GABRIEL RAMOS DE ABREU

Possíveis efeitos antidepressivos da cetamina em ratas lactantes:

Avaliação das implicações na prole

São Paulo

2020

GABRIEL RAMOS DE ABREU

Possíveis efeitos antidepressivos da cetamina em ratas lactantes: Avaliação das implicações na prole

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento: Patologia - VPT

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof.^a Dr.^a Helenice de Souza Spinosa

Coorientador:

Dr. André Rinaldi Fukushima

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3943
FMVZ

Abreu, Gabriel Ramos de
Possíveis efeitos antidepressivos da cetamina em ratas lactantes: avaliação das implicações na prole / Gabriel Ramos de Abreu – 2020.
124 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa.

Coorientador: Prof. Dr. André Rinaldi Fukushima.

1. Anestésico dissociativo. 2. Comportamento animal. 3. Depressão. 4. Toxicologia perinatal. 5. Neurotransmissores. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Possíveis efeitos antidepressivos da cetamina em ratas lactantes: avaliação das implicações na prole", protocolada sob o CEUA nº 6342230118, sob a responsabilidade de **Helenice de Souza Spinosa e equipe; Gabriel Ramos de Abreu** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/03/2018.

We certify that the proposal "Possible antidepressant effects of ketamine in lactating rats: evaluation of prole implications.", utilizing 480 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 6342230118, under the responsibility of **Helenice de Souza Spinosa and team; Gabriel Ramos de Abreu** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/14/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2018** a **12/2019** Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Origem: **Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **2 a 95 dias**

N: **480**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **2 a 300 g**

Resumo: A depressão é uma das doenças mais comuns e mentalmente incapacitantes no mundo. A depressão pós-parto é um subtipo de depressão que afeta 1 a cada 7 mulheres mundialmente. Ela é frequentemente definida como um episódio de transtorno de depressão maior que ocorre no período seguinte ao nascimento. O tratamento para esse tipo de depressão consiste na combinação de psicoterapias e tratamento farmacológico. Para o tratamento farmacológico é necessário considerar as consequências que este tratamento possa ter na mãe lactante e na progênie, uma vez que o vínculo mãe-filhote é fundamental para o desenvolvimento geral da progênie e, portanto, alterações no comportamento materno podem gerar distúrbios permanentes nos filhotes. A cetamina vem sendo bastante estudada para o uso como antidepressivo devido a seu mecanismo de ação misto. Levando em consideração que há uma tendência para a ampliação do uso clínico da cetamina e que há poucas informações a respeito da dose e via de administração ideal para seu uso como antidepressivo, bem como a segurança e eficácia de um tratamento durante o período pós-natal, tornam-se necessários mais estudos sobre o uso desse fármaco com essa finalidade, a fim de contribuir com o seu uso clínico mais seguro. Assim, o objetivo deste projeto é estudar as implicações da exposição materna à cetamina no desenvolvimento da prole de ratas. Para isso serão realizadas avaliações comportamentais e neuroquímicas da prole, desde o nascimento até a idade adulta.

Local do experimento: Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP e Laboratório Farmacologia Aplicada e Toxicologia LADTOX

São Paulo, 09 de maio de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COORDENADORIA DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

São Paulo, 21 de junho de 2018

À Senhora

Profª. Drª. Esther Lopes Ricci Adari Camargo

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Após a análise do projeto de pesquisa **Possíveis efeitos antidepressivos de cetamina em ratas lactantes e implicações na prole: aspectos comportamentais**, Processo CEUA/UPM Nº 168-04-2018, sob sua responsabilidade, a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie informa que os procedimentos encontram-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2008, do Decreto nº 6.899/2009 e das normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e **aprovou** os procedimentos éticos do referido projeto.

Dados do projeto de pesquisa:

Vigência - 04/2018 a 04/2019

Espécie/Linhagem - *Rattus norvegicus*

Nº de animais - 40

Peso - 350g

Idade - 90 dias

Sexo - Fêmeas e Machos

Origem dos animais - USP

Solicitamos, por gentileza, que após a conclusão do citado projeto seja encaminhada uma cópia digital, do Relatório Final, para finalizarmos o seu processo nesta Comissão.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Elizeu Coutinho de Macedo

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Projeto analisado na Reunião Mensal de maio.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ABREU, Gabriel Ramos.

Título: **Possíveis efeitos antidepressivos da cetamina em ratas lactantes:**
Avaliação das implicações na prole.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia Experimental e Comparada
da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico este trabalho a todos os cientistas, pesquisadores, professores, e divulgadores científicos que lutam para o avanço da ciência no país. Nosso trabalho as vezes pode parecer ingrato, sem retorno, que é jogado de escanteio e sucateado. Muitos altos e baixos repentinos, falta de bolsas, falta de verba, falta de profissionais, falta de estrutura; mas estamos constantemente nos corrigindo na direção correta e nos adaptando para o barco não afundar. Sempre lutando para aprender e melhorar. Não desistam, juntos somos fortes e juntos mudamos o país.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos os animais que possibilitaram esse projeto. Suas vidas não foram em vão e esta é a prova disso.

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Helenice de Souza Spinosa, por todo apoio, orientação, paciência e emoções antes de terminar essa dissertação, e, ainda assim, ter acreditado no meu potencial.

Ao Prof. Dr. André Rinaldi Fukushima pela coorientação e pela ajuda com os testes e coletas dos animais, além dos ensinamentos sobre o HPLC.

À FAPESP: processos nº 2018/05397-0 e 2018/02547-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

À CAPES, por possibilitar que o departamento continue funcionando e recebendo novos alunos, novas pesquisas e novas melhorias

À doutoranda e colega de projeto Ms.^a Julia Zaccarelli Magalhães, por toda ajuda com delineamento experimental, os testes comportamentais e laboratoriais, análise de resultados, elaboração da dissertação e companheirismo.

Agradeço demais à minha namorada, Rafa, que me incentivou a entrar no mestrado e a continuar firme e forte nele mesmo com todas as adversidades, e ainda me escutou reclamar muito sobre a vida, a verdade e o universo! Obrigado por estar presente e deixar os dias melhores <3

A todas as alunas de IC e estagiárias que participaram do projeto e ajudaram a tornar ele realidade – Camila, Beatriz, Júlia, Mayara, Amanda, Maju e principalmente Lorena, que ralou muito nesses dois anos.

Agradeço à Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Patologia por possibilitarem o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço também à Universidade Presbiteriana Mackenzie pela colaboração com o meu trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Esther Lopes Ricci, que colaborou com o projeto e foi uma grande parceira no desenrolar dos problemas.

Ao Alexandre e ao Sr. Domingos, por toda ajuda com os animais e a burocracia durante os testes no Mackenzie.

Agradeço aos funcionários do VPT que me ajudaram muito em toda essa loucura: Herculano, Magali, Luciana, Nelsinho, Milena e Adriana.

Agradeço muito ao Dr. Jorge Camilo Florio, por me ajudar e me ensinar a usar o HPLC. Sem você esse trabalho ficaria incompleto. Muito obrigado por doar seu tempo.

Agradeço aos meus pais e à minha irmã, que me deram condições de estudar até chegar aqui, e me apoiam com tudo que preciso.

A toda a minha família, que me incentivou, me ajudou e manteve a curiosidade alta durante esses anos.

Ao Neno e à Pequena, pois não importa se o dia foi bom ou ruim, vocês estavam aqui para deixar tudo melhor.

A todos os meus amigos que me ajudaram diretamente na realização do projeto: Mari, Gui e Gods. Ainda estaria tratando animais, pipetando, sonicando e organizando amostras e bolando estatísticas mirabolantes sem a ajuda de vocês.

A todos os professores do VPT que me ajudaram e me ensinaram todo dia um pouco mais.

A todos os colegas do VPT que me ajudaram com o projeto e também tornaram os dias mais leves.

A todos os meus amigos que mesmo com pouco contato durante dois anos, continuam torcendo e sendo meus amigos!!!

Àqueles que não citei diretamente, muito obrigado por fazerem parte da minha vida doida.

Forward, Always.

RESUMO

ABREU, G. R. **Possíveis efeitos antidepressivos da cetamina em ratas lactantes:** Avaliação das implicações na prole. 2020. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A depressão pós-parto é definida como um episódio de transtorno de depressão maior que ocorre no período seguinte ao nascimento. Essa doença afeta uma em cada sete mulheres e é a principal complicação do pós-parto; o tratamento disponível consiste na combinação de psicoterapias e tratamento farmacológico, sendo necessário considerar as consequências que este tratamento possa ter na mãe lactante e na progênie. O vínculo mãe-filhote é fundamental para o desenvolvimento geral da progênie e, portanto, alterações no comportamento materno podem gerar distúrbios permanentes nos filhotes. Estudos apontam que a depressão materna nos primeiros seis meses pós-parto está associada com problemas comportamentais em crianças da primeira infância até a adolescência. A cetamina vem sendo bastante estudada para o uso como antidepressivo devido a seu mecanismo de ação misto. Levando em consideração que há uma tendência para a ampliação do uso clínico da cetamina e que há poucas informações a respeito da dose e via de administração ideal para seu uso como antidepressivo, bem como a segurança e eficácia de um tratamento durante o período pós-natal tornam-se necessários mais estudos sobre o uso desse fármaco com essa finalidade, a fim de contribuir com o seu uso clínico mais seguro. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto nos filhotes na juventude e na idade adulta, bem como estudar os efeitos do tratamento prolongado de mães com cetamina nos filhotes na infância e na idade adulta. Para isso, ratas lactantes foram induzidas a depressão pós-parto pelo modelo de separação materna do dia pós-natal (DPN) 2 ao 12 e tratadas com diferentes doses de cetamina (5, 10 e 20 mg/kg) por via intraperitoneal do DPN2 ao 21. Foi realizada a avaliação comportamental, neuroquímica, bioquímica e do hemograma dos filhotes na infância (DPN21) e na idade adulta (DPN 60 a 90). Os resultados mostraram que o modelo de separação materna causou pequenas alterações na neuroquímica do hipocampo e do corpo estriado dos filhotes na

idade adulta; os demais parâmetros avaliados não sofreram alterações. Já em relação à cetamina, os resultados mostraram que as diferentes doses utilizadas provocaram alterações comportamentais no campo aberto e na caixa claro/escuro, indicando efeito ansiogênico desse fármaco. A análise neuroquímica mostrou aumento da atividade do sistema dopaminérgico, tanto nos filhotes jovens quanto nos adultos, sugerindo que a cetamina possui efeito nesse sistema de neurotransmissão. Os parâmetros bioquímicos e do hemograma não tiveram alterações pelo tratamento com a cetamina.

Palavras-chave: anestésico dissociativo; comportamento animal; depressão; toxicologia perinatal; neurotransmissores.

ABSTRACT

ABREU, G. R. **Possible antidepressant effects of ketamine in lactating rats:** Evaluation of implications for the offspring. 2020. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Postpartum depression is defined as an episode of major depression disorder that occurs in the period following birth. This disease affects one in seven women and is the main complication of childbirth; the available treatment consists of a combination of psychotherapies and pharmacological treatment, being necessary to consider the consequences that this treatment may have on the lactating mother and the progeny. The mother-infant bond is fundamental to the overall development of the progeny and, therefore, changes in maternal behavior can generate permanent disturbances in the pups. Studies have shown that maternal depression on the first six months post-partum is associated with behavioral problems in kids from childhood to adolescence. Ketamine has been extensively studied for use as an antidepressant due to its mixed mechanism of action. Taking in consideration that there is a tendency to increase the clinical use of ketamine and that there is little information about the ideal dose and route of administration for its use as an antidepressant, as well as the safety and efficacy of a treatment during the postnatal period, more studies are needed on the use of this drug for this purpose, in order to contribute to its safer clinical use. Thus, the objective of this work was to study the effects of the maternal separation model to induce postpartum depression in puppies in childhood and adulthood, as well as to study the effects of prolonged treatment of mothers with ketamine in puppies in childhood and adulthood. For this, lactating rats were induced to postpartum depression by the model of maternal separation of postnatal day (PND) 2 to 12 and treated with different doses of ketamine (5, 10 and 20 mg / kg) intraperitoneally from PND2 to 21. A behavioral assessment was conducted, as well as neurochemical, biochemical and blood count of puppies in childhood (PND21) and adulthood (PND 60 to 90). The results showed that the maternal separation model caused small changes in the neurochemistry of the hippocampus and the striatum of the puppies in adulthood; the other parameters evaluated did not change. Regarding ketamine, the results showed that the

different doses used caused behavioral changes in the open field and in the light / dark box, indicating the anxiogenic effect of this drug. The neurochemical analysis showed an increase in the activity of the dopaminergic system, both in young and adult puppies, suggesting that ketamine has an effect on this neurotransmission system. The biochemical and blood count parameters did not change due to the treatment with ketamine.

Keywords: dissociative anesthetic; animal behavior; depression; perinatal toxicology; neurotransmitters.

Lista de figuras

Figura 1 – Alguns dos parâmetros avaliados no desenvolvimento físico. A) Rato no DPN2 com a orelha ainda colada. B) Rato no DPN4 com a orelha descolada. C) Rato no DPN7 que já apresenta pelagem. D) Rato no DPN 10 que apresenta erupção do dente incisivo inferior. E) Rato no DPN14 que ainda tem as pálpebras parcialmente fechadas. F) Rato no DPN15 com as pálpebras abertas e o globo ocular totalmente exposto. -----33

Figura 2 – Parâmetro de preensão palmar. Na ilustração, o animal ainda apresenta o reflexo, fechando a pata ao toque do clipe. -----34

Figura 3 – Parâmetro de endireitamento postural. A ilustração representa um animal no DPN2 que consegue realizar a virada de corpo do decúbito dorsal para o decúbito ventral. -----34

Figura 4 – Parâmetro de geotaxia negativa. Na ilustração, um animal no DPN 6 consegue realizar o giro e ficar na posição ascendente.-----35

Figura 5 – Parâmetro de sobressalto. A ilustração representa um animal no DPN 15 que já tem os ductos auditivos abertos, apresentando sobressalto e tremor generalizado.-----35

Figura 6 – Arena do campo aberto com um rato do DPN21 realizando o teste. -----37

Figura 7 – Caixa claro/escuro com um animal no DPN21 realizando o teste --37

Figura 8 – Teste de interação social sendo realizado na arena do campo aberto. -----39

Figura 9 – Teste do labirinto de Barnes. A) Caixa escape. B) Formas geométricas para indicação visual extra labirinto. C) Caixa plástica utilizada para conter o animal. D) Detalhe do animal entrando na caixa de escape. -----40

Figura 10 – Cuba do nado forçada sendo utilizada para teste com um animal no DPN90. -----41

Figura 11 – Acompanhamento do peso e ganho de peso semanal (em gramas) de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de

separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----46

Figura 12 – Parâmetros avaliados no desenvolvimento físico de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----47

Figura 13 – Parâmetros avaliados no desenvolvimento reflexológico de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----48

Figura 14 – Parâmetros avaliados no campo aberto de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----49

Figura 15 – Parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----50

Figura 16 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do córtex de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----51

Figura 17 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipotálamo de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----52

Figura 18 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipocampo de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----53

Figura 19 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do corpo estriado de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----54

Figura 20 – Parâmetros avaliados no campo aberto de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----55

Figura 21 – Parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----56

Figura 22 – Parâmetros avaliados de teste de interação social de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----57

Figura 23 – Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----58

Figura 24 – Parâmetros avaliados teste de nado forçado de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----58

Figura 25 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do córtex de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----60

Figura 26 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipotálamo de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----61

Figura 27 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipocampo de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----62

Figura 28 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do corpo estriado de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----63

Figura 29 – Acompanhamento do peso e ganho de peso semanal (em gramas) de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----85

Figura 30 – Parâmetros avaliados no desenvolvimento físico de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----86

Figura 31 – Parâmetros avaliados no desenvolvimento reflexológico de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----87

Figura 32 – Parâmetros avaliados no campo aberto de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----88

Figura 33 – Parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via

intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----89

Figura 34 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do córtex de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=4-8 animais por grupo. -----91

Figura 35 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipotálamo de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----92

Figura 36 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipocampo de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----93

Figura 37 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do corpo estriado de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----94

Figura 38 – Parâmetros avaliados na análise bioquímica de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----95

Figura 39 – Parâmetros avaliados no campo aberto de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----96

Figura 40 – Parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----97

Figura 41 – Parâmetros avaliados de teste de interação social de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----98

Figura 42 – Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. -----99

Figura 43 – Parâmetros avaliados teste de nado forçado de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo -----99

Figura 44 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do córtex de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. ----- 102

Figura 45 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipotálamo de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. ----- 103

Figura 46 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipocampo de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de

separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. ----- 104

Figura 47 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do corpo estriado de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. ----- 105

Figura 48 – Parâmetros avaliados na análise do hemograma total de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 animais por grupo. ----- 106

Figura 49 – Parâmetros avaliados na análise da bioquímica sérica de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo. ----- 108

Lista de quadros

Quadro 1 – Testes comportamentais realizados na prole masculina na idade adulta de ratas submetidas ao modelo de depressão pós-parto por separação materna.	44
Quadro 2 – Divisão dos grupos experimentais.	82
Quadro 3 – Testes comportamentais realizados na prole masculina na idade adulta de ratas submetidas ao modelo de depressão pós-parto por separação materna e tratadas com cetamina durante a lactação.	83

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	25
CAPÍTULO 1	26
1.1 INTRODUÇÃO	27
1.2 OBJETIVOS.....	30
1.2.1 Objetivo geral.....	30
1.2.2 Objetivos específicos	30
1.3 MATERIAL E MÉTODOS	31
1.3.1 ANIMAIS	31
1.3.2 PROCEDIMENTOS	31
1.3.2.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez	31
1.3.2.2 Indução da depressão	31
1.3.2.3 Desenvolvimento físico.....	32
1.3.2.4 Desenvolvimento reflexológico.....	33
1.3.2.5 Avaliação comportamental	36
1.3.2.5.1 Campo aberto.....	36
1.3.2.5.2 Caixa claro/escuro.....	37
1.3.2.5.3 Interação social	38
1.3.2.5.4 Labirinto de Barnes	39
1.3.2.5.5 Nado forçado.....	40
1.3.2.6 Dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos.....	41
1.3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
1.3.3.1 Experimento 1: Avaliação dos efeitos do modelo de separação materna no comportamento e fisiologia da prole de machos jovens	43
1.3.3.2 Experimento 2: Avaliação dos efeitos do modelo de separação materna no comportamento e fisiologia da prole de machos adultos	44
1.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
1.4 RESULTADOS	45
Experimento 1: Avaliação dos efeitos do modelo de separação materna no comportamento e fisiologia da prole de machos jovens	45
Experimento 2: Avaliação dos efeitos do modelo de separação materna no comportamento e fisiologia da prole de machos adultos	55
1.5 DISCUSSÃO	64
1.6 CONCLUSÕES.....	73
CAPÍTULO 2	74

2.1 INTRODUÇÃO	75
2.1.1 Uso da cetamina como antidepressivo	76
2.2 OBJETIVOS	79
2.2.1 Objetivo geral	79
2.2.2 Objetivos específicos	79
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	80
2.3.1 ANIMAIS	80
2.3.2 DROGA	80
2.3.3 PROCEDIMENTOS	80
2.3.3.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez	80
2.3.3.2 Indução da depressão	80
2.3.3.3 Desenvolvimento físico	81
2.3.3.4 Desenvolvimento reflexológico	81
2.3.3.5 Avaliação comportamental	81
2.3.3.6 Dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos	81
2.3.3.7 Bioquímica sérica	81
2.3.3.8 Hemograma	82
2.3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	82
2.3.4.1 Experimento 1: Avaliação dos efeitos antidepressivos do tratamento prolongado de cetamina no comportamento e fisiologia da prole de machos jovens de mães induzidas a depressão pelo modelo de separação materno	82
2.3.4.2 Experimento 2: Avaliação dos efeitos antidepressivos do tratamento prolongado de cetamina no comportamento e fisiologia da prole de machos jovens de mães induzidas a depressão pelo modelo de separação materno	83
2.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	83
2.4 RESULTADOS	84
Experimento 1: Avaliação dos efeitos antidepressivos do tratamento prolongado de cetamina no comportamento e fisiologia da prole de machos jovens de mães induzidas a depressão pelo modelo de separação materno	84
Experimento 2: Avaliação dos efeitos antidepressivos do tratamento prolongado de cetamina no comportamento e fisiologia da prole de machos jovens de mães induzidas a depressão pelo modelo de separação materno	96
2.5 DISCUSSÃO	109
2.6 CONCLUSÕES	115
3. REFERÊNCIAS	116

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos, a fim de melhor explorar os experimentos feitos e os resultados obtidos.

