



Universidade Federal do Pará

Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

Análise comportamental e eletrofisiológica do uso de Glicocorticoides no Sistema Nervoso

Central em modelos animais de depressão

Keilla Gisele Mendonça Cardoso

Belém – PA

Janeiro/2017

Keilla Gisele Mendonça Cardoso

Análise comportamental e eletrofisiológica do uso de Glicocorticoides no Sistema Nervoso
Central em modelos animais de depressão

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Neurociências e Comportamento da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Silene Maria Araújo de Lima

Co-orientadora: Daniela Lopes Gomes

Belém-PA

Janeiro/2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFPA, Belém-PA

Cardoso, Keilla Gisele Mendonça.

Análise comportamental e eletrofisiológica do uso de glicocorticoides no sistema nervoso central em modelos animais de depressão / Keilla Gisele Mendonça Cardoso. — 2017.

Orientador: Silene Maria Araújo de Lima

Co-Orientador: Daniela Lopes Gomes

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento, 2017.

1. Eletrofisiologia. 2. Avaliação de comportamento. 3. Sistema nervoso central. I. Título.

CDD - 23. ed. 612.8

DADOS DA DEFESA E BANCA

Análise comportamental e eletrofisiológica do uso de Glicocorticoides no Sistema Nervoso Central em modelos animais de depressão

Candidata: Keilla Gisele Mendonça Cardoso

Data da defesa: 31/01/2017

Resultado:

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Silene Maria Araújo de Lima. (UFPA) – Orientadora

Profa. Dra. Daniela Lopes Gomes. (UFPA) – Coorientadora

Profa. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho. (UFAM) - Membro

Prof. Dr. Paulo Roney Kilpp Goulart (UFPA) - Membro

Prof. Dra Ana Leda de Faria Brino - (UFPA) - Suplente

Dedicatória

A Deus,

Agradecimentos

Antes e acima de tudo a Deus, sem O qual eu não poderia ter tido o desempenho e êxito conquistados no decorrer deste curso. Agradeço, também, a todos os colegas de turma, os quais se mostraram sempre solidários nos momentos de fraqueza e necessidade, em especial, ao querido amigo Ícaro, deixo aqui nas entrelinhas os pormenores agradecimentos.

Agradeço, também, à banca examinadora, composta pela Profa. Dra. Rosany Carvalho, que veio da UFAM, especialmente, para prestigiar e contribuir com nosso trabalho e seus conhecimentos; ao Prof. Dr. Paulo Goulart, que desde o início acompanhou minha árdua passagem pelo Programa e fez cada vez mais agraciar-me pelo estudo das Neurociências, repassando sempre a sua constante serenidade; à Profa. Dra. Daniela Gomes, que desde a graduação foi um exemplo de profissional dedicada, agradeço imensamente o apoio nos últimos dias de curso e sua agradabilíssima orientação no Estágio em Pesquisa; ao Prof. Dr. Moysés Hamoy, que foi um dos orientadores desta pesquisa, contribuindo para sua realização, e, consideravelmente, para meu enriquecimento intelectual e, por fim, à minha sensacional orientadora Profa. Dra. Silene Lima, sem a qual esse trabalho não teria sido realizado, incansavelmente me apoiando, sendo compreensiva, quando necessário, e brilhantemente repassando seus conhecimentos sobre as Neurociências, a ela serei eternamente grata.

Meus sinceros agradecimentos, deixo registrados aqui, também, à minha grande amiga, Filomena Lisboa, eterna conselheira e segunda mãe. E, por fim, à minha amada e querida família. Meus pais, minhas irmãs, cunhados e sobrinhos os quais tornaram meus dias mais felizes e menos exaustivos durante esse percurso. Entretanto, não poderia deixar de enfatizar meu agradecimento, aos meus amados, irmão Elton Cardoso e meu filho Daniel Lisboa. Os quais estiveram do meu lado em todos os momentos, sem exceção, me dando apoio nos momentos em que, quase, fraquejei. O êxito deste trabalho foi consequência de todo o apoio recebido no decorrer de sua elaboração. Meus sinceros agradecimentos a todos os quais participaram direta, ou indiretamente, para que ele fosse realizado.

Sumário

1	Introdução.....	13
1.1	Implicações comportamentais ocasionadas pelo uso de glicocorticoides e/ou hipercortisolismo.....	24
1.1.1	A inibição da leptina e suas consequências	24
1.1.2	A serotonina.....	26
1.1.2.1	Envolvimento da serotonina em funções fisiológicas e comportamentais.....	28
1.1.3	Depressão.....	29
1.2	A fluoxetina.....	29
1.3	Modelos experimentais para depressão – Teste do Nado Forçado (TNF).....	30
1.4	Eletroencefalograma (EEG).....	31
2	Objetivos.....	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivos específicos.....	33
3	Metodologia.....	34
3.1	Local.....	34
3.2	Animais.....	34
3.3	Procedimentos para a implantação do eletrodo.....	36
3.4	Delineamento experimental.....	37
3.5	Teste do Nado Forçado (TNF).....	37
3.6	Análise de dados.....	38
3.7	Análise estatística.....	39
4	Resultados.....	40
4.1	Análise eletrocorticográfica dos grupos controle agudo e dexametasona agudo.....	40
4.2	Análise eletrocorticográfica dos grupos controle crônico e dexametasona crônico ou dexametasona.....	41
4.3	Análise do espectograma e a distribuição de força nas frequências de 4 a 10 Hz (Força Theta).....	43
4.4	Análise do espectograma e a distribuição de força nas frequências de 20 a 50 Hz (Força Gamma).....	44
4.5	Análise do comportamento depressivo observado no TNF.....	45

4.6	Análise comportamental dos grupos controle positivo e controle negativo, dexametasona e sham dexametasona, fluoxetina e fluoxetina/dexametasona.....	45
4.7	Análise dos níveis de glicose e urina nos grupos controle, agudo e crônico.....	48
4.8	Uso de GC tem ação na hiperglicemia em roedores.....	48
4.9	Uso de GC potencializa o perfil de depressão no TNF.....	49
4.10	Uso de GC provoca alterações no EcoG.....	50
4.11	A fluoxetina não obteve efeito antidepressivo no TNF durante o uso de dexametasona.....	52
5	Discussão.....	55
6	Considerações finais.....	56
	Referências.....	57

Lista de Figuras e Tabelas

<i>Figura 1.</i> Diagrama esquemático da relação hipotálamo/hipófise e subdivisões anatomo-funcionais da hipófise.....	14
<i>Figura 2.</i> Tipos de hormônios secretados pela glândula hipófise em suas porções anterior (Adeno-hipófise) e posterior (neuro-hipófise).....	14
<i>Figura 3.</i> Desenho esquemático da glândula adrenal e suas regiões histológicas denominadas córtex e medula, que secretam os diferentes hormônios esteroides.....	15
<i>Figura 4.</i> Corte histológico da glândula adrenal, marcado com cresilvioleta ilustrando as diferenças histológicas características do córtex adrenal.....	16
<i>Figura 5:</i> Estrutura molecular dos glicocorticoides.....	17
<i>Figura 6:</i> Diagrama esquemático ilustrando os efeitos sistêmicos dos GC.....	18
<i>Figura 7:</i> Diagrama esquemático ilustrando os efeitos sistêmicos e efeitos colaterais do excesso de GC no organismo.....	19
<i>Figura 8:</i> Representação esquemática dos sinais e sintomas encontrados na SC.....	20
<i>Figura 9:</i> Diagrama esquemático representando as diversas possíveis etiologias da produção exagerada de ACTH.....	21
<i>Figura 10:</i> Estrutura química da 5-HT e seus precursores.....	27
<i>Figura 11:</i> Organograma dos Grupos	34
<i>Figura 12:</i> Desenho experimental. Descrição cronológica do projeto.....	35
<i>Figura 13:</i> Esteriotáxico.....	36
<i>Figura 14:</i> Procedimentos para implantação do eletrodo.....	37
<i>Figura 15:</i> Teste do Nado Forçado (TNF).....	38
<i>Figura 16:</i> Representação de distribuição de energia no espectrograma após a administração aguda de dexametasona obtido dos grupos de animais controle agudo e agudo.....	40
<i>Figura 17:</i> Representação de distribuição de energia no espectrograma após a administração crônica de dexametasona obtido dos grupos de animais grupos controle crônico e dexametasona ou crônico.....	41
<i>Figura 18:</i> Gráficos comparativos entre os grupos dexametasona (agudo e crônico) e controles.....	42
<i>Figura 19:</i> Gráficos comparativos. Força Theta e Espectrograma.....	43

<i>Figura 20:</i> Gráficos comparativos. Força Gamma e Espectograma.....	44
<i>Figura 21:</i> Gráfico da análise do comportamento depressivo observado no TNF demonstrando os dias de tratamento e a constatação do comportamento depressivo no grupo controle e tratado com dexametasona.....	45
<i>Figura 22:</i> Gráficos demonstrativos da análise comportamental dos grupos controle positivo e controle negativo, dexametasona e sham dexametasona, fluoxetina e fluoxetina/dexametasona.....	46
<i>Figura 23:</i> Gráfico demonstrativo de análise dos níveis de glicose e urina nos grupos controle, agudo e crônico.....	48
<i>Figura 24:</i> Representação esquemática da nulidade da ação da fluoxetina.....	56

Lista de abreviações

ACTH Adrenocorticotrofina ou Corticotrofina

CRH/CRF Hormônio liberador de corticotrofina

EcoG Eletrocorticograma

EEG Eletroencefalograma

GC Glicocorticoides

i.p. Intra-peritoneal

SC Síndrome de Cushing

SNC Sistema Nervoso

SNC Sistema Nervoso Central

SP Síndrome de Pseudo-Cushing

TNF Teste Do Nado Forçado

5HT 5-hidroxitriptamina, serotonina

Resumo

A Dexametasona é um glicocorticoide largamente prescrito na medicina utilizado como imunossupressor e anti-inflamatório, bem como, a fluoxetina, que é um antidepressivo, inibidor da recaptação de serotonina, que podem ser utilizados em algum momento ao mesmo tempo com o objetivo das suas respectivas finalidades. O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações eletroencefalográficas em animais administrados com essas drogas, como também, os efeitos comportamentais avaliados num modelo animal de depressão, o nado forçado. O estudo foi realizado em ratos wistar machos adultos, submetidos à administração de dexametasona em dose aguda de 4 mg/kg, 24 horas antes do registro eletrocorticográfico, e crônica, administrada durante sete dias a cada 24 horas na dose de 4 mg/kg *i.p.* A fluoxetina foi administrada na dose de 5 mg/kg, por sete dias, por via oral, com ferramenta semelhante à sonda orogástrica, procedimento de gavagem. Após a administração, os parâmetros eletroencefalográficos da atuação das drogas foram registrados e analisados. Ao comparar, a administração aguda de dexametasona com a crônica, não houve diferença estatística, porém, houve uma tendência para a diminuição das forças Theta e Gamma, para o uso crônico. O grupo que recebeu fluoxetina teve média de amplitude de $2,661 \pm 0,5850 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ comprovando a eficácia da fluoxetina no controle da depressão provocada pelo nado forçado. Para o grupo que recebeu dexametasona de forma crônica e fluoxetina para reverter o quadro a média de potência foi de $0,4758 \pm 0,2514 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, como não existe diferença estatística entre os grupos dexametasona e dexametasona fluoxetina, a fluoxetina não conseguiu reverter o quadro depressivo ocasionado pela dexametasona. No nado forçado, o grupo fluoxetina teve diminuição do tempo de flutuação, com média de tempo de $45,33 \pm 23,26$ segundos, demonstrando que o grupo não ficou depressivo. No grupo em que se administrou dexametasona de forma crônica e se avaliou a possibilidade de reverter o quadro depressivo com a fluoxetina a média de tempo de imobilidade foi de $169,8 \pm 24,5$ segundos indicando que a fluoxetina não teve efeito sobre a depressão ocasionada pela aplicação crônica de dexametasona. Concluímos nesse estudo que o glicocorticoide causa alterações no eletrocorticograma e depressão no teste do nado forçado (TNF). A fluoxetina não obteve efeito nos ratos submetidos ao TNF após o uso de dexametasona.

Palavras-chave: Glicocorticoides, cortisol, depressão, eletrofisiologia, Sistema Nervoso Central.

Abstract

Dexamethasone is a glucocorticoid widely prescribed in Medicine, used as immunosuppressant and anti-inflammatory as well as fluoxetine, which is an antidepressant, serotonin reuptake, which can be used at some point while aiming their respective purposes. The aim of this study was to evaluate the electroencephalographic abnormalities in animals administered with these drugs as well as the behavioral effects evaluated in an animal model of depression, forced swimming. The study was conducted in adult male Wistar rats subjected to administration of dexamethasone acute dose of 4 mg/kg, 24 hours before electrocorticographic record, and chronic, administered for seven days every 24 hours at a dose of 4 mg/kg i.p. Fluoxetine was administered at a dose of 5 mg/kg, for seven days orally with a similar tool the orogastric tube, gavage procedure. After administration, the electroencephalographic parameters of drug activity were recorded and analyzed. When comparing the acute administration of dexamethasone with chronic, there were no statistical differences, but there was a trend towards decreased Theta and Gamma force for chronic use. The group, who received fluoxetine averaged amplitude of $2,661 \pm 0,5850 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, proving fluoxetine efficacy in controlling depression caused by forced swimming. For the group received dexamethasone chronically and fluoxetine to reverse the power of the middle frame was $0.4758 \pm 0.2514 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, as there is no statistical difference between the dexamethasone group and dexamethasone fluoxetine, fluoxetine failed to reverse depressive symptoms caused by dexamethasone. In the forced swimming, the fluoxetine group had decreased fluctuation time, mean time of 45.33 ± 23.26 seconds, demonstrating that the group was not depressed. In the group administered with dexamethasone chronic form and assessed the possibility of reversing depressive disorder with fluoxetine immobility time average was 169.8 ± 24.5 seconds indicating that fluoxetine had no effect on the depression caused by chronic application of dexamethasone. We conclude from this study that the glucocorticoid cause changes in electrocorticogram and depression in the forced swimming test (FST). Fluoxetine got no effect on the rats subjected to the FST, after the use of dexamethasone.

Key-words: glucocorticoids, cortisol, depression, eletrophysiology, Central Nervous System

1 Introdução

O sistema nervoso (SN) juntamente com o sistema endócrino, assegura uma comunicação correta entre vários órgãos do corpo para manter um ambiente interno constante, também chamado homeostase. O SN permite a rápida transmissão de informações entre diferentes regiões do corpo, ao passo que, o sistema endócrino, é um sistema complexo de glândulas que secretam hormônios e os transportam diretamente para a circulação sanguínea, possuindo ações duradouras e mais lentas (Widmaier, Raff & Strang, 2006; Rachdaoui & Sarkar, 2013).

Segundo Tavares, Furtado e Santos (1984) esses sistemas exercem sua função de maneira integrada e se influenciam reciprocamente, não podendo ser dissociados. O SN cujas informações são transmitidas através de potenciais de ação ao longo das fibras nervosas, é responsável pelos ajustes homeostáticos rápidos. O sistema endócrino, envia suas informações pela corrente sanguínea através de mensageiros químicos, os hormônios, e participa, principalmente de ajustes mais lentos, de natureza metabólica. Um exemplo de influência de hormônios sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) é a ação dos hormônios tireoideanos sobre a atividade cerebral e a excitabilidade nervosa. Já em relação à influência do SNC sobre o sistema endócrino, temos como exemplo as observações de que estresses emocionais são capazes de alterar o ciclo reprodutivo em animais e no homem, além de provocar alterações psicológicas associadas às alterações dos níveis de hormônios gonadais durante o ciclo menstrual.

Os hormônios produzidos pelo sistema endócrino atuam sobre células-alvo em diferentes regiões do corpo. As glândulas endócrinas clássicas mais importantes são hipófise, hipotálamo, tireoide, paratireoides, adrenais, ilhotas de Langerhans do Pâncreas, gônadas e outras (Constanzo, 2007; Guyton & Hall, 2011).

A glândula hipófise ilustrada na Figura 1 (A e B) localiza-se em uma cavidade óssea, a *sela túrcica*, imediatamente abaixo do hipotálamo, na base do cérebro, e é formada por duas partes distintas: a glândula hipófise anterior ou adeno-hipófise e a glândula hipófise posterior ou neuro-hipófise (Douglas, 2002; Guyton & Hall, 2011).

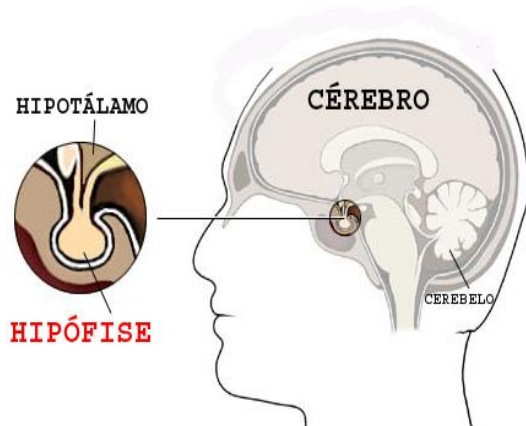


Figura 1 A

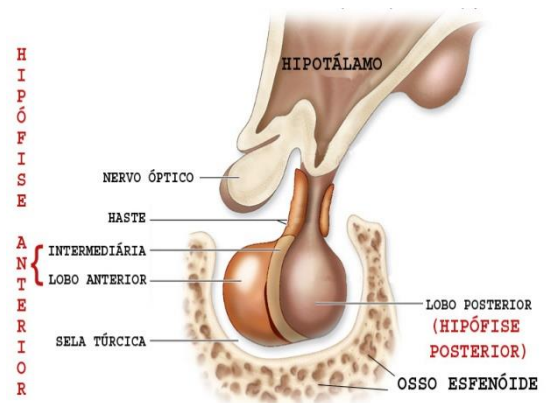


Figura 1 B

Figura 1: Diagrama esquemático da relação hipotálamo/hipófise mostrando a posição anatômica da glândula hipófise no SNC (Figura 1A) e suas subdivisões anatomo-funcionais (Figura 1B) regiões da glândula hipófise: Lobo Posterior, Lobo anterior.

Fonte: <http://marcotuliosette.site.med.br/index.asp?PageName=Tumores-20da-20Hip-F3fise>

A *glândula hipófise anterior* secreta seis hormônios principais: hormônio do crescimento, tireoestimulante, adrenocorticotrófico, prolactina, foliculoestimulante e o luteinizante. A maior parte desses hormônios atua no sentido de controlar outras glândulas, já a secreção de todos esses hormônios é controlada pelo hipotálamo. A *glândula hipófise posterior* atua na secreção dos hormônios antidiurético e ocitocina (Constanzo, 2007; Fox, 2007; Guyton & Hall, 2011; Saad, Maciel & Mendonça, 2007).

