JULIA ZACCARELLI MAGALHÃES

**Estudos comportamentais e neurofisiológicos da exposição
prolongada à cetamina como antidepressivo e o modelo de
separação materna para indução de depressão pós-parto em ratos**

São Paulo
2021

JULIA ZACCARELLI MAGALHÃES

**Estudos comportamentais e neurofisiológicos da exposição prolongada à
cetamina como antidepressivo e o modelo de separação materna para indução
de depressão pós-parto em ratos**

Tese 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 Doutora em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

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

São Paulo

2021

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. 4052
FMVZ

Magalhães, Julia Zaccarelli
Estudos comportamentais e neurofisiológicos da exposição prolongada à cetamina como antidepressivo e o modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratos / Julia Zaccarelli Magalhães. – 2021.
247 f. ; il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa.

1. Depressão pós-parto. 2. Anestésico. 3. Comportamento animal. 4. Comportamento materno. 5. Sistema nervoso central. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Possíveis efeitos antidepressivos da exposição prolongada a cetamina em modelo animal de depressão em ratos adultos e fêmeas lactantes", protocolada sob o CEUA nº 4973010217, sob a responsabilidade de **Helenice de Souza Spinosa** - 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 15/03/2017.

We certify that the proposal "Possible antidepressant effects of prolonged exposure to ketamine in animal model of depression in adult and lactating female rats", utilizing 220 Heterogenics rats (90 males and 130 females), protocol number CEUA 4973010217, under the responsibility of **Helenice de Souza Spinosa** - 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 03/15/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 03/2017 a 12/2020

Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Origem:	Biotério de Roedores do CEPTOX	sexo:	Machos	idade:	80 a 90 dias	N:	90
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	300 a 350 g		
Linagem:	Wistar						
Origem:	Biotério de Roedores do CEPTOX	sexo:	Fêmeas	idade:	80 a 90 dias	N:	90
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	250 a 300 g		
Linagem:	Wistar						
Origem:	Biotério de Roedores do CEPTOX	sexo:	Fêmeas	idade:	80 a 90 dias	N:	40
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	250 a 300 g		
Linagem:	Wistar						

Resumo: A cetamina é uma substância química utilizada como anestésico na medicina humana e veterinária, produzindo [anestesia dissociativa]. Essa substância atua em diversos tipos de receptores no sistema nervoso central, dentre eles os receptores glutamatérgicos N-metil D-Aspartato (NMDA) e não-NMDA, opióides, de monoaminas, GABAérgicos, e em canais de cálcio voltagem-dependente, tendo sua principal ligação com o receptor glutamatérgico NMDA. Estudos recentes revelam que os receptores NMDA possuem papel importante em psicopatologias como ansiedade e depressão. A cetamina, por ser um antagonista não competitivo dos receptores NMDA, vem sendo estudada para o uso como antidepressivo. Levando em consideração que há uma tendência para a ampliação do uso clínico da cetamina como antidepressivo e que há poucas informações a respeito de um tratamento prolongado e perinatal, tornam-se necessários mais estudos sobre o uso dessa substância com essa finalidade, a fim de contribuir com o seu uso clínico mais seguro. Assim, neste projeto pretende-se estudar os efeitos da exposição prolongada de cetamina num modelo animal de depressão em ratos adultos e fêmeas lactantes, avaliando-se o comportamento animal, por meio de teste de preferência a sacarose, caixa claro/escuro, nado forçado e comportamento materno, bem como a avaliação de neurotransmissores e metabólitos no sistema nervoso central e estudos bioquímicos séricos.

Local do experimento: Biotério do Departamento de Patologia/ FMVZ USP

São Paulo, 15 de março de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "POSSÍVEIS EFEITOS ANTIDEPRESSIVOS DA CETAMINA EM FÊMEAS LACTANTES E IMPLICAÇÕES NA PROLE", protocolada sob o CEUA nº 2099010218, sob a responsabilidade de **Helenice de Souza Spinosa** - 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 ANTIDEPRESSIVE EFFECTS OF CETAMINE IN INFANT FEMALES AND PROLE IMPLICATIONS", utilizing 70 Heterogenics rats (10 males and 60 females), protocol number CEUA 2099010218, under the responsibility of **Helenice de Souza Spinosa** - 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 03/2018 a 03/2020

Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Origem: **Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **90 a 100 dias**

N: **10**

Unhagem: **Wistar**

Peso: **350 a 400 g**

Origem: **Biotério de camundongos do Instituto de Ciências Biomédicas/USP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **90 a 100 dias**

N: **60**

Unhagem: **Wistar**

Peso: **350 a 400 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 ocorre 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 prole, uma vez que o vínculo mãe-filho é fundamental para o desenvolvimento geral da prole 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 os efeitos antidepressivos da exposição de ratas a cetamina no período de lactação, bem como o impacto nos sistemas cardiovascular, endócrino e nervoso central e na prole. Para isso serão realizadas avaliações comportamentais, neuroquímica, de densidade e expressão de RNA de receptores, de farmacocinética, dosagem hormonal, de perfil inflamatório, da atividade tireoidiana, bem como estudos histológicos e imuno-histoquímicos cardíacos.

Local do experimento: **Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP**

São Paulo, 10 de maio de 2018

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

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: MAGALHÃES, Julia Zaccarelli

Título: Estudos comportamentais e neurofisiológicos da exposição prolongada à cetamina como antidepressivo e o modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratos

Tese 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 Doutora em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esse trabalho ao meu primo Ricardo Zaccarelli Lopes Filho, pelo exemplo de coragem, força e determinação. Com ele aprendi que nada é impossível, basta a gente querer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos os animais que doaram as suas vidas possibilitando a realização deste trabalho. Meu sincero respeito e reconhecimento à todos eles.

Agradeço a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e por todo o aprendizado durante esse período.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – processo nº 1681744), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – processo nº 202884/2018-0) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 2018/02547-0) pelo apoio financeiro.

Agradeço a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Helenice de Souza Spinosa pela oportunidade, orientação, dedicação e confiança. Você é um exemplo de pessoa e de profissional! Muito obrigada por todos esses anos de trabalho e de aprendizado!

Agradeço a Universidade Presbiteriana Mackenzie pela colaboração neste trabalho. Em especial ao Alexandre, Sr. Domingos e Nilson pela ajuda durante os experimentos.

Agradeço ao Prof.^o Dr.^o Antônio Carlos Bianco pela oportunidade de fazer o Doutorado Sanduíche e desenvolver parte do meu trabalho em seu laboratório na Universidade de Chicago. Sua colaboração foi essencial para o resultado final deste trabalho. Agradeço também a Bárbara e Gustavo pelo apoio durante o período que estive lá.

Agradeço a Monica França e a Tatiana Fonseca por todo apoio, conselhos e amizade. Muito obrigada por todas as conversas e risadas que foram fundamentais no meu período em Chicago. Vocês fizeram com que o dia a dia fosse mais leve e divertido.

Agradeço a Luisa Roubicek e ao Keshav Ramesh por terem me recebido em sua casa de forma tão acolhedora e carinhosa. Muito obrigada por todas as saídas, viagens, papos e toda diversão que fizeram me sentir muito bem longe de casa.

Agradeço a Esther Lopes Ricci por todos esses anos de parceria e de amizade. Desde a graduação você me incentivou a entrar para o mundo da pesquisa, confiando em mim e no meu trabalho. Muito obrigada por tudo!

Agradeço ao Gabriel Ramos de Abreu pela ajuda, companheirismo e amizade durante todo esse trabalho. Muito obrigada por ter se tornado muito mais do que um parceiro de trabalho, mas um amigo, e por todos os momentos de descontração.

Agradeço ao André Rinaldi Fukushima por todas as sugestões e ajuda na realização da parte experimental desse trabalho.

Agradeço ao Prof.^o Jorge Flório e ao Dr.^o Ivo Lebrun pela colaboração nos estudos analíticos de HPLC. Muito obrigada por todos os ensinamentos e confiança.

Agradeço aos estagiários e alunos de iniciação científica: Lorena, Beatriz, Camila, Rodrigo, Zarife, Raul, Júlia, Mayara, Amanda e Maria Julia. Obrigada por toda a ajuda no desenvolvimento dessa pesquisa. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Patologia por toda a ajuda durante a realização desse trabalho. Agradeço em especial ao Herculano, Vagner, Magali, Dennis, Adriana, Milena, Luciana, Mauro e Nelson.

Agradeço a todos os colegas e amigos da pós-graduação do VPT, em especial a Sayuri, a Thaisa e a Natalia que se tornaram amigas muito especiais. Obrigada por todas as conversas, momentos de descontração e de muito aprendizado durante todos esses anos. Mesmo hoje estando cada uma num canto do mundo, a parceria e a amizade continuam.

Agradeço a Marianna Manes por anos de parceria e amizade. Do Mackenzie para a vida, você esteve do meu lado em todos os momentos importantes. Muito obrigada por toda ajuda, conselhos e risadas nesses anos todos!

Agradeço a todos os amigos da Carlitos e dos “De Sempre” por toda força e motivação que vocês me deram ao longo desse período. Cada um a seu modo me ajudou a chegar aonde eu cheguei. Muito obrigada pela torcida e por todos esses anos de amizade!

Agradeço a toda a minha família, em especial, ao meu tio Ricardo Zaccarelli por todo incentivo e carinho em todas as etapas da minha vida. Obrigada por me acompanhar desde sempre e por acreditar em mim!

Agradeço aos meus irmãos, Irene e Pedro, e aos meus sobrinhos, Mariana e Raul, que sempre estiveram ao meu lado. Muito obrigada por todo o apoio!

Agradeço meu namorado Guilherme, por todo o incentivo, companheirismo, ajuda e amor durante todos esses anos. Obrigada por estar sempre presente e por ser a pessoa que você é! Amo muito você!

Agradeço ao meu pai, Guilherme, por todo o interesse, apoio e amor durante a minha vida inteira. Muito obrigada também pela ajuda, conselhos e sugestões durante o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço imensamente a minha mãe, Renata, por todo amor e apoio que me deu em toda a minha vida. Mãe, você é a pessoa mais especial desse planeta, e eu tenho que te agradecer por tudo o que eu sou hoje. As minhas conquistas são as suas conquistas e eu tenho muito orgulho de ser sua filha. Te amo muito!

Por fim, agradeço a todos aqueles que não foram diretamente citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

MAGALHÃES, J.Z. **Estudos comportamentais e neurofisiológicos da exposição prolongada à cetamina como antidepressivo e o modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratos**. 2021. 247f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A depressão pós-parto é uma doença multifatorial mentalmente incapacitante que afeta mundialmente as mulheres. O tratamento recomendado para essa enfermidade consiste na combinação de psicoterapia e tratamento farmacológico. Atualmente, a busca de antidepressivos está em expansão, sendo priorizados fármacos com mecanismo de ação misto. A cetamina vem sendo bastante estudada para o uso como antidepressivo, incluindo o tratamento para a depressão pós-parto. Apesar disso, há poucas informações na literatura a respeito da segurança do uso da cetamina durante o período pós-natal, tornando-se necessários mais estudos sobre o uso desse fármaco com essa finalidade. Assim, no presente trabalho propõe-se estudar os efeitos antidepressivos da exposição prolongada de cetamina em ratos adultos e em ratas lactantes induzidas à depressão pós-parto. Para tanto, o trabalho foi dividido em três capítulos. O Capítulo 1 tem como objetivo estudar os efeitos do modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto em ratas. Para isso, ratas lactantes foram separadas de seus filhotes por 3 h diárias do dia pós-natal 2 ao 12. Foram realizados estudos comportamentais, neuroquímicos, hormonais, de expressão de RNA e de citocinas pró-inflamatórias. Os resultados mostraram que as ratas submetidas ao modelo de separação materna apresentaram alterações no comportamento materno, no nado forçado, nos níveis neurotransmissores cerebrais e nos níveis de corticosterona e TSH, consistentes com um fenótipo depressivo. Esses dados em conjunto sugerem que o modelo de separação materna em ratas pode ser útil para avaliação de fármacos com potencial atividade para o tratamento da depressão pós-parto. O Capítulo 2 tem como objetivo estudar os efeitos fármaco-toxicológicos do tratamento prolongado com diferentes doses subanestésicas de cetamina com potencial atividade antidepressiva em ratos. Para isso, ratos adultos foram tratados com 5, 10 ou 20 mg/kg de cetamina, por via intraperitoneal, por 21 dias e foi feita a avaliação do peso corporal, do consumo de água e ração e da bateria de observação funcional (FOB) semanalmente, bem como

as análises neuroquímica, hematológica e bioquímica sérica ao final do tratamento. Os resultados mostraram alterações no ganho de peso e no sistema serotoninérgico. Em conjunto, esses dados indicam que as alterações observadas podem ser explicadas pelo mecanismo de ação da cetamina, sugerindo ausência de efeitos fármaco-toxicológicos desse fármaco nas doses utilizadas. O Capítulo 3 tem como objetivo estudar os efeitos do tratamento com diferentes doses subanestésicas de cetamina em ratas lactantes induzidas à depressão pós-parto. Para isso, ratas lactantes foram induzidas a depressão pós-parto pelo modelo descrito no Capítulo 1, tratadas com as mesmas doses de cetamina do Capítulo 2, durante toda a lactação, e submetidas as mesmas avaliações descritas no Capítulo 1. Os resultados mostraram que o tratamento prolongado com cetamina causou alterações no ganho de peso, no comportamento materno, na caixa claro/escuro, na neuroquímica cerebral e induziu comportamento estereotipado. Esses dados em conjunto sugerem que o tratamento prolongado com doses subanestésicas de cetamina não causou efeito antidepressivo em ratas induzidas à depressão pós-parto pelo modelo de separação materna, e que a dose mais alta foi capaz de induzir comportamento estereotipado.

Palavras-chave: Depressão pós-parto. Anestésico. Comportamento animal. Comportamento materno. Sistema nervoso central.

ABSTRACT

MAGALHÃES, J.Z. **Behavioral and neurophysiological studies of prolonged exposure to ketamine as an antidepressant and the maternal separation model for postpartum depression induction in rats.** 2021. 247 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Postpartum depression is a multifactorial mental illness that affects women worldwide. The approved treatment for this disease consists of a combination of psychotherapy and pharmacological treatment. Currently, there is growing interest in the development of new antidepressants, prioritizing drugs with mixed mechanism of action. Ketamine is being extensively studied for its use as an antidepressant, including as a treatment for postpartum depression. However, there is limited evidence on the safety of its use during the postnatal period. For this reason, further studies on the use of this drug as a treatment for postpartum depression during the postnatal period are needed. Thus, the present work aims to study the antidepressant effects of prolonged exposure to ketamine in adult rats and in lactating female rats that have been induced to postpartum depression. This work is divided into three chapters. Chapter 1 aims to study the effects of the maternal separation model for postpartum depression induction in female rats. For this purpose, dams were separated from their offspring for 3 hours per day between postnatal days 2 to 12. Behavioral, neurochemical, hormonal, RNA expression and pro-inflammatory cytokine studies were carried out. The results showed that the dams submitted to the maternal separation model showed changes in: maternal behavior, the forced swim test, brain neurotransmitters levels and corticosterone and TSH levels, consistent with a depressive phenotype. These data suggest that the maternal separation model in rats may be useful for evaluating drugs with potential activity for the treatment of postpartum depression. Chapter 2 aims to analyze the pharmaco-toxicological effects of prolonged treatment using different subanesthetic doses of ketamine with potential antidepressant activity in rats. Adult male rats were treated with 5, 10 or 20 mg/kg of ketamine, via intraperitoneal injections, for 21 days. Their body weight, water and food intake and the functional observation battery (FOB) were evaluated weekly. In addition, neurochemical, hematological and biochemical analyzes were conducted at the end of treatment. The results showed

changes in weight gain and in the brain serotonergic system. Together, these data indicate that the observed changes can be explained by ketamine mechanism of action. This suggests that the doses used did not have any pharmacotoxicological effects. Chapter 3 examines the effects of the treatment using different subanesthetic doses of ketamine in lactating rats induced to postpartum depression. For this purpose, dams were induced to postpartum depression by the same model described in Chapter 1, treated with the same doses of ketamine as in Chapter 2 throughout lactation, and submitted to the same assessments described in Chapter 1. The results showed that prolonged treatment using ketamine caused changes in weight gain, maternal behavior, the light/dark box test, the brain neurochemistry and induced stereotyped behavior. Taken together, these data suggest that prolonged treatment using subanesthetic doses of ketamine did not cause an antidepressant effect in dams induced to postpartum depression by the maternal separation model, whereas the higher dose of ketamine was able to induce stereotyped behavior.

Keywords: Postpartum depression. Anesthetic. Animal behavior. Maternal behavior. Central nervous system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Representação esquemática das diferentes regiões cerebrais com alterações na atividade neuronal na depressão pós-parto.....	42
Figura 1.2 – Filhotes agrupados no ninho no DPN2.....	52
Figura 1.3 – Modelo de separação materna. A) sala em que foi feito o modelo de separação materna, em que as caixas moradia das mães estavam sobre a bancada ao lado das caixas de plástico pequenas com os filhotes; B) detalhe dos filhotes alocados nas caixas de plástico pequenas sobre a manta térmica.	53
Figura 1.4 – Aparato utilizado para o teste de preferência olfatória.....	56
Figura 1.5 – Aparato da caixa claro/escuro.....	57
Figura 1.6 – Rata realizando o teste de nado forçado.....	58
Figura 1.7 – Validação do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas lactantes, através do teste de nado forçado e da dosagem de corticosterona. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=9 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM =grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	66
Figura 1.8 – Avaliação do desempenho reprodutivo e acompanhamento do ganho de peso semanal (em gramas) de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	68
Figura 1.9 – Parâmetros avaliados no teste de comportamento materno de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	69

Figura 1.10 - Parâmetros avaliados teste de comportamento materno agressivo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	70
Figura 1.11 – Parâmetros avaliados teste de preferência olfatória de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	71
Figura 1.12 – Parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	72
Figura 1.13 – Parâmetros avaliados no teste de nado forçado de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-9 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	73
Figura 1.14 – Avaliação do sistema serotoninérgico do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	74
Figura 1.15 – Avaliação do sistema noradrenérgico do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	74

Figura 1.16 – Avaliação do sistema dopaminérgico do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	75
Figura 1.17 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	76
Figura 1.18 – Avaliação do sistema serotoninérgico do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	77
Figura 1.19 – Avaliação do sistema noradrenérgico do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	77
Figura 1.20 – Avaliação do sistema dopaminérgico do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	78
Figura 1.21 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	79

Figura 1.22 – Avaliação do sistema serotoninérgico do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	80
Figura 1.23 – Avaliação do sistema noradrenérgico do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	80
Figura 1.24 – Avaliação do sistema dopaminérgico do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	81
Figura 1.25 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	82
Figura 1.26 – Avaliação do sistema serotoninérgico do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	83
Figura 1.27 – Avaliação do sistema noradrenérgico do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	83

Figura 1.28 – Avaliação do sistema dopaminérgico do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	84
Figura 1.29 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	85
Figura 1.30 – Parâmetros avaliados na dosagem hormonal de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-10 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	86
Figura 1.31 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=5-6 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	87
Figura 1.32 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=5 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	88
Figura 1.33 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	88

Figura 1.34 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	89
Figura 1.35 – Parâmetros avaliados na dosagem dos níveis de citocinas pró-inflamatórias de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-10 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.....	90
Figura 2.1 – Estrutura química da cetamina.....	128
Figura 2.2 – Isômeros ópticos, S (+) e R(-), da cetamina.....	130
Figura 2.3 – Principal processo de biotransformação da cetamina (CET). Estão ilustrados os metabólitos da cetamina (norcetamina - nor-CET; hidroxinorcetamina - HNK; desidronorcetamina - DHNK), bem como as enzimas do citocromo P450 (CYP) que catalisam as reações de biotransformação.....	132
Figure 2.4 – Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e de ração de ratos tratados com cetamina (5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentados as médias e seus respectivos erros padrão. N=8 animais/grupo..	146
Figura 2.5 – Avaliação do sistema noradrenérgico do hipotálamo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	152
Figura 2.6 – Avaliação do sistema dopaminérgico do hipotálamo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	152

Figura 2.7 – Avaliação do sistema serotoninérgico do hipotálamo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	153
Figura 2.8 – Avaliação do sistema noradrenérgico do hipocampo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	154
Figura 2.9 – Avaliação do sistema dopaminérgico do hipocampo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	154
Figura 2.10 – Avaliação do sistema serotoninérgico do hipocampo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	155
Figura 2.11 – Avaliação do sistema noradrenérgico do córtex pré-frontal de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	156
Figura 2.12 – Avaliação do sistema dopaminérgico do córtex pré-frontal de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	156
Figura 2.13 – Avaliação do sistema serotoninérgico do córtex pré-frontal de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	157
Figura 2.14 – Avaliação do sistema noradrenérgico do corpo estriado de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	158

Figura 2.15 – Avaliação do sistema dopaminérgico do corpo estriado de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	158
Figura 2.16 – Avaliação do sistema serotoninérgico do corpo estriado de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	159
Figura 2.17 – Avaliação do sistema noradrenérgico do cerebelo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	160
Figura 2.18 – Avaliação do sistema dopaminérgico do cerebelo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	160
Figura 2.19 – Avaliação do sistema serotoninérgico do cerebelo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.....	161
Figura 2.20 – Avaliação hematológica de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as medianas e seus respectivos limites. N=6 animais/grupo.....	162
Figura 2.21 – Avaliação bioquímica sérica de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as medianas e seus respectivos limites. N=6 animais/grupo.....	164
Figura 3.1 – Mecanismos moleculares da ação da cetamina no metabolismo de neurotransmissão de glutamato (Glu) e de ácido gama aminobutírico GABA. BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; Gln = glutamina.....	185

Figura 3.2 – Avaliação do desempenho reprodutivo e do ganho de peso semanal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.....	197
Figura 3.3 - Parâmetros avaliados no comportamento materno de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.....	198
Figura 3.4 - Parâmetros avaliados no comportamento materno agressivo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.....	199
Figura 3.5 - Parâmetros avaliados na preferência olfatória de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.....	200
Figura 3.6 – Parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.....	202
Figura 3.7 – Parâmetros avaliados no teste do nado forçado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-9 animais por grupo.....	203

Figura 3.8 – Avaliação do sistema serotoninérgico do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	204
Figura 3.9 – Avaliação do sistema noradrenérgico do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	204
Figura 3.10 – Avaliação do sistema dopaminérgico do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	205
Figura 3.11 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	206
Figura 3.12 – Avaliação do sistema serotoninérgico do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	207
Figura 3.13 – Avaliação do sistema noradrenérgico do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	207

Figura 3.14 – Avaliação do sistema dopaminérgico do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	208
Figura 3.15 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	209
Figura 3.16 – Avaliação do sistema serotoninérgico do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	210
Figura 3.17 – Avaliação do sistema noradrenalina do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	210
Figura 3.18 – Avaliação do sistema dopamina do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	211
Figura 3.19 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	212

Figura 3.20 – Avaliação do sistema serotoninérgico do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	213
Figura 3.21 – Avaliação do sistema noradrenérgico do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	213
Figura 3.22 – Avaliação do sistema dopaminérgico do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	214
Figura 3.23 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.....	215
Figura 3.24 – Parâmetros avaliados na dosagem hormonal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-10 animais por grupo.....	216
Figura 3.25 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro de genes do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=5-7 animais por grupo.....	217

Figura 3.26 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro de genes do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=5 animais por grupo.....	218
Figura 3.27 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro de genes do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 animais por grupo.....	219
Figura 3.28 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro de genes do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 animais por grupo.....	220
Figura 3.29 – Parâmetros avaliados na dosagem dos níveis de citocinas pró-inflamatórias de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-10 animais por grupo.....	221

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Avaliação da bateria de observação funcional (FOB) de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as medianas e seus respectivos limites. N=6 animais/grupo..... 148