O primeiro capítulo aborda a depressão pós-parto e suas consequências na prole, tanto na infância quanto na idade adulta, por meio de testes comportamentais e avaliações neuroquímicas.

O segundo capítulo aborda as possíveis consequências do uso da cetamina como antidepressivo em ratas lactantes, estudando na prole o desenvolvimento físico e reflexológico, os modelos comportamentais, as avaliações neuroquímicas e as sanguíneas, tanto na infância quanto na idade adulta.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A depressão é uma das doenças mais comuns e mentalmente incapacitantes no mundo (HOLUBOVA et al., 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 250 milhões de pessoas de todas as idades sofrem dessa doença, sendo a prevalência maior em mulheres e com início geralmente entre 17 e 25 anos (WHO, 2016; FRIEDURGER et al., 2017). A depressão tem se tornado um problema socioeconômico grave, uma vez que há prejuízo no funcionamento global dos indivíduos que sofrem dessa doença (VANNUCCHI; VANNUCCHI, 2012).

A depressão pós-parto é um subtipo de depressão que afeta 1 a cada 7 mulheres mundialmente (FRIEDMAN; RESNICK, 2009; XIA, 2016). Ela é frequentemente definida como um episódio de transtorno de depressão maior que ocorre no período seguinte ao nascimento, podendo, em alguns casos, apresentar-se como transtorno de depressão menor (O'HARA; MCCABE, 2013).

Essa doença é a principal complicação do parto e cerca de 50% das mulheres com depressão pós-parto não são diagnosticadas e não recebem o tratamento adequado (FRIEDMAN; RESNICK, 2009). Ela possui prevalência de 10-15%, etiologia multifatorial (fatores biológicos, psicológicos e sociais) e possui latência média de aproximadamente um ano após o parto (GAVIN et al., 2005; GUEDES et al., 2011).

A sintomatologia normalmente apresentada é desânimo persistente, sentimento de culpa, alterações do sono, pensamentos suicidas, temor de machucar o filho, diminuição do apetite e da libido, diminuição do nível cognitivo e presença de pensamentos obsessivos (MORAES et al., 2006).

Os principais riscos para o desenvolvimento de depressão pós-parto são: menor escolaridade, baixo nível socioeconômico, baixo suporte social, histórico de doenças psiquiátricas, tristeza pós-parto, depressão pré-natal, baixa autoestima, ansiedade pré-natal e ou durante a gestação, estresse, gravidez não planejada, tentativa de interromper a gravidez, transtorno disfórico pré-menstrual, sentimentos negativos em relação à criança, falta de suporte emocional, neuroticismo, problemas conjugais e financeiros. (ROBERTSON et al., 2004; MORAES et al., 2006).

Existem vários métodos para o diagnóstico da depressão pós-parto; o mais utilizado é o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM*), elaborado pela Associação de Psiquiatria Americana (*American Psychiatric Association - APA*) e que atualmente encontra-se na 5ª edição (DSM-V), que lista diferentes critérios para o diagnóstico (APA, 2014).

O tratamento para esse tipo de depressão consiste na combinação de psicoterapias e tratamento farmacológico (WHO, 2020). A *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) aprovou diversos medicamentos antidepressivos, sendo que a grande maioria tem como alvo os sistemas monoaminérgicos (ABDALLAH et al., 2016). Esses medicamentos são classificados em: tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), outros inibidores seletivos de recaptação, antagonistas de receptores, inibidores da monoamina oxidase e agonistas dopaminérgicos (FLECK et al., 2003). Há também estudos que mostraram a participação dos receptores glutamatérgicos N-metil-D-Aspartato (NMDA) em psicopatologias como ansiedade e depressão (BERMAN et al., 2000).

Para este tipo de depressão, é necessário considerar as consequências que o tratamento farmacológico possa ter na mãe lactante e na progênie. Em roedores, em particular, Weinstock (2017) ressalta que o vínculo mãe-filhote é fundamental para o desenvolvimento geral da cria e, portanto, alterações no comportamento materno podem gerar distúrbios permanentes nos filhotes. Essa situação é bastante relevante no contexto da depressão pós-parto também em seres humanos.

A depressão pós-parto leva a alterações comportamentais e cognitivas no desenvolvimento da progênie. Estudos apontam que a depressão materna nos primeiros seis meses pós-parto está associada com problemas comportamentais na criança na primeira infância até a adolescência (AVAN et al., 2010; MURRAY et al., 2011). Em relação ao desenvolvimento cognitivo, as principais consequências para a criança são: baixo nível de quociente intelectual (QI) e baixo nível de vocabulário; ainda foi observado que as alterações cognitivas são mais proeminentes em meninos (BRAND; BRENNAN, 2009; GRACE et al., 2003).

Essas consequências para o desenvolvimento da criança estão mais ligadas ao tempo que a mãe permanece no estado depressivo, uma vez que a mesma possui participação fundamental no desenvolvimento intelectual e social nos primeiros anos de vida da criança (SOHR-PRESTON; SCARAMELLA, 2006).

Os medicamentos mais utilizados na atualidade para o tratamento da depressão são os ISRSs (BUENO, 2011), inclusive indicados para a depressão pós-parto. Em uma revisão sistemática da literatura conduzida por Goracci et al. (2015), no período de 1996 a 2014, sobre a relação entre uso de antidepressivos na gestação e a teratogênese apontou a ocorrência de efeitos teratogênicos em indivíduos expostos aos ISRSs; por outro lado, os resultados são inconsistentes na literatura para os antidepressivos tricíclicos e para a mirtazapina e a venlafaxina (inibidores seletivos da recaptação da serotonina e da noradrenalina). Esses achados reforçam a importância de se obter novas ferramentas farmacológicas ou o emprego de medicamentos já conhecidos e que se mostraram seguros para o tratamento desse distúrbio em mulheres lactantes.

Levando em consideração que a depressão pós-parto é uma doença que acomete muitas mulheres, mas seus mecanismos não estão totalmente elucidados e nem seus efeitos nas crianças, o presente trabalho tem como objetivo estudar as implicações da depressão pós-parto na prole utilizando modelo animal.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é estudar as implicações do modelo de separação materna no desenvolvimento da prole.

1.2.2 Objetivos específicos

Estudar as implicações do modelo de separação materna na prole, avaliando:

- O desenvolvimento físico e reflexológico;
- O comportamento no campo aberto e na caixa claro/escuro, tanto na infância quanto na idade adulta;
- A interação social e o comportamento no labirinto de Barnes e no teste de nado forçado, na idade adulta;
- Os níveis de neurotransmissores e seus diferentes metabólitos em diferentes regiões do sistema nervoso central.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas Wistar, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram alojados em gaiola de polipropileno (41 x 34 x 18 cm) com cama de maravalha autoclavada, mantidas em uma sala com umidade relativa do ar de 55% $\pm$ 10 e temperatura de 22°C $\pm$ 2, com o ciclo de doze horas de claro e escuro (luz acesa às 6h00). Os animais tiveram água e comida *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP, sob o protocolo de número 6342230118. Parte dos experimentos foram realizados na Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM), sendo aprovado pelo CEUA UPM sob o protocolo de número 168-04-2018.

1.3.2 PROCEDIMENTOS

1.3.2.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

Fêmeas virgens adultas foram colocadas nas gaiolas dos machos na proporção de três fêmeas para cada macho para o acasalamento. O ganho de peso semanal das ratas foi acompanhado e, quando constatado um ganho acima de 80 g, as ratas foram separadas e mantidas em gaiolas individuais até o nascimento dos filhotes. Após o nascimento, os animais foram mantidos isolados em suas caixas, com a mãe, por 24h, sendo manipulados apenas no dia pós-natal (DPN) 2.

1.3.2.2 Indução da depressão

A indução da depressão foi realizada através do modelo de separação materna por 3 horas (ou seja, 180 minutos, a SM180), que promove esse efeito por meio do estresse causado pela interrupção do vínculo mãe-filhote no início da vida da prole (VETULANI, 2013). Assim, a prole foi retirada da caixa moradia da mãe e foi alojada em caixas pequenas (18 x 13 x 11 cm) contendo maravalha

da caixa moradia. Essas caixas, com os filhotes, foram então colocadas sobre uma manta térmica com temperatura de $32^{\circ}\text{C} \pm 2$, por três horas diárias do DPN2 ao 12. As caixas foram mantidas na mesma sala em que estavam as caixas das mães, de forma que elas pudessem ouvir e farejar seus filhotes.

1.3.2.3 Desenvolvimento físico

Diariamente, cada macho da prole foi pesado individualmente e foi calculado o ganho de peso diário. Foi também avaliado diariamente durante toda a lactação o desenvolvimento físico da prole, conforme descrito por Udo et al. (2014), anotando-se o dia do aparecimento dos seguintes parâmetros:

- 1) descolamento de orelha – figura 1A e 1B;
- 2) aparecimento de pelo – figura 1C;
- 3) erupção dos dentes incisivos – quando ocorre o rompimento da gengiva – figura 1D;
- 4) abertura dos olhos – quando as duas fendas palpebrais se abrem e os globos oculares ficam expostos – figura 1E e 1D;
- 5) andar adulto – quando o filhote anda sem encostar o ventre no chão, se sustentado sobre as quatro patas;
- 6) descida dos testículos.

Figura 1 – Alguns dos parâmetros avaliados no desenvolvimento físico. A) Rato no DPN2 com a orelha ainda colada. B) Rato no DPN4 com a orelha descolada. C) Rato no DPN7 que já apresenta pelagem. D) Rato no DPN 10 que apresenta erupção do dente incisivo inferior. E) Rato no DPN14 que ainda tem as pálpebras parcialmente fechadas. F) Rato no DPN15 com as pálpebras abertas e o globo ocular totalmente exposto.

Fonte: Gabriel Ramos de Abreu (2020).

1.3.2.4 Desenvolvimento reflexológico

Foi avaliado diariamente o desenvolvimento reflexológico de todos os filhotes machos da ninhada, do DPN2 ao DPN21, conforme descrito por Udo et al. (2014), anotando-se o dia do aparecimento dos seguintes parâmetros:

1) preensão palmar – o coxim plantar das patas anteriores é tocado com a ponta de um clipe e o animal responde fechando a pata (único reflexo que desaparece ao longo do tempo) – figura 2;

2) endireitamento postural – o animal é colocado em decúbito dorsal para a observação da ocorrência ou não de virada do corpo para a posição de decúbito ventral – figura 3;

3) geotaxia negativa – o animal é colocado em uma rampa com inclinação de 45° com a cabeça direcionada para baixo; é observado se o animal volta para a posição ascendente, ou seja, com a cabeça direcionada para cima – figura 4;

4) sobressalto – é observado se o animal apresenta tremor generalizado ao ser exposto a um estalo, indicando abertura do ducto auditivo – figura 5.

Figura 2 – Parâmetro de preensão palmar. Na ilustração, o animal ainda apresenta o reflexo, fechando a pata ao toque do clipe.

Fonte: Chairim Arrais (2020).

Figura 3 – Parâmetro de endireitamento postural. A ilustração representa um animal no DPN2 que consegue realizar a virada de corpo do decúbito dorsal para o decúbito ventral.

Fonte: Chairim Arrais (2020).

Figura 4 – Parâmetro de geotaxia negativa. Na ilustração, um animal no DPN 6 consegue realizar o giro e ficar na posição ascendente.

Fonte: Chairim Arrais (2020).

Figura 5 – Parâmetro de sobressalto. A ilustração representa um animal no DPN 15 que já tem os ductos auditivos abertos, apresentando sobressalto e tremor generalizado.

Fonte: Chairim Arrais (2020).

1.3.2.5 Avaliação comportamental

A avaliação comportamental foi realizada no período da tarde, entre 13h e 16h. Todos os aparatos empregados foram limpos com solução de álcool a 70%, antes e após sua utilização, para evitar a interferência dos odores de outros animais. Os animais dos grupos controle e experimentais também foram intercalados para cada uma das avaliações.

1.3.2.5.1 Campo aberto

O campo aberto consiste em uma arena circular com 97 cm de diâmetro, circundado por uma parede de 27 cm de altura; o chão da arena é demarcado por linhas pretas formando 25 quadrantes de tamanho semelhante como descrito por Sandini et al. (2014) – figura 6. Este teste foi realizado no DPN21 e no DPN60 em um filhote macho de cada ninhada. Para isso, os animais foram colocados no centro do aparato e seu comportamento observado por 5 minutos. Os parâmetros observados foram:

1) frequência de locomoção – foi considerada uma unidade de locomoção quando o animal adentrou com as quatro patas em cada quadrante do aparato;

2) frequência de levantar – foi considerada uma unidade de levantar quando o animal se apoiou sobre as patas traseiras, ficando com o tronco ereto, na posição vertical, podendo ou não tocar a parede do aparato com as patas dianteiras;

3) frequência de *grooming* – número de vezes que o animal realizou o ato de higienização da face ou do corpo;

4) tempo de imobilidade – tempo, em segundos, em que o animal ficou imóvel;

5) frequência de defecação – número de bolos fecais encontrados ao final do experimento.

Figura 6 – Arena do campo aberto com um rato do DPN21 realizando o teste.

Fonte: Gabriel Ramos de Abreu (2020).

1.3.2.5.2 Caixa claro/escuro

O teste da caixa claro/escuro é utilizado para avaliar a ansiedade de roedores (KUMAR et al., 2013). A caixa claro/escuro consiste em um aparato retangular (60 x 40 x 35 cm) dividido em dois compartimentos, sendo um claro e um escuro. Os dois compartimentos são repartidos por uma parede com uma abertura central, que permite que o animal transite livremente pela caixa – figura 7. Este teste foi realizado no DPN21 e DPN60.

Figura 7 – Caixa claro/escuro com um animal no DPN21 realizando o teste

Fonte: Gabriel Ramos de Abreu (2020).

Os animais foram colocados no compartimento claro e seu comportamento foi observado por 10 minutos. Os parâmetros avaliados foram:

- 1) latência para a primeira passagem do compartimento claro para o escuro;
- 2) número de cruzamentos entre os compartimentos;
- 3) tempo gasto no compartimento claro;
- 4) tempo gasto no compartimento escuro.

1.3.2.5.3 Interação social

Esse teste consistiu na observação do comportamento de uma dupla de animais desconhecidos na arena do campo aberto, realizado nos DPN61 e 62 – figura 8. Tomou-se o cuidado de que a variação de peso entre esses animais não fosse superior a 20g. Para isso, no primeiro dia, cada animal foi colocado isoladamente no campo aberto por 10 minutos para habituação no aparato. No segundo dia, a dupla de ratos foi colocada no campo aberto por 10 minutos para habituação ao parceiro. No terceiro dia, foi realizado o teste propriamente dito, quando a dupla foi colocada novamente no campo aberto e o comportamento do animal alvo foi observado por 10 minutos. Foram observados os seguintes parâmetros:

- 1) tempo de farejar o outro animal da dupla;
- 2) tempo de perseguir o outro animal da dupla;
- 3) tempo de passar sob/sobre o outro animal da dupla;
- 4) tempo total de interação social.

Figura 8 – Teste de interação social sendo realizado na arena do campo aberto.

Fonte: Gabriel Ramos de Abreu (2020).