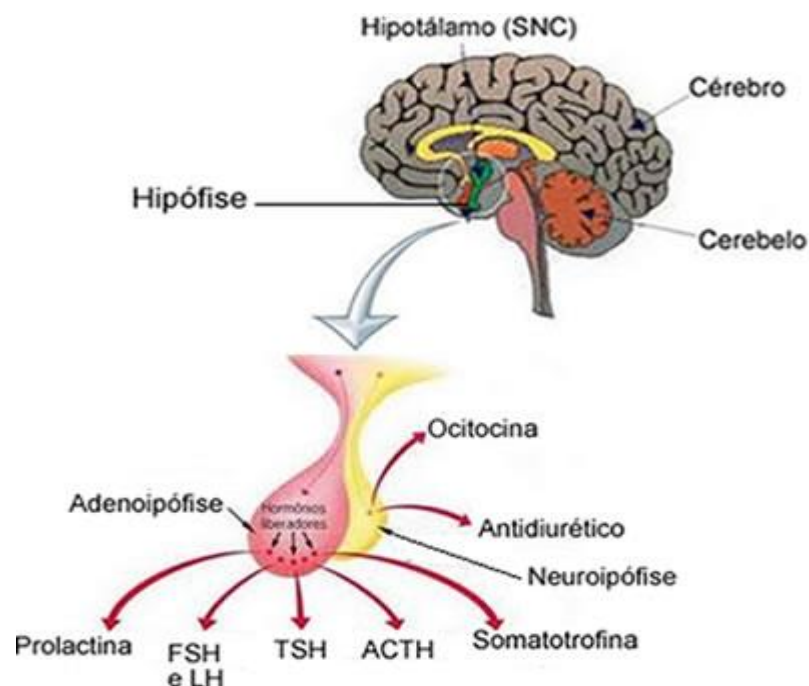


Figura 2: Tipos de hormônios secretados pela glândula hipófise em suas porções anterior (Adeno-hipófise) e posterior (neuro-hipófise)

Fonte: http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/upload/conteudo_legenda/85db0ff82844c45cf72b9b4e74edb04f.jpg

A glândula adrenal e que vamos ampliar a nossa discussão em nosso texto, está localizada como um gorro sobre o pólo superior de cada rim, está subdividida em duas partes distintas: a *medula adrenal* – parte central, relativamente delgada, responsável pela secreção de epinefrina e norepinefrina - e o *córtex adrenal* - o qual circunda a medula, e possui células glandulares grandes contendo consideráveis quantidades de colesterol (Constanzo, 2007; Fox, 2007; Guyton & Hall, 2011). (Figura 3)

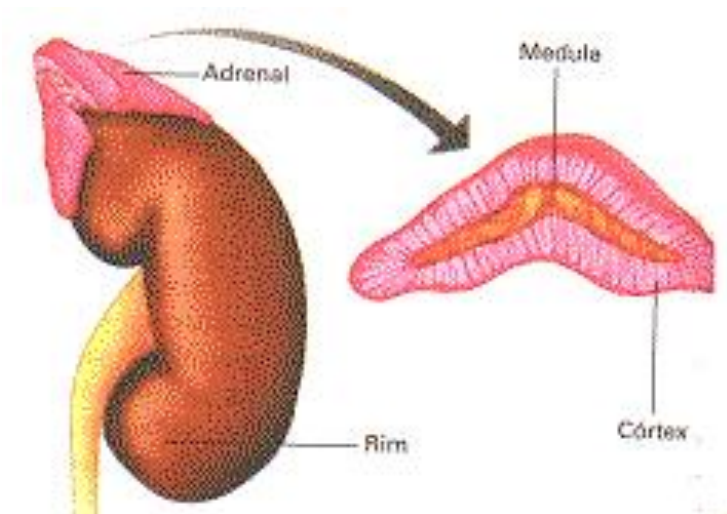


Figura 3: Desenho esquemático da glândula adrenal e suas regiões histológicas denominadas córtex e medula, que secretam os diferentes hormônios esteroides

Fonte: <http://mcvcorpohumano.blogspot.com.br/p/sistema-endocrino.html>

Os hormônios secretados por essas células são esteroides, com estrutura química semelhante ao colesterol e podem ser classificados de acordo com suas funções em: Mineralocorticoides, que controlam a excreção renal de sódio e potássio, como a aldosterona; Glicocorticoides (GC), que controlam o metabolismo das proteínas, gorduras e carboidratos, como o cortisol; e Androgênios, que produzem efeitos semelhantes à testosterona, hormônio masculino. O córtex adrenal também é subdividido em três camadas distintas: a zona glomerulosa, que secreta aldosterona, a zona fasciculada, a qual secreta a maior parte de cortisol e, provavelmente, androgênios, e a zona reticular, a qual provavelmente, contribui para a secreção de cortisol e androgênios, como ilustra a Figura 4 (Constanzo, 2007; Fox, 2007; Guyton & Hall, 2011). Face ao grande espectro de ação desses hormônios e suas glândulas-alvo iremos enfatizar o papel relevante dos GC e seus efeitos biológicos no SNC.

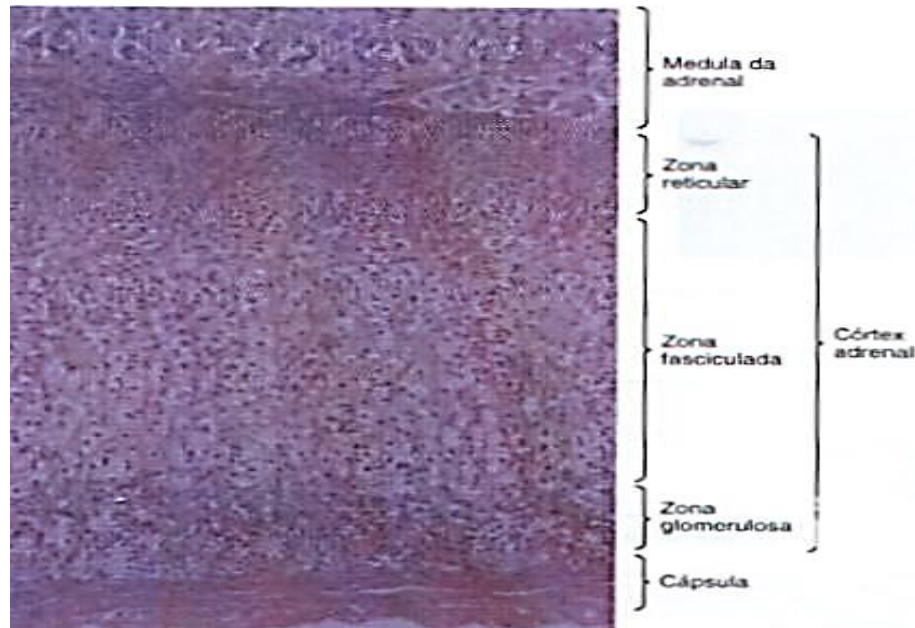


Figura 4: Corte histológico da glândula adrenal, marcado com cresilvioleta ilustrando as diferenças histológicas características do córtex adrenal.

Fonte: Rosenzweig, Leiman & Breedlove, 2012.

Estudos de base populacional que descrevem o padrão de consumo de medicamentos, inclusive de glicocorticoides (GC) são escassos no Brasil (Barros, 1982, 1983; Weiderpass, 1994). Os GC sistêmicos são medicamentos amplamente utilizados por várias especialidades médicas por seus excelentes efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. Por isso, o médico deve estar familiarizado com a farmacologia do medicamento, assim como sua administração e efeitos colaterais como a depressão. A automedicação e o uso irracional de GC podem trazer muitos danos à saúde, fatos estes relacionados aos fatores de prescrição e dispensação de medicamentos como sua falta de exigência no controle de venda dessas medicações nas farmácias. Com todas as indicações terapêuticas existentes para os GC, é importante atentar-se sempre à questão da relação custo e benefício, devendo-se pesar cuidadosamente o que se pode obter de efeitos benéficos com o uso de uma droga com tantos efeitos colaterais. Quando se decide utilizar GC terapêuticamente, vários fatores devem ser lembrados, que influenciam diretamente no aparecimento de seus efeitos colaterais: tipo de preparação a ser utilizada, via de administração, dose, esquema de administração (contínuo x dias alternados), tempo de uso, idade e sexo do paciente entre outros (Damiani *et al*, 2001).

Os GC são substâncias que têm como estrutura molecular básica o ciclopentanoperidrofenantreno, derivado do colesterol, que consiste em três anéis hexanos e um anel pentano, conforme demonstra a Figura 5. Todos os GC, naturais e sintéticos, são variações dessa estrutura básica e precisam, para terem efeito de um grupo 11 – hidroxilo (Pereira,

Bolzani, Stefani & Charlin, 2007). Esses hormônios esteroides são sintetizados e secretados pela glândula adrenal, em resposta ao estresse. Após a exposição ao estresse, o hipotálamo é estimulado para liberar o hormônio liberador de corticotropina (CRH) que então atua sobre a glândula hipófise anterior para estimular a síntese do hormônio ACTH. Este por sua vez, atua sobre o córtex adrenal para induzir a secreção de GC. Uma vez presentes na corrente sanguínea, os GC exercem uma variedade de efeitos específicos no tecido (Cruz-Topete & Cidlowski, 2015).

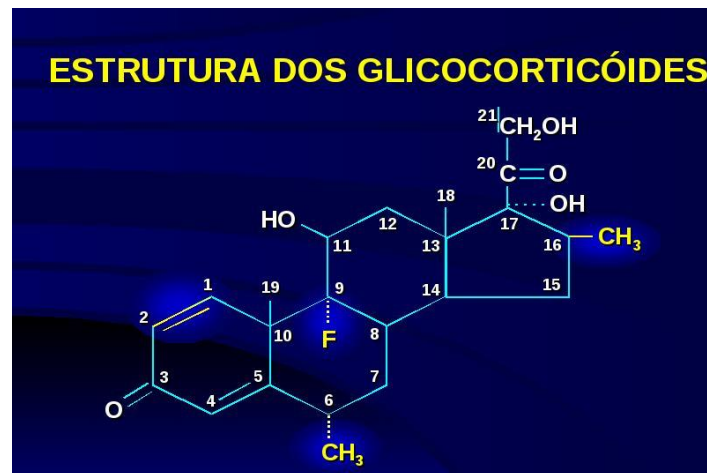


Figura 5: Estrutura molecular dos glicocorticoides

Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABk04AL/glicocorticoides>

Dentre os efeitos específicos mais comuns temos o efeito dos GC inibindo a secreção de insulina, e estimulando a produção do glucagon, que resulta no aumento da taxa de glicose sanguínea. Em contrapartida o aumento pronunciado da glicemia eleva os níveis plasmáticos de cortisol e pode ampliar as respostas características ao estresse. O aumento da glicemia pelos GC resulta tanto da ativação da gliconeogênese hepática, quanto de certos efeitos sistêmicos do cortisol, como ilustrado na Figura 6.

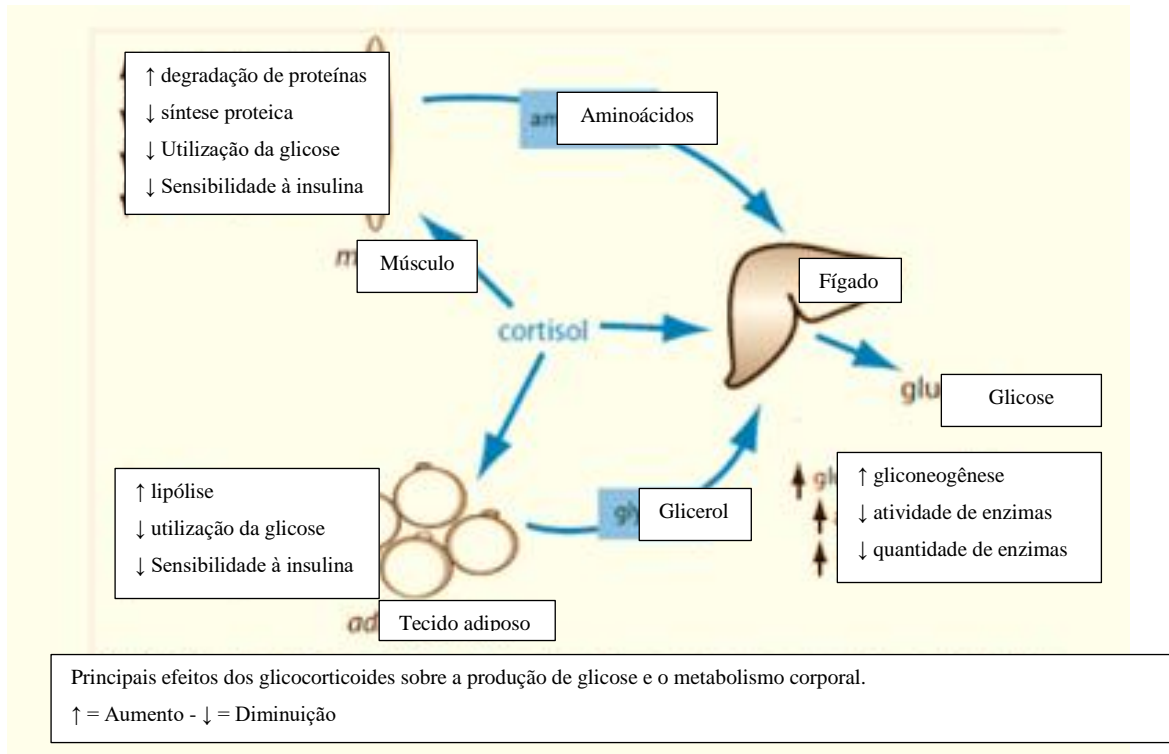


Figura 6: Diagrama esquemático ilustrando os efeitos sistêmicos dos glicocorticoides

Fonte: <http://corticoidesebioquimica.blogspot.com.br/2013/02/efeitos-do-cortisol-no-organismo.html>

Além dessas funções, os GC regulam as respostas alérgica e inflamatória, sendo de grande importância nos casos de estresse físico o que age diretamente na resposta histamínica. Além disso estabiliza as membranas lisossômicas e reduz a permeabilidade capilar e a fagocitose. Também influenciam a resposta imune, pois reduzem o número de linfócitos e eosinófilos circulantes e a produção de anticorpos; bloqueiam a síntese de interferons e inibem as interleucinas, causando supressão das respostas mediadas pelos linfócitos T. No sistema cardiovascular, os GC ampliam a ação catecolaminérgica, aumentando o tônus vascular e a força de contração miocárdica. Seu efeito inibitório na síntese das substâncias inflamatórias vasodilatadoras contribui na recuperação da pressão arterial em casos de hemorragia.

No SN, os CG influenciam desde a regulação de processos básicos de multiplicação e diferenciação celular até alterações da atividade eletrofisiológica do sistema límbico e no hipocampo. Certas habilidades do SN no processamento de informações são dependentes do cortisol, estando sob sua influência os padrões comportamentais de humor, ansiedade, motivação e aprendizagem, já que interfere nos sistemas de neurotransmissores. A partir da ativação da síntese de enzimas do sistema colinérgico, os GC aumentam a síntese da triptofano-hidroxilase, enzima relacionada com a produção da 5HT (5-hidroxitriptamina, serotonina) (Cortez & Silva, 2007).

A Figura 7 demonstra que os desequilíbrios das taxas de GC podem resultar em condições patológicas graves, tais como complicações cardiovasculares, metabólicas e imunológicas, como por exemplo, observadas na Síndrome de Cushing (excesso de GC) e na doença de Addison (deficiência de GC) (Cruz-Topete & Cidlowski, 2015).

Os GC também podem ser sintetizados em laboratório derivados do colesterol e são indicados, principalmente, para tratamentos dermatológicos, assim como, para o tratamento de muitas outras doenças não endócrinas, incluindo pulmonar, autoimune, hematológicas, e distúrbios neoplásicos (Pereira, Bolzani, Stefani & Charlin, 2007; Stratakis, 2012).

Geer, Islam & Buettner (2014) afirmam que numerosos mecanismos potenciais, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento da captação de ácidos graxos para o fígado, obesidade abdominal, acúmulo de gordura subcutânea visceral e no tronco, estão estreitamente relacionados com o desenvolvimento de resistência à insulina, dislipidemia, e risco cardiovascular causados pelo excesso de GC.

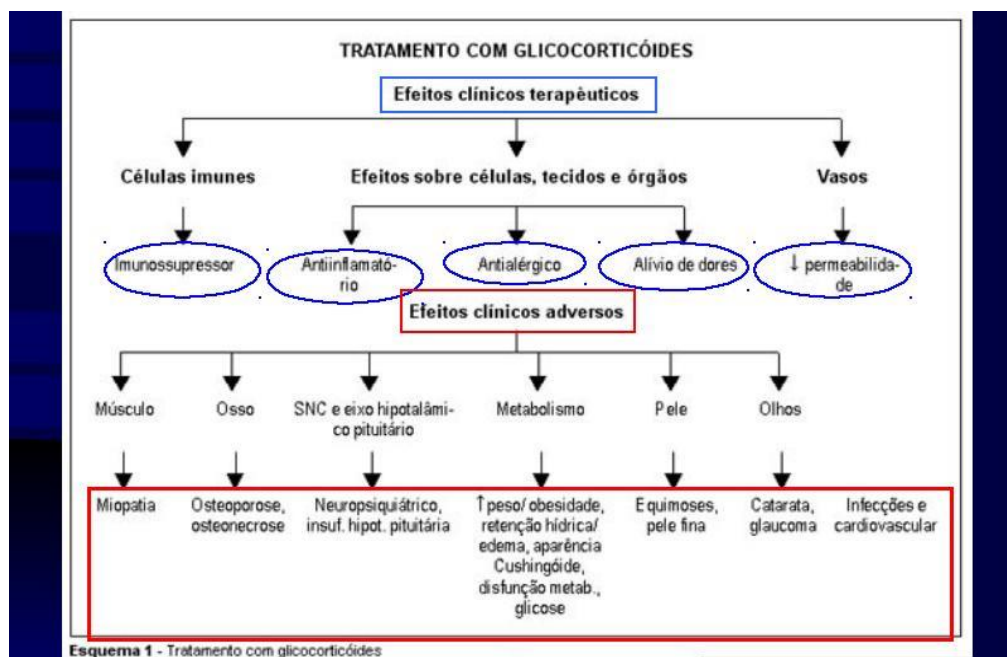


Figura 7: Diagrama esquemático ilustrando os efeitos sistêmicos e efeitos colaterais do excesso de GC no organismo.

Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/abaaabk04al/glicocorticoides>

Em relação a esse excesso, quaisquer que sejam suas causas, é acompanhado por uma vasta gama de sinais e sintomas conhecidos como Síndrome de Cushing (SC). Esta condição mais

geralmente decorre de causas iatrogênicas, quando os GC são utilizados como anti-inflamatório e/ou tratamento imunossupressor (Boscaro & Arnaldi, 2009).

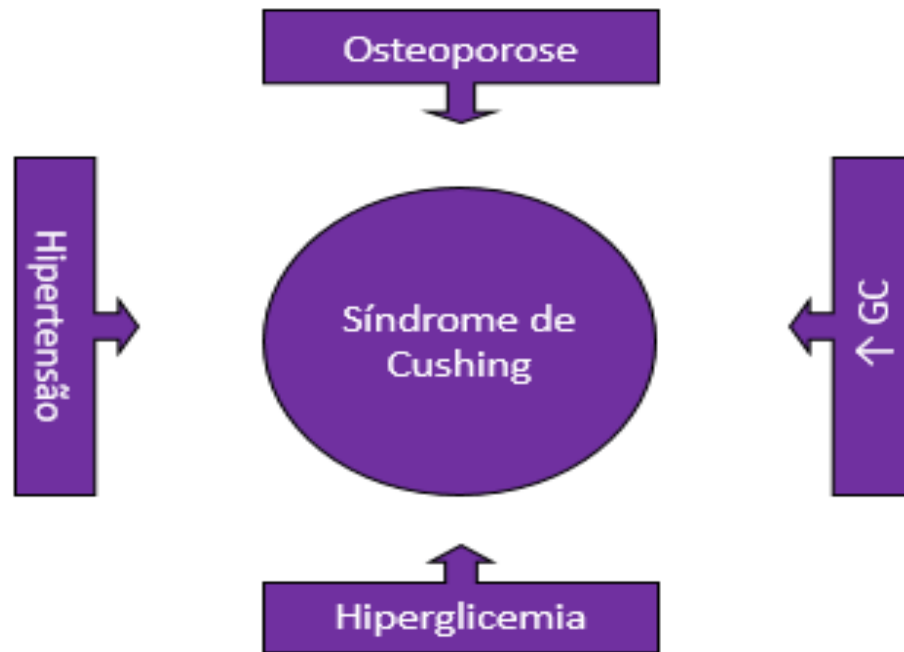


Figura 8: Representação esquemática dos sinais e sintomas encontrados na SC

O cortisol é um GC sintetizado e secretado, de acordo com as necessidades fisiológicas, pela produção de ACTH, secretada pela adeno-hipófise. A secreção de ACTH por sua vez é regulada pelo CRF/CRH, secretado no hipotálamo, pelo nível de GC no plasma, já a liberação de CRF/CRH é inibida pelos níveis sanguíneos elevados de GC, por impulsos oriundos do SNC, por peptídeos opioides, fatores psicológicos e do meio ambiente. Este GC aumenta a produção hepática de glicose, estimulando o catabolismo lipídico e proteico, de forma a obter substratos para a gliconeogênese e reduz a captação periférica da glicose (Cardoso & Palma, 2009).

O cortisol também foi sintetizado em laboratório com o objetivo de ser usado em pacientes com artrite reumatoide. Logo a seguir, os efeitos colaterais desfavoráveis foram reconhecidos, o que resultou em limites ao uso terapêutico dos GC (Longui, 2007; Cruz-Topete & Cidlowski, 2015).