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 – Descrição das alterações genéticas e epigenéticas envolvidos na psicopatologia da depressão pós-parto.....	47
Quadro 1.2 – Descrição dos parâmetros avaliados no teste de comportamento materno.....	54
Quadro 1.3 – Descrição dos parâmetros avaliados no teste de comportamento materno agressivo.....	55
Quadro 1.4 – Descrição dos parâmetros avaliados na preferência olfatória.....	56
Quadro 1.5 – Descrição dos parâmetros avaliados na caixa claro/escuro.....	57
Quadro 1.6 – Descrição dos parâmetros avaliados no nado forçado.....	58
Quadro 1.7 – Descrição dos genes avaliados.....	63
Quadro 1.8 – Testes comportamentais realizados nas fêmeas submetidas ao modelo de depressão pós-parto por separação materna. DPN=dia pós-natal..	65
Quadro 2.1 – Descrição dos parâmetros analisados no teste FOB (<i>functional observational battery</i>).....	140
Quadro 2.2 – Divisão dos grupos experimentais.....	143
Quadro 3.1 – Divisão dos grupos experimentais.....	194
Quadro 3.2 – Testes comportamentais realizados nas fêmeas submetidas ao modelo de depressão pós-parto por separação materna (DPN=dia pós-natal).	195

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	37
CAPÍTULO 1.....	39
1.1 INTRODUÇÃO.....	40
1.1.1 Neurobiologia da depressão pós-parto.....	41
1.1.2 Mecanismos neuroendócrinos da depressão pós-parto.....	43
1.1.3 Mecanismos neuroinflamatórios da depressão pós-parto.....	45
1.1.4 Fatores genéticos e epigenéticos da depressão pós-parto.....	46
1.1.5 Tratamentos da depressão pós-parto.....	47
1.1.6 Justificativa.....	49
1.2 OBJETIVOS.....	50
1.2.1 Objetivo geral.....	50
1.2.2 Objetivos específicos.....	50
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
1.3.1 Animais.....	51
1.3.2 Procedimentos.....	51
1.3.2.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez.....	51
1.3.2.2 Avaliação do desempenho reprodutivo e do ganho de peso durante a lactação.....	52
1.3.2.3 Modelo de separação materna.....	52
1.3.2.4 Avaliação comportamental.....	53
1.3.2.4.1 Comportamento materno.....	53
1.3.2.4.2 Comportamento materno agressivo.....	54
1.3.2.4.3 Preferência olfatória.....	55
1.3.2.4.4 Caixa claro/escuro.....	56
1.3.2.4.5 Nado forçado.....	58
1.3.2.5 Eutanásia e coleta de material biológico.....	59
1.3.2.6 Dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos.....	59
1.3.2.7 Dosagem hormonal.....	61
1.3.2.8 Avaliação da expressão de RNA.....	62
1.3.2.9 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias.....	64

1.3.3 Delineamento experimental.....	64
<u>1.3.3.1 Experimento 1: Validação do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas lactantes.....</u>	<u>64</u>
<u>1.3.3.2 Experimento 2: Avaliação dos efeitos comportamentais e neurofisiológicos do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas lactantes.....</u>	<u>64</u>
1.3.4 Análise estatística.....	65
1.4 RESULTADOS.....	66
1.4.1 Experimento 1: Validação do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas lactantes.....	66
1.4.2 Experimento 2: Avaliação dos efeitos comportamentais e neurofisiológicos do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas lactantes.....	67
<u>1.4.2.1 Efeitos do modelo de separação materna no desempenho reprodutivo e no ganho de peso de ratas lactantes.....</u>	<u>67</u>
<u>1.4.2.2 Efeitos do modelo de separação materna no comportamento de ratas lactantes.....</u>	<u>68</u>
<u>1.4.2.2.1 Comportamento materno.....</u>	<u>68</u>
<u>1.4.2.2.2 Comportamento materno agressivo.....</u>	<u>69</u>
<u>1.4.2.2.3 Preferência olfatória.....</u>	<u>70</u>
<u>1.4.2.2.4 Caixa claro/escuro.....</u>	<u>71</u>
<u>1.4.2.2.5 Nado forçado.....</u>	<u>72</u>
<u>1.4.2.3 Efeitos do modelo de separação materna nos níveis de neurotransmissores cerebrais e seus metabólitos de ratas lactantes.....</u>	<u>73</u>
<u>1.4.2.4 Efeitos do modelo de separação materna nos níveis hormonais de ratas lactantes.....</u>	<u>85</u>
<u>1.4.2.5 Efeitos do modelo de separação materna na expressão de RNA mensageiro de genes cerebrais de ratas lactantes.....</u>	<u>86</u>
<u>1.4.2.6 Efeitos do modelo de separação materna nos níveis de citocinas pró-inflamatórias de ratas lactantes.....</u>	<u>89</u>
1.5 DISCUSSÃO.....	91

1.6 CONCLUSÃO.....	110
REFERÊNCIAS.....	111
CAPÍTULO 2.....	127
2.1 INTRODUÇÃO.....	128
2.1.1 Uso clínico.....	129
2.1.2 Farmacocinética.....	130
2.1.3 Mecanismo de ação.....	133
2.1.4 Efeitos colaterais.....	135
2.1.5 Uso como droga de abuso.....	136
2.1.6 Justificativa.....	136
2.2 OBJETIVOS.....	138
2.2.1 Objetivo geral.....	138
2.2.2 Objetivos específicos.....	138
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	139
2.3.1 Animais.....	139
2.3.2 Fármaco.....	139
2.3.3 Procedimentos.....	140
<u>2.3.3.1 Bateria de observação funcional (<i>functional observational battery</i> - FOB).....</u>	<u>140</u>
<u>2.3.3.2 Dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos.....</u>	<u>141</u>
<u>2.3.3.3 Avaliação hematológica.....</u>	<u>142</u>
<u>2.3.3.4 Avaliação bioquímica.....</u>	<u>142</u>
2.3.4 Delineamento experimental.....	143
2.3.5 Análise estatística.....	144
2.4 RESULTADOS.....	145
2.4.1 Efeitos da administração prolongada de cetamina no ganho de peso e no consumo de água e ração.....	145
2.4.2 Efeitos da administração prolongada de cetamina na bateria de observação funcional (FOB).....	146
2.4.3 Efeitos da administração prolongada de cetamina nos níveis de neurotransmissores cerebrais e seus metabólitos.....	151

2.4.4 Efeitos da administração prolongada de cetamina nos parâmetros hematológicos.....	161
2.4.5 Efeitos da administração prolongada de cetamina nos parâmetros bioquímicos séricos.....	163
2.5 DISCUSSÃO.....	165
2.6 CONCLUSÃO.....	170
REFERÊNCIAS.....	171
CAPÍTULO 3.....	182
3.1 INTRODUÇÃO.....	183
3.1.1 Mecanismo de ação antidepressiva.....	184
3.1.2 Estudos pré-clínicos.....	187
3.1.3 Estudos clínicos.....	188
3.1.4 Tratamento para depressão pós-parto.....	189
3.1.5 Justificativa.....	189
3.2 OBJETIVOS.....	191
3.2.1 Objetivo geral.....	191
3.2.2 Objetivos específicos.....	191
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	192
3.3.1 Animais.....	192
3.3.2 Fármaco.....	192
3.3.3 Procedimentos.....	192
<u>3.3.3.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez.....</u>	<u>192</u>
<u>3.3.3.2 Avaliação do desempenho reprodutivo e do ganho de peso.....</u>	<u>193</u>
<u>3.3.3.3 Modelo de separação materna.....</u>	<u>193</u>
<u>3.3.3.4 Avaliação comportamental.....</u>	<u>193</u>
<u>3.3.3.5 Eutanásia e coleta de material biológico.....</u>	<u>193</u>
<u>3.3.3.6 Dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos.....</u>	<u>193</u>
<u>3.3.3.7 Dosagem hormonal.....</u>	<u>193</u>
<u>3.3.3.8 Avaliação da expressão de RNA.....</u>	<u>194</u>
<u>3.3.3.9 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias.....</u>	<u>194</u>
3.3.4 Delineamento experimental.....	194
3.3.4 Análise estatística.....	195

3.4 RESULTADOS.....	196
3.4.1 Efeitos da administração prolongada de cetamina no desempenho reprodutivo e no ganho de peso de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna.....	196
3.4.2 Efeitos da administração prolongada de cetamina no comportamento de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna.....	197
<u>3.4.2.1 Comportamento materno.....</u>	<u>197</u>
<u>3.4.2.2 Comportamento materno agressivo.....</u>	<u>199</u>
<u>3.4.2.3 Preferência olfatória.....</u>	<u>199</u>
<u>3.4.2.4 Caixa claro/escuro.....</u>	<u>201</u>
<u>3.4.2.5 Nado forçado.....</u>	<u>202</u>
3.4.3 Efeitos da administração prolongada de cetamina nos níveis de neurotransmissores cerebrais e seus metabólitos de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna.....	203
3.4.4 Efeitos da administração prolongada de cetamina nos níveis hormonais de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna.....	215
3.4.5 Efeitos da administração prolongada de cetamina na expressão de RNA mensageiro de genes cerebrais de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna.....	217
3.4.6 Efeitos da administração prolongada de cetamina nos níveis de citocinas pró-inflamatórias de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna.....	220
3.5 DISCUSSÃO.....	222
3.6 CONCLUSÃO.....	234
REFERÊNCIAS.....	235
ANEXO 1.....	245
ANEXO 2.....	247

APRESENTAÇÃO

A depressão pós-parto é uma doença multifatorial mentalmente incapacitante que afeta mulheres pelo mundo todo. Ela é definida como um episódio de depressão maior que ocorre no período seguinte ao parto. O tratamento preconizado para essa doença é a combinação de psicoterapias e tratamento farmacológico. Entretanto, é necessário considerar as consequências que esse tratamento farmacológico possui tanto na mãe lactante, quanto na progênie. Sabe-se que o vínculo mãe-filhote é fundamental para o desenvolvimento correto da progênie; assim, alterações no comportamento materno, bem como o tratamento indireto via leite materno, podem gerar distúrbios permanentes na progênie.

Atualmente, o tratamento farmacológico para depressão está em expansão, com a exploração de novos alvos moleculares e sistemas de neurotransmissão. Hoje, os tratamentos disponíveis utilizam o sistema indolaminérgico como alvo, visando principalmente a serotonina e seus receptores como alvo central. Contudo, as novas tendências farmacológicas visam fármacos que possuam mecanismo de ação misto, ou seja, que utilizem mais de um mecanismo para sua ação.

A cetamina é um agente anestésico utilizado tanto na medicina humana como na veterinária que possui mecanismo de ação misto. Ela produz um efeito de anestesia dissociativa, em que não há perda real de consciência dos pacientes e seus reflexos respiratórios continuam preservados, porém ficam incapazes de responder a estímulos sensoriais. Além disso, a cetamina também possui ação analgésica, anti-inflamatória e antidepressiva.

Devido à sua ação antidepressiva, a cetamina vem sendo bastante estudada para o uso com essa finalidade, incluindo o tratamento de depressão pós-parto. Apesar disso, há poucas informações na literatura a respeito da segurança de um tratamento durante o período pós-natal, tornando-se necessários mais estudos sobre o uso desse fármaco com essa finalidade, a fim de contribuir com o seu uso clínico mais seguro.

Assim, no presente trabalho propõe-se estudar os efeitos antidepressivos da exposição prolongada de cetamina em ratos adultos e em ratas lactantes induzidas à depressão pós-parto.

Para tanto, o trabalho foi dividido em três capítulos. O Capítulo 1 refere-se ao estudo dos efeitos de um modelo comportamental de indução da depressão pós-parto em ratos. O Capítulo 2 traz o estudo dos efeitos farmaco-toxicológicos do tratamento prolongado com diferentes doses subanestésicas de cetamina com potencial atividade antidepressiva em ratos. O Capítulo 3, em ratas lactantes induzidas à depressão pós-parto pelo modelo comportamental utilizado no Capítulo 1, estudou-se os efeitos do tratamento com diferentes doses subanestésicas de cetamina, avaliadas no Capítulo 2.

Este trabalho já originou artigos publicados em periódicos nacionais e internacionais. O artigo intitulado “Novas tendências do uso da cetamina nos transtornos de depressão: implicações no desenvolvimento da progênie” é uma revisão da literatura sobre o uso antidepressivo da cetamina publicado em periódico nacional. O artigo intitulado “*Preclinical toxicological study of prolonged exposure to ketamine as an antidepressant*” refere-se aos experimentos abordados no Capítulo 2 e foi publicado em periódico internacional. A referência de ambos os artigos está anexada no final do trabalho.

CAPÍTULO 1

ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROFISIOLÓGICOS DO
MODELO DE SEPARAÇÃO MATERNA PARA INDUÇÃO DE DEPRESSÃO PÓS-
PARTO EM RATAS LACTANTE

1.1 INTRODUÇÃO

A depressão pós-parto é uma doença mentalmente incapacitante que afeta uma em cada sete mulheres pelo mundo (FRIEDMAN; RESNICK, 2009; XIA, 2016). Estima-se que de 10 a 15% das mulheres em países industrializados sofrem dessa doença e em países em desenvolvimento esse número triplica (PAWLUSKI; LONSTEIN; FLEMING, 2017).

Apesar de a depressão pós-parto ser considerada a complicação mais comum do parto, devido ao impacto negativo na mãe e as alterações importantes provocados no desenvolvimento comportamental, emocional e cognitivo da criança, ainda é uma doença pouco estudada e pouco diagnosticada no mundo; cerca de 50% das mulheres com depressão pós-parto não são diagnosticadas e não recebem o tratamento adequado (FRIEDMAN; RESNICK, 2009; PAYNE; MAGUIRE, 2019).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM-5*), elaborado pela Associação de Psiquiatria Americana (*American Psychiatric Association - APA*) define essa doença como um episódio de depressão maior (ou depressão unipolar) com início no período periparto (APA, 2014), pois cerca de um terço das mulheres que sofrem de depressão pós-parto começam a manifestar alguns sintomas durante a gestação (WISNER et al., 2013).

O DSM-5 preconiza o diagnóstico de depressão maior quando um indivíduo manifesta pelo menos cinco sintomas clínicos por, no mínimo, duas semanas, sendo elas: 1) humor deprimido na maior parte do dia, quase todos os dias, 2) acentuada diminuição no interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades, 3) perda ou ganho significativo de peso, 4) insônia ou hipersonia, 5) agitação ou retardo psicomotor, 6) fadiga ou perda de energia, 7) sentimentos de inutilidade ou culpa excessivo, 8) capacidade diminuída para pensar ou se concentrar e 9) pensamentos recorrentes de morte ou ideias suicidas (APA, 2014).

A depressão pós-parto apresenta prevalência de 10-20% na população mundial, porém esse valor varia pelas diferentes regiões do mundo (GAVIN et al., 2005; COUTO et al., 2015). Essa doença possui 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).

Diversos fatores de risco ambientais para o desenvolvimento de depressão pós-parto foram identificados: depressão pré-natal, ansiedade pré-natal, interações mãe-bebê prejudicadas, falta de suporte social, problemas financeiros e matrimoniais, e eventos de vida adversos (ROBERTSON et al., 2004; O'HARA; MCCABE, 2013).

1.1.1 Neurobiologia da depressão pós-parto

Diversos sistemas neurais estão envolvidos na psicopatologia da depressão. Pawluski et al. (2017), em um trabalho de revisão, destaca as regiões cerebrais que apresentam alterações na atividade neuronal em mulheres diagnosticadas com depressão pós-parto. Os estudos abordados nessa revisão utilizaram ressonância magnética funcional para avaliar a atividade neuronal por meio de estímulos emocionais relacionados com a criança e não relacionados com a criança, com o objetivo de entender tanto a neurobiologia da doença, quanto correlacionar às alterações neurológicas encontradas com a resposta materna aos filhos (Figura 1.1).

Esses estudos apontam alterações na atividade neuronal de estruturas corticais (córtex pré-frontal medial dorsal, córtex cingulado anterior, córtex cingulado posterior, insula, giro frontal inferior, giro frontal superior, córtex orbitofrontal) e subcorticais (amígdala, corpo estriado, tálamo, hipocampo, núcleo caudado, nucleus accumbens, substância nigra, área tegmental ventral e substância cinzenta periaquedutal) – (Figura 1.1); essas alterações nos circuitos neurais frequentemente ocorrem em apenas um hemisfério cerebral (PAWLUSKI; LONSTEIN; FLEMING, 2017).

Figura 1.1 – Representação esquemática das diferentes regiões cerebrais com alterações na atividade neuronal na depressão pós-parto.

Fonte: (Adaptado de PAWLUSKI; LONSTEIN; FLEMING, 2017).

Legenda: ACC = córtex cingulado anterior; AMG = amígdala; CN = núcleo caudado; DMPFC = córtex pré-frontal medial dorsal; HPC = hipocampo; IC = insula; IFG = giro frontal inferior; NaCC = núcleo accumbens; OFC = córtex orbitofrontal; PAG = substância cinzenta periaquedutal; PCC = córtex cingulado posterior; SFG = giro frontal superior; SN = substância nigra; STR = corpo estriado; THAL = tálamo; VTA = área tegmental ventral.

Existem diversos sistemas de neurotransmissão envolvidos na psicopatologia da depressão, contudo, em relação à depressão pós-parto, se destacam os sistemas serotoninérgico, dopaminérgico, glutamatérgico e GABAérgico (PAWLUSKI; LONSTEIN; FLEMING, 2017; PAYNE; MAGUIRE, 2019).

O envolvimento das monoaminas na psicopatologia da depressão pós-parto tem sido sugerido por diversos trabalhos, uma vez que medicamentos que tenham esse sistema como alvo acarretam em efeito antidepressivo nesses indivíduos (PAYNE; MAGUIRE, 2019). Estudos mostraram que mulheres diagnosticadas com depressão pós-parto apresentaram redução nos níveis de serotonina plaquetária e de triptofano, aminoácido precursor da serotonina, além de redução na ligação da serotonina com seus receptores e transportadores (SKALKIDOU et al., 2012). Polimorfismos em genes envolvidos no sistema serotoninérgico também estão

associados ao desenvolvimento dessa doença (SKALKIDOU et al., 2012; FASCHING et al., 2012).

Além da serotonina, também há evidências que sugerem o envolvimento da dopamina na depressão pós-parto. Estudos em seres humanos mostram que mutações nos genes dos receptores de dopamina DR1 e DR2 estão associadas aos distúrbios no comportamento materno exibidos por mulheres com essa doença (MILEVA-SEITZ et al., 2013). Estudo em roedores mostrou que a inibição dos neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo foi capaz de aumentar o comportamento tipo-depressivo exibido por esses animais, enquanto a ativação desses neurônios teve o efeito oposto (TYE et al., 2012).

O glutamato e o ácido gama-aminobutírico (GABA) são aminoácidos neurotransmissores que também estão associados ao desenvolvimento da depressão pós-parto; o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, enquanto o GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (PAYNE; MAGUIRE, 2019). Estudos em mulheres diagnosticadas com essa doença revelaram aumento nos níveis de glutamato no córtex pré-frontal e diminuição no córtex pré-frontal medial dorsal, bem como uma correlação entre os níveis de GABA e o desenvolvimento da doença (MCEWEN et al., 2012; DELIGIANNIDIS et al., 2016; ROSA et al., 2017). O envolvimento desses aminoácidos na depressão pós-parto possivelmente está associado a alterações nos níveis de hormônios sexuais femininos, uma vez que estes modulam a ação desses neurotransmissores (SCHILLER; MELTZER-BRODY; RUBINOW, 2015).

1.1.2 Mecanismos neuroendócrinos da depressão pós-parto

Os períodos do periparto e do pós-parto são marcados pela abrupta mudança nos níveis hormonais e são também períodos de vulnerabilidade para o desenvolvimento de doenças mentais; desse modo, acredita-se que as flutuações nas concentrações de hormônios que ocorrem nesses períodos estejam relacionadas com a neurobiologia da depressão pós-parto (BLOCH; DALY; RUBINOW, 2003; PAYNE; MAGUIRE, 2019).

Os hormônios sexuais femininos são a evidência mais forte dessa relação entre as alterações nas concentrações hormonais e o desenvolvimento da

depressão pós-parto, uma vez que as flutuações nos níveis desses hormônios ocorrem concomitantemente com o início da manifestação da sintomatologia da doença; ainda que os níveis séricos absolutos desses hormônios possam não diferir em mulheres que sofrem dessa doença, a sensibilidade cerebral às flutuações desses hormônios é diferente (PAYNE; MAGUIRE, 2019).

As concentrações de estrógeno e progesterona aumentam drasticamente antes do parto e caem de forma abrupta depois do nascimento da criança. Suda e colaboradores (2008) demonstrou a relação entre os níveis de estrógeno e progesterona com a manifestação de comportamento tipo-depressivo. Nesse trabalho ratas ovariectomizadas foram administradas com estrógeno e progesterona exógenas por 21 dias, através de implante subcutâneo, a fim de mimetizar as flutuações hormonais que ocorrem no periparto. Após esse período, os animais tiveram abrupta queda nas concentrações hormonais e foi observado o aparecimento de comportamento tipo-depressivo. Os níveis de estrógeno também causam impacto no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), igualmente importante para o desenvolvimento da depressão pós-parto (WALF; FRYE, 2006).

A ocitocina (nonapeptídeo produzido no hipotálamo e armazenado na neuro-hipófise atua como um hormônio e promove a liberação do leite durante a lactação e a contração uterina no parto), devido a sua ação na regulação das emoções, na interação social, no estresse, na relação mãe-filhote, no parto e na lactação, tem sido apontada como outro fator influente na depressão pós-parto (PAYNE; MAGUIRE, 2019). Estudos mostraram que os níveis séricos de ocitocina durante o período de lactação em mulheres são inversamente correlacionados com a manifestação dos sintomas dessa doença (STAUBE; GREWEN; MELTZER-BRODY, 2013).

A prolactina (hormônio secretado pela adeno-hipófise tem como principal função estimular a produção de leite pelas glândulas mamárias e o aumento das mamas), assim como a ocitocina, também possui papel importante na lactação e na manifestação do comportamento materno (CAMARGO et al., 2017). Estudo com mulheres diagnosticadas com depressão pós-parto mostrou relação entre o desenvolvimento da doença com níveis séricos baixos de prolactina (GROER; MORGAN, 2007).

O eixo HPA também é apontado como fator importante na psicopatologia da depressão pós-parto devido, em partes, pelo estresse ser um fator de risco importante para o desenvolvimento dessa doença (BLOCH; DALY; RUBINOW, 2003; PAYNE; MAGUIRE, 2019). Estudos mostraram que a exposição de roedores a agentes estressores durante a gestação e/ou lactação acarretou em manifestação do comportamento tipo-deprimido e alteração no comportamento materno, assim como a exposição ao hormônio do estresse, corticosterona (glicocorticoide produzido pelo córtex da adrenal), sugerindo que esses efeitos sejam mediados por esse hormônio (CARINI; MURGATROYD; NEPHEW, 2013; MAGUIRE; MODY, 2016).

Os hormônios tireoidianos também estão relacionados com o desenvolvimento da depressão pós-parto (BLOCH; DALY; RUBINOW, 2003). Uma revisão publicada por Kirkegaard e Faber (1998) mostrou as principais mudanças nos hormônios tireoidianos (tri-iodotironina – T3; e tiroxina - T4) apresentadas por pacientes com depressão, sendo elas: aumento nas concentrações séricas de T4, diminuição ou conservação de T3, aumento ou conservação de triiodotironina reversa (rT3 – produto inativo da desiodação do T4), e diminuição de hormônio estimulador da tireoide (TSH). Também há relatos de diminuição nos níveis da proteína transportadora transtina (TTR), o que faz com que os hormônios tireoidianos não consigam chegar ao encéfalo (HENDRICK; ALTSHULER; WHYBROW, 1998; SULLIVAN et al., 1999).

Esses achados sugerem que a depressão pode estar relacionada com a deficiência de hormônios tireoidianos no cérebro e que essa deficiência contribui com a falta de efeito de muitos medicamentos antidepressivos (BAUER et al., 2003). Outra hipótese é de que a diminuição nos níveis de T3 leve a diminuição nos níveis de serotonina e, conseqüentemente, na função cerebral (WHYBROW; PRANGE, 1981; BASRAON; COSTANTINE, 2011).