1.3.2.5.4 Labirinto de Barnes

O labirinto de Barnes é um teste utilizado para avaliar o aprendizado e a memória declarativa espacial, e foi realizado entre os DPN85 e 90. Ele consiste em uma plataforma circular de 120 cm de diâmetro elevada a 90 cm do chão; essa plataforma possui 18 aberturas de 9 cm de diâmetro, dispostos de forma equidistante ao longo do perímetro do aparato (SANDINI et al., 2018). Uma das aberturas está ligada a uma caixa escape contendo maravalha, localizada sob a plataforma. O aparato possui coloração branca e foi alocado em uma sala com as paredes brancas, sendo que numa delas foram fixadas duas formas geométricas pretas, que serviram de dicas visuais para o animal localizar a caixa escape – figura 9.

O experimento consistiu em colocar o animal no centro do aparato sob uma caixa de plástico por 30 segundos. Após esse período, a caixa de plástico foi removida e o comportamento do animal foi observado por 5 minutos, período no qual o animal deveria encontrar a caixa de escape. Caso o animal não encontrasse e adentrasse na caixa escape em 5 minutos, este foi conduzido gentilmente até a caixa e foi mantido neste local por, pelo menos, 30 segundos, para, depois, retornar a sua gaiola moradia. Cada animal foi submetido a quatro dias de treino e um de teste (quinto dia), passando pelo aparato de manhã e de

tarde, com um intervalo de 4 horas entre as sessões. Os parâmetros avaliados foram:

- 1) latência, em segundos, para entrar na caixa escape;
- 2) número de erros – número de aberturas que o rato farejou antes de encontrar a caixa escape. Foi considerado um novo erro toda vez que o animal farejou a abertura e se distraiu ou procurou uma nova abertura para farejar.

Figura 9 – Teste do labirinto de Barnes. A) Caixa escape. B) Formas geométricas para indicação visual extra labirinto. C) Caixa plástica utilizada para conter o animal. D) Detalhe do animal entrando na caixa de escape.

Fonte: Gabriel Ramos de Abreu (2016).

1.3.2.5.5 Nado forçado

O nado forçado é um teste empregado para avaliação de comportamento tipo-depressivo em animais (ENGIN et al., 2009). Esse teste foi realizado em uma cuba de acrílico transparente (45 cm de altura x 30 cm de diâmetro) cheia de água a 25°C – figura 10. Os animais foram colocados na cuba por 5 min e seu comportamento foi observado. Os parâmetros avaliados foram:

- 1) latência para a 1ª imobilidade;
- 2) tempo de imobilidade;

3) tempo de mobilidade.

Após o teste os animais foram colocados sob uma lâmpada vermelha para secagem durante 30 minutos. Este teste foi realizado no DPN90.

Figura 10 – Cuba do nado forçada sendo utilizada para teste com um animal no DPN90.

Fonte: Gabriel Ramos de Abreu (2020).

1.3.2.6 Dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para a obtenção de diferentes estruturas cerebrais para dosagem dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos.

Após a decapitação, o encéfalo do animal foi retirado e colocado em uma placa de gelo, a fim de deixar o órgão preservado para a dissecação das seguintes estruturas cerebrais: córtex, hipotálamo, hipocampo e corpo estriado. Após a coleta, as estruturas foram colocadas em microtubos e acondicionadas em gelo seco para rápido congelamento. Em seguida elas foram pesadas e armazenadas em freezer com temperatura de -80°C para processamento em até 30 dias.

As diferentes estruturas coletadas foram então homogeneizadas em ácido perclórico (ClHO_4) a 0,1 M contendo ácido 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA –

padrão interno) com o auxílio de uma caneta sonicadora de alta frequência, sendo o volume de ácido 10 vezes o peso da estrutura.

Após a homogeneização, as estruturas foram deixadas *overnight* em refrigerador a 10°C para precipitação das proteínas e ácidos nucleicos. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm (centrífuga Eppendorf®- 5804 R), a 4°C por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado com uma micropipeta e colocado em microtubos para ser armazenado em freezer -80°C, até a quantificação analítica. Foram quantificados:

- Noradrenalina (NOR) e seu metabólito, ácido vanilmandélico (VMA);
- Dopamina (DA) e seus metabólitos, ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA);
- Serotonina (5HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA).

Foi calculado também o *turnover* (taxa de renovação), por meio da relação metabólito/neurotransmissor, de NOR, DA e 5HT da seguinte forma: VMA/NOR, DOPAC/DA, HVA/DA e 5HIAA/5-HT.

As análises foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-ED) no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia da FMVZ/USP, como descrito por Zaccarelli-Magalhães et al. (2019) e Sandini et al. (2018). Para tanto foi empregado o cromatógrafo Shimadzu Modelo 20A, composto por um injetor automático com válvula injetora de volume variável (entre 1 e 100 µl), bombas de fluxo quaternárias, uma coluna cromatográfica (150 X 4,6 mm, Shimpak – ODS C 18) com filtro de linha e um detector eletroquímico Antec Decade. Foi utilizada a técnica de cromatografia em fase reserva com pareamento iônico (ácido heptanosulfônico), que é baseada na cromatografia de partição ou absorção. Para as análises foi utilizada a temperatura de 60°C e o tempo de obtenção dos picos de até 17 minutos.

A fase móvel utilizada foi um sistema isocrático formado por tampão citrato 0,02 M, 5% de acetonitrila, 0,12 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) sódico e 0,0556% de ácido 1-heptanosulfônico (HSA). O pH foi ajustado para 2,71 com ácido ortofosfórico (H₃PO₄). A fase móvel foi filtrada em um sistema à vácuo antes de ser utilizada no HPLC-ED. Após esse procedimento ela circulou no sistema *overnight* para equilíbrio da coluna, que foi acondicionada em um

fluxo de 1,2 ml/min. O detector foi mantido com um potencial de 0,8 V no eletrodo de trabalho.

Para o preparo das soluções padrões de monoaminas foi utilizado padrões de concentrações 1 nM de cada neurotransmissor e seu metabólito diluídos em ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio e estocados em freezer -80°C. No momento da análise os padrões foram descongelados e diluídos de 2.500 a 10.000 vezes em ácido perclórico 0,1 M. Foram injetados pelo menos dois padrões no HPLC-ED diariamente, um antes e outro ao final das dosagens para a utilização dos valores como referência.

O equipamento foi padronizado diariamente, ao início e ao término do trabalho, com uma solução de trabalho, com concentração conhecida, de neurotransmissores, seus metabólitos e DHBA, empregando-se como diluente uma solução de ácido perclórico, 0,1M, contendo EDTA e metabissulfito de sódio.

O limite de detecção é de 0,25 e 1 ng para todos os analitos, o limite de quantificação é de 10 ng/g de tecido cerebral ou 1,0 ng por 60 ng de sobrenadantes e a taxa de recuperação é superior a 80%.

1.3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

1.3.3.1 Experimento 1: Avaliação dos efeitos do modelo de separação materna no comportamento e fisiologia da prole de machos jovens

Vinte ratas lactantes foram divididas em dois grupos, um grupo controle e um grupo experimental (n=10 fêmeas/grupo). As fêmeas foram induzidas à depressão através do modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12.

No DPN2 as ninhadas foram padronizadas para 8 filhotes por mãe (4 fêmeas e 4 machos, sempre que possível) e foram realizadas observações para a detecção de possíveis malformações externas. Do DPN2 ao DPN21 foram realizadas as observações do desenvolvimento físico e reflexológico de todos os filhotes machos da ninhada. No DPN21 foram realizados os testes de campo aberto e caixa claro/escuro em um filhote macho, escolhido de forma aleatória.

Ao final do último teste, os animais foram eutanasiados para coleta de estruturas cerebrais para a análise neuroquímica.

1.3.3.2 Experimento 2: Avaliação dos efeitos do modelo de separação materna no comportamento e fisiologia da prole de machos adultos

Um filhote macho de cada ninhada das mães do experimento 1 foi escolhido de forma aleatória para ser submetido aos testes comportamentais na idade adulta (Quadro 1). No DPN90, após o último teste comportamental, os animais foram eutanasiados para coleta de estruturas cerebrais para a análise neuroquímica.

Quadro 1 – Testes comportamentais realizados na prole masculina na idade adulta de ratas submetidas ao modelo de depressão pós-parto por separação materna.

Teste Comportamental	DPN
Campo Aberto	60
Caixa claro/escuro	60
Interação social	61 e 62
Labirinto de Barnes	85 a 90
Nado forçado	90

Fonte: Gabriel Ramos de Abreu (2020).

1.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi empregado o software GraphPad Prism 6® (GraphPad software, Inc., San Diego, California, USA) para a realização das análises estatísticas. O teste de Bartlett foi utilizado para a verificação da homocedasticidade dos dados. Para a análise de peso e ganho de peso foi utilizado a ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni. Para os dados paramétricos foi utilizado o teste t. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O nível de significância para todas as análises foi de $p < 0,05$.

1.4 RESULTADOS

Experimento 1: Avaliação dos efeitos do modelo de separação materna no comportamento e fisiologia da prole de machos jovens

A Figura 11 mostra os resultados do acompanhamento do peso e ganho de peso semanal dos animais. Em relação ao peso dos animais, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(1,14)=0,9102$, $p>0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(19,266)=1634$, $p<0,0001$), com interação entre os fatores ($F(19,266)=3,095$, $p<0,0001$). Em relação ao ganho de peso semanal, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(1,14)=4,048$, $p>0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(2,28)=186,3$, $p<0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(2,28)=0,5714$, $p>0,05$).

Figura 11 – Acompanhamento do peso e ganho de peso semanal (em gramas) de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni.

A Figura 12 mostra os parâmetros do desenvolvimento físico dos filhotes machos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. O teste de Mann-Whitney não mostrou diferenças estatísticas significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros observados: desdobramento de orelha ($p=0,7063$), erupção de dentes incisivos ($p=0,3276$), abertura dos olhos ($p=0,4126$), aparecimento dos pelos ($p=0,2364$), andar adulto ($p=0,3660$) e descida dos testículos ($p=0,1526$).

Figura 12 – Parâmetros avaliados no desenvolvimento físico de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste de Mann-Whitney.

A Figura 13 mostra os parâmetros do desenvolvimento reflexológico da prole masculina de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. O teste de Mann-Whitney não mostrou diferenças estatísticas significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros observados: preensão palmar ($p=0,1063$), endireitamento postural ($p=0,0769$), geotaxia negativa ($p=0,9814$) e sobressalto ($p=0,0811$).

Figura 13 – Parâmetros avaliados no desenvolvimento reflexológico de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste de Mann-Whitney.

A Figura 14 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no campo aberto dos filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: locomoção ($p=0,1870$), levantar ($p=0,1780$), *grooming* ($p=0,5511$), imobilidade ($p=0,3811$) e bolos fecais ($p=0,6783$).

Figura 14 – Parâmetros avaliados no campo aberto de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste t.

A Figura 15 mostra os resultados dos parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados: latência claro/escuro ($p=0,9214$), tempo no claro ($p=0,6950$) e tempo no escuro ($p=0,6747$). O teste t mostrou que os animais do grupo DPP apresentaram aumento no número de cruzamentos entre os compartimentos em comparação com os animais do grupo controle ($p=0,0025$).

Figura 15 – Parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

**p<0,01, teste t.

As Figuras 16-19 mostram os resultados da dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos dos filhotes machos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. Em relação ao córtex, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: NOR ($p=0,5596$), VMA ($p=0,5316$), VMA/NOR ($p=0,1040$), DA ($p=0,4883$), DOPAC ($p=0,4907$), DOPAC/DA ($p=0,2936$), HVA ($p=0,8135$), HVA/DA ($p=0,7088$), 5HT ($p=0,2648$), 5HIAA ($p=0,0680$), 5HIAA/5HT ($p=0,6736$) – Figura 16.

Em relação ao hipotálamo, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: NOR ($p=0,5738$), VMA ($p=0,4721$), VMA/NOR ($p=0,3728$), DA ($p=0,9922$), DOPAC ($p=0,8109$), DOPAC/DA ($p=0,3525$), HVA ($p=0,2965$), HVA/DA ($p=0,2914$), 5HT ($p=0,5104$), 5HIAA ($p=0,3237$), 5HIAA/5HT ($p=0,5551$) – Figura 17.

Em relação ao hipocampo, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: NOR ($p=0,6095$), VMA ($p=0,1465$), VMA/NOR ($p=0,4716$), DA ($p=0,9850$), DOPAC ($p=0,9429$),

DOPAC/DA ($p=0,4316$), HVA ($p=0,6720$), HVA/DA ($p=0,7022$), 5HT ($p=0,9392$), 5HIAA ($p=0,7768$), 5HIAA/5HT ($p=0,3168$) – Figura 18.

Em relação ao corpo estriado, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: NOR ($p=0,8262$), DA ($p=0,8460$), DOPAC ($p=0,7230$), DOPAC/DA ($p=0,6538$), HVA ($p=0,4577$), HVA/DA ($p=0,6366$), 5HT ($p=0,7196$), 5HIAA ($p=0,3367$), 5HIAA/5HT ($p=0,2705$) – Figura 19.

Figura 16 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do córtex de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p>0,05$, teste t.

Figura 17 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipotálamo de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste t.

Figura 18 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipocampo de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste t.

Figura 19 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do corpo estriado de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste t.

Experimento 2: Avaliação dos efeitos do modelo de separação materna no comportamento e fisiologia da prole de machos adultos

A Figura 20 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no campo aberto dos filhotes machos na idade adulta de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: locomoção ($p=0,3529$), levantar ($p=0,2402$), *grooming* ($p=0,4629$), imobilidade ($p=0,3790$) e bolos fecais ($p=0,2885$).

Figura 20 – Parâmetros avaliados no campo aberto de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p>0,05$, teste t.

A Figura 21 mostra os resultados dos parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de filhotes machos na idade adulta de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: latência claro/escuro ($p=0,6661$), número de cruzamentos ($p=0,1176$), tempo no claro ($p=0,2061$) e tempo no escuro ($p=0,2061$).

Figura 21 – Parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste t.

A Figura 22 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no teste de interação social. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: farejar ($p=0,8048$), perseguir ($p=0,9455$), passar sob/sobre ($p=0,3927$) e tempo total de interação social ($p=0,8001$).

Figura 22 – Parâmetros avaliados de teste de interação social de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste t.

A Figura 23 mostra o resultado dos parâmetros avaliados no labirinto de Barnes. Em relação ao número de erros, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(1,14)=0,5889$, $p > 0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(4,56)=7,012$, $p < 0,001$), sem interação entre os fatores ($F(4,56)=0,8569$, $p > 0,05$). Em relação à latência, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(1,14)=0,2020$, $p > 0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(4,56)=21,00$, $p < 0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(4,56)=1,445$, $p > 0,05$).

Figura 23 – Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni.

A Figura 24 mostra os resultados do teste de nado forçado. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: latência para a primeira imobilidade ($p=0,3343$), tempo de imobilidade ($p=0,2817$) e tempo de mobilidade ($p=0,2817$).

Figura 24 – Parâmetros avaliados teste de nado forçado de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste t.

As Figuras 25-28 mostram os resultados da dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos dos filhotes machos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação na idade

adulta. Em relação ao córtex, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: NOR ($p=0,1360$), VMA ($p=0,5356$), VMA/NOR ($p=0,6405$), DA ($p=0,5649$), DOPAC ($p=0,1596$), DOPAC/DA ($p=0,0547$), HVA ($p=0,4128$), HVA/DA ($p=0,1204$), 5HT ($p=0,8399$), 5HIAA ($p=0,3480$), 5HIAA/5HT ($p=0,1827$) – Figura 25.

Em relação ao hipotálamo, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: NOR ($p=0,7378$), VMA ($p=0,4064$), VMA/NOR ($p=0,7519$), DA ($p=0,0520$), DOPAC ($p=0,0706$), DOPAC/DA ($p=0,2560$), HVA ($p=0,0739$), HVA/DA ($p=0,2328$), 5HT ($p=0,2057$), 5HIAA ($p=0,5047$), 5HIAA/5HT ($p=0,6582$) – Figura 26.

Em relação ao hipocampo, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados: NOR ($p=0,8841$), VMA ($p=0,3238$), VMA/NOR ($p=0,4402$), DA ($p=0,6389$), DOPAC ($p=0,3492$), HVA ($p=0,6325$), HVA/DA ($p=0,2949$), 5HT ($p=0,2557$), 5HIAA ($p=0,9465$) e 5HIAA/5HT ($p=0,2106$). O teste t mostrou que o grupo DPP apresentou menor taxa de *turnover* DOPAC/DA do que o grupo controle ($p=0,0083$) – Figura 27.

Em relação ao corpo estriado, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: NOR ($p=0,3131$), DA ($p=0,8490$), DOPAC/DA ($p=0,2111$), HVA ($p=0,5292$), HVA/DA ($p=0,3958$), 5HT ($p=0,2375$) e 5HIAA ($p=0,4019$). O teste t mostrou que os animais do grupo DPP apresentaram menor nível de DOPAC ($p=0,0110$) e menor taxa de *turnover* 5HIAA/5HT ($p=0,0244$) do que os animais do grupo controle – Figura 28.

Figura 25 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do córtex de filhotes machos adultos de ratos induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste t.

Figura 26 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipotálamo de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste t.

Figura 27 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipocampo de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

**p<0,01, teste t.

Figura 28 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do corpo estriado de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

*p<0,05, teste t.

1.5 DISCUSSÃO

A depressão é uma doença que ocorre em cerca de 250 milhões de pessoas de todas as idades (WHO, 2020; STRASBURGER et al., 2017). Um de seus subtipos, a depressão pós-parto, acarreta uma a cada sete mulheres (FRIEDMAN; RESNICK, 2009; XIA, 2016). Além de difícil diagnóstico e tratamento, quanto mais tempo a mãe passa sob esse estado, maiores as consequências para seus filhos, porém pouco se sabe dos mecanismos envolvidos nessa interação e quais os efeitos gerados por eles (SOHR- PRESTON; SCARAMELLA, 2006; AVAN et al., 2010; MURRAY et al., 2011).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as consequências da indução de depressão pós-parto em ratas lactantes através do modelo SM180. A indução da depressão foi realizada de acordo com o protocolo de separação materna sugerido por Vetulani (2013), no qual a mãe é separada dos filhotes por três horas diárias, durante 10 dias – DPN2 ao DPN12. Este modelo é um dos mais utilizados para o estudo dos efeitos da separação entre a mãe-prole, e, se tratando especificamente do modelo de três horas, atende aos critérios de modelo de depressão em humanos, gerando comportamentos tipo-depressivos que são influenciados pela alteração do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (VETULANI, 2013). Evidências demonstram que traumas e negligência durante a infância influenciam fortemente o comportamento emocional de adultos com risco para depressão, ansiedade e abuso de substâncias. Essas alterações também dificultam o tratamento, além de aumentar a comorbidade entre as doenças (VETULANI, 2013, HOLMES et al., 2005).