O hormônio adrenocorticotrófico, ACTH, produzido na adeno-hipófise e regulado pelo CRH/CRF hipotalâmico ou hormônio liberador de corticotrofina, o qual é produzido no hipotálamo e potencializado sob a ação de vários fatores neurais como dor, ansiedade ou

hipoglicemia, condições todas que levam ao estresse e, atuam na secreção de ACTH. Este hormônio controla e regula o córtex adrenal agindo sobre as zonas (fasciculada e reticular) que secretam hormônios GC, como o cortisol. Além do córtex adrenal, o ACTH pode agir sobre as células adiposas, promovendo lipólise, acelerando a captação de glicose e aminoácidos, e ainda, sobre as células-beta do pâncreas, aumentando assim, a secreção de Insulina, dentre outras funções (Douglas, 2002).



Figura 9: Diagrama esquemático representando as diversas possíveis etiologias da produção exagerada de ACTH

A secreção de ACTH é regulada por um regime de retroalimentação negativa produzida pela taxa de cortisol no plasma, que inibe a secreção de ACTH e age diretamente na adeno-hipófise, ou inibindo simultaneamente a produção de ACTH ou na diminuição de CRH (Douglas, 2002; Saad, Maciel & Mendonça, 2007).

O ACTH é um hormônio peptídico hidrossolúvel o qual é captado por receptores de membrana atuando na síntese de proteínas no ribossomo que age como transportador do colesterol das gotículas do reservatório lipídico até as mitocôndrias, iniciando-se a síntese de esteroides corticais. Além disso, produz-se ativação de enzimas hidroxilantes essenciais nas últimas etapas da formação do cortisol e aldosterona. Como efeitos extra-corticais foram observados na hipersecreção de ACTH, a maior síntese de melanina nos melanóforos da pele, como ocorre na moléstia de Addison e a ativação da lipase tissular no tecido adiposo, produzindo-se maior liberação de ácidos graxos e redução da massa de tecido gorduroso. Como efeitos corticais, o ACTH estimula o crescimento e proliferação das células das zonas fascicular e reticular, sintetizando-se mais ácidos nucleicos e proteínas aumentando-se a secreção de todos

os esteroides corticais, produzindo o acúmulo de colesterol e aumento da secreção de GC, como o cortisol (Douglas, 2002).

Atualmente há uma necessidade cada vez maior por pesquisas relacionadas aos efeitos do uso de certas substâncias sobre o organismo, como os GC que são de origem sintética com atividade imunossupressora e anti-inflamatória, sendo uma classe farmacológica que simula os hormônios esteroidais, e entre esses o fármaco mais marcante é a dexametasona, devido sua longa ação, com alto potencial GC e vida média plasmática, potencial mineralocorticoide e dose equivalente baixa em comparação a outros GC. Entre os ISRS, que surgiram, nas últimas décadas, como uma nova classe farmacológica, desenvolvida com efeito antidepressivo, devido à sua eficácia, segurança e tolerabilidade, que passou a ser utilizada comumente na prática médica, temos a fluoxetina, que foi criada como protótipo da classe que age no SNC, principalmente, no córtex cerebral e neurônios serotoninérgicos.

Os ISRS, como a fluoxetina, caracterizam-se pela redução da captação da serotonina na fenda sináptica, sendo a fenda sináptica o ponto de contato entre um neurônio e outro e o local onde são liberados os neurotransmissores, tendo ação na membrana celular. Já o complexo dexametasona-receptor tem ação no núcleo da célula, unindo-se ao ácido desoxirribonucleico (DNA) estimulando a transmissão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e síntese enzimática consequente. Esta ação é a responsável pelos efeitos dos GC sistêmicos. Entretanto, em algumas células os efeitos podem ser de supressão da transcrição do mRNA, como no caso dos linfócitos. Os GC alteram a atividade pré e pós-sináptica, modificando as concentrações de receptores serotoninérgicos 5-HT entre outros. Segundo Cowen (2002), algumas dessas ações podem neutralizar os efeitos de drogas antidepressoras nos receptores betadrenérgicos. Por outro lado, não há, até o presente momento, por conta de uma literatura escassa e contraditória, conhecimento de como os GC exercem efeitos nos receptores serotoninérgicos (Alheira & Brasil, 2005).

Os efeitos farmacológicos dos GC verificam-se com doses superiores à quantidade produzida endogenamente. São, geralmente, extensões dos seus efeitos fisiológicos. Vale ressaltar que as ações fisiológicas e farmacológicas ocorrem pela ativação dos mesmos receptores. As concentrações que causam os efeitos desejados promovem igualmente o aparecimento de reações adversas que, na sua maioria, são apenas exacerbação dos eventos normalmente observados (Penildon, 2010).

A utilização dos GC na prática médica para tratamento com objetivo imunossupressor e anti-inflamatório, tem ação deletéria, devido os fármacos penetrarem rapidamente no cérebro,

e apesar de sua função fisiológica no SNC ser desconhecida, o seu excesso ou sua deficiência podem alterar profundamente o comportamento e a função cognitiva. Os GC, inicialmente, causam euforia; no entanto, com a exposição prolongada ocorre uma variedade de anomalias psicológicas, incluindo irritabilidade, labilidade emocional e depressão. O comportamento hipercinético ou maníaco é menos comum; psicoses declaradas ocorrem em um pequeno número de pacientes, particularmente naqueles com distúrbio bipolar subjacentes. Muitos pacientes observam alterações em suas funções cognitivas, mais frequentemente no que diz respeito à memória e à concentração. Os outros efeitos centrais incluem o aumento do apetite, redução de libido e insônia, com redução do sono REM e aumento do sono em estágio II (Gardner, 2013).

Devido a uma possível interação farmacológica entre GC e ISRS, é possível que tenhamos uma interferência no sistema serotoninérgico do SL, pois os GC agem em muitas células, logo vão agir alterando os receptores 5-HT, conseqüentemente alterando o sistema serotoninérgico, que é composto pelo neurotransmissor serotonina (5-HT), seus receptores, neurônios serotoninérgicos e a proteína de transporte de serotonina (SERT), e que são alvos da ação da fluoxetina. Essa droga introduzida nos EUA em 1998, um ISRS atua no sentido de tentar normalizar as sinapses neuronais a partir do aumento de neurotransmissores disponíveis nas fendas sinápticas, bloqueando a recaptação dos mesmos pela membrana pré-sináptica, causando inibição do SERT, por isso tornou-se rapidamente uma das medicações de prescrição mais comum na prática clínica (Katsung, 2010). Sendo assim, a fluoxetina, amplamente prescrita para tratamento da ansiedade e da depressão, tornou-se uma substância reconhecidamente eficaz para o tratamento do sintoma da depressão humana (Edwards, 1995; O'shea, 1991). A depressão humana é caracterizada por humor depressivo, falta de interesse, anedonia, lentidão psicomotora, queda de energia, negativismo em pensamentos, além de sintomas físicos e insônia, sendo que as três primeiras manifestações citadas são seus principais sintomas psíquicos.

Sabendo da função dos GC em sua ação fisiológica e farmacológica, ao provocarem a elevação de seus níveis em humanos, foram modelados em roedores estudos e modelos para produzir ansiedade e estado depressivo com uso de GC (Ardayfio & Kim, 2006; Murray, Smith & Hutson, 2008; Zhao, Baros & Zhang, 2008; Gourley *et al.*, 2008).

Dentre os modelos e estudos para produzir a depressão em roedores temos o TNF, que é um dos mais usados no estudo da depressão em animais de laboratório, por apresentar alto valor preditivo, devido à resposta aos fármacos antidepressivos existentes. O teste é baseado na ideia de que a imobilidade reflete o “desespero comportamental”, que se assemelharia à

sintomatologia da depressão, supondo que o animal desiste de escapar (Kapczinski, Quevedo, Izquierdo & Col, 2011).

A análise da atividade elétrica cerebral pode ser feita através do EcoG, que consiste no registro de atividade elétrica e/ou potencial de campo de um conjunto de neurônios que é captada por meio de eletrodos em contato direto com o córtex cerebral dos roedores. O traçado obtido de acordo com a amplitude e frequência das ondas indica as faixas das forças cerebrais que podem ser correspondentes à excitação ou redução da atividade elétrica cerebral. Esse método de análise das forças cerebrais, possivelmente, pode identificar alterações eletroencefalográficas devido à ação de medicamentos no SNC.

Realizar esse estudo é de grande valor científico e é nosso objetivo, haja vista uma carência de pesquisas relacionadas ao tema. Portanto, é de suma importância desenvolver esse estudo das alterações eletroencefalográficas em ratos após a utilização do GC, dexametasona, e ISRS, a fluoxetina, submetidos em seguida ao modelo de depressão do TNF, procurando não somente saber as consequências eletroencefalográficas e comportamentais de sua utilização em animais experimentais por conta das ações e interações farmacológicas dessas classes, mas também, servir como base para novos estudos.

1.1 Implicações comportamentais ocasionadas pelo uso de glicocorticoides e/ou hipercortisolismo

As alterações nervosas resultantes do uso dos GC são variadas e ocorrem com frequência de 4% a 36% na maioria das séries estudadas. As mais notáveis são as alterações do comportamento, que vão desde depressão, insônia ou exacerbação do estado de ânimo, nem sempre explicada pela melhora da doença, até manifestações francamente psicóticas e tentativas de suicídio. Um dos efeitos adversos mais graves é a insuficiência do eixo hipófise-adrenal por retirada abrupta de GC utilizados por longo tempo. Os GC exógenos suprimem tanto a liberação de ACTH pela hipófise como o CRH hipotalâmico (Penildon, 2010).

1.1.1 A inibição da leptina e suas consequências

A leptina, um hormônio secretado a partir do tecido adiposo branco, é um importante regulador do peso corporal e da ingestão alimentar (Negrão & Licínio, 2000). Este efeito da leptina é particularmente evidente em roedores e seres humanos que carecem de uma forma funcional da proteína, resultando em obesidade grave e aumento do apetite. Seu efeito na ingestão de alimentos é mediado em parte via receptores de leptina presentes no hipotálamo (Lerario *et al.*, 2001; Münzberg, Flier & Bjørbæk, 2004).

A descoberta da leptina se deu no contexto das investigações feitas com modelos experimentais de obesidade. Numa série de estudos realizados com ratos obesos foi identificado que estes ratos possuíam um gene mutante (ratos *ob/ob*) e eram incapazes de produzir um fator circulante presente no tecido adiposo de ratos normais. O achado mais interessante destes estudos foi a constatação de que ratos *ob/ob* perdiam peso quando em contato com o sangue de ratos normais demonstrando que seus cérebros respondiam a este fator (Negrão & Licínio, 2000).

Negrão e Licínio (2000) afirmam ainda que um grupo liderado pelo Dr. Friedman da Rockefeller University, em 1994, clonou o gene deste fator, denominado proteína *ob* ou leptina (do grego *leptos*, magro). Existe uma homologia de 84% entre o gene da leptina humana e o gene encontrado em camundongos. Logo a seguir, passou-se a produzir a leptina recombinante e demonstrou-se que a leptina administrada em camundongos *ob/ob* levava a uma perda de peso e reduzia a ingestão calórica.

Um dos principais sinais e sintomas associados ao uso de GC é a deposição de gordura central com um aumento do tecido adiposo na região dorso-cervical, face e área supra clavicular, juntamente com uma perda de tecido adiposo nas extremidades. Uma hipótese para este fenômeno é que os adipócitos periféricos do tronco diferem em suas sensibilidades relativas à insulina e aos efeitos lipolíticos facilitados por GC. Os adipócitos da região do tronco responderiam predominantemente aos níveis elevados de insulina decorrentes da hiperglicemia induzida por GC, enquanto os adipócitos periféricos seriam menos sensíveis à insulina e responderiam mais aos efeitos de outros hormônios lipolíticos facilitados pelos GC. Além disso, os GC causam aumento de apetite e retenção de líquido, ocasionando edema e aumento de peso (Pereira, Bolzani, Stefani & Charlin, 2007).

Segundo Lerario *et al.* (2001) foi demonstrado que um certo número de hormônios, incluindo insulina, catecolaminas, esteróides sexuais e cortisol, modulam a síntese de leptina *in vitro* e *in vivo*. O cortisol e a insulina tem sido implicados há muito tempo no equilíbrio

energético e acredita-se que sua interação com a leptina constitua um circuito de realimentação para a manutenção do peso corporal. Considerando a ação anti-obesidade da leptina, parece razoável que o hipercortisolismo que classicamente induz hiperfagia e obesidade possa ser contra-regulado por uma ativação do gene *ob* conduzindo a hiperleptinemia.

Os efeitos dos glicocorticóides sobre a leptinemia em seres humanos não foram totalmente esclarecidos. Entretanto, em alguns estudos, a administração aguda de glicocorticóides tem aumentado a leptinemia (Lerario *et al*, 2001), enquanto em outros relatos tais resultados não foram observados. Kolaczynski, Goldstein and Considine (1997) confirmam em seus estudos que a dexametasona é um poderoso estimulador da produção de leptina *in vivo* através de um mecanismo que parece ser independente da transcrição do gene *OB* na gordura abdominal subcutânea humana.

Em contrapartida, estudos apontam também que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal apresenta-se hiper-responsivo nos indivíduos obesos. Observa-se resposta aumentada do cortisol a estímulo com ACTH, CRH. E apesar de não haver hipercortisolismo bioquímico, o hipercortisolismo funcional presente na obesidade abdominal poderia contribuir para a síndrome metabólica, cujas características se assemelham em muito às manifestações da síndrome de Cushing. Existe aumento da atividade glicocorticóide na gordura abdominal devido a maior atividade local da enzima 11-beta-hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 1 (11 β HSD-1), que catalisa a interconversão de cortisona para cortisol na célula-alvo. Estudos com ratos Zucker obesos, resistentes à leptina, demonstraram aumento da atividade da 11 β HSD-1 no tecido adiposo omental, acarretando uma maior geração de glicocorticóide local, e conseqüentemente maior ativação de seu receptor, promovendo obesidade (Lordelo *et al*, 2007).

1.1.2 A Serotonina

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) compõe o grupo das aminas biogênicas (neurotransmissores) que inclui também as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina). A taxa da síntese da serotonina é dependente da disponibilidade do triptofano livre no plasma que é o aminoácido precursor dessa substância (Raimundo *et al*, 2009). O triptofano é um aminoácido essencial com recomendação dietética estimada de 5 mg/kg/dia. É o aminoácido limitante em quase todas as fontes de proteína que são importantes para a nutrição

humana, representando 1-1,5% de aminoácidos totais em proteínas vegetais e animais típicas, respectivamente. As fontes alimentares de triptofano mais comuns são ovos, leite, carne, soja, batatas, cereais, brócolis, couve-flor, berinjela, kiwis, ameixas, bananas, nozes, peixes, frutos do mar e tomates (Keszthelyi, Troost & Masclee, 2009). A hidroxilação inicial do triptofano mais do que a descarboxilação do 5-HTP parece ser o passo limitante na síntese da serotonina (Frazer & Hensler, 1993).

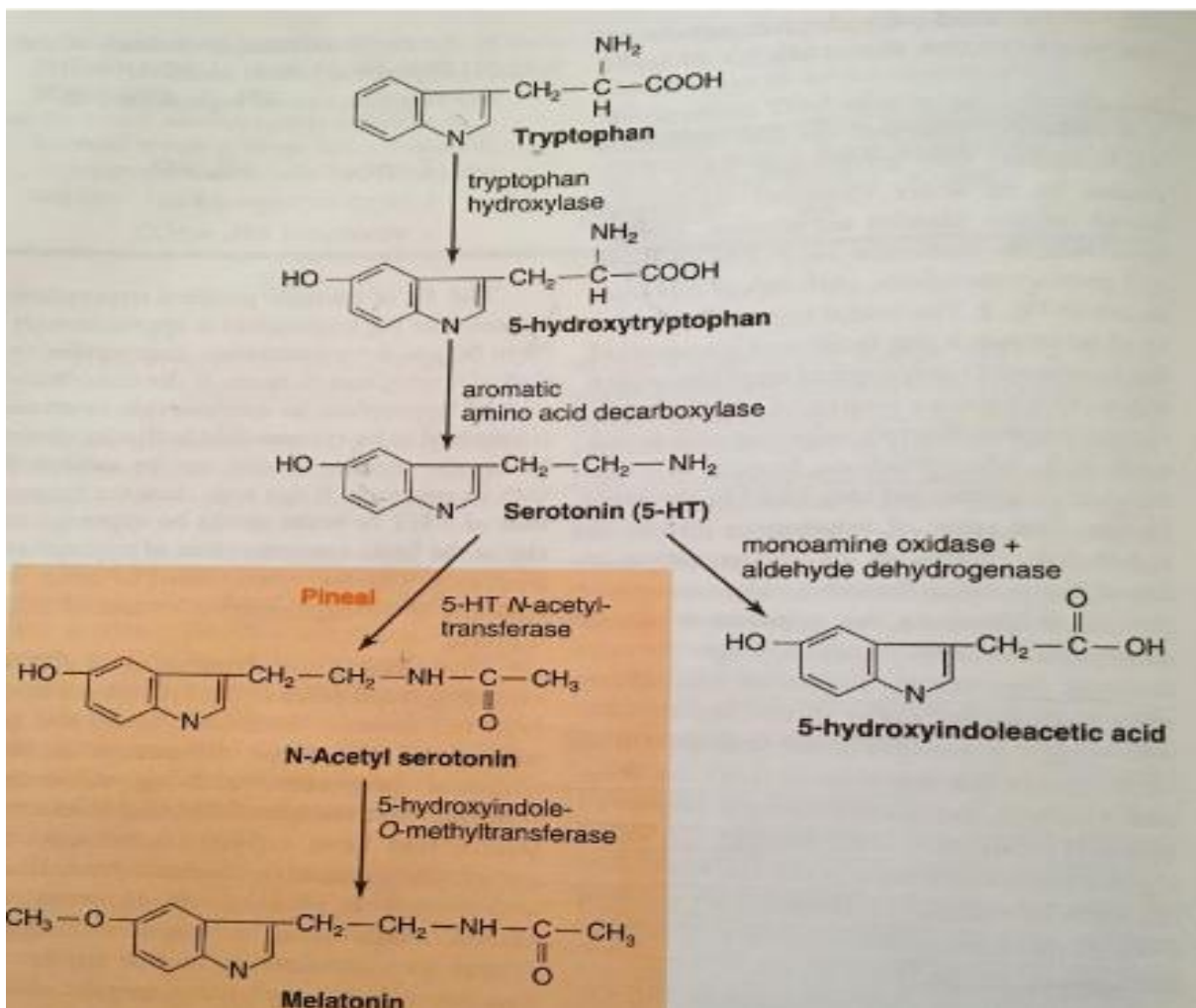


Figura 10: Estrutura química da 5-HT e seus precursores, note que a 5-HT tem como precursor o triptofano, que sofre ação da triptofano hidroxilase se transformando, em 5-hidroxitriptofano e após a ação da descarboxilase dá origem à serotonina.

Fonte: Frazer & Hensler, 1993.

As concentrações de 5-HT cerebrais estão relacionadas a alterações de comportamento e humor, ansiedade, agressividade, depressão, sono, fadiga, e ainda na supressão de apetite (Feijó & Bertoluci, 2011).

A 5-HT tem efeito inibidor da conduta juntamente a um efeito modulador geral da atividade psíquica. Assim, ela influi sobre quase todas as funções cerebrais, inibindo ou estimulando o ácido gama-aminobutírico (GABA). É dessa forma que a 5-HT regula o humor, o sono, a atividade sexual, o apetite, o ritmo circadiano, as funções neuroendócrinas, a temperatura corporal, a sensibilidade à dor, a atividade motora e as funções cognitivas (Feijó & Bertoluci, 2011).

1.1.2.1 Envolvimento da serotonina em funções fisiológicas e comportamentais

O hipotálamo secreta vários fatores de liberação e inibição para controlar a secreção dos hormônios da hipófise anterior. A serotonina está entre muitos dos neurotransmissores que participam do controle hipotalâmico da secreção da hipófise, particularmente, na regulação da prolactina, ACTH e hormônio do crescimento. Medidas dessas respostas hormonais, após a administração de drogas que aumentam a função da serotonina cerebral fornecem métodos para avaliar sua função em humanos. Por exemplo, a administração do precursor de serotonina (triptofano) aumenta a concentração plasmática de prolactina e hormônio do crescimento. Adicionalmente, o triptofano tem sido usado clinicamente para avaliar o funcionamento do sistema serotoninérgico em pacientes com doenças psiquiátricas (Murphy *et al*, 1989).

