

ÂNGELA AMÂNCIO DOS SANTOS

**NUTRIÇÃO, SISTEMAS SEROTONINÉRGICO E
NITRÉRGICO: ESTUDO MORFO-FUNCIONAL EM RATOS
JOVENS E ADULTOS**

RECIFE

2006

Ângela Amâncio dos Santos

**Nutrição, Sistemas Serotoninérgico e Nitrérgico: Estudo Morfo-
Funcional em Ratos Jovens e Adultos**

Recife

2006

Ângela Amâncio dos Santos

**Nutrição, Sistemas Serotoninérgico e Nitrérgico: Estudo Morfo-
Funcional em Ratos Jovens e Adultos**

Tese apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Nutrição do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do grau
de Doutor em Nutrição.

Orientador: Professor Rubem Carlos Araújo Guedes

Recife

2006

Santos, Ângela Amâncio

Nutrição, sistemas serotoninérgico e nitrérgico : estudo morfo-funcional em ratos jovens e adultos / Ângela Amâncio dos Santos. – Recife : O Autor, 2006.

xv, 92 folhas ; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Nutrição – Desenvolvimento do sistema nervoso – Ratos jovens e adultos. 2. Dieta Básica Regional – Desnutrição. 3. Sistemas serotoninérgico e nitrérgico – Depressão alastrante, NADPH-diaforase e proliferação celular. I. Título.

**612.39
612.3**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2006-131**

Nutrição, Sistemas Serotoninérgico e Nitrérgico:
Estudo Morfo-Funcional em Ratos Jovens e Adultos

Ângela Amâncio dos Santos

Data de Aprovação: 18 / 04 / 06

Banca Examinadora

1. Prof. Beatriz Monteiro Longo

Beatriz Monteiro Longo

2. Prof. Belmira Lara S. A. da Costa

Belmira Lara S. A. da Costa

3. Prof. Juliana M. Carrazzone Borba

Juliana M. Carrazzone Borba

4. Prof. Sebastião José de Melo

Sebastião José de Melo

4. Prof. Raul Manhães de Castro

Raul Manhães de Castro

Recife

2006

Amâncio-dos-Santos, A. Nutrição, Sistemas
Serotoninérgico e Nitrérgico: Estudo Morfo-
Funcional em Ratos Jovens e Adultos, 2006.

“... Knowledge belongs to humanity and is the torch which illuminates the world.”

Louis Pasteur

Agradecimentos

Meu agradecimento especial ao Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes, ao Prof. Barry L. Jacobs, à minha família, às estagiárias Denise Lima, Patrícia Pinheiro, Mirella Ozias, Manuella Oliveira e Natália Guimarães, à professora Maria Inês Nogueira e Luiz Takase, ao professor Raul Manhães de Castro, a todos os que fazem parte do Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio e do Neuroscience Program (Green Hall – Psychology Department, Princeton University), aos Departamentos de Nutrição e de Patologia, a todos os meus amigos e parentes.

A todos sou imensamente grata e desejo que o Eterno Deus, nosso pai celestial, recompense com suas ricas bênçãos a cada um dos vocês.

Agradeço também ao CNPq, cujo suporte financeiro foi indispensável em mais essa etapa da minha formação.

*Gracias a la vida,
que me ha dado tanto...*

Violeta Parra

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT	XV
INTRODUÇÃO.....	1
1. Nutrição e Desenvolvimento do Sistema Nervoso	1
2. Sistema Serotoninérgico	3
3. Sistema Nitrérgico	5
4. A Depressão Alastrante Cortical	7
5. Sistema Serotoninérgico e Neurogênese	8
HIPÓTESES	11
OBJETIVOS.....	12
1. Geral	12
2. Específicos.....	12
MÉTODOS.....	14
1. Animais.....	14
2. Grupos Experimentais	14

2.1. Manipulação Nutricional	14
2.2. Tratamento Farmacológico	16
3. Determinações Ponderais	19
3.1. Pesos Corporais	19
3.2. Pesos Encefálicos	19
4. Procedimento Cirúrgico	20
5. Estimulação Cortical e Registro Eletrofisiológico	21
5.1. Aplicação Tópica de Fluoxetina	21
6. Estudo Morfológico	22
6.1. Análises Morfométricas	23
7. Neurogênese Hipocampal	25
7.1. Neurogênese em Ratos Jovens (25 dias)	25
7.2. Neurogênese em Ratos Adultos (60 dias)	26
7.3. Reação Imunohistoquímica para BrdU	28
8. Análise Estatística	29
 RESULTADOS	 31
1. Peso Corporal	31
1.1. Efeito do Tratamento Farmacológico	31
1.2. Efeito do Estresse das Injeções	31
1.3. Efeito do Tratamento Nutricional	32
2. Peso Encefálico	32
3. Velocidade de propagação da DA	33
3.1. Efeito do Tratamento Farmacológico Sistêmico	33
3.2. Efeito do Estresse da Injeção	34
3.3. Efeito do tratamento Nutricional	34
3.4. Efeito do Tratamento Farmacológico Tópico	45
4. Análises Morfométricas	48
4.1. Número de Neurônios NADPH-d Positivos	48
4.2. Área do Corpo Celular de Neurônios NADPH-d Positivos	49
5. Neurogênese	55
5.1. Relação entre Neurogênese e Estresse	55

DISCUSSÃO	59
CONCLUSÃO.....	75
PERSPECTIVAS.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	93

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-Hidroxitriptamina, serotonina
ANOVA	Análise de variância
BrdU	Bromodeoxiuridina
C	Contensão
D	Desnutrido
DA	Depressão alastrante cortical
DAB	Diaminobenzidina
DBR	Dieta básica regional
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECoG	Eletrocorticograma
e.p.m.	Erro padrão da média
F	Fluoxetina
i.p.	Intraperitoneal
IgG	Imunoglobulina
I	Ingênuo
ISRS	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
LAFINNT	Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio
L	Lipopolissacarídeo
N	Nutrido
NADPH-d	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-diaforase
NCL	Novocastra Laboratories
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salina
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
s.c.	Subcutâneo
S	Solução salina; solução isotônica de sais; Ringer Simplificado
T	Tópico (a)
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VLV	Variação lenta de voltagem

LISTA DE FIGURAS

01 – Peso corporal	36
02 – Peso encefálico relativo de animais nutridos.....	38
03 – Peso encefálico relativo de animais nutridos e desnutridos	39
04 – Registros eletrofisiológicos da depressão alastrante de ratos jovens nutridos	42
05 – Registros eletrofisiológicos da depressão alastrante de ratos jovens	43
desnutridos	
06 – Registros eletrofisiológicos da depressão alastrante de ratos adultos	44
nutridos e desnutridos	
07 – Aplicação tópica de fluoxetina	46
08 – Registros eletrofisiológicos da depressão alastrante de ratos adultos	47
tratados topicamente com fluoxetina	
09 – Número de neurônios NADPH-d positivos nos distintos hemisférios	50
cerebrais	
10 – Número total de neurônios NADPH-d positivos	51
11 – Área do corpo celular de neurônios NADPH-d positivos nos distintos	52
hemisférios cerebrais	
12 – Área total do corpo celular de neurônios NADPH-d positivos	53
13 – Fotomicrografias de células NADPH-d positivas	54
14 – Fotomicrografias de hipocampus de ratos marcados com anti-BrdU.....	57

LISTA DE TABELAS

01 – Grupos experimentais	18
02 – Grupos experimentais para neurogênese hipocampal	30
03 – Evolução ponderal	35
04 – Pesos encefálicos	37
05 – Velocidades de propagação da depressão alastrante em ratos jovens	40
06 – Velocidades de propagação da depressão alastrante em ratos adultos	41
07 – Número de neurônios hipocampais BrdU positivos	56
08 – Número de neurônios hipocampais BrdU positivos de ratos submetidos a agentes estressores	58

RESUMO

Estudo Eletrofisiológico: Ratos Wistar foram injetados durante o período de lactação com fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (5, 10, 20, ou 40 mg/kg/d por via subcutânea) e o fenômeno da depressão alastrante da atividade elétrica cerebral (**DA**) foi registrado na superfície cortical desses animais imediatamente após o desmame (25-30 dias de vida). Em um grupo adicional (10 mg/kg) a **DA** foi registrada aos 60-70 dias. Quando comparada às duas condições controle (injeção com solução salina ou sem injeção - “ingênuos”), a fluoxetina reduziu ($P<0,05$) a velocidade da **DA** nos ratos jovens de forma dose-dependente em 4%, 6%, 16% e 15%, respectivamente, e nos adultos em 13%. Em um outro experimento com ratos adultos, a aplicação tópica cortical de fluoxetina (5 e 10 mg/ml) sobre a dura-máter intacta, durante 10 min, reduziu a velocidade da **DA** de modo diretamente proporcional à concentração aplicada (reduções máximas de 7,6% e 43,3%; $P<0,05$). A propagação da **DA** foi bloqueada em 4 dos 14 ratos tratados topicamente com a concentração mais alta de fluoxetina (10 mg/ml). Este efeito tópico da fluoxetina foi revertido após lavagem, da região tratada, com solução salina. Em ratos precocemente desnutridos, a fluoxetina aplicada durante o período de aleitamento (10 mg/kg/d, s.c.) e topicamente (10 mg/ml) também reduziu ($P<0,05$) as velocidades da **DA** em 18 e 22% para o tratamento sistêmico (nos animais jovens e adultos, respectivamente) e em 22,4% para o tratamento tópico.

Estudo Morfológico: Em ratos Wistar tratados precocemente com fluoxetina (10 mg/kg/d, s.c.) não houve modificações apreciáveis no número, nem na área do corpo celular de neurônios nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-diaforase (**NADPH-d**) positivos, independentemente do estado nutricional.

Neurogênese Hipocampal: A fluoxetina não alterou o número de células hipocampusais positivas à bromodeoxiuridina (marcador de proliferação celular) em ratos Sprague-Dawley jovens ou adultos, submetidos ou não a uma condição de estresse.

Conclusões: 1) A presente ação da fluoxetina suporta a hipótese de uma influência serotoninérgica antagonista sobre a **DA**; 2) A desnutrição precoce não impede os efeitos da fluoxetina; 3) A neurogênese hipocampal, bem como as células **NADPH-d**-positivas (que são produtoras de óxido nítrico) parecem ser resistentes ao tratamento precoce com esse inibidor seletivo da recaptação de serotonina.

ABSTRACT

Wistar rats were injected subcutaneously during the lactation period with fluoxetine (5, 10, 20, or 40 mg/kg/d) and cortical spreading depression (SD) was recorded immediately after weaning (25-30 days of life). An additional group (10 mg/kg) was SD-recorded at 60-70 days. As compared to the saline-injected or “ingenuous” controls, fluoxetine dose-dependently reduced ($P<0.05$) SD velocities in the young rats by 4, 6, 16 and 15%, respectively, and in adult rats by 13%. In another experiment, in adult rats, topical cortical application of fluoxetine (5- and 10 mg/ml solutions over the intact dura-mater for 10 min) dose-dependently reduced SD velocity (7.6% and 43.3% maximal reductions; $P<0.05$). SD propagation was blocked in 4 out of the 14 rats topically treated with the highest fluoxetine concentration (10 mg/ml). This topical fluoxetine effect was reverted after flushing the treated region with saline. In early malnourished rats, fluoxetine applied during the suckling period (10 mg/kg/d, s.c.) and topically (10 mg/ml) also reduced ($P<0.05$) SD velocities by 18 and 22% for the systemic treatment (young and adult animals, respectively) and by 22.4% for the topical one. In contrast, early fluoxetine (10 mg/kg/d, s.c.) treatment did not change the number and the cell body area of neurons positive to the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) in well- and malnourished Wistar rats, as well as the number of hippocampal cells positive to bromodeoxyuridine in young and adult Sprague-Dawley rats, submitted or not to a stress condition. The present fluoxetine action supports the hypothesis of an antagonistic serotonergic influence on SD. Data also suggest that early malnutrition does not greatly affect fluoxetine effects and that hippocampal neurogenesis and NADPH-d cells seem to be resistant to the early fluoxetine treatment.

INTRODUÇÃO

A nutrição é o processo através do qual os seres vivos obtêm a energia imprescindível à sobrevivência (Mahan e Escott-Stump, 2005). Uma vez que os animais adquirem os nutrientes através dos alimentos, uma alimentação adequada é condição *sine qua non* para uma vida saudável. Grandes progressos têm sido documentados na área de produção e tecnologia de alimentos de forma que toda população mundial poderia ter acesso a uma alimentação quantitativa e qualitativamente suficiente. Contudo, a fome e a desnutrição continuam a assolar inúmeras pessoas em todo o mundo com grande impacto (Onis *et al.*, 1993), inclusive no Brasil.

A desnutrição pode ser acarretada pela deficiência em um ou mais nutrientes da alimentação diária. Ela tem sido associada com seqüelas físicas, mentais e emocionais que representam um ônus considerável tanto para a economia, como para a sociedade, sendo uma situação inaceitável, sobretudo do ponto de vista ético e moral.

O presente trabalho foi realizado com o intuito de investigar as repercussões da ativação do sistema serotoninérgico em um período de intenso desenvolvimento do sistema nervoso sobre a morfologia e a fisiologia do cérebro de ratos normais e desnutridos.

1. NUTRIÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO

A nutrição é importante para o desenvolvimento do organismo como um todo. Com relação ao desenvolvimento do sistema nervoso, parece que ela exerce um papel de destaque (Morgane *et al.*, 1993).

Estudos recentes têm mostrado que a formação de novas células no sistema nervoso continua durante toda a vida, pelo menos em algumas áreas cerebrais (Altman e Das, 1965; Cameron e McKay, 2001) tanto em animais, como em humanos (Eriksson *et al.*, 1998). Contudo, o período de desenvolvimento mais intenso do sistema nervoso ocorre nas fases iniciais da vida; é o chamado período de crescimento rápido do cérebro. Nos seres humanos essa fase se inicia intra-útero e se estende principalmente até os primeiros dois a quatro anos de vida. No rato albino, o mamífero mais usado para estudos experimentais sobre o tema, ela compreende as três primeiras semanas de vida pós-natal, ou seja, o período de aleitamento (Smart e Dobbing, 1971). Devido à rapidez com que os processos de hiperplasia, hipertrofia, mielinização e migração neuronal ocorrem nessa fase, o cérebro se torna mais vulnerável às agressões do ambiente, inclusive as nutricionais e por isso essa etapa é também conhecida como período crítico do desenvolvimento cerebral (Dobbing, 1968).

Em verdade, na vigência de episódios de desnutrição, o sistema nervoso é até, de certa forma, poupado quando comparado a outros sistemas. Entretanto, diferentemente dos demais, alguns danos ocasionados ao sistema nervoso durante o período crítico de desenvolvimento poderão não mais ser revertidos, a depender da intensidade e duração da agressão ambiental, dentre elas as alterações nutricionais (Morgane *et al.*, 1993; Guedes *et al.*, 1996; Almeida *et al.*, 2002).

Os neurotransmissores, que são as substâncias químicas responsáveis pela comunicação neuronal, também podem ser afetados pela desnutrição em todas as etapas de seu metabolismo, a saber, sua síntese, armazenamento, liberação, funcionamento e degradação no sistema nervoso central. Dentre os sistemas de neurotransmissores, o serotoninérgico parece exercer um papel de destaque no que se refere a variáveis nutricionais.

2. SISTEMA SEROTONINÉRGICO

O neurotransmissor do sistema serotoninérgico é a indolamina serotonina (5-hidroxitriptamina; **5-HT**). Os neurônios produtores de **5-HT** localizam-se nos núcleos da rafe do tronco cerebral e formam o sistema eferente mais complexo do cérebro humano (Azmitia e Whitaker-Azmitia, 1995). Além disso, a **5-HT** parece mediar uma ampla variedade de ações no organismo (Glennon e Dukat, 1995), exercendo um papel chave durante o período de desenvolvimento. Os neurônios serotoninérgicos estão entre os que nascem mais precocemente no sistema nervoso central e a **5-HT** parece atuar como um fator trófico ao crescimento e desenvolvimento tanto do próprio sistema serotoninérgico, como de outros sistemas neurotransmissores cerebrais (Lauder *et al.*, 1981; Azmitia e Whitaker-Azmitia, 1995).

Associações entre nutrição e sistema serotoninérgico têm sido demonstradas por meio de várias evidências. Por exemplo, a serotonina do cérebro só poderá ser sintetizada a partir do aminoácido essencial L -triptofano. Devido a sua essencialidade, o L -triptofano tem de ser fornecido ao organismo, o que comumente ocorre através da dieta pela ingestão de alimentos, principalmente de origem animal (Fernstrom, 1983).

Além disso, outras evidências mostram que a serotonina exerce um papel importante sobre o comportamento alimentar, considerada como sendo um agente capaz de promover a saciedade (Blundell, 1992; Leibowitz e Shor-Posner, 1986; Simansky, 1996; Orosco e Gerozissis, 2001). Com relação a esse aspecto, tem sido relatado que alguns tipos de obesidade parecem estar relacionados a disfunções do sistema serotoninérgico (Wurtman e Wurtman, 1995); e que desordens psiquiátricas relacionadas a distúrbios alimentares, tais como a anorexia nervosa e a bulimia também podem ser influenciadas por alterações desse sistema (Monteleone *et al.*, 2000).

Como mencionado anteriormente, o sistema serotoninérgico, da mesma forma que afeta o estado nutricional, pode ser por ele modificado. Há relatos na literatura de um provável aumento da atividade desse sistema resultante de episódios de desnutrição durante o período crítico de desenvolvimento do cérebro (Manjarrez *et al.*, 1998; Kehoe *et al.*, 2001). Adicionalmente, tem sido observado aumento na concentração de triptofano cerebral durante a inanição aguda (Huether *et al.*, 1998). Todavia, quanto ao seu aspecto funcional, há evidências de que a resposta comportamental do sistema serotoninérgico subsequente à sua estimulação farmacológica pode se tornar reduzida em decorrência da desnutrição precoce, se comparada com aquela de animais nutricionalmente normais (Barreto-Medeiros *et al.* 2002). Em relação a esse aspecto, contudo, outro estudo eletrofisiológico não encontrou diferenças significativas entre animais nutridos e desnutridos quando de suas respostas ao tratamento farmacológico com citalopram, uma substância capaz de aumentar a disponibilidade sináptica de **5-HT** (Guedes *et al.*, 2002).

Existem inúmeras maneiras de se estudar um determinado sistema neurotransmissor. Nesse trabalho foi estudada a ativação do sistema serotoninérgico, utilizando-se um instrumento farmacológico, a fluoxetina. Esse fármaco pertence a uma classe de medicamentos conhecida como inibidores seletivos da recaptação de **5-HT** (**ISRS**), cujo mecanismo de ação principal é o aumento da disponibilidade daquela amina na fenda sináptica, o que pode acentuar seu papel fisiológico em receptores serotoninérgicos (Hiemke e Härtter, 2000). Essas drogas inibem a captação seletiva de serotonina e possuem pouca ou nenhuma afinidade por receptores muscarínicos, adrenérgicos, dopaminérgicos, histamínicos ou serotoninérgicos (Ross, 1982; Graeff, 1998; Hiemke e Härtter, 2000).

A fluoxetina é um **ISRS** largamente utilizado na clínica médica para o tratamento de transtornos neuropsiquiátricos (Wong *et al.*, 2005). Esta droga foi o primeiro **ISRS** disponível para uso clínico na maioria dos países, inclusive na América e, dentre os demais fármacos dessa classe, é considerado como um dos que possui maior tempo de meia-vida em humanos, cerca de um a quatro dias (Hiemke e Härtter, 2000).

A ação antidepressiva da fluoxetina é bastante conhecida em todo mundo. Todavia, um número considerável de pacientes que sofrem de depressão é resistente ao tratamento com antidepressivos, inclusive com a fluoxetina (Nelson, 2003). Assim, há um corpo crescente de investigações associando a utilização dessa classe de medicamentos, os **ISRS**, com fármacos que agem em outros sistemas de neurotransmissores a fim de se obter resposta terapêutica mais eficaz (Harkin *et al.*, 2004). O sistema nitrérgico é um dos que tem sido manipulado para amplificar o papel antidepressivo das drogas que ativam o sistema serotoninérgico (Harkin *et al.*, 2004).

3. SISTEMA NITRÉRGICO

O neurotransmissor do sistema nitrérgico é o óxido nítrico (**NO**). O **NO** é um gás difusível, implicado com a plasticidade sináptica durante o desenvolvimento cerebral e com o refinamento dos circuitos neurais do adulto (Bohme *et al.*, 1991; Schuman e Madison, 1991; Friedlander *et al.*, 1992; Izumi *et al.*, 1992). Biologicamente, o **NO** é sintetizado através de uma reação, catalizada pela enzima sintase do óxido nítrico (**NOS**), entre o oxigênio molecular (O_2) e a L-arginina (Knowles *et al.*, 1989).

Interessantemente, além de seu papel no desenvolvimento do sistema nervoso, diversos estudos têm mostrado que o **NO** pode interferir com as ações da **5-HT** no controle de funções como o sono (Léger *et al.*, 1998) e a nocicepção (Wang e Nakai, 1995). Adicionalmente, foi demonstrado que o **NO** aumenta a liberação de **5-HT** (Lorrain e Hull, 1993) e inibe sua recaptação (Pöğün e Kuhar, 1994). Também tem sido mostrado que entre os corpos celulares serotoninérgicos do núcleo da rafe dorsal, uma grande proporção produz **NO** (Wotherspoon *et al.*, 1994; Léger *et al.*, 1998; Tagliaferro *et al.*, 2001). Ainda mais recentemente, o papel desse sistema no tratamento da depressão também tem sido documentado. Dados da literatura relatam que o uso de inibidores da **NOS**, a enzima chave para a síntese do **NO**, pode acentuar o efeito antidepressivo da fluoxetina, bem como o da imipramina, um antidepressivo tricíclico (Harkin *et al.*, 2004).

Assim como ocorre com o sistema serotoninérgico, é provável que o estado nutricional também possa modificar o funcionamento do sistema nitrérgico no córtex cerebral. Estudos pioneiros desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naide Teodósio (**LAFINNT**), têm mostrado que isso é verdadeiro pelo menos em termos da morfologia daquele sistema (Picanço-Diniz *et al.*, 1998; Borba *et al.*, 2000; Rocha-de-Melo *et al.*, 2004).

No **LAFINNT**, o sistema nitrérgico tem sido investigado através da técnica histoquímica para a marcação de neurônios que contêm a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-diaforase (**NADPH-d**). Dados da literatura têm descrito que neurônios produtores de **NO** possuem concomitantemente, em suas estruturas, a enzima **NADPH-d** (Garthwaite, 1988; Snyder, 1992). Nesses trabalhos, a utilização de técnicas bioquímicas, histoquímicas e imunocitoquímicas mostraram que a enzima **NADPH-d** correspondia à enzima **NOS** (Hope *et al.*, 1991; Matsumoto *et al.*, 1993) em várias

regiões cerebrais. Assim sendo, a marcação histoquímica de neurônios **NADPH-d** positivos é uma técnica que tem sido amplamente aceita para os estudos que se propõem a analisar o sistema nitrgico.

Adicionalmente, a marcação de neurônios **NADPH-d** positivos talvez possa fornecer subsídios para a compreensão dos correlatos histoquímicos de um interessante fenômeno eletrofisiológico já bem estabelecido no **LAFINNT**, conhecido como o fenômeno da depressão alastrante cortical (**DA**).

4. A DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

O fenômeno eletrofisiológico da **DA** pode ser expresso literalmente como uma diminuição (“depressão”) da atividade elétrica do tecido cerebral, que se propaga (“alastrante”) de forma concêntrica (com velocidade da ordem de 2 a 5 mm/min), do ponto onde se iniciou, para todo o restante da população neural. Esse fenômeno foi descrito por Aristides Leão (Leão, 1944) e se caracteriza como sendo uma reação reversível, neuro-humoral, que pode ser provocada por estímulos elétricos, mecânicos, químicos, resfriamento brusco, e até mesmo, em condições especiais, pela aplicação de estímulos sensoriais. A **DA** tem sido registrada na superfície dos hemisférios cerebrais de inúmeras espécies de vertebrados – anfíbios, aves e mamíferos (Bures *et al.*, 1974; Guedes *et al.*, 2005), inclusive no homem (Mayevsky *et al.*, 1996), podendo ocorrer no córtex, mas também, em várias outras estruturas extra e subcorticais (Leão, 1972; Bures *et al.*, 1974; Do Carmo e Martins-Ferreira, 1984; Streit *et al.*, 1995; Guedes *et al.*, 2005).