A prole de roedores apresenta uma alta dependência da mãe no início da vida, tendo como principal instrumento de interação a boca, ingerindo o saco amniótico após o parto, recolhendo-os para o ninho e estimulando a região anogenital para micção e defecação (CRUZ, 2009; MAYER; ROSENBLATT, 2984; BRIDGES, 2015; LONSTEIN; LÉVY; FLEMING, 2015). As lambidas da mãe também estimulam o desenvolvimento do hipocampo, afetando o aprendizado espacial e a memória e reduzindo a resposta do eixo HPA ao estresse (VETULANI, 2013). Além disso, a mãe também prove a alimentação através da amamentação e o controle da temperatura corporal.

No presente trabalho, uma vez que os filhotes não conseguem manter a temperatura corporal ideal sem a ajuda da mãe, durante a separação, estes foram mantidos sobre uma manta térmica à $32^{\circ}\text{C} \pm 2$ e, a fim de diminuir o estresse causado por novos ambientes – principalmente através do tato e do olfato, principais sentidos disponíveis à prole nos primeiros dias de vida – a caixa pequena foi forrada com maravalha da caixa moradia, mantendo a textura já conhecida e o cheiro da mãe.

A literatura aponta que pequenas variações durante os primeiros dias pós-natais de ratos, como mudança de temperatura, disponibilidade de comida e menor frequência de cuidado materno, têm consequências duradouras no comportamento defensivo, emocional e na resposta ao estresse (LEVINE, 1957; DENENBERG, OTTINGER, STEPHENS, 1962; PLOTSKY, MEANEY, 1993). Filhotes expostos à SM180 apresentam hiper-responsividade no eixo HPA por toda a vida. Estas alterações causam estados tipo depressivos e de ansiedade, anedonia e inclinação para maior ingestão de etanol. Foi identificado no cérebro desses animais um aumento do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e da expressão de seu gene, alteração no sistema monoaminérgico e mudanças nos receptores de GABA e ocitocina em diversas áreas do cérebro, associados com ansiedade, hipervigilância, preferência por etanol e comprometimento leve na cognição. Porém, segundo Holmes (2005), apenas alguns estudos mostraram que a SM180 nos primeiros dias de vida, causou aumento permanente de comportamentos tipo ansiosos na prole, quando testados durante a vida adulta.

No presente trabalho foi feita avaliação do ganho de peso e desenvolvimentos físico e reflexológico da prole. Na análise de peso e ganho de peso, nossos resultados não mostraram diferenças entre o grupo controle e DPP, apontando apenas o ganho de peso ao longo do tempo, indicando o crescimento dos animais sem interferências causadas pela SM180.

Os parâmetros do desenvolvimento físico estão relacionados à presença do fator de crescimento epidérmico (EGF), isolado e descrito por Cohen, em 1962. Este é um polipeptídio com ação divisora e de diferenciação celular de tecidos epidérmicos, promovendo a abertura dos olhos, a erupção dos dentes incisivos, crescimento de pelo e o desdobramento da orelha (CAMARGO, 2014). A descida de testículos aponta o início da maturação sexual em ratos machos.

Essa maturação é resultado da interação ente hipotálamo, hipófise anterior, os testículos e os órgãos sexuais secundários (NEGRO-VILLAR; OJEDA; MCCANN, 1973), onde o primeiro evento é a mudança de sensibilidade no eixo hipotálamo-hipófise com *feedback* negativo para os andrógenos (SMITH; DAMASSA; DAVISON, 1989). Uma vez que a puberdade tem início, há aumento no nível e/ou liberação de gonadotrofina, o que aumenta a secreção de testosterona pelas células de Leydig, até alcançar um novo equilíbrio (SODERSTEIN; ENEROTH, 1984; CAMARGO, 2014). Os resultados deste trabalho não apontaram diferenças em relação ao grupo controle e ao grupo DPP nos parâmetros avaliados no desenvolvimento físico, indicando que o modelo SM180 não acarretou em atrasos no desenvolvimento físico.

A avaliação do desenvolvimento reflexológico foi proposto por Fox (1965), uma vez que os reflexos e as respostas de um recém-nascido permitem que ele reaja ao ambiente em que vive, são instintivos e servem para protegê-lo. Durante a ontogenia, o controle da postura depende de diversos processos neurobiológicos e da percepção do mundo. O desenvolvimento postural é um pré-requisito para o desenvolvimento motor e interfere intimamente com o desenvolvimento cognitivo e a comunicação verbal e não verbal (ALTMAN; SUDARSHAN, 1975; SILVA, et al., 1987). O reflexo de endireitamento postural, geotaxia negativa e o andar adulto são guiados pelo sistema motor e pelo sistema vestibular. Este começa a se desenvolver logo após o nascimento, mas é dificultado pela imaturidade do sistema motor. Já o reflexo de preensão palmar, também conhecido como reflexo de Babinski, pode indicar a presença de danos nos nervos que conectam a medula espinhal ao cérebro, quando encontrado em crianças com mais de dois anos de idade. Este reflexo também acontece em roedores. Quanto ao reflexo de sobressalto, este indica a abertura dos ductos auditivos, possibilitando a percepção de sons do ambiente (ALTMAN; SUDARSHAN, 1975). Nenhum dos parâmetros avaliados no presente trabalho mostrou diferenças entre o grupo controle e o grupo DPP, indicando que a SM180 não acarretou em atrasos no desenvolvimento reflexológico da prole.

Para a avaliação comportamental foram utilizados os testes de campo aberto, caixa claro/escuro, interação social, labirinto de Barnes e nado forçado. O campo aberto foi utilizado para avaliação da atividade geral. Ele também serve

como uma forma de avaliação do sistema vestibular através da locomoção dos animais. Inicialmente o campo aberto foi empregado por Hall (1934) para aferição da taxa de defecação, relacionando esta com a emocionalidade dos animais (WALSH; CUMMINS, 1976). Mais tarde, novos parâmetros de avaliação foram incorporados ao teste. A movimentação é utilizada como parâmetro da atividade geral do animal. Pelo fato de locais abertos serem aversivos aos ratos, alguns animais podem apresentar alto grau de ansiedade e ficarem imóveis num único ponto do aparato; Archer (1973) ressaltou que o medo do animal é inversamente proporcional à exploração. Além da locomoção também são utilizados os parâmetros de levantar e *grooming*. O levantar indica, também, a exploração do animal no aparato, porém verticalmente, enquanto o *grooming*, comportamento de autolimpeza do animal, indica diminuição do medo e habituação ao ambiente em que ele se encontra.

No presente estudo o campo aberto foi utilizado na infância e na idade adulta, a fim de monitorar possíveis alterações do sistema vestibular, do sistema motor, de ansiedade e de emocionalidade. Os animais avaliados na infância e na idade adulta não foram os mesmos, para não interferir com a habituação ao teste e também possibilitar a análise neuroquímica em ambas as idades. Não houve diferença em nenhum dos parâmetros avaliados no teste, nem na infância e nem na idade adulta, mostrando que a SM180 não alterou o comportamento geral da prole ligado aos sistemas vestibular e motor, à ansiedade e à emocionalidade no teste de campo aberto.

A caixa claro/escuro é utilizada para aferir a ansiedade dos animais. O modelo se baseia na aversão natural de roedores a um novo ambiente e um agente estressor leve, como a luminosidade (CRAWLEY, 1980). A passagem entre os compartimentos vem sendo utilizada como um índice de ansiedade, assim como o tempo gasto em cada compartimento, sendo que, quanto maior o tempo gasto na parte escura, maior o efeito ansiogênico (CRAWLEY, 1981; BOURIN; HASCOËT, 2003).

Nossos resultados apontam que durante a infância, o grupo DPP teve o parâmetro de cruzamentos aumentado em relação ao grupo controle, o que poderia indicar que esses animais estavam mais ansiosos. Porém, o tempo gasto nos compartimentos claro e escuro não mostraram diferenças, assim como o

teste do campo aberto que, apesar de não ser um teste específico para ansiedade, poderia corroborar essa diferença; e, como discutido adiante, na análise neuroquímica também não houve alterações que indiquem que esses animais estavam ansiosos durante a infância. Essa diferença não foi encontrada nos animais adultos nos parâmetros avaliados no teste, não tendo sido persistente durante o amadurecimento dos animais. Logo, é possível concluir que a SM180 não foi capaz de causar efeitos ansiogênicos no nível comportamental da prole.

O teste de interação social foi validado por File e Hyde (1979) e tem como objetivo avaliar a ansiedade dos animais, uma vez que a ansiedade é incompatível com a interação social. O teste se utiliza de um comportamento natural dos animais, necessário para manter a hierarquia do grupo e encontrar parceiros para acasalamento (LAPIZ-BLUHM et al., 1999; KAIDANOVICH-BEILIN et al., 2011). Problemas de interação social estão associados com diversas doenças neuropsiquiátricas como depressão, distúrbios do espectro autista, transtorno bipolar, entre outros (KAIDANOVICH-BEILIN et al., 2011).

Para diminuir o estresse causado por um ambiente novo, os animais foram habituados ao campo aberto no primeiro dia. No segundo dia, foram habituados com seus parceiros de teste e no terceiro dia foi avaliada a interação social dos animais. Os resultados obtidos não apontaram nenhuma diferença nesse comportamento social entre os grupos controle e DPP, indicando que a SM180 não foi capaz de alterar a sociabilidade nem a ansiedade da prole.

O labirinto de Barnes foi proposto por Carol Barnes, em 1979, e tem como objetivo avaliar o aprendizado e a memória declarativa espacial de ratos (BARNES, 1979; ROSENFELD; FERGUSON, 2014). Este teste tem sido um dos mais utilizados para tal finalidade, uma vez que o labirinto aquático de Morris é considerado mais ansiogênico para os animais. O teste consiste no animal aprender o local da caixa escape, uma vez que, apesar de possuírem hábitos exploratórios, preferem ambientes escuros e fechados (HARRISON et al., 2006).

A busca e memorização da caixa escape foi auxiliada por indicações visuais extra labirinto, e os animais, com o decorrer do teste, passaram a procurar a caixa escape de forma sequencial e não aleatória ou indo diretamente a ela. No presente trabalho, tanto os animais controle quanto os animais DPP

se comportaram conforme esperado: com o passar das sessões, diminuíram o tempo e o número de erros até adentrar a caixa escape. Desta forma, é possível concluir que a SM180 não foi capaz de alterar o aprendizado nem a memória declarativa espacial da prole.

O teste de nado forçado foi proposto por Porsolt em 1978 como uma validação para fármacos antidepressivos, uma vez que estes tendem a diminuir a imobilidade dos animais no teste, e, atualmente, é um dos testes mais utilizados para a avaliação de depressão. O teste consiste em colocar o animal numa cuba com água a 25°C, de onde eles não conseguem escapar. Ao longo do teste, os animais tendem a ficarem mais imóveis; a postura de imobilidade dos animais se dá quando estes passam a flutuar realizando o mínimo de movimentos possíveis para manter o focinho acima da água, permitindo a respiração. Animais depressivos tendem a ficar mais imóveis e, eventualmente, podem desistir de nadar (BOGDANOVA et al., 2013; YANKELEVITCH-YAHAV et al., 2015). Para evitar que os resultados obtidos no teste sejam causados pelo estresse do ambiente e do teste em si, os animais foram habituados 24 horas antes, na mesma cuba, com água a 25°C, durante 5 minutos.

Como discutido anteriormente, animais expostos a SM180 são mais propensos a desenvolverem depressão e ansiedade devido aos distúrbios causados durante o período pós-natal. Porém, nossos animais não foram expostos a estresses suficientes para desencadear tais distúrbios e, conseqüentemente, não se mostraram presentes no teste.

É válido relatar que nos testes de nado forçado realizados neste trabalho, ambos os grupos apresentaram comportamentos similares de flutuação imediatamente após serem colocados na água. Por causa disso, a latência para primeira imobilidade, quando imediata, foi padronizada para 1 segundo, ficando mais fácil a visualização estatística da mesma. Tal comportamento pode ter sido causado pelo tamanho da cuba utilizada no teste. Os animais utilizados já eram adultos e alguns conseguiam flutuar e se manter na superfície da água encostando a cauda nas paredes do aparato. Como todos os animais, de ambos os grupos, apresentaram comportamento similar, o teste não foi invalidado. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que não houve diferença no comportamento dos animais da SM180 em relação ao grupo controle no teste de

nado forçado, indicando que o modelo não causou distúrbios do tipo depressivo nesses animais.

A depressão é uma doença multifatorial que prejudica diversas vias neurobiológicas envolvidas com os sistemas das monoaminas. A hipótese das monoaminas foi formulada com base em estudos de antidepressivos tricíclicos e da monoamina oxidase, que mostram aumento de curto prazo nas concentrações de dopamina, noradrenalina e serotonina, e é utilizada como referência para os mecanismos neuroquímicos da depressão (CLEARE, 2004; FERRARI; VILLA, 2017).

Após o teste do nado forçado, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para a coleta de diferentes regiões do encéfalo para a dosagem de neurotransmissores cerebrais: córtex pré-frontal, hipotálamo, hipocampo e corpo estriado. As regiões cerebrais escolhidas para dosagem foram baseadas no trabalho de Stahl (2003), que relacionou os principais sintomas da depressão com diferentes áreas cerebrais: o córtex pré-frontal com humor deprimido, tristeza e problemas de concentração; o hipotálamo com distúrbios do sono, alterações de peso e apetite e perda de interesse e prazer; o hipocampo com perda de interesse e prazer; e o corpo estriado com fadiga, perda de energia e agitação ou retardo psicomotor.

Os sintomas mais característicos da depressão, a tristeza profunda e o humor negativo, estão relacionados com a atividade anormal dessas três monoaminas no córtex pré-frontal (DAVIDSON et al., 2002; LEVESQUE et al., 2003; DAVIES et al., 2003). Além disso, Nutt et al. (2007) desenvolveram um modelo hipotético que correlaciona cada neurotransmissor monoaminérgico com os diferentes sintomas da depressão. Nesse modelo, a serotonina e a noradrenalina são responsáveis pelos sintomas de efeito negativo como culpa, irritabilidade, medo e ansiedade, e a dopamina e a noradrenalina associadas à perda de sensações positivas como prazer, motivação, interesse e energia.

O córtex pré-frontal está localizado no lobo frontal, região anterior do cérebro, e se conecta com diferentes regiões do encéfalo, desempenhando o papel de funções complexas como julgamentos, planejamento motor e pensamento fundamentado (SEMRUD-CLIKEMAN; ELLISON, 2009; DAMASIO; ANDERSON, 2003)

O hipotálamo é uma estrutura que exerce funções endócrinas e comportamentais, como o controle hormonal através do eixo hipotálamo-hipófise, regulação da temperatura corporal, ingestão de alimentos, comportamento sexual, manutenção da homeostase e mediação de respostas emocionais (GUYTON; HALL, 2002).

O hipocampo tem papel importante na cognição e integra o sistema límbico, sendo dividido em duas grandes regiões: a dorsal, responsável pelo aprendizado-memória e a ventral, relacionada com as emoções (FANSELOW; DONG, 2010), estando ligado a distúrbios psicológicos como a depressão e o transtorno bipolar (DONNE et al., 2008).

O corpo estriado faz parte dos núcleos da base e participa do controle de movimentos voluntários, e também está ligado ao sistema de recompensas e a tomada de decisões (HIKOSAKA; TAKIKAWA; KAWAGOE, 2000; BÁEZ-MENDOZA; SCHULTZ, 2013; DO et al., 2016).

No presente trabalho, o resultado da análise neuroquímica da prole jovem não apontou alterações em nenhuma das estruturas. Na prole adulta, o córtex e o hipotálamo também não apresentaram alterações, porém o hipocampo do grupo DPP apresentou diminuição da taxa de *turnover* de DOPAC/DA em relação ao grupo controle, enquanto no corpo estriado houve uma diminuição nos níveis de DOPAC e na taxa de *turnover* de 5HIAA/5HT.

Os resultados do corpo estriado, tanto da prole jovem quanto da prole adulta não apresentaram dados do metabólito VMA, impossibilitando a análise do *turnover* de VMA/NOR.

As alterações encontradas no nosso trabalho podem ser explicadas pelos efeitos da SM180 na prole, uma vez que o modelo descreve maior sensibilidade ao estresse e propensão no desenvolvimento de depressão e ansiedade (VETULANI, 2013). Foi encontrado em fêmeas que passaram pelo modelo de separação materna, alterações ligadas ao sistema monoaminérgico, principalmente o dopaminérgico mesolímbico (HALL et al., 1999; MAENEY et al., 2002; BREAK et al., 2004; ARBORELIUS; EKLUND, 2007). Break (2004) mediu a densidade de receptores e os sítios de transporte de dopamina no núcleo *accumbens* e no corpo estriado de animais que passaram pelo modelo de

separação materna e encontrou menor disponibilidade destes. Apesar disso, na literatura há poucos trabalhos que examinaram os efeitos da SM180 na prole no âmbito neuroquímico, sendo maioria deles com fêmeas. Nossos achados corroboram os achados de Break (2004) e Arborelius e Eklund (2007), sugerindo que a SM180 pode afetar os sistemas monoaminérgicos na idade adulta. Seriam necessários mais estudos a fim de elucidar tais alterações, tanto na prole feminina quanto na masculina.