Serotonina parece também estar envolvida no controle do ritmo circadiano. Muito pouco se conhece sobre a função de uma lesão extensa de aferências serotoninérgicas, porém, lesões de neurônios serotoninérgicos de animais de laboratório tem descrito que ocorre uma ruptura dos ritmos locomotores que resulta na perda de ritmo diário de corticosterona.

Pesquisas neuroquímicas tem buscado descobrir como efeitos da ingesta alimentar afetam as concentrações de triptofano cerebral e a síntese de serotonina, enquanto pesquisas farmacológicas tem enfatizado o controle do apetite por drogas serotoninérgicas em laboratórios animais usando ratos administração não seletiva de agonistas serotoninérgicos tais como a fenfluramina, que atua para liberar serotonina ou o triptofano, seu precursor, causando a diminuição da ingesta alimentar. A partir desses dados tem sido inferido que a serotonina inibe a ingesta de alimentos. Agonistas de serotonina que ativam os receptores 5-HT_{1C} e 5-HT_{1B} também diminuem a ingesta. Inibidores seletivos da captação de serotonina tem efeitos anoréxicos, assim como, provavelmente, por aumentar as ações fisiológicas da serotonina endógena. De maneira oposta, pequenas doses de agonistas de 5-HT_{1A} aumentam a ingesta de

alimentos em ratos. O consumo aumentado de alimentos pode ser devido à atividade de grande número de receptores de serotonina no núcleo da Raphe. A ativação dos receptores 5-HT_{1A} localizados no corpo celular e dendritos parecem inibir a taxa de disparo neuronal e a liberação de serotonina. Os efeitos hipofágicos da fenfluramina ou agonistas de serotonina são mais pronunciados em ratas fêmeas; um efeito de potencial relevância para as desordens humanas, tais como, anorexia nervosa e bulimia que tem maior incidência em mulheres do que em homens.

1.1.3 Depressão

A depressão é uma condição relativamente comum, de curso crônico e recorrente. Está frequentemente associada com incapacitação funcional e comprometimento da saúde física. Os pacientes deprimidos apresentam limitação da sua atividade e bem-estar, além de uma maior utilização de serviços de saúde (Fleck, 2009).

A Organização Mundial de Saúde define depressão como um transtorno mental comum, caracterizado por tristeza, perda de interesse, ausência de prazer, oscilações entre sentimento de culpa e baixa auto-estima, além de distúrbios do sono ou do apetite. Bem como sensação de cansaço e falta de concentração.

A teoria monoamínica da depressão sustenta que a depressão resulta de uma diminuição patológica na neuro-transmissão de serotonina e/ou norepinefrina. Com base nessa hipótese, pode-se deduzir que o aumento da neuro-transmissão da serotonina e/ou norepinefrina pode melhorar ou reverter a depressão (Golan, 2009).

Na depressão acontece uma diminuição na quantidade de neurotransmissores liberados, mas a bomba de recaptação e a enzima continuam trabalhando normalmente. Então um neurônio receptor captura menos neurotransmissores e o sistema nervoso funciona com menos neurotransmissores do que normalmente seria preciso (Andrade, 2003).

Portanto, embora seja um transtorno que afeta muitas pessoas no mundo, a etiologia da depressão é desconhecida, sendo sua origem relacionada a fatores genéticos e ambientais, que interferem no desenvolvimento cerebral.

1.2 A Fluoxetina

O uso de antidepressivos no tratamento de pacientes com depressão iniciou-se no fim dos anos 50, sendo que, desde então novos tratamentos foram desenvolvidos e tem constituído oportunidades para a compreensão dos mecanismos envolvidos na depressão (Deitos *et al.*, 1999). Somente duas classes de antidepressivos eram conhecidas até a década de 80, os tricíclicos e os inibidores de monoaminoxidase. Apesar de eficazes, essas drogas são inespecíficas e acarretam diversos efeitos colaterais (Moreno, Moreno & Soares, 1999). Nas últimas décadas, outras classes de antidepressivos foram desenvolvidas. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRC) pertencem a essa nova geração de drogas antidepressivas, sendo a fluoxetina, o protótipo do grupo para o tratamento de depressão, devido à sua eficácia, segurança e tolerabilidade (Leite *et al.*, 2007; Egeland, Warner-Schmidt, Greengard & Svenningsson, 2010). A droga é ainda frequentemente usada para tratamento de outras condições (as quais não são objeto do presente estudo), tais como diferentes transtornos de ansiedade e transtornos alimentares, embora, nesse último caso, seu uso seja muito controverso (Duvvuri, Bailer & Kaye, 2010).

A fluoxetina é uma substância reconhecidamente eficaz para o tratamento dos sintomas da depressão (Carlini, 2009). Ela pertence à família das fenilpropalaminas, agindo a nível pré-sináptico na junção neuro-efetora.

A inibição da recaptação de serotonina aumenta os níveis sinápticos de serotonina, produzindo aumento na ativação do receptor de 5-HT e intensificação das respostas pós-sinápticas (Golan, 2009), principalmente, no sistema límbico (SL) que se relaciona com depressão. O SL tem como estruturas principais: os giros corticais, os núcleos de substância cinzenta e tratos de substância branca disposto nas superfícies mediais de ambos os hemisférios e em torno do terceiro ventrículo. Estas estruturas, funcionalmente, se relacionam com os instintos, emoções e memória e, através do hipotálamo, com a manutenção da homeostase. De fato, a depressão associa-se a déficits em áreas estratégicas do cérebro, incluindo regiões límbicas (Barreto, 2010), causando um possível desequilíbrio químico que envolve uma série de neurotransmissores em regiões do cérebro que comandam o humor, como o sistema límbico, o hipotálamo e o lobo frontal. Daí a eficácia dos medicamentos antidepressivos, cuja função é restabelecer esse equilíbrio químico.

1.3 Modelos experimentais para depressão – Teste do Nado Forçado (TNF)

Um teste clássico para o estudo da depressão é chamado de desespero comportamental, ou natação forçada, o qual consiste em submeter ratos ou camundongos para nadar em um cilindro do qual não há escapatória. Após as primeiras tentativas de fuga, sem sucesso, os animais percebem que não tem como sair do local e assumem uma postura imóvel, exceto pelos mínimos movimentos necessários para manter a cabeça acima da água. Durante o teste são avaliados tempo de mobilidade e natação (Kapczinski, Quevedo, Izquierdo & Col, 2011).

A investigação experimental da depressão em humanos é, em grande parte, eticamente inviável, assim, modelos animais de depressão foram desenvolvidos para esse fim (Willner, 1991). O teste de nado forçado é um modelo muito utilizado para avaliação da atividade antidepressiva com roedores (Porsolt, Le Pichon & Jalfre, 1977). Devido apresentarem comportamento passivo (flutuação) durante o teste, num reteste 24 horas após a primeira exposição, podem ser reduzidos por meio de tratamento com drogas antidepressivas, o que sugere algum elemento em comum com a depressão humana. Sua grande utilização decorre principalmente pela fácil execução, fidedignidade dos resultados em vários laboratórios e sua sensibilidade à ação de quase todas as classes de antidepressivos existentes na atualidade (Borsini & Meli, 1988; Cryan & Lucki, 2000).

1.4 Eletroencefalograma (EEG)

O cérebro exerce controle sob o organismo por meio da atividade coletiva de populações de células nervosas, que disparam de forma sincrônica em diferentes situações. É possível avaliar essa atividade coletiva por meio do eletroencefalograma (EEG), que é o registro da diferença de potencial elétrico entre dois pontos do SN (Pavão, 2010).

O registro gráfico das oscilações dos potenciais elétricos do SN denomina-se genericamente de oscilograma. Sua forma mais conhecida é o EEG. Em animais, é obtido implantando-se eletrodos diretamente sobre a superfície cortical (eletrocorticograma – EcoG) ou no, interior do encéfalo. Geralmente, os eletroscilogramas de gatos, ratos e outros animais de experimentação são detectados por eletrodos dispostos em derivações bipolares. Antes da implantação de eletrodos para registro dos eletroscilogramas, é necessária a determinação precisa das posições dos pontos nas quais se deseja implantá-los. A cirurgia de implantação de eletrodos permite o registro simultâneo de diferentes áreas do encéfalo e de diversas unidades motoras (Tufik, 2008).

Portanto, o EcoG registra a atividade na superfície ou no interior do córtex cerebral e o EEG, a atividade de milhões de neurônios na superfície do crânio. A escolha dessa região para esse estudo, deve-se ao fato de que no córtex cerebral, representado pela massa cinzenta, no qual ficam localizados os neurônios, a leitura eletroencefalográfica através de dois eletrodos, nada mais é do que uma análise amostral da atividade cerebral, comparando potenciais de ação (voltagem e frequência) entre dois pontos equidistantes do cérebro do rato (córtex motor primário e do giro pré-central).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

A proposta deste trabalho será estudar as alterações eletroencefalográficas e comportamentais após a utilização de dexametasona e fluoxetina, em modelo animal experimental submetido ao nado forçado.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar as forças cerebrais captadas pelo eletrocorticograma dos animais após 24 horas da aplicação de dexametasona, 4,0 mg/kg, por via intraperitoneal;
- Avaliar através do eletrocorticograma as forças cerebrais após sete aplicações de dexametasona, 4,0 mg/kg *i.p.* e comparar com os animais controle e tratados agudamente;
- Analisar a ação antidepressiva da fluoxetina e ação depressiva da dexametasona, sobre o comportamento de ratos, no Teste do Nado Forçado (TNF);
- Avaliar o perfil glicêmico dos animais antes e após a utilização da dexametasona;

3 Metodologia

3.1 Local

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de produtos naturais Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Pará (ICB – UFPA) em parceria e orientação do Prof. Dr. Moysés Hamoy (ICB – UFPA).

3.2 Animais

Foram utilizados oitenta e um ratos Wistar machos adultos, pesando entre 200 a 250 g. Os animais foram obtidos do biotério central da Universidade Federal do Pará, e mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, em ambiente com temperatura regulada (25 – 28°C), ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados *ad libitum*. O procedimento experimental foi submetido e aprovado pelo comitê de ética e pesquisa em animais de experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE-UFPA), sob parecer nº 100/2005.

- Neste trabalho onde se lê “crônico”, considera-se “subcrônico”.

Foram formados nove grupos de nove animais: controle agudo, dexametasona agudo, controle crônico, dexametasona crônico ou dexametasona, controle negativo, controle positivo, sham dexametasona, fluoxetina e fluoxetina/dexametasona, conforme Figura 11.



Figura 11: Organograma dos Grupos

A dexametasona foi administrada na dose de 4 mg/kg *i.p.* 24 horas antes do registro electrocorticográfico para o grupo agudo. Para o grupo crônico, ou simplesmente grupo dexametasona, foi administrada durante sete dias a cada 24 horas na dose de 4 mg/kg *i.p.* Cada um com seu grupo controle, controle agudo (CA) e controle crônico (CC), respectivamente. O grupo sham dexametasona corresponde aos animais que receberam 7 dias de tratamento com injeções de solução fisiológica por via *i.p.* no equivalente volume da dexametasona. A fluoxetina foi administrada na dose de 5 mg/kg por via oral, com ferramenta semelhante à sonda orogástrica, procedimento de gavagem, também por sete dias, para o grupo fluoxetina. O grupo dexametasona/fluoxetina corresponde ao grupo de animais que foram tratados conjuntamente com essas duas drogas, nas mesmas doses já descritas anteriormente, dexametasona na dose de 4 mg/kg *i.p.* e fluoxetina na dose de 5 mg/kg por via oral, por sete dias (Figura 12). As doses elevadas de dexametasona e a dose padrão de fluoxetina administrada foram determinadas por meio de cálculo alométrico.

Além disso, foi definido o grupo controle negativo (animais ingênuos ao teste) e o grupo controle positivo (animais ensinados a fazerem o teste) para o início do TNF. Após sete dias o TNF foi realizado, e após o término foram realizados os registros electrocorticográficos que serviram de comparação aos grupos experimentais. O volume de urina dos animais foi medido após o tratamento agudo e crônico com dexametasona. A descrição temporal do experimento foi descrita na figura 12.

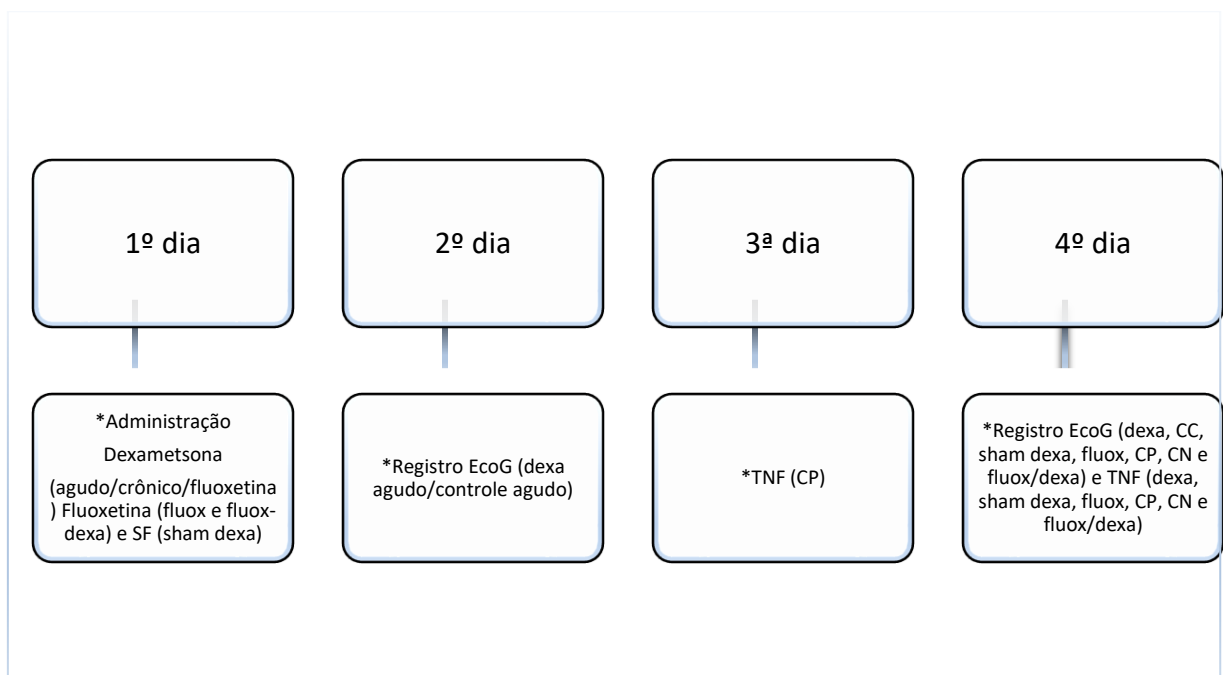


Figura 12: Desenho experimental. Descrição cronológica do projeto.

3.3 Procedimentos para a implantação do eletrodo

Os animais foram anestesiados com uma associação de Xilazina (5,0 mg/kg Valée - Montes Claros, MG, Brasil) e Quetamina (50 mg/kg Köing Santana de Parnaíba, SP, Brasil) por via *i.p.* Após o animal apresentar perda de reflexo interdigital foi fixado no aparelho esteriotáxico (Figura 13), para a implantação de eletrodos. O procedimento foi iniciado com a tricotomia da pele da região da cabeça, com adequada assepsia, sendo feito a infiltração de lidocaína a 2% (Hipolabor Sabará, MG, Brasil) no local da incisão cirúrgica que contém 3,0 cm rostro-caudal na linha mediana, expondo a superfície óssea do crânio (Figura 14). A lidocaína também foi aplicada no conduto auditivo externo para reduzir os efeitos da pressão das barras do esteriotáxico. Após a exposição do osso do crânio foram realizadas duas perfurações com aparelho odontológico, obedecendo as coordenadas esteriotáxicas – 0,96 mm posterior para bregma, \pm 2 mm latero-lateral (hemisférios direito e esquerdo) (Paxinos & Franklin, 2005), onde foram implantados os eletrodos em aço com 1 mm de diâmetro e acomodados na duramater, fixados e isolados com acrílico autopolimerizante de uso odontológico (Resinas Acrílicas Pó Clássico LTDA) e Acrílico Auto Polimerizante (JET Clássico LTDA).



Figura 13: Esteriotáxico



Figura 14: Procedimentos para implantação do eletrodo. O animal foi anestesiado, fixado no estereotáxico, no qual foi realizado procedimento cirúrgico (incisão longitudinal), onde foi possível visualizar o Bregma.

3.4 Delineamento experimental

Os registros eletrocorticográficos foram feitos após o primeiro dia, para os grupos dexametasona agudo e controle agudo. Após o sétimo dia, para os grupos dexametasona de uso crônico, controle crônico, controle negativo, controle positivo, sham dexametasona, fluoxetina e fluoxetina/dexametasona. Os eletrodos conectados a um sistema de aquisição de dados, composto por um amplificador de alta impedância (Grass Technologies, P511), monitorado por um osciloscópio (Protek, 6510), os dados foram continuamente digitalizados em uma taxa de 1,0 KHz por um computador equipado com uma placa de aquisição de dados (National Instruments, Austin, TX) os dados serão armazenados em disco rígido e, processado através de um software especializado (LabVIEW express). O eletrodo de registro estava localizado no lado direito do hemisfério, e do lado esquerdo o eletrodo de referência. Todo o experimento foi executado dentro da gaiola de Faraday. Após 10 minutos de acomodação, a partir desse momento foi captado o EcoG durante 15 minutos. Os registros do controle serão feitos com protocolos semelhantes utilizando solução fisiológica 0,9% m/V em equivalente ao obtido para os grupos experimentais.

3.5 Teste do nado forçado (TNF)

Para este teste comportamental foram utilizados os seguintes grupos: grupo 1 que foram tratados com dexametasona de maneira crônica, ou, simplesmente, dexametasona, grupo 2 como sham dexametasona (animais controle tratados com solução fisiológica), grupo 3 como controle negativo (animais ingênuos), grupo 4 como controle positivo (animais já submetidos ao TNF), grupo 5 que foram tratados com fluoxetina, e grupo 6 que foram tratados com fluoxetina e dexametasona, concomitantemente.

O padrão do TNF foi executado conforme Lucki (1997). Os ratos foram testados em cilindros de PVC preto (50 cm x 22 cm), com água a 30 cm de profundidade e temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo 15 minutos para cada animal (Figura 15). Ao fim do teste, o animal era tirado do cilindro e secado com um pano. Entre cada teste, a água do cilindro era trocada, após a limpeza com álcool (70%). Os ratos foram filmados para o registro comportamental e gravados em computador. Foi contado o tempo perdido em cada um dos seguintes comportamentos: flutuação (completa imobilidade ou movimentos suaves, apenas o suficiente para manter o nariz/cabeça acima da superfície da água); escalada (movimentos vigorosos com as patas dianteiras acima da superfície da água ou contra a parede do cilindro); natação (o animal se movimenta dentro do cilindro com o corpo na horizontal, sem quebrar a superfície da água com as patas dianteiras. Também foi considerado natação quando o animal manteve o corpo abaixo da superfície da água). Tudo foi registrado por um observador treinado, que computou duas vezes uma amostra de sessões, obtendo concordância intra-observador acima de 85%.

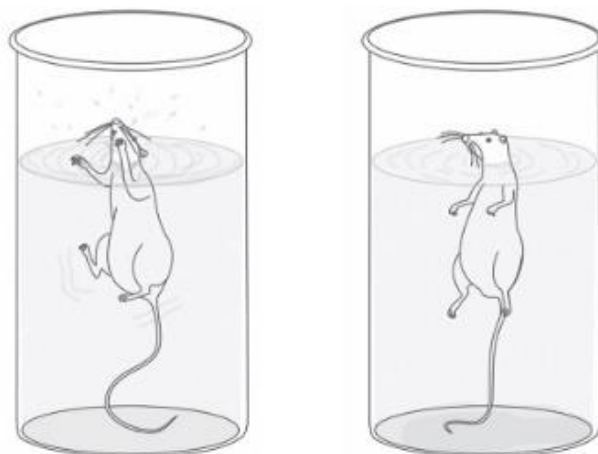


Figura 15: Teste do Nado Forçado (TNF).
Fonte: Abelaira, Réus & Quevedo, 2013.