Desde as primeiras descrições da **DA** muitas tentativas têm sido feitas para esclarecer os mecanismos responsáveis pelo fenômeno. Acredita-se que os mesmos possam estar relacionados a patologias de interesse clínico, tais como a epilepsia (Leão, 1944; Guedes e Cavalheiro, 1997) e a enxaqueca com aura (Lehmenkühler *et al.*, 1993). Ambas essas patologias parecem ter relação com o sistema serotoninérgico (Salgado-Commissariat e Alkadhi, 1997; Gold *et al.*, 1998; Lu e Gean, 1998) e este, por sua vez, parece participar dos mecanismos da **DA**. Por exemplo, Verçosa (1997) demonstrou que o uso de uma dieta pobre em triptofano pode aumentar a susceptibilidade do córtex cerebral à **DA**. Contrariamente, o uso de fármacos que ativam o sistema serotoninérgico parece exercer um papel antagônico sobre o fenômeno (Gorelova *et al.*, 1987; Cabral-Filho *et al.*, 1995; Araújo, 1997; Guedes *et al.*, 2002), reposita essa que pode ou não ser modificada pela desnutrição precoce (Araújo, 1997; Guedes *et al.*, 2002). Assim, uma melhor compreensão dessa relação **DA** versus sistema serotoninérgico, sobretudo associada ao estado nutricional ainda se faz necessária.

Além da **DA**, o sistema serotoninérgico parece influenciar outros fenômenos no sistema nervoso central, dentre eles a plasticidade e a formação de novos neurônios (neurogênese), tanto precocemente (o que já foi discutido em tópico anterior), como na idade adulta.

5. SISTEMA SEROTONINÉRGICO E NEUROGÊNESE

Até bem pouco tempo aceitava-se como bem estabelecido que o cérebro adulto seria incapaz de formar novas células neuronais; que o cérebro uma vez formado poderia perder essas células, mas não mais gerar novos neurônios.

Contudo, recentemente, pesquisadores descobriram que pelo menos no giro dentado do hipocampo, no bulbo olfatório e em algumas áreas do córtex cerebral é possível haver produção de novos neurônios (Altman e Das, 1965; Cameron e McKay, 2001); isto é, naquelas áreas cerebrais ocorreria neurogênese durante toda a vida, mesmo quando os indivíduos atingem a idade adulta. A partir de então, diversos estudos têm sido realizados, tornando claro que a neurogênese ocorre no cérebro de várias espécies de animais, incluindo o homem (Eriksson *et al.*, 1998; Gould *et al.*, 1998). Todavia, o porque de ela persistir durante toda a vida, mas ocorrer somente em áreas restritas do cérebro, ainda continua sendo uma incógnita e objeto de crescente investigação.

Através desses estudos tem sido documentado que vários fatores podem interferir com a neurogênese. Um desses fatores parece ser os sistemas de neurotransmissores, como é o caso do sistema serotoninérgico. Por exemplo, tem sido demonstrado que a estimulação do sistema serotoninérgico em ratos adultos, inclusive com fluoxetina, parece aumentar a formação de novas células neuronais no hipocampo (Jacobs e Fornal, 1999; Malberg *et al.*, 2000; Manev *et al.*, 2001) e que talvez seja esse o mecanismo de ação daquela droga no combate a depressão (Jacobs *et al.*, 2000; Jacobs, 2002).

Além dos sistemas de neurotransmissores, fatores ambientais também podem influenciar esse fenômeno. Dentre eles, o estresse, que é considerado um dos principais fatores causais da depressão, parece ser um fator ambiental de destaque relacionado à redução da neurogênese (Gould *et al.*, 1998; Tanapat *et al.*, 1998).

Diante de todo o exposto, torna-se notória a complexidade, mas também a relevância do sistema serotoninérgico para o bom funcionamento do sistema nervoso central. Ele está associado ao desenvolvimento do sistema nervoso, à neurogênese, bem

como a outros sistemas de neurotransmissores desempenhando uma diversidade de ações (Wotherspoon *et al.*, 1994; Azmitia e Whitaker-Azmitia, 1995; Léger *et al.*, 1998; Jacobs e Fornal, 1999; Malberg *et al.*, 2000; Manev *et al.*, 2001; Tagliaferro *et al.*, 2001). Ademais, mecanismos serotoninérgicos parecem estar subjacentes na patofisiologia de várias doenças, tais como a epilepsia, a enxaqueca com aura, a depressão e muitas outras, até mesmo pelas características difusas desse sistema (Salgado-Commissariat e Alkadhi, 1997; Gold *et al.*, 1998; Lu e Gean, 1998; Jacobs *et al.*, 2000; Jacobs, 2002). Assim, apesar de ser um sistema relativamente bem conhecido, há muito ainda que ser esclarecido no que se refere às funções da serotonina. Dessa forma, esse trabalho se propôs a estudar animais (ratos) que sofreram ativação do sistema serotoninérgico nas fases iniciais da vida, bem como na idade adulta, e analisar quais seriam as repercussões advindas dessa estimulação tanto para o funcionamento, como para a morfologia e/ou morfogênese do sistema nervoso, e no quanto a variável nutricional poderia influenciar esses efeitos.

HIPÓTESES

- O tratamento com o inibidor seletivo de recaptação da serotonina, fluoxetina, durante o período de lactação do rato reduzirá a susceptibilidade cortical ao fenômeno da depressão alastrante (**DA**), bem como o número e a atividade enzimática de neurônios nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-diaforase positivos. Esse mesmo tratamento também estimulará a proliferação de novas células no hipocampo.
- A administração subcutânea de fluoxetina durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso reduzirá de forma duradoura a excitabilidade cerebral quanto à **DA**. Adicionalmente, ocasionará estimulação persistente da proliferação celular no hipocampo, reduzindo o impacto negativo, imposto pelo estresse, à formação dessas novas células.
- A vigência de desnutrição no período de crescimento rápido do encéfalo modificará o mecanismo de ação da fluoxetina.

OBJETIVOS

1. GERAL

Avaliar, em ratos nutridos e desnutridos, os possíveis efeitos do tratamento com o inibidor seletivo da recaptação de serotonina, fluoxetina, sobre as características eletrofisiológicas da depressão alastrante (**DA**) e também, sobre a morfometria de neurônios que contêm a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-diaforase (**NADPH-d** positivos) e sobre a neurogênese (formação de novos neurônios) no hipocampo.

2. ESPECÍFICOS

- Investigar, em ratos recém-desmamados (25-30 dias), nutricionalmente normais e desnutridos, os efeitos do tratamento com fluoxetina, durante o período de lactação sobre:
 - a evolução de peso corporal, bem como sobre os pesos encefálicos (estes últimos, obtidos apenas ao final do registro da **DA**);
 - a incidência e a propagação da **DA**, registrada eletrofisiologicamente no córtex cerebral;
 - as características morfométricas e o número de neurônios **NADPH-d** positivos.

- Avaliar, em ratos adultos jovens (60-70 dias), nutridos e desnutridos durante o aleitamento, um possível efeito duradouro do tratamento com fluoxetina durante o período de aleitamento sobre o fenômeno da **DA**.
- Analisar, em ratos adultos (90-150 dias), a influência do tratamento tópico, no córtex cerebral, com fluoxetina sobre as características eletrofisiológicas da **DA**, em animais nutridos e submetidos precocemente à desnutrição.
- Determinar se o tratamento precoce com fluoxetina afeta a neurogênese hipocampal em ratos jovens e quando eles alcançam a idade adulta. Adicionalmente, verificar se esse tratamento protegeria os animais contra a redução, induzida pelo estresse, da formação de novos neurônios no hipocampo.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos, da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Esses animais foram mantidos sob condições padrão do biotério, em sala à temperatura de $24 \pm 1^\circ \text{C}$, submetidos a um ciclo artificial claro-escuro de 12/12 horas (o escuro iniciando-se às dezenove horas), com livre acesso à água e comida.

Para as determinações experimentais, os ratos foram distribuídos aleatoriamente, vinte e quatro horas após o parto (primeiro dia de vida, considerando-se o dia de nascimento como dia zero), em ninhadas de seis filhotes por mãe. Em seguida, os animais foram agrupados de acordo com a descrição abaixo.

2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

2.1. Manipulação Nutricional

Conforme a dieta das respectivas mães durante o aleitamento, os animais foram divididos, em dois grupos: nutrido e desnutrido.

- Grupo Nutrido (N) – Constituído de filhotes amamentados por nutrizes que recebiam a dieta comercial “Labina” (Agribands Purina do Brasil, LTDA) usada na manutenção do biotério; essa dieta contém 23% de proteína, sendo considerada normoprotéica. Após o desmame (vigésimo quinto dia de vida), os filhotes permaneceram recebendo a Labina até o dia do experimento.
- Grupo Desnutrido (D) – Constituído de filhotes cujas mães receberam imediatamente após o parto uma dieta hipoprotéica, contendo 8% de proteína, a Dieta Básica Regional (DBR, segundo Teodósio et al., 1990). Esse tipo de procedimento tem sido utilizado como um meio reconhecidamente eficaz em provocar desnutrição nos filhotes. A partir do vigésimo quinto dia de vida (desmame), os animais passaram a ser mantidos com a dieta Labina até o término do experimento.

A DBR foi elaborada a partir de dados obtidos de inquéritos alimentares feitos pelo setor de Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da UFPE, realizados em populações de baixa renda da Zona da Mata de Pernambuco. A DBR é composta pelos mesmos alimentos (feijão mulatinho, farinha de mandioca, batata doce e carne de charque), e na mesma proporção, daqueles identificados nos inquéritos e que constituíam a base da alimentação diária das populações em estudo (Coutinho, 1976; Teodósio et al., 1990). À análise química, verificou-se ser a DBR multideficitária, isto é, pobre em lipídios, vitaminas, minerais e, principalmente, em proteínas (aproximadamente 8%). Esta é predominantemente de origem vegetal. O uso diário da

DBR produz quadro de desnutrição protéico-calórica grave, parecendo mimetizar, em ratos, a desnutrição infantil (Teodósio et al., 1990).

2.2. Tratamento Farmacológico

Para manipulação do sistema serotoninérgico foi utilizada a fluoxetina (**F**; cloridrato de fluoxetina - Novartis). Essa substância era dissolvida em solução isotônica de sais, denominada Ringer Simplificado (a qual será referida durante todo este trabalho como solução salina; ver composição no anexo A), nas concentrações de 0,25, 0,5, 1 ou 2 mg/ml para o tratamento sistêmico e, nas concentrações de 5 ou 10 mg/ml para o tópico.

Filhotes machos dos grupos nutrido ou desnutrido foram subdivididos em dezesseis outros grupos, de acordo com o tipo e a intensidade do tratamento a que foram submetidos. Todos esses grupos estão descritos a seguir (Tabela 1).

2.2.1. Tratamento sistêmico

- **Grupos Tratados com Fluoxetina** – A fim de se obter uma curva dose-resposta da ação da fluoxetina, principalmente sobre a velocidade de propagação da depressão alastrante (**DA**), 4 grupos de animais nutridos foram injetados, por via subcutânea, duas vezes ao dia (às 7 h e às 17 h), com fluoxetina nas doses diárias totais de 5 mg/kg/dia, 10 mg/kg/dia, 20 mg/kg/dia ou 40 mg/kg/dia (metade em cada uma das duas injeções diárias). Os grupos foram denominados respectivamente como: **25-NF5**; **25-NF10**; **25-NF20** e **25-NF40**. Mediante os resultados obtidos com os grupos

nutridos, um grupo de animais desnutridos foi tratado de maneira similar, recebendo fluoxetina na dose diária total de 10 mg/kg/dia, grupo **25-DF-10**. 10 mg/kg/dia, representou a dose mínima eficaz em provocar alterações sobre a **DA** nos animais nutridos. Imediatamente após o desmame (25-30 dias), esses animais foram submetidos ao registro eletrofisiológico da **DA**. Para se verificar a possibilidade de alterações permanentes resultantes do tratamento farmacológico imposto nas fases iniciais da vida, ratos de ambas as condições nutricionais, tratados com fluoxetina (10 mg/kg, s.c.) durante o aleitamento foram submetidos ao registro da **DA** somente aos 60-70 dias de idade, grupos **60-NF10** e **60-DF10**.

- **Grupos Tratados com Solução Salina** – Para cada condição nutricional e idade de realização de experimentos, um grupo de animais foi administrado com volume equivalente de solução salina (**S**; **25-NS**, **25-DS**, **60-NS** e **60-DS**) da mesma maneira que os animais injetados com fluoxetina. Esses grupos serviram como controles para o estresse da injeção dos animais tratados com a droga.
- **Grupos sem Tratamento (“Ingênuos”)** – Grupos de animais jovens (25-30 dias) não injetados, de ambas as condições nutricionais (**25-NI** e **25-DI**), foram usados para comparação com os grupos tratados sistemicamente com solução salina. Estes grupos, chamados de “ingênuos” tiveram por finalidade se estudar o possível efeito do estresse, decorrente da aplicação de injeções.

TABELA 1 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o estado nutricional a que as nutrizes foram submetidas durante o período de aleitamento (nutridos e desnutridos) e com o tratamento farmacológico (fluoxetina [F] ou salina [S], s.c.; e F tópica a 5 e 10 mg/ml [T5 e T10]). I (“ingênuos”) são animais que não receberam qualquer injeção.

GRUPOS	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	DIA DO REGISTRO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE
Grupos Nutridos (N; 23 % de proteína)		
25-NI (n = 16)	Nenhum (ingênuos)	25-30
25-NS (n = 18)	S	25-30
25-NF5 (n = 15)	F 5 mg/kg	25-30
25-NF10 (n = 16)	F 10 mg/kg	25-30
25-NF20 (n = 16)	F 20 mg/kg	25-30
25-NF40 (n = 11)	F 40 mg/kg	25-30
60-NS (n = 6)	S	60-70
60-NF10 (n = 8)	F 10 mg/kg	60-70
NT5 (n = 12)	F, tópica, 5 mg/ml	90-150
NT10 (n = 14)	F, tópica, 10 mg/ml	90-150
Grupos Desnutridos (D; 8 % de proteína)		
25-DI (n = 13)	Nenhum (ingênuos)	25-30
25-DS (n = 15)	S	25-30
25-DF10 (n = 11)	F 10 mg/kg	25-30
60-DS (n = 5)	S	60-70
60-DF10 (n = 6)	F 10 mg/kg	60-70
DT10 (n = 8)	F, tópica, 10 mg/ml	90-150

2.2.2. Tratamento tópico

Dois grupos de animais nutridos, com idades entre 90-150 dias, foram tratados durante o registro da **DA** com aplicações tópicas (**T**), no córtex cerebral, de fluoxetina (nas concentrações de 5 ou 10 mg/ml; grupos **N-FT5**, **N-FT10**, respectivamente). A aplicação de fluoxetina foi realizada após, no mínimo, uma hora de registro basal da **DA**, o qual era utilizado como controle. Sendo 10 mg/ml a concentração mais eficaz em alterar as características da **DA** (ver resultados), um grupo de animais desnutridos foi tratado topicamente com a mesma (grupo **D-FT10**).

3. DETERMINAÇÕES PONDERAIS

3.1. Pesos Corporais

Os animais tratados de forma sistêmica foram pesados diariamente (balança Marte – modelo 1001, com sensibilidade até 0,01 g ou Filizola – modelo MF-3/1, com sensibilidade até 0,1) do 1º ao 25º dias de vida. Todos os ratos foram pesados no dia de experimento.

3.2. Pesos Encefálicos

Ao final dos registros eletrofisiológicos (item 5), os ratos que não seriam submetidos às análises morfométricas (item 6) foram sacrificados, ainda sob anestesia,

mediante lesão na região bulbar, introduzindo-se um estilete ao nível da cisterna magna, o que provocava parada respiratória. Após o sacrifício, seus encéfalos foram retirados. Para isso, o neuro-eixo foi seccionado transversalmente em dois níveis: caudalmente, tangenciando-se a borda inferior do cerebelo, incluindo-o; rostralmente, no limite entre os hemisférios cerebrais e os bulbos olfatórios, excluindo-se esses últimos. Imediatamente após a remoção, os encéfalos foram pesados em balança analítica (modelo Bosh, S-2000, com sensibilidade até 0,1 mg), obtendo-se o chamado peso do encéfalo úmido. Em seguida foram colocados em uma estufa (FANEM) a 100°C e pesados a cada 1 ou 2 dias na mesma balança acima citada, até atingirem peso constante, considerado o peso do encéfalo seco.

Foi calculado também, o peso relativo do encéfalo definido através da razão entre o peso (g) desse órgão úmido e o peso corporal (g), multiplicado por 100.

4. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para a realização dos registros eletrofisiológicos, cada animal foi anestesiado com uma solução contendo mistura de uretana a 10% + cloralose a 0,4%, à dose de 1000 mg/kg de uretana + 40 mg/kg de cloralose, via intraperitoneal. Foi procedida uma traqueostomia para introdução de uma cânula de polietileno. O animal foi colocado em decúbito ventral sobre um aquecedor elétrico de temperatura regulável; este aparelho permitiu a manutenção da temperatura retal do animal em torno de 37 ± 1 °C. Em seguida, a cabeça do animal foi fixada em aparelho estereotáxico (da marca “David – Kopf”, USA, modelo 900, ou da marca Insight Equipamentos), de modo a permitir a

incisão e remoção da pele e do periósteo para exposição do crânio. Por meio de trepanação, foram feitos 3 orifícios (anterior, médio e posterior, de cerca de 2 a 4 mm de diâmetro cada), alinhados paralelamente à linha média, ao nível do hemisfério cerebral direito.

5. ESTIMULAÇÃO CORTICAL E REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO

A **DA** foi provocada aplicando-se o estímulo (solução de KCl a 2%), a um ponto da superfície cortical frontal, durante um minuto, através do orifício anterior. Os registros eletrofisiológicos foram feitos utilizando-se eletrodos impolarizáveis (tipo “Ag-AgCl”) confeccionados no próprio laboratório (ver Guedes *et al.*, 1992), conectados a um polígrafo (modelo 7D – Grass Medical Instruments ou Sensor Medics – Dynograph[®] Recorder R611). Em dois pontos corticais parietais (um em cada orifício) foram registradas, simultaneamente, a atividade elétrica cortical (eletrocorticograma) e a variação lenta de voltagem que acompanha a **DA**. As variações corticais de voltagem foram registradas contra um eletrodo de referência comum, colocado sobre os ossos nasais, nos quais o potencial é invariável. O registro foi feito por um período de 4 horas. A velocidade de propagação da **DA** foi calculada com base na distância entre os dois eletrodos registradores e no tempo gasto pela **DA** para percorrer esta distância.

5.1. APLICAÇÃO TÓPICA DE FLUOXETINA

Como mencionado anteriormente, os animais dos grupos **N-FT5**, **N-FT10** e **D-FT10** foram submetidos à aplicação tópica de fluoxetina. Previamente a esta aplicação, foi realizado, por um período de, no mínimo, uma hora, registro eletrofisiológico da **DA** (registro “basal”), conforme descrito acima. Durante esse período, a velocidade da **DA** foi medida a cada 20 minutos. Cerca de 10 minutos após a última medida do registro basal, estando a dura-máter intacta, a fluoxetina (a 5 ou 10 mg/ml) era aplicada, com auxílio de uma seringa, sobre a superfície de um dos orifícios parietais (ou até mesmo dos dois orifícios), usados para o registro eletrofisiológico. A fluoxetina permanecia em contato com a superfície cortical por aproximadamente 10 minutos. O córtex era, então, enxugado com um pequeno pedaço de algodão. Feito isto, procedia-se à nova estimulação com KCl, a fim de se obter outra medida de velocidade de propagação da **DA**. Aplicações subseqüentes de fluoxetina foram realizadas da mesma maneira. Para efeito de comparação, muitas vezes, o tratamento tópico com fluoxetina era precedido por uma aplicação semelhante de solução salina. As velocidades de propagação do fenômeno obtidas após o tratamento farmacológico tópico, foram comparadas com aquelas do período pré-droga, no mesmo animal. Antes de se encerrarem as sessões de registro, lavava-se, com solução salina, o tecido cortical onde haviam sido feitas as aplicações de fluoxetina, na tentativa de remover qualquer resquício, que porventura restasse, e possibilitar a recuperação das características da **DA**.

6. ESTUDO MORFOLÓGICO

Animais jovens (25-30 dias), de ambas as condições nutricionais, tratados sistemicamente com fluoxetina (10 mg/kg) ou solução salina, foram submetidos, após o

registro eletrofisiológico, à técnica histoquímica para marcação de neurônios nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-diaforase positivos (**NADPH-d**), conforme a descrição a seguir.

Estando os animais profundamente anestesiados, foi realizada perfusão transcardíaca, utilizando as seguintes soluções: 1) tampão fosfato de sódio em solução salina 0,1M (pH 7,2-7,4), para remoção do sangue; 2) formaldeído 10%, para fixação do tecido cerebral. As soluções foram injetadas sob pressão positiva fornecida por um compressor e regulada para se manter entre 80 e 100 mm/Hg.

Ao final da perfusão, o crânio foi aberto e o encéfalo retirado e pesado. Em seguida, foi realizada a microtomia. Os encéfalos foram cortados em vibrátomo (Sectioning System Series 1000), em fatias coronais com espessura de 150 μ m.

A reação histoquímica dos cortes neuronais foi realizada de acordo com o método indireto da enzima málica (Scherer-Singler *et al.*, 1983), até visualização dos dendritos terciários e de ordens superiores na maioria das células marcadas. Para acompanhar a evolução da reação foi utilizado microscópio óptico, modelo Standard 25 (Zeiss). Após a interrupção da reação, os cortes foram montados em lâminas histológicas e foram procedidas as análises morfométricas.

6.1. Análises Morfométricas

Nos animais dos grupos **25-NF10** (n = 7), **25-NS** (n = 7), **25-DF10** (n = 6) e **25-DS** (n = 8) foram efetuadas análises microscópicas na área 17 (área visual primária) dos seguintes parâmetros: 1) número de neurônios **NADPH-d** positivos; 2) área do corpo celular daqueles mesmos neurônios. Os limites do córtex visual primário foram

identificados através de um microscópio óptico (Zeiss), com auxílio de um atlas de coordenadas estereotáxicas do cérebro do rato (Paxinos e Watson, 1998) e dos critérios de laminação das camadas, revelada pela histoquímica da **NADPH-d** na neurópila (de acordo com Borba *et al.*, 2000). É digno de nota que as lâminas foram codificadas, de forma que o observador desconhecia, no momento das análises, a qual dos grupos pertencia cada preparação histológica.

Para a contagem do número de neurônios **NADPH-d** positivos foram selecionados aleatoriamente (entre o Bregma -5,80 e -7,30) 5 cortes histológicos de cada animal. Foram analisados os dois hemisférios cerebrais a fim de se detectar eventuais alterações decorrentes do fenômeno da **DA**. Foi utilizada uma câmara clara (ganho 1,1x) acoplada ao microscópio em pequeno aumento (ocular 8x e objetiva 4x). Os contornos da área 17 foram desenhados em papel milimetrado e as posições das células foram marcadas no desenho, para serem contadas posteriormente. Foram contadas todas as células visualizadas na substância cinzenta, bem como aquelas que se localizavam na substância branca dentro de uma faixa de até 5 mm imediatamente adjacente à substância cinzenta.