1.6 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram que o modelo de separação materna por 3 horas:

- Não foi capaz de alterar o peso nem o ganho de peso da prole;
- Não atrasou o desenvolvimento físico nem o desenvolvimento reflexológico da prole;
- Não alterou o funcionamento do sistema vestibular, do sistema motor, nem implicou num aumento ou diminuição de ansiedade e emocionalidade da prole, na infância e na idade adulta, testados no campo aberto;
- Não alterou a ansiedade da prole, na infância nem na idade adulta, medida no teste da caixa claro/escuro;
- Não foi capaz de alterar a sociabilidade nem a ansiedade da prole, na idade adulta, no teste de interação social;
- Não alterou o aprendizado nem a memória declarativa espacial da prole, na idade adulta, no teste do labirinto de Barnes;
- Não causou distúrbios do tipo depressivo na prole medidos no teste do nado forçado;
- Não promoveu alterações nos níveis de neurotransmissores da prole na infância;
- Alterou os níveis de neurotransmissores no hipocampo e no corpo estriado da prole adulta.

CAPÍTULO 2

2.1 INTRODUÇÃO

A cetamina (2-(2-clorofenil)-2-(metilamino)ciclohexanona) é um fármaco anestésico, sintetizado pela primeira vez pelo americano Calvin Stevens em 1962 no laboratório Parke & Davis (ROFAEL; ABDEL-RAHMAN, 2002; SILVA et al., 2010). Essa substância foi desenvolvida como substituto do anestésico fenciclidina que, apesar de ser seguro e confiável para o uso clínico, causava delírios intensos e prolongados, o que acabou tornando-o indesejável para o uso em seres humanos (LI; VLISIDES, 2016).

O primeiro estudo com cetamina em seres humanos foi conduzido em 1964 e, em 1970, essa substância foi introduzida no mercado para seu uso clínico (PELTONIEMI et al., 2016). Inicialmente foi empregada como anestésico de uso militar, sedativo para crianças em procedimentos cirúrgicos e na medicina veterinária (BHUTTA, 2007).

Atualmente a cetamina é utilizada em cirurgias pediátricas, obstetras, cardiovasculares, de trauma e em pacientes com queimaduras para analgesia na medicina humana e para anestesia de pequena duração, além da analgesia em diversas espécies de animais, como felinos, caninos, equinos, ruminantes e espécies exóticas (ROFAEL; ABDEL-RAHMAN, 2002; SELLERS et al., 2010). A cetamina pode ser usada isoladamente ou em conjunto com outra substância anestésica (SELLERS et al., 2010).

Esse fármaco produz um efeito de anestesia dissociativa, que provoca perda sensorial e anestesia no paciente, bem como amnésia e paralisia dos movimentos, sem haver perda real da consciência (BERGMAN, 1999). Os pacientes ficam inconscientes e catalepticos ou parcialmente inconscientes, tendo seus reflexos respiratórios preservados, mas sendo incapazes de responder a estímulos sensoriais (BERGMAN, 1999; LI; VLISIDES, 2016). Os estímulos sensoriais atingem as áreas sensoriais corticais, porém não há resposta devido à supressão das áreas de associação cerebral (BHUTTA et al., 2007). Esse efeito da cetamina é um estado único, que fica entre a sedação profunda e a anestesia (BERGMAN, 1999). Esse estado é resultado da dissociação funcional e eletrofisiológica entre os sistemas tálamo-neocortical e límbico (SILVA et al., 2010).

A cetamina atua em diversos tipos de receptores no sistema nervoso central, dentre eles os receptores glutamatérgicos (NMDA) e não-NMDA, opióides, de monoaminas, gabaérgicos e em canais de cálcio voltagem-dependente (HIROTA; LAMBERT, 1996; ROFAEL; ABDEL-RAHMAN, 2002; SILVA et al. 2010).

A principal ligação da cetamina ocorre com o receptor glutamatérgico NMDA, que é acoplado a um canal iônico com propriedades excitatórias (HIROTA; LAMBERT, 1996). A cetamina é um antagonista não competitivo dos canais de cálcio; uma vez ligado ao receptor há o bloqueio do influxo de cálcio, o que faz com que não ocorra a despolarização da célula (HIROTA; LAMBERT, 1996; BERGMAN, 1999).

A atuação da cetamina sobre os receptores glutamatérgicos não-NMDA ocorre provavelmente através do sistema glutamato/óxido nítrico/GMPc. A ativação dos receptores não-NMDA estimula a produção de óxido nítrico, que por sua vez, aumenta a concentração de GMPc. A cetamina inibe os receptores não-NMDA e, conseqüentemente, inibe a ação da enzima óxido nítrico sintetase, necessária para formação de óxido nítrico (GONZALES, et al. 1995). A inibição dessa enzima parece desempenhar papel importante na ação analgésica da cetamina, além de desempenhar um possível papel neuroprotetor e ativar o sistema parassimpático (SILVA et al., 2010).

2.1.1 Uso da cetamina como antidepressivo

A cetamina vem sendo bastante estudada para o uso como antidepressivo. Estudos clínicos utilizando uma única infusão de cetamina (0,5 mg/kg) administrada por via intravenosa por um período de 40 minutos diminuiu os sintomas da depressão em pacientes por cerca de uma semana (ZARATE et al., 2006). Os efeitos antidepressivos da cetamina aparecem cerca de 4 horas após sua administração por via intravenosa (ABDALLAH et al., 2016).

Como os efeitos da administração aguda de cetamina são transitórios, alguns estudos vêm sendo feitos para avaliar os efeitos dessa substância em uma administração crônica. Num desses estudos clínicos, observou-se que a administração oral de cetamina por 28 dias resultou em um efeito antidepressivo

prolongado, não sendo relatados efeitos psicomiméticos, porém, com efeitos colaterais, como perturbações no sono e diarreia (IRWIN et al., 2013).

Em outro estudo com pacientes bipolares, observou-se que a administração de cetamina, por via sublingual, promoveu melhora no humor em 70% dos pacientes, com efeito rápido após a administração (BROWNE; LUCKI, 2013).

Abdallah e colaboradores (2016), em trabalho de revisão, mostram que a administração de repetidas doses de cetamina podem estender os efeitos antidepressivos dessa substância; a administração de 0,5 mg/kg de cetamina três vezes por semana durante duas semanas, prolongaram os efeitos antidepressivos da cetamina.

Estudos em animais mostraram que essa substância apresentou efeitos ansiolíticos e antidepressivos em roedores submetidos a modelos de ansiedade e depressão, como natação forçada, suspensão pela cauda, anedonia e labirinto em cruz elevado, semelhante aos efeitos dos antidepressivos clássicos (YILMAZ et al. 2002; MAENG et al., 2008; GARCIA, 2008; DREWNIAKY et al., 2015). A administração de dose única de cetamina em ratos machos interferiu no comportamento desses animais por até 10 dias depois de sua administração (YILMAZ et al. 2002).

Em relação ao uso da cetamina como terapia para a depressão pós-parto, foram encontrados apenas quatro artigos investigando seus efeitos. Dois desses trabalhos foram realizados em humanos; o trabalho de Xu e colaboradores (2017) investigou se uma dose intravenosa de cetamina 0,25 mg/kg logo após o parto fosse capaz de prevenir depressão pós-parto, e não encontrou diferenças nos pacientes que receberam o fármaco e os que não receberam, já o trabalho de Ma e colaboradores (2019) também investigou se uma única dose de 0,5 mg/kg logo após o parto seria capaz de prevenir a depressão pós-parto, e sugere que o fármaco funciona como um profilático contra a depressão pós-parto.

Os outros dois trabalhos encontrados foram feitos em roedores. Wu et al. (2016) investigou se uma dose única de cetamina 30 mg/kg na prole de camundongos que tiveram depressão pós-parto, poderia reverter a via Akt-mTOR no hipocampo desses animais e concluiu que o prejuízo visto nos animais

que não receberam o fármaco foi revertido. O segundo trabalho foi realizado pelo mesmo grupo com a mesma dose de cetamina, mas investigaram se os efeitos da depressão pós-parto seriam revertidos pelo fármaco na sinalização de Akt-mTOR através dos receptores NMDA do hipocampo, e concluíram que os efeitos anormais na sinalização molecular foram revertidos (XIA et al., 2016). A escassez de trabalhos reforça a importância de mais estudos sobre os efeitos desse medicamento com essa finalidade.

O tratamento farmacológico para depressão tem aumentado e se modificado nas últimas décadas explorando novos alvos moleculares e sistemas de neurotransmissão. Atualmente a estratégia farmacológica mais utilizada na terapêutica explora principalmente o sistema indolaminérgico, visando principalmente a serotonina e seus receptores como alvo central. Entretanto, as novas tendências farmacológicas visam fármacos que possuam mecanismo de ação misto, ou seja, utilizem mais de uma via ou mais de um mecanismo para sua ação.

Dentre os diversos tipos de depressão, a depressão pós-parto possui como fator complicador a relação mãe-progênie, uma vez que esse vínculo é fundamental para o desenvolvimento geral da progênie; sendo assim, é necessário avaliar as consequências do tratamento farmacológico sob essas condições.

Levando em consideração que há uma tendência para a ampliação do uso clínico da cetamina como antidepressivo, incluindo o tratamento de depressão pós-parto e que há poucas informações a respeito da dose e via de administração ideal para esse uso, bem como a segurança e eficácia de um tratamento durante o período pós-natal, tornam-se necessários mais estudos sobre o uso desse fármaco com essa finalidade, a fim de contribuir com o seu uso clínico mais seguro.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho é estudar as implicações da exposição materna à cetamina no desenvolvimento da prole.

2.2.2 Objetivos específicos

Estudar as implicações da exposição materna à cetamina na prole, avaliando:

- O desenvolvimento físico e reflexológico;
- O comportamento no campo aberto e na caixa claro/escuro, tanto na infância quanto na idade adulta;
- A interação social e o comportamento no labirinto de Barnes e teste de nado forçado na idade adulta;
- Os níveis de neurotransmissores e seus diferentes metabólitos em diferentes regiões do sistema nervoso central;
- Exames hematológico e bioquímico sérico.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas Wistar, provenientes do Biotério do ICB/USP. Os animais foram alojados em gaiola de polipropileno (41 x 34 x 18 cm) com cama de maravalha autoclavada, mantidas em uma sala com umidade relativa do ar de 55% $\pm$ 10 e temperatura de 22°C $\pm$ 2, com o ciclo de doze horas de claro e escuro (luz acesa às 6h00). Os animais tiveram água e comida *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

Esse estudo foi aprovado pela CEUA da FMVZ/USP, sob o protocolo de número 6342230118. Parte dos experimentos foram realizados na UPM, sendo aprovado pelo CEUA UPM sob o protocolo de número 168-04-2018.

2.3.2 DROGA

Foi empregada a cetamina (Quetamina injetável Vetnil® para cães e gatos – frasco com 100 mg/ml). A cetamina foi diluída em solução salina (NaCl 0,9%) a cada dois dias e conservada em frasco âmbar na geladeira. As doses empregadas foram 5, 10 e 20 mg/kg de cetamina, administrada por via intraperitoneal (PARISE et al., 2013), que são consideradas doses subanestésicas. Os animais do grupo controle receberam apenas solução salina pela mesma via e volume (1ml/kg).

2.3.3 PROCEDIMENTOS

2.3.3.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

O acasalamento e o diagnóstico de prenhez foram feitos como descrito no Capítulo 1, item 1.3.3.1.

2.3.3.2 Indução da depressão

A indução da depressão foi feita como descrito no Capítulo 1, item 1.3.3.2.

2.3.3.3 Desenvolvimento físico

O desenvolvimento físico da prole foi feito como descrito no Capítulo 1, item 1.3.3.3.

2.3.3.4 Desenvolvimento reflexológico

O desenvolvimento reflexológico da prole foi feito como descrito no Capítulo 1, item 1.3.3.4.

2.3.3.5 Avaliação comportamental

A avaliação comportamental foi realizada como descrito no Capítulo 1, item 1.3.3.5.

2.3.3.6 Dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos

A dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos foi realizada como descrito no Capítulo 1, item 1.3.3.6.

2.3.3.7 Bioquímica sérica

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para a coleta de sangue para análise da bioquímica sérica. O sangue foi coletado em tubo com o anticoagulante EDTA e mantido em temperatura ambiente por 30 minutos para a retração do coágulo. Em seguida, o material foi centrifugado a 4.000 rpm (centrífuga Eppendorf®-5804 R) por 10 minutos. Após a centrifugação o soro foi coletado e armazenado em freezer à temperatura de -80°C para posterior análise. Os parâmetros analisados foram: albumina, alanina aminotransferase (ALT-TGP), aspartato transaminase (AST-TGO), colesterol, creatinina, fosfatase alcalina (FAL), gama glutamil transpeptidase (GGT), glicose, proteína total, triglicérides e ureia UV. Essa análise foi feita no equipamento ChemWell-T da empresa Intertek, utilizando os kits comerciais da mesma marca, Intertek katal, obedecendo as instruções do fabricante.

2.3.3.8 Hemograma

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para a coleta de sangue para análise do hemograma completo na prole adulta. O sangue foi coletado em tubo com o anticoagulante EDTA e a análise foi feita por meio do sistema automatizado ABX VET®, HORIBA. Os parâmetros analisados foram: leucócitos, hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e plaquetas.

2.3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

2.3.4.1 Experimento 1: Avaliação dos efeitos antidepressivos do tratamento prolongado de cetamina no comportamento e fisiologia da prole de machos jovens de mães induzidas a depressão pelo modelo de separação materno

Quarenta ratas lactantes foram divididas em quatro grupos, como mostra o Quadro 2 (n=10 fêmeas/grupo). As fêmeas foram induzidas à depressão através do modelo de separação materna do dia pós-natal DPN2 ao DPN12. O tratamento com solução salina ou diferentes doses de cetamina foi feito por via intraperitoneal durante o período de lactação, do DPN2 ao DPN21.

Quadro 2 – Divisão dos grupos experimentais.

Grupo	Tratamento
Salina	Solução salina 0,9%
Ceta 5	Cetamina 5 mg/kg
Ceta 10	Cetamina 10 mg/kg
Ceta 20	Cetamina 20 mg/kg

Fonte: Gabriel Ramos de Abreu (2020)

No DPN2 as ninhadas foram padronizadas para 8 filhotes por mãe (4 fêmeas e 4 machos, sempre que possível) e foram realizadas observações para a detecção de possíveis malformações externas. Do DPN2 ao DPN21 foram realizadas as observações do desenvolvimento físico e reflexológico de todos os filhotes machos da ninhada. No DPN21 foi realizado os testes de campo aberto e caixa claro/escuro em um filhote macho, escolhido de forma aleatória. Ao final

do último teste, os animais foram eutanasiados para coleta de estruturas cerebrais e sangue para as análises neuroquímica e bioquímica sérica.

2.3.4.2 Experimento 2: Avaliação dos efeitos antidepressivos do tratamento prolongado de cetamina no comportamento e fisiologia da prole de machos jovens de mães induzidas a depressão pelo modelo de separação materno

Um filhote macho de cada ninhada das mães do experimento 1 foi escolhido de forma aleatória para ser submetido aos testes comportamentais na idade adulta (Quadro 3). No DPN90, após o último teste comportamental os animais foram eutanasiados para coleta de estruturas cerebrais e sangue para as análises neuroquímica, bioquímica sérica e hemograma.

Quadro 3 – Testes comportamentais realizados na prole masculina na idade adulta de ratas submetidas ao modelo de depressão pós-parto por separação materna e tratadas com cetamina durante a lactação.

Teste Comportamental	DPN
Campo Aberto	60
Caixa claro/escuro	60
Interação social	61 e 62
Labirinto de Barnes	85 a 90
Nado forçado	90

Fonte: Gabriel Ramos de Abreu (2020)

2.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi empregado o software GraphPad Prism 6® (GraphPad software, Inc., San Diego, California, USA) para a realização das análises estatísticas. O teste de Bartlett foi utilizado para a verificação da homocedasticidade dos dados. Para os dados paramétricos foi utilizado a ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett, quando tinha apenas um fator (tratamento) a ser avaliado e ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni, quando tinham dois fatores (tratamento e tempo) a serem avaliados. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunns. O nível de significância para todas as análises foi de $p < 0,05$.

2.4 RESULTADOS

Experimento 1: Avaliação dos efeitos antidepressivos do tratamento prolongado de cetamina no comportamento e fisiologia da prole de machos jovens de mães induzidas a depressão pelo modelo de separação materno.

A Figura 29 mostra os resultados do acompanhamento do peso e ganho de peso semanal dos animais. Em relação ao peso dos animais, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,28)=0,5350$, $p>0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(19,532)=3260$, $p<0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(57,532)=0,7517$, $p>0,05$). Em relação ao ganho de peso semanal, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,28)=0,4156$, $p>0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(2,56)=423,9$, $p<0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(6,56)=1,046$, $p>0,05$).

Figura 29 – Acompanhamento do peso e ganho de peso semanal (em gramas) de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni.

A Figura 30 mostra os parâmetros do desenvolvimento físico dos filhotes machos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina durante a lactação. O teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças estatísticas significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros observados: desdobramento de orelha ($p=0,4766$), erupção de dentes incisivos ($p=0,8122$), abertura dos olhos ($p=0,5441$), aparecimento dos pelos ($p=0,9711$), andar adulto ($p=0,9406$) e descida dos testículos ($p=0,5896$).

Figura 30 – Parâmetros avaliados no desenvolvimento físico de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis.

A Figura 31 mostra os parâmetros do desenvolvimento reflexológico da prole masculina de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina durante a lactação. O teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças estatísticas significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros observados: preensão palmar ($p=0,6254$), endireitamento postural ($p=0,2248$), geotaxia negativa ($p=0,9020$) e sobressalto ($p=0,8270$).

Figura 31 – Parâmetros avaliados no desenvolvimento reflexológico de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis.

A Figura 32 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no campo aberto dos filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina durante a lactação. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: locomoção ($F(3,28)=2,074$, $p > 0,05$), levantar ($F(3,28)=1,766$, $p > 0,05$), *grooming* ($F(3,28)=1,811$, $p > 0,05$), imobilidade ($F(3,28)=1,227$, $p > 0,05$) e bolos fecais ($F(3,28)=2,109$, $p > 0,05$).