3.6 Análise de dados

Para as análises dos sinais adquiridos uma ferramenta foi construída usando a linguagem de programação Python versão 2.7. As bibliotecas Numpy e Scipy foram usadas para o processamento matemático e a biblioteca Matplotlib para os gráficos. A interface gráfica foi desenvolvida utilizando a biblioteca PyQt4.

Os gráficos de amplitude demonstram a diferença de potencial entre os eletrodos de referência e de registro. Nos sinais foram observadas 1000 amostras por segundo. Os espectrogramas foram calculados usando uma janela de Hamming com 256 pontos (256/1000 segundos), cada quadro foi gerado com uma sobreposição de 128 pontos por janela. Para cada quadro a densidade de potência espectral (PSD) foi calculada pelo método peridograma média de Welch. O histograma de frequência foi gerado pelo primeiro cálculo do PSD do sinal usando a janela de Hamming com 256 pontos, sem sobreposição, com o PSD, resultando um histograma construído com caixas de 1,0 Hz. Para analisar a diferença entre os experimentos, um gráfico com a média e desvio padrão de PSD de vários experimentos foi construído, cada onda do gráfico foi gerada a partir de um conjunto de testes, onde o PSD foi gerado e calculado a média e o desvio padrão de cada grupo, para o cálculo da janela PSD Hamming foi usado 256 pontos sem sobreposição.

3.7 Análise estatística

As comparações dos valores de potência foram feitas usando o teste t não-paramétrico e não pareado usando um software GraphPad Prism ® 5. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 Resultados

4.1 Análise eletrocorticográfica dos grupos controle agudo e dexametasona agudo

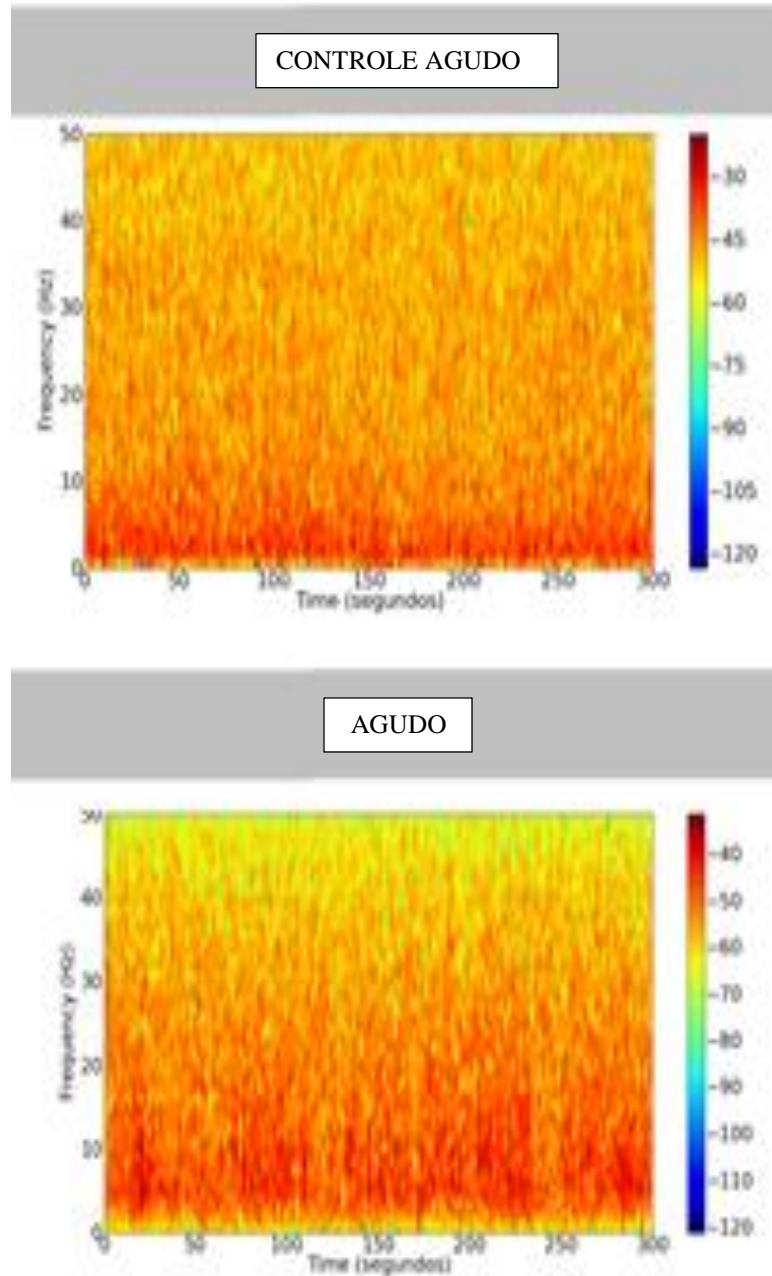


Figura 16: Representação de distribuição de energia no espectrograma após a administração aguda de dexametasona obtido dos grupos de animais controle agudo e agudo (nove ratos cada) após dose aguda (24 h) 4 mg/kg *i.p.* de dexametasona. Frequências entre 0 e 50 Hz ($p < 0,05$).

4.2 Análise eletrocorticográfica dos grupos controle crônico e dexametasona crônico ou dexametasona

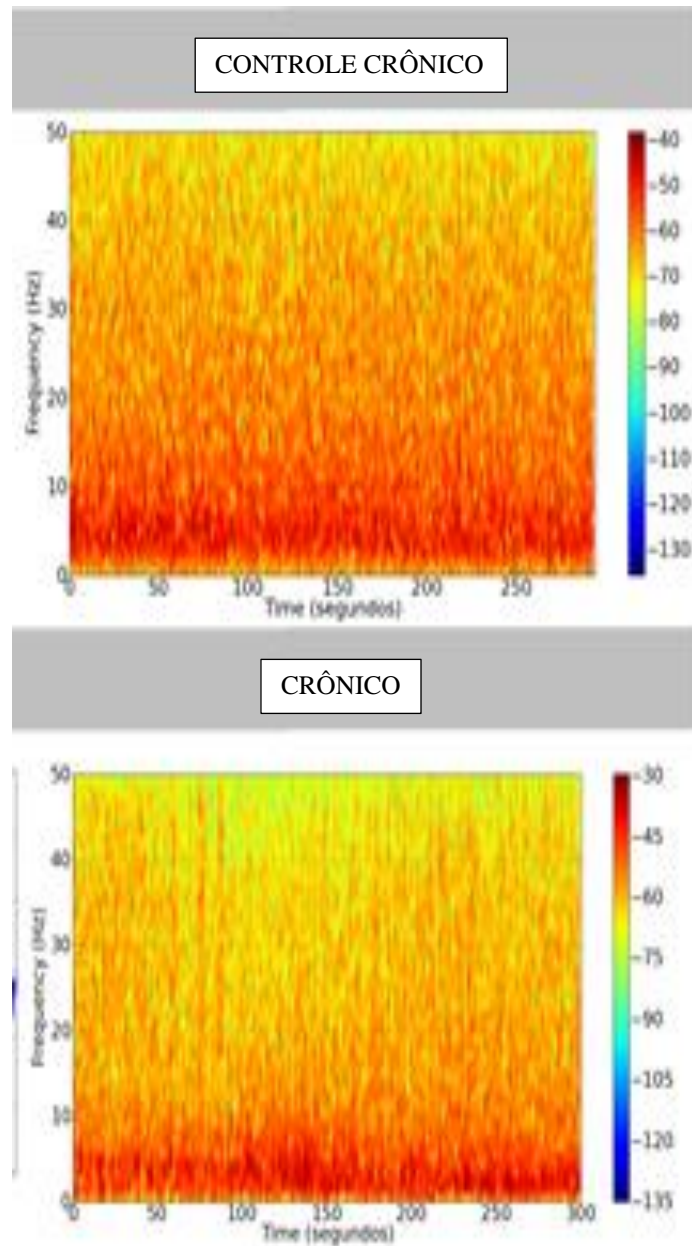


Figura 17: Representação de distribuição de energia no espectrograma após a administração crônica de dexametasona obtido dos grupos de animais grupos controle crônico e dexametasona ou crônico (nove ratos cada) após dose crônica de dexametasona (sete dias), 4 mg/kg *i.p.* Frequências entre 0 e 50 Hz ($p < 0,05$).

No estado basal se tem o espectrograma dos animais agudos e já na primeira dose de dexametasona pode ser observada a distribuição de energia no espectrograma em uma condição aguda (Figura 16). Após a utilização de dexametasona por um período de sete dias os animais apresentaram diferenças mais marcantes no espectrograma que demonstra distribuição de

energia em frequências mais baixas no cérebro em depressão devido ao uso prolongado de GC (Figura 17).

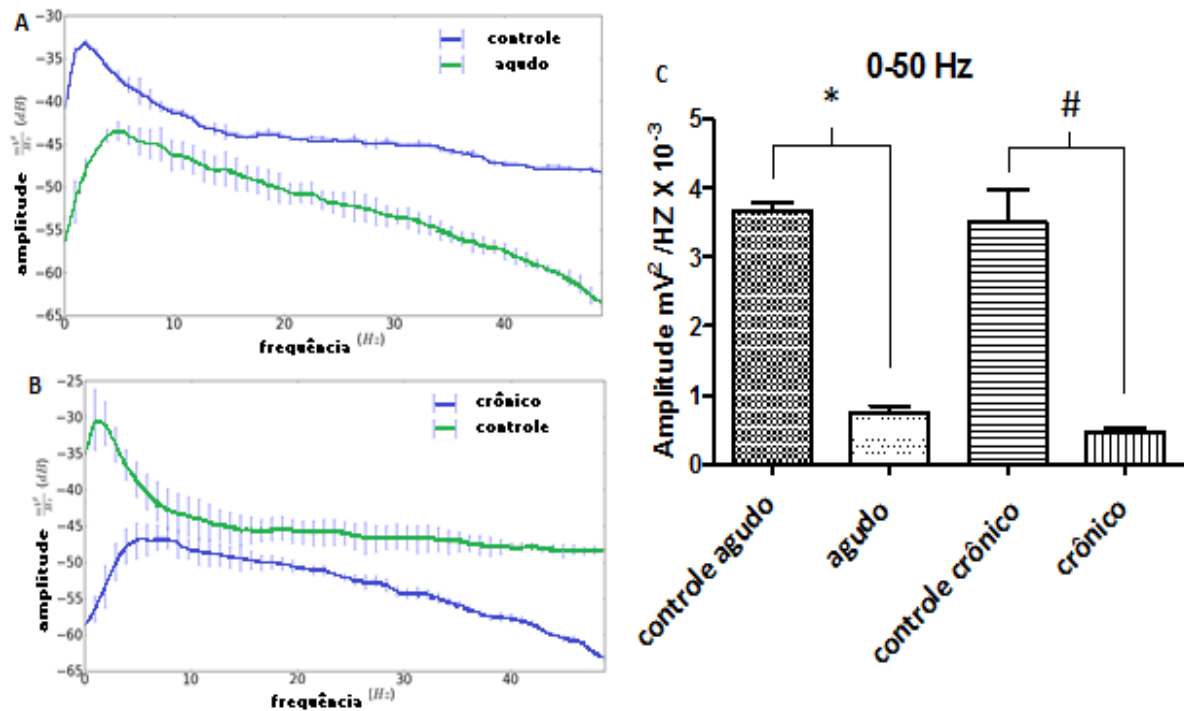


Figura 18: Gráficos comparativos entre os grupos dexametasona (agudo e crônico) e controles. Para $p < 0,05$. Em A temos a comparação das forças cerebrais dos grupos dexametasona agudo e controle agudo, evidenciando menores médias de amplitudes para o grupo agudo (0 a 50 Hz). Em B temos a comparação das forças cerebrais dos grupos dexametasona crônico e controle crônico, onde também é apresentado menores médias de amplitudes para o grupo crônico (0 a 50 Hz). Em C * Indica comparação entre os grupos controle agudo ($3,672 \pm 0,3482 mV^2/Hz \times 10^{-3}$) e agudo ($0,7549 \pm 0,2427 mV^2/Hz \times 10^{-3}$), ocorrendo diminuição nas amplitudes cerebrais do grupo agudo, # Indica comparação entre os grupos controle crônico ($3,498 \pm 1,269 mV^2/Hz \times 10^{-3}$) e crônico ($0,4557 \pm 0,1737 mV^2/Hz \times 10^{-3}$), que também demonstra a diminuição nas amplitudes cerebrais do grupo crônico.

O gráfico de distribuição de frequência demonstra que ocorre alterações compatíveis com o funcionamento cerebral depressivo com animais após o contato agudo com GC, demonstrando menores médias de amplitudes nas frequências correspondentes (Figura 18 A). O gráfico de distribuição de frequência utilizando doses crônicas de GC demonstraram diminuição de amplitude das forças cerebrais quando comparados com o grupo controle em que foi administrado solução fisiológica no volume equivalente ao da dexametasona. Na figura 18 C, são apresentados os dados de forma linear mostrando as médias de frequência acumulada para o controle do estado agudo foi de $3,672 \pm 0,3482 mV^2/Hz \times 10^{-3}$. Para o grupo em que foi administrado dexametasona de forma aguda a média de amplitude foi de $0,7549 \pm 0,2427 mV^2/Hz \times 10^{-3}$ o que demonstra diferença estatística entre os grupos indicando que ocorre diminuição nas amplitudes cerebrais após a primeira dose de dexametasona. A média de amplitude para registros eletrocorticográficos do grupo controle crônico foi de $3,498 \pm 1,269$

$\text{mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ e o grupo dexametasona crônico teve média de $0,4557 \pm 0,1737 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ demonstrando a diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (Figura 18 B). Não houve diferença estatística entre os registros electrocorticográficos quando se relacionou o uso de dexametasona de forma aguda e crônica.

4.3 Análise do espectograma e a distribuição de força nas frequências de 4 a 10 Hz (Força Theta)

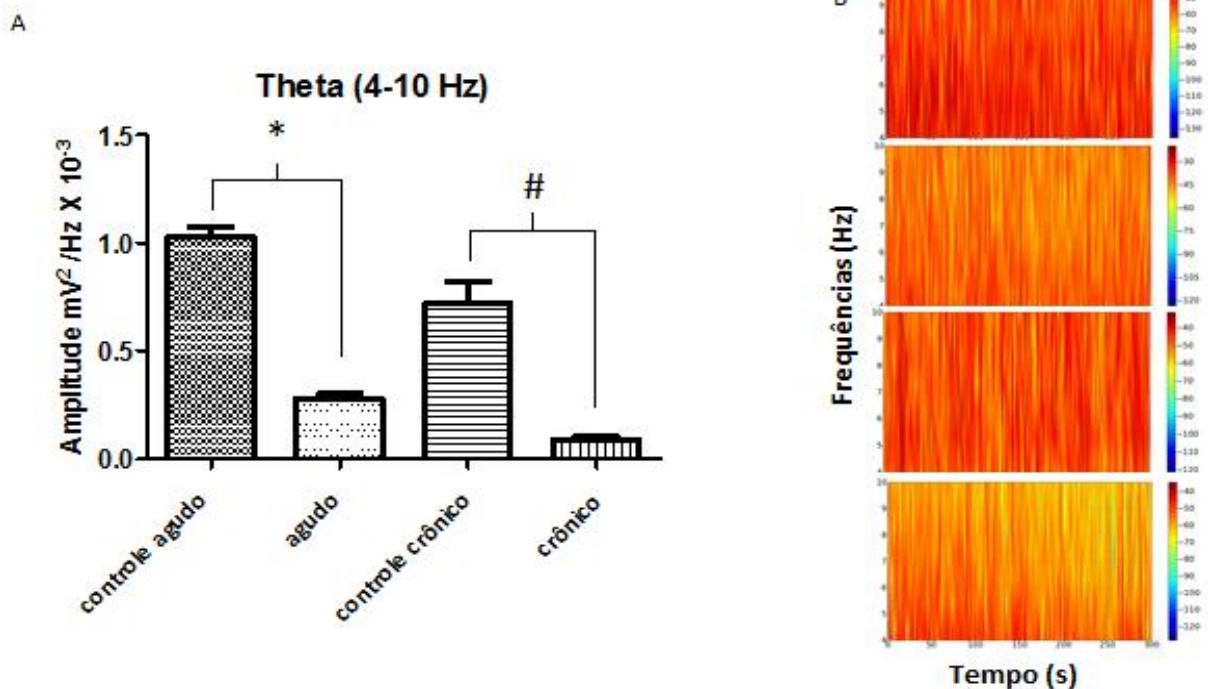


Figura 19: Força Theta e Espectograma. $p < 0,05$. Em B temos o espectograma que demonstra a distribuição de força nas frequências de 4 a 10 Hz. Em A o gráfico demonstra a amplitude nas frequências acumuladas na força Theta (4 a 10 Hz), * Indica comparação entre os grupos controle agudo ($1,031 \pm 0,1083 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e agudo ($0,2825 \pm 0,04856 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), evidenciando uma redução desta força no grupo agudo. # Indica comparação entre os grupos controle crônico ($0,7231 \pm 0,259 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e crônico ($0,09095 \pm 0,03175 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) que também evidencia uma redução desta força no grupo crônico.

Os registros electrocorticográficos apresentaram diferenças na força Theta, o controle agudo apresentou média de $1,031 \pm 0,1083 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ e a utilização aguda da dexametasona apresentou média de $0,2825 \pm 0,04856 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, esses resultados demonstraram diferenças estatisticamente positivas tendo uma redução de 72,59% em relação ao controle. Para o grupo tratado cronicamente o controle foi de $0,7231 \pm 0,259 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ e o grupo tratado cronicamente com dexametasona teve média de $0,09095 \pm 0,03175 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, o que demonstra diferença estatística em relação ao controle. Ao comparar a administração de dexametasona agudo de crônico, não houve diferenças estatísticas, porém houve uma tendência

para a diminuição da força Theta para administração crônica da dexametasona (Figura 19 A). Essa relação pode ser observada nos gráficos de distribuição de energia (Figura 19 B).

4.4 Análise do espectograma e a distribuição de força nas frequências de 20 a 50 Hz (Força Gamma)

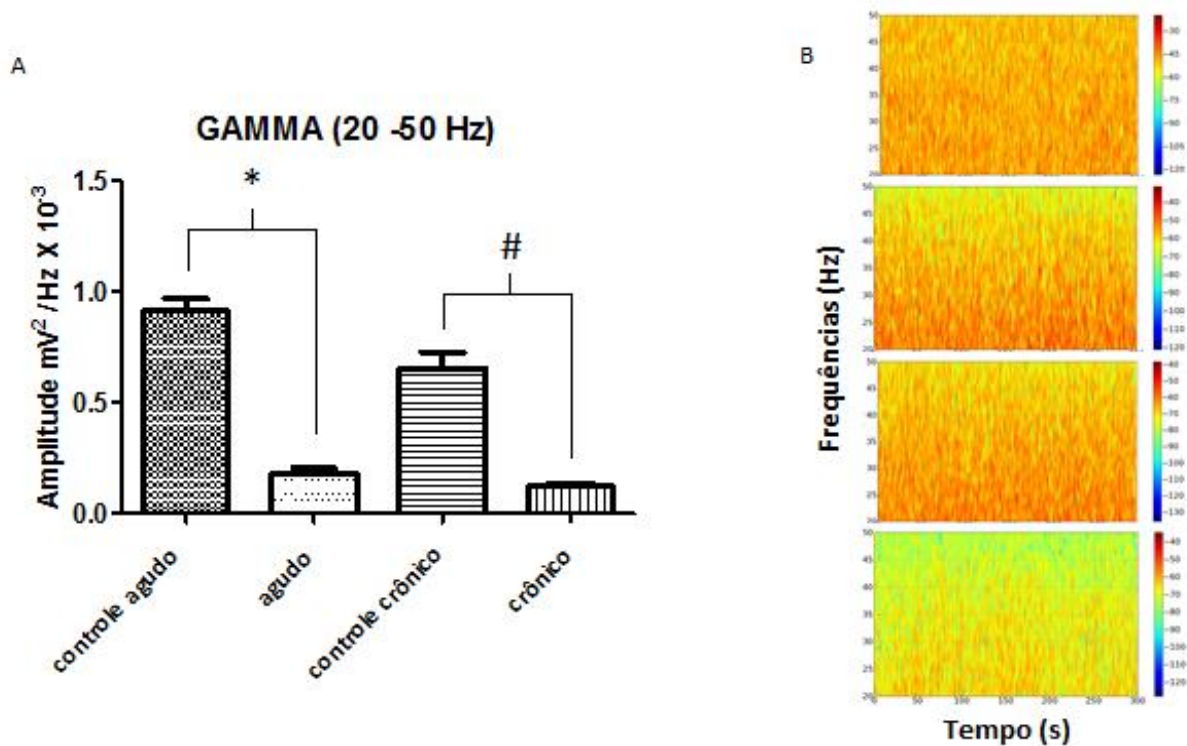


Figura 20: Força Gamma e Espectograma. $p < 0,05$. Em B temos o espectograma que demonstra a distribuição de força nas frequências de 20 a 50 Hz. Em A o gráfico demonstra a amplitude nas frequências acumuladas na força Gamma (20 a 50 Hz), * Indica comparação entre os grupos controle agudo ($0,9127 \pm 0,1525 mV^2/Hz \times 10^{-3}$) e agudo ($0,181 \pm 0,06273 mV^2/Hz \times 10^{-3}$), evidenciando uma redução desta força no grupo agudo. # Indica comparação entre os grupos controle crônico ($0,6552 \pm 0,2078 mV^2/Hz \times 10^{-3}$) e crônico ($0,1226 \pm 0,05060 mV^2/Hz \times 10^{-3}$) que também evidencia uma redução desta força no grupo crônico.