As medidas da área do corpo celular foram obtidas a partir de neurônios **NADPH-d** positivos localizados no córtex visual primário (entre o Bregma -5,80 e -7,30) de uma preparação histológica. Em cada corte histológico foram medidos os perfis celulares de 20 neurônios da substância cinzenta cortical (10 de cada hemisfério cerebral) escolhidos aleatoriamente (objetiva 40x). Depois de digitalizada a imagem da célula, a área do soma (em μm^2) era obtida automaticamente, através do sistema de análise de imagem (Optimas macros®, 1996, Optimas Corporation, Washington, USA). As médias das áreas foram tomadas para efeito comparativo.

7. NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL

Os estudos concernentes a esse item foram desenvolvidos no Departamento de Psicologia da Princeton University (Princeton, NJ, EUA), na vigência de “bolsa de Doutorado Sanduíche”, sob a orientação do prof. Barry Jacobs. Foram investigados os efeitos da fluoxetina, administrada durante o aleitamento, sobre a neurogênese (formação de novos neurônios) hipocampal tanto em animais recém-desmamados (25 dias), como adultos (60 dias de vida). Associada à ação da fluoxetina, foi adicionalmente investigado o efeito de dois tipos diferentes de estresse (estresse por contensão e administração de lipopolissacarídeo) sobre a formação de novas células neuronais no hipocampo de ratos adultos.

Ratos machos Sprague-Dawley (n = 17), nutricionalmente normais, foram tratados com uma injeção diária de fluoxetina (cloridrato de fluoxetina - Eli Lilly and Company) à dose de 10 mg/kg/dia, de forma subcutânea, do 2º ao 25º dia após o nascimento. Ou seja, esses animais foram manipulados da mesma maneira que aqueles do grupo **NF10**, à exceção de que receberam a dose de fluoxetina em apenas uma injeção diária. Para efeito comparativo, foram obtidos ratos que receberam volume equivalente de solução salina (cloreto de sódio 0,9%, 10 ml/kg/ dia, s.c.; n = 16). Subgrupos desses animais foram submetidos aos estudos descritos a seguir (Tabela 2).

7.1. Neurogênese em Ratos Jovens (25 dias)

Ao desmame (25º dia de vida), ratos tratados com fluoxetina (grupo **F-25**; n = 6) e também com salina (grupo **S-25**; n = 5) receberam uma injeção intraperitoneal de

bromodeoxiuridina (**BrdU**) na dose de 200 mg/kg. **BrdU** é um análogo da timidina que é incorporado ao DNA durante a fase de síntese (fase-S) do ciclo celular e é usado para marcar células em proliferação. Decorridas 2 horas, os animais foram anestesiados com uma overdose de pentobarbital (cerca de 300 mg/kg) e a seguir perfundidos transcardiacamente, com auxílio de uma bomba de infusão (modelo Harvard, na velocidade mais alta; cerca de 15 ml/min por 2 minutos, seguida por 7.5 ml/min por 4 min), primeiro com solução salina (20 ml, a qual continha 10.000 U/ml de heparina, para prevenir a coagulação do sangue) e depois com paraformaldeído a 4% (pH 7.4; 120 ml). Os encéfalos foram removidos e então mantidos em paraformaldeído 4%, em geladeira, durante 24 horas, para pós-fixação. Em seguida, eles foram transferidos para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em tampão fosfato salina 0,1M (PBS, pH 7,4) até que descessem ao fundo do frasco (processo que ocorria em torno de 2 dias). Fatias coronais seriadas de hipocampo (40 µm de espessura) foram obtidas através de microtomia sob congelamento; 144 fatias foram conseguidas nas 12 séries de hipocampo (12 fatias/série). Todas as fatias pertencentes às séries 6 e 7 foram submetidas à reação imunohistoquímica de **BrdU** (descrita no item 7.3).

7.2. Neurogênese em Ratos Adultos (60 dias)

Uma parte dos animais foi mantida no biotério para serem analisados quando atingissem os 60 dias de idade. Eles foram submetidos a um dos seguintes tratamentos:

7.2.1. Neurogênese

Para determinar se o tratamento precoce com fluoxetina afeta a neurogênese na idade adulta, alguns animais tratados com fluoxetina (grupo **F-60**; n = 4) e com solução salina (grupo **S-60**; n = 2) receberam uma injeção de **BrdU** (200 mg/kg, i.p.) de maneira similar àqueles aos 25 dias. A seguir os mesmos procedimentos supra descritos foram realizados.

O estresse está comumente associado com uma variedade de desordens psiquiátricas como, por exemplo, a depressão, e é freqüentemente o fator causal de tais desordens. Dessa forma, foram analisados os efeitos de dois agentes estressores sobre a neurogênese hipocampal: 1) o lipopolissacarídeo, que desafia o sistema imune; 2) o estresse por contensão.

7.2.2. Estresse pelo Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (**L**) é um componente estrutural da membrana de bactérias *gram* negativas e um potente indutor de citocinas que produzem uma reação inflamatória. Ele tem sido considerado um agente estressor do tipo metabólico (Connor *et al.*, 1999). Animais tratados precocemente com fluoxetina e com solução salina (grupos **F-L** – n = 3 e **S-L** – n = 3, respectivamente) receberam 2 injeções de lipopolissacarídeo (1 mg/kg, i.p.), separadas por um intervalo de 5 horas. Adicionalmente, tanto animais fluoxetina, como tratados precocemente com salina

foram administrados com solução salina (5 ml/kg, i.p.), para efeito de comparação com a injeção de lipopolissacarídeo (respectivamente, grupos **F-S** – n = 2 e **S-S** – n = 2). Três horas após a última injeção (seja de lipopolissacarídeo ou de solução salina), todos os animais receberam **BrdU** (200 mg/kg, i.p.), sendo então perfundidos após mais 2 horas, a fim de que fossem efetuadas as reações imunohistoquímicas para marcação das células que incorporaram o **BrdU**.

7.2.3. Estresse por Contensão

É bastante conhecido que a contensão (**C**) é capaz de induzir estresse do tipo neurogênico em animais experimentais (Connor *et al.*, 1999), razão pela qual este tipo de manipulação foi utilizada neste trabalho. Animais tratados no início da vida tanto com fluoxetina (**F-C**; n = 2), como com salina (**S-C**; n = 4) foram totalmente contidos entre duas camadas de tela metálica (malha de 1mm²) e mantidos, dessa forma, em uma gaiola, por duas horas. A seguir eles foram injetados com **BrdU** (200 mg/kg, i.p.) e, duas horas depois, perfundidos.

7.3. Reação Imunohistoquímica para BrdU

As fatias cerebrais que haviam sido obtidas pela microtomia foram montadas em lâminas (Superfrost Plus Gold) e deixadas em estufa a 37° C até o dia seguinte. A fim de possibilitar a exposição do antígeno, as lâminas foram mergulhadas em ácido cítrico em ebulição (0,01 M, pH 6,0) por 6 minutos, e depois incubadas por 8 ½ minutos em

solução de tripsina (0,1% em tampão Tris 0,1M, pH 7,5; contendo 0,1% CaCl_2) e por 10 minutos em HCl (2N em PBS), ambas à temperatura ambiente. A seguir, foram submetidas ao procedimento imunohistoquímico. As lâminas foram mantidas a 4° C, em anticorpo anti-BrdU (NCL-BrdU, Novocastra Laboratories; em PBS 1:200, contendo Tween 20 a 0,5%) durante a noite; e, depois, em anticorpo biotinilado anti-mouse IgG (1:200 em PBS) por 1 hora. Em seguida foram incubadas por 1 hora no Complexo Avidina/Biotina (1:100 cada em PBS) e reagidas por 6 ½ minutos com solução de diaminobenzidina (DAB) e hidróperóxido de uréia (0,23 mg/ml; Sigma Fast Tablets Sets), com o objetivo de evidenciar as células que incorporaram o **BrdU**. No dia seguinte, as lâminas foram montadas, após procedimento histológico para reação de Nissl. As células positivas para **BrdU** foram contadas, de forma cega, nas zonas granular e subgranular, bem como no hilo do hipocampo dos dois hemisférios cerebrais através de microscópio óptico (Olympus) com objetiva de 40x.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) foi empregada para analisar os dados de pesos corporais e encefálicos, bem como a velocidade de propagação da **DA** e as observações histoquímicas e imunohistoquímicas. Nas comparações em que ANOVA apontou diferenças significantes foi aplicado o teste para comparação múltipla de Tukey-Kramer. O teste *t* pareado foi utilizado para comparar velocidades de propagação da **DA** antes e após o tratamento farmacológico tópico. Em todos os casos, foi considerado como nível de significância para rejeição da hipótese nula, um valor de $P \leq 0,05$.

TABELA 2 - distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento subcutâneo a que os ratos foram submetidos durante o período de aleitamento, com o agente estressor (lipopolissacarídeo [L], solução salina [S] ou contensão [C]) imposto na idade adulta, bem como, com a idade experimental em que receberam bromodeoxiudina (**BrdU**).

TRATAMENTO		PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	
DURANTE A LACTAÇÃO	GRUPO	25 DIAS	60 DIAS
Fluoxetina (F; 10 mg/kg)	F-25 (n = 6)	BrdU	
	F-60 (n = 4)	BrdU	
	F-L (n = 3)	Lipopolissacarídeo (2 x 1 mg/kg, i.p.) + BrdU	
	F-S (n = 2)	Solução salina (2 x 5 ml/kg, i.p.) + BrdU	
	F-C (n = 2)	Contensão (2 h) + BrdU	
Solução Salina (S; 10 ml/kg)	S-25 (n = 5)	BrdU	
	S-60 (n = 2)	BrdU	
	S-L (n = 3)	Lipopolissacarídeo (2 x 1 mg/kg, i.p.) + BrdU	
	S-S (n = 2)	Solução salina (2 x 5 ml/kg, i.p.) + BrdU	
	S-C (n = 4)	Contensão (2 h) + BrdU	

RESULTADOS

1. PESO CORPORAL

1.1. Efeito do Tratamento Farmacológico

Os animais nutridos tratados com fluoxetina apresentaram pesos corporais médios significativamente menores que aqueles tratados com solução salina, desde o 5º dia de vida até o dia do experimento para os grupos **NF20** e **NF40**; e, a partir do 11º dia até o 25º dia de vida ou até o dia do registro eletrofisiológico para os animais dos grupos **NF5** e **NF10**, respectivamente. Vale ressaltar que em alguns grupos (**NF5**, **NF10**, **NF40**), o peso corporal ao início do tratamento era significativamente superior ao dos animais controles e que o efeito da fluoxetina sobre o ganho reduzido de peso corporal era dependente da dose. Nos desnutridos esse mesmo efeito foi observado, ocorrendo a partir do 10º dia de vida até o dia do experimento; os animais daquele grupo (**DF10**) também apresentavam peso corpóreo inicial superior aos do grupo salina (Tabela 3 e Figura 1).

1.2. Efeito do Estresse das Injeções

Os grupos ingênuos (**NI** e **DI**) constituem grupos de animais não injetados, utilizados com a finalidade de se investigar a influência do estresse, pela aplicação das soluções, sobre alguns parâmetros analisados nesse estudo, tais como peso corporal,

velocidade da **DA**. No que se refere ao peso corporal, não houve qualquer diferença entre os animais pertencentes a esses grupos e seus respectivos controles tratados com solução salina (**NS** e **DS**). Tabela 3 e Figura 1.

1.3. Efeito do Tratamento Nutricional

Após alguns dias (3, 4 e 5 para os grupos **DF10**, **DS** e **DI**, respectivamente) de ingestão materna de **DBR**, os pesos corporais dos animais desnutridos tornaram-se significativamente menores que os dos animais nutridos. Essa diferença persistiu até o dia do experimento em todas as comparações. Esses resultados estão na Tabela 3.

2. PESO ENCEFÁLICO

Ao serem comparados os animais nutridos tratados com fluoxetina (**F**) nas diferentes doses com os animais injetados com solução salina (**S**) quanto aos pesos encefálicos absolutos (úmidos e secos) e relativos, os valores médios encontrados foram semelhantes. Quando as mesmas comparações foram realizadas em animais desnutridos (**D**), o grupo **DF10** apresentou pesos encefálicos absolutos significativamente menores em relação ao grupo **DS**; porém, pesos encefálicos relativos, maiores (Tabela 4 e Figuras 2 e 3).

Avaliando-se conjuntamente os animais tratados com solução salina com os animais não injetados, ingênuos (**NS versus NI**; **DS versus DI**), os valores médios de

pesos encefálicos absolutos (úmidos e secos) e relativos foram equivalentes dentro da mesma condição nutricional (Tabela 4 e Figuras 2 e 3).

Por outro lado, quando se analisam os diferentes estados nutricionais para um mesmo tipo de tratamento (**NF10** *versus* **DF10**, **NS** *versus* **DS**, **NI** *versus* **DI**), os animais dos grupos desnutridos apresentaram pesos encefálicos absolutos significativamente menores que aqueles dos grupos nutridos correspondentes; contudo, seus pesos relativos foram sempre maiores em cada comparação (Tabela 4 e Figura 3).

3. VELOCIDADE DE PROPAGAÇÃO DA DA

3.1. Efeito do Tratamento Farmacológico Sistêmico

Os grupos tratados com fluoxetina (tanto nutridos, como desnutridos) apresentaram, de uma maneira geral, valores médios de velocidades da DA inferiores aos grupos tratados com solução salina. Nos animais jovens (25-30 dias) nutridos essas diferenças foram estatisticamente significantes em todas as horas de registro para os grupos NF20 e NF40; no grupo NF10 foi significativa nas 1^a e 2^a horas de registro; e, no grupo NF5, apesar de não haver diferença estatística, os valores médios foram mais baixos em todas as horas. Além disso, foi também observado que esse efeito sobre a velocidade de propagação da DA era dependente da dose, isto é, quanto maior a dose, maior a redução nos valores médios da velocidade da DA, nas variações desde 5 mg/kg a 20 mg/kg. Todavia, a partir de 20 mg/kg, essa característica dose-dependente deixou de existir, não mais se correlacionando com a dose de 40 mg/kg. Nos animais jovens desnutridos (25-DF10), a fluoxetina também reduziu significativamente os valores

médios de velocidade de propagação da DA, em comparação ao grupo tratado com solução salina. Esses resultados estão na Tabela 5. A redução da velocidade de propagação da DA decorrente do tratamento com fluoxetina, observada nos animais recém-desmamados (25-30 dias de vida), persistiu até a idade adulta (60-70 dias); sendo as diferenças significantes nas quatro horas de registro para os desnutridos (60-DF10) e, nas 1ª e 3ª horas, para os nutridos (60-NF10), quando comparados com os respectivos controles (Tabela 6). Registros ilustrativos da propagação da DA nos diferentes grupos estão mostrados nas Figuras 4, 5 e 6.

3.2. Efeito do Estresse da Injeção

As comparações entre os grupos ingênuos e seus respectivos controles (tratados com solução salina), resultaram em velocidades de propagação da DA semelhantes em todas as horas de registro (Tabela 5).

3.3. Efeito do Tratamento Nutricional

Os animais desnutridos ingênuos (jovens) ou injetados com solução salina (jovens e adultos) apresentaram valores médios da velocidade de propagação da **DA** significativamente maiores que os respectivos animais nutridos, em todas as horas de registro. Todavia, comparando-se os grupos tratados com fluoxetina (**25-DF10** *versus* **25-NF10** e **60-DF10** *versus* **60-NF10**), seus valores médios de velocidade da **DA** foram equivalentes nas quatro horas de registro (Tabelas 5 e 6).

TABELA 3 - Evolução ponderal de ratos nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) no início da vida, e submetidos, durante o aleitamento, a uma das seguintes condições: 1) tratamento com fluoxetina (**F**; nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg/kg, s.c.); 2) aplicação de volume equivalente de solução salina (**S**; grupos controles); 3) não injetados com qualquer solução (grupos “ingênuos”; **I**). Os valores representam a média $\pm$ desvio-padrão, com o número de animais indicado entre parênteses. As letras minúsculas indicam valores diferentes ($P < 0,05$) dos respectivos valores dos grupos marcados com a mesma letra, na coluna da esquerda. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey.

GRUPO	PESO CORPORAL (g)				
	1º DIA	7º DIA	14º DIA	21º DIA	(25º-30º DIAS)
NI (a)	6,53 $\pm$ 0,82 (12)	16,23 $\pm$ 2,09 (18)	34,16 $\pm$ 4,68 (18)	52,12 $\pm$ 8,43 (18)	82,2 $\pm$ 7,2 (16)
NS (b)	6,86 $\pm$ 0,63 (23)	16,57 $\pm$ 1,66 (27)	33,16 $\pm$ 2,95 (27)	53,24 $\pm$ 4,23 (27)	86,9 $\pm$ 10,5 (18)
NF5 (c)	7,33 $\pm$ 0,75 ^b (20)	16,46 $\pm$ 2,07 (20)	30,48 $\pm$ 3,63 ^b (20)	48,68 $\pm$ 5,18 ^b (20)	80,3 $\pm$ 15,6 (15)
NF10 (d)	7,56 $\pm$ 0,92 ^b (25)	16,97 $\pm$ 1,40 (24)	28,46 $\pm$ 2,61 ^b (24)	43,07 $\pm$ 4,61 ^b (24)	68,2 $\pm$ 11,1 ^b (15)
NF20 (e)	7,08 $\pm$ 0,78 (17)	14,11 $\pm$ 1,86 ^b (24)	22,48 $\pm$ 3,28 ^b (24)	34,72 $\pm$ 4,61 ^b (24)	64,5 $\pm$ 12,3 ^b (16)
NF40 (f)	7,19 $\pm$ 0,52 ^b (24)	13,75 $\pm$ 1,74 ^b (23)	21,09 $\pm$ 3,09 ^b (20)	26,74 $\pm$ 5,31 ^b (16)	49,0 $\pm$ 7,9 ^b (11)
DI (g)	6,60 $\pm$ 0,67 (19)	11,99 $\pm$ 1,70 ^a (19)	15,54 $\pm$ 1,74 ^a (19)	19,25 $\pm$ 2,74 ^a (19)	29,2 $\pm$ 5,8 ^a (13)
DS (h)	6,59 $\pm$ 0,76 (23)	12,11 $\pm$ 1,29 ^b (23)	16,09 $\pm$ 1,33 ^b (23)	19,17 $\pm$ 2,02 ^b (23)	28,9 $\pm$ 6,5 ^b (16)
DF10 (i)	7,35 $\pm$ 0,78 ^h (28)	12,00 $\pm$ 1,74 ^d (28)	14,46 $\pm$ 1,57 ^{d,h} (27)	15,96 $\pm$ 2,45 ^{d,h} (26)	23,5 $\pm$ 8,3 ^{d,h} (12)

PESO CORPORAL

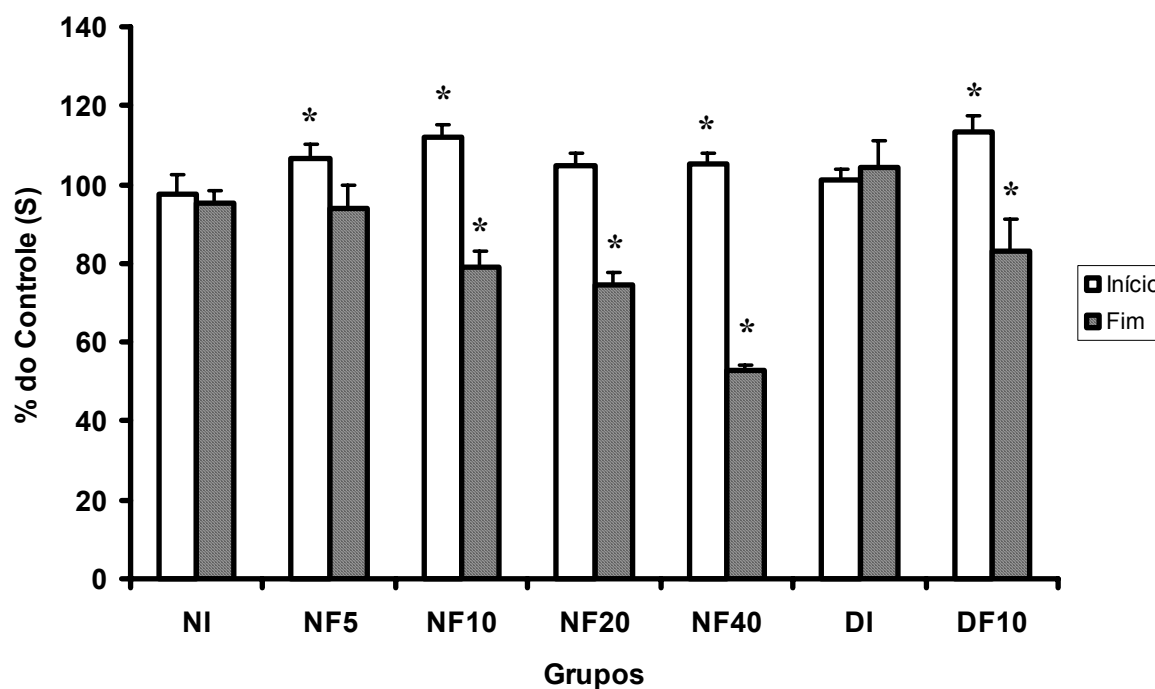


FIGURA 1 - Variação dos pesos corporais entre o início (1º dia de vida) e o fim (25-30 dias) do tratamento com fluoxetina (F; nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg/kg, s.c.). Os dados (média±e.p.m.) são expressos como percentual dos valores dos grupos controles injetados com solução salina (S). N e D indicam, respectivamente, grupos nutridos e desnutridos. I representa grupos “ingênuos”, que não sofreram qualquer injeção (grupos não injetados). A fluoxetina era administrada diariamente, por via subcutânea. * $P < 0,05$ em relação ao respectivo valor do grupo controle (NS ou DS; ANOVA, seguida do teste do Tukey). NS, n = 23, 21; NI, n = 12, 16; NF5, n = 20, 15; NF10, n = 25, 15; NF20, n = 17, 16; NF40, n = 24, 12; DS, n = 23, 20; DI, n = 19, 17; DF10, n = 28, 17.

TABELA 4 - Pesos encefálicos de ratos jovens (25-30 dias) nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) no início da vida, e submetidos, durante o aleitamento, a uma das seguintes condições: 1) tratamento com fluoxetina (**F**; nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg/kg, s.c.); 2) aplicação de volume equivalente de solução salina (**S**; grupos controles); 3) não injetados com qualquer solução (grupos “ingênuos”; **I**). Os valores representam a média $\pm$ desvio-padrão, com o número de animais indicado entre parênteses. As letras minúsculas indicam valores diferentes ($P < 0,05$) dos respectivos valores dos grupos marcados com a mesma letra, na coluna da esquerda. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey.