Figura 32 – Parâmetros avaliados no campo aberto de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

A Figura 33 mostra os resultados dos parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina durante a lactação. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos parâmetros latência claro/escuro ($F(3,28)=1,581$, $p > 0,05$), tempo no claro ($F(3,28)=1,350$, $p > 0,05$) e tempo no escuro ($F(3,28)=1,440$, $p > 0,05$), mas mostrou diferenças significantes no parâmetro número de cruzamentos entre os compartimentos ($F(3,28)=8,405$, $p < 0,01$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais de todos os grupos que receberam cetamina apresentaram diminuição no número de cruzamento entre os compartimentos em comparação com os animais do grupo salina ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente).

Figura 33 – Parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

*p<0,05, **p<0,01, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

As Figuras 34-37 mostram os resultados da dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos dos filhotes machos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina durante a lactação. Em relação ao córtex, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: NOR ($F(3,28)=0,06563$, $p>0,05$), VMA ($F(3,28)=0,8020$, $p>0,05$), VMA/NOR ($F(3,28)=2,266$, $p>0,05$), DA ($F(3,28)=1,888$), DOPAC ($F(3,28)=0,6702$, $p>0,05$), DOPAC/DA ($F(3,28)=1,902$, $p>0,05$), HVA ($F(3,28)=4,629$, $p>0,05$), HVA/DA ($F(3,28)=3,217$, $p>0,05$), 5HT ($F(3,24)=1,129$, $p>0,05$), 5HIAA ($F(3,28)=0,6847$, $p>0,05$), 5HIAA/5HT ($F(3,24)=0,5314$, $p>0,05$) – Figura 34.

Em relação ao hipotálamo, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados: NOR

($F(3,28)=0,8659$, $p>0,05$), VMA ($F(3,28)=1,639$, $p>0,05$), DOPAC ($F(3,28)=0,6820$, $p>0,05$), DOPAC/DA ($F(3,28)=4,762$, $p>0,05$), HVA ($F(3,28)=1,726$, $p>0,05$), 5HT ($F(3,28)=1,346$, $p>0,05$), 5HIAA ($F(3,28)=2,903$, $p>0,05$), 5HIAA/5HT ($F(3,28)=0,8596$, $p>0,05$). A ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes nos parâmetros VMA/NOR ($F(3,28)=2,488$, $p<0,01$), DA ($F(3,28)=3,564$, $p<0,05$), HVA/DA ($F(3,28)=4,090$, $p<0,01$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais do grupo cetamina 5 tiveram aumento das taxas de *turnover* VMA/NOR ($p<0,01$) e HVA/DA ($p<0,05$) diminuição dos níveis de DA ($p<0,05$). O pós-teste também mostrou que os animais do grupo cetamina 20 apresentaram aumento das taxas de *turnover* VMA/NOR ($p<0,05$) e HVA/DA ($p<0,001$) – Figura 35.

Em relação ao hipocampo, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: NOR ($F(3,28)=1,550$, $p>0,05$), VMA ($F(3,28)=0,8595$, $p>0,05$), VMA/NOR ($F(3,28)=1,837$, $p>0,05$), DA ($F(3,28)=0,8047$, $p>0,05$), DOPAC ($F(3,28)=0,3619$, $p>0,05$), DOPAC/DA ($F(3,28)=1,519$, $p>0,05$), HVA ($F(3,28)=1,874$, $p>0,05$), HVA/DA ($F(3,28)=1,137$, $p>0,05$), 5HT ($F(3,28)=1,348$, $p>0,05$), 5HIAA ($F(3,28)=0,8447$, $p>0,05$), 5HIAA/5HT ($F(3,28)=1,055$, $p>0,05$) – Figura 36.

Em relação ao corpo estriado, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados: DOPAC ($F(3,28)=0,6166$, $p>0,05$), DOPAC/DA ($F(3,27)=3,985$, $p>0,05$), HVA ($F(3,28)=0,9591$, $p>0,05$) e 5HIAA ($F(3,28)=2,899$, $p>0,05$). A ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes nos parâmetros NOR ($F(3,28)=5,760$, $p<0,01$), DA ($F(3,28)=4,292$, $p<0,05$) e 5HT ($F(3,28)=6,762$, $p<0,01$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais do grupo cetamina 5 apresentaram aumento nos níveis de NOR, DA e 5HT ($p<0,05$ em todos) em relação aos animais do grupo salina. Em relação às taxas de *turnover* HVA/DA e 5HIAA/5HT, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos (HVA/DA ($F(3,28)=5,342$, $p<0,01$) e 5HIAA/5HT ($F(3,28)=1,880$, $p<0,05$)), porém o pós-teste de Dunnett não apontou diferenças significantes entre os grupos – Figura 37.

Figura 34 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do córtex de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=4-8 animais por grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

Figura 35 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipotálamo de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

Figura 36 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipocampo de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

Figura 37 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do corpo estriado de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

* $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

A Figura 38 mostra os resultados da análise da bioquímica sérica dos filhotes machos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina durante a lactação. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados: albumina ($F(3,28)=0,1497$, $p > 0,05$), ALT-TGP ($F(3,28)=1,805$, $p > 0,05$), colesterol ($F(3,28)=2,593$, $p > 0,05$), creatinina ($F(3,28)=0,3530$, $p > 0,05$), FAL ($F(3,28)=0,7162$, $p > 0,05$), GGT ($F(3,28)=0,2101$, $p > 0,05$), glicose ($F(3,28)=0,3019$, $p > 0,05$), proteína total ($F(3,28)=0,1332$, $p > 0,05$), triglicérides ($F(3,28)=0,2939$, $p > 0,05$) e ureia UV ($F(3,28)=1,986$, $p > 0,05$). A ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos no parâmetro AST-TGO ($F(3,28)=3,228$, $p < 0,05$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais do grupo cetamina 10 apresentaram aumento nos níveis de AST-TGO em comparação aos animais do grupo salina ($p < 0,05$).

Figura 38 – Parâmetros avaliados na análise bioquímica de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

*p<0,05, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

Experimento 2: Avaliação dos efeitos antidepressivos do tratamento prolongado de cetamina no comportamento e fisiologia da prole de machos jovens de mães induzidas a depressão pelo modelo de separação materno

A Figura 39 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no campo aberto dos filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina durante a lactação durante a lactação. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: locomoção ($F(3,28)=1,779$, $p>0,05$), levantar ($F(3,28)=2,493$, $p>0,05$), *grooming* ($F(3,28)=0,3634$, $p>0,05$), imobilidade ($F(3,28)=1,634$, $p>0,05$) e bolos fecais ($F(3,28)=0,8993$, $p>0,05$).

Figura 39 – Parâmetros avaliados no campo aberto de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p>0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

A Figura 40 mostra os resultados dos parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de filhotes machos jovens de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina durante a lactação durante a lactação. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros testados:

latência claro/escuro ($F(3,28)=1,056$, $p>0,05$), número de cruzamentos ($F(3,28)=1,500$, $p>0,05$) tempo no claro ($F(3,28)=2,312$, $p>0,05$) e tempo no escuro ($F(3,28)=2,096$, $p>0,05$).

Figura 40 – Parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p>0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

A Figura 41 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no teste de interação social. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: farejar ($F(3,28)=0,4183$, $p>0,05$), perseguir ($F(3,28)=0,05033$, $p>0,05$), passar sob/sobre ($F(3,28)=0,5299$, $p>0,05$) e tempo total de interação social ($F(3,28)=0,4139$, $p>0,05$).

Figura 41 – Parâmetros avaliados de teste de interação social de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

A Figura 42 mostra o resultado dos parâmetros avaliados no labirinto de Barnes. Em relação ao número de erros, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,28)=1,315$, $p > 0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(4,112)=7,971$, $p < 0,001$), sem interação entre os fatores ($F(12,112)=0,6548$, $p > 0,05$). Em relação à latência, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3,28)=1,267$, $p > 0,05$), porém há diferenças significantes quanto ao tempo ($F(4,112)=31,54$, $p < 0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(12,112)=0,8512$, $p > 0,05$).

Figura 42 – Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni.

A Figura 43 mostra os resultados do teste de nado forçado. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: latência para a primeira imobilidade ($F(3,28)=1,907$, $p > 0,05$), tempo de imobilidade ($F(3,28)=0,5625$, $p > 0,05$) e tempo de mobilidade ($F(3,28)=0,5625$, $p > 0,05$).

Figura 43 – Parâmetros avaliados teste de nado forçado de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo

$p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

As Figuras 44-47 mostram os resultados da dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos dos filhotes machos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina durante a lactação na idade adulta. Em relação ao córtex, a ANOVA

de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados: VMA ($F(3,28)=1,168$, $p>0,05$), VMA/NOR ($F(3,28)=1,993$, $p>0,05$), DOPAC ($F(3,28)=2,875$, $p>0,05$), DOPAC/DA ($F(3,28)=2,803$, $p>0,05$), HVA ($F(3,28)=0,4460$, $p>0,05$), HVA/DA ($F(3,28)=1,251$, $p>0,05$), 5HT ($F(3,28)=0,1710$, $p>0,05$), 5HIAA ($F(3,28)=1,205$, $p>0,05$), 5HIAA/5HT ($F(3,28)=2,170$, $p>0,05$), mas mostrou diferenças significantes no parâmetro NOR ($F(3,28)=3,200$, $p<0,05$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais do grupo cetamina 20 apresentaram diminuição nos níveis de NOR em comparação com os animais do grupo salina ($p<0,05$). Em relação ao parâmetro DA, a ANOVA de uma via apontou diferenças significantes entre os grupos ($F(3,28)=1,894$, $p<0,05$), mas o pós-teste de Dunnett não apontou nenhuma diferença significativa entre os grupos – Figura 44.

Em relação ao hipotálamo, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados: NOR ($F(3,28)=1,163$, $p>0,05$), VMA ($F(3,28)=0,8755$, $p>0,05$), VMA/NOR ($F(3,28)=1,224$, $p>0,05$), DA ($F(3,28)=2,865$, $p>0,05$), HVA ($F(3,28)=0,2464$, $p>0,05$), 5HT ($F(3,28)=0,7909$, $p>0,05$), 5HIAA ($F(3,28)=0,7933$, $p>0,05$), 5HIAA/5HT ($F(3,28)=0,1605$, $p>0,05$). A ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes nos parâmetros DOPAC ($F(3,28)=4,981$, $p<0,01$), DOPAC/DA ($F(3,28)=4,710$, $p<0,01$) e HVA/DA ($F(3,28)=4,120$, $p<0,05$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais do grupo cetamina 10 apresentaram aumento nos níveis de DOPAC ($p<0,01$) e diminuição nas taxas de *turnover* HVA/DA ($p<0,01$), bem como os animais do grupo cetamina 20 apresentaram aumento nos níveis de DOPAC ($p<0,05$) e nas taxas de *turnover* DOPAC/DA ($p<0,01$) em comparação com os animais do grupo salina – Figura 45.

Em relação ao hipocampo, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados: NOR ($F(3,28)=0,4356$, $p>0,05$), VMA/NOR ($F(3,28)=1,833$, $p>0,05$), DA ($F(3,28)=0,9898$, $p>0,05$), DOPAC ($F(3,28)=0,9449$, $p>0,05$), DOPAC/DA ($F(3,28)=0,9865$, $p>0,05$), HVA ($F(3,28)=0,4317$, $p>0,05$), HVA/DA ($F(3,28)=0,5605$, $p>0,05$), 5HT ($F(3,28)=1,225$, $p>0,05$), 5HIAA ($F(3,28)=0,5787$, $p>0,05$) e 5HIAA/5HT ($F(3,28)=1,060$, $p>0,05$). A ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes no parâmetro VMA ($F(3,28)=4,018$, $p<0,05$). O pós-teste

de Dunnett mostrou que os animais do grupo cetamina 20 apresentaram aumento nos níveis de VMA em comparação com o grupo salina ($p < 0,01$) – Figura 46.

Em relação ao corpo estriado, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados: NOR ($F(3,28)=0,9756$, $p > 0,05$), DA ($F(3,28)=0,8256$, $p > 0,05$), DOPAC ($F(3,28)=0,2724$, $p > 0,05$), DOPAC/DA ($F(3,28)=1,479$, $p > 0,05$), HVA ($F(3,28)=1,045$, $p > 0,05$), HVA/DA ($F(3,28)=2,214$, $p > 0,05$), 5HT ($F(3,28)=1,230$, $p > 0,05$) e 5HIAA ($F(3,28)=0,5594$, $p > 0,05$). Em relação ao parâmetro 5HIAA/5HT, a ANOVA de uma via apontou diferenças significantes entre os grupos ($F(3,28)=4,380$, $p < 0,05$), mas o pós-teste de Dunnett não apontou nenhuma diferença significativa entre os grupos – Figura 47.

Figura 44 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do córtex de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

* $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

Figura 45 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipotálamo de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

*p<0,05, **p<0,01, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

Figura 46 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do hipocampo de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

**p<0,01, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

Figura 47 – Parâmetros avaliados na análise neuroquímica do corpo estriado de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

A Figura 48 mostra os resultados da análise da bioquímica sérica dos filhotes machos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina durante a lactação. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos parâmetros leucócitos ($F(3,20)=0,8616$, $p > 0,05$), hemácias ($F(3,20)=0,6908$, $p > 0,05$), hemoglobina ($F(3,20)=1,120$, $p > 0,05$), hematócrito ($F(3,20)=1,075$, $p > 0,05$), hemoglobina corpuscular média ($F(3,20)=2,435$, $p > 0,05$), concentração de hemoglobina corpuscular média ($F(3,20)=0,4774$, $p > 0,05$) e plaquetas ($F(3,20)=0,7077$, $p > 0,05$), mas mostrou diferenças significantes no parâmetro volume corpuscular médio ($F(3,20)=3,286$, $p < 0,05$). O pós-teste de Dunnett apontou que os animais do grupo cetamina 20 tiveram diminuição no volume corpuscular médio em relação aos animais do grupo salina ($p < 0,05$).

Figura 48 – Parâmetros avaliados na análise do hemograma total de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 animais por grupo.

*p<0,05, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

A Figura 49 mostra os resultados da análise da bioquímica sérica dos filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina durante a lactação. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: albumina ($F(3,28)=0,09790$, $p>0,05$), ALT-TGP ($F(3,28)=0,6152$, $p>0,05$), AST-TGO ($F(3,28)=1,959$, $p>0,05$), colesterol ($F(3,28)=0,3433$, $p>0,05$), creatinina ($F(3,28)=0,08150$, $p>0,05$), FAL ($F(3,28)=0,6699$, $p>0,05$), GGT ($F(3,28)=0,2967$, $p>0,05$), glicose ($F(3,28)=0,3910$, $p>0,05$), proteína total ($F(3,28)=2,207$, $p>0,05$), triglicérides ($F(3,28)=0,5254$, $p>0,05$) e ureia UV ($F(3,28)=0,8207$, $p>0,05$).

Figura 49 – Parâmetros avaliados na análise da bioquímica sérica de filhotes machos adultos de ratas induzidas a depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (0, 5, 10 e 20 mg/kg), por via intraperitoneal, durante a lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

2.5 DISCUSSÃO

A cetamina é um anestésico dissociativo que vem sendo estudada como um antidepressivo; diversos estudos apontam melhora nos sintomas depressivos mesmo com doses agudas (ZARATE et al., 2006; ABDALLAH et al., 2016). Novos estudos indicam que a administração crônica também tem sido efetiva contra os sintomas depressivos e com poucos efeitos colaterais (BROWNE; LUCKI, 2013; IRWIN et al., 2013). Especificamente na depressão pós-parto, foram encontrados apenas quatro artigos investigando seus efeitos. Até o momento, a literatura carece de estudos que investiguem os efeitos da cetamina na prole de mães com depressão pós-parto, e também carece de trabalhos que investiguem se a cetamina, assim como outros antidepressivos – fluoxetina, citalopram, entre outros – é secretada no leite materno (O'CONNOR et al., 2016; LACTMED, 2019; PAYNE, 2019) e, caso seja, em que forma. Por isso o presente trabalho teve como objetivo avaliar as implicações da exposição materna à cetamina no desenvolvimento da prole.

As mães dos quatro grupos foram induzidas a depressão através do modelo de separação materna, da mesma maneira discutida no capítulo 1 (item 1.5), porém os grupos ceta 5, ceta 10 e ceta 20 receberam administração intraperitoneal de cetamina nas doses equivalentes (5, 10 e 20 mg/kg) uma vez ao dia, do DPN2 do DPN21, enquanto o grupo salina (controle) recebeu solução salina (NaCl 0,9%) pela mesma via e volume (1 ml/kg).

Na análise de peso e ganho de peso, nossos resultados não mostraram diferenças entre os grupos, apontando apenas o ganho de peso ao longo do tempo, indicando o crescimento dos animais sem interferências causadas pela cetamina. Também não houve atraso o desenvolvimento físico da prole dos quatro grupos experimentais utilizados, assim como no desenvolvimento reflexológico. Não foram encontrados artigos que relacionem a presença de cetamina nos primeiros estágios de vida com um desenvolvimento físico ou reflexológico prejudicado. Porém alguns trabalhos apontam que a exposição direta e repetida de altas doses de cetamina no início da vida, acarreta na morte celular e degeneração de neurônios em ratos (IKONOMIDOU et al., 1999; SCALLET et al., 2004).

Nossos achados no teste do campo aberto com a prole masculina na infância não mostraram diferenças entre os grupos. Porém, os parâmetros de locomoção, levantar e imobilidade apresentaram uma tendência dose-dependente na qual, quanto maior a dose, menor a mobilidade e a exploração vertical e maior a imobilidade. Em um trabalho conduzido por Pitsikas e colaboradores (2019), ratos Wistar que receberam uma dose anestésica de cetamina (100 mg/kg) e 24 h após a administração passaram pelo teste de campo aberto, apresentaram menor mobilidade e exploração vertical. Nos trabalhos de Fredriksson e Archer (2004) e Fredriksson et al. (2004), altas doses de cetamina causaram degeneração de células no córtex parietal de camundongos e diminuição da habituação dos animais. Além disso, Magalhães et al. (2016), ressalta que baixas doses de cetamina são ansiogênicas, ou seja, aumentam a ansiedade, enquanto altas doses de cetamina são ansiolíticas, ou seja, reduzem a ansiedade. Nossos achados corroboram os trabalhos citados, uma vez que a taxa de exploração da arena é inversamente proporcional ao medo; também é possível inferir que o alto tempo de imobilidade seria causado por um alto grau de ansiedade (ARCHER, 1973).

