J. Impulsivity: a discussion of clinical and experimental findings. *Journal of Psychopharmacology* 1999;13(2):180-192.
51. FISHBECK KL, RASMUSSEN KM. Effect of repeated cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *Journal of Nutrition* 1987;117:1967-1975.
52. PORSOLT RD, LE PICHON M, JALFRE M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977;266:730-732.
53. LYNN G, KIRBY & IRWIN LUCKI. Interaction Between the Forced Swimming Test and Fluoxetine Treatment on Extracellular 5-Hydroxytryptamine and 5-Hydroxyindoleacetic Acid in the Rat¹. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1997;282(2):967-976.
54. ARMARIO A, GAVALDÁ A, MERI O. Forced swimming test in rats: effects of desipramine administration and the period of exposure to the test on struggling behavior, swimming, immobility and defaecation rate. *European Journal of Pharmacology* 1988;158:207-212.
55. SILVA MTA, ALVES CRR, SANTAREM EMM. Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1999;32:333 - 339.
56. PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Neurosci. Methods* 1985;14:149-167.

57. TREIT D, FUNDYTUS M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1985;31:958-962.
58. TREIT D, MENARD J, ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1993;44:463-469.
59. GRIEBEL G, RODGERS RJ, PERRAULT G, SANGER DJ. Risk assessment behaviour: Evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;57(4):817-827.
60. LIGHTOWLER S, WOOD M, BROWN T, GLEN A, BLACKBURN T, TULLOCH I, KENNETT G. An investigation of the mechanism responsible for fluoxetine-induced hypophagia in rats. *European Journal of Pharmacology* 1996;296:137-143.
61. DEIRÓ, TCBJ. Desenvolvimento somático e sensório-motor e padrão adulto do consumo alimentar, em ratos: efeitos do tratamento neonatal com inibidor de recaptação da serotonina durante o período de crescimento rápido de encéfalo. [Dissertação de Mestrado]. Recife: UFPE; 1998.
62. KELLIHER P, KELLY JP, LEONARD BE, SÁNCHEZ C. Effects of acute and chronic administration of selective monoamine re-uptake inhibitors in the rat forced swim test. *Psychoneuroendocrinology* 2003;28:332-347.
63. HANSEN HH, SÁNCHEZ C, MEIER E. Neonatal administration of the selective serotonin reuptake inhibitor Lu-10-134-C increases forced swimming-induced immobility in adult rats: a putative animal model of depression? *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1997;283(3):1333-1341.
64. GERSNER R, DAR DE, SHABAT-SIMON M, ZANGEN A. Behavioral analysis during the forced swimming test using a joystick device. *Journal of Neuroscience Methods* 2005;143:117-121.
65. HIEMKE C HS. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics* 2000;85:11-28.

66. GRAEFF F. Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico Serotonin, periaqueductal gray matter and panic disorder. Rev Bras Psiquiatr 2003;25:42-45.
67. HANDLEY SL, Mc BLANE JW. Opposite effects of fluoxetine in two animal models of anxiety. Br. J. Pharmacol. 1993;107:446.
68. GRIEBEL G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: More than 30 years of research. Pharmacol. Ther. 1995;65:319-395.
69. ARTIGAS F. 5 - HT and antidepressants: new views from microdialysis studies. Trends in Pharmacological Sciences 1993;14:262.
70. BLIER P, DE MONTIGNY C & CHAPUT Y. Modification of the serotonina system by the antidepressant treatments: implications for the therapeutic response in major depression. Journal of Clinical Psychopharmacology 1987;7:24S - 35S.
71. STANFORD SC. Prozac: panacea or puzzle? Trends in Pharmacological Sciences 1996;17:150 - 154.
72. KSHAMA, D; MUNONYEDI, U. Modulation of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms. Behav. Neural. Biol. 1990;54:234-253.
73. SÁNCHEZ C & MEIER E. Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression: are they all alike? Psychopharmacology 1997;129:197-205.
74. GORMAN JM, LIEBOWITZ MR, FYER AJ, GOETZ D, CAMPEAS RB, FYER MR, DAVIES SO & KLEIN DF. An open trial of fluoxetine in the treatment of panic attacks. Journal of Clinical Psychopharmacology 1987;7:329-332.
75. PAGE ME, DETKE MJ, DALVI A, KIRBY LG, LUCKI I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. Psychopharmacology (Berl) 1999;142(2):162-167.

76. MENDES DA SILVA C, BARRETO MEDEIROS JM, MANHÃES DE CASTRO R, ANTUNES DECM, CUNHA ADU, RIBAS VR, FRANÇA MF. Tratamento neonatal com inibidor seletivo de recaptura da serotonina: evolução nutricional e efeito tardio sobre a depressão experimental. *Neurobiologia* 2000;63:61-65.
77. McGUIRK J, SILVESTORNE T. The effect of the 5-HT re-uptake inhibitor fluoxetine on food intake and body weight in healthy male subjects. *Obesity* 1990;14:361.
78. POLTRONIERI SC, ZANGROSSI JRH, VIANA MB. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behavioral Brain Research*. 2003.
79. ANSORGE MS, ZHOU M, LIRA A, HEN R, GINGRICH JA. Early-Life Blockade of the 5-HT Transporter Alters Emotional Behavior in Adult Mice. *Science* 2004;306.

Anexo

Cojma



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Recife, 10 de fevereiro de 2004

Ofício nº 07/2004
Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Prof. Raul Manhães de Castro
Departamento de Nutrição- CCS/UFPE

Após o recebimento de seu projeto de pesquisa intitulado “**Tratamento neonatal com inibidor de recaptção de serotonina: Avaliação comportamental de ansiedade em ratos adultos**”, processo Nº 014846/2003-08, os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) analisaram os aspectos relativos aos protocolos experimentais adotados.

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

De acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos, ressaltamos ainda que o sacrifício dos animais experimentais, realizado no presente trabalho, justifica-se pelo fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico. Diante do exposto, emitimos um parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Prof. Miriam Camargo Guarnieri
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Prof. Belmira Lara da S. Andrade da Costa
Vice-Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

recebi em 11/02/04