GRUPO	PESO ENCEFÁLICO (g)	
	ÚMIDO	SECO
NI (a)	1,4548 $\pm$ 0,0696 (6)	0,2832 $\pm$ 0,0128 (6)
NS (b)	1,4134 $\pm$ 0,0906 (6)	0,2695 $\pm$ 0,0206 (6)
NF5 (c)	1,4025 $\pm$ 0,0794 (7)	0,2654 $\pm$ 0,0238 (7)
NF10 (d)	1,4364 $\pm$ 0,0326 (6)	0,2410 $\pm$ 0,0037 (6)
NF20 (e)	1,3952 $\pm$ 0,0688 (6)	0,2638 $\pm$ 0,0192 (6)
NF40 (f)	1,2858 $\pm$ 0,1260 (2)	0,2381 $\pm$ 0,0199 (2)
DI (g)	1,1373 $\pm$ 0,0797 ^a (8)	0,2188 $\pm$ 0,0153 ^a (8)
DS (h)	1,1832 $\pm$ 0,1055 ^b (8)	0,2257 $\pm$ 0,0168 ^b (8)
DF10 (i)	1,0333 $\pm$ 0,1005 ^{h,d} (13)	0,1888 $\pm$ 0,0242 ^{h,d} (13)

PESO ENCEFÁLICO RELATIVO

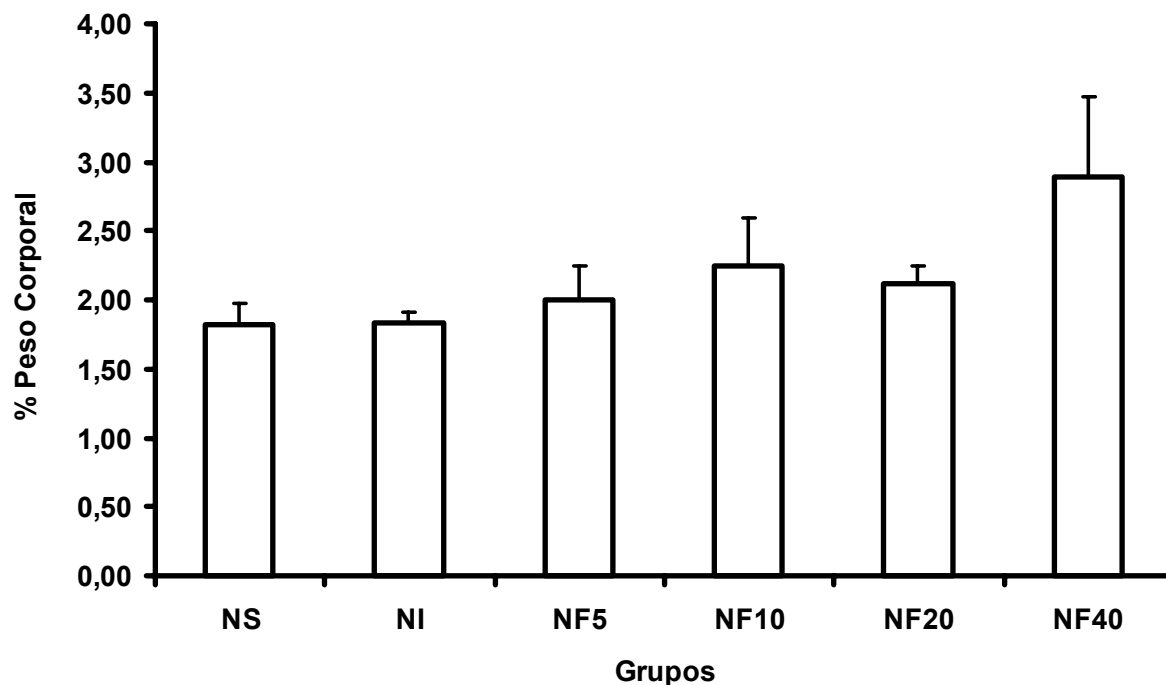


FIGURA 2 - Pesos encefálicos úmidos relativos aos pesos corporais, obtidos no dia do experimento, de animais jovens (25-30 dias) nutridos (N), submetidos durante o aleitamento a uma das seguintes situações: 1) injetados diariamente, duas vezes ao dia, com fluoxetina (F; nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg/kg, s.c.); 2) tratados com solução salina (S; grupo controle para os animais injetados com fluoxetina); 3) não injetados com qualquer solução (“ingênuos”, grupo I). Os dados estão expressos em média±e.p.m. Não houve diferenças entre os grupos analisados (ANOVA, seguida do teste do Tukey). NS, n=6; NI, n=6; NF5, n=7; NF10, n=6; NF20, n=6; NF40, n=2.

PESO ENCEFÁLICO RELATIVO

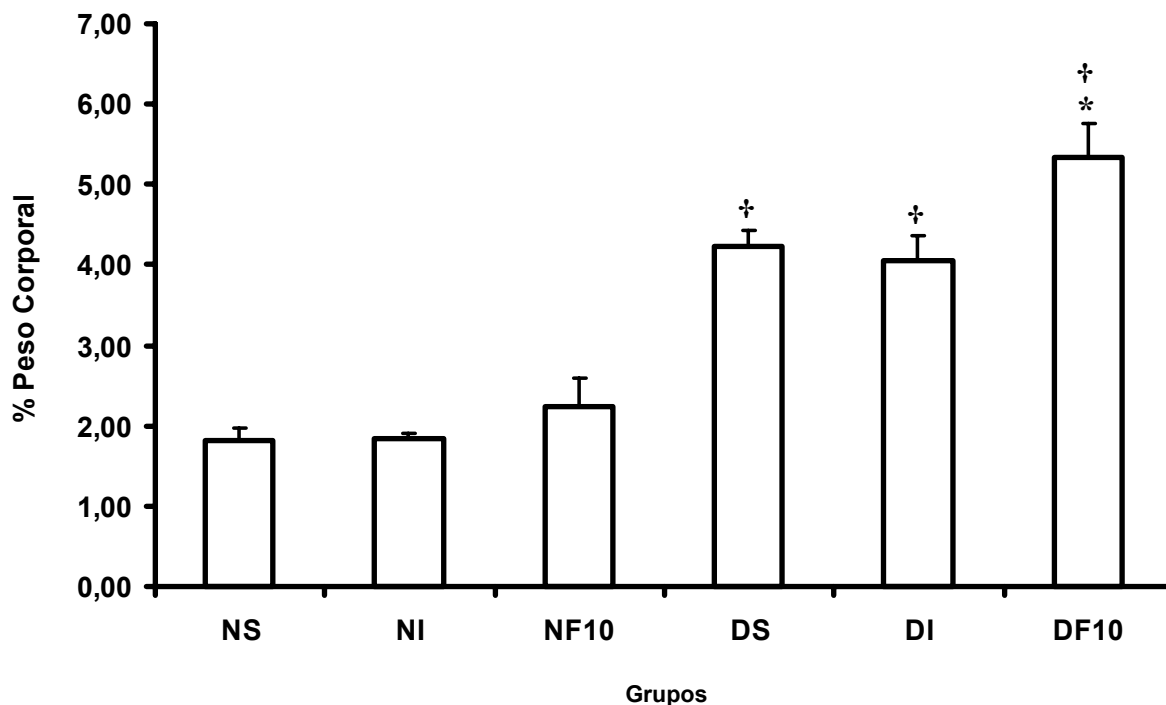


FIGURA 3 - Pesos encefálicos úmidos relativos aos pesos corporais, obtidos no dia do experimento, de animais jovens (25-30 dias) nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) no início da vida, e submetidos durante o aleitamento a uma das seguintes situações: 1) injetados com fluoxetina (**F**; 10 mg/kg, s.c.); 2) tratados com volume equivalente de solução salina (**S**; grupos controles); 3) não injetados com qualquer solução (“ingênuos”, grupos **I**). Os dados estão expressos em média ± e.p.m. * $P < 0,05$ em relação ao controle **DS**. † $P < 0,05$ em relação aos grupos nutridos correspondentes (ANOVA, seguida do teste do Tukey). **NS**, $n = 6$; **NI**, $n = 6$; **NF10**, $n = 6$; **DS**, $n = 8$; **DI**, $n = 8$; **DF10**, $n = 9$.

TABELA 5 - Velocidades de propagação da **DA** em ratos jovens (25-30 dias) nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) no início da vida, e submetidos, durante o aleitamento, a uma das seguintes condições: 1) tratamento com fluoxetina (**F**; nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg/kg, s.c.); 2) aplicação de volume equivalente de solução salina (**S**; grupos controles); 3) não injetados com qualquer solução (grupos “ingênuos”; **I**). Os valores representam a média $\pm$ desvio-padrão em cada hora de registro, com o número de animais indicado entre parênteses. As letras minúsculas indicam valores diferentes ($P < 0,05$) dos respectivos valores dos grupos marcados com a mesma letra, na coluna da esquerda. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey.

GRUPOS (25-30d)	VELOCIDADE DA DA (mm/min)			
	1 ^a h	2 ^a h	3 ^a h	4 ^a h
NI (a)	3,75 $\pm$ 0,12 (15)	3,81 $\pm$ 0,13 (15)	3,87 $\pm$ 0,15 (15)	3,92 $\pm$ 0,20 (15)
NS (b)	3,71 $\pm$ 0,21 (18)	3,77 $\pm$ 0,18 (18)	3,80 $\pm$ 0,17 (18)	3,89 $\pm$ 0,19 (18)
NF5 (c)	3,50 $\pm$ 0,19 (15)	3,63 $\pm$ 0,33 (15)	3,67 $\pm$ 0,41 (15)	3,73 $\pm$ 0,37 (15)
NF10 (d)	3,47 $\pm$ 0,19 ^b (15)	3,51 $\pm$ 0,22 ^b (15)	3,62 $\pm$ 0,20 (15)	3,63 $\pm$ 0,20 (15)
NF20 (e)	3,04 $\pm$ 0,27 ^b (16)	3,16 $\pm$ 0,33 ^b (16)	3,23 $\pm$ 0,36 ^b (16)	3,28 $\pm$ 0,33 ^b (15)
NF40 (f)	2,93 $\pm$ 0,23 ^b (11)	3,22 $\pm$ 0,30 ^b (11)	3,33 $\pm$ 0,28 ^b (11)	3,39 $\pm$ 0,22 ^b (10)
DI (g)	4,11 $\pm$ 0,35 ^a (13)	4,49 $\pm$ 0,29 ^a (13)	4,59 $\pm$ 0,33 ^a (13)	4,72 $\pm$ 0,27 ^a (13)
DS (h)	4,25 $\pm$ 0,29 ^b (15)	4,57 $\pm$ 0,42 ^b (15)	4,74 $\pm$ 0,42 ^b (15)	4,90 $\pm$ 0,49 ^b (15)
DF10 (i)	3,55 $\pm$ 0,24 ^h (12)	3,80 $\pm$ 0,28 ^h (12)	3,75 $\pm$ 0,57 ^h (12)	3,92 $\pm$ 0,33 ^h (11)

TABELA 6 - Velocidades de propagação da **DA** em ratos adultos (60-70 dias) nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) no início da vida, e submetidos, durante o aleitamento, ao tratamento subcutâneo com fluoxetina (**F**; 10 mg/kg) ou com volume equivalente de solução salina (**S**; grupos controles). Os valores representam a média $\pm$ desvio-padrão em cada hora de registro, com o número de animais indicado entre parênteses. As letras minúsculas indicam valores diferentes ($P < 0,05$) dos respectivos valores dos grupos marcados com a mesma letra, na coluna da esquerda. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey.

GRUPOS (60-70d)	VELOCIDADE DA DA (mm/min)			
	1 ^a h	2 ^a h	3 ^a h	4 ^a h
NS (a)	3.36 $\pm$ 0.09 (6)	3.26 $\pm$ 0.11 (5)	3.32 $\pm$ 0.09 (6)	3.33 $\pm$ 0.14 (6)
NF10 (b)	2.98 $\pm$ 0.18 ^a (7)	2.85 $\pm$ 0.28 (7)	2.84 $\pm$ 0.30 ^a (7)	2.89 $\pm$ 0.29 (7)
DS (c)	3.98 $\pm$ 0.39 ^a (5)	3.97 $\pm$ 0.37 ^a (5)	4.05 $\pm$ 0.50 ^a (5)	4.06 $\pm$ 0.52 ^a (4)
DF10 (d)	3.19 $\pm$ 0.25 ^c (6)	3.09 $\pm$ 0.30 ^c (6)	3.06 $\pm$ 0.35 ^c (6)	3.15 $\pm$ 0.19 ^c (6)

RATOS JOVENS (25-30 DIAS)

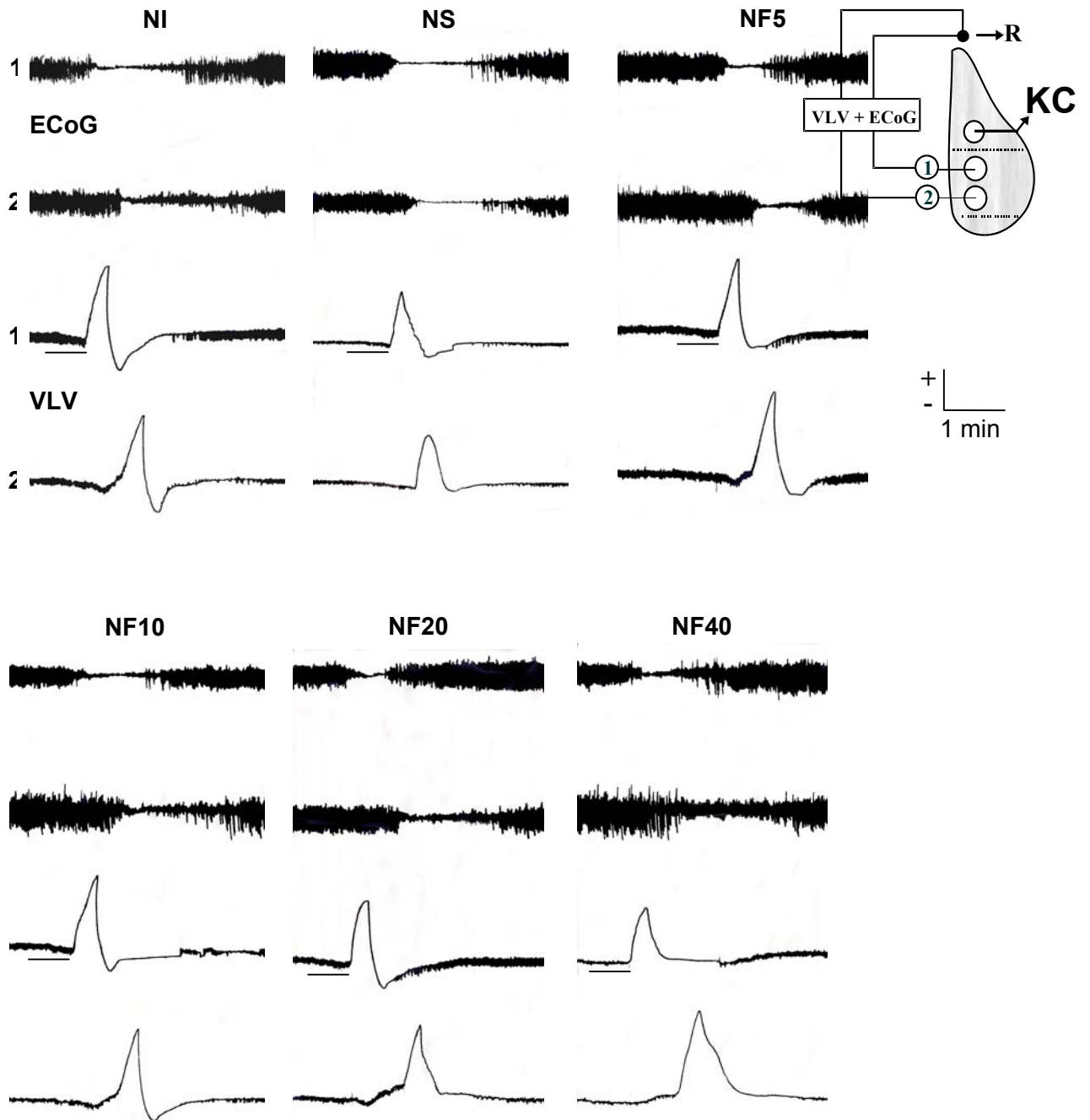


FIGURA 4 - Registros eletrofisiológicos da depressão alastrante (**DA**; electrocorticograma – **ECoG**, 0,5 mV; e, variação lenta de voltagem que acompanha a **DA** – **VLV**, 10 mV) no córtex parietal de ratos jovens (25-30 dias) nutridos (**N**), submetidos durante o aleitamento a uma das seguintes situações: 1) injetados subcutaneamente com fluoxetina (**F**; nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg/kg); 2) tratados com solução salina (**S**; grupo controle); 3) não injetados com qualquer solução (“ingênuos”; **I**). A barra horizontal, no traçado, indica o período de estimulação com KCl a 2% (1 minuto) necessário para deflagrar a **DA** na região frontal do mesmo hemisfério. Os números 1 e 2, no esquema (à direita), indicam os pontos de registro, marcados com os mesmos números à esquerda do traçado. O esquema mostra também o local de aplicação do estímulo (**KCl**) e o eletrodo de referência (**R**), sobre os ossos nasais.

RATOS JOVENS (25-30 DIAS)

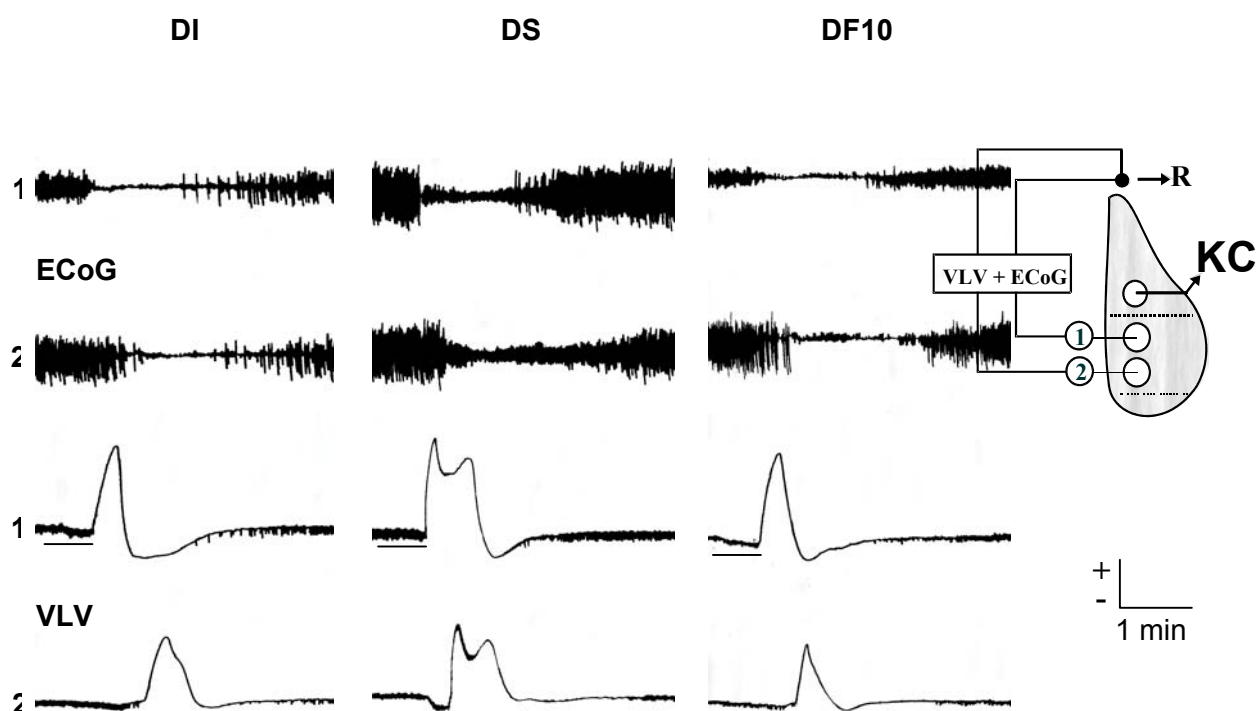


FIGURA 5 - Registros eletrofisiológicos da depressão alastrante (**DA**; electrocorticograma – **ECoG**, 0,5 mV; e, variação lenta de voltagem que acompanha a **DA** – **VLV**, 10 mV) no córtex parietal de ratos jovens (25-30 dias) desnutridos (**D**), injetados durante o aleitamento com fluoxetina (**F**; 10 mg/kg, s.c.); ou, com volume equivalente de solução salina (**S**); ou, não injetados com qualquer solução (“ingênuos”, **I**). A barra horizontal, no traçado, indica o período de estimulação com KCl a 2% (1 minuto) necessário para deflagrar a **DA** na região frontal do mesmo hemisfério. Os números 1 e 2, no esquema (à direita), indicam os pontos de registro, marcados com os mesmos números à esquerda do traçado. O esquema mostra também o local de aplicação do estímulo (**KCl**) e o eletrodo de referência (**R**), sobre os ossos nasais.

RATOS ADULTOS (60-70 DIAS)

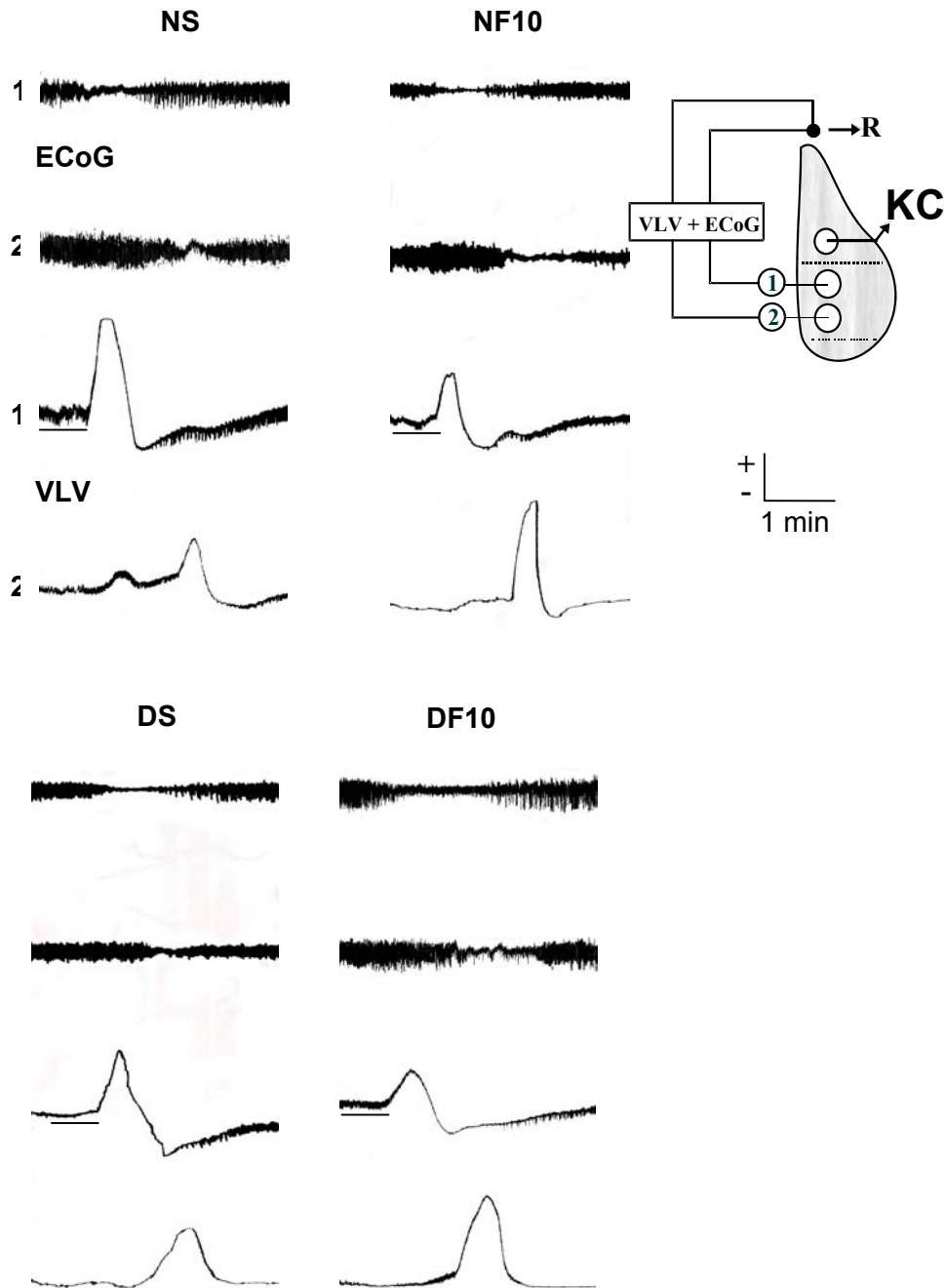


FIGURA 6 - Registros eletrofisiológicos da depressão alastrante (**DA**; eletrocorticograma – **ECoG**, 0,5 mV; e, variação lenta de voltagem que acompanha a **DA** – **VLV**, 10 mV) no córtex parietal de ratos adultos (60-70 dias) nutridos (**N**) e precocemente desnutridos (**D**), injetados durante o aleitamento com fluoxetina (**F**; 10 mg/kg, s.c.); ou, com volume equivalente de solução salina (**S**). A barra horizontal, no traçado, indica o período de estimulação com KCl a 2% (1 minuto) necessário para deflagrar a **DA** na região frontal do mesmo hemisfério. Os números 1 e 2, no esquema (à direita), indicam os pontos de registro, marcados com os mesmos números à esquerda do traçado. O esquema mostra também o local de aplicação do estímulo (**KCl**) e o eletrodo de referência (**R**), sobre os ossos nasais.