Durante a idade adulta, os grupos tratados com cetamina, não apresentaram diferenças nos parâmetros avaliados no campo aberto. Levando em consideração as tendências observadas na infância, é possível identificar um padrão nos mesmos parâmetros, porém inversa: quanto maior a dose, maior a mobilidade e a exploração vertical e menor a imobilidade. O mesmo estudo de Pitsikas e colaboradores (2019) mostrou que, após 48 h da administração de cetamina, no teste do campo aberto, não houve diferença entre o grupo que recebeu o fármaco e o grupo controle. De fato, isso ocorreu porque a maior parte da cetamina é convertida através do sistema do citocromo p450 e eliminada do organismo, em até 48 h, pela urina e bile (CHANG; GLAZKO, 1974; ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2019). Por outro lado, no presente trabalho a exposição à cetamina da prole testada foi de forma indireta, isto é, através do leite materno. Os animais testados na infância no campo aberto tinham passado pelo desmame em até 3 horas antes do teste. Logo, os nossos achados sugerem que parte da cetamina administrada nas mães foi eliminada pelo leite materno e foi capaz de interferir com mecanismos de ansiedade da prole; assim, podemos

inferir que os efeitos causados pelo fármaco foram revertidos na idade adulta após a eliminação deste pelo organismo. São necessários mais estudos para verificar essa hipótese, como, por exemplo, realizar o teste de campo aberto logo após o desmame, 24 e 48 h depois, porém com animais diferentes, afim de não gerar habituação ao teste.

O teste da caixa claro/escuro da prole de mães tratadas com cetamina na infância não apresentou diferenças em relação ao grupo salina nos parâmetros de latência claro/escuro, tempo no claro e tempo no escuro, mas apresentou diminuição no parâmetro de cruzamentos quando comparados com o grupo salina. Assim como discutido no capítulo 1 (item 1.5), o número de cruzamentos é utilizado como um índice de ansiedade, porque a habituação ao longo do tempo é observada com esta medida. Pitsikas et al. (2019), que tratou ratos com dose anestésica de 100 mg/kg, observou diminuição no número de cruzamentos em relação aos animais controle. Trevlopoulou e colaboradores (2015) trataram ratos com uma dose de 8 mg/kg e não notaram influência da cetamina no desempenho dos animais na caixa claro/escuro. Nossos achados corroboram os de Pitsikas e colaboradores (2019), apesar da dose administrada nas mães não exceder 20 mg/kg e ser uma dose muito abaixo do descrito na literatura como ansiolítico (MAGALHÃES et al., 2016). Na idade adulta, o teste da caixa claro/escuro não apresentou diferenças no comportamento dos grupos de mães tratadas com cetamina em relação ao grupo salina. Isso demonstra que, assim como no campo aberto, as possíveis alterações causadas pela cetamina durante a infância, foram revertidas após a eliminação desta.

O teste de interação social na idade adulta da prole de mães tratadas com cetamina não apresentou diferença quando comparado ao grupo salina em nenhum dos parâmetros avaliados. Esses resultados corroboram os de Becker et al. (2003), que tratou ratos com 30 mg/kg de cetamina durante 5 dias e constatou que não houve diferenças entre os grupos tratados e salina. Assim como no presente trabalho, os testes foram realizados num período superior a 48 h desde o último contato com cetamina, seja pela administração ou, possivelmente, pelo leite materno. Porém nossos resultados não corroboram os de Trevlopoulou e colaboradores (2015), que observou diminuição no tempo de interação social de ratos tratados com 8 mg/kg de cetamina e sugeriu que a

cetamina, como outros antagonistas de receptores NMDA, podem induzir comportamentos do espectro autista.

No teste do labirinto de Barnes, os três grupos da prole de mães tratadas com cetamina apresentaram resultado similar, sem diferenças nos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo salina. Foram encontrados outros artigos relacionando diferentes tipos de memória com o uso de cetamina. Magalhães e colaboradores (2016) observaram ausência de alteração na memória declarativa episódica e de reconhecimento, por meio do reconhecimento de objetos, com ratos tratados com 100 mg/kg de cetamina. Venâncio e colaboradores (2011) trataram seus animais com doses de 5 e 10 mg/kg de cetamina e também não encontraram diferenças do grupo tratado em relação ao grupo controle na memória declarativa episódica medida por meio do reconhecimento de objetos. Levando em conta essas referências, os resultados obtidos neste trabalho corroboram que a cetamina não foi capaz de alterar a memória declarativa espacial medida no labirinto de Barnes.

O teste do nado forçado também não apontou diferenças nos parâmetros analisados dos grupos Ceta 5, Ceta 10 e Ceta 20 quando comparados com o grupo salina. Como discutido anteriormente, na literatura há poucos trabalhos que relacionam a depressão pós-parto com o uso de cetamina, o que se torna verdade para trabalhos relacionando o uso de cetamina com o nado forçado. Fitzgerald e colaboradores (2019) trataram camundongos com cetamina 10 e 30 mg/kg e realizaram o teste do nado forçado 24 h e 7 dias depois. No primeiro teste, os animais que receberam a dose de 30 mg/kg se mostraram mais ativos em relação ao controle e ao grupo de 10 mg/kg; no segundo teste nenhuma diferença foi encontrada entre os animais que receberam a cetamina e o controle. Yilmaz et al. (2002) verificaram que animais tratados com uma única dose de cetamina de 160 mg/kg, apresentaram menor tempo de imobilidade no nado forçado quando comparado ao grupo controle, em até 10 dias após a administração. Seguindo essa linha, nosso trabalho não apontou diferenças entre os grupos da prole de mães tratadas com cetamina em relação ao grupo controle, pois na idade em que o teste foi realizado, os animais já estavam a mais de 60 dias sem receber cetamina de forma indireta através do leite materno.

Na análise neuroquímica, o sistema dopaminérgico e o noradrenérgico apresentaram alterações no hipotálamo e corpo estriado dos ratos jovens, bem como no córtex, hipotálamo e hipocampo dos adultos. A serotonina estava alterada apenas no corpo estriado dos jovens na dose de 5 mg/kg de cetamina.

Há poucos trabalhos na literatura analisando as interações do tratamento prolongado com cetamina e a neuroquímica cerebral, sendo os existentes focados no sistema dopaminérgico. Kokkinou e colaboradores (2018) fizeram uma revisão da literatura e encontraram as seguintes alterações em roedores submetidos a tratamento prolongado com doses subanestésicas de cetamina: 1) aumento da atividade do sistema dopaminérgico no córtex de ratos que receberam doses de 25, 50 e 100 mg/kg; 2) ausência de alteração no hipocampo de camundongos que receberam 100 mg/kg; 3) ausência de alteração em ratos tratados com 15 e 30 mg/kg de cetamina, contudo foi encontrado aumento na atividade do sistema dopaminérgico no corpo estriado de camundongos tratados com 100 mg/kg.

Não foram encontrados na literatura trabalhos relacionando a administração prolongado de cetamina com alterações no hipotálamo, apenas em administrações agudas. Kokkinou e colaboradores (2018) relataram: 1) aumento na atividade do sistema dopaminérgico no córtex pré-frontal de ratos tratados com 5 e 30 mg/kg de cetamina; 2) ausência de alteração no hipotálamo de ratos tratados com 10 e 25 mg/kg, entretanto foi encontrado aumento na atividade do sistema dopaminérgico em animais tratados com 25, 50 e 100 mg/kg; 3) ausência de alterações no hipocampo foi relatada em dois trabalhos e um relatou diminuição da via dopaminérgica nessa região cerebral; 4) aumento na atividade da via dopaminérgica em doses variando entre 10 e 30 mg/kg.

Os nossos resultados corroboram os resultados revisados por Kokkinou e colaboradores (2018), com exceção do resultado obtido no hipotálamo da prole jovem, que apresentou diminuição nos níveis de dopamina na dose de 5 mg/kg. Isso indica que mais estudos relacionando os efeitos da cetamina sobre as monoaminas cerebrais precisam ser realizados, a fim de elucidar os transtornos causados por ela. Dessa forma, podemos inferir que a cetamina não foi capaz de alterar de forma duradoura a neuroquímica cerebral da prole de mães tratadas com esse fármaco, uma vez que as alterações observadas na infância não se

mantiveram até a idade adulta, e as alterações vistas na idade adulta não são encontradas na infância.

A análise hematológica foi realizada visando avaliar possíveis efeitos tóxicos da cetamina, caso essa de fato fosse eliminada pelo leite materno. Células sanguíneas são sensíveis a agentes tóxicos e podem ser alteradas numa exposição por fatores exógenos (ZACCARELLI-MAGALHÃES, 2019) e seriam uma forma de medir a toxicidade da cetamina indiretamente. Nossos resultados indicam que não houve alterações em nenhum dos parâmetros analisados, portanto a exposição indireta à cetamina, via leite, nas doses escolhidas não foi suficiente para causar anormalidades hematológicas.

A cetamina é biotransformada no fígado pelo do sistema do citocromo p450 que converte a cetamina em norcetamina, um metabólito ativo que é secretado pela urina e pela bile (CHANG; GLAZKO, 1974; ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2019). Por isso, foi realizada a análise de bioquímica sérica, avaliando se a exposição indireta à cetamina pelo leite poderia causar alguma alteração nos perfis hepático, lipídico e renal. Na prole jovem a única alteração encontrada foi no parâmetro AST-TGO no grupo Ceta 10. Esta enzima pode indicar lesões ou o mau funcionamento do fígado, mas apesar da análise estatística ter apontado diferença, os valores se encontram dentro da variação biológica da espécie (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; LIMA et al., 2014).

Os presentes achados, tomados em conjunto, indicam que a exposição materna à cetamina em ratas lactantes induzidas à depressão através do modelo de separação materna do dia pós-natal DPN2 ao DPN12 causou alterações no funcionamento do sistema vestibular e motor, bem como aumentou de ansiedade da prole na infância, porém esses efeitos desapareceram na idade adulta; alterações em neurotransmissores e metabólitos em diferentes áreas do sistema nervoso central da prole foram encontradas tanto na infância como na idade adulta. Não foram observadas alterações no desenvolvimento físico e reflexológico da prole, nem em vários testes comportamentais avaliados na idade adulta.

2.6 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram que o tratamento prolongado com diferentes doses sub anestésicas de mães com diferentes doses de cetamina:

- Não foi capaz de alterar o peso nem o ganho de peso da prole;
- Não atrasou o desenvolvimento físico nem o desenvolvimento reflexológico da prole;
- Foi capaz de alterar o funcionamento do sistema vestibular, do sistema motor e implicou num aumento de ansiedade da prole, na infância;
- Não foi capaz de alterar o funcionamento do sistema vestibular, do sistema motor, nem implicou num aumento ou diminuição de ansiedade e emocionalidade da prole, na idade adulta;
- Não alterou a ansiedade da prole, na infância nem na idade adulta, medida no teste da caixa claro/escuro;
- Não foi capaz de alterar a sociabilidade nem a ansiedade da prole, na idade adulta, no teste de interação social;
- Não alterou o aprendizado nem a memória declarativa espacial da prole, na idade adulta, no teste do labirinto de Barnes;
- Não causou distúrbios do tipo depressivo na prole medidos no teste do nado forçado;
- Alterou os níveis de neurotransmissores no hipotálamo e no corpo estriado da prole na infância
- Alterou os níveis de neurotransmissores no córtex pré-frontal, no hipotálamo e no hipocampo da prole adulta;
- Não alterou as análises do hemograma nem da bioquímica sérica.

3. REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, C.G.; ADAMS, T.G.; KELMENDI, B.; ESTERLIS, I.; SANACORA, G.; KRYSTAL, J.H. Ketamine's mechanism of action: a path to rapid-acting antidepressants. **Depression and Anxiety**, v.33, p.689–697, 2016.
- ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Animal Behavior**, v. 23, p. 896-920, 1975.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-V**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ARANA, T.; MORILAK, D. A. Behavioral assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 10, p. 1115-1137, 2008.
- ARBOLERIU, L.; EKLUND, M. B. Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. **Neuroscience**, v. 145, p. 738-750, 2007.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, n. 21, v. 2, p. 205-235, 1973.
- AVAN, B.; RICHTER, L. M.; RAMCHANDANI, P. G.; NORRIS, S. A.; STEIN, A. Maternal postnatal depression and children's growth and behaviour during the early years of life: exploring the interaction between physical and mental health. **Archives of Disease in Childhood**, v.95, n.9, p.690-695, 2010.
- BÁEZ-MENDOZA, R.; SCHULTZ, W. The role of the striatum in social behavior.
- BARNES, C. A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. **Journal of Comparative Physiology**, v. 93, n. 1, p. 74-104, 1979.
- BECKER, A.; PETERS, B.; SCHROEDER, H.; MANN, T.; HUETHER, G.; GRECKSCH, G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology Biological Psychiatry**, v. 27, p. 687-700, 2003.
- BERGMAN, S.A. Ketamine: review of its pharmacology and its use in pediatric anesthesia. **Anesthesia Progress**, v.46, p.10-12, 1999.
- BERMAN, R. M.; CAPPIELLO, A.; ANAND, A.; OREN, D. A.; HENINGER, G. R.; CHARNEY, D. S. KRYSTAL, J. H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological Psychiatry**, v.47, p.351-354, 2000.
- BHUTTA, A.T. Ketamine: a controversial drug for neonates. **Seminars in Perinatology**, v.31, p.303-308, 2007.
- BOGDANOVA, O. V.; KANEKAR, S.; D'ANCI, K. E.; RENSHAW, P. F. Factors influencing behavior in the forced swim test. **Physiol. Behav.**, v. 118, p. 227-239, 2013.

- BOURIN, M.; HASCOET, M. The mouse light/dark box test. **Eur J Pharmacol.**, v. 463, p. 55–65, 2003
- BRAKE, W. G.; ZHANG, T. Y.; DIORIO, J.; MEANEY, M. J.; GRATTON, A. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 1863-1874, 2004.
- BRAND, S. R.; BRENNAN, P. A. Impact of antenatal and postpartum maternal mental illness: how are the children? **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.52, p.441–455, 2009.
- BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 36, p. 178-196, 2015.
- BROWNE, C.A.; LUCKI, I. Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants. **Frontiers of Pharmacology**, v.4, p.1-18, 2013.
- BUENO, J. R. A era dos antidepressivos. Revisão sobre a escolha de um antidepressivo na prática clínica. **Revista Debate em Psiquiatria Clínica**, v.1, n.1, p.6-14, 2011.
- CAMARGO, E. L. R. A. **Exposição perinatal de ratos ao glifosato (roundup®): efeitos sobre o comportamento materno e sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta**. 2014. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CHANG, T.; GLAZKO, A. J. Biotransformation and disposition of ketamine. **Int. Anesthesiol. Clin.**, v. 12, n. 2, p. 157-177, 1974.
- CLEARE, A. J. Biological models of unipolar depression. In: Power M (ed) **Mood disorders: a handbook of science and practice**. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. p. 29–46.
- CRAWLEY, J. N.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effect of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 13, p.167–170, 1980.
- DAMASIO, A. R.; ANDERSON, S. W. The frontal lobes. K. M. HEILMAN, K. M.; VALENSTEIN, E. **Clinical neuropsychology**. 4 ed. New York: Oxford, 2003. p. 404-446.
- DAVIDSON, J. R.; MEONI, P.; HAUDQUET, V.; CANTILLON, M.; HACKETT, D. Achieving remission with venlafaxine and fluoxetine in major depression: its relationship to anxiety symptoms. **Depress Anxiety**, v. 16, n. 4, p. 4-13, 2002.
- DAVIES, J.; LLOYD, K. R.; JONES, I. K.; BARNES, A.; PILOWSKY, L. S. Changes in regional cerebral blood flow with venlafaxine in the treatment of major depression. **Am J Psychiatry**, v. 160, n. 2, p. 374-376, 2003.
- DENENBERG, V.H., OTTINGER, D.R., STEPHENS, M.W. Effects of maternal factors upon growth and behavior of the rat. **Child Dev.**, v. 33, 65–71, 1962

- DO, J.; KIM, J. I.; BAKES, J.; LEE, K.; KAANG, B. K. Functional roles of neurotransmitters and neuromodulators in the dorsal striatum. **Learning & Memory**, v. 20, n. 1, p. 21-28, 2012.
- DONG, C.; ANAND, K. J. S. Developmental neurotoxicity of ketamine in pediatric clinical use. **Toxicology Letters**, v. 220, p. 53-60, 2013.
- DREWNIAK, E.; HAN, J.; HANCOCK, C.; JONES, R.L.; LIM, J.; GORGANI, N.N.; SPERRY III, J.K.; YU, H.J.; RAFFA, R.B. Rapid onset antidepressant action of ketamine: potential revolution in understanding and future pharmacologic treatment of depression. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v.40, p.125-130, 2015.
- ENGIN, E.; TREIT, D.; DICKSON, C.T. Anxiolytic- and antidepressant-like properties of ketamine in behavioral and neurophysiological animal models. **Neuroscience**, v.161, p.359-369, 2009.
- FANSELOW, M. S.; DONG, H. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2010.
- FERRARI, F.; VILLA, R. F. The Neurobiology of Depression: an Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence. **Mol Neurobiol.**, v. 54, n. 7, p. 4847-4865, 2017
- FILE, S. E.; HYDE, J. R. Evidence that piracetam has an anxiolytic action. **Journal of Affective Disorders**, v.1, n. 4, p. 227-235, 1979.
- FITZGERALD, P. J.; YEN, J. Y.; WATSON, B. O. Stress-sensitive antidepressant-like effects of ketamine in the mouse forced swim test. **Plos One**, 2019.
- FLECK, M. P. A.; LAFER, B.; SOUGEY, E. B.; DEL PORTO, J. A.; BRASIL, M. A.; JURUENA, M. F. Diretrizes da associação médica brasileira para o tratamento da depressão (versão integral). **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.25, n.2, p.114-122, 2003.
- FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioral development of the Mouse. **Animal Behavior**, v. 13, p. 234-241, 1965.
- FREDRIKSSON, A.; ARCHER, T. Neurobehavioural Deficits Associated with Apoptotic Neurodegeneration and Vulnerability for ADHD. **Neurotoxicity Research**, v. 6, n. 6, p. 435-456, 2004.
- FREDRIKSSON, A.; ARCHER, T.; ALM, H.; GORDH, T.; ERIKSSON, P. Neurofunctional deficits and potentiated apoptosis by neonatal NMDA antagonist administration. **Behavioural Brain Research**, v. 153, p. 367-376, 2004
- FRIEDMAN, S.H.; RESNICK, P.J. Postpartum depression: an update. **Women's Health**, v.5, n.3, p.287-295, 2009.
- Frontiers of Neuroscience**, v. 7, p. 1-14, 2013.
- GARCIA, L.S.B.; COMIM, C.M.; VALVASSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; ANDREAZZA, A.C.; STERTZ, L.; FRIES, G.R.; GAVIOLI, E.C.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Chronic administration of ketamine elicits

antidepressant-like effects in rats without affecting hippocampal brain-derived neurotrophic factor protein levels. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.103, p.502–506, 2008.