1.1.3 Mecanismos neuroinflamatórios da depressão pós-parto

O sistema imune também está relacionado com o desenvolvimento da depressão pós-parto. Mudanças na resposta inflamatória ocorrem durante a gravidez, porém cessam após o parto; entretanto, evidências sugerem que em

mulheres que desenvolvem depressão essas alterações no sistema imunológico levam à excessiva resposta pró-inflamatória por meio da ativação de citocinas pró-inflamatórias no sistema nervoso central (SKALKIDOU et al., 2012; PAYNE; MAGUIRE, 2019).

Estudos mostram que mulheres com depressão pós-parto apresentam aumento nas concentrações séricas de interleucinas IL-1 β e IL-6 (ANDERSON; MAES, 2013; PAYNE; MAGUIRE, 2019). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória com ação endócrina e metabólica, capaz de interagir com o eixo HPA (SKALKIDOU et al., 2012). Payne e Maguire (2019) também mostram aumento nos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Estudos com mulheres diagnosticadas com depressão pós-parto sugerem o envolvimento do interferon gama (IFN- γ) na psicopatologia dessa doença, uma vez que essas mulheres apresentaram níveis mais baixos dessa citocina (GROER; MORGAN, 2007; SKALKIDOU et al., 2012).

A via da quinurenina (via metabólica que leva à produção de nicotinamida-adenina-dinucleótido – NAD⁺ – a partir da degradação do triptofano) também parece estar envolvida no desenvolvimento da depressão pós-parto. Estudo em mulheres com depressão pós-parto associou o aumento da concentração de quinurenina com o desenvolvimento da doença (MAES et al., 2002). Esse aumento nos níveis de quinurenina sugere aumento da degradação do triptofano por ação inflamatória, limitando a produção de serotonina (ANDERSON; MAES, 2013; PAYNE; MAGUIRE, 2019).

1.1.4 Fatores genéticos e epigenéticos da depressão pós-parto

Atualmente, existem fortes evidências que apontam fatores genéticos e epigenéticos como influenciadores no desenvolvimento de depressão pós-parto. Estudos de associação em todo o genoma identificaram alguns genes candidatos e potenciais vias envolvidas nessa doença; grande parte desses trabalhos apontam os polimorfismos como principais responsáveis pelas alterações genéticas relacionadas a essa doença (COUTO et al., 2015; PAYNE; MAGUIRE, 2019).

Além de fatores genéticos, também foram identificadas alterações na expressão gênica devido a mudanças na estrutura da cromatina, como metilação e modificações nas histonas (fatores epigenéticos), como parte do mecanismo

complexo da depressão pós-parto (PAYNE; MAGUIRE, 2019). No Quadro 1.1 estão descritas as principais alterações genéticas e epigenéticas envolvidas na psicopatologia dessa doença.

Quadro 1.1 – Descrição das alterações genéticas e epigenéticas envolvidos na psicopatologia da depressão pós-parto.

Genes	Descrição	Alterações genéticas e epigenéticas
<i>ESR1</i>	Receptor de estrógeno alfa	- Polimorfismo - Enriquecimento de sítios de transcrição
<i>5-HTT</i>	Transportador de serotonina	- Polimorfismo
<i>MAOA</i>	Monoamina oxidase A	- Polimorfismo
<i>COMT</i>	Catecol-O-metiltransferase	- Polimorfismo
<i>TPH2</i>	Triptofano hidroxilase 2	- Variações genéticas - Polimorfismo
<i>OXT</i>	Ocitocina	- Polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) - Metilação
<i>OXTR</i>	Receptor de ocitocina	- Polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) - Metilação
<i>HMNC1</i>	Hemicentina-1	- Polimorfismo
<i>GR</i>	Receptor de glicocorticóides	- Mutações - Polimorfismo
<i>CRH</i>	Hormônio liberador de corticotrofina	- Mutações - Polimorfismo
<i>HP1BP3</i>	Proteína 1 da heterocromatina, proteína de ligação 3	- Metilação
<i>TTC9B</i>	Domínio de repetição 9B do tetratricopeptídeo	- Metilação

Fonte: (COUTO et al., 2015; PAYNE; MCGUIRE, 2019).

1.1.5 Tratamentos da depressão pós-parto

Atualmente, existe grande quantidade de tratamentos farmacológicos e não farmacológicos para a depressão maior, incluindo antidepressivos, terapia hormonal, terapia eletroconvulsiva e psicoterapia (ZAJECKA, 2000; FITELSON et al., 2011).

Contudo, em relação ao uso de medicamentos antidepressivos, é necessário considerar as consequências que esse tratamento possa ter na mãe lactante (alterações metabólicas e o efeito da doença e do tratamento sobre a capacidade da mãe de cuidar da progênie), bem como na progênie, uma vez que esses medicamentos podem ser eliminados pelo leite materno (FITELSON et al., 2011; PAYNE, 2019).

Em roedores, em particular, Weinstock (2017) ressaltou 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.

Essa doença também 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 (GRACE; EVINDAR; STEWART, 2003; BRAND; BRENNAN, 2009).

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).

A *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) aprovou diversos medicamentos para o tratamento da depressão, sendo que a grande maioria tem como alvo os sistemas monoaminérgicos de neurotransmissão cerebral (ABDALLAH et al., 2016). Esses medicamentos são classificados de acordo com sua ação farmacológica, sendo eles: inibidores da monoaminoxidase, inibidores não seletivos da recaptação de monoaminas, inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs), inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina, inibidores seletivos de recaptação de serotonina e antagonistas do receptor alfa-2 adrenérgico, estimulantes da recaptação da serotonina, inibidores seletivos de recaptação de

noradrenalina, inibidores seletivos de recaptação de dopamina e antagonistas de receptor alfa-2 adrenérgico (MORENO; MORENO; SOARES, 1999).

Os ISRSs são os antidepressivos recomendados para o tratamento da depressão pós-parto (KIM et al., 2014). 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.

1.1.6 Justificativa

A depressão pós-parto é uma doença mental grave de grande importância para a saúde pública mundial. Apesar disso, ainda é uma doença pouco estudada e pouco diagnosticada no mundo. Embora existam diversos tratamentos farmacológicos disponíveis, estes apresentam riscos sobre a saúde da mãe e também para a prole, uma vez que é necessário avaliar as consequências do tratamento farmacológico sobre a mãe lactante e a prole lactente. A neurobiologia complexa da depressão pós-parto contribui para a dificuldade em estudar essa doença. Portanto, estudos utilizando modelos animais possuem papel importante no desenvolvimento de pesquisas sobre essa doença, pois ilustram efeitos biológicos e fornecem informações sobre segurança e eficácia de medicamentos antes dos testes em seres humanos. Assim, o objetivo do presente estudo foi realizar a avaliação dos efeitos comportamentais e fisiológicos do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos comportamentais e neurofisiológicos do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas lactantes.

1.2.2 Objetivos específicos

Em ratas submetidas ao modelo de separação materna durante a lactação, avaliar:

- O ganho de peso durante a lactação;
- O comportamento materno, comportamento materno agressivo, preferência olfatória, comportamento na caixa claro/escuro e nado forçado;
- Os níveis de neurotransmissores e seus metabólitos cerebrais;
- Os níveis hormonais;
- A expressão de RNA mensageiro de genes cerebrais;
- Os níveis de citocinas pró-inflamatórias.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Animais

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar virgens, com aproximadamente 90 dias de vida, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (41 x 34 x 18 cm) com maravalha autoclavada como substrato e mantidos 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 (a luz acende às 6h e apaga às 18h). Os animais tiveram água e comida *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

Os experimentos foram conduzidos na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) e na Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM), sendo aprovados pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ/USP, sob o protocolo de número 2099010218, e pela CEUA da UPM sob o protocolo de número 168-04-2018.

1.3.2 Procedimentos

1.3.2.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

As fêmeas foram colocadas nas gaiolas dos machos ao fim da tarde para o acasalamento, na razão de três fêmeas para cada macho. As fêmeas foram mantidas nas gaiolas dos machos e foi feito o acompanhamento do ganho de peso das fêmeas a cada 2 dias. Uma vez constatado o ganho de peso igual ou superior a 80 g de uma fêmea, ela foi separada dos demais animais e acondicionada em uma gaiola individual até o nascimento dos filhotes.

1.3.2.2 Avaliação do desempenho reprodutivo e do ganho de peso durante a lactação

O dia do nascimento dos filhotes foi considerado dia pós-natal (DPN) 1. Nesse dia não foi feita a manipulação dos animais, apenas a observação do nascimento dos filhotes. No DPN2 foi feita a padronização dos filhotes para 8 filhotes por ninhada (4 machos e 4 fêmeas, sempre que possível) e foi realizada a avaliação do desempenho reprodutivo das ratas, como descrito por Udo et al. (2014) – Figura 1.2. Foram observados os seguintes parâmetros:

- 1) Total de filhotes – Número total de filhotes nascidos vivos;
- 2) Número de fêmeas – Número total de filhotes fêmeas;
- 3) Número de machos – Número total de filhotes machos.

Durante toda a lactação foi feita a mensuração do peso diário de cada mãe a fim de obter-se o ganho de peso semanal.

Figura 1.2 – Filhotes agrupados no ninho no DPN2

Fonte: Autoria própria.

1.3.2.3 Modelo de separação materna

O modelo de separação materna foi utilizado para induzir a depressão pós-parto nas ratas, como descrito por Vetulani (2013). Esse modelo promove esse efeito depressivo através do estresse causado pela interrupção do vínculo mãe-filhote no início da vida da prole. Para isso, cada rata foi separada de sua prole por

três horas diárias, do DPN2 ao DPN12, das 10h às 13h. Os filhotes foram retirados das gaiolas moradias das mães e alocados em caixas de plástico pequenas (18 x 13 x 11 cm) contendo maravalha da gaiola moradia da mãe. Essas pequenas caixas foram então colocadas sobre uma manta térmica com temperatura de $32^{\circ}\text{C} \pm 2$ e mantidas na mesma sala em que as mães estavam alojadas (Figura 1.3). Desse modo, as mães podiam ouvir e farejar seus filhotes, mas não tinham contato físico e visual com eles.

Figura 1.3 – Modelo de separação materna. A) sala em que foi feito o modelo de separação materna, em que as caixas moradia das mães estavam sobre a bancada ao lado das caixas de plástico pequenas com os filhotes; B) detalhe dos filhotes alocados nas caixas de plástico pequenas sobre a manta térmica.

Fonte: ABREU (2020).

1.3.2.4 Avaliação comportamental

A avaliação comportamental de cada rata teve início logo após a realização do modelo de separação materna, entre 13h e 16h. Todos os aparatos empregados foram limpos, antes e após sua utilização, com solução de álcool 70%, a fim de evitar a interferência de odores dos outros animais. Para as avaliações de cada teste, foram intercalados animais do grupo controle e experimental.

1.3.2.4.1 Comportamento materno

Para a avaliação do comportamento materno, os filhotes foram separados das mães durante um período de uma hora e os ninhos foram desfeitos. Ao término desse período, os filhotes foram colocados de volta na gaiola moradia da mãe,

distribuídos nos vértices e nos pontos centrais das laterais da gaiola. Em seguida, a mãe foi introduzida no centro da gaiola e seu comportamento observado durante 1h (UDO et al., 2014). O Quadro 1.2 apresenta os parâmetros avaliados nesse teste.

Quadro 1.2 – Descrição dos parâmetros avaliados no teste de comportamento materno.

Parâmetro	Definição	Unidade de Medida
Recolhimento dos filhotes	Mãe carrega o filhote pela boca enquanto se locomove.	Tempo (segundos)
Latência agrupamento	Mãe agrupa todos os filhotes no ninho.	Tempo (segundos)
Grooming nos filhotes	Mãe realiza a higienização do filhote.	Tempo (segundos)
Self-grooming	Mãe realiza a auto higienização.	Tempo (segundos)
Latência para a amamentação	Tempo gasto até a mãe realizar a postura de cifose para amamentação dos filhotes pela 1ª vez.	Tempo (segundos)
Amamentação	Mãe permanece na postura de cifose, por no mínimo 3 minutos consecutivos, sobre no mínimo 5 filhotes.	Tempo (segundos)

1.3.2.4.2 Comportamento materno agressivo

Para a avaliação do comportamento materno agressivo a mãe foi separada dos filhotes por 15 min. Após esse período, ela foi recolocada na gaiola moradia com os filhotes e, então, um macho intruso, de peso semelhante ou menor ao da mãe (foi aceito uma diferença de peso de até 10 g entre eles) foi introduzido (MAGALHÃES et al., 2015). Este comportamento foi observado por 10 minutos. Os parâmetros avaliados estão descritos no Quadro 1.3.

Quadro 1.3 – Descrição dos parâmetros avaliados no teste de comportamento materno agressivo.

Parâmetro	Definição	Unidade de Medida
Interação mãe-intruso	Interação entre a mãe e o macho intruso; inclui os comportamentos de farejar, lambar, perseguir, passar sob/sobre, lutar e morder.	Tempo (segundos)
Latência 1ª luta	Tempo gasto até a mãe iniciar a primeira luta com o macho intruso.	Tempo (segundos)
Luta	Mãe exibe comportamento de luta, caracterizado por ataques rápidos e consecutivos contra o macho intruso; os ataques incluem <i>boxing</i> , mordidas e rolamento pela caixa, seguidos por um período de imobilidade.	Frequência
<i>Boxing</i>	Mãe ataca o macho intruso com as patas dianteiras e/ou traseiras.	Frequência
Interação mãe-filhotes	Interação entre a mãe e os filhotes; inclui os comportamentos de farejar, lambar, pegar com a boca e amamentar.	Tempo (segundos)
<i>Grooming</i> da mãe	Mãe realiza a auto higienização.	Tempo (segundos)
Interação intruso-filhotes	Interação entre o macho intruso e os filhotes; inclui os comportamentos de farejar, lambar e pegar com a boca.	Tempo (segundos)
<i>Grooming</i> do intruso	Macho intruso realiza a auto higienização.	Tempo (segundos)

1.3.2.4.3 Preferência olfatória

O teste de preferência olfatória é utilizado para avaliar possíveis alterações no reconhecimento materno da prole (RAINEKI, et al. 2009; TARICANO, 2010). Para tanto, foi utilizado um aparato circular com 80 cm de diâmetro delimitado por uma parede e com dois compartimentos laterais opostos de 30 x 30 cm. Esses compartimentos foram isolados do restante da arena por telas metálicas, a fim de limitar a interação do animal teste apenas pelo olfato (Figura 1.4).

Figura 1.4 - Aparato utilizado para o teste de preferência olfatória.

Fonte: Autoria própria.

Para o teste foi colocado maravalha limpa em um dos compartimentos laterais e maravalha suja da caixa moradia no outro compartimento. A rata foi então colocada no centro do aparato e seu comportamento observado por 10 minutos. Os parâmetros observados estão descritos no Quadro 1.4.

Quadro 1.4 – Descrição dos parâmetros avaliados na preferência olfatória.

Parâmetro	Definição	Unidade de Medida
Tempo zona limpa	Rata permanece na zona com maravalha limpa.	Tempo (segundos)
Tempo zona suja	Rata permanece na zona com maravalha com o odor dos filhotes.	Tempo (segundos)
Frequência zona limpa	Número de vezes que a rata adentra com as quatro patas na zona com maravalha limpa.	Frequência
Frequência zona suja	Número de vezes que a rata adentra com as quatro patas na zona com maravalha com o odor dos filhotes.	Frequência

1.3.2.4.4 Caixa claro/escuro

O teste da caixa claro/escuro é utilizado para avaliar a ansiedade de roedores (KUMAR; BHAT; KUMAR, 2013). A caixa claro/escuro é um aparato retangular (60 x 40 x 35 cm) dividido em dois compartimentos, um claro e um escuro, divididos por uma parede contendo uma abertura central, que permite o livre acesso dos animais

aos dois compartimentos. Sob o compartimento claro foi colocada uma luz branca como estímulo aversivo para os animais (Figura 1.5).

Figura 1.5 – Aparato da caixa claro/escuro.

Fonte: Autoria própria.

Cada rata foi colocada no centro do compartimento claro e seu comportamento foi observado por 10 minutos. O Quadro 1.5 mostra os parâmetros avaliados nesse teste.

Quadro 1.5 – Descrição dos parâmetros avaliados na caixa claro/escuro.

Parâmetro	Definição	Unidade de Medida
Latência 1ª passagem	Rata passa do compartimento claro para o escuro pela primeira vez.	Tempo (segundos)
Número de cruzamentos	Número total de vezes que a rata passou do compartimento claro para o escuro e vice-versa.	Frequência
Tempo no claro	Rata permanece no compartimento claro.	Tempo (segundos)
Tempo no escuro	Rata permanece no compartimento escuro.	Tempo (segundos)
Frequência no claro	Número de vezes em que a rata entrou no compartimento claro.	Frequência
Frequência no escuro	Número de vezes em que a rata entrou no compartimento escuro.	Frequência

1.3.2.4.5 Nado forçado

O nado forçado é um teste empregado para avaliação de comportamento tipo-depressivo em animais (ENGIN; TREIT; DICKSON, 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 1.6).

Figura 1.6 – Rata realizando o teste de nado forçado.

Fonte: Autoria própria.

Cada animal foi colocado na cuba por 5 minutos e seu comportamento foi observado. Os parâmetros avaliados estão descritos no Quadro 1.6. Após o término do teste, os animais foram colocados sob uma lâmpada vermelha para secagem durante 30 minutos.

Quadro 1.6 – Descrição dos parâmetros avaliados no nado forçado.

Parâmetro	Definição	Unidade de Medida
Latência 1ª imobilidade	Rata permanece praticamente imóvel pela primeira vez.	Tempo (segundos)
Imobilidade	Rata permanece praticamente imóvel, se movendo apenas o suficiente para manter a cabeça fora da água;	Tempo (segundos)
Atividade	Rata permanece nadando ou escalando a cuba.	Tempo (segundos)

1.3.2.5 Eutanásia e coleta de material biológico

Após o último teste comportamental, as ratas foram submetidas à eutanásia por decapitação para obtenção de sangue e das seguintes estruturas cerebrais: hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado. O sangue foi utilizado para a dosagem hormonal e de citocinas pró-inflamatórias e as estruturas cerebrais para a dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos, bem como para a avaliação da expressão de RNA.

1.3.2.6 Dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos

Após a decapitação, o encéfalo do animal foi retirado da caixa craneana e colocado sobre uma placa de gelo, a fim de preservar o órgão para a dissecação das diferentes estruturas cerebrais. Cada estrutura foi então colocada em microtubo e acondicionada em gelo seco para rápido congelamento. Em seguida, cada uma delas foi pesada e armazenada em *freezer* com temperatura de -80°C para processamento em até 30 dias.

O processamento ocorreu através da homogeneização de cada estrutura em ácido perclórico (ClHO_4) a 0,1 M contendo ácido 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA – padrão interno). Para isso, foi utilizada uma caneta sonicadora de alta frequência e o volume de ácido usado foi 10 vezes o peso de cada estrutura.

Após a homogeneização, as estruturas permaneceram em refrigerados a 10°C *overnight* 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 o auxílio de 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);
- Aspartato (ASP);
- Glutamato (GLU);

- Glicina (GLI);
- GABA.

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 das monoaminas foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector eletroquímico (HPLC-ED – *High Performance Liquid Chromatography-Electrochemical Detection*) no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia da FMVZ/USP, como descrito por Zaccarelli-Magalhães et al. (2019) e Sandini et al. (2018). Foram empregados 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 24 minutos.

A fase móvel utilizada foi um sistema isocrático formado por tampão citrato 0,02 M, acetonitrila 5%, 0,12 nM 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.

As soluções padrões das monoaminas foram preparadas utilizando a concentração de 1 nM de cada neurotransmissor e seus metabólitos 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 de 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 foi de 0,25 e 1 ng para todos os analitos, o limite de quantificação foi de 10 ng/g de tecido cerebral ou 1,0 ng por 60 ng de sobrenadantes e a taxa de recuperação foi superior a 80%.

As análises dos aminoácidos neurotransmissores foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD), em colaboração com o Dr. Ivo Lebrun do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. O aparelho utilizado foi um Shimadzu com coluna cromatográfica (ACE 3 C18-300®, 150 x 3,0 mm) acoplada a um detector de arranjo de diodo ajustado a um comprimento de onda de 254 nm. Sucintamente, foi utilizada a técnica de cromatografia em fase reversa com duas fases móveis: a fase móvel A foi uma solução tampão de 6% de acetonitrila e a fase móvel B foi uma solução de 80% de acetonitrila, 20% de água milli-Q e 0,02% de EDTA. A corrida analítica foi feita em até 46 minutos, em um fluxo de 0,3 mL/min na proporção de 94% de fase móvel A e 6% de fase móvel B; e o limite de detecção dos analitos foi de 20 ng.

1.3.2.7 Dosagem hormonal

O sangue foi coletado em tubo Vacutainer® contendo anticoagulante EDTA. Após a coleta, o tubo ficou 30 minutos em repouso e depois foi centrifugado a 4.000 rpm (centrífuga Eppendorf®- 5804 R), a 23°C por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma micropipeta e colocado em microtubos para armazenamento em *freezer* -80°C, até a quantificação.

Foi realizada a dosagem dos seguintes hormônios: corticosterona, estradiol, progesterona, ocitocina, prolactina, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), testosterona, tri-iodotironina (T3), tiroxina (T4) e hormônio estimulante da tireoide (TSH), através de *kit* comercial, seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante. Os *kits* utilizados foram:

- Corticosterona E-EL-R0269 (Elabscience, Texas, EUA);
- Estradiol E-EL-0152 (Elabscience, Texas, EUA);
- Progesterona E-EL-0154 (Elabscience, Texas, EUA);

- Ocitocina E-EL-0029 (Elabscience, Texas, EUA);
- Prolactina E-EL-R0052 (Elabscience, Texas, EUA);
- FSH E-EL-R0391 (Elabscience, Texas, EUA);
- LH E-EL-R0026 (Elabscience, Texas, EUA);
- Rat Tri-iodothyronine ELISA Kit® (Cusabio, Houston, Texas, EUA);
- Rat thyroxine ELISA Kit® (Cusabio, Houston, Texas, EUA);
- Milliplex Map Rat Thyroid Magnetic Bead Panel® (Merk Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA).

As dosagens hormônios T3, T4 e TSH foram realizadas com a colaboração do Prof. Dr. Antônio Carlos Bianco da *Section of Endocrinology, Diabetes & Metabolism, Biological Sciences Division, University of Chicago*, durante o programa de Doutorado Sanduíche.

1.3.2.8 Avaliação da expressão de RNA

Após a eutanásia, o hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado foram isoladas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior análise. Foi realizada a extração do RNA total dos tecidos com o auxílio do *kit* comercial RNeasy Lipid Tissue Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha). A concentração e a integridade do RNA foram determinadas utilizando o equipamento de espectrofotometria DS-11 Spectrophotometer® (DeNovix, Wilmington, DE, EUA). Após a extração, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA), sendo utilizado de 0,5 a 1µg do RNA total obtido, processado por meio da utilização do *kit* comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit® (Roche, Pleasanton, CA, EUA) em termociclador Refurbished Eppendorf Mastercycler pro S (Eppendorf, Enfield, CT, EUA). Em seguida, foi realizada a PCR em tempo real com o auxílio do *kit* comercial PowerUp SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e a reação foi realizada no termociclador StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Os genes avaliados, bem como os seus *primers* estão descritos no Quadro 1.7. O gene da ciclosporina B (CycloB) foi utilizado como controle interno (*primers*:

forward 5'-CTCCGTGGCCAACGATAAGA-3'; reverse 5'-AGCCAAATCCTTTCTCTCCTGT-3'). Os resultados estão expressos como a razão de mRNA do gene de interesse e do mRNA da CycloB.

Quadro 1.7 – Descrição dos genes avaliados.