3.4. Efeito do Tratamento Farmacológico Tópico

A aplicação tópica (**T**) de fluoxetina nas concentrações de 5 ou 10 mg/ml (grupos **T5** e **T10**), no córtex parietal, reduziu significativamente, de forma “dose-dependente”, a velocidade de propagação da **DA**, nos animais nutricionalmente normais quando comparada aos seus valores basais (antes da aplicação da droga). Redução significativa decorrente do tratamento tópico com fluoxetina à concentração de 10 mg/ml também foi observada nos ratos desnutridos. Após lavagem da região tratada com solução salina, os valores de velocidade de propagação da **DA** passaram a ser semelhantes àqueles obtidos antes da aplicação da droga. A redução máxima da velocidade de propagação da **DA**, após o tratamento farmacológico tópico cortical atingiu os seguintes valores, respectivamente, para os grupos **NT5**, **NT10** e **DT10**: $7,63 \pm 1.46\%$, $43,30 \pm 10.27\%$ e $22,40 \pm 3.34\%$ (Figura 7).

Além disso, nos animais nutridos tratados com fluoxetina a 10 mg/ml, a velocidade da **DA** às vezes não pôde ser avaliada em 4 dos 14 ratos (28,6%), pois nesses casos sua propagação foi interrompida no ponto cortical tratado com fluoxetina. Antes da aplicação tópica de fluoxetina, as **DAs** sempre se propagaram normalmente para os dois pontos de registro, em 100% dos casos. Nos desnutridos, tal bloqueio não foi observado. Registros ilustrativos dos efeitos do tratamento tópico cortical com fluoxetina estão mostrados na Figura 8.

APLICAÇÃO TÓPICA DE FLUOXETINA

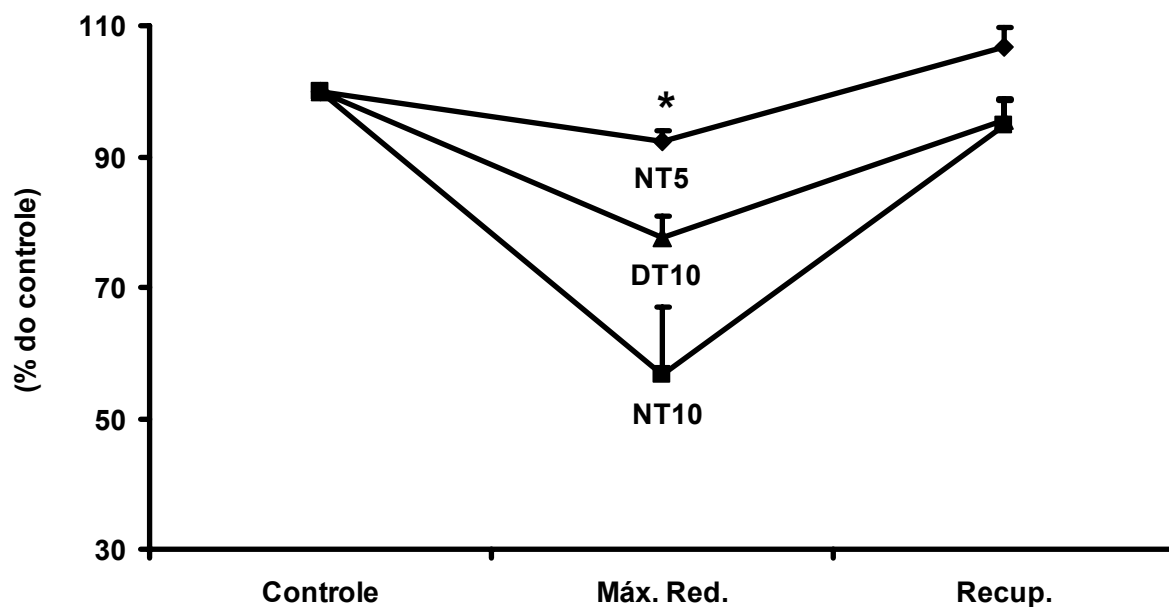


FIGURA 7 - Redução da velocidade da depressão alastrante (**DA**) em ratos adultos nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) após aplicação tópica (**T**) de fluoxetina. **T5** e **T10** indicam, respectivamente, grupos tratados com fluoxetina nas concentrações de 5 e 10 mg/ml. A solução foi aplicada topicamente durante 10 min imediatamente antes da deflagração da **DA** com KCl em uma área circular (3-4 mm de diâmetro) na superfície do córtex parietal (loais de registro), sobre a dura-máter intacta. Os dados (média±e.p.m.) são expressos como percentuais dos valores controles (antes da aplicação de fluoxetina). **Máx. Red.**, redução máxima da velocidade da **DA** (atingida cerca de 10-110 min após a primeira aplicação de fluoxetina). **Recup.**, recuperação dos efeitos da fluoxetina (obtido após 20-80 min da redução máxima). *indica que todos os valores “**Máx. Red.**” são diferentes dos correspondentes valores controles ($P < 0,05$; teste *t* pareado). **NT5**, $n = 12$; **NT10**, $n = 14$; **DT10**, $n = 8$.

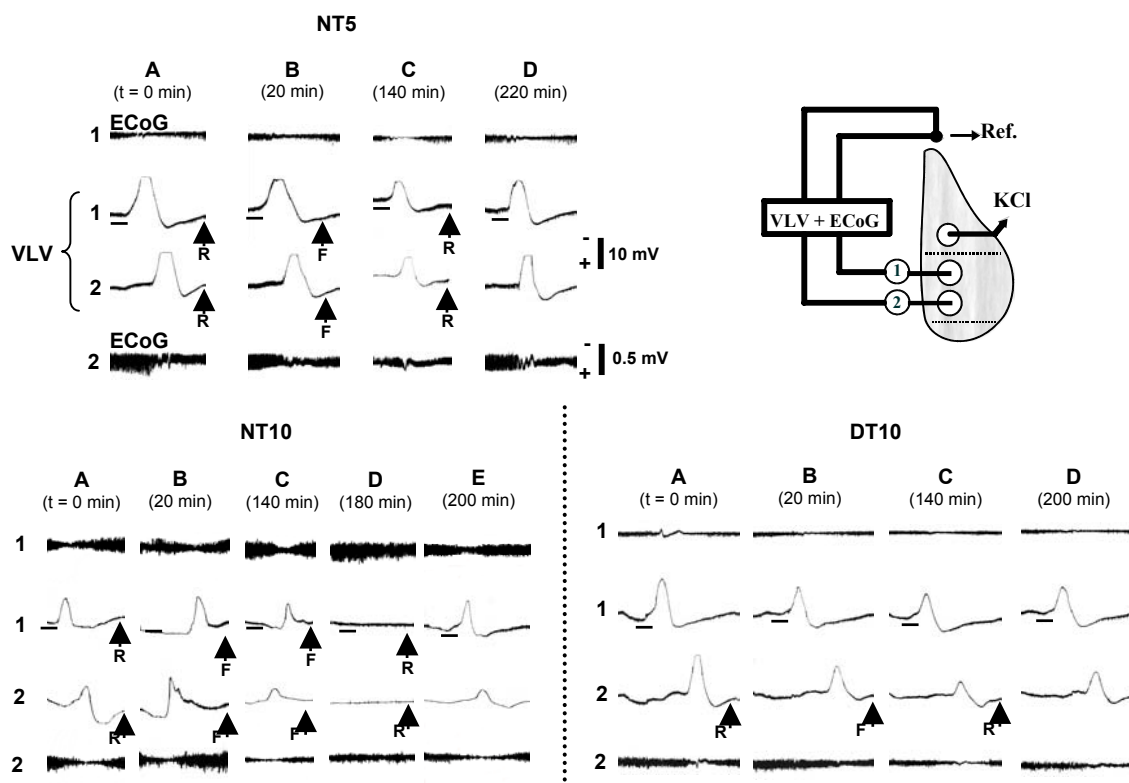


FIGURA 8 - Eletrocorticograma (ECoG) e variação lenta de voltagem (VLV) em ratos nutridos (N) e desnutridos (D), mostrando os efeitos das aplicações tópicas (T) de fluoxetina (5 ou 10 mg/ml; respectivamente, **T5** ou **T10**) sobre a depressão alastrante (DA). A barra horizontal, no traçado, indica o período de estimulação com KCl a 2% (1 minuto) necessário para deflagrar a DA na região frontal do mesmo hemisfério. Os números 1 e 2, no esquema (à direita), indicam os pontos de registro, marcados com os mesmos números à esquerda do traçado. O esquema mostra também o local de aplicação do estímulo (KCl) e o eletrodo de referência (Ref.), sobre os ossos nasais. Em cada animal, A mostra um registro controle (antes da fluoxetina). A aplicação de Ringer (R), diferentemente da de fluoxetina (F), não modificou significativamente as amplitudes da DA (comparar A e B). Reduções nas amplitudes da VLV, após aplicação de fluoxetina, estão mostradas em C em todos os animais (nos pontos de registro 1 e 2 para os ratos NT5 e NT10, e no ponto 2, para o rato DT10; pode-se observar neste último animal que a amplitude da VLV se alterou somente na região 2, que havia sido tratada com fluoxetina). No rato NT10 (D), é possível notar o bloqueio da DA nos dois pontos de registro, após aquelas regiões terem sido tratadas com fluoxetina. A recuperação dos efeitos da aplicação tópica de fluoxetina pode ser visto em D (nos ratos NT5 e DT10) e em E (nos NT10), após lavagem da região tratada com Ringer. O tempo em minutos se refere ao tempo decorrido após os registros controles.

4. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

Foram analisados os números totais, bem como as áreas do corpo celular de neurônios **NADPH-d** positivos, na área visual primária (área 17) de cada um dos hemisférios cerebrais. Isto, com o objetivo de se identificar, além das possíveis diferenças decorrentes dos tratamentos farmacológicos e nutricionais, aquelas que pudessem ser devidas à deflagração e/ou propagação da **DA** cortical.

4.1. Número de Neurônios NADPH-d Positivos

Nas comparações intragrupos não se verificou diferenças entre o hemisfério da **DA** (hemisfério direito) e o hemisfério contralateral (esquerdo) em qualquer dos grupos estudados (Figura 9).

Nas observações intergrupos, os números de neurônios dos hemisférios esquerdos correspondentes foram semelhantes entre si independentemente dos tratamentos, se farmacológicos ou nutricionais. Ao se realizar as mesmas comparações, porém no hemisfério direito, o número de neurônios **NADPH-d** positivos do grupo fluoxetina desnutrido (**DF10**) foi significativamente inferior ao do grupo controle (**DS**), nas demais aferições nenhuma diferença pode ser detectada. Todavia, aquele efeito deixou de existir quando os dois hemisférios foram estudados conjuntamente (Figuras 9 e 10).

4.2. Área do Corpo Celular de Neurônios NADPH-d Positivos

Quanto a este parâmetro, observou-se que o valor médio da área do corpo celular do hemisfério direito (lado da **DA**) do grupo fluoxetina-nutrido (**NF10**) era significativamente maior que o do hemisfério esquerdo. Nas demais comparações intragrupos, os valores médios inter-hemisférios são semelhantes (Figura 11).

Nas comparações intergrupos, quando se analisam isoladamente os hemisférios cerebrais, os valores médios da área do soma são equivalentes independentemente do tipo de tratamento ou do estado nutricional. No entanto, quando se estudam os dois hemisférios conjuntamente, a área do soma do grupo fluoxetina nutrido (**NF10**) é maior que a do grupo controle (**NS**). Tal efeito não foi encontrado nos correspondentes grupos desnutridos, nem houve diferenças quando se analisou o aspecto nutricional (Figuras 11, 12 e 13).

NÚMERO DE NEURÔNIOS NADPH-d POSITIVOS

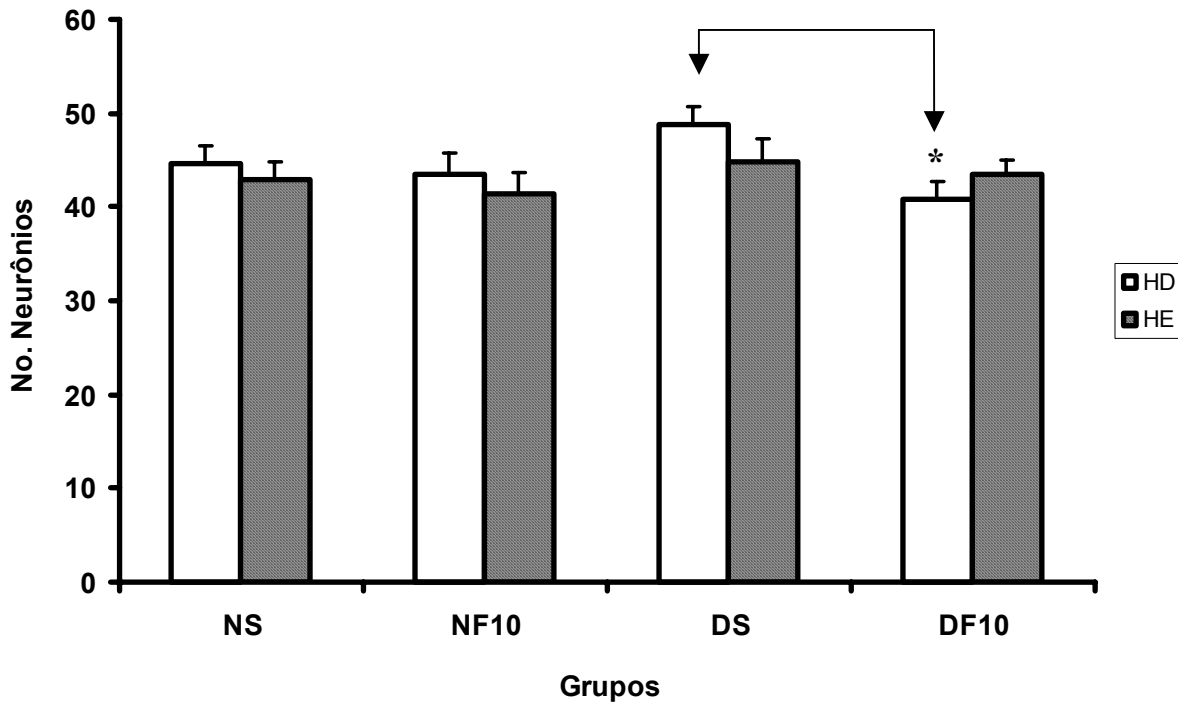


FIGURA 9 - Número de neurônios **NADPH-d** positivos em cada um dos hemisférios cerebrais (direito e esquerdo) da área visual primária (área 17) de animais jovens (25-30 dias) nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) no início da vida, e submetidos durante o aleitamento à injeção diária de fluoxetina (**F**; 10 mg/kg, s.c.) ou de volume equivalente de solução salina (**S**; grupos controles). Foram analisados 5 cortes de 150 μ m de espessura por animal. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. * $P < 0,05$ em comparação ao hemisfério direito do grupo **DS** (ANOVA, seguida do teste do Tukey). **NS**, $n = 7$; **NF10**, $n = 7$; **DS**, $n = 8$; **DF10**, $n = 6$.

NÚMERO DE NEURÔNIOS NADPH-d POSITIVOS

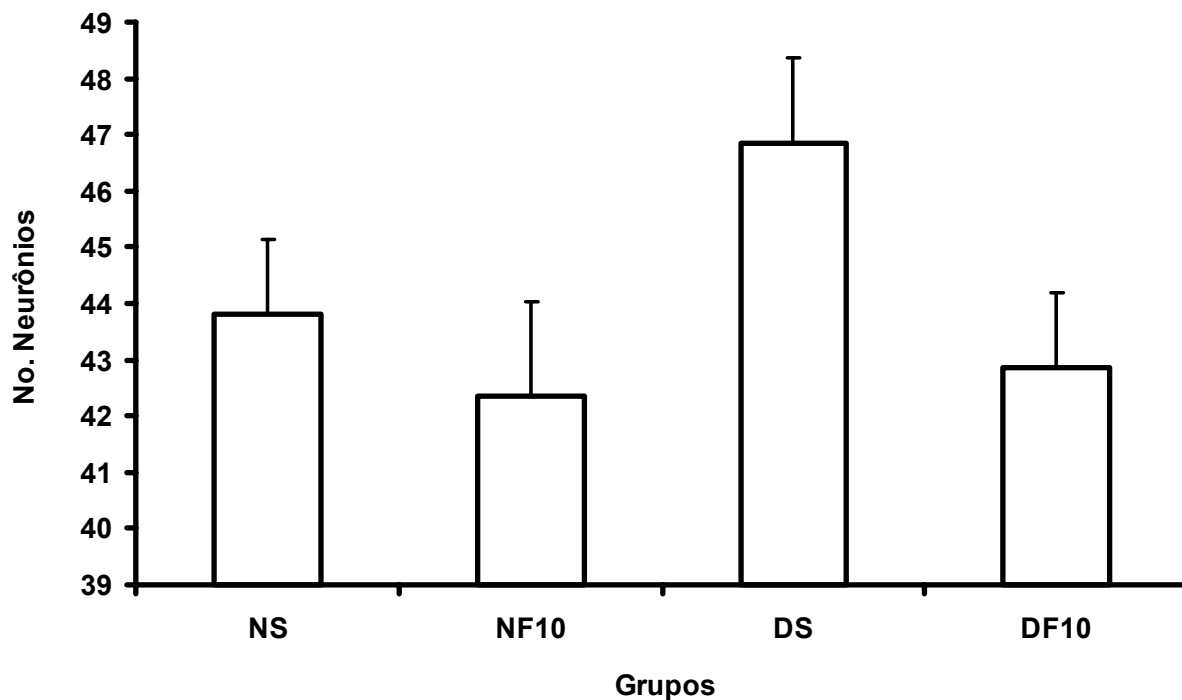


FIGURA 10 - Número de neurônios **NADPH-d** positivos totais (ambos os hemisférios) da área visual primária (área 17) de animais jovens (25-30 dias) nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) no início da vida, e submetidos durante o aleitamento à injeção diária de fluoxetina (**F**; 10 mg/kg, s.c.) ou de volume equivalente de solução salina (**S**; grupos controles). Foram analisados 5 cortes de 150 μ m de espessura por animal. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA, seguida do teste do Tukey). **NS**, n = 7; **NF10**, n = 7; **DS**, n = 8; **DF10**, n = 6.

ÁREA DO CORPO CELULAR DE NEURÔNIOS NADPH-d POSITIVOS

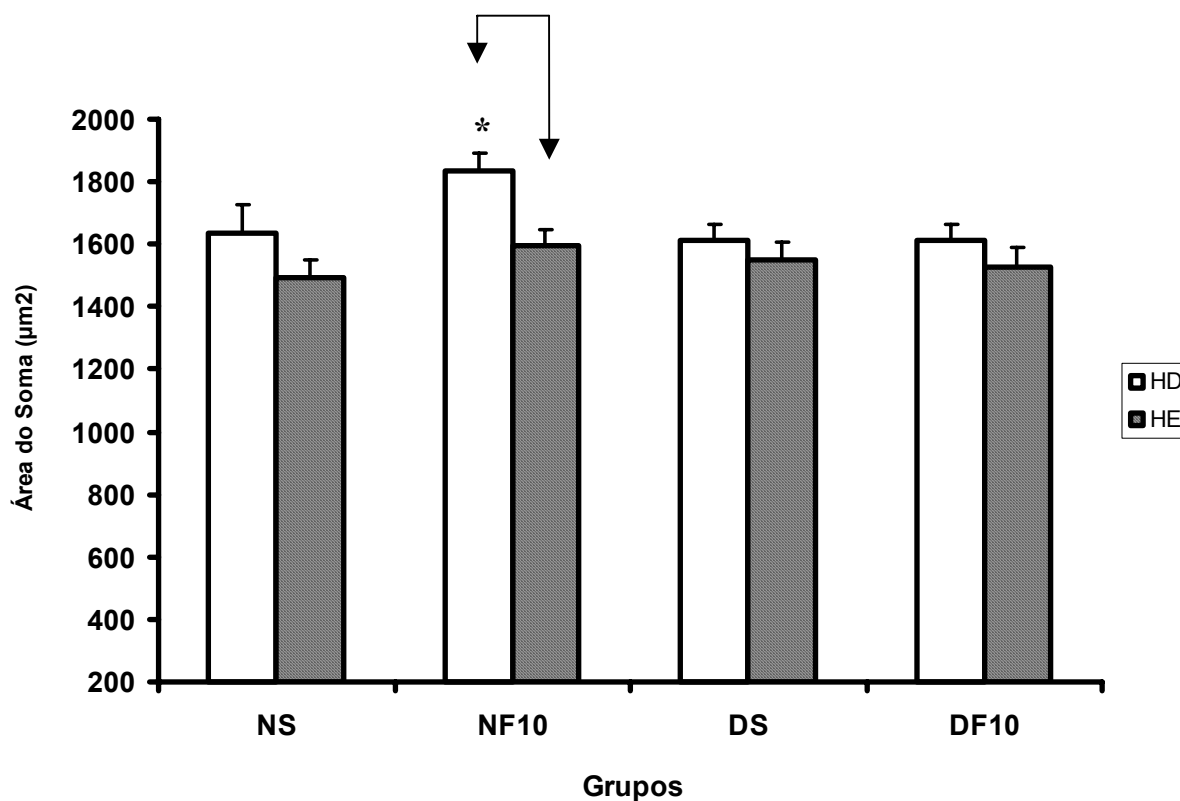


FIGURA 11 - Área do corpo celular (soma) de neurônios **NADPH-d** positivos em cada um dos hemisférios cerebrais (direito e esquerdo) da área visual primária (área 17) de animais jovens (25-30 dias) nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) no início da vida, e submetidos durante o aleitamento à injeção diária de fluoxetina (**F**; 10 mg/kg, s.c.) ou de volume equivalente de solução salina (**S**; grupos controles). Foram analisadas 20 células por animal. Os dados representam a média±e.p.m. * $P < 0,05$ em comparação ao hemisfério esquerdo do mesmo grupo (ANOVA, seguida do teste do Tukey). **NS**, $n = 7$; **NF10**, $n = 7$; **DS**, $n = 8$; **DF10**, $n = 6$.