Os registros eletrocorticográficos apresentaram diferenças na força Gamma, o controle agudo apresentou média de $0,9127 \pm 0,1525 mV^2/Hz \times 10^{-3}$ e a utilização aguda da dexametasona apresentou média de $0,181 \pm 0,06273 mV^2/Hz \times 10^{-3}$, esses resultados demonstraram diferenças estatisticamente positivas tendo uma redução de 80,16% em relação ao controle. Para o grupo tratado cronicamente a média do controle foi de $0,6552 \pm 0,2078 mV^2/Hz \times 10^{-3}$ e o grupo tratado cronicamente com dexametasona apresentou média de $0,1226 \pm 0,05060 mV^2/Hz \times 10^{-3}$, o que demonstra diferença estatística em relação ao controle. Ao comparar a administração de dexametasona aguda de crônica, não houve diferenças estatísticas, porém, houve uma tendência para a diminuição da força Gamma para administração crônica da

dexametasona (Figura 20 A). Essa relação pode ser observada nos espectrogramas de distribuição de energia na Figura 20 B.

4.5 Análise do comportamento depressivo observado no TNF

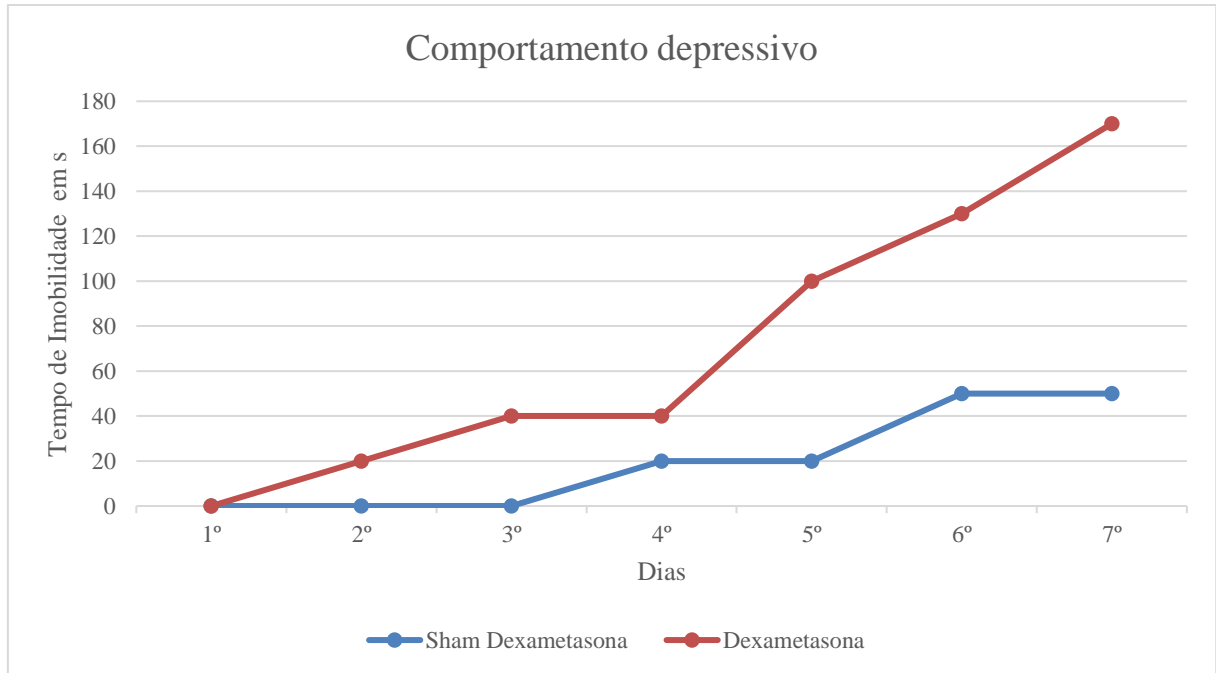


Figura 21: Comportamento depressivo. Demonstra os dias de tratamento e a constatação do comportamento depressivo no grupo controle e tratado com dexametasona, na dose de 4 mg/kg i.p., ambos os grupos com nove ratos. Há diferença estatística ao sétimo dia de $p < 0,05$.

O comportamento depressivo foi constatado nos animais submetidos à dexametasona, através de teste comportamental em nado forçado, após o tratamento de sete dias, em que os animais entraram no quadro depressivo, usando como parâmetro o tempo de imobilidade conforme literatura vigente. Desta forma foi fixado o período de sete dias de tratamento para os testes comportamentais. Também foram quantificadas as alterações eletroencefálicas dos animais submetidos à dose aguda (24 h) de tratamento e comparado com a dose crônica que corresponde a sete dias de tratamento.

4.6 Análise comportamental dos grupos controle positivo e controle negativo, dexametasona e sham dexametasona, fluoxetina e fluoxetina/dexametasona

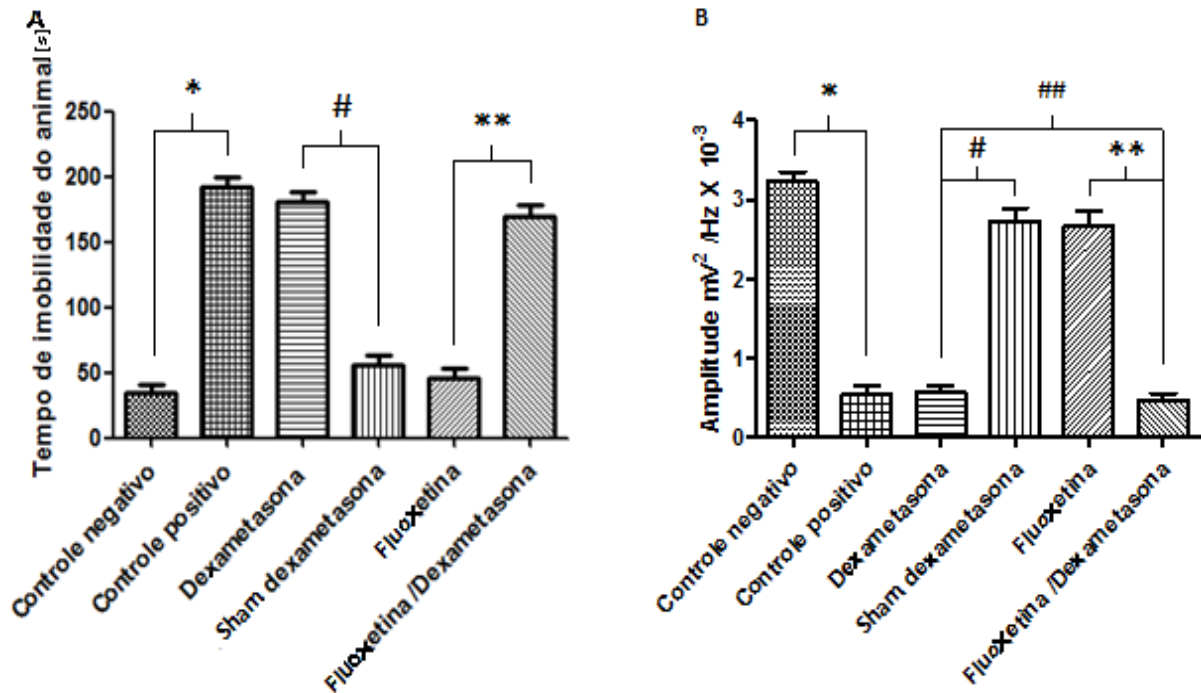


Figura 22: Gráficos dos grupos no TNF (A) e EcoG (B). $p < 0,05$. Em A * Indica comparação entre os grupos CN ($35,11 \pm 16,01s$) e CP ($191,7 \pm 23,59s$), apresentando aumento da média de imobilidade para o grupo CP, # Indica comparação entre os grupos dexametasona ($180,2 \pm 24,03s$) e sham dexametasona ($55,89 \pm 22,67s$), evidenciando aumento da média de imobilidade (depressão) para o grupo dexametasona, ** Indica comparação entre os grupos fluoxetina ($45,33 \pm 23,26s$) fluoxetina/dexametasona ($169,8 \pm 24,5s$) demonstrando aumento do tempo de imobilidade, e não reversão pela fluoxetina dos efeitos da dexametasona e do grupo fluoxetina/dexametasona. Em B temos o gráfico de amplitude para as frequências até 50 Hz (EcoG), * Indica comparação entre os grupos CN ($3,221 \pm 0,3827 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e CP ($0,5372 \pm 0,3361 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), demonstrando diferença entre o grupo deprimido (CN), com aumento da amplitude, e do grupo não deprimido (CP), pela aplicação do TNF, # Indica comparação entre os grupos dexametasona ($0,56224 \pm 0,2819 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e sham dexametasona ($2,718 \pm 0,5074 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) evidenciando uma menor amplitude do grupo dexametasona e, conseqüentemente uma atividade cerebral reduzida pelo uso crônico. ** Indica comparação entre os grupos fluoxetina ($2,661 \pm 0,5850 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e fluoxetina/dexametasona ($0,4758 \pm 0,2514 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) apresentando aumento da amplitude para o grupo fluoxetina, constatando sua ação isolada, e a amplitude diminuída do grupo fluoxetina/dexametasona mostra que a fluoxetina não reverteu a ação da dexametasona, ## mostra que não houve diferença significativa, entre as amplitudes dos grupos dexametasona ($0,56224 \pm 0,2819 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e fluoxetina/dexametasona ($0,4758 \pm 0,2514 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) evidenciando que a fluoxetina não conseguiu reverter o estado depressivo causado pela dexametasona.

O tempo de nado forçado para os animais controle negativo (animais ingênuos) teve média de tempo de imobilidade de $35,11 \pm 16,01$ segundos, os animais controle positivo apresentaram média de imobilidade de $191,7 \pm 23,59$ segundos, esse quadro de imobilidade é um indicativo de depressão. O grupo dexametasona crônico teve média de $180,2 \pm 24,03$ segundos indicando que o animal apresenta comportamento depressivo após administração crônica com dexametasona. O grupo sham dexametasona corresponde aos animais que receberam sete dias de tratamento com injeções de solução fisiológica por via *i.p.* no equivalente volume da dexametasona e indicam média de tempo de imobilidade $55,89 \pm 22,67$ segundos não demonstrou características de depressão. O grupo fluoxetina teve média de tempo de $45,33 \pm$

23,26 segundos, demonstrando que o grupo não ficou depressivo. No grupo em que se administrou dexametasona de forma crônica e se avaliou a possibilidade de reverter o quadro depressivo com a fluoxetina a média de tempo de imobilidade foi de $169,8 \pm 24,5$ segundos, indicando que a fluoxetina não teve efeito sobre a depressão ocasionada pela aplicação crônica de dexametasona (Figura 21 A).

Para análise das forças cerebrais através das amplitudes obtidas dos registros electrocorticográficos para cada grupo pode ser feita uma relação da diminuição da amplitude com quadros de depressão observados após os testes. Para o grupo controle negativo teve média de $3,221 \pm 0,3827 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, já o controle positivo indicou média de $0,5372 \pm 0,3361 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, mostrando diferença entre o grupo com comportamento depressivo e não depressivo pela aplicação do TNF. O grupo que recebeu dexametasona cronicamente apresentou média de amplitude de $0,56224 \pm 0,2819 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, o grupo submetido ao estresse de aplicação pela via *i.p.* chamado de sham dexametasona apresentou média de amplitude de $2,718 \pm 0,5074 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, a diferença entre as amplitudes comprova atividade cerebral diminuída pela dexametasona. O grupo que recebeu fluoxetina teve média de amplitude de $2,661 \pm 0,5850 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ comprovando a eficácia da fluoxetina no controle da depressão provocada pelo nado forçado. Para o grupo que recebeu dexametasona de forma crônica e fluoxetina para reverter o quadro a média de potência foi de $0,4758 \pm 0,2514 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, como não existe diferença estatística entre os grupos dexametasona e dexametasona/fluoxetina, a fluoxetina não conseguiu reverter o quadro depressivo ocasionado pela dexametasona (Figura 21B).

Alguns estudos sugerem que o TNF pode não representar um modelo fidedigno para o desenvolvimento de um quadro depressivo em modelos experimentais. Borsini and Meli (1988) e O'Neill and Valentino (1982) afirmam que a imobilidade dos animais, a qual representaria o “desespero comportamental” é representativa de um quadro de adaptabilidade dando a ideia de que esses animais “aprenderam” que é impossível escapar, ou seja, se familiarizaram com o ambiente. Entretanto, em nosso estudo refutamos tais dados diante da observação dos resultados eletrofisiológicos os quais demonstram uma diminuição das forças cerebrais características de um quadro comportamental depressivo. E, ainda, a fluoxetina não obteve o efeito esperado que seria a reversão do quadro depressivo, devido provavelmente uma alteração no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, diferente dos dados encontrados nos estudos de Borsini and Meli (1988) onde encontramos referências da ação positiva de antidepressivos em modelos animais de depressão no TNF.

4.7 Análise dos níveis de glicose e urina nos grupos controle, agudo e crônico

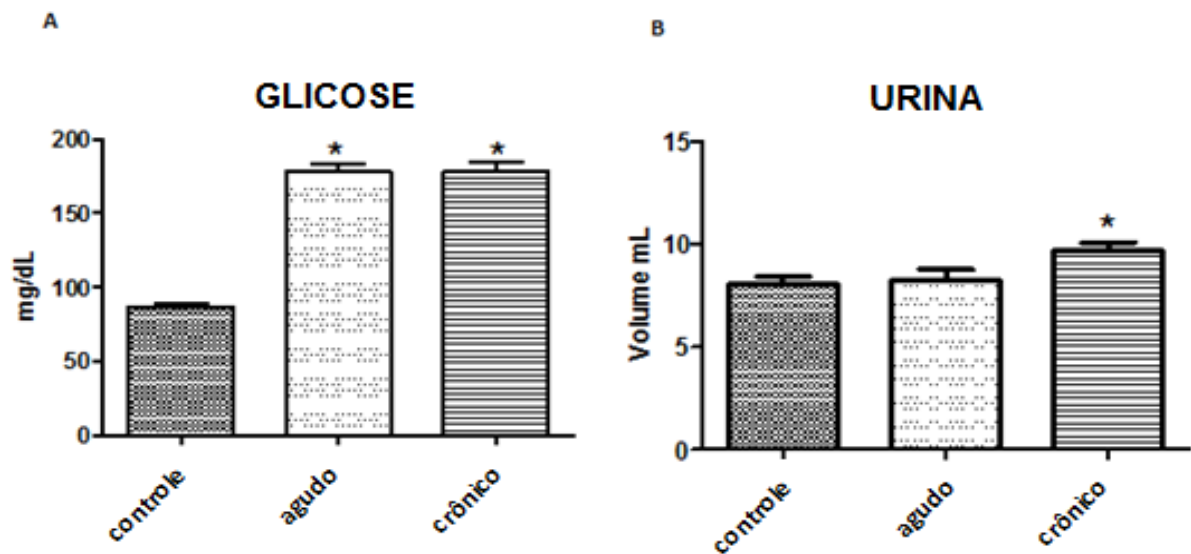


Figura 23: Glicose e Urina. $p < 0,05$. Em A * mostra o aumento nos níveis de glicose plasmática dos grupos dexametasona agudo ($178,4 \pm 15,95$ mg/dL) e crônico ($178,2 \pm 19,91$ mg/dL). E em B * mostra que houve aumento no volume urinário do grupo dexametasona crônico ($9,720 \pm 1,156$ mL).

Durante o experimento foi feita a avaliação da glicemia plasmática nos animais submetidos ao tratamento agudo e crônico. No grupo controle a média de glicemia foi de $87 \pm 5,05$ mg/dL, para os animais tratados agudamente foi de $178,4 \pm 15,95$ mg/dL, o que demonstra uma rápida elevação da glicemia plasmática após a dose de GC aplicado, para o grupo tratado cronicamente a média foi de $178,2 \pm 19,91$ mg/dL, o que comprovou diferença estatística entre o grupo controle e os grupos tratados agudo e crônico (Figura 22 A).

Também foi medido o volume de urina para os grupos. O grupo controle apresentou média de $8,110 \pm 1,050$ mL, após o tratamento de uma dose aguda de GC foi obtida a média de $8,256 \pm 1,590$ mL e para o grupo tratado cronicamente o volume médio de urina foi de $9,720 \pm 1,156$ mL. Os resultados demonstraram que durante o uso crônico de dexametasona houve aumento no volume de urina dos animais (Figura 22 B).

4.8 Uso de GC tem ação na hiperglicemia em roedores

A administração crônica de dexametasona em ratos resulta em hiperglicemia (Pinheiro *et al.*, 2009; Wang, 2005; Benatti & Lancha, 2007), sendo que outras pesquisas realizadas nas mesmas condições também mostram resultados semelhantes e que a principal alteração metabólica do excesso de cortisol é a resistência insulínica de maneira tempo-dependente

(Matos, Moreira & Guedes, 2003; Santos, Rafacho & Bosqueiro, 2007). Os GC inibem a captação de glicose pelos tecidos periféricos e estimulam a gliconeogênese e a glicogenólise, além disso, aumentam o nível plasmático de glicose e proteínas totais (Vegiopoulos & Herzig, 2007). Estudos em humanos que fazem uso crônico de GC, também apontam para hiperglicemia, resistência à insulina e intolerância à glicose (Kim, Yoo, Lee & Chung, 2011; Lasang & Hustak, 2011; American Diabetes Association, 2012; Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2013).

A avaliação da glicemia plasmática no grupo controle em comparação com os animais tratados aguda e cronicamente demonstrou uma rápida elevação da glicemia plasmática após a dose de GC aplicada (Figura 22 A). No presente estudo, foi avaliada a glicemia plasmática dos animais submetidos ao tratamento agudo e crônico de dexametasona, bem como foi medido o volume urinário que evidencia também indivíduos com sinais de hipercortisolismo apresentam um quadro de poliúria, polidipsia e polifagia (Romão & Antunes, 2012). Foram constatadas a elevação da glicemia plasmática e o aumento no volume urinário dos roedores, sendo estes resultados compatíveis com a literatura científica vigente de Pinheiro *et al.* (2009), Wang (2005), Benatti e Lancha (2007), sobre os efeitos colaterais do uso de GC e conseqüentemente da dexametasona.

4.9 Uso de GC potencializa o perfil de depressão no TNF

O tratamento GC de forma crônica modela um estado ansioso e deprimido, como constatado pelo nosso estudo em ratos. O instinto de sobrevivência animal testado no nado forçado implica que o animal depende não apenas da capacidade de responder ao estresse, mas também, de memorizar e integrar informações aprendidas para responder as demandas similares no futuro (Finsterwald; Bourdeau & Lacroix, 2015). Níveis adequados de cortisol e GC endógeno, são necessários para suprir as necessidades físicas, mas também, contribuem para a capacidade de memorização, aprendizado e performance cognitiva. Porém, em quantidade excessiva ou insuficiente prejudica tais condições (Stephens & Wand, 2012).