GAVIN, N. I.; GAYNES, B. N.; LOHR, K. N.; MELTZER-BRODY, S.; GARTLEHNER, G.; SWINSON, T. Perinatal depression: a systematic review of prevalence and incidence. **Obstetrics & Gynecology**, v.106, p.1071–1083, 2005

GONZALES, J.M.; LOEB, A.L.; REICHARD, P.S.; IRVINE, S. Ketamine inhibits glutamate, N-methyl-D-aspartate- and quisqualate-stimulated cGMP production in cultured cerebral neurons. **Anesthesiology**, v.82, p.205–213, 1995.

GORACCI, A; VALDAGNO, M.; MALTINTI, E.; SILLARI, S.; FAGIOLINI, A. Antidepressant use in pregnancy: a critical review of the risk and benefits. **Rivista di Psichiatria**, v.50, n.3, p.118–126, 2015.

GRACE, S. L.; EVINDAR, A.; STEWART, D. E. The effect of postpartum depression on child cognitive development and behavior: a review and critical analysis of the literature. **Archives of Women's Mental Health**, v.6, p.263–274, 2003.

GUEDES, A. C. E.; KAMI, C. T.; CAVALLI, L. K. V.; NICOLAOU, S. K.; HESS, V. B.; MALUF, E. M. C. P. Depressão pós-parto: incidência e fatores de risco associados. **Revista de Medicina**, v.90, n.3, p.149–154, 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Endocrinologia e reprodução. In: **Fundamentos de Guyton: tratado de fisiologia médica**. 10^a. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 74, p. 905–916.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. **Journal of Comparative Physiology**, v.18, n. 3, p. 385–403, 1934.

HALL, F. S.; WILKINSON, L. S.; HUMBY, T.; ROBBINS, T. W. Maternal deprivation of neonatal rats produces enduring changes in dopamine function. **Synapse**, v. 32, p. 37–43, 1999.

HIKOSAKA, O.; TAKIKAWA, Y.; KAWAGOE, R. Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 953–978, 2000.

HIROTA, K.; LAMBERT, D.G. Ketamine its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. **British Journal of Anesthesia**, v.77, p.441–444, 1996.

HOLMES, A.; GUIQUET, A. M.; VOGEL, E.; MILLSTEIN, R. A.; LEMAN, S.; BELZUNG, C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1335–1346, 2005

HOLUBOVA, K.; NEKOVAROVA, T.; PISTOVCAKOVA, J.; SULCOVA, A.; STUCHLÍK, A.; VALES, K. Pregnanolone glutamate, a novel use-dependent NMDA receptor inhibitor, exerts antidepressant-like properties in animal models. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.8, p.1–10, 2014.

IKONOMIDOU, C.; BOSCH, F.; MIKSA, M.; BITTIGAU, P.; VÖCKLER, J.; DIKRANIAN, K.; TENKOVA, T. I.; STEFOVSKA, V.; TURSKI, L.; ONLEY, J. W. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. **Science**, v. 283, n. 5398, p. 70-74, 1999.

IRWIN, S.A.; IGLEWICZ, A.; NELESEN, R.A.; LO, J.Y.; CARR, C.H.; ROMERO, S.D. LLOYD, L.S. Daily oral ketamine for the treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care: a 28-day open-label proof-of-concept trial, **Journal of Palliative Medicine**, v.16, n.8, p.958-965, 2013.

KAIDANOVICH-BEILIN, O.; LIPINA, T.; VUKOBRADOVIC, I.; Roder, J.; WOODGETT, J. R. Assessment of Social Interaction Behaviors. **J. Vis. Exp.**, v. 48, n. e2473, 2011.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical Biochemistry of domestic animals. 6 ed. Burlington: Academic Press, 2008, 928p.

KOKANE, S. S.; LIN, Q. Impact of Early Life Ketamine Exposure on the Developing Brain and Cognitive Sequelae: A Discussion of Apoptotic Neurodegeneration Mechanisms. In: Preedy, V. R. **Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse**. London: Elsevier, 2016. p. 581-592.

KOKKINO, M.; SHOK, A. H.; HOWES, O. D. The effects of ketamine on dopaminergic function: meta-analysis and review of the implications for neuropsychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 23, p. 56-69, 2018)

KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: a comprehensive review. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, p. 175–183, 2013.

LACTMED – Drugs and Lactation Database. **Ketamine**. 2006-2019.

LAPIZ-BLUHM, M. D. S.; BONDI, C. O.; DOYEN, J.; RODRIGUEZ, G.; BÉDARD-

LÉVESQUE, M.; BÉDARD, A.; COSSETTE, M.; PARENT, A. Novel aspects of the chemical anatomy of the striatum and its efferents projections. **J Chem Neuroanat**, v. 26, n. 4, p. 271-281, 2003.

LEVINE, S. Infantile experience and resistance to physiological stress. **Science**, v. 126, p. 405, 1957

LI, L.; VLISIDES, P.E. Ketamine: 50 years of modulating the mind. **Frontiers in Human Neuroscience**, v.10, p.1-15, 2016.

LIMA, C. M.; LIMA, A. K.; MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; LEITE, B. L. S.; SERAFINI, M. R.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 03, p. 1-9, 2014.

LONSTEIN, J. S.; LÉVY, F.; FLEMING, A. S. Common and divergent psychobiological mechanisms underlying maternal behaviors in non-human and human mammals. **Horm. Behav.** v. 73, p. 156-185, 2015

MA, J. H.; WANG, S. Y.; YU, H. A.; LI, D. Y.; LUO, S. C.; ZHENG, S. S.; WAN, L. F.; DUAN, K. M.. Prophylactic use of ketamine reduces postpartum depression in Chinese women undergoing cesarean section. **Psychiatry Research**, v. 279, p. 252-258, 2019

MAENG, S.; ZARATE JR C.A.; DU, J.; SCHLOESSER, R.J.; MCCAMMON, J.; CHEN, G. ET AL. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. **Biological Psychiatry**, v.63, p.349-352, 2008.

MAGALHÃES, A.; VALENTIM, A.; VENÂNCIO, C.; PEREIRA, M.; MELO, P.; SUMMAVIELE, T.; ANTUNES, L. Ketamine alone or combined with midazolam or dexmedetomidine does not affect anxiety-like behaviours and memory in adult Wistar rats. **Lab Anim**, v. 51, n. 2, p. 147-159, 2016.

MAGALHÃES, J.Z.; UDO, M.S.B.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; CARVALHO, M.P.N.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Prenatal exposure to fipronil disturbs maternal aggressive behavior in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v.52, p.11-16, 2015.

MAYER, A. D.; ROSENBLATT, J. S. Prepartum changes in maternal responsiveness and nest defense in *Rattus norvegicus*. **Journal of Comparative Psychology**, v. 98, n. 2, p. 177-188, 1984.

MEANEY, M. J.; BRAKE, W.; GRATTON, A. Environmental regulation of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? *Psychoneuroendocrinology*, v. 27, p.127–138, 2002.

MORAES, I. G. S.; PINHEIRO, R. T.; SILVA, R. A.; HORTA, B. L.; SOUSA, P. L. R.; FARIA, A. D. Prevalência da depressão pós-parto e fatores associados. **Revista de Saúde Pública**, v.40, n.1, p.65-70, 2006.

MURRAY, L.; ARTECHE, A.; FEARON, P.; HALLIGAN, S.; GOODYER, I. COOPER, P. Maternal postnatal depression and the development of depression in offspring up to 16 years of age. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.50, n.5, p.460-470, 2011.

NEGRO-VILLAR, A.; OJEDA, S. R.; MACCANN, S. SM. Evidence for changes in sensitivity to testosterone negative feedback on gonadotropin release during sexual development in the male rat. **Endocrinology**, v. 93, p. 729-735, 1973.

NUTT, D.; DEMYTTENAERE, K.; JANKA, Z.; AARRE, T.; BOURIN, M.; CANONICO, P. L.; CARRASCO, J. L.; STAHL, S. The other face of depression, reduced positive affect: the role of catecholamines in causation and cure. **J Psychopharmacol**, v. 21, n. 5, p. 461-471, 2007.

O'CONNOR, E.; ROSSOM, R. C.; HENNINGER, M.; GROOM, H. C.; BURDA, B. U.; HENDERSON, J. T.; BIGLER, Whitlock, E. P. Screening for Depression in Adults: An Updated Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. **Agency for Healthcare Research and Quality (US)**, n. 14-05208, p. 1-306, 2016.

O'HARA, M. W.; MCCABE, J. E. Postpartum depression: current status and future directions. **Annual Review of Clinical Psychology**, v.9, p.379-407, 2013.

PARISE, E. M.; ALCANTARA, L. F.; WARREN, B. L.; WRIGHT, K. N.; HADAD, R.; SIAL, O. K.; KROECK, K. G.; IÑIGUEZ, S. D.; BOLAÑOS-GUZMÁN, C. A. Repeated Ketamine Exposure Induces an Enduring Resilient Phenotype in Adolescent and Adult Rats. **BIOL PSYCHIATRY**, v. 54, p. 750-759, 2013.

PAYNE, J. L. Psychopharmacology in pregnancy and breastfeeding. **Med. Clin. N. Am**, v. 103, p. 629-650, 2019.

PELTONIEMI, M. A.; HAGELBERG, N. M.; OLKKOLA, K. T.; SAARI, T. I. Ketamine: a review of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics in anesthesia and pain therapy. **Clinical Pharmacokinetics**, v.55, p.1059–1077, 2016.

PITSIKAS, N.; GEORGIADOU, G.; DELIS, F.; ANTONIOU, K. Effects of anesthetic ketamine on anxiety-like behavior in rats. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 4, p. 829-838, 2019.

PLOTSKY PM, MEANEY MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 18, p. 18, 195–200, 1993.

ROBERTSON, E.; GRACE, S.; WALLINGTON, T.; STEWART, D.E. Antenatal risk factors for postpartum depression: a synthesis of recent literature. **General Hospital Psychiatry**, v.26, n.4, p.289–295, 2004.

ROFAEL, H.Z.; ABDEL-RAHMAN, M.S. Development and validation of high-performance liquid chromatography method for the determination of cocaine, its metabolites and ketamine. **Journal of Applied Toxicology**, v.22, p.123-128, 2002.

ROSENFELD, C. S.; FERGUSON, S. A. Barnes Maze Testing Strategies with Small and Large Rodent Models. **Journal of Visualized Experiments**, v. 84, 2014.

SANDINI, T. M.; REIS-SILVA, T. M.; MOREIRA, N.; BERNARDI, M. M.; LEBRUN, I.; SPINOSA, H. S. Effects of isoflavones on behavior, estradiol, glutamate, and GABA levels in intact middle-aged female rats. **Nutricional Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 805-816, 2018.

SANDINI, T.M.; UDO, M.S.B.; REIS-SILVA, T.M.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Prenatal exposure to integerrimine N-oxide impaired the maternal care and the physical and behavioral development of offspring rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.36, p.53-63, 2014.

SCALLET, A. C.; SCHMUED, L. C.; SLIKKER, W. JR.; GRUNBERG, N.; FAUSTINO, P. J.; DAVIS, H.; HANIG, J. P. Developmental neurotoxicity of ketamine: morphometric confirmation, exposure parameters, and multiple fluorescent labeling of apoptotic neurons. **Toxicological Sciences**, v. 81, p. 364–370, 2004

SELLERS, G.; LIN, H.C.; RIDDELL, M.G.; RAVIS, W.R.; LIN, Y.J.; DURAN, S.H.; GIVENS, M.D. Pharmacokinetics of ketamine in plasma and milk of mature Holstein cows. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.33, p.480–484, 2010.

SEMRUD-CLIKEMAN, M.; ELLISON, P. A. T. Functional neuroanatomy. In: SEMRUD-CLIKEMAN, M.; ELLISON, P. A. T. **Child Neuropsychology: Assessment and interventions for neurodevelopmental disorders**. 2. ed. New York: Springer, 2009. 488 p.

SILVA, F. C. C.; DANTAS, R. T.; CITÓ, M. C. O.; SILVA, M. I. G.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Ketamina, da anestesia ao uso abusivo: artigo de revisão. **Revista de Neurociência**, n.18, v.2, p.227-237, 2010.

SILVA, V.; RIUL, T. R.; GOLOVATTEI, M. A. R.; PAUMGARTTER, F. J. R. Ethanol embryofetotoxicity in malnourished rats. **Nutrition Reports Internacional**, v. 36, n. 04, p. 887-895, 1987.

SMITH, E. R.; DAMASSA, D. A.; DAVIDSON, J. M. Feedback regulation and male puberty: testosterone-luteinizing hormone relationships in the developing male rat. **Endocrinology**, v. 101, p. 173-180, 1989.

SODERSTEIN, P.; ENEROTH, P. Effects of exposure to pups on maternal behavior, sexual behavior and serum prolactin concentrations in male rat. **Journal of endocrinology**, v. 102, p 115-119, 1984.

SOHR-PRESTON, S. L.; SCARAMELLA, L. V. Implications of timing of maternal depressive symptoms for early cognitive and language development. **Clinical Child and Family Psychology Review**, v.9, p.65–83, 2006.

Stahl, S. M. Symptoms and circuits, part 1: Major depressive disorder. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 64, p. 1282-1283, 2003.

STRASBURGER, S.E.; BHIMANI, P.M.; KAABE, J.H.; KRYSIAK, J.T.; NANCHANATT, D.L.; NGUYEN, T.N.; POUGHM K.A.; PRINCE, T.A.; RAMSEY, N.S.; SAVSANI, K.H.; SCANDLEN, L.; CAVARETTA, M.J.; RAFFA, R.B. What is the mechanism of Ketamine's rapid-onset antidepressant effect? A concise overview of the surprisingly large number of possibilities. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, p.1-8, 2017.

TREVLOPOULOU, A.; TOUZLATZI, N.; PITSIKAS, N. The nitric oxide donor sodium nitroprusside attenuates recognition memory deficits and social withdrawal produced by the NMDA receptor antagonist ketamine and induces anxiolytic-like behaviour in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 233, n. 6, p. 1045-1054, 2015.

TROFIMIUK, E.; WIELGAT, P.; BRASZKO, J. J.; CAR, H. Stress and ketamine, bimodal influence on cognitive functions. **Brain Research Bulletin**, v. 360, p. 354-364, 2019.

UDO, M.S.B.; SANDINI, T.M.; REIS, T.M.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and

reflex development in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v.45, p.27–33, 2014.

VANNUCCHI, A.; VANNUCCHI, A.M.C., Quatro enfoques da depressão. **Revista da Faculdade de Ciência Médica da Sorocaba**, v.14, n.4, p.169-172, 2012.

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

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WEINSTOCK, M. Prenatal stressors in rodents: effects on behavior. **Neurobiology of Stress**, v.6, p.3-13, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Mental health: depression**. Washington, 2016. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/depression>>. Acesso em: 18 mar. 2020.

WU, R.; ZHANG, H.; XUE, W.; ZOU, Z.; LU, C.; XIA, B.; WANG, W.; CHEN, G. Transgenerational impairment of hippocampal Akt-mTOR signaling and behavioral deficits in the offspring of mice that experience postpartum depression-like illness. **Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 73, p. 11-18, 2017.

XIA, B.; CHEN, C.; ZHANG, H.; XUE, W.; TANG, J.; TAO, W.; WU, R.; REN, L.; WANG, W.; CHEN, G. Chronic stress prior to pregnancy potentiated long-lasting postpartum depressive-like behavior, regulated by Akt-mTOR signaling in the hippocampus. **Scientific Report**, v.6, n.35042, 2016.

XU, Y; LI, Y; HUANG, X; CHEN, D; SHE, B; MA, D. Single bolus low-dose of ketamine does not prevent postpartum depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled, prospective clinical trial. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v.295, p.1167-1174, 2017.

YANKELEVITCH-YAHAV, R.; FRANKO, M.; HULY, A.; DORON, R. The Forced Swim Test as a Model of Depressivelike Behavior. **J Vis Exp.**, v. 97, 2015.

YILMAZ, A.; SCHULZ, D.; AKSOY, A.; CANBEYLI, R. Prolonged effect of an anesthetic dose of ketamine on behavioral despair. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v.71, p.341-344, 2002.

ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; FUKUSHIMA, A. R.; MOREIRA, N.; MANES, M.; ABREU, G. R.; RICCI, E. L.; WAZIRY, P. A. F.; SPINOSA, H. S. Preclinical toxicological study of prolonged exposure to ketamine as an antidepressant. **Pharmacological Reports**, v. 72, p. 24-35, 2019.

ZARATE JR, C.A.; SINGH, J.B.; CARSON, P.J.; BRUTSHE, N.E.; AMELI, R.; LUCKENBAUGH, D.A.CHARNEY, D.S.; MANJI, H.K. A randomized trial of anN-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Archives of General Psychiatry**, v.63, p.856–864, 2006.