Genes	Descrição	Primers
<i>TRH</i>	Hormônio liberador de tireotrofina	F: AGTCTCCACTTCGCAGACTC R: CGCAGGATTCAGGGATACCA
<i>Dio2</i>	Deiodinase tipo 2	F: ACGCCTACAAACAGGTAAATTGG R: CCGTCTTCTCTGAGGCACAA
<i>Dio3</i>	Deiodinase tipo 3	F: GCCTCTACGTCATCCAGAGC R: GCCCACCAATTCAGTCACTT
<i>Sst</i>	Somatostatina	F: TTCTGCAGAAGTCTCTGGCG R: ACAGGATGTGAATGTCTTCC
<i>PAP-2</i>	Enzima de degradação do hormônio liberador de tireotrofina	F: CCGAGCTCTTTATCCTCTGG R: GGAAGCTTGAACGACAGAGC
<i>Hr</i>	Proteína hairless	F: ATCAGGTACAGGGCTTGGTG R: TTCACTGCTTGAACACAGC
<i>Aldh1a1</i>	Aldeído desidrogenase 1	F: CTCTGTTTCCCAGGTGTTGTG R: GGGTCCCTTTATTAGCTTTGC
<i>Cnr1</i>	Receptor canabinóide tipo 1	F: GCTGTGTGTCATCCTGCACT R: ACATTGGGGCTGTCTTTACG
<i>Slc22a3</i>	Transportador de cátions orgânicos 3	F: GTGCAATGGGAAACACCTCT R: TGATACACCACGGCACTTGT
<i>Dbp</i>	Sítio D da proteína de ligação do promotor de albumina	F: CCGTGGAGGTGCTAATGACCT R: CCTCTGAGAAGCGGTGCCT

A avaliação da expressão de RNA foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Antônio Carlos Bianco da *Section of Endocrinology, Diabetes & Metabolism, Biological Sciences Division, University of Chicago*, durante o programa de Doutorado Sanduíche.

1.3.2.9 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias

A coleta do sangue foi realizada como descrito no item 1.3.2.5. Foi realizada a dosagem dos seguintes citocinas pró-inflamatórias: interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), através do *kit* comercial Cat # RECYTMAG-65K-04 (IL1b, IL6, IL10 e TNFa) Luminex™ xMAP (Millipore, St Charles, Missouri, EUA), seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante.

1.3.3 Delineamento experimental

1.3.3.1 Experimento 1: Validação do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas lactantes

Vinte ratas adultas lactantes foram divididas em dois grupos, um grupo controle (Cont) e um grupo experimental que foi induzido à depressão através do modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12 (SM). No DPN12, logo após a última sessão de separação materna, os animais foram submetidos ao teste de nado forçado e, em seguida, foram submetidos à eutanásia por decapitação para coleta de sangue para dosagem dos níveis de corticosterona.

1.3.3.2 Experimento 2: Avaliação dos efeitos comportamentais e neurofisiológicos do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas lactantes

Vinte ratas adultas lactantes foram divididas em dois grupos, um grupo controle (Cont) e um grupo experimental (SM), que foi induzido à depressão através do modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. No DPN2 também foi feita a avaliação do desempenho reprodutivo das ratas e a mensuração do peso foi feito diariamente durante toda a lactação. Os testes comportamentais foram realizados do DPN11 ao DPN21, como descrito no Quadro 1.8. No DPN21, logo após o último teste comportamental, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação

para coleta de diferentes estruturas cerebrais e sangue para a análise neuroquímica, hormonal, da expressão de RNA e de citocinas pró-inflamatórias.

Quadro 1.8 – Testes comportamentais realizados nas fêmeas submetidas ao modelo de depressão pós-parto por separação materna. DPN = dia pós-natal.

Teste Comportamental	DPN
Comportamento materno	11
Comportamento materno agressivo	12
Preferência olfatória	12
Caixa claro/escuro	20
Nado forçado	21

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 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 de Student. 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

São apresentados, a seguir, os resultados obtidos.

1.4.1 Experimento 1: Validação do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas lactantes

A Figura 1.7 mostra os resultados de teste de nado forçado e da dosagem dos níveis séricos de corticosterona de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. Em relação ao nado forçado, o teste t não mostrou diferenças entre os grupos no parâmetro latência para a primeira imobilidade ($p=0,1604$), mas apontou aumento significativo no tempo de imobilidade ($p=0,0079$) e redução no tempo de atividade ($p=0,0079$) em ratas submetidas à separação materna. Em relação à dosagem de corticosterona, o teste t mostrou aumento significativo nos níveis desse hormônio das ratas submetidas a separação materna ($p= 0,0492$).

Figura 1.7 – Validação do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas lactantes, através do teste de nado forçado e da dosagem de corticosterona. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=9 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM =grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, teste t.

1.4.2 Experimento 2: Avaliação dos efeitos comportamentais e neurofisiológicos do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas lactantes

1.4.2.1 Efeitos do modelo de separação materna no desempenho reprodutivo e no ganho de peso de ratas lactantes

A Figura 1.8 mostra os resultados da avaliação do desempenho reprodutivo e do ganho de peso durante a lactação de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. Em relação ao desempenho reprodutivo, o teste t apontou diferenças significantes entre os grupos no número total de filhotes ($p=0,0272$) e número de fêmeas ($p=0,0165$), mas não apontou diferenças no número de machos ($p=0,5176$). Em relação ao ganho de peso, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(2,28)=2,196$, $p>0,05$), porém apontou diferenças em relação ao tempo ($F(2,28)=46,58$, $p<0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(2,28)=2,196$, $p>0,05$). O pós-teste de Bonferroni mostrou que as ratas submetidas ao modelo de separação materna apresentaram diminuição no ganho de peso na terceira semana de lactação em comparação com as ratas controle ($p<0,05$).

Figura 1.8 – Avaliação do desempenho reprodutivo e acompanhamento do ganho de peso semanal (em gramas) de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

* $p < 0,05$, ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni, e teste t.

1.4.2.2 Efeitos do modelo de separação materna no comportamento de ratas lactantes

1.4.2.2.1 Comportamento materno

A Figura 1.9 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no teste de comportamento materno de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos parâmetros latência agrupamento ($p=0,3467$) e *grooming* nos filhotes ($p=0,1186$), porém mostrou diferenças significantes nos demais parâmetros. As ratas submetidas ao modelo de separação materna demoraram mais tempo para recolher os filhotes [primeiro filhote ($p= 0,0422$); segundo filhote ($p= 0,0366$); terceiro filhote ($p= 0,0375$); quarto filhote ($p= 0,0429$)], passaram mais tempo realizando *self-grooming* ($p=$

0,0331), apresentaram menor latência para a amamentação ($p= 0,0290$) e passaram mais tempo amamentando seus filhotes ($p= 0,0389$) em comparação com as ratas do grupo controle.

Figura 1.9 - Parâmetros avaliados teste de comportamento materno de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

* $p<0,05$, teste t.

1.4.2.2.2 Comportamento materno agressivo

A Figura 1.10 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no teste de comportamento materno agressivo de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros analisados: interação mãe-intruso ($p= 0,9774$), interação mãe-filhotes ($p= 0,2731$), *grooming* da mãe ($p= 0,3818$), interação intruso-filhotes ($p= 0,5536$) e *grooming* do intruso ($p= 0,1722$). O teste t mostrou que as ratas submetidas ao modelo de separação materna apresentaram maior latência

para iniciar a primeira luta ($p < 0,0001$) e número menor de lutas ($p = 0,0406$) e *boxing* ($p = 0,0024$) em comparação com as ratas do grupo controle.

Figura 1.10 - Parâmetros avaliados teste de comportamento materno agressivo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, teste t.

1.4.2.2.3 Preferência olfatória

A Figura 1.11 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no teste de preferência olfatória de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados: frequência na zona limpa ($p = 0,5245$), frequência na zona suja ($p = 0,8931$), tempo na zona limpa ($p = 0,3300$) e tempo na zona suja ($p = 0,7170$).

Figura 1.11 – Parâmetros avaliados teste de preferência olfatória de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p > 0,05$, teste t.

1.4.2.2.4 Caixa claro/escuro

A Figura 1.12 mostra os resultados dos parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros: latência 1ª passagem ($p=0,0528$), número de cruzamentos ($p=0,8062$), frequência no claro ($p=0,1469$) e frequência no escuro ($p=0,1165$). O teste t mostrou que as ratas submetidas ao modelo de separação materna permaneceram mais tempo no claro ($p=0,0265$) e menos tempo no escuro ($p=0,0265$) em comparação com as ratas do grupo controle.

Figura 1.12 – Parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

* $p < 0,05$, teste t.

1.4.2.2.5 Nado forçado

A Figura 1.13 mostra os resultados do teste de nado forçado de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: latência para a primeira imobilidade ($p=0,5774$), tempo de imobilidade ($p=0,3621$) e tempo de atividade ($p=0,1577$).

Figura 1.13 – Parâmetros avaliados no teste de nado forçado de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-9 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p > 0,05$, teste t.

1.4.2.3 Efeitos do modelo de separação materna nos níveis de neurotransmissores cerebrais e seus metabólitos de ratas lactantes

As Figuras 1.14 – 1.29 mostram os resultados da avaliação neuroquímica de diferentes estruturas cerebrais de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. Em relação ao hipotálamo, o teste t não mostrou diferenças significantes nos seguintes parâmetros avaliados: 5HT ($p=0,8265$), 5HIAA ($p=0,2431$), 5HIAA/5HT ($p=0,3152$), NOR ($p=0,5957$), VMA ($p=0,3085$), VMA/NOR ($p=0,0807$), DA ($p=0,3060$), DOPAC ($p=0,6645$), DOPAC/DA ($p=0,5484$), HVA ($p=0,8928$), HVA/DA ($p=0,3836$), ASP ($p=0,6337$) e GLU ($p=0,2196$). Contudo, o teste t mostrou que as ratas do grupo SM apresentaram aumento de GLI ($p=0,0317$) e GABA ($p=0,0478$) – Figuras 1.14 a 1.17.

Figura 1.14 – Avaliação do sistema serotoninérgico do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p > 0,05$, teste t.

Figura 1.15 – Avaliação do sistema noradrenérgico do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p > 0,05$, teste t.

Figura 1.16 – Avaliação do sistema dopaminérgico do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p > 0,05$, teste t.

Figura 1.17 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

* $p < 0,05$, teste t.

Em relação ao hipocampo, o teste t não mostrou diferenças significantes nos seguintes parâmetros: 5HT ($p=0,5712$), 5HIAA/5HT, NOR ($p=0,4942$), VMA ($p=0,2981$), VMA/NOR ($p=0,1032$), DA ($p=0,1848$), DOPAC ($p=0,3020$), DOPAC/DA ($p=0,1973$), ($p=0,7329$), ASP ($p=0,9904$), GLU ($p=0,3227$), GLI ($p=0,8820$) e GABA ($p=0,0654$). Entretanto, o teste t mostrou que as ratas do grupo SM apresentaram diminuição de 5HIAA ($p=0,0046$), HVA ($p=0,0440$) e HVA/DA ($p=0,0341$) – Figuras 1.18 a 1.21.

Figura 1.18 – Avaliação do sistema serotoninérgico do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

**p<0,01, teste t.

Figura 1.19 – Avaliação do sistema noradrenérgico do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

p>0,05, teste t.

Figura 1.20 – Avaliação do sistema dopaminérgico do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

*p<0,05, teste t.

Figura 1.21 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p > 0,05$, teste t.

Em relação ao córtex pré-frontal, o teste t não mostrou diferenças significantes nos seguintes parâmetros: 5HT ($p=0,2916$), 5HIAA/5HT ($p=0,8749$), VMA ($p=0,1199$), HVA ($p=0,4745$), HVA/DA ($p=0,6132$), ASP ($p=0,3395$), GLU ($p=0,9049$), GLI ($p=0,8266$) e GABA ($p=0,9658$). Contudo, o teste t mostrou que as ratas do grupo SM apresentaram diminuição de 5HIAA ($p=0,0109$), NOR ($p=0,0014$), DA ($p=0,0311$), DOPAC ($p=0,0045$) e DOPAC/DA ($p=0,0339$), e aumento do *turnover* VMA/NOR ($p=0,0269$) – Figuras 1.22 a 1.25.

Figura 1.22 – Avaliação do sistema serotoninérgico do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

* $p < 0,05$, teste t.

Figura 1.23 – Avaliação do sistema noradrenérgico do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, teste t.

Figura 1.24 – Avaliação do sistema dopaminérgico do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, teste t.

Figura 1.25 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p > 0,05$, teste t.

Em relação ao corpo estriado, o teste t não mostrou diferenças significantes nos seguintes parâmetros avaliados: 5HT ($p=0,8592$), 5HIAA ($p=0,2760$), 5HIAA/5HT ($p=0,7814$), NOR ($p=0,9546$), ($p=0,7760$), VMA/NOR ($p=0,4104$), DA ($p=0,2493$), DOPAC ($p=0,6352$), DOPAC/DA ($p=0,9546$), HVA ($p=0,2226$), HVA/DA ($p=0,6459$), e ASP ($p=0,1169$). Entretanto, o teste t mostrou que as ratas do grupo SM apresentaram aumento de GLU ($p=0,0345$), GLI ($p=0,0489$) e GABA ($p=0,0357$) – Figuras 1.26 a 1.29.

Figura 1.26 – Avaliação do sistema serotoninérgico do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p > 0,05$, teste t.

Figura 1.27 – Avaliação do sistema noradrenérgico do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p > 0,05$, teste t.

Figura 1.28 – Avaliação do sistema dopaminérgico do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

p>0,05, teste t.

Figura 1.29 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

*p<0,05, teste t.

1.4.2.4 Efeitos do modelo de separação materna nos níveis hormonais de ratas lactantes

A Figura 1.30 mostra os resultados dos parâmetros da avaliação sérica dos níveis hormonais de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados: corticosterona (p=0,5191), progesterona (p=0,9674), estradiol (p=0,6398), FSH (p=0,5049), LH (p=0,5297), ocitocina (p=0,5359), prolactina (p=0,7361), T3 (p=0,7399), T4 (p=0,8219). O teste t apontou que as ratas do grupo SM apresentaram diminuição da concentração de TSH (p=0,0359) em comparação com as ratas do grupo controle.

Figura 1.30 – Parâmetros avaliados na dosagem hormonal de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-10 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

*p<0,05, teste t.

1.4.2.5 Efeitos do modelo de separação materna na expressão de RNA mensageiro de genes cerebrais de ratas lactantes

A Figura 1.31 mostra os resultados da avaliação expressão de RNA mensageiro do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. O teste t não apontou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos genes avaliados: *TRH* (p=0,9972), *Dio2* (p= 0,4871), *Dio3* (p=0,2348), *Sst* (p=0,5272), *PAP-2* (p=0,9282).

Figura 1.31 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=5-6 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p > 0,05$, teste t.

A Figura 1.32 mostra os resultados da avaliação expressão de RNA mensageiro do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. O teste t não apontou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos genes avaliados: *Dio2* ($p=0,6566$) e *Dio3* ($p=0,2083$).

Figura 1.32 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=5 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p > 0,05$, teste t.

A Figura 1.33 mostra os resultados da avaliação expressão de RNA mensageiro do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. O teste t não apontou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos genes avaliados: *Dio2* ($p=0,1062$) e *Dio3* ($p=0,7750$).

Figura 1.33 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p > 0,05$, teste t.

A Figura 1.34 mostra os resultados da avaliação expressão de RNA mensageiro do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. O teste t não apontou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos genes avaliados: *Dio2* ($p=0,3384$), *Dio3* ($p=0,1494$), *Hr* ($p=0,4462$), *Aldh1a1* ($p=0,4655$), *Cnr1* ($p=0,8656$), *Slc22a3* ($p=0,6109$) e *Dbp* ($p=0,1499$).

Figura 1.34 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

$p>0,05$, teste t.

1.4.2.6 Efeitos do modelo de separação materna nos níveis de citocinas pró-inflamatórias de ratas lactantes

A Figura 1.35 mostra os resultados dos parâmetros da avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias de ratas submetidas ao modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. O teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes parâmetros avaliados: IL-1 β ($p=0,0640$), IL-6 ($p=0,1519$) e TNF- α ($p=0,5042$). O teste t apontou que as ratas do grupo SM apresentaram diminuição nos níveis de IL-10 ($p=0,0461$) em comparação com as ratas do grupo controle.

Figura 1.35 – Parâmetros avaliados na dosagem dos níveis de citocinas pró-inflamatórias de ratas submetidas ao modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-10 animais por grupo; Cont=grupo controle; SM=grupo separação materna do dia pós-natal 2 ao 12.

* $p < 0,05$, teste t.

1.5 DISCUSSÃO

A depressão pós-parto é uma doença mentalmente incapacitante e de grande preocupação de saúde pública pelo mundo por ser a principal complicação do parto (AFFONSO et al., 2000; FRIEDMAN; RESNICK, 2009; XIA, 2016). Apesar disso, ela ainda é uma doença pouco estudada e pouco diagnosticada, em parte devido a seu caráter multifatorial e sua neurobiologia complexa (FRIEDMAN; RESNICK, 2009; PAYNE; MAGUIRE, 2019). Modelos animais vêm sendo utilizados no desenvolvimento de pesquisas sobre essa doença, a fim de auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar a avaliação dos efeitos comportamentais e fisiológicos do modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratas.

A indução da depressão foi realizada através do modelo de separação materna, que leva os animais a um estado depressivo através da ruptura do vínculo mãe-filhote logo nos primeiros dias após o parto (TOIGO et al. 2012; VETULANI, 2013), acarretando em alterações comportamentais e fisiológicas (BOCCIA et al., 2007; EKLUND et al., 2009; TOIGO et al. 2012). Repetidos eventos de separação materna em roedores imitam o que ocorre com a relação mãe-criança na depressão pós-parto em humanos, sendo um modelo animal comportamental útil no estudo dessa doença (BOCCIA et al., 2007; PAYNE; MAGUIRE, 2019).

O modelo de separação materna começou a ser utilizado na década de 1960. A maior parte dos estudos, entretanto, foram realizados a partir de 2005, com o objetivo de esclarecer os efeitos da quebra do vínculo mãe-filhote nos filhotes; assim, poucos estudos avaliaram as implicações desse modelo nas mães (EKLUND et al., 2009; TRACTENBERG et al., 2016).

Existem diversos protocolos do modelo de separação materna, que diferem entre si em relação à frequência (1 ou 2 vezes ao dia), período (início logo após do nascimento dos filhotes e término entre a segunda semana após o parto e o desmame) e duração do período de separação (de 10 minutos a 24 horas) (VETULANI, 2013). Apesar disso, o protocolo de separação materna mais utilizado nos estudos com ratos consiste em separar os filhotes da mãe por 3 horas diárias durante as primeiras 2 semanas de vida (TRACTENBERG et al., 2016); assim, escolhemos utilizar este protocolo para esse estudo.

A validação do modelo de separação materna escolhido foi realizada no primeiro experimento deste trabalho através do teste de nado forçado e da dosagem dos níveis séricos de corticosterona no DPN12, logo após a última sessão de separação materna.

O teste do nado forçado foi desenvolvido por Porsolt em 1978 como uma variação do teste do desamparo aprendido e atualmente é o mais utilizado para avaliar o efeito antidepressivo de medicamentos em animais (ENGIN; TREIT; DICKSON, 2009; ALMEIDA et al. 2011). Este teste se baseia no comportamento de desespero do animal para sair de uma situação sem escapatória; assim, num primeiro momento, os animais nadam para tentar escapar do recipiente em que são colocados, mas ao longo do teste há o desenvolvimento de imobilidade, em que os animais realizam apenas os movimentos necessários para manter a cabeça fora d'água (ALMEIDA et al. 2011). Esse comportamento de imobilidade reflete a desistência do animal de escapar da situação em que se encontra e buscar a sobrevivência (LUCKI, 1997; CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). A latência para a primeira imobilidade é um parâmetro complementar ao tempo de imobilidade; animais com comportamento tipo-depressivo apresentam menor latência para imobilidade (ALMEIDA et al. 2011). Medicamentos antidepressivos são capazes de reverter o comportamento tipo-depressivo, através da diminuição do tempo de imobilidade e aumento da latência para a primeira imobilidade (ALMEIDA et al. 2011; POWELL; FERNANDES; SCHALKWYK, 2012).

Estudos da literatura que avaliaram os efeitos da separação materna por período prolongado (de 3 h a 6 h diárias nas primeiras 2 semanas de vida dos filhotes) no comportamento de ratas no teste do nado forçado mostraram que esses animais apresentaram aumento no tempo de imobilidade, diminuição do tempo de nado e de escalada e na frequência de tentativas de escape, indicando comportamento tipo-depressivo desses animais (BOCCIA et al., 2007; SUNG et al., 2010; MANIAM; MORRIS, 2010)

Nossos resultados mostraram que as ratas induzidas à depressão apresentaram aumento no tempo de imobilidade e diminuição no tempo de atividade no DPN12 em comparação aos animais do grupo controle. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Boccia et al. (2007), Sung et al. (2010) e Maniam e Morris (2010).

A corticosterona é um hormônio glicocorticoide produzido e secretado pelo córtex da glândula adrenal em roedores, que possui papel importante na cascata de eventos endócrinos ativados em resposta ao estresse (STERNER; KALYNCHUK, 2010). Ao ser liberada na corrente sanguínea, a corticosterona age em diferentes tecidos, a fim de limitar as funções não essenciais do organismo e redirecionar energia para lidar com o agente estressor. No cérebro, esse hormônio controla a ativação do eixo HPA por meio do *feedback* negativo no hipotálamo (HERMAN; CULLINAN, 1997). Diversos estudos mostraram a relação do comportamento tipo-depressivo e dos níveis de corticosterona em roedores (CARINI; MURGATROYD; NEPHEW, 2013; MAGUIRE; MODY, 2016).

Em relação ao modelo de separação materna, estudo feito por Eklund e colaboradores (2009) mostrou que ratas separadas de seus filhotes por 15 min durante oito dias aleatórios durante as primeiras duas semanas de vida dos filhotes apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona.

Nossos resultados mostraram que as ratas induzidas à depressão apresentaram aumento nos níveis séricos de corticosterona no DPN12 em comparação com as ratas controle, corroborando o estudo de Eklund et al. (2009). Esses resultados, em conjunto com os do teste de nado forçado, indicam um estado tipo-depressivo dessas ratas, validando o protocolo de separação materna para indução de depressão pós-parto.

O segundo experimento deste trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos comportamentais e fisiológicos do modelo de separação materno durante a lactação. No segundo dia após o parto foi feita a avaliação do desempenho reprodutivo das ratas e os nossos resultados mostram que as ratas do grupo submetido ao modelo de separação materna apresentaram maior número total de filhotes e maior número de filhotes fêmeas. Essas alterações, apesar de serem estatisticamente significantes, ocorreram ao acaso, pois a indução da depressão pelo modelo de separação materna foi iniciada após a avaliação do desempenho reprodutivo e, portanto, não possuem significado para esse experimento.

Durante toda a lactação foi feito o acompanhamento do ganho de peso das ratas. Nossos resultados mostram que as ratas do grupo submetido ao modelo de separação materna apresentaram menor ganho de peso na última semana de lactação. A perda de peso é um dos sinais clínicos manifestado por indivíduos que

sofrem de depressão (APA, 2014). Assim, essa alteração pode ser consequência da indução à depressão pós-parto pelo modelo de separação materna.

A avaliação comportamental consistiu nas mensurações dos comportamentos materno, através dos testes de comportamento materno, materno agressivo e preferência olfatória; tipo-ansioso, através do teste da caixa claro/escuro; e tipo-depressivo, através do teste de nado forçado.

O comportamento materno consiste em um conjunto de cuidados que a mãe tem com seus filhotes para garantir seu correto desenvolvimento neurológico e, assim, a propagação da espécie; é um comportamento complexo e instintivo com características particulares de cada espécie de mamífero (NUMAN, 1994; CAMARGO et al., 2017). Alterações no comportamento materno podem gerar distúrbios neurológicos e sociais permanentes na prole (ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2020).

Os cuidados maternos em roedores começam a ser expressos antes do nascimento da prole e permanecem até o final da lactação; esses cuidados se modificam ao longo do tempo com o crescimento dos filhotes (NUMAN, 1994; TEODOROV et al., 2002; LENZ; SENGELAUB, 2010).