Em nossos resultados sugere que no grupo que utilizou dexametasona de forma crônica entrou em depressão, visto que, o tempo de imobilidade no TNF foi maior neste grupo (Figura 21 A). Semelhanças entre características de depressão/ansiedade e distúrbios associados aos níveis de GC elevados foram relatados por diversos estudos (Scheline, 1996; McEwen, 1999; Grippo *et al.*, 2005; Popa *et al.*, 2008). Este resultado é corroborado com o valor das médias de

amplitude das forças cerebrais os quais foram estatisticamente menores no grupo dexametasona após o teste de nado forçado, em contraste com o grupo que utilizou solução salina no controle e no grupo que utilizou somente fluoxetina (Figura 21 B).

No grupo dexametasona de nosso estudo que é caracterizado pelo uso crônico desta droga, pode ser comparado com vários estudos que recentemente tem confirmado que a exposição crônica aos GC induz ansiedade e depressão em roedores (Stone & Lin, 2008; Gourley *et al.*, 2008; Murray, Smith & Hutson, 2008).

Estabelecendo uma associação ao quadro humano, estudos mostram que níveis aumentados de cortisol diurno representam um fator de risco para o desenvolvimento da depressão. Seus níveis variam de acordo com as características individuais e a severidade da depressão (Dienes, Hazel & Hammen, 2013). Outra teoria levantada na literatura científica afirma que aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que envolve níveis de GC elevados é considerada uma alteração neurobiológica chave na depressão maior (Antonijevic, 2006). Essa alteração no eixo endócrino é semelhante ao modelo depressivo induzido pela aplicação exógena de GC realizada pelo nosso estudo.

Tiemensma *et al.* (2010) afirma que a depressão maior foi o distúrbio psiquiátrico mais comumente encontrado em pacientes com doença de Cushing em remissão, doença caracterizada pelo excesso de cortisol (GC endógeno) circulante no organismo, em concordância com os resultados da revisão de estudo feita descrevendo os distúrbios encontrados nos estados de hipercortisolismo de Pereira, Tiemensma e Romijn (2010). De forma semelhante, Denis (2009), em seu estudo ao usar os GC cronicamente por três semanas em ratos, constatou uma deterioração do estado revestimento, uma diminuição do comportamento de limpeza e um ritmo circadiano achatado com redução das atividades em gaiolas. Estes sintomas são semelhantes aos induzidos por estresse crônico no qual são identificados níveis elevados de cortisol (Surget *et al.*, 2008). De forma semelhante em humanos um subconjunto de doentes deprimidos com anedonia e cortisol elevado, disfunções cognitivas e distorções de negligência pessoal é relatada por Morgan, Mitchell and Jablensky (2005).

4.10 Uso de GC provoca alterações no EcoG

A exposição crônica aos GC leva a alterações estruturais e funcionais no cérebro por mecanismos ainda desconhecidos e que permanecem mesmo depois de cessado o estímulo (Tiemensma *et al.*, 2010). Essas modificações podem ser visíveis de acordo com os nossos

resultados eletrocorticográficos. Estruturas do SL como o hipocampo e a amígdala são modificadas pela exposição à grande quantidade de cortisol por causa da grande densidade de receptores de GC mineralocorticoides e por exercerem funções importantes na geração da resposta ao estresse (Burkhardt *et al.* 2015).

Os mecanismos pelos quais os GC afetam a atividade neuronal permanece desconhecido; todavia, foi sugerido que esteroides produzidos localmente no cérebro (denominados neuro-esteroides) podem regular a excitabilidade neuronal. Em modelos de roedores, a administração de doses muito altas de GC diminui a sobrevivência e a função dos neurônios do hipocampo. Em associação a essas alterações, observa-se também uma redução da memória. Em um estudo realizado em seres humanos, os níveis basais de cortisol exibiram uma correlação direta com atrofia do hipocampo e a ocorrência de déficits de memória (Laurence, Bruce & Björn, 2011). O hipocampo estrutura participante do SL está intimamente relacionado com a amígdala, estruturas essas responsáveis pelo comportamento.

Os receptores de GC, que são responsáveis pelo início da ação farmacológica dos GC tem ampla distribuição no SNC e concentram-se principalmente nas estruturas límbicas como a amígdala e o hipocampo, duas áreas relacionadas à geração de memória de situações de estresse, medo e ameaça (Finsterwald & Alberini, 2013) além de serem locais relacionados à cognição e aprendizado. Essas áreas têm comunicação por vias aferentes e eferentes com o córtex entorrinal, temporal, pré-frontal, cingulado e subículo, presentes no neocórtex e são passíveis de leitura da sua atividade elétrica através do EcoG. Indivíduos com depressão apresentam uma maior densidade de receptores GC na amígdala e hipocampo (Lucassen, Oomen, Schouten & Fitzsimons, 2016). Essas alterações estruturais e funcionais provocadas por GC podem interferir na atividade elétrica cerebral de acordo com nossos resultados, no qual há uma modificação no potencial de campo do córtex dos roedores estudados nas nossas condições experimentais com uso de dexametasona. Os receptores de GC também são encontrados nas células gliais (astrócitos e microglias) responsáveis pela resposta imune do SNC e interferem na comunicação sináptica e neuroplasticidade (Rial *et al.*, 2016). Essa interferência pode ser responsável pela modificação da atividade elétrica cerebral já que ela depende da comunicação sináptica entre dendritos e axônios e a formação de novas vias de comunicação através da neuroplasticidade.

Em nossos resultados o uso de GC nas doses aguda e crônica provocaram alterações no EcoG (Figura 18, 19 e 20). As alterações no EcoG são visíveis, já desde as forças cerebrais mais baixas (Figura 19) até a fração mais alta, fração Gamma (Figura 20), com redução das médias de amplitude nos grupos agudo e crônico. A redução das médias de amplitude nas forças

Theta e Gamma nos grupos agudo e crônico sugerem maior possibilidade de depressão nestes ratos em função do uso da dexametasona, devido às amplitudes das forças cerebrais serem compatíveis com uma atividade elétrica cerebral menor.

Há uma relação ao comparar os nossos resultados eletrocorticográficos e comportamentais (Figura 21) no qual observamos uma relação inversamente proporcional com tempo de imobilidade (Figura 21 A) com as médias de amplitude das forças cerebrais (Figura 21 B). Utilizando o TNF que é um modelo comportamental muito utilizado para a avaliação da atividade antidepressiva em roedores (Porsolt, Le Pichon & Jalfre, 1977) há muitos anos, temos uma relação inédita da redução da atividade elétrica cerebral dos roedores com o tempo de imobilidade aumentada no TNF (compatível com o comportamento depressivo), no qual temos a comprovação da alteração e redução da atividade elétrica cerebral provocada desde seu uso na forma aguda até a utilização crônica de dexametasona relacionada à potencialização do comportamento depressivo demonstrada pelo TNF.

Curiosamente, de forma recente não foram encontrados outros estudos na literatura científica que pudessem servir de comparação com nossos resultados para investigar os efeitos de GC na atividade elétrica cerebral em doses agudas e crônicas.

4.11 A fluoxetina não obteve efeito antidepressivo no TNF durante o uso de dexametasona

A ação da fluoxetina quando administrada em ratos em doses terapêuticas, e através de modestos regimes, resulta num aumento da natação e uma diminuição da imobilidade (Slattery & Cryan, 2012). Uma pesquisa mostrou que os efeitos antidepressivos da fluoxetina, como observado no TNF, não são apenas dependentes da dose, mas também diferem quando administrada de forma aguda ou cronicamente (Cryan Valentino & Lucki, 2005). Essa diferenciação da forma de administração da fluoxetina é demonstrada em nosso estudo ao ser utilizada cronicamente por sete dias obtendo seu efeito antidepressivo. De um modo geral, várias doses baixas de fluoxetina são ineficazes quando administradas de forma aguda, mas eficazes quando administradas cronicamente, normalmente por um período de 14 dias (Cryan, Valentino & Lucki, 2005). A administração crônica de 1,2 e 5 mg/kg de fluoxetina pode reduzir significativamente a imobilidade, mas quando as mesmas doses são administradas de forma aguda ou sub-crônica (três injeções durante um período de 24 horas) nenhum efeito antidepressivo é observado (Detke, Johnson & Lucki, 1997). Em relação ao nosso estudo temos a constatação do efeito antidepressivo utilizando a dose de 5 mg/kg.

Como os resultados da ação da fluoxetina verificados no TNF para avaliar depende da dose e a forma de administração, comparamos nossos resultados com o estudo semelhante de Denis (2009), no qual temos em seus resultados a reversão da depressão com fluoxetina após o uso crônico de GC, usando corticosterona (5 mg/kg) por 4 semanas seguido por 3 semanas de fluoxetina (18 mg/kg/dia) no qual foi revertido o estado depressivo de ratos confirmados por testes como campo aberto e nado forçado. Essa diferença de resultados pode ser explicada pela diferença de materiais e métodos utilizados nos dois estudos. O GC utilizado no nosso estudo foi a dexametasona em alta dose definida por cálculo alométrico (4 mg/dia), por via intraperitoneal por sete dias, como também o uso concomitante de fluoxetina (5 mg/kg) desde o primeiro dia de tratamento com dexametasona por também sete dias. A dexametasona tem um potencial GC maior que a corticosterona e é a que mais interfere no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal sendo sua ação dependente da dose e duração do tratamento.

A utilização de GC como a dexametasona tem ação antidepressiva no SNC e a ação antidepressiva dos ISRS como a fluoxetina não tem efeito terapêutico em roedores quando administrados concomitantes com os GC, sendo essa relação evidenciada em nossos estudos (Figura 21). Diferentemente do estudo de Denis (2009) que utilizou corticosterona seguida de fluoxetina, sugere-se que esta diferença é evidenciada pela diferença entre nossos estudos devido à utilização de GC diferentes e tempo de administração, já que essas drogas possuem metabolização e excreção diferentes. A interação farmacológica que ocorre entre a dexametasona e a fluoxetina quando utilizadas ao mesmo tempo pode ser explicada pela ação nuclear dos GC ao ligarem-se a proteínas receptoras específicas os tecidos-alvo para regular a expressão dos genes responsivos aos GC, modificando, assim, os níveis e o conjunto de proteínas sintetizadas pelos vários tecidos-alvo, entre eles o do SNC. Após a ligação do ligante, os receptores de GC dissociam-se de suas proteínas associadas e dirigem-se até o núcleo, onde interage com sequências específicas do DNA dentro das regiões reguladoras dos genes afetados. Os mecanismos pelos quais os receptores de GC ativam ou regulam negativamente a transcrição são complexos e não estão totalmente elucidados (Laurence, Bruce & Björn, 2011). Já em relação aos efeitos dos fármacos ISRS evocam mecanismos adaptativos ou reguladores que aumentam a eficácia da terapia. Estas respostas incluem aumento da densidade ou sensibilidade do receptor adrenérgico, aumento do acoplamento receptor-proteína G e a sinalização de nucleotídeos cíclicos, indução de fatores neurotróficos e aumento da neurogênese no hipocampo (Schmidt & Duman, 2007). Os efeitos antidepressivos persistentes dependem da inibição contínua de transportadores de 5-HT ou aumento da neurotransmissão serotoninérgica alcançada por um mecanismo farmacológico alternativo (Benmansour, Cecchi & Morilak,

1999; Zhao, Baros & Zhang, 2008), resultando em mais 5-HT residente na sinapse durante um longo período de tempo. Uma evidência convincente sugere que a sinalização contínua através de 5-HT aumenta a expressão de determinados produtos de genes a jusante, em particular o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que parece estar relacionado com o mecanismo final da ação desses fármacos (Sen, Duman & Sanacora, 2008). Essa produção de fatores a jusante de genes é que pode estar prejudicada com a utilização concomitante de GC, assim como, a síntese de receptores de 5-HT e suas proteínas carreadoras, já que foi demonstrado que a ação de GC é nuclear e regula negativamente a transcrição gênica, assim como, consequentemente, a atividade neuronal responsável pelo comportamento, humor e memória.

Infelizmente, nem as teorias anteriores de sub-regulação dos receptores monoaminérgicos e sinalização alterada nem as teorias atuais de neurogênese e modulação de fatores neurotróficos levou ainda a novos tratamentos antidepressivos. Os receptores do glutamato, neurocinina, hormônio de liberação da corticotropina e cíclicos e nucleotídeo cíclico fosfodiesterases podem ser alvos potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos (O'donnell & Zhang, 2004; Rakofsky, Holtzheimer & Nemeroff, 2009; Witkin, Marek, Johnson & Schoepp, 2007; Zarate, Singh & Carlson, 2006).

5 Discussão

O uso de GC provoca alterações no EcoG nas doses aguda e crônica sugerindo maior possibilidade de depressão nestes ratos em função do uso da dexametasona devido às faixas das forças cerebrais serem compatíveis com uma atividade cerebral menor.

O uso de GC causa depressão no TNF devido ao uso de dexametasona em nosso estudo, visto que, o tempo de imobilidade no TNF ter sido maior neste grupo.

A fluoxetina não obteve efeito antidepressivo no TNF após o uso de dexametasona mostrando que seus efeitos antidepressivos, como observado no TNF, não são apenas dependentes da dose, mas diferem quando administrada de forma aguda ou cronicamente e administração concomitante com GC.

O uso de GC causa hiperglicemia nos animais tratados agudamente e cronicamente demonstrando uma elevação da glicemia plasmática após uso de GC.

6 Considerações finais

A fluoxetina, classificada como um medicamento antidepressivo do tipo ISRS, deveria agir na reversão do quadro comportamental depressivo induzido nos modelos experimentais desse trabalho, inibindo a recaptação de serotonina na fenda sináptica realizada pelos receptores 5-HT. Entretanto, concluímos em nosso trabalho que sua ação foi anulada devido a uma possível alteração no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal o qual estaria envolvido na dessensibilização do receptor 5-HT_{1A}, localizado no corpo celular da célula pré-sináptica, ocasionando a recaptação de serotonina presente na fenda sináptica.

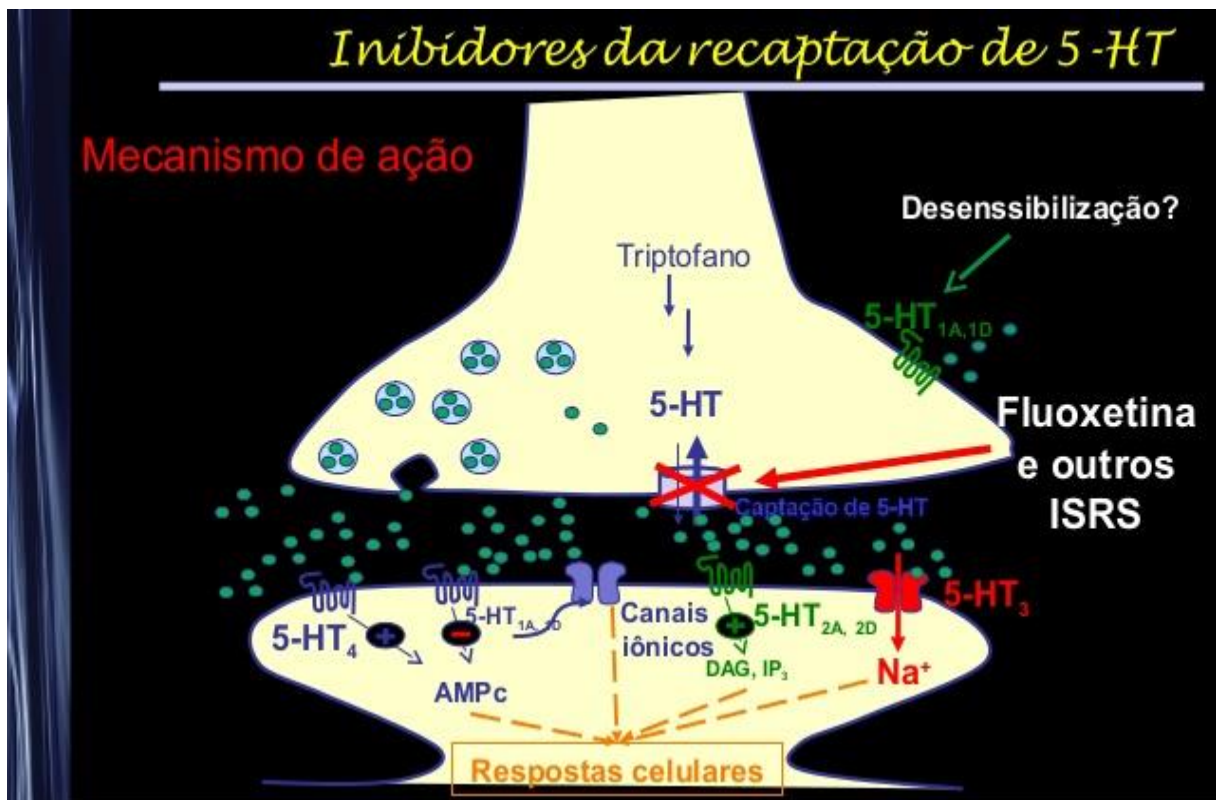


Figura 24: Representação esquemática da nulidade da ação da fluoxetina.

Referências

- Abelaira, H. M., Réus, G. Z. & Quevedo, J. (2013). Animal Models As Tools To Study The Pathophysiology Of Depression. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. Vol.35, S.2, p.112-120.
- Alheira, F. V. (2005). O Papel Dos Glicocorticoides Na Expressão Dos Sintomas De Humor – Uma Revisão. *Revista de Psiquiatria Do Rio Grande Do Sul*, Vol.27, n.2, p.177-186.
- American Diabetes Association: Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus. (2012). *Diabetes Care*. n.35, S.1, p.64-71.
- Andrade, R. V. & Silva, A. F. (2003). Atuação Dos Neurotransmissores Na Depressão. *Revista Ciências Farmacêuticas*. Vol.1, n.1.
- Antonijevic, I. A. (2006). Depressive Disorders – Is It Time To Endorse Different Pathophysiologies. *Psychoneuroendocrinology*. Vol.31, p.1-15.
- Ardayfio, P. & Kim, K. S. (2006). Anxiogenic-Like Effect Of Chronic Corticosterone In The Light-Dark Emergence Task In Mice. *Behav Neurosci*. Vol.120, p.249-256.
- Barreto, J. E. F. & Silva, L. P. (2010). Sistema Límbico E As Emoções – Uma Revisão Anatômica. *Revista Neurociências*. Vol.18, N.3, p.386-394.
- Barros, J. A. A. C. A (1982). *Medicalização Da Clientela Previdenciária*. [Dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo.
- Barros, M. B. A. (1983). *Saúde E Classe Social: Um Estudo Sobre Morbidade e Consumo De Medicamentos* [Tese]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade De Medicina – USP.
- Benmansour, S., Cecchi, M. & Morilak, D. A. (1999). Effects Of Chronic Antidepressant Treatments On Serotonina Transporter Function, Density And Mrna Level. *J Neurosci*. Vol. 19, p.10494-10501.

- Benatti, F. B. & Lancha, A. H. (2007). Leptina e Exercício Físico Aeróbio: Implicações Da Adiposidade Corporal E Insulina. *Rev Bras Med Esporte*, Vol. 13, n.4.
- Borsini, F. & Meli, A. (1988). Is The Forced Swimming Test A Suitable Model For Revealing Antidepressant Activity. *Psychopharmacology*, Vol.94, p.147-160.
- Boscaro, M. & Arnaldi, G. (2009). Approach To The Patient With Possible Cushing's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(9):3121–3131.
- Boscaro, M., Barzon, L. & Sonino, N. (2000). The Diagnosis Of Cushing's Syndrome Atypical Presentations And Laboratory Shortcomings. *Arch Intern Med.*, 160(20):3045-3053.
- Burkhardt, et al. (2015). Hippocampal And Cerebellar Atrophy In Patients With Cushing's Disease. *Neurosurg Focus*. Vol. 39.
- Burkhardt, J. M., Taskin, A. A., Zahedi, R. P. & Vögtle, F. N. (2015). Quantitative Profiling Forr Substrates Of The Mithochondrial Presequence Processing Protease Reveals A Set Of Nonsubstrate Proteins Increased Upon Proteotoxic Stress. *J Proteome. Res.*Vol.14, n.11, p.4550 – 4563.
- Cardoso, R. T. & Palma, I. M. (2009). Cortex Supra-Renal: Anatomia, Embriologia E Fisiologia. *Revista Portuguesa De Endocrinologia, Diabetes E Metabolismo*, 1: 71 – 76.
- Carlini, E. A. (2009). Fluoxetina: Indícios De Uso Inadequado. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*. Vol. 58, n.2, p. 97-100.
- Constanzo, L. S. (2007). *Fisiologia*. 3 Ed. Rio de Janeiro, Elsevier.
- Cortez, C. M. & Silva, D. (2007). Implicações Do Estresse Sobre A Saúde E A Doença Mental. *Arquivos Catarinenses de Medicina* Vol. 36, No. 4.
- Cowen, P. J. (2002). Cortisol, Serotonina Na Depression: All Stressed Out. *J Psyquitary*. Vol.180, p.99-100.
- Cruz-Topete, D. & Cidlowski, J. A. (2015). One Hormone Two Actions: Anti And Pro-Inflammatory Effects Of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 22(0): 20-32.