ÁREA DO CORPO CELULAR DE NEURÔNIOS NADPH-d POSITIVOS

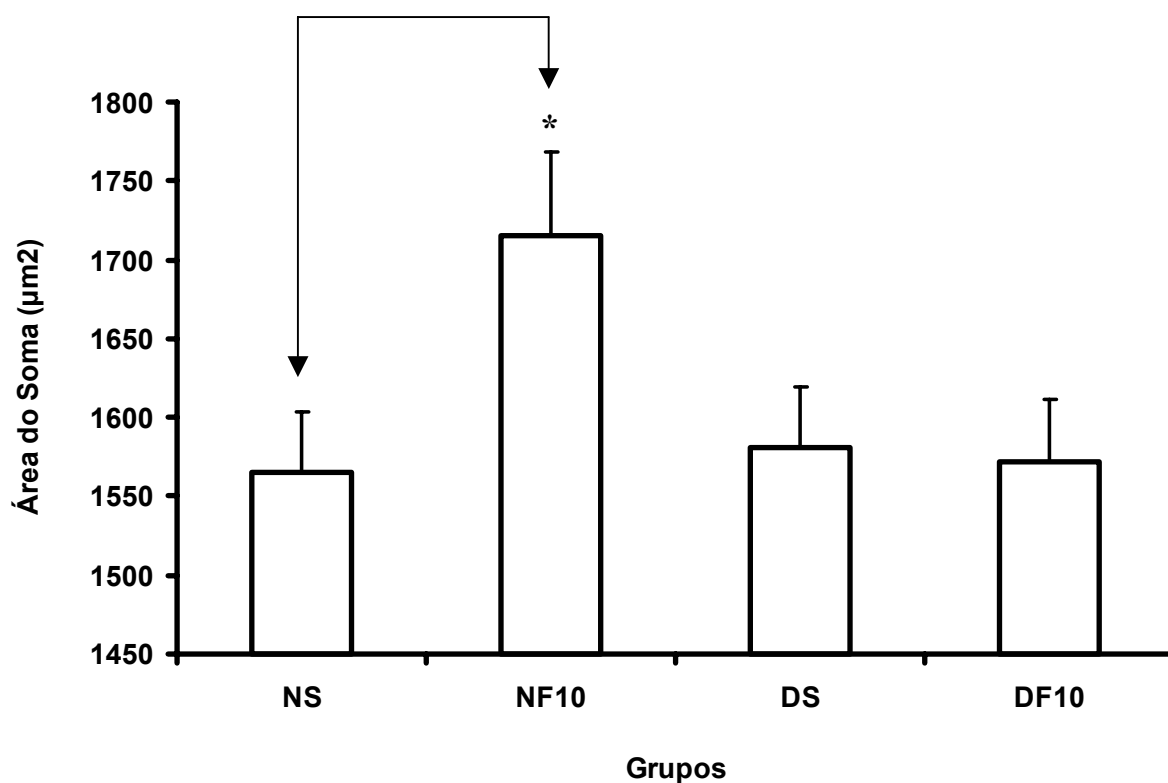


FIGURA 12 - Área do corpo celular (soma) de neurônios **NADPH-d** positivos totais (ambos os hemisférios) da área visual primária (área 17) de animais jovens (25-30 dias) nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) no início da vida, e submetidos durante o aleitamento à injeção diária de fluoxetina (**F**; 10 mg/kg, s.c.) ou de volume equivalente de solução salina (**S**; grupos controles). Foram analisadas 20 células por animal. Os dados representam a média±e.p.m. * $P < 0,05$ em comparação ao grupo controle **NS**. ANOVA, seguida do teste do Tukey. **NS**, $n = 7$; **NF10**, $n = 7$; **DS**, $n = 8$; **DF10**, $n = 6$.

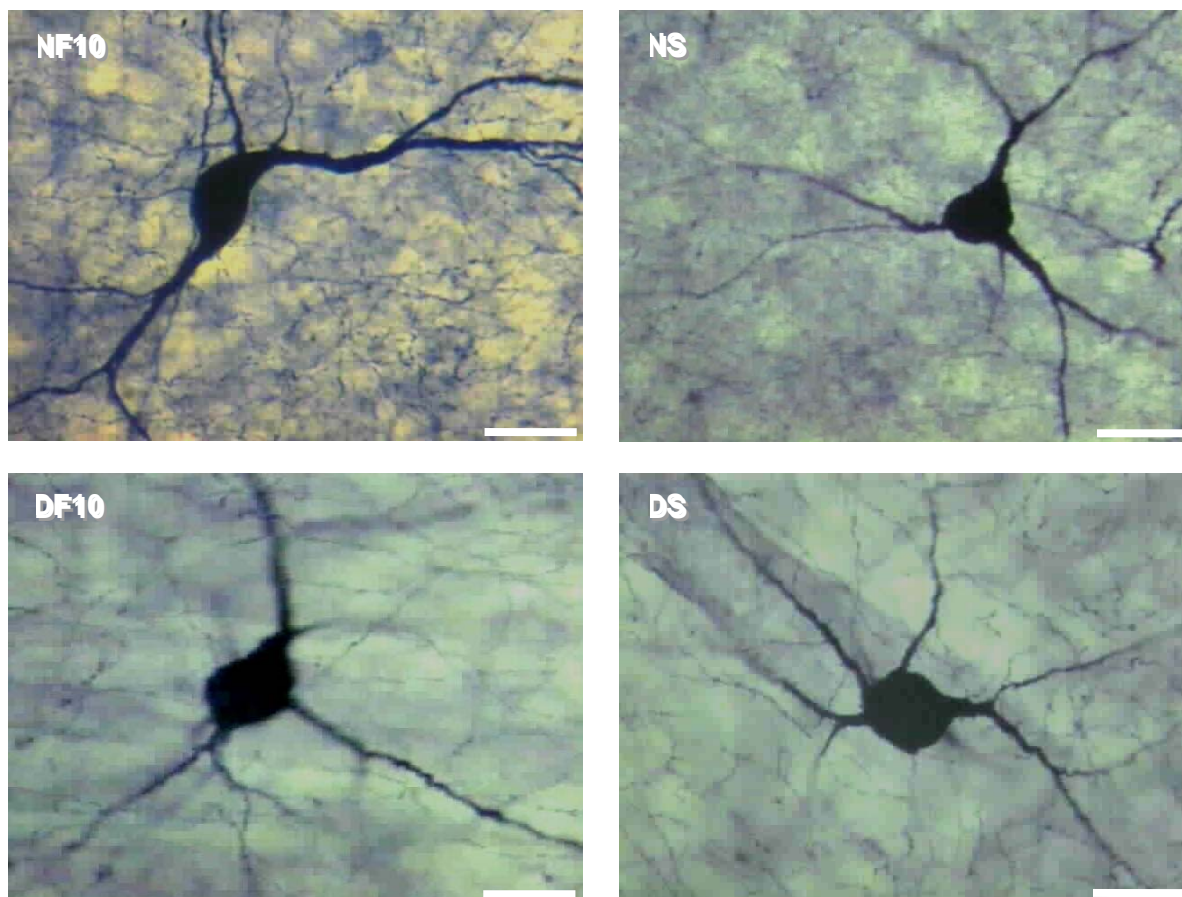


FIGURA 13 - Fotomicrografias de células **NADPH-d** positivas da área visual primária (área 17) de animais jovens (25-30 dias) nutridos (**N**) e desnutridos (**D**) no início da vida, e submetidos durante o aleitamento à injeção diária de fluoxetina (10 mg/kg, s.c.) ou de volume equivalente de solução salina (**S**; grupos controles). Escala da barra: 20 μ m.

5. NEUROGÊNESE

Como mencionado em “Métodos”, esta parte do presente trabalho foi realizada no Departamento de Psicologia da Universidade de Princeton (EUA), sob a supervisão do prof. Barry Jacobs, na vigência de “bolsa de Doutorado Sanduíche” concedida pelo CNPq.

O número de células neuronais da região hipocampal (camadas granulares, subgranulares e hilo) que incorporaram ao seu DNA o 5-bromo-2-deoxiuridina (**BrdU**) foi semelhante quando se compararam os grupos tratados com fluoxetina com os seus respectivos controles, tratados com solução salina. Essa ausência de efeito foi demonstrada tanto aos 25, como aos 60 dias de vida. Todavia, o número de células marcadas pelo **BrdU** foi muito mais elevado no início da vida, do que na idade adulta; cerca de quase 3 vezes mais que nesta última fase da vida (Tabela 7 e Figura 14).

5.1. Relação entre Neurogênese e Estresse

O estresse induzido de forma aguda aos 60 dias de vida, tanto através da aplicação de lipopolissacarídeo (**L**), como por meio da contensão (**C**), não exerceu qualquer efeito sobre o número de células hipocampus (camadas granulares, subgranulares e hilo) positivas ao **BrdU**. Da mesma maneira, o tratamento precoce com fluoxetina não influenciou a resposta do hipocampo do animal adulto a qualquer dos dois tipos de agentes estressores (Tabela 8).

TABELA 7 - Número de neurônios hipocâmpais positivos ao 5-bromo-2-deoxiuridina de ratos submetidos durante o aleitamento a uma única aplicação diária de fluoxetina (F; 10 mg/kg, s.c.) ou de volume equivalente de solução salina (S; grupos controles). O efeito do tratamento precoce foi investigado aos 25 e 60 dias de idade. As letras minúsculas indicam valores diferentes ($P < 0,05$) dos respectivos valores dos grupos marcados com a mesma letra, na coluna do meio. A análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida do teste de Tukey.

IDADE EXPERIMENTAL	GRUPO	MÉDIA $\pm$ E.P.M
25 dias	S-25 (n=5) (a)	858,0 $\pm$ 23,6 ^c
	F-25 (n=6) (b)	848,5 $\pm$ 35,6 ^d
60 dias	S-60 (n=2) (c)	313,0 $\pm$ 11,0
	F-60 (n=4) (d)	289,0 $\pm$ 19,9

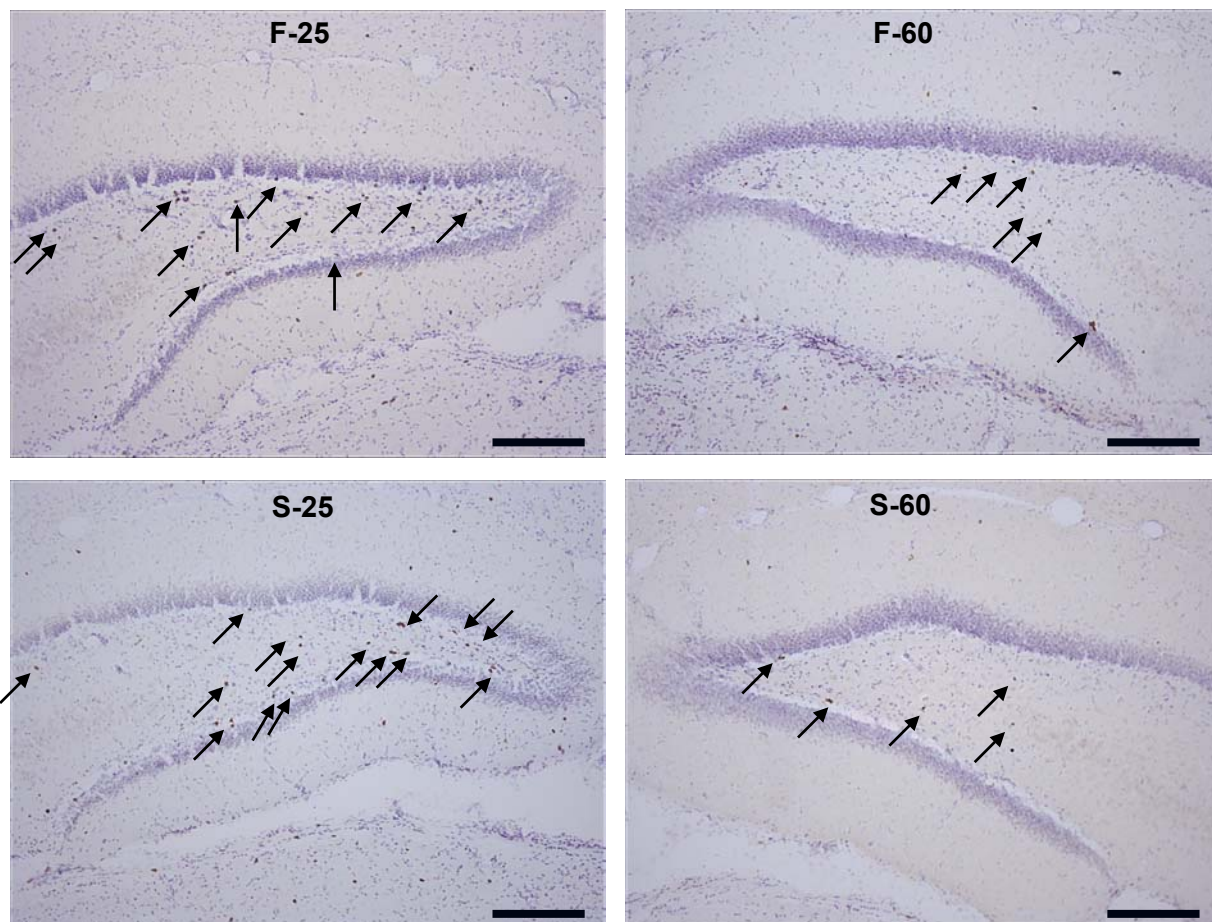


FIGURA 14 - Fotomicrografias de fatias coronais (Bregma - 5.20) de hipocampus de ratos marcados com anti-bromodeoxiuridina aos 25 ou aos 60 dias de vida. Os animais foram tratados durante o período de lactação com fluoxetina (**F**; 10 mg/kg/dia, s.c.) ou com volume equivalente de solução salina (**S**; grupos controles). As células ou grupos celulares positivos a bromodeoxiuridina (pontos marrons) estão identificados pelas setas. Escala da barra: 20 μ m.

TABELA 8 - Número de neurônios hipocâmpais positivos ao 5-bromo-2-deoxiuridina de ratos tratados durante o aleitamento com uma única aplicação diária de fluoxetina (**F**; 10 mg/kg, s.c.) ou de volume equivalente de solução salina (**S**; grupos controles) e, submetidos aos 60 dias de vida a uma das seguintes condições: 1) duas injeções de lipopolissacarídeo (**L**; 1 mg/kg, i.p.; grupos **F-L** e **S-L**) ou de solução salina (5 ml/kg; grupos **F-S** e **S-S**); 2) contensão (**C**) durante duas horas (grupos **F-C** e **S-C**; que foram comparados, respectivamente, aos grupos **F-60** e **S-60** do estudo anterior). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA, seguida do teste de Tukey).

AGENTES ESTRESSORES	GRUPO	MÉDIA $\pm$ E.P.M
Lipopolissacarídeo (L)	S-S (n=2)	288,0 $\pm$ 10,0
	S-L (n=3)	282,0 $\pm$ 31,7
	F-S (n=2)	265,0 $\pm$ 4,0
	F-L (n=3)	228,0 $\pm$ 25,9
Contensão (C)	S-60 (n=2)	313,0 $\pm$ 11,0
	S-C (n=4)	288,8 $\pm$ 10,5
	F-60 (n=4)	289,0 $\pm$ 19,9
	F-C (n=2)	225,0 $\pm$ 5,0

DISCUSSÃO

Os dados apresentados demonstram que o tratamento farmacológico com fluoxetina no início da vida, associado ou não à desnutrição precoce, foi eficaz em reduzir de forma dose-dependente a velocidade de propagação do fenômeno da depressão alastrante (**DA**), o qual tem sido relacionado à excitabilidade cerebral. Adicionalmente, ele também influenciou alguns dos parâmetros ponderais investigados, mantendo inalterados alguns aspectos da imunohistoquímica cerebral. Esses resultados serão discutidos à luz da literatura, apresentando-se quando pertinente, os mecanismos possíveis para explicar os efeitos observados.

A administração de fluoxetina no período de rápido crescimento do encéfalo (aleitamento) provocou diminuição do peso corporal desde as fases iniciais do tratamento. Esse efeito ocorreu de forma dependente da dose, sendo diretamente proporcional à mesma. É interessante notar que a desnutrição não modificou o efeito da droga sobre o ganho reduzido de peso corporal, observado nos animais nutridos. Essas alterações ponderais podem estar relacionadas ao aumento na disponibilidade sináptica de serotonina (**5-HT**) decorrente do tratamento com fluoxetina (Fuller *et al.*, 1991). De fato, a associação entre atividade serotoninérgica e controle da ingestão alimentar tem sido bastante documentada (Blundell, 1992; Leibowitz e Shor-Posner, 1986; Simansky, 1996; Mancilla-Diaz *et al.*, 2005). Dados da literatura atribuem, a muitas das drogas que agem no sistema serotoninérgico, um efeito anoréxico (Silverstone, 1992; Garattini, 1995; Halford e Blundel, 1996), que culminaria com a redução do peso corporal. Adicionalmente, outros trabalhos de nosso laboratório utilizando drogas que estimulam o sistema serotoninérgico e até mesmo a fluoxetina, também têm encontrado resultados

similares (Amâncio-dos-Santos, 2001; Manhães-de-Castro *et al.*, 2001; Barreto-Medeiros *et al.*, 2004).

No que se refere a fluoxetina, esse fármaco tem sido utilizado como um supressor de apetite em tratamentos que têm como objetivo a redução de peso corporal, sobretudo em situações nas quais a obesidade é decorrente de alterações psíquicas relacionadas à ansiedade ou depressão, isto é, a alterações nos níveis de neurotransmissores cerebrais, especialmente, a **5-HT** (Salvador *et al.*, 2002). Há de se admitir, contudo, que tal efeito, se desejável em indivíduos adultos, pode não ser apropriado quando se trata de sujeitos recém-nascidos, como ocorrido nesse trabalho. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (**ISRS**) têm sido prescritos para o tratamento de depressão pós-parto, por apresentarem menos efeito colateral que drogas similares (Fuller *et al.*, 1991), mais especificamente a fluoxetina tem sido utilizada com essa finalidade (Heikkinen *et al.*, 2003). Diante da possibilidade de que esses fármacos possam chegar às crianças através do leite materno (Heikkinen *et al.*, 2003), este trabalho reforça um alerta a essas situações.

Todavia, vale ressaltar que o principal objetivo deste trabalho tem sido simplesmente estimular um sistema neurotransmissor, no início da vida (como instrumento para tal foi usada a fluoxetina) e investigar como o cérebro responderia a tal estímulo. Adicionalmente, buscar alguma resposta que possa esclarecer como essa ativação do sistema serotoninérgico poderia influenciar o fenômeno da **DA**, cujos mecanismos subjacentes ainda não estão totalmente elucidados. É digno de nota também que, apesar de o ganho de peso corporal estar reduzido em decorrência do tratamento farmacológico, não foram detectadas reduções de peso encefálico, nem alterações significativas nas análises imunohistoquímicas cerebrais, pelo menos nos animais nutricionalmente normais. Desta feita, embora a variável peso corporal deva ser

sempre considerada, até mesmo por ser uma medida de fácil aquisição, é possível que ela não seja a única, ou mesmo a melhor indicadora de eficácia terapêutica.

O impacto negativo da desnutrição sobre o peso corporal é tema extensivamente relatado e conhecido (Almeida *et al.*, 2002). O fato de se submeter animais à desnutrição neste trabalho teve por finalidade investigar como seria o efeito da fluoxetina em animais desnutridos, se este seria potencializado ou suprimido. Mais uma vez pôde ser confirmado que a desnutrição, imposta pela administração da dieta básica regional (**DBR**) às nutrízes no período do aleitamento, provocou redução significativa do peso corporal dos filhotes, provavelmente devido a alterações tanto na quantidade, como na qualidade do leite materno (Crnic e Chase, 1978; Wanderley, 2001; Teodósio *et al.*, 1990).

Dependendo de sua intensidade, a desnutrição precoce, além de afetar o peso corporal, pode também reduzir o peso encefálico total. Essa redução resulta provavelmente do menor número e/ou menor tamanho dos elementos celulares, bem como de alterações nos processos de maturação neuronal, levando a diminuição do desenvolvimento da arborização dendrítica, sináptica e da mielinização (Morgane *et al.*, 1993; Picanço-Diniz *et al.*, 1998; Borba *et al.*, 2000; Rocha-de-Melo *et al.*, 2004). Nossos dados mostraram que os animais desnutridos pela **DBR** apresentaram pesos cerebrais absolutos (úmido e seco) menores ao serem comparados aos de animais nutridos, confirmando dados anteriores (Teodósio *et al.*, 1990; Santos-Monteiro *et al.*, 2000).

Por outro lado, a relação entre o peso do encéfalo e o peso corporal foi maior para os animais desnutridos. Isto pode indicar desproporção entre o conjunto do organismo e a cabeça, freqüentemente uma consequência da desnutrição. É bastante conhecido na literatura que o crescimento do encéfalo não é tão afetado pela agressão

nutricional quanto o de outros órgãos (Resnick e Morgane, 1984; Teodósio *et al.*, 1990). Assim, esse peso encefálico relativo mais alto dos animais desnutridos ocorreu às custas do maior impacto da desnutrição sobre o peso corporal, e não por aumento do peso cerebral; uma vez que os pesos absolutos (úmido e seco) dos encéfalos desses animais eram claramente menores que o dos correspondentes animais nutridos.

No caso dos animais nutridos, o tratamento com fluoxetina durante o aleitamento não exerceu influência sobre os pesos encefálicos, a despeito do reduzido ganho de peso corporal que sugeria certo grau de desnutrição, sofrida por esses animais. Esses dados parecem evidenciar a existência de mecanismos de proteção para o sistema nervoso, de modo a poupá-lo, em relação aos outros sistemas, mediante agressões exógenas em sua fase mais crítica de desenvolvimento, neste caso, o aleitamento (Morgane *et al.*, 1978; 1993). O aumento da disponibilidade de **5-HT** a partir da fluoxetina (Fuller *et al.*, 1991), se por um lado provoca hipofagia, por outro, poderia acentuar aqueles mecanismos de proteção, uma vez que a **5-HT** parece atuar como um fator trófico sinalizando ou regulando o desenvolvimento, inclusive estimulando as células gliais a produzir outros fatores tróficos de crescimento (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1996; Rubenstein, 1998). Resultados similares foram encontrados por Amâncio-dos-Santos (2001) ao tratar animais, durante essa mesma fase da vida, com um outro **ISRS**, o citalopram.

Nos animais desnutridos, aqueles tratados com fluoxetina apresentaram pesos encefálicos absolutos significativamente menores e pesos relativos maiores que aqueles de seu controle (grupo **DS**). Ou seja, embora a administração isolada de fluoxetina não tenha interferido de forma negativa sobre o peso do encéfalo, tal efeito passa a existir quando ela se associa a um potente agente agressor, a desnutrição precoce. Assim, é possível que a soma de dois fatores que sabidamente acarretam alterações ponderais

(Picanço-Diniz *et al.*, 1998; Borba *et al.*, 2000; Rocha-de-Melo *et al.*, 2004; Amâncio-dos-Santos, 2001; Manhães-de-Castro *et al.*, 2001; Barreto-Medeiros *et al.*, 2004), comprometam aquele efeito trófico que a maior disponibilidade de **5-HT** pudesse exercer sobre o cérebro (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1996; Rubenstein, 1998). Tem sido bastante documentado que desnutrição no início da vida acarreta inúmeras seqüelas ao arcabouço estrutural do sistema nervoso (Picanço-Diniz *et al.*, 1998; Borba *et al.*, 2000; Rocha-de-Melo *et al.*, 2004), dessa forma, é coerente supor que ela possa ter representado, neste caso, um obstáculo à atuação da **5-HT** como um regulador do crescimento e do desenvolvimento.

A **DBR** imposta aos animais no período de aleitamento, produziu um efeito facilitador sobre a **DA** cortical, a julgar pelas maiores velocidades de propagação nos grupos desnutridos controles (tratados com solução salina ou não injetados) em comparação com os respectivos grupos nutridos. Essa maior susceptibilidade à **DA** encontrada neste estudo confirma achados anteriores (Guedes, 1984; Guedes *et al.*, 1987; Andrade *et al.*, 1990; Ximenes-da-Silva e Guedes, 1991; Guedes *et al.*, 1996; Rocha-de-Melo e Guedes, 1997; Santos-Monteiro *et al.*, 2000) e evidencia, mais uma vez, a grande sensibilidade do córtex cerebral à deficiência nutricional, sobretudo durante o aleitamento.

A presente investigação foi dirigida especialmente à avaliação das alterações eletrofisiológicas corticais após tratamento com fluoxetina em um período de extrema importância para o desenvolvimento do sistema nervoso, que é o período de aleitamento em ratos. Os resultados apresentados mostram que, em ambas as situações nutricionais, os animais tratados com fluoxetina apresentaram velocidades de propagação da **DA** menores que as dos animais controles (injetados com solução salina), sendo esse efeito dependente da dose.

Adicionalmente, o tratamento precoce com fluoxetina parece influenciar de forma duradoura o fenômeno da DA, haja vista o fato de que os mesmos efeitos observados imediatamente após o desmame ainda permaneciam na idade adulta (60-70 dias). O que sugere, como um possível mecanismo subjacente, a ocorrência de modificações estruturais nos dois grupos estudados. Interessantemente, alterações persistentes no sistema transportador da 5-HT têm sido recentemente descritas em ratos adultos tratados precocemente com aquele mesmo fármaco (Bock et al., 2005).