No período do parto, as fêmeas se preparam para o nascimento dos filhotes e realizam a construção do ninho; elas também apresentam aumento na agressividade frente a um intruso (BRIDGES, 2015; CAMARGO et al., 2017). Durante o parto, conforme os filhotes vão nascendo, as fêmeas utilizam a boca para limpar os filhotes e ingerem o saco amniótico e a placenta para terem nutrientes e eliminarem pistas olfatórias para potenciais predadores (LONSTEIN; LÉVY; FLEMING, 2015; BRIDGES, 2015).

Nas primeiras semanas após o parto, as fêmeas passam grande parte do tempo nos ninhos com suas proles e, conforme os filhotes vão crescendo e ganhando independência da mãe, o comportamento materno passa a ser gradativamente menos expresso (NUMAN, 1994). Assim, usualmente a avaliação do comportamento materno é realizada na primeira semana do pós-parto, período em que os filhotes são exclusivamente dependentes da mãe (TEODOROV et al., 2005).

Os cuidados maternos em ratos podem ser divididos em duas categorias: 1) os diretos, que são comportamentos dirigidos a prole, como buscar, agrupar e amamentar os filhotes; e 2) os indiretos, que são direcionados a estímulos externos,

como a agressividade expressa frente a um intruso e a construção do ninho (NUMAN, 1994; BRIDGES, 2015; ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2020). Considerando esses fatos, neste trabalho foram utilizados os testes de comportamento materno e preferência olfatória para avaliar os cuidados maternos diretos e o teste de comportamento materno agressivo para avaliar os cuidados maternos indiretos.

Trabalhos da literatura apontam que o modelo de separação materna por período prolongado (3 h a 4,5 h) causa distúrbio no comportamento materno, evidenciado pelo maior tempo gasto pelas mães para recolher e agrupar os filhotes e pelo comprometimento na confecção dos ninhos (MANIAM; MORRIS, 2010; AGUGGIA; SUÁREZ; RIVAROLA, 2013)

Nossos resultados mostram que as mães submetidas ao modelo de separação materno demoraram mais para recolher e agrupar os filhotes no ninho, da mesma forma que os trabalhos de Maniam e Morris (2010) e Aguggia, Suárez e Rivarola (2013). Contudo, após o período inicial do teste, as mães do modelo de separação materno passaram mais tempo fazendo *self-grooming*, apresentaram menor latência para realizar a amamentação e maior tempo de amamentação do que as mães do grupo controle. Esses resultados sugerem desorganização do comportamento materno, em que, após período prolongado de separação de seus filhotes, as mães se encontram em uma situação de conflito, resultando em um comportamento menos direcionado aos filhotes e com atraso no reconhecimento deles (AGUGGIA; SUÁREZ; RIVAROLA, 2013).

A agressão é uma resposta inata dos animais, fundamental para sua sobrevivência, uma vez que leva a um melhor acesso a alimento, a acasalamento e permite melhores chances de propagação da espécie (MAGALHÃES et al., 2015; ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2020). A agressão materna, em roedores, é expressa frente a presença de um intruso que deseja se aproximar do ninho com o intuito de proteção da prole, sendo mais pronunciada durante a primeira semana pós-parto (BOSCH, 2005; CAMARGO et al., 2017; ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2020).

O comportamento materno agressivo é caracterizado por ataques laterais, mordidas e *boxing* dos membros dianteiros e traseiros (LONSTEIN; GAMMIE, 2002). Este tipo de agressão difere daquela apresentada por roedores machos, pois além

do padrão ofensivo também há expressão do padrão defensivo; que se dá pela inclusão do “medo” como componente importante deste comportamento (BOSCH et al., 2005; CAMARGO et al., 2017).

Nossos resultados mostram que as mães submetidas ao modelo de separação materna apresentaram prejuízo no comportamento materno agressivo, evidenciado pela maior latência para realizar a primeira luta e pelo número reduzido de lutas e de *boxing*. Estudo realizado por Boccia e Pedersen (2001) avaliou o comportamento materno agressivo de ratas submetidas ao modelo de separação materna quando filhotes por 3 h diárias, do DPN214, constatou maior latência de ataque ao macho intruso e com menor frequência. Nossos resultados corroboram os de Boccia e Pedersen (2001) e, junto com os resultados do teste de comportamento materno, indicam que o modelo de separação materna causou disfunção nos cuidados maternos exibidos por essas ratas.

O olfato, na maioria das espécies de mamífero, faz parte da regulação do comportamento materno, em que alterações nesse sistema podem desencadear distúrbios na resposta materna (LÉVY; KELLER; POINDRON, 2004). Uma fêmea virgem, ao ser exposta ao odor de filhotes pela primeira vez, exibe comportamento de retirada; contudo no parto, as fêmeas desenvolvem a capacidade de responder a pistas olfativas provenientes dos filhotes desencadeando os cuidados maternos (LÉVY; KELLER; POINDRON, 2004). Além disso, o olfato das mães é fundamental para a expressão de alguns comportamentos maternos essenciais para a sobrevivência dos filhotes, como o *grooming* anogenital, importante para o desenvolvimento dos reflexos de defecação e micção e dos órgãos reprodutores (MOORE, 1981; BROUETTE-LAHLOU; VERNET-MAURY; CHANEL, 1991).

Estudos clínicos mostram que em indivíduos com depressão maior se observa alterações da percepção olfativa, através de déficits na detecção olfativa e no processamento de sinais (ATANASOVA et al., 2008; SCHABLITZKY; PAUSE, 2014). Estudos em roedores apontam que modelos de depressão causam diminuição no reconhecimento olfativo, de forma semelhante ao que se observa em pacientes deprimidos (RAYNAUD et al., 2015). Desse modo, foi realizado o teste de preferência olfatória nas mães com o objetivo de avaliar se o modelo de separação materno seria capaz de causar alterações no reconhecimento olfatório dos filhotes.

O teste de preferência olfatória foi realizado com base no trabalho de Rainecki et al. (2009). O teste originalmente é realizado em filhotes com o objetivo de avaliar se estes são capazes de identificar a mãe pelo olfato, através da escolha entre a maravalha com o odor do ninho e a maravalha limpa (TARICANO, 2010). Neste trabalho, foi feita uma adaptação desse teste, em que foi dada a escolha para a mãe entre a maravalha com o odor dos filhotes e a maravalha limpa. Nossos resultados mostraram que não houve diferença entre as ratas submetidas ao modelo de separação materno e as ratas controle.

O teste da caixa claro/escuro foi proposto em 1980 por Crawley e Goodwin para avaliar o efeito ansiolítico de medicamentos. É um teste simples, rápido, que não exige treinamento prévio dos animais e que não possui estímulos dolorosos para sua realização (TABACH, 2011). Este teste se baseia em dois comportamentos inatos dos roedores: a aversão a ambientes altamente iluminados e o comportamento exploratório espontâneo. Desse modo, ao ser dada a escolha entre explorar um ambiente grande e iluminado ou um ambiente pequeno e escuro, esses animais preferem o ambiente escuro, sendo essa escolha alterada pela exposição a agentes ansiolíticos (RAMOS, 2008; TABACH, 2011).

A ansiedade e a depressão são duas condições diretamente relacionadas, em que indivíduos que sofrem de depressão tendem a ser mais ansiosos do que indivíduos sadios (KUMAR; BHAT; KUMAR, 2013). A ansiedade é ainda considerada um dos sintomas da depressão (CZÉH et al., 2016), o que ressalta a importância de se avaliar o comportamento tipo-ansioso desses animais.

Trabalhos da literatura indicam que o modelo de separação materna leva a um comportamento tipo-ansioso em roedores. Assim, estudos realizados por Maniam e Morris (2010) e Aguggia et al. (2013) mostraram que ratas separadas de seus filhotes por período prolongado (3 h ou 4,5 h diárias pelas primeiras 2 ou 3 semanas do período pós-parto), quando avaliadas no labirinto em cruz elevado, apresentaram menor número de entradas e menor tempo de permanência no braço aberto.

Nossos resultados mostraram que as ratas submetidas ao modelo de separação materna permaneceram mais tempo no compartimento claro e menos tempo no compartimento escuro quando comparadas com as ratas do grupo controle ao final da lactação. Esses resultados não corroboram os estudos da

literatura mencionados, indicando que o modelo de separação materna utilizado não levou a um comportamento tipo-ansioso das mães.

Uma possível explicação para esse resultado é a utilização de diferentes testes comportamentais, já que os trabalhos da literatura utilizaram o labirinto em cruz elevado como teste de ansiedade e neste trabalho foi utilizado a caixa claro/escuro. Apesar de serem testes semelhantes, eles empregam estímulos diferentes: o labirinto em cruz elevado combina elementos de desconhecimento, abertura e elevação, enquanto a caixa claro/escuro utiliza os estímulos de luz e desconhecimento (BOURIN et al., 2007). Desse modo, o teste da caixa claro/escuro, aparentemente, não é eficaz para a avaliação do comportamento tipo-depressivo relacionado com ansiedade em ratos.

O teste de nado forçado foi utilizado novamente para avaliar o comportamento tipo-depressivo ao final da lactação. Nossos resultados mostraram que as ratas submetidas ao modelo de separação materna apresentaram tendência para menor latência para a imobilidade, mais tempo imóveis e menos tempo em atividade do que as ratas do grupo controle. O estudo de Maniam e Morris (2010) também foi observado essa tendência nos resultados do nado forçado quando os animais foram testados pela segunda vez, 12 semanas após a última sessão de separação materna. Isso indica que, apesar do modelo induzir um comportamento tipo-depressivo, esse comportamento não se mantém por muito tempo, levando o animal a voltar a exibir um comportamento normal após alguns dias.

A depressão pós-parto, por ser uma doença multifatorial, acarreta alterações em diversos processos neurobiológicos e, dentre eles, se destaca o envolvimento dos sistemas de neurotransmissão monoaminérgicos (PAWLUSKI et al., 2017; PAYNE; MAGUIRE, 2019). Diversos estudos apontaram prejuízos nesses sistemas, principalmente nos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico (SKALKIDOU et al., 2012; FASCHING et al., 2012; TYE et al., 2012; MILEVA-SEITZ et al., 2013).

Estudos genéticos mostram que a depressão pós-parto também está relacionada com polimorfismos em genes relacionados com a síntese, o transporte e a degradação das monoaminas: 1) *5HTT* – gene que codifica a proteína transportadora de serotonina; 2) *TPH2* – gene que codifica a enzima triptofano hidroxilase, responsável pela síntese de serotonina; 3) *COMT* – gene que codifica a enzima catecol O-metiltransferase, responsável pela degradação das catecolaminas

(dopamina e noradrenalina); e 4) MAOA – gene que codifica a enzima monoamina oxidase A, responsável pela degradação de monoaminas (COUTO et al., 2015; ELWOOD et al., 2019). Assim, foi realizada a avaliação dos efeitos do modelo de separação materna nos sistemas de neurotransmissão monoaminérgicos, através da dosagem dos níveis de neurotransmissores cerebrais, seus metabólitos e *turnover* por meio da relação nível do metabólito/nível do neurotransmissor.

A escolha das estruturas cerebrais avaliadas neste estudo foi feita com base no trabalho de Stahl (2003), que correlacionou os principais sintomas e sinais clínicos da depressão com regiões cerebrais distintas. Essa correlação criou uma topografia hipotética para os sintomas/sinais de depressão, incluindo: 1) associação do hipotálamo com distúrbios do sono, alterações no peso e apetite e perda de interesse ou prazer; 2) associação do hipocampo com perda de interesse ou prazer; 3) associação do córtex pré-frontal com humor deprimido, tristeza, alterações e concentração, fadiga mental e pensamentos suicidas; e 4) associação do corpo estriado com fadiga, perda de energia e agitação ou retardo psicomotor.

Além disso, Nutt e colaboradores (2007) desenvolveram um modelo hipotético que correlaciona os sistemas de neurotransmissão monoaminérgicos com os diferentes sintomas da depressão. Nesse modelo, o sistema serotoninérgico e o noradrenérgico são responsáveis pelas características negativas (culpa, irritabilidade, medo e ansiedade), enquanto o sistema dopaminérgico e o noradrenérgico estão associados com a perda dos atributos positivos (perda de prazer, motivação, energia e interesse). Os sentimentos de tristeza profunda e mau humor, que são os sintomas mais presentes e definidores do estado depressivo, estão relacionados com a atividade neuronal anormal no córtex pré-frontal dos três sistemas de neurotransmissão monoaminérgicos (DAVIDSON et al., 2002; LÉVESQUE et al., 2003; DAVIES et al., 2003).

A serotonina é o neurotransmissor envolvido na neurobiologia da depressão mais estudado; sua via de transmissão se inicia no tronco cerebral, mais especificamente nos núcleos da rafe, e se projeta para o hipotálamo, amígdala, corpo estriado e córtex pré-frontal (MORET; BRILEY, 2011). A síntese de serotonina cerebral depende da presença do aminoácido triptofano no sangue; uma vez transportado para o cérebro, o triptofano é amplamente distribuído pelo sistema

nervoso central e é feita a síntese de serotonina catalisada pela enzima triptofano hidroxilase (DUAN et al., 2018).

Diversos estudos apontam que mulheres com depressão pós-parto apresentam baixos níveis de serotonina plaquetária, bem como de triptofano no sangue, levando a um comprometimento do sistema serotoninérgico (SKALKIDOU et al., 2012; YILDIZ et al., 2017; DUAN et al., 2018; PAWLUSKI et al., 2019). Estudo realizado por Stamatakis et al. (2015) com ratas mostrou que a separação materna por 15 minutos diários do DPN1 ao 22 causou redução nos níveis do receptor serotoninérgico 5HT_{1A} no hipocampo, no córtex pré-frontal, na amígdala e na área pré-óptica medial.

Essas alterações no sistema serotoninérgico estão relacionadas com a presença de importantes sintomas de depressão, como: 1) ansiedade e medo, devido às projeções da via serotoninérgica no sistema límbico; 2) fadiga e perda de energia, que estão associadas a níveis baixos de serotonina no corpo estriado; e 3) sentimento de culpa e pensamentos suicidas, que estão relacionados com prejuízo no sistema de neurotransmissão serotoninérgica na amígdala e no córtex (STAHL, 2003; NUTT et al., 2007; MORET; BRILEY, 2011).

Nossos resultados mostraram que as ratas submetidas ao modelo de separação materna apresentaram diminuição de 5HIAA, metabólito da serotonina, no hipocampo e no córtex pré-frontal, indicando comprometimento do sistema serotoninérgico. Esses resultados estão de acordo com os achados da literatura, tanto com os de estudos com seres humanos, quanto com os de estudos com animais (SKALKIDOU et al., 2012; STAMATAKIS et al., 2015; DUAN et al., 2018; PAWLUSKI et al., 2019).

A via de neurotransmissão noradrenérgica no cérebro começa no *locus coeruleus* e se projeta para diferentes regiões encefálicas, como hipocampo, amígdala, tálamo e neocórtex (HAMON; BLIER, 2013). Em indivíduos que sofrem de depressão, as disfunções nesta via estão associadas a alterações de apetite, resposta à dor, perda de prazer, comportamento agressivo, estado de alerta, baixo nível de energia, desatenção e funções cognitivas alteradas (MORET; BRILEY, 2011).

A literatura carece de trabalhos que avaliam o sistema noradrenérgico na depressão pós-parto, entretanto é possível inferir o envolvimento desse sistema

devido ao papel que ele exerce no transtorno de depressão maior e do uso de medicamentos antidepressivos que inibem a recaptação de noradrenalina para o tratamento dessa doença (HAMON; BLIER, 2013). Além disso, estudos genéticos já mencionados mostram o envolvimento dos genes que codificam as enzimas catecol O-metiltransferase e monoamina oxidase A, que fazem parte do metabolismo da noradrenalina (COUTO et al., 2015; ELWOOD et al., 2019).

Estudo com camundongos *knockout* para o transportador de noradrenalina mostrou que esses animais se comportam da mesma maneira que camundongos controle tratados com diferentes tipos de medicamentos antidepressivos, isto é, eles possuem níveis altos de noradrenalina extracelular e comportamento normal em testes clássicos de depressão, como o nado forçado e a suspensão pela cauda (DZIEDZICKA-WASYLEWSKA et al., 2006).

Nossos resultados mostraram que as ratas submetidas ao modelo de separação materna apresentaram diminuição de NOR e aumento do *turnover* VMA/NOR no córtex pré-frontal, indicando alteração do sistema noradrenérgico e corroborando os trabalhos da literatura.

A dopamina possui duas principais vias de neurotransmissão cerebrais envolvidas na neurobiologia da depressão: 1) a via mesocortical, que se inicia na área tegmental ventral e se projeta para o núcleo accumbens e para o córtex pré-frontal; e 2) a via nigro-estriatal, que se origina na substância nigra e se projeta para o corpo estriado (MORET; BRILEY, 2011). Alterações nessas vias estão correlacionadas com três importantes sintomas da depressão: 1) perda de energia e retardo associado a ação da dopamina no corpo estriado; 2) desatenção e perda de impulso, causado por baixos níveis de dopamina no córtex pré-frontal; e 3) perda de prazer em atividades normalmente prazerosas, devido ao desequilíbrio do sistema dopaminérgico no sistema de recompensa cerebral, que inclui o núcleo accumbens (STAHL, 2003; NUTT et al., 2007; DUNLOP; NEMEROFF, 2007; NUTT, 2008).

As alterações nos circuitos dopaminérgicos, além de estarem relacionadas com os sintomas de depressão pós-parto, também possuem papel importante na disfunção do comportamento materno, especialmente a via mesolímbica (NEPHEW et al., 2015; POST; LEUNER, 2018; WINOKUR et al., 2019). Essa via se inicia com os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral e se projeta no núcleo accumbens, nas estruturas do sistema límbico (amígdala e hipocampo) e no córtex,

sendo parte do sistema de recompensa, e relacionada ao comportamento motivacional e com funções cognitivas e emocionais (POST; LEUNER, 2018).

Diversos estudos com roedores indicam que o cuidado materno é um comportamento motivado e gratificante, sendo essencial a participação da via dopaminérgica mesolímbica para a expressão desses cuidados; para esses animais, os filhotes são um estímulo recompensador, sendo preferíveis a drogas com alto grau de dependência, como, por exemplo, a cocaína (NEPHEW et al., 2015; POST; LEUNER, 2018). De tal modo, alterações no sistema de recompensa cerebral levam a disfunção do comportamento materno (NUMAN et al., 2005). Estudo realizado por Lavi-Avnon e colaboradores (2008) utilizou ratas *Flinders Sensitive Line* como modelo de depressão pós-parto e mostraram que esses animais apresentaram diminuição nos níveis extracelulares de dopamina no sistema de recompensa ao serem expostas aos seus filhotes.

Nossos resultados mostraram que as ratas submetidas ao modelo de separação materna apresentaram diminuição de DA, de DOPAC e do *turnover* DOPAC/DA no córtex pré-frontal, e diminuição de HVA e do *turnover* HVA/DA no hipocampo, indicando comprometimento das vias mesocortical e mesolímbica nesses animais, semelhante ao que ocorre em pacientes com depressão. Esses resultados sugerem também que a disfunção nos cuidados maternos exibida por esses animais possa ser consequência dessas alterações neuroquímicas encontradas.

Há também evidências na literatura do envolvimento de aminoácidos neurotransmissores na psicopatologia da depressão pós-parto, em particular, do glutamato e do GABA (COUTO et al., 2015; PAWLUSKI et al., 2017; PAYNE; MAGUIRE, 2019). Assim, foi realizada a avaliação dos efeitos do modelo de separação materna nos níveis de aminoácidos neurotransmissores cerebrais, sendo eles, o aspartato, o glutamato, a glicina e o GABA.

Nossos resultados mostraram alterações nos níveis de glutamato, glicina e GABA em diferentes estruturas cerebrais de ratas submetidas ao modelo de separação materna. Entretanto não foram encontradas alterações nos níveis de aspartato em nenhuma das estruturas cerebrais analisadas.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e está relacionado com o desenvolvimento de diversas doenças

psiquiátricas, dentre elas a depressão (GUYTON; HALL, 2017; PAYNE; MAGUIRE, 2019). Atualmente, o sistema glutamatérgico vem sendo alvo de diversos estudos para novos tratamentos mais rápidos e mais eficazes para estas doenças (JUN et al., 2014).

Existem poucos estudos na literatura que correlacionaram alterações no sistema glutamatérgico com o desenvolvimento de depressão pós-parto, tanto em mulheres, quanto em modelos animais. Em pacientes com depressão pós-parto, foram realizados estudos de imagem funcional através da utilização de espectroscopia por ressonância magnética e foram encontrados tanto aumento nos níveis de glutamato no córtex pré-frontal (MCEWEN et al., 2012), quanto diminuição (ROSA et al., 2017).

Estudos com roedores mostraram diminuição da sinalização do gene *GluR1*, que codifica o receptor glutamatérgico AMPA, no hipocampo e do gene *GLT-1*, que codifica o transportador de glutamato 1, no córtex pré-frontal de animais induzidos a depressão pós-parto (XIA et al., 2016; GUAN et al., 2016; ZHANG, et al., 2017). Bölükbas e colaboradores (2020) mensuraram os níveis séricos de glutamato de ratas expostas ao modelo de separação materna por 1 h diária durante a lactação e não encontraram diferenças quando comparados aos das ratas do grupo controle.

Nossos resultados mostraram aumento nos níveis de glutamato no corpo estriado, porém sem alterações nas demais estruturas cerebrais analisadas. Esses resultados diferem dos encontrados na literatura, sugerindo que essa alteração possivelmente ocorreu ao acaso, e, portanto, não possui relação com o modelo de indução a depressão pós-parto utilizado.

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central e também está relacionado com o desenvolvimento transtornos mentais, como ansiedade e depressão (LONSTEIN et al., 2014a; PAYNE; MAGUIRE, 2019). Durante o período periparto há equilíbrio entre os processos de síntese e liberação de GABA, de ativação dos receptores GABAérgicos tipo A, e de expressão das diferentes subunidades e densidade desses receptores; assim, alterações nesse equilíbrio têm sido apontadas como contribuições para o desenvolvimento de ansiedade e depressão no período pós-parto (LONSTEIN et al., 2014a; MACKENZIE; MAGUIRE, 2014).

Estudo utilizando um modelo hormonal de indução a depressão pós-parto em ratas mostrou aumento na expressão do gene *GABAA α 4*, que codifica a subunidade $\alpha 4$ do receptor GABAérgico tipo A, no hipocampo, indicando aumento da atividade GABAérgica nesses animais (SUDA et al., 2008). Bölükbas e colaboradores (2020) mostraram em seu trabalho que ratas expostas ao modelo de separação materna por 1 h diária durante a lactação apresentaram aumento dos níveis séricos de GABA.

Nossos resultados mostraram aumento dos níveis de GABA no hipotálamo e no corpo estriado de ratas do grupo SM em comparação com os animais do grupo controle. Esses resultados corroboram os trabalhos da literatura, sugerindo desbalanço do sistema GABAérgico causado pelo aumento dos níveis de GABA cerebrais na depressão pós-parto.

A glicina é um aminoácido que possui duas funções principais no sistema nervoso central: 1) a atuação como neurotransmissor inibitório, através da sua ligação com o receptor de glicina; e 2) a de facilitador da excitação neuronal, através do seu papel como co-agonista obrigatório na ativação do receptor glutamatérgico NMDA (HARSING et al., 2012; CIOFFI; GUZZO, 2016). Dessa forma, a glicina é um mediador importante na manutenção do equilíbrio entre as neurotransmissões excitatórias e inibitórias no sistema nervoso central (CIOFFI; GUZZO, 2016).

Não foram encontrados na literatura trabalhos que relacionaram a ação da glicina no sistema nervoso central com o desenvolvimento de depressão pós-parto. Entretanto, devido ao seu papel fisiológico, é possível inferir que esse neurotransmissor pode ter um papel relevante nessa doença, da mesma forma que os outros aminoácidos neurotransmissores já mencionados anteriormente. Nossos resultados mostraram que as ratas do grupo SM apresentaram aumento nos níveis de glicina no hipotálamo e no corpo estriado, sugerindo uma ação inibitória, semelhante à do GABA nessas estruturas.