- Cryan J. F. & Lucki, I. (2000). Antidepressant-Like Behavioral Effects Mediated By 5-Hydroxytryptamine 2C Receptors. E-*The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. Vol.295, p.1120-1126. Retrieved from <http://jpet.aspetjournals.org/content/295/3/1120.long>.
- Cryan, J. F., Page, M. E. & Lucki, I. (2002). Noradrenergic Lesions Differentially Alter The Antidepressant-Like Effects Of Reboxetine In A Modified Forced Swim Test. E-*European Journal Of Pharmacology*, Vol. 436, p.197-205. Retrieved from <http://neurobio.drexel.edu/pageweb/ejp.pdf>.
- Cryan, J. F., Valentino, R. J. & Lucki, I. (2005) Assessing Substrates Underlying The Behavioral Effects Of Antidepressants Using The Modified Rat Forced Swimming Test. *Neuroscience And Biobehavioral Reviews*. Vol.29, p.547-569.
- Damiani, D., Kuperman, H., Dichtchekian, V., Della-Manna, T. & Setian, N. (2001). Corticoterapia E Suas Repercussões: A Relação Risco-Benefício. *Pediatria*, São Paulo, n.1, p.71-82.
- Deitos, F., Copette, F. R., Pasqualotto, A. C., Segat, F. M., Santos, R. P. & Guillande, S. (1999). Antidepressivos E Seus Efeitos Colaterais, Quais São E Como Reconhecê-los. E-*Revista Brasileira De Clínica Terapêutica*. Vol.25, p.62-70. Retrieve from <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&idmateria=1354>
- Denis, J. D. (2009). Behavioral Effects Of Fluoxetine In An Animal Model Anxiety/Depression Are Mediated By Both Neurogenesis-Dependent And Independent Mechanisms. *Neuro*, Vol.62, n.4, p.479-493.
- Detke, M. J., Johnson, J. & Lucki, I. (1997). Acute And Chronic Antidepressant Drug Treatment In The Rat Forced Swimming Test Model Of Depression. *Experimental And Clinical Psychopharmacology*. Vol.5, n.2, p. 107-112.

- Edwards, J. C. (1995) Drug Choice In Depression. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Or Tricyclic Antidepressants. *Cns Drugs*. Vol.4, p.141-159.
- Dienes, K.A., Hazel, N.A. & Hammen, C.L. (2013). Cortisol Secretion In Depressed And At-Risk Adults. *Psychoneuroendocrinology*, 38 (6), 927-940.
- Douglas, C.R. (2002). *Tratado de Fisiologia*. 5 Ed. Robe Editorial, SP.
- Duvvuri, V., Bailer, U. F. & Kaye, W. H. (2010). Altered Serotonin Function In Anorexia And Bulimia Nervosa. In C. P. Müller & B. L. Jacobs (Eds.), *Handbook Of The Behavioral Neurobiology Of Serotonin*. London, Uk: Elsevier. p.715-729.
- Egeland, M., Warner-Schmidt, J., Greengard, P. & Svenningsson, P. (2010). Neurogenic Effects Of Fluoxetine Are Attenuated In P11 (S100a10) Knockout Mice. *Biological Psychiatry*, 67, 1048-1056.
- Feijó, F. M. & Bertoluci, M. C. (2011). Serotonina E Controle Hipotalâmico Da Fome: Uma Revisão. *Rev Assoc Med Bras*. Vol.57, n.1, p.74-77.
- Finsterwald, C. & Alberini, C. M. (2013). Stress And Glucocorticoid Receptor-Dependent Mechanisms In Long-Term Memory: From Adaptive Responses To Psychopathologies. *Neurobiology Of Learning And Memory*, 112.
- Finsterwald, N. E., Bourdeau, I. & Lacroix, A. (2015). Multiple Aberrant Hormone Receptors In Cushing's Syndrome. *Journal Of Endocrinology*. 173.
- Fleck, M. P. & Berlim, M. T. (2009). Revisão Das Diretrizes Da Associação Médica Brasileira Para O Tratamento Da Depressão. *Revista Brasileira De Psiquiatria*. vol.31, s.1.
- Fox, S.I. (2007). *Fisiologia Humana*. 7 Ed. SP, Manole.
- Frazer, A. & Hensler, J. G. (1993). *Serotonin. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, And Medical Aspects*. Raven Press Ltd, Cap. 13, 5ª Edition.
- Gardner, G. D. & Shoback, D. (2013). *Endocrinologia Básica Clínica De Greenspan*. 9ª Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 879.

- Geer, E. B., Islam, J. & Buettner, C. (2014). Mechanisms Of Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance: Focus On Adipose Tissue Function And Lipid Metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 43(1): 75–102.
- Giordano, C.; Guarnotta, V.; Pivonello, R.; Amato, M. C.; Simeoli, C.; Ciresi, A.; Cozzolino, A. & Colao, A. (2014). Is Diabetes In Cushing's Syndrome Only A Consequence Of Hypercortisolism? *European Journal Of Endocrinology*, 170, 311-319.
- Golan, D. E. (2009). *Princípios De Farmacologia: A Base Fisiopatológica Da Farmacoterapia.* 3ª Ed., RJ: Guanabara Koogan, p.186-202.
- Gonzalez- Gonzalez et al. (2013). Hyperglycemia Related To High-Dose Glucocorticoid Use In Non Critically Ill Patients. *Diabetol. Metab. Syndr.* Vol.5, n.18.
- Gourley, S. L., Wu, F. J., Kiraly, D. D., Ploski, J. E., Kedves, A. T., Duman, R. S. & Taylor, J. R. (2008). Regionally Specific Regulation Of Erk Map Kinase In A Model Of Antidepressant-Sensitive Chronic Depression. *Biological Psychiatry.* Vol.63, p.353-359.
- Grippe, A. J., Sullivan, N. R., Damjanoska, K. J., Crane, J. W., Carrasco, G. A., Shi, J., ... Van De Kar, L. D. (2005). Chronic Mild Stress Induces Behavioral And Physiological Changes And May Alter Serotonin 1a Receptor Function, In Male An Cycling Female Rats. *Psychopharmacology.* Vol.179, p.769-780.
- Guyton, A.C. & Hall, J. E. (2011). *Tratado de Fisiologia Médica.* 12 Ed. Edit. Elsevier.
- Kapczinski, F., Quevedo, J., Izquierdo, I. & Col. (2011). Bases Biológicas Dos Transtornos Psiquiátricos: Uma Abordagem Translacional. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, p.99-112.
- Katzung, B. G. (2010). *Farmacologia Básica E Clínica.* 10ª Ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, p.3590-370, 521-540.
- Keszthelyi, D., Troost, F. J. & Masclee, A. A. M. (2009). Understanding The Role Of Tryptophan And Serotonin Metabolism In Gastrointestinal Function. *Neurogastroenterol Motil*, 21, 1239–1249.

- Kim, S. Y., Yoo, C. G., Lee, C. T., Chung, H. S. et al. (2011). Incidence And Risk Factors Of Steroid-Induced Diabetes In Patients With Respiratory Disease. *J. Korean. Med. Sci.* Vol.26, n.2, p.264-7.
- Kolaczynski, J. W., Goldstein, B. J. & Considine, R. V. (1997). Dexamethasone, Ob Gene, And Leptin In Humans; Effect Of Exogenous Hyperinsulinemia. *Jce & M*, Vol 82 No 11.
- Lansang, M. C. (2011). Glucocorticoid-induced Diabetes And Adrenal Suppression: How To Detect And Manage Them. *Cleve. Clin. J. Med.*, Vol.78, n.11, P.748-56.
- Laurence, L. B., Bruce, A. C.; & Björn, C. K. (2011). *As Bases Farmacológicas Da Terapêutica De Goodman & Gilman*. 12^a Ed., The Mcgraw-Hill Companies, New York.
- Leite, C. E., Nunes, F. B., Pires, M. G. S., Lunardelli, A., Lhulier, F. R., Martins, M. R. & Oliveira, J. R. (2007). Influência Do Uso Continuado De Fluoxetina Nas Dosagens Séricas De Prolactina Em Mulheres. *E-Revista Brasileira De Análises Clínicas*, Vol.39, p.283-285.2007. Retrieve From <http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac390410.pdf>
- Lerario, D. D. G., Ferreira, S.R.G., Miranda, W.L. & Chacra, A.R. (2001). Influence Of Dexamethasone And Weight Loss On The Regulation Of Serum Leptin Levels In Obese Individuals. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, 34: 479-487.
- Longui, C. A. (2007). Glucocorticoid Therapy: Minimizing Side Effects. *J. Pediatr.* (Rio J.) Vol.83 No.5 Suppl.163-171. Porto Alegre.
- Lordelo, R. A., Mancini, M. C., Cercato, C. & Halpern, A. (2007). Eixos Hormonais Na Obesidade: Causa Ou Efeito? *Arq Bras Endocrinol Metab*, 51/1.
- Lucassen, P. J., Oomen, C. A., Schouten, M. & Fitzsimons, C. P. (2016). *Adult Neurogenesis In The Hippocampus*, Chapter: 8, Publisher: Elsevier, Editors: J Canales, p.177-206.
- Lucki, I. (1997). The Forced Swimming Test As A Model For Core And Component Behavioral Effects Of Antidepressant Drugs. *Behavioral Pharmacology*, 8, 523–532.

- Matos, A. F. G., Moreira, R. O. & Guedes, E. P. (2003). Aspectos Neuroendócrinos Da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Endocrinol. Metab.* Vol.47, N.4.
- Mcewen, B. S. (1999). Stress And Hippocampal Plasticity. *Annu Rev Neurosci.* Vol.22, p.105-122.
- Moreno, R. A., Moreno, D. H. & Soares, M. B. M. (1999). **Psicofarmacologia De Antidepressivos.** *Revista Brasileira De Psiquiatria,* Vol.21, P.24-40.
- Morgan, V. A., Mitchell, P. B. & Jablensky, A. V. (2005). The Epidemiology Of Bipolar Disorder: Sociodemographic, Disability And Service Utilization Data From The Australian National Study Of Low Prevalence (Psychotic) Disorders. *Bipolar Disord.* Vol.7, p.326-337.
- Münzberg, H., Flier, J. S. & Bjørbæk, C. (2004). Region-Specific Leptin Resistance Within The Hypothalamus Of Diet-Induced Obese Mice. *Endocrinology,* 145(11):4880–4889.
- Murphy, D. L., Zohar, J., Benkelfat, C., Pato, M. T., Pigott, T. A. & Insel, T. R. (1989). Obsessive-Compulsive Disorder As A 5-Ht Subsystem-Related Behavioral Disorder. *Brit J Psychiatry.* 155:15 – 24.
- Murray, F., Smith, D. W. & Hutson, P. H. (2008). Chronic Low Dose Corticosterone Exposure Decreased Hippocampal Cell Proliferation, Volume And Induced Anxiety And Depression Like Behaviours In Mice. *Eur. J. Pharmacol.* Vol.583, p.115-127.
- Negrão, A. B. (2000). Leptina: O Diálogo Entre Adipócitos E Neurônios. *Arq Bras Endocrinol Metab* Vol. 44, n.3.
- O'Donnel, J. M. & Zhang, H. T. (2004). Antidepressant Effects Of Inhibitors Of cAMPphosphodiesterase (PDE4). *Trends Pharmacol. Sci.* Vol.25, p.158-163.
- O'Neill, K. A. & Valentino, D. (1982). Escapability and generalization: effect on 'behavioral despair' *European Journal of Pharmacology,* 78 379-380.

- O'Shea, B. (1991). Antidepressants: User And Attitudes Among Consultant Psychiatrists. *Br. J. Psychosocial Med.* Vol.8, p.167-170.
- Pavão, R. & Cheixas-Dias, S. (2010). Identificação Computadorizada De Crises Tipo Ausência No Eletrocorticograma De Ratos. *Rev Med (São Paulo)*. Vol.89, n.1, p.12-20.
- Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. (2005). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2ª ed. Elsevier.
- Pinheiro, C. H. J., Sousa, W. M., Oliveira, J., Marinho, M. J. F., Motta, R., Smith, M. M. R. L. & Silva, C. A. B. (2009). Exercício Físico Previne Alterações Cardiometabólicas Induzidas Pelo Uso Crônico De Glicocorticoides. *Arq Bras Cardiol.*, Vol.93, n.4, p.400-408.
- Penildon, S. (2010). *Farmacologia*. 8ª Ed. Editora Guanaba Koogan, RJ, p.822-836
- Pereira, A. L.C., Bolzani, F. C. B., Stefani, M. (2007). Uso Sistêmico De Corticosteróides: Revisão Da Literatura. *Med Cutan Iber Lat Am*;35(1):35-50.
- Pereira, A. M., Tiemensma, J. & Romijnja. (2010). Neuropsychiatric Disorders In Cushing's Syndrome. *Neuroendocrinology.*, 92 Suppl 1:65-70.
- Popa, D., Lena, C., Alexandre, C. & Adrien, J. (2008). Lasting Syndrome Of Depression Produced By Reduction In Serotonin Uptake During Postnatal Development: Evidence From Sleep, Stress And Behavior. *J Neurosci*. Vol.28, p.3546-3554.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M. & Jalfre, M. (1977). Depression: A New Animal Model Sensitive To Antidepressant Treatments. *Nature*. Vol.266, p.730-732.
- Rachdaoui, N. & Sarkar, D. K. (2013). Effects Of Alcohol On The Endocrine System. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 42(3): 593–615.
- Raimundo, A. K. S.; Sousa, L. A. Silveira, R. F.; Cerqueira, M. C. D.; Rodrigues, J. & Dini, P. D.(2009). Dosagem De Serotonina Sistêmica Após Aplicação De Eletroestimulação Nervosa Transcutânea (Tens). *Fisioter. Mov.* Vol.22, n.3, p.365-374.

- Rakofsky, J. J., Holtzheimer, P. E. & Nemeroff, C. B. (2009). Emerging Targets For Antidepressant Therapies. *Curr. Opin. Chem.Biol.* Vol.13, p.291-302.
- Restrepo, J. G., Sierra, G. L. & Maya, G. C. (2009). Síndrome De Cushing. *Medicina & Laboratorio*, Vol.15, n. 9-10.
- Rial, D., Lemos, C., Pinheiro, H., Duarte, J. M., Gonçalves, F. Q. & Real, J. I. (2016). Depression As A Glial-Based Synaptic Dysfunction. *Front. Cell. Neurosci.* Vol.9, p .521.
- Rollin, G. A. F. S. & Czepielewski, M. A. (2003). Síndrome De Cushing: É Possível Simplificar E Padronizar Sua Abordagem Diagnóstica? *Arq Bras Endocrinol Metab*, 47/4:368-380.
- Romão, F. G. & Antunes, M. I. P P. (2012). Hipoadrenocorticismo Em Cães. *Vet E Zootec.* Vol.19, n.1, p.044-054.
- Romanholi, D.J.P.C. & Salgado, L.R. (2007). Estados De Pseudo-Cushing. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 51/8.
- Rosenzweig, Leiman & Breedlove. (2012). *Biological Psychology*. 2ª Ed.
- Saad, M.J.A., Maciel, R.M.B. & Mendonça, B.B. (2007). *Endocrinologia*. São Paulo: Atheneu.
- Santos, C. L., Rafacho, A. & Bosqueiro, J. R. (2007). Efeitos Da Administração De Dexametasona In Vivo Sobre Glicemia, Insulinemia E Substratos Circulantes São Dependentes Do Tempo De Tratamento. *Biosci J. Uberlândia*, Vol.23, n.3, p.101-110.
- Schelini, Y. I. (1996). Hippocampal Atrophy In Major Depression: A Result Of Depression-Induced Neurotoxicity. *Mol Psychiatry*. Vol.1, p.298-299.
- Schmidt, H. D. & Duman, R. S. (2007). The Role Of Neurotrophic Factors In Adult Hippocampal Neurogenesis, Antidepressant Treatments And Animal Models Of Depressive-Like Behavior. *Behav.Pharmacol.* Vol.18, p.391-418.

- Sen, S., Duman, R. & Sanacora, G. (2008). Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression And Antidepressant Medications: Meta-Analyses And Implications. *Biol. Psychiatry*. Vol.64, p.527-532.
- Slattery, D. A. & Cryan, J. F. (2012). Using The Rat Forced Swim Test To Assess Antidepressant-Like Activity In Rodents. *Nature Protocols*. Vol.7, n.6, p.1009-1014,
- Stephens, M. A. C.; Wand, G. Stress And The Hpa Axis: Role Of Glucocorticoids In Alcohol Dependence. *Alcohol Research: Current Reviews*, v.34, N.4, P.468-483, 2012.
- Stone, E. A. & Lin, Y. (2008). Na Anti-Immobility Effect Of Exogenous Corticosterone In Mice. *Eur J. Pharmacol*, Vol.580, p.135-142.
- Stratakis, C.A. (2012). Cushing Syndrome In Pediatrics. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 41(4): 793–803.
- Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibarguen-Vargas, Y., Chalon, S., Griebel, G., Hen, R. & Belzung, C. (2008). Drug-Dependent Requirement Of Hippocampal Neurogenesis In A Model Of Depression And Of Antidepressant Reversal. *Biological Psychiatry*. Vol.64, p.293-301.
- Tavares, P., Furtado, M. & Santos, F. (1984). *Fisiologia Humana*. Atheneu, RJ.
- Tiemensma, J., Biermasz, N. R., Van Der Mast, R. C., Wassenaar, M. J., Middelkoop, H. A. & Pereira, A. M. (2010). Increased Psychopathology And Maladaptive Personality Traits, But Normal Cognitive Functioning In Patients After Long-Term Cure Of Acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. Vol.95: E392.
- Tufik, S. (2008). *Medicina E Biologia Do Sono*. 1ª Ed. São Paulo: Manole, p.59-60.
- Vargas, M.L. & Costa, C.V. (2009). Prevalencia, Etiología Y Cuadro Clínico Del Síndrome De Cushing. *Endocrinol Nutr*. 56(1): 32-9
- Vegiopoulos, A. & Herzig, S. (2007). Glucocorticoids, Metabolism And Metabolic Diseases. *Molecular And Cellular Endocrinology*. Vol.275, n.1-2, p.43-61.

- Wang, M. (2005). The Role Of Glucocorticoid Action In The Pathophysiology Of The Metabolic Syndrome. *Nutrition & Metabolism*. Vol. 2, n.3, p.1-14.
- Weiderpass, E. (1994). *Epidemiologia Do Consumo De Medicamentos No Primeiro Trimestre De Vida Em Centro Urbano Do Brasil* [Dissertação]. Pelotas (RS): Universidade Federal De Pelotas.
- Widmaier, E. P., Raff, H. & Strang, K. T. (2006). *Vander's Human Physiology*: 10^a Ed. Hardcover.
- Willner, P. (1991). *Behavioural Models In Psychopharmacology*. In P. Willner (Ed.), Behavioral Models In Psychopharmacology: Theoretical, Industrial, And Clinical Perspectives. Cambridge: Cambridge University Press. p.3-18.
- Witkin, J. M., Marek, G. J., Johnson, B. G. & Schoepp, D. D. (2007). Metabotropic Glutamate Receptors In The Control Of Mood Disorders. *Cns Neuro. Disord Drug Targets*. Vol.6, p.87-100.
- Zarate, C. A. Jr., Singh, J. B. & Carlson, P. J. A. (2006). Randomized Trial Of An N-Methyl-D-Aspartate Antagonist In Treatment-Resistant Major Depression. *Arch Gen Psychiatry*. Vol.63, p.856-864.
- Zhao, Z., Baros, A. M. & Zhang, H. T. (2008). Norepinephrine Transporter Regulation Mediates The Long-Term Behavioral Effects Of The Antidepressant Desipramine. *Neuropsychopharmacology*. Vol.33, p.3190-3200.