Um papel freqüentemente inibitório da **5-HT** no sistema nervoso central tem sido documentado (Vogt, 1982; Cooper *et al.*, 1996). Associado a isto, tem sido evidenciado o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos inibitórios na enxaqueca clássica (Gold *et al.*, 1998) e na epilepsia (Salgado-Comissariat e Alkadhi, 1997; Lu e Gean, 1998), processos patológicos que têm sido associados à **DA**. Em relação à própria **DA**, outras drogas que agem no sistema serotoninérgico, acentuando suas ações, também atuam no sentido de reduzir sua velocidade de propagação (Barkley *et al.*, 1992; Cabral-Filho *et al.*, 1995; Araújo, 1997; Krüger *et al.*, 1999; Guedes *et al.*, 2002).

Os efeitos antagônicos do tratamento com fluoxetina sobre a **DA** têm sido atribuídos ao aumento da atividade serotoninérgica no sistema nervoso central (Barkley *et al.*, 1992; Cabral-Filho *et al.*, 1995; Krüger *et al.*, 1999; Guedes *et al.*, 2002). Como anteriormente mencionado, a fluoxetina inibe seletivamente a recaptação sináptica de **5-HT** (Fuller *et al.*, 1991; Hiemke e Härter, 2000). Essa inibição provoca um aumento imediato da concentração sináptica da referida amina, o que pode amplificar suas ações em seus múltiplos receptores nas várias regiões cerebrais, inclusive no neocórtex, estrutura onde a **DA** foi registrada (Bloom e Morales, 1998).

No que se refere aos mecanismos que envolvem a interação sistema da **5-HT** e fenômeno da **DA**, há evidências que os relacionam a adaptações ao nível dos receptores

serotoninérgicos, especialmente do receptor **5-HT_{1A}** (Krüger *et al.*, 1999). Este receptor somatodendrítico age como um auto-receptor inibitório, porque sua estimulação resulta em diminuição da liberação neuronal de **5-HT** (Graeff, 1998). Entretanto, estudos eletrofisiológicos mostraram que a administração crônica de agonistas **5-HT_{1A}** ou de **ISRSs** dessensibiliza os auto-receptores, resultando em aumento da neurotransmissão serotoninérgica (Graeff, 1998; Hervás *et al.*, 2001), sem afetar a responsividade dos receptores **5-HT_{1A}** pós-sinápticos (Graeff, 1998). Isso é importante, porque é amplamente difundido na literatura que a ativação de receptores **5-HT_{1A}** conduz a uma hiperpolarização da membrana e inibição do disparo neuronal, através de um aumento da entrada de K⁺ na célula (Borsini *et al.*, 1995; Graeff, 1998; Lu e Gean, 1998; Krüger *et al.*, 1999). Essa hiperpolarização da membrana poderia também, inclusive, aumentar o limiar para a deflagração da **DA** (Krüger *et al.*, 1999).

Outras evidências apontam para um papel de natureza antioxidante, em que a serotonina inibiria a produção de radicais livres (Read e Parsons, 2000). Por sua vez, relatos da literatura sugerem que substâncias antioxidantes parecem reduzir a velocidade de propagação da **DA** (Souza-Bezerra *et al.*, 2005), ao passo que a presença de radicais livres exerce um efeito facilitador sobre a mesma (Netto e Martins-Ferreira, 1989; El-Bacha *et al.*, 1998; Guedes *et al.*, 1996).

Interações com outros sistemas neurotransmissores também poderiam estar envolvidas no efeito antagônico da **5-HT** sobre a **DA**. Dados demonstram que a administração crônica de drogas serotoninérgicas, como os antidepressivos citalopram e imipramina, parecem reduzir os níveis de subunidades de RNAm do receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA; Boyer *et al.*, 1998), possivelmente alterando sua ação fisiológica. Por outro lado, tem sido mostrado que antagonistas NMDA dificultam o fenômeno da **DA** (Guedes *et al.*, 1988; Marrannes *et al.* 1988; Nellgard e Wieloch, 1992).

Investigações futuras envolvendo a possibilidade de uma participação indireta deste receptor nos efeitos da fluoxetina sobre a **DA** poderiam ser pertinentes.

Um outro elemento indiscutivelmente importante na eficiência de um fármaco é a dose utilizada. Guedes *et al.* (2002) encontraram um efeito antagônico, dependente da dose sobre a **DA** ao tratar animais de forma tópica, na região de registro, com citalopram (1 e 5 mg/ml). Tal efeito foi atribuído à disponibilidade crescente de **5-HT** na fenda sináptica à medida que aumentava a concentração cortical daquele fármaco. Este trabalho confirma e reforça os achados anteriores; pois, tanto o tratamento sistêmico precoce, como o tópico, com fluoxetina exerceram um efeito inversamente proporcional sobre a velocidade da **DA**. Isto é, sistemicamente, a dose mínima de 5 mg/kg não influenciou significativamente os valores, mas com a dose de 10 mg/kg passaram a ser detectadas reduções significativas. Redução máxima da velocidade da **DA** foi encontrada com a dose de 20 mg/kg, na qual foi atingido um platô, pois a dose de 40 mg/kg não incrementou aquele efeito. Semelhantemente, os animais tratados de forma tópica, durante o registro da **DA**, nas concentrações de 5 mg/ml e 10 mg/ml, mais uma vez comprovam esse efeito dose-dependente.

Ainda concernente à dosagem da droga é interessante mencionar que houve diferenças quanto ao estado nutricional. Por exemplo, nos animais nutridos a dose mínima realmente eficaz foi a de 20 mg/kg; enquanto que, os desnutridos responderam com máxima intensidade à dose de 10 mg/kg. O potente efeito antagônico da fluoxetina sobre o fenômeno da **DA** nos animais desnutridos se tornou evidente pelo fato de os valores médios da velocidade de propagação do grupo fluoxetina-desnutrido serem equivalentes aos do correspondente grupo nutrido, bem como aos do grupo **NS** (nutrido-controle) em todas as horas de registro. Ou seja, a desnutrição não prejudicou o efeito da fluoxetina quanto à **DA**, antes parece até intensificá-lo. Relatos da literatura têm

evidenciado um provável aumento da atividade serotoninérgica decorrente de episódios de desnutrição durante o período crítico de desenvolvimento do cérebro (Manjarrez *et al.*, 1998; Kehoe *et al.*, 2001). Também tem sido observado aumento na concentração de triptofano cerebral durante a inanição aguda (Huether *et al.*, 1998). Assim, é possível que a “superestimulação” do sistema serotoninérgico ocasionada pela associação entre fluoxetina e desnutrição seja a responsável por essa maior sensibilidade sobre o fenômeno da **DA**. Por outro lado, esse efeito parece sofrer também a influência da via de administração, uma vez que os animais desnutridos, tratados de forma tópica apresentaram reduções máximas de velocidade da **DA** inferiores a dos nutridos tratados com a mesma dose e não foi observado bloqueio, na região tratada, quanto à propagação do fenômeno.

Com relação a esse aspecto, desnutrição *versus* funcionamento do sistema serotoninérgico, dados comportamentais e eletrofisiológicos obtidos no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (**LAFINNT**) têm se mostrado por vezes divergentes. Barreto-Medeiros *et al.* (2004) tratando ratos adultos normais e precocemente desnutridos com citalopram observaram redução da resposta agressiva nos ratos nutricionalmente normais, mas não nos desnutridos. Semelhantemente, Araújo (1997) encontrou que a administração de sumatriptam durante o aleitamento, a ratos desnutridos teve pouco efeito em alterar a propagação da depressão alastrante quando os animais se tornaram adultos. Os autores atribuíram esses resultados a uma hiporresponsividade cerebral ao tratamento farmacológico em decorrência da desnutrição. Por outro lado, em um outro estudo, a resposta elétrica cerebral de ratos previamente desnutridos, tratados com citalopram na vida adulta, não diferiu da dos animais nutridos com relação ao fenômeno da **DA** cortical (Amâncio-dos-Santos, 2001; Guedes *et al.*, 2002). Assim, pelo menos do ponto de vista da **DA**, onde a **5-HT** parece

exercer um papel antagônico (Cabral-Filho *et al.*, 1995; Amâncio-dos-Santos, 2001; Guedes *et al.*, 2002), as prováveis alterações quanto a responsividade do sistema serotoninérgico devidas à desnutrição ainda não estão totalmente esclarecidas e parecem ser dependentes do fármaco ou da metodologia utilizada.

Dada a influência do estresse sobre a fisiologia do sistema nervoso central, foi incluído neste trabalho, um grupo controle adicional, o grupo ingênuo. Este grupo não recebia qualquer tratamento e foi utilizado com o objetivo de se analisar um possível efeito do estresse, principalmente sobre a eletrofisiologia cerebral. Em todas as variáveis analisadas, não houve diferenças significativas entre os animais ingênuos e aqueles injetados com solução salina. Resultados semelhantes foram obtidos por Guedes *et al.* (2002) em animais nutricionalmente normais e demonstram que as injeções subcutâneas durante as fases iniciais da vida não representam um estresse relevante para os animais, independentemente do estado nutricional, pelo menos nos modelos experimentais utilizados na presente investigação.

Associação entre os sistemas serotoninérgico e nitrérgico tem sido um tema de crescente interesse na literatura. A partir desses dados, há evidências de que a inibição da atividade nitrérgica parece potencializar a serotoninérgica e que isso teria repercussões inclusive amplificando o papel antidepressivo da **5-HT** (Luo e Tan, 2001; Harkin *et al.*, 2004). Uma das formas de se analisar a atividade do sistema nitrérgico é através da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-diaforase (**NADPH-d**), a qual tem sido documentado estar presente na estrutura de neurônios produtores de óxido nítrico (**NO**), concomitantemente com a enzima sintase do óxido nítrico (**NOS**) (Hope *et al.*, 1991; Matsumoto *et al.*, 1993). Em nosso estudo, tínhamos como objetivo investigar se a estimulação precoce do sistema serotoninérgico modificaria a morfometria de neurônios **NADPH-d** positivos do córtex visual primário (área 17).

Adicionalmente, analisar alguma possível relação entre esses sistemas neurotransmissores e a **DA**.

Neste trabalho não se verificou qualquer diferença significativa quanto ao número de neurônios **NADPH-d** positivos do córtex visual entre o hemisfério da **DA** (direito) e o hemisfério contralateral em quaisquer dos grupos estudados. Caggiano e Kraig (1998) encontraram que o número de células neuronais imunopositivas para **NOS** no neocórtex estava significativamente aumentado 6 horas e 3 dias após a **DA**, sendo que nesse último caso, a marcação era ainda mais intensa. Esses resultados aparentemente conflitantes talvez possam ser explicados pelos diferentes métodos empregados. Neste estudo foi realizada a técnica histoquímica para a **NADPH-d** e não a imunohistoquímica para a **NOS**. Além disso, nós analisamos uma área cortical restrita, a área 17 do córtex visual, enquanto que aqueles autores referem à análise do neocórtex como um todo. Eles também destacam que essas diferenças foram encontradas nas regiões neocorticais mais superficiais, não havendo diferenças significativas quando se analisava o neocórtex em camadas mais profundas. Uma outra divergência também pode estar relacionada com o intervalo pós **DA** em que os animais foram sacrificados. Neste estudo os animais foram perfundidos imediatamente após o experimento eletrofisiológico, enquanto que aqueles pesquisadores esperaram 6 horas a 3 dias para perfundir os animais, encontrando uma intensificação do efeito nesse último caso. Novas investigações considerando essas variáveis e com análises adicionais, poderão esclarecer com maior propriedade a relação entre neurônios **NADPH-d** positivos e **DA**.

Quanto à influência da estimulação serotoninérgica foi observado que os animais desnutridos tratados com fluoxetina apresentaram número reduzido de neurônios **NADPH-d** positivos no hemisfério direito. Vários achados da literatura que correlacionam os sistemas serotoninérgico e nitrérgico expressam um efeito

inversamente proporcional, isto é, a estimulação serotoninérgica atua de forma antagonista sobre o sistema nitrérgico e vice-versa (Luo e Tan, 2001; Tagliaferro *et al.*, 2001; 2003; Wegener *et al.*, 2003). Em nosso trabalho, apesar da sutil influência do tratamento, os resultados estão de acordo com os dados da literatura, pelo menos no que se refere ao número de neurônios. Há evidências de que os antidepressivos produzem um efeito inibitório secundário sobre a enzima **NOS**, o que resultaria em uma menor atividade enzimática, reduzindo conseqüentemente um possível efeito neurotóxico do **NO** (Luo e Tan, 2001; Wegener *et al.*, 2003). Quanto à área do soma, os resultados obtidos foram um tanto divergentes do que tem sido discutido até o presente, pois foi verificado um aumento na área do soma no grupo de animais nutridos tratados com fluoxetina. Todavia, aumentos na área do soma podem não estar necessariamente associados à atividade aumentada da **NOS**. O hemisfério direito é o que foi utilizado para deflagração da **DA**. Uma das características da **DA** é um aumento do espaço intracelular (Somjen, 2001); assim, não seria de todo incoerente supor que esse aumento na área do soma pudesse ser decorrente da deflagração da **DA**. Contudo, somente estudos futuros poderão esclarecer apropriadamente essa possibilidade.

Na análise conjunta dos dois hemisférios cerebrais, o efeito da fluoxetina em reduzir o número de neurônios **NADPH-d** positivos que antes tinha sido encontrado no hemisfério direito dos animais desnutridos, deixou de existir. Tagliaferro *et al.* (2001; 2003) têm documentado que a depleção de **5-HT**, tanto no período pós-natal, como na idade adulta, aumenta a atividade do sistema nitrérgico. Outrossim, Wegener *et al.* (2003) encontraram que, enquanto a estimulação local com fármacos que ativam o sistema serotoninérgico (inclusive alguns **ISRS**, como o citalopram) reduz a atividade de **NOS** hipocampal, a administração sistêmica tanto aguda, como crônica com essas drogas, é ineficaz em afetar a atividade daquela enzima. Assim, ao que tudo indica,

parece que há ainda muito que ser esclarecido quanto às interações entre esses dois sistemas neurotransmissores, o que torna esse tema de grande interesse para investigações futuras.

Concernente ao efeito do estado nutricional, tem sido demonstrado que a desnutrição pode acarretar várias alterações em neurônios **NADPH-d** positivos tanto na área 17 do córtex visual, como no hipocampo. Aumentos na densidade, bem como na atividade histoquímica da neurópila da camada molecular do giro denteado, são alguns de seus efeitos (Borba *et al.*, 2000; Picanço-Diniz *et al.*, 1998; Rocha-de-Melo *et al.*, 2004). Todavia, no que se refere à área do soma, os dados têm-se mostrado inconstantes. Picanço-Diniz *et al.* (1998) encontraram que a desnutrição precoce acarreta redução da área do soma de neurônios **NADPH-d** positivos situados na substância branca do córtex visual. Borba *et al.* (2000) mostraram que valores reduzidos na área do soma representam um efeito transitório da desnutrição. Rocha-de-Melo *et al.* (2004) demonstraram que seus animais desnutridos no início da vida apresentavam uma tendência a valores reduzidos da área do soma daqueles neurônios, mas tal efeito não se traduzia em diferença significativa. Maia *et al.* (2006) também não encontraram diferenças entre animais nutridos e desnutridos quanto a esse parâmetro, bem como quanto ao número de neurônios, como o que tem sido documentado neste trabalho. Assim, é possível que neurônios **NADPH-d** positivos sejam relativamente resistentes à injúria ocasionada pela desnutrição no período crítico do desenvolvimento cerebral.

Além de seu envolvimento com outros sistemas neurotransmissores, há evidências da participação da **5-HT** em uma variedade de funções e processos cerebrais. Por exemplo, essa amina tem sido reconhecida como um fator trófico de crescimento neuronal durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1996; Rubenstein, 1998). Recentemente, ela tem sido também implicada

em um outro fenômeno de grande relevância, a neurogênese que se manifesta durante toda a vida e que tem sido relacionada com a patofisiologia da depressão (Jacobs e Fornal, 1999; Malberg *et al.*, 2000; Jacobs, 2002).

Os estudos que se propõem a investigar neurogênese têm correntemente empregado a técnica de marcação imunohistoquímica com bromodeoxiuridina (**BrdU**), substância capaz de identificar células em fase de proliferação. Neste trabalho, o **BrdU** foi utilizado para visualização de novas células neuronais produzidas na região hipocampal de animais recém-desmamados e adultos que haviam sido tratados durante todo o aleitamento com fluoxetina. De acordo com os resultados, embora o tratamento farmacológico não tenha influenciado a neurogênese em qualquer das idades analisadas, esse fenômeno ocorreu de forma muito mais intensa nas fases iniciais da vida, em comparação com a idade adulta. Isto fortalece o conhecimento praticamente indubitável de que o cérebro possui um período no qual o crescimento e desenvolvimento ocorre com grande intensidade, o período de crescimento rápido do cérebro (Dobbing, 1968), que se processa nas fases iniciais da vida, tanto em seres humanos, como na espécie utilizada neste trabalho, o rato (Smart e Dobbing, 1971).

Um corpo crescente de dados associa episódios de depressão clínica a alterações hipocâmpais. Tem sido mostrado que indivíduos deprimidos apresentam um volume de hipocampo reduzido em comparação a controles normais (Sheline *et al.* 1996; Shah *et al.*, 1998; Bremmer, 1999; Sheline *et al.*, 1999). Por outro lado, acredita-se na possibilidade de que antidepressivos que estimulam a neurotransmissão serotoninérgica, dentre eles a fluoxetina, produzem um aumento da neurogênese hipocampal em ratos adultos, e que este efeito representaria, talvez, uma das alterações adaptativas responsáveis pelo retardo na eficácia terapêutica desses medicamentos, em torno de 3

semanas após o início do tratamento (Jacobs e Fornal, 1999; Malberg *et al.*, 2000; Jacobs, 2002).

Neste trabalho, a administração crônica de fluoxetina no período de aleitamento foi ineficaz em alterar a neurogênese hipocampal, diferentemente do que tem sido relatado na literatura, quando o mesmo tipo de tratamento, por igual período é realizado em animais adultos (Jacobs e Fornal, 1999). Uma suposição plausível para tal resposta, pode residir no fato de que a neurogênese que ocorre durante o período de crescimento rápido do cérebro, é por si só tão intensa, que mesmo a estimulação adicional do sistema serotoninérgico poderia não ser capaz de modificá-la. Ou seja, a neurogênese fisiológica precoce ocorreria no limite máximo de operação do sistema. Uma outra hipótese poderia estar relacionada à dose utilizada. No que se refere à **DA**, tem sido anteriormente argumentado, que a dose realmente eficaz para reduzir a velocidade daquele fenômeno em animais nutricionalmente normais foi a de 20 mg/kg. No estudo da neurogênese, foi utilizada a dose única de 10 mg/kg, por ser considerada uma dose satisfatória em paradigmas experimentais de depressão (Mendes-da-Silva, *et al.* 2002; Malberg e Duman, 2003).

Há poucas dúvidas de que o estresse seja um dos fatores ambientais mais relevantes na etiologia da depressão (Kendler *et al.*, 1999), bem como um dos agentes fundamentais na supressão da neurogênese hipocampal (Malberg e Duman, 2003). No entanto, a fluoxetina, tem sido demonstrada reverter seu efeito supressor (Malberg e Duman, 2003). Neste trabalho os animais foram submetidos, na idade adulta, a dois reconhecidos tipos de estressores, um lipopolissacarídeo e a contensão (Connor *et al.*, 1999). Isto, com a finalidade de verificar se a administração precoce de fluoxetina seria capaz de prevenir uma possível redução, imposta pelo estresse, da neurogênese no hipocampo. Os resultados indicaram que nenhum dos dois agentes estressores alterou

significativamente a proliferação celular naquela região do cérebro, nem suas ações sofreram qualquer influência do tratamento prévio com a fluoxetina. Apesar disso, quando comparados aos respectivos controles, os animais submetidos a qualquer um daqueles agentes apresentaram sinais clínicos (não mensurados) de estresse, tais como, aumento da diurese e do número de bolos fecais, apatia, cromodacriorréia (manchas vermelhas ao redor dos olhos). É possível que número de animais utilizado no presente estudo tenha influenciado os resultados observados.

Em suma, pode-se concluir que a estimulação do sistema serotoninérgico, através da fluoxetina parece ter sido eficaz em modificar a eletrofisiologia cerebral em relação à **DA**, sem alterar de forma significativa alguns de seus parâmetros morfométricos. A **5-HT** é um neurotransmissor distribuído por todas as regiões cerebrais, desempenhando uma ampla gama de funções. Por isso, a transmissão serotoninérgica é considerada complexa; a **5-HT** pode, inclusive, afetar outros sistemas neurotransmissores. Assim, investigações adicionais são necessárias na tentativa de explicar as ações, por vezes contraditórias, daquela amina no sistema nervoso central. O presente estudo representa parte dos esforços que contribuem para esclarecer o papel fisiológico do sistema serotoninérgico, levando-se em conta que mecanismos subjacentes a diversas patologias de interesse clínico parecem estar a ele associados. Do que já se conhece, pode-se inferir que a **5-HT** dificilmente seria o único neurotransmissor envolvido nos processos ora analisados, tais como o fenômeno eletrofisiológico da **DA**, a neurogênese, mas sem dúvida, ela participa de maneira fundamental, tanto em animais bem nutridos como naqueles submetidos à desnutrição precoce.

CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados, pode-se concluir que:

- O tratamento com fluoxetina durante o aleitamento reduziu, de forma proporcional às doses empregadas, o peso corporal e a velocidade de propagação da depressão alastrante (**DA**) em ratos nutridos e desnutridos.
- Quando associada à desnutrição, a fluoxetina reduziu o peso do encéfalo.
- À semelhança do tratamento sistêmico precoce, a aplicação cortical tópica de fluoxetina, durante o registro da **DA**, exerceu um efeito antagônico, dose-dependente, sobre a sua velocidade de propagação.
- O efeito antagônico da fluoxetina sobre a **DA** pôde ser considerado duradouro, uma vez que, nos animais tratados sistemicamente no início da vida, as velocidades de propagação da **DA** se mantiveram reduzidas até a idade adulta (60-70 dias de idade).
- As células nicotinamida dinucleotídeo fosfato-diaforase positivas pareceram ser resistentes à aplicação subcutânea precoce de fluoxetina, na dose de 10 mg/kg, a julgar pelas pequenas alterações no número e na área do soma das mesmas. A incidência e a propagação da **DA**, bem como o estado nutricional, também não influenciaram significativamente aqueles parâmetros morfométricos.
- A administração pós-natal de fluoxetina não afetou a neurogênese no hipocampo, nem influenciou a resposta de proliferação celular hipocampal frente ao estresse nos animais analisados.

PERSPECTIVAS

Os dados obtidos no presente trabalho, em conjunto com resultados anteriormente obtidos em nosso laboratório, demonstram inequivocamente a influência do sistema serotoninérgico sobre o fenômeno da depressão alastrante cortical (**DA**). Todavia, as complexas interações da serotonina no sistema nervoso central continuam a estimular o prosseguimento das investigações, sobretudo no que se refere às suas relações com outros sistemas neurotransmissores e a suas ações tróficas sobre o tecido neural. Assim, sugerimos como perspectivas para estudos futuros, utilizando animais em diferentes estados nutricionais:

- Avaliar a influência do tempo decorrido entre a presença da **DA** no tecido cortical e a sua análise histoquímica para a determinação das características morfométricas de neurônios nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-diaforase (**NADPH-d**) positivos.
- Analisar o impacto da atividade serotoninérgica sobre a morfometria de neurônios **NADPH-d** positivos, utilizando doses de fluoxetina maiores e menores que a usada presentemente (“curva dose-resposta”).
- Avaliar, com agonistas e antagonistas específicos, a interação entre o sistema serotoninérgico e outros sistemas neurotransmissores, como o de aminoácidos excitatórios, sobre a velocidade da **DA**.
- Investigar os efeitos de uma curva dose-resposta de fluoxetina e/ou de outros fármacos que atuem sobre o sistema serotoninérgico quanto à neurogênese hipocampal, em situações de estresse agudo ou crônico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida SS, Duntas LH, Dye L, Nunes ML, Prasad C, Rocha JBT, Wainwright P, Zaia CTBV, Guedes RCA (2002). Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. *Nutritional Neuroscience*, **5**:311-320.
- Altman J, Das GD (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, **124**:319-335.
- Amâncio-dos-Santos A. *Nutrição, sistema serotoninérgico e funções neurais: efeito do citalopram sobre a depressão alastrante cortical em ratos* (2001). Recife: Dissertação (Mestrado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal Pernambuco, 105p.
- Andrade AFD, Guedes RCA, Teodósio NR (1990). Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary protein supplementation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **23**:889-893.
- Araújo MGR (1997). *Tratamento sistêmico precoce com sumatriptan e efeitos eletrofisiológicos cerebrais no rato adulto, normal e desnutrido*. Recife: Dissertação (Mestrado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal Pernambuco, 62p.
- Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM (1995). Anatomy, cell biology, and plasticity of the serotonergic system. Neuropsychopharmacological implications for the actions of psychotropic drugs. In: Bloom FE, Kupfer DJ (Eds.). *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. New York: Raven Press Ltd., 443-449.