Como já mencionado anteriormente, há fortes evidências de que diversos tipos de hormônios possuem papel importante na neurobiologia da depressão pós-parto (BLOCH; DALY; RUBINOW, 2003; PAYNE; MAGUIRE, 2019). A avaliação hormonal neste trabalho foi realizada através dosagem dos níveis séricos de corticosterona, dos hormônios sexuais e dos hormônios tireoidianos das ratas no DPN21.

A mensuração dos níveis de corticosterona foi realizada, como mencionado anteriormente, devido a implicação de disfunções do eixo HPA na psicopatologia da depressão pós-parto. Nossos resultados mostraram que ao final da lactação não há mais diferenças significantes entre os níveis de corticosterona das ratas submetidas ao modelo de separação materna e as ratas controle, indicando a normalização das concentrações deste hormônio após alguns dias.

Os hormônios sexuais e hipotalâmicos, além de estarem relacionados com o mecanismo de desenvolvimento da depressão pós-parto (PAYNE; MAGUIRE, 2019), também possuem papel fundamental na expressão do comportamento materno (LONSTEIN; LÉVY; FLEMING, 2015). Durante o período gestacional os níveis de progesterona se encontram elevados e vão decaindo próximo ao parto; já com os níveis de estrógenos ocorre o inverso, estes aumentam ao final da gestação, tendo seu pico no parto (CAMARGO et al., 2017). Esse pico de estrógeno acarreta em grande liberação de prolactina e ocitocina intracerebral e são responsáveis pelo desenvolvimento do comportamento materno (LONSTEIN et al., 2014b; NUMAN; FLEMING; LÉVY, 2006).

O FSH e o LH são hormônios gonadotrópicos secretados pela hipófise que estão mais relacionados com os processos reprodutivos mamíferos (GUYTON; HALL, 2017). Entretanto, estudo feito por Bayerl, Klamfl e Bosch (2019), mostrou que o tratamento de ratas lactantes com um antagonista do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH, responsável pela estimulação da liberação de FSH e LH) causou distúrbio no comportamento materno agressivo dessas ratas, evidenciado pela diminuição no número de ataques frente ao intruso. Desse modo, é possível que o FSH e o LH também possuam papel na expressão dos cuidados maternos.

Nossos resultados mostraram que ao final da lactação não houve diferenças significantes entre os níveis de progesterona, estradiol, FSH, LH, ocitocina e prolactina das ratas submetidas ao modelo de separação materna em relação às ratas controle, indicando que esse modelo não foi capaz de causar alteração nos níveis séricos de hormônios sexuais e hipotalâmicos.

As implicações clínicas das ações dos hormônios tireoidianos nos transtornos depressivos vêm sendo estudadas extensivamente e ainda não há concordância na comunidade científica. A maior parte dos pacientes com depressão apresenta níveis séricos de T4 dentro da variação normal, porém 25% dos indivíduos que sofrem

dessa doença possuem concentrações de T4 aumentados no sangue (KIRKEGAARD; FABER, 1998). Essas diferenças podem ser explicadas pelo grau de severidade da depressão, uma vez que estudos correlacionam a severidade dessa doença com os níveis séricos de T4 e T3 (BAUMGARTNER et al., 1988). Pacientes com depressão também apresentam taxa de conversão do T4 em T3 reduzida, fato que pode ser explicado pela redução na atividade das enzimas desidases nos tecidos alvo (KIRKEGAARD; KØRNER; FABER, 1990; BERENT et al., 2014).

Os níveis séricos de T3 normalmente se encontram dentro do limite normal, porém estes podem estar reduzidos em pacientes com depressão grave (KIRKEGAARD; FABER, 1998). Existem diversos fatores que influenciam os níveis de T3 no sangue, como inanição, uso de medicação e aumento dos níveis de cortisol. Esses fatores podem estar presentes em indivíduos que sofrem de depressão, podendo levar a diminuição nos níveis séricos de T3 (DOCTER et al., 1993). Isso dificulta a interpretação dos dados de concentração sérica desse hormônio.

A dosagem de TSH em pacientes com depressão mostrou que as concentrações séricas desse hormônio tendem a estar diminuídas (MAES et al., 1989; MAES et al., 1993). Estudos mostraram que a variação circadiana das concentrações séricas de TSH também está alterada em indivíduos que sofrem de depressão, sendo restabelecida após tratamento da doença (DUVAL et al., 1996).

Os nossos resultados mostraram que as ratas submetidas ao modelo de separação materna mantiveram a concentração sérica de T4 e de T3 semelhante ao das ratas controle, porém apresentaram diminuição na concentração de TSH. Essa alteração pode estar relacionada com a ação de diversos fatores no hipotálamo.

O hipotálamo é uma das duas regiões cerebrais diretamente conectadas com a hipófise, glândula endócrina que também está diretamente relacionada com a tireoide, constituindo, assim, o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT). Desse modo, estímulos provenientes do hipotálamo estimulam a secreção de hormônios na hipófise e na tireoide (CLARKE, 2015).

O hormônio liberador de tireotrofina (TRH) produzido nas células das porções anterior, medial e peraventricular do núcleo paraventricular do hipotálamo estimula a produção de TSH na hipófise, que, por sua vez, estimula a síntese de T3 e T4 na

tireoide, através do sistema porta HHT (PERELLO; STUART; NILLNI, 2006; GUYTON; HALL, 2017). A liberação do TSH também é regulada pela ação das enzimas D2 e D3 no cérebro (HANON et al., 2008). Desse modo, foi feita a mensuração da expressão de mRNA dos genes TRH, Dio2 e Dio3 no hipotálamo, a fim de verificar se a queda na concentração sérica de TSH observada nos animais induzidos a depressão poderia ter ocorrido devido a um desses fatores. Nossos resultados mostraram que não houve diferença nos níveis de mRNA desses genes entre os grupos experimentais.

Além das desidases, existem outros fatores que podem influenciar a concentração de TSH de um organismo (CLARKE, 2015). A somatostatina é um neuro-hormônio inibitório, também produzido no hipotálamo, que atua na regulação do TSH em sistema de feedback (EPELBAUM, 1986). Assim, o aumento da concentração desse hormônio proporciona uma queda na concentração de TSH. A PAP-2 é a enzima responsável pela degradação do TRH, e, assim como a somatostatina, também causa diminuição nos níveis de TSH quando aumentada (MOURA; MOURA, 2004). Os resultados do PCR em tempo real revelaram que não houve diferença nos níveis de mRNA dos genes da somatostatina e PAP-2 nas ratas submetidas à separação materna em relação às ratas controle.

Devido aos resultados encontrados no hipotálamo, foi investigado se a diminuição da concentração de TSH observada nos animais submetidos ao modelo de separação materna poderia ter ocorrido devido à ação das enzimas D2 e D3 em outras regiões cerebrais, conectadas com o hipotálamo. A seleção dessas regiões foi baseada também no estudo de Stahl (2003), que, como mencionado anteriormente, relaciona estruturas cerebrais distintas com os principais sintomas/sinais da depressão.

Os resultados da mensuração da expressão de mRNA dos genes Dio2 e Dio3 no hipocampo e no córtex pré-frontal mostraram que não houve diferenças significantes entre as ratas submetidas ao modelo de separação materna e as do grupo controle. Em relação ao corpo estriado, apesar das diferenças não serem estatisticamente significantes, houve aumento na expressão de mRNA da Dio2 e diminuição da expressão de mRNA da Dio3. Esses resultados indicam um possível hipotireoidismo estriatal nessas ratas.

Para testar essa hipótese, foi realizada a análise da expressão de mRNA de genes responsivos ao T3. Assim, um possível aumento na expressão desses genes poderia indicar de forma indireta aumento na concentração de T3 no corpo estriado, sugerindo um hipotireoidismo local. A escolha dos genes foi feita com base no trabalho de Diez et al. (2008) que fez um levantamento de genes responsivos ao T3 expressos no corpo estriado de ratos, e mostrou que os genes Hr, Aldh1a1, Cnr1, Slc22a3 e Dbp são regulados positivamente pelo T3.

O gene Hr codifica uma proteína cuja função está relacionada com o crescimento de pelos; o gene Aldh1a1 codifica uma proteína envolvida na oxidação irreversível de aldeídos endógenos e exógenos; o gene Cnr1 codifica o receptor canabinóide tipo 1; o gene Slc22a3 codifica o transportador de cátions orgânicos 3; o gene Dbp codifica o sítio D da proteína de ligação do promotor de albumina (SZPIRER et al., 1992; KIM et al., 2004; YOKOO et al., 2008; ONWUAMEZE et al., 2014; TOULOUPI et al., 2018). Estudos da literatura também relacionam os genes Cnr1, Slc22a3 e Dbp com doenças psiquiátricas, em especial com a depressão (BAGANZ et al., 2008; LIA et al., 2013; KONG et al., 2019). Nossos resultados mostraram que não houve diferença nos níveis de mRNA desses genes entre as ratas submetidas ao modelo de separação materna e as do grupo controle.

Além dos fatores neuroquímicos e endócrinos, fatores imunológicos também estão relacionados com o desenvolvimento da depressão pós-parto (PAYNE; MAGUIRE, 2019). Desse modo, foi feito a dosagem de citocinas pró-inflamatórias no sangue das ratas no DPN21.

Citocinas são mediadores de processos inflamatórios capazes de interagir com diferentes vias de neurotransmissão, plasticidade neural e metabolismo neuroendócrino relacionados com a depressão (DELLAGIOIA; HANNESTAD, 2010). Trabalhos da literatura apontam aumento nas concentrações séricas desses marcadores de resposta inflamatória na depressão pós-parto (SKALKIDOU et al., 2012; ANDERSON; MAES, 2013).

Neste trabalho foi feita a dosagem das interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 e do TNF- α . As principais funções dessas citocinas no organismo são: 1) IL-1 β – ativação endotelial, do eixo HPA, de linfócitos, de macrófagos e de neurófilos, bem como síntese de ácidos graxos prostanoídes e de IL-6; 2) IL-6 – síntese de proteínas de fase aguda e diferenciação e ativação de linfócitos T e B; 3) IL-10 – inibição de

inflamação e da produção de IL-1, IL-6, TNF e interferon (IFN- γ); 4) TNF- α – ativação endotelial e de neutrófilos, bem como estimulação da migração de células dendríticas para os linfonodos (DELLAGIOIA; HANNESTAD, 2010; ABELAIRA et al., 2013).

Nossos resultados mostraram que as ratas submetidas ao modelo de separação materna não apresentaram alteração nos níveis de grande parte das citocinas dosadas no sangue, mas exibiram níveis diminuídos de IL-10, diferente dos estudos da literatura. Essa diminuição dos níveis de IL-10, apesar de ser estatisticamente significativa, possivelmente não possui significado relevante, uma vez que não está acompanhada de outras alterações imunológicas. Esses dados em conjunto indicam, portanto, que o modelo de separação materna não foi capaz de alterar a resposta inflamatória nesses animais. Mais estudos são necessários para elucidar o papel do sistema imune no estado depressivo induzido pelo modelo de separação materna.

Esses dados tomados em conjunto sugerem que o modelo de separação materna pode ser usado como modelo de depressão pós-parto em ratas, uma vez que causou disfunção do comportamento materno, induziu o comportamento tipo-depressivo no nado forçado e aumentou os níveis séricos de corticosterona logo após a última separação das mães de seus filhotes. Esse fenótipo depressivo se desvanece ao final de lactação, devido ao processo adaptativo fisiológico do desmame. Apesar disso, alterações na neuroquímica do hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e do corpo estriado, e no metabolismo tireoidiano, evidenciadas pela diminuição nos níveis séricos de TSH, se mantiveram até o final da lactação, sem, contudo, interferir em hormônios tireoidianos, desiodases, expressão gênica e marcadores de resposta inflamatória envolvidos com a depressão pós-parto.

1.6 CONCLUSÃO

O modelo de separação materna para indução da depressão em ratas lactantes:

- Causou diminuição no ganho de peso no final da lactação;
- Causou disfunção do comportamento materno, evidenciado pelos resultados do teste de comportamento materno e materno agressivo;
- Induziu comportamento tipo-depressivo no nado forçado;
- Alterou os níveis de monoaminas e de seus metabólitos no hipocampo e no córtex pré-frontal e de aminoácidos neurotransmissores no hipotálamo e corpo estriado;
- Aumentou os níveis de corticosterona e diminuição nos níveis de TSH;
- Não alterou a expressão de RNA mensageiro de genes cerebrais;
- Diminuiu os níveis de IL-10.

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, n.8, p.689–697, 2016.

ABELAIRA, H.M.; RÉUS, G.Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, n.35, p.S112–S120, 2013.

AFFONSO, D.D.; DE, A.K.; HOROWITZ, J.A.; MAYBERRY, L.J. An international study exploring levels of postpartum depressive symptomatology. **Journal of Psychosomatic Research**, v.49, n.3, p.207-216, 2000.

AGUGGIA, J.P.; SUÁREZ, M.M.; RIVAROLA, M.A. Early maternal separation: Neurobehavioral consequences in mother rats. **Behavioural Brain Research**, v.248, p.25– 31, 2013.

ALMEIDA, R.N.; NÓBREGA, F.F.F.; BRAGA, J.E.F.; OLIVEIRA, L.E.G.; SÁ, R.C.S. Modelos animais para o estudo de drogas antidepressivas. In: CARLINI, E.A.; MENDES, F.R. **Protocolos em psicofarmacologia comportamental**. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011. p.267-291.

ANDERSON, G.; MAES, M. Postpartum depression: psychoneuroimmunological underpinnings and treatment. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.9, p.277–287, 2013.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-V)**. Editora Artmed, 5ª edição, 2014. 992 p.

ATANASOVA, B.; GRAUX, J.; EL HAGE, W.; HOMMET, C.; CAMUS, V.; BELZUNG, C. Olfaction: a potential cognitive marker of psychiatric disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.32, n.7, p.1315-1325, 2008.

AUMGARTNER, A.; GRAF, K.J.; KURTEN, I.; MEINHOLD, H. The hypothalamic–pituitary–thyroid axis in psychiatric patients and healthy subjects: Parts 1–4. **Psychiatry Research**, v.24, n.3, p.271-332, 1988.

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.

BAGANZ, N.L.; HORTON, R.E.; CALDERON, A.S.; OWENS, W.A.; MUNN, J.L.; WATTS, L.T.; KOLDZIC-ZIVANOVIC, N.; JESKE, N.A.; KOEK, W.; TONEY, G.M.; DAWS, L.C. Organic cation transporter 3: keeping the brake on extracellular serotonin in serotonin-transporter-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, n.48, p.18976-18981, 2008.

BASRAON, S.; COSTANTINE, M.M. Mood disorders in pregnant women with thyroid dysfunction. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.54, n.3, p.506–514, 2011.

BAUER, M.; LONDON, E.D.; SILVERMAN, D.H.S.; RASGON, N.; KIRCHHEINER, J.; WHYBROW, P.C. Thyroid brain and mood modulation in affective disorder: insights from molecular research and functional brain imaging. **Pharmacopsychiatry**, v.36, p.S215-S221, 2003.

BAUMGARTNER, A.; GRÄF, K.; KÜRTEN, I.; MEINHOLD, H. The hypothalamic-pituitary-thyroid axis in psychiatric patients and healthy subjects. **Psychiatry Research**, v.24, n.3, p.271-332, 1988.

BAYERL, D.S.; KLAMFL, S.M.; BOSCH, O.J. More than reproduction: Central gonadotropin-releasing hormone antagonism decreases maternal aggression in lactating rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v.31, p.1-8, 2019

BERENT, D.; ZBORALSKI, K.; ORZECZOWSKA, A.; GALECKI, P. Thyroid hormones association with depression severity and clinical outcome in patients with major depressive disorder. **Molecular Biology Reports**, v.41, n.4, p.2419-2425, 2014.

BLOCH, M.; DALY, R.C.; RUBINOW, D.R. Endocrine factors in the etiology of postpartum depression. **Comprehensive Psychiatry**, v.44, n.3, p.234–246, 2003.

BOCCIA, M.L.; PEDERSEN, C.A. Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. **Psychoneuroendocrinology**, v.26, n.7, p.657–672, 2001.

BOCCIA, M.L.; RAZZOLI, M.; VADLAMUDI, S.P.; TRUMBULL, W.; CALEFFIE C.; PEDERSEN, C.A. Repeated long separations from pups produce depression-like behavior in rat mothers. **Psychoneuroendocrinology**, v.32, n.1, p.65–71, 2007.

BÖLÜKBAS, I.; MUNDORF, A.; FREUND, N. Maternal separation in rats induces neurobiological and behavioral changes on the maternal side. **Scientific Reports**, v.10, p.1-9, 2020.

BOSCH, O.J.; MEDDLE, S.L.; BEIDERBECK, D.I.; BRANTEN, A.J. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. **The Journal of Neuroscience**, v.25, p.6807–6815, 2005.

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈRE, B.; DHONNCHADHA, B.N.; HASCÖET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.21, n.6, p.567–574, 2007.

BRAND, S.R.; BRENNAN, P.A. Impact of antenatal and postpartum maternal mental illness: how are the children? **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.52, n.3, p.441–455, 2009.

BRIDGES, R.S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.36, p.178-196, 2015.

BROUETTE-LAHLOU, I.; VERNET-MAURY, E.; CHANEL, J. Is rat dam licking behavior regulated by pups' preputial gland secretion? **Animal Learning & Behavior**, v.19, n.2, p.177–184, 1991.

CAMARGO, E.R.L.A.; ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; FUKUSHIMA, A.R.; SPINOSA, H.S. Comportamento materno: uma revisão da inter-relação com a toxicologia do desenvolvimento em roedores. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, v.17, n.1, p.8-25, 2017.

CARINI, L.M.; MURGATROYD, C.A.; NEPHEW, B.C. Using chronic social stress to model postpartum depression in lactating rodents. **Journal of Visualized Experiments**, v.76, n.e50324, 2013.

CIOFFI, C.L.; GUZZO, P.R. Inhibitors of glycine transporter-1: potential therapeutics for the treatment of CNS disorders. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.16, n.29, p.3404-3437, 2016.

CLARKE, I.J. Hypothalamus as an endocrine organ. **Comprehensive Physiology**, v.5, p.217-253, 2015.

COUTO, T.C.; BRANCAGLION, M.Y.M.; ALVIM-SOARES, A.; MOREIRA, L.; GARCIA, F.D.; NICOLATO, R.; AGUIAR, R.A.L.P.; LEITE, H.V.; CORRÊA, H. Postpartum depression: A systematic review of the genetics involved. **World Journal of Psychiatry**, v.5, n.1, p.103-111, 2015.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.23, n.5, p.238-245, 2002.

CZÉH, B.; FUCHS, E.; WIBORG, O.; SIMON, M. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.64, p.293–310, 2016.

DAVIDSON, J.R.; MEONI, P.; HAUDIQUET, V.; CANTILLON, M.; HACKETT, D. Achieving remission with venlafaxine and fluoxetine in major depression: its relationship to anxiety symptoms. **Depression and Anxiety**, v.16, n.1, 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. **The American Journal of Psychiatry**, v.160, n.2, p.374-376, 2003.

DELIGIANNIDIS, K.M.; KROLL-DESROSIERS, A.R.; MO, S.; NGUYEN, H.P.; SVENSON, A.; JAITLY, N.; HALL, J.E.; BARTON, B.A.; ROTHSCILD, A.J.; SHAFFER, S.A. Peripartum neuroactive steroid and γ -aminobutyric acid profiles in women at-risk for postpartum depression. **Psychoneuroendocrinology**, v.70, p.98–107, 2016.

DELLAGIOIA, N.; HANNESTAD, J. A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, n.34, p.130-143, 2010.

DIEZ, D.; GRIJOTA-MARTINEZ, C.; AGRETTI, P.; DE MARCO, G.; TONACCHERA, M.; PINCHERA, A.; ESCOBAR, G.M.; BERNAL, J.; MORTE, B. Thyroid hormone action in the adult brain: gene expression profiling of the effects of single and multiple doses of triiodo-L-thyronine in the rat striatum. **Endocrinology**, v.149, n.8, p.3989 – 4000, 2008.

DOCTER, R.; KRENNING, E.P.; DE JONG, M.; HENNEMANN, G. The sick euthyroid syndrome: Changes in thyroid hormone serum parameters and hormone metabolism. **Clinical Endocrinology**, v.39, n.5, p.499-518, 1993.

DUAN, K.M.; MA, J.H.; WANG, S.Y.; HUANG, Z.D.; ZHOU, Y.Y.; YU, H.Y. The role of tryptophan metabolism in postpartum depression. **Metabolic Brain Disease**, v.33, n.3, p.647-660, 2018.

DUNLOP, B.W.; NEMEROFF, C.B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Archives of General Psychiatry**, v.64, n.3, p.327-337, 2007.

DUVAL, F.; MOKRANI, M.C.; CROCQ, M.A.; JAUTZ, M.; BAILLY, P.; DIEP, T.S.; MACHER, J.P. Effect of antidepressant medication on morning and evening thyroid function tests during a major depressive episode. **Archives of General Psychiatry**, v.53, n.9, p.833-840, 1996.

DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M.; FARON-GÓRECKA, A.; KUŚMIDER, M.; DROZDOWSKA, E.; ROGÓZ, Z.; SIWANOWICZ, J.; CARON, M.G.; BÖNISCH, H. Effect of antidepressant drugs in mice lacking the norepinephrine transporter. **Neuropsychopharmacology**, v.31, n.11, p.2424-2432, 2006.

ELWOOD, J.; MURRAY, E.; BELL, A.; SINCLAIR, M.; KERNOHAN, W.G.; STOCKDALE, J. A systematic review investigating if genetic or epigenetic markers are associated with postnatal depression. **Journal of Affective Disorders**, v.253, p.51-62, 2019.

EKLUND, M.B.; JOHANSSON, L.M.; UVNÄS-MOBERG, K.; ARBORELIUS, L. Differential effects of repeated long and brief maternal separation on behavior and neuroendocrine parameters in Wistar dams. **Behavioural Brain Research**, v.203, n.1, p.69-75, 2009.

ENGIN, E.; TREIT, D.; DICKSON, C.T. Anxiolytic- and antidepressant-like properties of ketamine in behavioral and neurophysiological animal models. **Neuroscience**, v.161, n.2, p.359-369, 2009.

EPELBAUM, J. Somatostatin in the central nervous system: Physiology and pathological modifications. **Progress in Neurobiology**, v.27, n.1, p.63-100, 1986.

FASCHING, P.A.; FASCHINGBAUER, F.; GOECKE, T.W.; ENGEL, A.; HÄBERLE, L.; SEIFERT, A.; VOIGT, F.; AMANN, M.; REBHAN, D.; BURGER, P.; KORNHUBER, J.; EKICI, A.B.; BECKMANN, M.W.; BINDER, E.B. Genetic variants in

the tryptophan hydroxylase 2 gene (TPH2) and depression during and after pregnancy. **Journal of Psychiatric Research**, v.46, n.9, p.1109-1117, 2012.

FITELSON, E.; KIM, S.; BAKER, A.S.; LEIGHT, K. Treatment of postpartum depression: clinical, psychological and pharmacological options. **International Journal of Women's Health**; v.3, p.1–14, 2011.

FRIEDMAN, S.H.; RESNICK, P.J. Postpartum depression: an update. **Women's Health**, v.5, n.3, p.287–295, 2009.

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, n.5, p.1071-1083, 2005.

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, n.4, p263–274, 2003.

GROER, M.W.; MORGAN, K. Immune, health and endocrine characteristics of depressed postpartum mothers. **Psychoneuroendocrinology**, v.32, n.2, p.133-139, 2007.

GUAN, Y.; LIU, X.; SU, Y. Ceftriaxone pretreatment reduces the propensity of postpartum depression following stroke during pregnancy in rats. **Neuroscience Letters**, v.632, p.15-22, 2016.

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: GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 45, p.54-63, 2013.

HANON, E.A.; LINCOLN, G.A.; FUSTIN, J.M.; DARDENTE, H.; MASSON-PEVET, M.; MORGAN, P.J.; HAZLERIGG, D.G. Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. **Current Biology**, v.18, n.15, p.1147-1152, 2008.

HARSING, L.G.; ZSILLA, G.; MATYUS, P.; NAGY, K.M.; MARKO, B.; GYARMATI, Z.; TIMAR, J. Interactions between glycine transporter type 1 (GlyT-1) and some inhibitor molecules - glycine transporter type 1 and its inhibitors. **Acta Physiologica Hungarica**, v.99, n.1, p.1-17, 2012.

HENDRICK, V.; ALTSHULER, L.; WHYBROW, P. Psychoneuroendocrinology of mood disorders: the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. **Psychiatric Clinics of North America**, v.21, n.2, p.277-292, 1998.

HERMAN, J.P.; CULLINAN, W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, v.20, n.2, p.78-84, 1997.

JUN, C.; CHOI, Y.; LIM, S.M.; BAE, S.; HONG, Y.S.; KIM, J.E.; LYOO, I.K. Disturbance of the glutamatergic system in mood disorders. **Experimental Neurobiology**, v.23, n.1, p.28-35, 2014.

KIM, D.R.; EPPERSON, C.N.; WEISS, A.R.; WISNER, K.L. Pharmacotherapy of postpartum depression: an update. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.15, n.9, p.1223-1234, 2014.

KIM, H.; PANTELEYEV, A.A.; JAHODA, C.A.B.; ISHII, Y.; CHRISTIANO, A.M. Genomic organization and analysis of the hairless gene in four hypotrichotic rat strains. **Mammalian Genome**, v.15, n.12, p.975-81, 2004.

KIRKEGAARD, C.; FABER, J. The role of thyroid hormones in depression. **European Journal of Endocrinology**, v.138, p.1-9, 1998.

KIRKEGAARD, C.; KØRNER, A.; FABER, J. Increased production of thyroxine and inappropriately elevated serum thyrotropin levels in endogenous depression. **Biological Psychiatry**, v.27, n.5, p.472-476, 1990.

KONG, X.; MIAO, Q.; LU, X.; ZHANG, Z.; CHEN, M.; ZHANG, J.; ZHAI, J. The association of endocannabinoid receptor genes (CNR1 and CNR2) polymorphisms with depression: a meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, v.98, n.46, p.1-8, 2019.

KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: a comprehensive review. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, n.2, p. 175–183, 2013.

LIA, J.Z.; BUNNEYB, B.G.; MENG, F.; HAGENAUER, M.H.; WALSH, D.M.; VAWTER, M.P.; EVANS, S.J.; CHOUDARY, P.V.; CARTAGENA, P.; BARCHASE, J.D.; SCHATZBERG, A.L.; JONES, E.G.; MYERS, R.G.; WATSON, S.J.; AKIL, H.; BUNNEY, H.W. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, n.24, p.9950-9955, 2013.

LAVI-AVNON, Y.; WELLER, A.; FINBERG, J.P.M.; GISPAN-HERMAN, I.; KINOR, N.; STERN, Y.; SCHROEDER, M.; GELBER, V.; BERGMAN, S.Y.; OVERSTREET, D.H.; YADID, G. The reward system and maternal behavior in an animal model of depression: a microdialysis study. **Psychopharmacology**, v.196, p.281-291, 2008.

LENZ, K.M.; SENGELAUB, D.R. Maternal care effects on the development of a sexually dimorphic motor system: the role of spinal oxytocin. **Hormones and Behavior**, v.58, n.4, p. 575-581, 2010.

LÉVESQUE, M.; BÉDARD, A.; COSSETTE, M.; PARENT, A. Novel aspects of the chemical anatomy of the striatum and its efferent projections. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v.26, n.4, p.271-281, 2003.

LÉVY, F.; KELLER, M.; POINDRON, P. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. **Hormones and Behavior**, v.46, n.3, p.284– 302, 2004.

LONSTEIN, J.S.; GAMMIE, S.C. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.26, n.8, p.869-888, 2002.

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

LONSTEIN, J.S.; MAGUIRE, J.; MEINLSCHMIDT, G.; NEUMANN, I.D. Emotion and mood adaptations in the peripartum female: complementary contributions of GABA and oxytocin. **Journal of Neuroendocrinology**, v.26, n.10, p.649–664, 2014a.

LONSTEIN, J.S.; PEREIRA, M.; MORRELL, J.I.; MARLER, C.A. Parental behavior. In: PLANT, T.M.; ZELEZNIK, A.J. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 4^a ed. Nova York: Elsevier. 2014. p.2371-2438b.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioral Pharmacology**, v.8, n.6-7, p.523–532, 1997.

MACKENZIE, G.; MAGUIRE, J. The role of ovarian hormone-derived neurosteroids on the regulation of GABAA receptors in affective disorders. **Psychopharmacology (Berl)**, v.231, n.17, p.3333-3342, 2014.

MAES, M.; MELTZER, H.Y.; COSYNS, P.; SUY, E.; SCHOTTE, C. An evaluation of basal hypothalamic–pituitary–thyroid axis function in depression: Results of a large-scaled and controlled study. **Psychoneuroendocrinology**, v.18, n.8, p.607-620, 1993.

MAES, M.; VANDEWOUDE, M.; MAES, L.; SCHOTTE, C.; COSYNS, P. A revised interpretation of the TRH test results in female depressed patients. Part I: TSH responses. Effects of severity of illness, thyroid hormones, monoamines, age, sex hormonal, corticosteroid and nutritional state. **Journal of Affective Disorders**, v.16, n.2-3, p.203–213, 1989.

MAES, M.; VERKERK, R.; BONACCORSO, S.; OMBELET, W.; BOSMANS, E.; SCHARPÉ, S. Depressive and anxiety symptoms in the early puerperium are related to increased degradation of tryptophan into kynurenine, a phenomenon which is related to immune activation. **Life Sciences**, v.71, n.16, p.1837–1848, 2002.

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, part A, p.11-16, 2015.

MAGUIRE, J.; MODY, I. Behavioral deficits in juveniles mediated by maternal stress hormones in mice. **Neural Plasticity**, v.16, p.1-13, 2016.

MANIAM, J.; MORRIS, M.J. Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. **Behavioural Brain Research**, v.208, n.1, p.72–79, 2010.

MCEWEN, A.M.; BURGESS, D.T.A.; HANSTOCK, C.C.; SERES, P.; KHALILI, P.; NEWMAN, S.C.; BAKER, G.B.; MITCHELL, N.D.; KHUDABUX-DER, J.; ALLEN, P.S.; LEMELLEDO, J.M. Increased glutamate levels in the medial prefrontal cortex in patients with postpartum depression. **Neuropsychopharmacology**, v.37, n.11, p.2428-2435, 2012.

MILEVA-SEITZ, V.; STEINER, M.; ATKINSON, L.; MEANEY, M.J.; LEVITAN, R.; KENNEDY, J.L.; SOKOLOWSKI, M.B.; FLEMING, A.S. Interaction between oxytocin genotypes and early experience predicts quality of mothering and postpartum mood. **PLoS One**, v.8, n.4, p.1-12, 2013.

MOORE, C.L. An olfactory basis for maternal discrimination of sex of offspring in rats. **Animal Behaviour**, v.29, n.2, p.383– 386, 1981.

MORET, C.; BRILEY, M. The importance of norepinephrine in depression. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.7, p.9-13, 2011.

MOURA, E.G.; MOURA, C.C.P. Regulação da síntese e secreção de tireotrofina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.48, n.1, p.40-52, 2004.

MORENO, R.A.; MORENO, D.H.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.21, p.24-40, 1999.

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.

NEPHEW, B.C.; MURGATROYD, C.; PITTET, F.; FEBO, M. Brain reward pathway dysfunction in maternal depression and addiction: a present and future transgenerational risk. **Journal of Reward Deficiency Syndrome**, v.1, n.3, p.105-116, 2015.

NUMAN, M. Maternal behavior. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. 2^a ed. Nova York: Rasen Press. 1994. p.221-302.

NUMAN, M.; FLEMING, A.S. LÉVY, F. Maternal behavior. In: NEIL, J.D. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3^a ed. Londres: Elsevier. 2006. p.1921-1993.

NUMAN, M.; NUMAN, M.J.; PLIAKOU, N.; STOLZENBERG, D.S.; MULLINS, O.J.; MURPHY, J.M.; SMITH, C.D. The effects of D1 or D2 dopamine receptor antagonism in the medial preoptic area, ventral pallidum, or nucleus accumbens on the maternal retrieval response and other aspects of maternal behavior in rats. **Behavioral Neuroscience**, v.119, n.6, p.1588–1604, 2005.

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. **Journal of Psychopharmacology**, v.21, n.5, p.461-471, 2007.

NUTT, D.J. Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v.69 Suppl E1, p.4-7, 2008.

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.

ONWUAMEZE, O.E.; NAM, K.W.; EPPING, E.A.; WASSINK, T.H.; ZIEBELL, S.; ANDREASEN, N.C.; HO, B.C. MAPK14 and CNR1 gene variant interactions: effects on brain volume deficits in schizophrenia patients with marijuana misuse. **Psychological Medicine**, v.43, n.3, p.619-631, 2014.

PAWLUSKI, J.L.; LI, M.; LONSTEIN, J.S. Serotonin and motherhood: from molecules to mood. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.53, p.1-13, 2019.

PAWLUSKI, J.L.; LONSTEIN, J.S.; FLEMING, A.S. The neurobiology of postpartum anxiety and depression. **Trends in Neurosciences**, v.40, n.2, p.106-120, 2017.

PAYNE, J.L. Psychopharmacology in pregnancy and breastfeeding. **Medical Clinics of North America**, v.40, n.2, p.217-238, 2019.

PAYNE, J.L.; MAGUIRE, J. Pathophysiological mechanisms implicated in postpartum depression. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.52, p.165-180, 2019.

PERELLO, M.; STUART, R.C.; NILLNI, E.A. The role of intracerebroventricular administration of leptin in the stimulation of prothyrotropin releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology**, v.147, n.7, p.3296-3306, 2006.

POST, C.; LEUNER, B. The maternal reward system in postpartum depression. **Archives of Women's Mental Health**, v.22, n.3, p.417-429, 2018.

POWELL, T.R.; FERNANDES, C.; SCHALKWYK, L.C. Depression-related behavioral tests. **Current Protocols in Mouse Biology**, v.2, n.2, p.119-127, 2012.

RAINEKI, C.; DE SOUZA, M.A.; SZAWKA, R.E.; LUTZ, M.L.; DE VASCONCELLOS, L.F.T.; SANVITTO, G.L.; IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.; CAMMAROTA, M.; LUCION, A.B. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic amp response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. **Neuroscience**, v.159, n.1, p.31-38, 2009.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.29, n.10, p.493-498, 2008.

RAYNAUD, A.; MEUNIER, N.; ACQUISTAPACE, A.; BOMBAIL, V. Chronic variable stress exposure in male Wistar rats affects the first step of olfactory detection. **Behavioural Brain Research**, v.291, p.36-45, 2015.

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.

ROSA, C.E.; SOARES, J.C.; FIGUEIREDO, F.P.; CAVALLI, R.C.; BARBIERI, M.A.; SPANGHERO, M.S.; SALMON, C.E.G.; DEL-BEN, C.M.; SANTOS, A.C. Glutamatergic and neural dysfunction in postpartum depression using magnetic resonance spectroscopy. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v.265, p.18-25, 2017.

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. **Nutritional Neuroscience**, v.22, n.11, p.805-816, 2018.

SCHABLITZKY, S.; PAUSE, B.M. Sadness might isolate you in a non-smelling world: olfactory perception and depression. **Frontiers in Psychology**, v.5, p.1-20, 2014.

SCHILLER, C.E.; MELTZER-BRODY, S.; RUBINOW, D.R. The role of reproductive hormones in postpartum depression. **CNS Spectrums**, v.20, n.1, p.48-59, 2015.

SKALKIDOU, A.; HELLGREN, C.; COMASCO, E.; SYLVÉN, S.; POROMAA, I.S. Biological aspects of postpartum depression. **Women's Health**, v.8, n.6, p.659-672, 2012.

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, n.1, p.65–83, 2006.

STAHL, S.M. Symptoms and circuits, part 1: Major depressive disorder. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v.64, n.11, p.1282-1283, 2003.

STAMATAKIS, A.; KALPACHIDOU, T.; RAFTOGIANNI, A.; ZOGRAFOU, E.; TZANOU, A.; PONDIKIS, S.; STYLIANOPOULOU, F. Rat dams exposed repeatedly to a daily brief separation from the pups exhibit increased maternal behavior, decreased anxiety and altered levels of receptors for estrogens (ER α , ER β), oxytocin and serotonin (5-HT $1A$) in their brain. **Psychoneuroendocrinology**, v.52, p.212–228, 2015.

STAUBE, A.M.; GREWEN, K.; MELTZER-BRODY, S. Association between maternal mood and oxytocin response to breastfeeding. **Journal of Women's Health**, v.22, n.4, p.352-361, 2013.

STERNER, E.Y.; KALYNCHUK, L.E. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: Relevance to depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.34, n.5, p.777–790, 2010.

SUDA, S.; SEGI-NISHIDA, E.; NEWTON, S.S.; DUMAN, R.S. A postpartum model in rat: behavioral and gene expression changes induced by ovarian steroid deprivation. **Biological Psychiatry**, v.64, n.4, p.311–319, 2008.

SULLIVAN, G.M.; HATTERER, J.A.; HERBERT, J.; CHEN, X.; ROOSE, S.P.; ATTIA, E.; MANN, J.J.; MARANGELL, L.B.; GOETZ, R.R.; GORMAN, J.M. Low levels of transthyretin in the CSF of depressed patients. **The American Journal of Psychiatry**, v.156, n.5, p.710-715, 1999.

SUNG, Y.H.; SHIN, M.S.; CHO, S.; BAIK, H.H.; JIN, B.K.; CHANG, H.K.; LEE, E.K.; KIM, C.J. Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus. **Neuroscience Letters**, v.470, n.1, p.86–90, 2010.

SZPIRER, C.; RIVIERE, M.; CORTESE, R.; NAKAMURA, T.; ISLAM, M.Q.; LEVAN, G.; SZPIRER, J. Chromosomal localization in man and rat of the genes encoding the liver-enriched transcription factors C/EBP, DBP, and HNF1/LFB-1 (CEBP, DBP, and Transcription Factor 1, TCF1, respectively) and of the hepatocyte growth factor/scatter factor gene (HGF). **Genomics**, v.13, n.2, p.293-300, 1992.

TABACH, R. Modelos animais para o estudo de drogas ansiolíticas. In: CARLINI, E.A.; MENDES, F.R. **Protocolos em psicofarmacologia comportamental**. São Paulo: Editora Fap-Unifesp. 2011. p.159-182.

TARICANO, M. **Efeitos da administração pré-natal de LPS no aprendizado e/ou memória na prole de ratas**. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TEODOROV, E.; MORAES, A.P.; FELICIO, L.F.; VAROLLI, F.M.; BERNARDI, M.M. Perinatal maternal exposure to picrotoxin: effects on sexual behavior in female rat offspring. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.81, n.4, p.935–942, 2005.

TEODOROV, E.; SALZGEBER, S.A.; FELICIO, L.F.; VAROLLI, F.M.; BERNARDI, M.M. Effects of perinatal picrotoxin and sexual experience on heterosexual and homosexual behavior in male rats. **Neurotoxicology & Teratology**, v.24, n.2, p.235–245, 2002.

TOIGO, E.V.P.; DIEHL, L.A.; FERREIRA, A.G.K.; MACKENDANZ, V.; KROLOW, R.; BENITZ, A.N.D.; NOSCHANG, C.; HUFFELL, A.P.; SILVEIRA, P.P.; WYSE, A.T.S.; DALMAZ, C. Maternal depression model: long-lasting effects on the mother following separation from pups. **Neurochemical Research**, v.37, p.126–133, 2012.

TOULOUPI, K.; KÜBLBECK, J.; MAGKLARA, A.; MOLNÁR, F.; REINISALO, M.; KONSTANDI, M.; HONKAKOSKI, P.; PAPPAS P. The basis for strain-dependent rat aldehyde dehydrogenase 1a7 (ALDH1A7) gene expression. **Molecular Pharmacology**, v.96, n.5, p.655-663, 2018.

TRACTENBERG, S.G.; LEVANDOWSKI, M.L.; AZEREDO, L.A.; ORSO, R.; ROITHMANN, L.G.; HOFFMANN, E.S.; BRENHOUSE, H.; GRASSI-OLIVEIRA, R. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.68, p.489–503, 2016.

TYE, K.M.; MIRZABEKOV, J.J.; WARDEN, M.R.; FERENCZI, E.A.; TSAI, H.C.; FINKELSTEIN, J.; KIM, S.Y.; ADHIKARI, A.; THOMPSON, K.R.; ANDALMAN, A.S.; GUNAYDIN, L.A.; WITTEN, I.B.; DEISSEROTH, K. Dopamine neurons modulate

neural encoding and expression of depression-related behavior. **Nature**, v.493, n.7433, p.537–541, 2012.

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.

VETULANI, J. Early maternal separation: a rodent model of depression on a prevailing human condition. **Pharmacological Reports**, v.65, n.6, p.1451-1461, 2013.

WALF, A.A.; FRYE, C.A. A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. **Neuropsychopharmacology**, v.31, n.6, p.1097-1111, 2006.

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

WHYBROW, P.; PRANGE, A. A hypothesis of thyroid-catecholamine-receptor interactions: its relevance to affective illness. **Archives of General Psychiatry**, v.38, n.1, p.106-113, 1981.

WINOKUR, S.B.; LOPES, K.L.; MOPARTHI, Y.; PERREIRA, M. Depression-related disturbances in rat maternal behaviour are associated with altered monoamine levels within mesocorticolimbic structures. **Journal of Neuroendocrinology**, v.31, p.1-18, 2019.

WISNER, K.L.; SIT, D.K.Y.; MCSHEA, M.C.; RIZZO, D.M.; ZORETICH, R.A.; HUGHES, C.L.; ENG, H.F.; LUTHER, J.F.; WISNIEWSKI, S.R.; COSTANTINO, M.L.; CONFER, A.L.; MOSES-KOLKO, E.L.; FAMY, C.S.; HANUSA, B.H. Onset timing, thoughts of self-harm, and diagnoses in postpartum women with screen-positive depression findings. **JAMA Psychiatry**, v.70, n.5, p.490-498, 2013.

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, p.1-12, 2016.

YILDIZ, G.; SENTURK, M.B.; YILDIZ, P.; CAKMAK, Y.; BUDAK, M.S.; CAKAR, E. Serum serotonin, leptin, and adiponectin changes in women with postpartum

depression: controlled study. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v.295, n.4, p.853-858, 2017.

YOKOO, S.; MASUDA, S.; YONEZAWA, A.; TERADA, T.; KATSURA, T.; INUI, K.I. Significance of organic cation transporter 3 (SLC22A3) expression for the cytotoxic effect of oxaliplatin in colorectal cancer. **Drug Metabolism and Disposition**, v.36, n.11, p.2299-306, 2008.

ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; SANDINI, T.M.; ABREU, G.R.; PETROCELLI, B.M.; MOREIRA, N.; REIS-SILVA, T.M.; LEBRUM, I.; FLÓRIO, J.C.; RICCI, E.L.; FUKUSHIMA, A.R.; WAZIRY, P.A.F.; SPINOSA, H.S. Prolonged exposure of rats to varenicline increases anxiety and alters serotonergic system, but has no effect on memory. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.181, p.1–8, 2019.

ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; SANTORO, M.A.; ABREU, G.R.; RICCI, E.L.; FUKUSHIMA, A.R.; KIRSTEN, T.B.; WAZIRY, P.A.F.; SPINOSA, H.S. Exposure of dams to fluoxetine during lactation disturbs maternal behavior but had no effect on the offspring behavior. **Behavioural Brain Research**, v.377, p.1-7, 2020.

ZAJECKA, J.M. Clinical issues in long-term treatment with antidepressants. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.61, p.20-25, 2000.

ZHANG, X.L.; WANG, L.; XIONG, L.; HUANG, F.H.; XUE, H. Timosaponin B-III exhibits antidepressive activity in a mouse model of postpartum depression by the regulation of inflammatory cytokines, BDNF signaling and synaptic plasticity. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.14, n.4, p.3856-3861, 2017.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DOS EFEITOS FARMACO-TOXICOLÓGICOS DA ADMINISTRAÇÃO
PROLONGADA DE CETAMINA EM RATOS

2.1 INTRODUÇÃO

A cetamina (2-(2-clorofenil)-2- (metilamino) ciclohexanona) (Figura 2.1) é um fármaco derivado da fenilciclohexilamina utilizado originalmente como anestésico (ADAMS; CASTAGNOLI; TREVOR, 1978). Ela foi sintetizada pela primeira vez em 1962, pelo americano Calvin Stevens, no laboratório Parke & Davis e foi liberada para o uso comercial em 1970 como um anestésico de ação rápida por via intravenosa (DUNDEE et al., 1970; ROFAEL; ABDEL-RAHMAN, 2002; SILVA et al., 2010; PELTONIEMI et al., 2016). Essa substância foi desenvolvida como um substituto para o anestésico fenciclidina, que teve seu uso interrompido por provocar delírios intensos e prolongados como efeitos colaterais (LI; VLISIDES, 2016).

Figura 2.1 – Estrutura química da cetamina

Fonte: (LI; VLISIDES, 2016).

Inicialmente a cetamina foi empregada para uso na medicina veterinária, e na medicina humana como anestésico de uso militar e sedativo para crianças em procedimentos cirúrgicos (BHUTTA, 2007). Atualmente, é utilizada na medicina veterinária para analgesia e anestesia de pequena duração em diversas espécies de animais, como, por exemplo, felinos, caninos e equinos, e na medicina humana em cirurgias pediátricas, obstétricas, cardiovasculares, de trauma e em pacientes com queimaduras (ROFAEL; ABDEL-RAHMAN, 2002; SELLERS et al., 2010). Além do seu efeito anestésico, a cetamina também possui ação analgésica, anti-inflamatória e antidepressiva (WEISMAN, 1971; ROYTBLAT et al., 1998; ZARATE et al. 2006).

2.1.1 Uso clínico

A cetamina produz efeito de anestesia dissociativa, que é uma forma de anestesia em que o paciente não perde a consciência por completo, mas é induzido a um estado de catatonia, catalepsia e amnésia (GAO; REJAEI; LIU, 2016). Desse modo, ocorre perda sensorial e paralisia dos movimentos, mas sem perda real de consciência e depressão respiratória (BERGMAN, 1999). Os indivíduos, quando nesse estado, se tornam incapazes de responder a estímulos sensoriais; uma vez que estes estímulos atingem as áreas sensoriais corticais, ocorre supressão das áreas de associação cerebral, o que faz com que não haja uma resposta (BHUTTA, 2007; LI; VLISIDES, 2016). Esse estado é, portanto, o resultado da dissociação funcional e eletrofisiológica entre o sistema tálamo-neocortical e o sistema límbico (SILVA, 2010).

Para a indução desse estado de anestesia dissociativa é necessário pico de concentração plasmática de 1.200 a 2.400 ng/ml de cetamina (ZANOS et al., 2018). Um estudo realizado por White e colaboradores (1985) mostrou que a indução da anestesia geral em adultos voluntários saudáveis ocorre de 5 a 7 minutos após infusão intravenosa de 50 mg/min com a dose de 275 mg. Após o término da infusão, os indivíduos levaram 11 minutos para abrir os olhos (concentração sérica de cetamina de 8 a 14 μ M) e 45 minutos para recuperarem totalmente a consciência (concentração sérica de cetamina de 3,78 a 4,62 μ M).

Devido seu efeito analgésico, a cetamina também é utilizada no tratamento de dor aguda pós-operatória. Para isso é feita a administração de doses subanestésicas que variam de 0,15 a 0,25 mg/kg por via intravenosa ou de 0,5 a 1 mg/kg por via intramuscular (HIRLINGER; DICK, 1984; ROYBLAT et al., 1993).

O efeito anti-inflamatório da cetamina ocorre por meio da inibição na produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo NF- κ B (fator nuclear kappa B), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), interleucina 6 (IL-6) e proteína C-reativa (ZANOS et al., 2018). Esse fármaco é utilizado antes e durante cirurgias para ajudar na recuperação pós-operatória de pacientes; é feita a administração de doses variando de 0,15 a 0,25 mg/kg via intravenosa (ROYBLAT et al., 1993).