- Barkley GL, Lehta BJ, Tepley N, Gaymer J, Aboukasm A, Welch KMA (1992). Effects of dihydroergotamine on spreading depression. In: Olesen J, Saxena PR (Ed.) *5-Hydroxytryptamine Mechanisms in Primary Headaches*. New York: Raven Press Ltd., 236-241.
- Barreto-Medeiros JM, Cabral-Filho JE, de-Souza SL, Freitas-Silva SR, Mendes-da-Silva C, Deiro TC, Monteiro JM, Guedes RCA, de-Castro CM, Manhaes-de-Castro R (2002). Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. *Nutritional Neuroscience*, **5**:211-214.
- Barreto-Medeiros JM, Feitoza EG, Magalhaes K, Cabral-Filho JE, Manhaes-de-Castro FM, de-Castro CM, Manhaes-de-Castro R (2004). Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. *Nutritional Neuroscience*, **7**:49-52.
- Bloom FE, Morales M (1998). The central 5-HT₃ receptor in CNS disorders. *Neurochemical Research*, **23**:653-659.
- Blundell JE (1992). Serotonin and the biology of feeding. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **55**:155S-159S.
- Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC (1991). Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *European Journal of Pharmacology*, **199**:379-81.
- Bock N, Quentin DJ, Huther G, Moll GH, Banaschewski T, Rothenberger A (2005). Very early treatment with fluoxetine and reboxetine causing long-lasting change of the serotonin but not the noradrenaline transporter in the frontal cortex of rats. *The World Journal of Biological Psychiatry*, **6**:107-112.

- Borba JMC, Araújo MS, Picanço-Diniz CW, Manhães-De-Castro R, Guedes RCA (2000). Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. *Brain Research Bulletin*, **53**:193-201.
- Borsini F, Ceci A, Bietti G, Donetti A (1995). BIMT 17, a 5-HT_{1A} receptor agonist/5-HT_{2A} receptor antagonist, directly activates postsynaptic 5-HT inhibitory responses in the rat cerebral cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **352**:283-290.
- Boyer PA, Skolnick P, Fossom, LH (1998). Chronic administration of imipramine and citalopram alters the expression of NMDA receptor subunit mRNAs in mouse brain. A quantitative in situ hybridization study. *Journal of Molecular Neuroscience*, **10**:219-233.
- Bremmer JD (1999). Does stress damage the brain? *Biological Psychiatry*, **45**:797-805.
- Bures J, Buresova O, Krivanek I (1974). *The Mechanisms and Applications of Leao's Spreading Depression of Electroencephalographic Activity*. Praga: Academia.
- Cabral-Filho JE, Trindade-Filho EM, Guedes RCA (1995). Effect of d-fenfluramine on cortical spreading depression in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **28**:347-350.
- Caggiano AO, Kraig RP (1998). Neuronal nitric oxide synthase expression is induced in neocortical astrocytes after spreading depression. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **18**:75-87.
- Cameron HA, McKay Ronald DG (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, **435**:406-417.

- Connor TJ, Song C, Leonard BE, Anisman H, Merali Z (1999). Stressor-induced alterations in serotonergic activity in an animal model of depression. *Neuroreport*, **10**:523-8.
- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH (1996) (eds.). Serotonin (5-hydroxytryptamine) and histamine. In: *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 7ª edição. New York: Oxford University Press, 352-409.
- Coutinho EM. *Relações hospedeiro-parasito na esquistossomose mansônica em função da dieta básica regional* (1976). Recife: Tese (Livre-Docência), Universidade Federal de Pernambuco, 109p.
- Crnic LS, Chase HP (1978). Models of infantile undernutrition in rats: effects on milk. *The Journal of Nutrition*, **108**:1755-1760.
- Do Carmo RJ, Martins-Ferreira H (1984). Spreading depression of Leão probed with ion-selective microelectrodes in isolated chick retina. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **56**:401-421.
- Dobbing J (1968). Vulnerable periods in developing brain. In: Davison AN, Dobbing J (Eds.). *Applied Neurochemistry*. Oxford: Blackwell, 287-316.
- El-Bachá RS, De-Lima-Filho JL, Guedes RCA (1998). Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photoactivated riboflavin. *Nutritional Neuroscience*, **1**:205-212.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn A-M, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, **4**:1313–1317.
- Fernstrom JD (1983). Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiological Reviews*; **63**:484-546.

- Friedlander MJ, Montague PR, Hester F, Marchase RB (1992). Role of nitric oxide in NMDA-receptor mediated release of neurotransmitter in visual cortex. *Society for Neuroscience*, **18**:210 (Abstract).
- Fuller RW, Wong DT, Robertson DW (1991). Fluoxetine, a selective inhibitor of serotonin uptake. *Medicinal Research Reviews*, **11**:17-34.
- Garattini S (1995). Biological actions of drugs affecting serotonin and eating. *Obesity Research*, **3**:463S-470S.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, **336**:385-388.
- Glennon RA, Dukat M (1995). Serotonin receptor subtypes. In: Bloom FE, Kupfer DJ (Eds.). *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. New York: Raven Press Ltd., 415-429.
- Gold L, Back T, Arnold G, Dreier J, Einhüpl KU, Dirnagl U (1998). Cortical spreading depression-associated hyperemia in rats: involvement of serotonin. *Brain Research*, **783**:188-193.
- Gorelova NA, Koroleva VI, Amemori T, Pavlik V, Bures J (1987). Ketamine blockade of cortical spreading depression in rats. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, **66**:440-447.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**:3168–3171.

- Graeff FG (1998). Sistemas serotoninérgicos. In: Miguel EC, Rauch SL, Leckman JF (Eds.). *Neuropsiquiatria dos Gânglios da Base*. 2ª edição traduzida. São Paulo: Lemos Editorial; 59-79.
- Guedes RCA (1984). On some conditions that influence cortical spreading depression. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **56**:445-455.
- Guedes RCA, Amâncio-dos-Santos A, Manhães-de-Castro R, Costa-Cruz RRG (2002). Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Nutritional Neuroscience*, **5**:115-123.
- Guedes RCA, Andrade AFD, Cabral-Filho JE (1987). Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effect of dietary protein deficiency. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **20**:639-642.
- Guedes RCA, Andrade AFD, Cavaleiro EA (1988). Excitatory amino acids and cortical spreading depression. In: Cavaleiro EA, Lehman J, Turski L (Eds.). *Frontiers in Excitatory amino acid Research*. New York: Alan R. Liss, 667-670.
- Guedes RCA, Cabral-Filho JE, Teodósio NR (1992). GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and early malnourished rats. In: Do Carmo RJ (Ed.). *Spreading Depression. Experimental Brain Research Series*. **23**. Berlin: Springer, 17-26.
- Guedes RCA, Cavaleiro EA (1997). Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epilepsy Research*, **27**:33-40.
- Guedes RCA, Santos-Monteiro J, Teodósio NR (1996). Malnutrition and brain function: experimental studies using the phenomenon of cortical spreading depression. *Revista Brasileira de Biologia*, **56**:293-301.

- Guedes RCA, Tsurudome K, Matsumoto N (2005). Spreading depression in vivo potentiates electrically-driven responses in frog optic tectum. *Brain Research*, **1036**:109-114.
- Halford JC, Blundell JE (1996). Metergoline antagonize fluoxetine-induced suppression of food intake but not changes in the behavioral satiety sequence. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **54**:745-751.
- Harkin A, Connor TJ, Burns MP, Kelly JP (2004). Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *European Neuropsychopharmacology*, **14**:274-281.
- Heikkinen T, Ekblad U, Palo P, Laine K (2003). Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **73**:330-337.
- Hervás I, Vilaró T, Romero Luz, Scorza C, Mengod G, Artigas F (2001). Desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors by a low chronic fluoxetine dose effect of the concurrent administration of way-100635. *Neuropsychopharmacology*, **24**:11-20.
- Hiemke C, Härtter S (2000). Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, **85**:11-28.
- Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **88**:2811-2814.
- Huether G, Schmidt S, Rüther E (1998). Nutritional effects on central serotonergic activity: a hypothesis on the unconscious self-manipulation of mood by food intake and dietary selection. *Nutritional Neuroscience*, **1**:3-7.

- Izumi Y, Clifford DB, Zorumski CF (1992). Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science*, **257**:1273-1226.
- Jacobs BL, Fornal CA (1999). Chronic fluoxetine treatment increases hippocampal neurogenesis in rats: A novel theory of depression. *Society of Neuroscience Abstracts*, **25**:714.
- Jacobs BL (2002). Adult brain neurogenesis and depression. *Brain, Behavior, and Immunity*, **16**:602–609.
- Jacobs BL, Van Praag H, Gage FH (2000). Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Molecular Psychiatry*, **5**:262-269.
- Kehoe P, Mallinson K, Bronzino J, McCormick CM (2001). Effects of prenatal protein malnutrition and neonatal stress on CNS responsiveness. *Developmental Brain Research*, **132**:23-31.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999). Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *The American Journal of Psychiatry*, **156**:837-841.
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S (1989). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanisms for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **86**:5159-5162.
- Krüger H, Heinemann U, Luhmann J (1999). Effects of ionotropic glutamate receptor blockade and 5-HT_{1A} receptor activation on spreading depression in rat neocortical slices. *NeuroReport*, **10**:2651-2656.
- Lauder JM, Wallace JA, Krebs H (1981). Roles for serotonin in neuroembryogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **133**:477-506.

- Leão AAP (1944). Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*, **7**:359-390.
- Leão AAP (1972). Spreading depression. In: Purpura DP, Penry K, Tower DB, Woodbury DM, Walter RD. *Experimental Models of Epilepsy*. New York: Raven Press, 173-195.
- Léger L, Gay N, Burlet S, Charnay Y, Cespuglio R (1998). Localization of nitric oxide-synthesizing neurons sending projections to the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuroscience Letters*, **257**:147-150.
- Lehmenkühler A, Grotemeyer KH, Tegtmeier T (1993). (Eds.). *Migraine: Basic Mechanisms and Treatment*. München: Urban & Schwarzenberg, 602p.
- Leibowitz SF, Shor-Posner G (1986). Brain serotonin and eating behavior. *Appetite*, **7**:1-14.
- Lorrain DS, Hull E (1993). Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. *Neuroreport*, **5**:87-89.
- Lu K-T, Gean P-W (1998). Endogenous serotonin inhibits epileptiform activity in rat hippocampal CA1 neurons via 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor activation. *Neuroscience*, **86**:729-737.
- Luo L, Tan R-X (2001). Fluoxetine inhibits dendrite atrophy of hippocampal neurons by decreasing nitric oxide synthase expression in rats depression model. *Acta Pharmacologica Sinica*, **22**:865-870.
- Mahan LK, Escott-Stump S (2005) (eds). *Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia*. 11ª ed. São Paulo: Roca,. 1242p.

- Maia LMSS, Frazao MF, Souza TKM, Silva MB, Rocha-de-Melo AP, Picanco-Diniz CW, Amancio-dos-Santos A, Guedes RCA (2006). L-arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early-malnourished adult rats. *Brain Research*, **1072**:19-25.
- Malberg JE, Duman RS (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, **28**:1562-1571.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, **20**:9104-9110.
- Mancilla-Diaz JM, Escartin-Perez RE, Lopez-Alonso VE, Floran-Garduño B, Romano-Camacho JB (2005). Role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the hypophagic effect of 5-HT on the structure of feeding behavior. *Medical Science Monitor*, **11**:BR74-79.
- Manev H, Uz T, Smalheiser NR, Manev R (2001). Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. *European Journal of Pharmacology*, **411**:67-70.
- Manhães-de-Castro R, Barreto-Medeiros JM, Mendes-da-Silva C, Ferreira LMP, Guedes RCA, Cabral-Filho JE, Costa JA (2001). Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **34**:121-124.
- Manjarrez G, Contreras JL, Chagoya G, Hernandez-R J (1998). Free tryptophan as an indicator of brain serotonin synthesis in infants. *Pediatric Neurology*, **18**:57-62.

- Marrannes R, Willems R, De-Prins E, Wauquier A (1988). Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Research*, **457**:226-240.
- Matsumoto T, Nakane M, Pollock JS, Kuk JE, Föstermann U (1993). A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH diaphorase is only seen after exposure of the tissue to fixative. *Neuroscience Letters*, **155**:61-64.
- Mayevsky A, Doron A, Manor T, Meilin S, Zarchin N, Ouaknine GE (1996). Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Research*, **740**:268-274.
- Mendes-da-Silva C, Souza SL, Barreto-Medeiros JM, Freitas-Silva SR, Antunes DEC, Cunha ADU, Ribas VR, França MFS, Nogueira MI, Manhães-de-Castro R (2002). Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, **60**:928-993.
- Monteleone P, Brambilla F, Bortolotti F, Maj M (2000). Serotonergic dysfunction across the eating disorders: relationship to eating behaviour, purging behaviour, nutritional status and general psychopathology. *Psychological Medicine*, **30**:1099-1110.
- Morgane PJ, Austin-LaFrance RJ, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **17**:91-128.
- Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawlyrewicz E, Resnick O (1978). The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **2**:137-230.

- Nellgard B, Wieloch T (1992). NMDA-receptor blockers but not NBQX, an AMPA-receptor antagonist, inhibit spreading depression in the rat brain. *Acta Physiologica Scandinavica*, **146**:497-503.
- Nelson JC (2003). Managing treatment-resistant major depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*, **64**:5-12.
- Netto M, Martins-Ferreira H (1989). Elicitation of spreading depression by rose Bengal photodynamic action. *Photochemistry and Photobiology*, **50**:229-234.
- Onis M, Monteiro C, Akre J, Clugston G (1993). *Bulletin of the World Health Organization* **71**:703-712.
- Orosco M, Gerozissis K (2001). Macronutrient-induced cascade of events leading to parallel changes in hypothalamic serotonin and insulin. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **25**:167-174.
- Paxinos G, Watson C (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4^a ed. California, USA: Academic Press.
- Picanço-Diniz CW, Araújo MS, Borba JMC, Guedes RCA (1998). NADPH-diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutritional Neuroscience*, **1**:35-48.
- Pöglün S, Kuhar MJ (1994). Regulation of neurotransmitter reuptake by nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **738**:305-315.
- Read SJ, Parsons AA (2000). Sumatriptan modifies cortical free radical release during cortical spreading depression. A novel antimigraine action for sumatriptan? *Brain Research*, **870**:44-53.
- Resnick O, Morgane PJ (1984). Generational effects of protein malnutrition in the rat. *Brain Research*, **317**:219-227.

- Rocha-de-Melo AP, Guedes RCA (1997). Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. *Brazilian Journal of medical and Biological Research*, **30**:663-669.
- Rocha-de-Melo AP, Picanço-Diniz CW, Borba JMC, Santos-Monteiro J, Guedes RCA (2004). NADPH-diaphorase histochemical labeling patterns in the hippocampal neuropil and visual cortical neurons in weaned rats reared during lactation on different litter sizes. *Nutritional Neuroscience*, **7**:207-216.
- Ross SB (1982). The characteristics of serotonin uptake system. In: Osborne NN (editor). *Biology of Serotonergic Transmission*. New York: John Wiley & Sons Ltd., 159-195.
- Rubenstein JLR (1998). Development of serotonergic neurons and their projections. *Biological Psychiatry*, **44**:145-150.
- Salgado-Commissariat D, Alkadhi KA (1997). Serotonin inhibits epileptiform discharge by activation of 5-HT_{1A} receptors in CA₁ pyramidal neurons. *Neuropharmacology*, **36**:1705-1712.
- Salvador J, Silva C, Santos E (2002). Tratamiento farmacológico de la obesidad. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, **25**:143-161.
- Santos-Monteiro J, Teodósio NR, Guedes RCA (2000). Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in normal and early malnourished adult rats. *Nutritional Neuroscience*, **3**:29-40.
- Scherer-Singler U, Vicent SR, Kimura H, McGeer EG (1983). Demonstration of a unique population of neurons with NADPH diaphorase histochemistry. *Journal of Neuroscience Methods*, **9**:229-234.

- Schuman EM, Madison DV (1991). A requirement for the intracellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, **254**:1503-1506.
- Shah PJ, Ebmeier KP, Glabus MF, Goodwin GM (1998). Cortical gray matter reductions associated with treatment-resistant chronic unipolar depression. *The British Journal of Psychiatry*, **172**:527-532.
- Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH (1999). Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *The Journal of Neuroscience*, **19**:5034-5043.
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**:3908-3913.
- Silverstone T (1992). Appetite suppressants. A review. *Drugs*, **43**:820-36.
- Simansky KJ (1996). Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behavior Brain Research*, **510**:251-258.
- Smart JL, Dobbing J (1971). Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Research*, **28**:85-95.
- Snyder SH (1992). Nitric oxide and neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, **2**:323-327.
- Streit DS, Ferreira FCR, Martins-Ferreira H (1995). Spreading depression in isolated spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, **74**:888-890.
- Somjen GG (2001). Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiological Reviews*, **81**:1065-1096.

- Souza-Bezerra R, Abadie-Guedes R, Melo FR, Paiva AM, Amâncio-dos-Santos A, Guedes RCA (2005). Shrimp carotenoids protect the developing rat cerebral cortex against the effects of ethanol on cortical spreading depression. *Neuroscience Letters*, **391**:51-55.
- Tagliaferro P, Ramos AJ, Lopez-Costa JJ, López EM, Brusco A (2003). Changes in the postnatal development on nitric oxide system induced by serotonin depletion. *Developmental Brain Research*, **146**:39-49.
- Tagliaferro P, Ramos AJ, López-Costa JJ, López EM, Saavedra JP, Brusco A (2001). Increased nitric oxide synthase activity in a model of serotonin depletion. *Brain Research Bulletin*, **54**:199-205.
- Tanapat P, Galea LA, Gould E (1998). Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **16**:235-9.
- Teodósio NR, Lago ES, Romani SAM, Guedes RCA (1990). A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, **40**:533-547.
- Verçosa TC (1997). *Restrição dietética de triptofano e depressão alastrante*. Recife: Dissertação (Mestrado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 74p.
- Vogt M (1982). Some functional aspects of central serotonergic neurones. In: Osborne NN (Ed.). *Biology of Serotonergic Transmission*. New York: John Wiley & Sons Ltd., 299-315.
- Wanderley LG (2001). *Influência do exercício físico sobre a lactação de ratas desnutridas pela dieta básica regional (DBR)*. Recife: Dissertação (Mestrado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 79p.

- Wang Q-P, Nakai Y (1995). Immunoelectron microscopy of β -endorphinergic synaptic innervation of nitric oxide synthase immunoreactive neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Research*, **684**:185-193.
- Wegener G, Volke V, Harvey BH, Rosenberg R (2003). Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. *Brain Research*, **959**:128-134.
- Whitaker-Azmitia PM, Druse M, Walker P, Lauder JM (1996). Serotonin as a development signal. *Behavioural Brain Research*, **73**:19-29.
- Wong DT, Perry KW, Bymaster FP (2005). The discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nature Reviews*, **4**:764-774.
- Wotherspoon G, Albert M, Rattray M, Priestley JV (1994). Serotonin and NADPH-diaphorase in the dorsal raphe nucleus of the adult rat. *Neuroscience Letters*, **173**:31-36.
- Wurtman RJ, Wurtman JJ (1995). Brain serotonin, carbohydrate-craving, obesity and depression. *Obesity Research*, **3**:477S-480S.
- Ximenes-da-Silva A, Guedes RCA (1991). Differential effect of changes of blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. *Brazilian Journal of medical and Biological Research*, **24**:1277-1281.

ANEXOS

ANEXO A – COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO ISOTÔNICA DE SAIS

– RINGER SIMPLIFICADO –

Substância	mEq/L	g/L de água destilada
Cloreto de Sódio (NaCl)	130	7,6050
Cloreto de Potássio (KCl)	5	0,3730
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	1	0,0555
TOTAL		8,0335

ANEXO B – SUBMISSÃO DE ARTIGO

– REVISÃO –



SOCIEDADE CAMPINEIRA DE EDUCAÇÃO E INSTRUÇÃO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS
NÚCLEO DE EDITORAÇÃO SBI/CCV

REVISTA DE NUTRIÇÃO/BRAZILIAN JOURNAL OF NUTRITION
INDEXADA EM BASES DE DADOS INTERNACIONAIS:
CHEMICAL ABSTRACT - CAB ABSTRACT -
EMBASE - FSTA - POPLINE - POP LINE - NISC
BASES NACIONAIS: LILACS - SciELO - PERI -
QUALIS (CAPES) A-NACIONAL
ISSN 1415-5273

Campinas, 8 de fevereiro de 2006

OFÍCIO/NE/RN nº 190/2006

Ilustríssima Senhora

Venho pelo presente agradecer o envio do manuscrito intitulado **Nutrição e função serotoninérgica cerebral** para publicação na Revista de Nutrição. Para toda a correspondência futura relativa a este trabalho, por favor, refira-se ao protocolo número 989.

O Conselho Editorial procederá a tramitação regular do processo de aprovação do manuscrito, entendendo que o mesmo não foi publicado anteriormente e que não será submetido a outro periódico durante o período de revisão.

Tão logo quanto possível, V.Sa será notificado(a) a respeito do processo para consideração de eventuais sugestões dos revisores ou sobre a aprovação do trabalho.

Informamos que a partir da submissão do manuscrito aos revisores técnicos, serão aceitas somente duas novas versões do original.

Novamente grata por seu interesse na Revista de Nutrição, expresso nossas saudações.

Atenciosamente


Profa. Maria Cristina Matoso
Revista de Nutrição
Editora Gerente

Ilustríssima Senhora
Profa. Ângela Amâncio dos Santos
R. Primeiro de Maio, 28
Ponte dos Carvalhos
54580-000 - Cabo - PE

ANEXO C – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO
– DADOS ELETROFISIOLÓGICOS –

Ms. No.: EXNR-06-10R1

Title: Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions.

Corresponding Author: Professor Rubem C. A. Guedes

Authors: Ângela Amâncio-dos-Santos, MS; Patrícia C. F. Pinheiro, Nutr. Grad.; Denise S. C. de Lima, Nutr. Grad.; Mirella G. Ozias, Nutr. Grad.; Manuella B. Oliveira; Natália X. Guimarães;

Dear Professor Guedes,

We are pleased to inform you that your manuscript referenced above has been accepted for publication in Experimental Neurology.

Your article will appear on Elsevier's on-line journals' database ScienceDirect as an "Article in Press" within approximately 4-6 weeks. Please see <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00144886>. An "Article in Press" may already be cited prior its publication in an issue of the journal by means of its unique DOI number which does not change throughout the publication process.

At the same time, Medline/PubMed will list the article in their database, linking to the fulltext of the paper in ScienceDirect. Medline/PubMed is freely accessible for researchers across the world.

You can track the status of your article via the Author Gateway at <http://authors.elsevier.com/JournalDetail.html?PubID=622828&Precis=DESC>. As a registered user, you will also receive e-mail alerts when the publication status changes, including when the paper is published.

Many thanks for submitting your fine paper to Experimental Neurology. We look forward to receiving additional papers from you in the future.

With kind regards,

Dr. Sid Gilman, M.D.
Editor-in-Chief
Experimental Neurology

Experimental Neurology, Editorial Office
Elsevier
525 B Street, Suite 1900
San Diego, CA 92101-4495
USA
Phone: (619) 699-6767
Fax: (619) 699-6801
E-mail: expn@elsevier.com