Nas últimas décadas a cetamina também passou a ser utilizada como antidepressivo, principalmente em casos de depressão maior. Diversos estudos pré-

clínicos e clínicos demonstraram os efeitos antidepressivos desse fármaco, porém a literatura não é conclusiva em relação à dose eficaz (doses variam de 0,25 e 30 mg/kg), via de administração (intravenosa, intraperitoneal, sublingual ou oral) e duração do tratamento (aguda *versus* prolongada) (YILMAZ et al., 2002; ZARATE et al., 2006; GARCIA et al., 2008; MAENG et al., 2008; BROWNE; LUCKI, 2013; IRWIN et al., 2013; DREWNIAKY et al., 2015; ABDALLAH et al., 2016; XU et al., 2017).

2.1.2 Farmacocinética

A cetamina possui uma estrutura quiral composta por dois isômeros ópticos, S (+) e R (-), devido a um átomo de carbono assimétrico na posição C2 (Figura 2.2) (LI; VLISIDES, 2016; PELTONIEMI et al., 2016). Estudos da literatura apontam o isômero S-cetamina como tendo três vezes mais ação anestésica do que o isômero R-cetamina (ZANOS et al., 2018). Apesar disso, a formulação comercial mais utilizada consiste de uma mistura racêmica desses dois isômeros (BHUTTA, 2007; PELTONIEMI et al., 2016). Essa formulação é solúvel em água e lipídios e apresenta pKa de 7,5, o que faz com que seja possível a sua administração por diversas vias (BERGMAN, 1999).

Figura 2.2 – Isômeros ópticos, S (+) e R(-), da cetamina

Fonte: (Adaptado de PELTONIEMI et al., 2016).

A via de administração mais utilizada em seres humanos é a intravenosa (ZANOS et al., 2018). A via intramuscular é utilizada em casos de urgência em pacientes não cooperativos, neonatos e crianças; a biodisponibilidade da cetamina

nesse tipo de via de administração é de 93%, sendo o pico de concentração plasmático atingido entre 5 e 30 minutos após a administração (CLEMENTS; NIMMO; GRANT, 1982). A via intranasal possui biodisponibilidade de 45% a 50% e é considerada uma alternativa a via intravenosa por possuir rápida absorção sistêmica e ser menos invasiva (MALINOVSKY et al., 1996). A via oral possui a pior biodisponibilidade, de apenas 16% a 29%, com o pico de concentração plasmático do fármaco ocorrendo de 20 a 120 minutos após a administração (ROLAN et al., 2014).

A cetamina possui rápida distribuição pelos tecidos altamente vascularizados, como o encéfalo, podendo atravessar facilmente a barreira hematoencefálica (BERGMAN, 1999). Ela possui fraca ligação com as proteínas plasmáticas (de 10% a 50%), e, conseqüentemente, possui grande volume de distribuição, o que leva a rápida ação sistêmica (SILVA et al., 2010; ZANOS et al., 2018).

A biotransformação da cetamina ocorre no fígado, através de vários processos, devido à ação de enzimas microssomais hepáticas do complexo citocromo P450 (SILVA et al., 2010). No principal processo de biotransformação, a cetamina é transformada em norcetamina através da desmetilação do nitrogênio; na sequência, a norcetamina é metabolizada em desidronorcetamina (DHNK) e em diversas hidroxinorcetaminas (HNKs), por meio de hidroxilação de um anel ciclohexil (Figura 2.3) (ADAMS et al., 1981).

Figura 2.3 – Principal processo de biotransformação da cetamina (CET). Estão ilustrados os metabólitos da cetamina (norcetamina - nor-CET; hidroxinorcetamina – HNK; desidronorcetamina - DHNK), bem como as enzimas do citocromo P450 (CYP) que catalisam as reações de biotransformação.

Fonte: (adaptado de ZANOS et al., 2018).

Estudo feito por Zarate et al. (2012) em pacientes diagnosticados com depressão maior resistentes aos antidepressivos clássicos e tratados com 0,5 mg/kg por infusão intravenosa de 40 minutos, identificou a norcetamina, a DHNK e a (2R,6R,2S,6S)HNK como os principais metabólitos circulantes no plasma. O pico de concentração plasmático para cada substância foi de: 204,13 ng/ml para a cetamina, atingido em 40 minutos; 73,54 ng/ml para a norcetamina, atingido em 80 minutos; 13,27 ng/ml para a DHNK, atingido em 110 minutos; e 23,19 ng/ml para a (2R,6R,2S,6S)HNK, atingido em 230 minutos.

A meia-vida da cetamina é de 2 a 4 horas, porém a administração conjunta com outros fármacos que possuem biotransformação hepática pode estender a meia-vida da cetamina devido à competição pelas enzimas do citocromo P450 (CLEMENTS; NIMMO; GRANT, 1982; BERGMAN, 1999; PELTONIEMI et al., 2016). Além do fígado, a biotransformação da cetamina também pode ocorrer nos rins, intestinos e pulmões, porém em menor quantidade (MION; VILLEVIEILLE, 2013).

A eliminação da cetamina ocorre primariamente pela urina, com excreção de níveis baixos de cetamina (2%), norcetamina (2%) e DHNK (16%) (ADAMOWICZ; KALA, 2005). A maior parte desse fármaco, cerca de 80%, é excretada na forma

conjugada com o ácido glicurônico pela urina e bile (MION; VILLEVIEILLE, 2013; ZANOS et al., 2018).

2.1.3 Mecanismo de ação

A cetamina atua em diversos tipos de receptores no sistema nervoso central, sendo eles: 1) receptores glutamatérgico N-metil D-Aspartato (NMDA); 2) receptores glutamatérgico não-NMDA; 3) receptores GABAérgicos; 4) receptores colinérgicos; 5) receptores monoaminérgicos; 6) receptores opióides; 7) receptores sigma; e 8) canais voltagem-dependente (HIROTA; LAMBERT, 1996; ROFAEL; ABDEL-RAHMAN, 2002; SILVA et al. 2010; ZANOS, et al. 2018).

A principal ligação da cetamina ocorre com os receptores glutamatérgico NMDA. Esses receptores são canais iônicos com propriedades excitatórias, formados por diferentes combinações de quatro subunidades codificadas pelos genes *GluN1*, *GluN2A-D* e *GluN3A-B* (HIROTA; LAMBERT, 1996; VYKLICKY et al., 2014). Quando em repouso, esses receptores estão bloqueados por uma molécula de magnésio; para sua ativação é necessário que haja um influxo de cálcio, acarretando em despolarização da membrana e, conseqüentemente, a liberação do magnésio e a ligação de uma molécula de glutamato e de uma molécula de glicina ou D-serina (coativadores) (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013). A cetamina se liga no sítio de ligação alostérico da fenciclidina, localizado no poro do canal, e atua como um antagonista não competitivo, por meio do bloqueio do influxo de cálcio para que não haja despolarização da célula (HIROTA; LAMBERT, 1996; BERGMAN, 1999; MION; VILLEVIEILLE, 2013).

A ação da cetamina sobre os receptores glutamatérgico não-NMDA ocorre via sistema glutamato/óxido nítrico/GMPc. Ao serem ativados, esses receptores estimulam a produção de óxido nítrico e, conseqüentemente, aumentam a concentração de GMPc. A cetamina também possui ação antagonista sobre esses receptores; ao bloquear os receptores não-NDMA, esse fármaco provoca a inibição da ação da enzima óxido nítrico sintetase, necessária para a formação de óxido nítrico (GONZALES, et al. 1995).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central; o GABA se liga a três tipos de receptores, o GABA_A e

GABA_C, ambos ionotrópicos, e o GABA_B metabotrópico (JACOB; MOSS; JURD, 2008). A cetamina atua como agonista dos receptores GABAérgicos, principalmente dos receptores GABA_A. Estudos de eletrofisiologia *in vitro* mostraram que esse fármaco potencializa as correntes pós-sinápticas inibitórias mediadas pelo receptor GABA_A em concentrações utilizadas clinicamente em células de bulbo olfatório de cobaias e de hipocampo de ratos (IRIFUNE et al., 2000).

A cetamina também se liga aos receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos. Existem cinco tipos de receptores muscarínicos (M1-M5), todos ligados à proteína G (EGLEN, 2005). Estudos mostram que a cetamina se liga aos receptores M1, M2 e M3, porém ainda não se sabe ao certo qual o efeito que ela exerce nesses receptores (ZANOS et al., 2018). Já os receptores colinérgicos nicotínicos são canais de cátions formados por uma combinação de cinco subunidades proteicas. A cetamina atua como antagonista dos receptores $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ e $\alpha 3\beta 4$ (ZANOS et al., 2018).

A atuação da cetamina nos receptores monoaminérgicos ocorre através dos receptores de dopamina e serotonina. Existem cinco tipos de receptores dopaminérgicos, D1-D5, e sete tipos de receptores serotoninérgicos, 5-HT₁ a 5-HT₇, no sistema nervoso central; todos esses receptores são metabotrópicos, com exceção do 5-HT₃ que é ionotrópico (DE FELICE, 2017). A cetamina possui alta afinidade pelo receptor D2, atuando como agonista parcial, e pelo receptor 5-HT₂, atuando como agonista (CRISP et al., 1991; KAPUR; SEEMAN, 2002; SILVA et al. 2010).

Os receptores opióides são amplamente distribuídos pelo sistema nervoso central e em tecidos periféricos; eles são ligados à proteína G e são divididos em três subtipos, μ , κ e δ (KIEFFER; GAVÉRIAUX-RUFF, 2002; TRESCOT et al., 2008). A cetamina possui maior afinidade pelo receptor μ , seguido pelo κ , e pelo δ (SMITH et al., 1987). A atuação desse fármaco nesses receptores parece estar relacionada com a ação analgésica, uma vez que a função primária dos receptores opióides é a inibição da transmissão de estímulos nociceptivos (TRESCOT et al., 2008; PACHECO; ROMERO; DUARTE, 2014) e com os efeitos psicomiméticos, pois agonistas dos receptores κ produzem efeitos similares aos da cetamina (HUSTVEIT; MAURSET; OYE, 1995).

Os receptores sigma são classificados em dois subtipos, sigma I e sigma II (BOWEN; HELLEWELL; MCGARRY, 1989). Estudos mostraram que a cetamina atua como agonista desses receptores, possuindo afinidade pelos dois subtipos (WANG, et al., 2007; ROBSON et al., 2012).

A cetamina também se liga em canais iônicos voltagem-dependente. Estudos mostraram que esse fármaco possui uma ação antagonista de canais de sódio e de canais de cálcio (ZANOS et al., 2018).

2.1.4 Efeitos colaterais

A cetamina possui efeitos psicotomiméticos, sendo os mais comuns: distorções nos estímulos visuais, auditivos ou somatossensitivos, alterações na percepção corpórea e de tempo, alucinações, pensamentos incomuns, retração emocional e retardo motor (ZANOS et al., 2018). Alguns indivíduos relataram experiências extracorpóreas ao se recuperarem da anestesia com cetamina (WHITE; WAY; TREVOR, 1982).

Estudo realizado por Vollenweider e colaboradores (1997) sugeriu que a S-cetamina estaria envolvida nas experiências alucinógenas e nas alterações visuais, auditivas e proprioceptivas, enquanto a R-cetamina estaria associada ao sentimento de bem-estar que os indivíduos relatam.

Outros estudos também apontam a cetamina como tendo efeitos negativos na memória e cognição. Dentre os sintomas relatados, se destacam: diminuição da nitidez mental, da concentração e de diversos tipos de memória logo após a administração de doses subanestésicas de cetamina (PFENNINGER; DURIEUX; HIMMELSEHER, 2002; MATHEW et al., 2010; DRIESEN et al., 2013).

A cetamina também possui efeitos indesejados nos sistemas periféricos. Estudos mostraram que a administração de cetamina pode levar a tonturas, náusea, vômito, taquicardia, hipertensão e palpitações (MORGAN et al., 2004; STRAYER; NELSON, 2008; WAN et al., 2015). Efeitos oculares (nistagmo, diplopia e dilatação pupilar) e musculoesqueléticos (mioclonia, espasmos, ataxia e fasciculação) também podem ocorrer (KRYSTAL et al., 1994; WEINER et al., 2000; WOLF; WINSTOCK, 2006).

2.1.5 Uso como droga de abuso

Devido aos efeitos dissociativos e psicotrópicos já citados, a cetamina passou a ser utilizada como droga de abuso. Na década de 1980 diversos tipos de preparações com cetamina eram encontradas nas ruas, com nomes como, *Special K*, *Kit Kat*, *Super Acid*, *Purple* e *Vitamin K*; já nos anos 1990, seu uso recreativo aumentou ainda mais devido à cultura da música *acid house* e das *raves* (ROFAEL; ABDEL-RAHMAN, 2002). Em 1999, o DEA (*Drug Enforcement Administration*) colocou a cetamina na lista de substâncias não narcóticas controladas, a fim de desencorajar o seu uso abusivo (DEA, 2017).

Uma revisão da literatura feita por Corazza, Assi e Schifano (2013) apontou que as doses de cetamina utilizadas para uso recreativo geralmente varia de 1 a 2 mg/kg por via intravenosa, de 50 a 150 mg por via intramuscular, de 100 a 500 mg por via oral e de 30 a 400 mg por via intranasal. A via de administração mais utilizada da cetamina como droga de abuso é a intranasal, que leva aos efeitos desejados entre 5 e 10 minutos após a administração, com duração de 45 a 75 minutos (WOLF; WINSTOCK, 2006).

Usuários relataram que doses mais baixas de cetamina causam efeitos estimulantes, dissociativos e alucinógenos leves, enquanto doses mais altas levam a sintomas psicotomiméticos e sentimento de dissociação da realidade (WOLF; WINSTOCK, 2006). O uso por longo período de tempo desse fármaco pode levar a disfunções cognitivas e de atenção e diminuição da sociabilidade (ZHANG et al., 2018).

2.1.6 Justificativa

A cetamina é um fármaco versátil com mecanismo de ação misto, ou seja, que atua em múltiplos sistemas de neurotransmissão, e que possui diversos efeitos sistêmicos. Estudos da literatura apontaram que a cetamina, além do seu efeito anestésico, já muito bem caracterizado, também possui efeito antidepressivo em doses subanestésicas. Entretanto, ainda não há um consenso na literatura em relação à dose eficaz, via de administração e duração do tratamento para essa finalidade. Desse modo, são necessários mais estudos para a avaliação da cetamina

como antidepressivo. Tais estudos contribuirão para o redirecionamento seguro do medicamento para esse novo uso clínico. Assim, o objetivo do presente estudo foi realizar uma avaliação fármaco-toxicológica em ratos machos adultos do tratamento prolongado com doses subanestésicas de cetamina.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos fármaco-toxicológicos do tratamento prolongado com três doses subanestésicas de cetamina em ratos machos adultos.

2.2.2 Objetivos específicos

Avaliar, em ratos machos adultos, os efeitos da administração prolongada de cetamina:

- No ganho de peso e no consumo de água e ração;
- Na bateria de observação funcional (*functional observational battery* - FOB);
- Nos níveis de neurotransmissores cerebrais e seus metabólitos;
- No hemograma completo;
- Nos níveis bioquímicos séricos.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar, com aproximadamente 90 dias de vida, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em pares em gaiolas de polipropileno (41 x 34 x 18 cm) com maravalha autoclavada como substrato e mantidos 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 (a luz acende às 6h e apaga às 18h). Os animais tiveram água e comida *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

Os experimentos foram conduzidos na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), sendo aprovados pela CEUA da FMVZ/USP, sob o protocolo de número 4973010217.

2.3.2 Fármaco

Nesse estudo foi utilizado cloridrato de cetamina proveniente do produto de uso veterinário 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 em refrigerador a 10°C. Foram empregadas três doses diferentes, 5, 10 e 20 mg/kg de cetamina administradas por via intraperitoneal. Os animais do grupo controle receberam solução salina 0,9%, 1mL/kg, também por via intraperitoneal. O tratamento com cetamina ou solução salina ocorreu todas as manhãs (entre 9h e 10h30) por 21 dias consecutivos.

2.3.3 Procedimentos

2.3.3.1 Bateria de observação funcional (*functional observational battery* - FOB)

A bateria de observação funcional (FOB) é um método de monitoramento de animais para detecção de déficits funcionais utilizado em estudos de neurotoxicidade de drogas; esse teste foi validado para tal uso pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos em 1998 (USEPA, 1998). Neste trabalho foi monitorada a atividade geral, as respostas sensoriais e psicomotoras, e alterações no sistema nervoso central e autônomo semanalmente, 10 minutos após a administração de cetamina ou solução salina. O procedimento consistiu em colocar os animais tratados em gaiolas de metal e analisar os sinais visíveis de possíveis efeitos do fármaco. Os parâmetros analisados estão descritos no Quadro 2.1. Um observador, cego para o tratamento aplicado em cada animal, atribuiu um escore de 0 a 4 para cada um dos parâmetros avaliados.

Quadro 2.1 – Descrição dos parâmetros analisados no teste FOB (*functional observational battery*)

Parâmetro	Descrição
Atividade geral ^a	Observação da atividade geral do animal na gaiola após um estímulo; a atividade geral engloba os comportamentos de locomoção, levantar, farejar e imobilidade.
Frêmito vocal ^b	Observação da emissão de som sem nenhum estímulo no animal.
Irritabilidade ^b	Observação de sinais de irritabilidade após observador assoprar o focinho do animal.
Reflexo auricular ^b	Observação de resposta do animal após observador estalar os dedos próximo à cabeça do animal.
Aperto de cauda ^b	Observação de resposta do animal após observador apertar a ponta da cauda com bastante intensidade.
Reflexo corneal ^b	Observação do reflexo de fechar os olhos após o observador, cuidadosamente, colocar a ponta de uma caneta perto do olho do animal.
Resposta ao toque ^b	Observação de resposta do animal após observador tocá-lo por período de 20 segundos.

Legenda: Atividade/Sistema envolvido – ^aatividade geral; ^bsistema sensorial; ^csistema psicomotor; ^dsistema nervoso central; ^esistema nervoso autônomo. Fonte: adaptado de Brito (1994).

Quadro 2.1 – Descrição dos parâmetros analisados no teste FOB (*functional observational battery*) (continuação).

Parâmetro	Descrição
Contorção ^c	Observação de presença ou ausência de contorção do corpo do animal.
Trem posterior ^c	Observação do modo de caminhar do animal (se o trem posterior está caído ou normal).
Reflexo de endireitamento ^c	Observação do reflexo de endireitamento corporal do animal após o observador o colocar com a parte dorsal do corpo voltada para a superfície de uma mesa (o animal deve ser capaz de voltar com rapidez a posição original, ou seja, com o ventre voltado para a superfícies da mesa).
Tônus corporal ^c	Observação da presença ou ausência de tônus corporal.
Força de agarrar ^c	Observação da intensidade que o animal tem para se segurar em uma grade.
Tremores ^d	Observação de presença ou ausência de tremores.
Convulsões ^d	Observação de presença ou ausência de convulsões.
Cauda de Straub ^d	Observação da posição da cauda do animal (se está em pé ou não).
Sedação ^d	Observação de presença ou ausência de sedação.
Anestesia ^d	Observação de presença ou ausência de reflexos dolorosos no animal.
Ataxia ^d	Observação de presença ou ausência de movimentos incoordenados devido à dismetria.
Ptose ^e	Observação das pálpebras do animal (se estão abertas ou fechadas).

Legenda: Atividade/Sistema envolvido – ^aatividade geral; ^bsistema sensorial; ^csistema psicomotor; ^dsistema nervoso central; ^esistema nervoso autônomo. Fonte: adaptado de Brito (1994).

2.3.3.2 Dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos

Uma hora após a última administração de cetamina, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação. Foram coletadas as seguintes estruturas cerebrais: hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal, corpo estriado e cerebelo. A coleta das estruturas e o processamento das amostras foram realizados como descrito no Capítulo 1, item 1.3.2.6.

As análises foram realizadas por HPLC-ED no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia da FMVZ/USP, no mesmo equipamento descrito no Capítulo 1, item 1.3.2.6. A fase móvel utilizada foi um sistema isocrático formado por tampão citrato 0,02 M, metanol 92:8 (v/v), 0,12 nM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) sódico e 0,0556% de ácido 1-heptanosulfônico (HSA). O pH foi ajustado para 3,0 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 ml/min. O detector foi mantido com um potencial de 0,8 V no eletrodo de trabalho.

As soluções padrões das monoaminas foram preparadas utilizando a concentração de 1 nM de cada neurotransmissor e seus metabólitos diluídos em ácido perclórico 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 de 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 foi de 0,25 e 1 ng para todos os analitos, o limite de quantificação foi de 10 ng/g de tecido cerebral ou 1,0 ng por 60 ng de sobrenadantes e a taxa de recuperação foi superior a 80%.

2.3.3.3 Avaliação hematológica

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para coleta de sangue para análise do hemograma completo. O sangue foi coletado em um tubo com anticoagulante EDTA e a análise foi realizada usando o sistema Mindray BC-2800 VET. Os parâmetros analisados foram níveis de glóbulos brancos, linfócitos, monócitos, granulócitos, glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e plaquetas.

2.3.3.4 Avaliação bioquímica

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para coleta de sangue para análise da bioquímica sérica, como descrito por Zaccarelli-Magalhães et al. (2018). O sangue foi coletado em tubo sem anticoagulante e mantido a 25°C por 30 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 4.000 rpm (centrífuga

Eppendorf®-5804 R) à 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação, o soro foi coletado e armazenado em freezer -80°C para análise posterior. Os parâmetros analisados foram os níveis de albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato transaminase (AST), fosfatase alcalina (FAL), gama glutamil transpeptidase (GGT), proteína total, colesterol total, glicose, lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos, creatinina e ureia. A análise foi realizada em equipamento ChemWell®-T (Intertek), utilizando os *kits* comerciais da mesma marca, seguindo as instruções do fabricante.

2.3.4 Delineamento experimental

Trinta e dois ratos foram subdivididos em quatro grupos: um controle que recebeu solução salina e três experimentais que receberam diferentes doses de cetamina (5, 10 ou 20 mg/kg), como descrito no Quadro 2.2. Todos os tratamentos foram realizados diariamente por via intraperitoneal por 21 dias (n=8 animais/grupo). Antes do início do tratamento, todos os ratos foram pesados e distribuídos aleatoriamente em cada grupo. Durante os 21 dias de tratamento, foi feita a avaliação semanal do peso corporal, consumo de água e ração, e o teste FOB. Após a última administração de cetamina ou solução salina, os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta de diferentes estruturas cerebrais e sangue para análises neuroquímica, hematológica e bioquímica.

Quadro 2.2 – Divisão dos grupos experimentais.

Grupos	Descrição do tratamento
Controle	Solução salina (NaCl) 0,9%
Ceta 5	Cetamina 5 mg/kg
Ceta 10	Cetamina 10 mg/kg
Ceta 20	Cetamina 20 mg/kg

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

São apresentados, a seguir, os resultados obtidos.

2.4.1 Efeitos da administração prolongada de cetamina no ganho de peso e no consumo de água e ração

A Figura 2.4 mostra os resultados do acompanhamento do ganho de peso e do consumo de água e ração semanal de ratos tratados com cetamina por três semanas. Em relação ao ganho de peso, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou que há diferenças significantes entre os grupos quanto o tratamento ($F(3,28)=4,391$, $p<0,05$) e o tempo ($F(2,56)=19,21$, $p<0,001$), sem interação entre os fatores ($F(6,56)=2,013$, $p>0,05$). O pós-teste de Bonferroni mostrou que os animais do grupo Ceta 20 ganharam menos peso nas duas primeiras semanas de tratamento em comparação aos animais do grupo salina ($p<0,05$).

Em relação ao consumo de água semanal, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou que não houve diferenças significantes entre os grupos quanto ao tratamento ($F(3,28)=0,9276$, $p>0,05$), mas apontou diferenças quanto ao tempo ($F(2,56)=11,65$, $p<0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(6,56)=1,274$, $p>0,05$). Em relação ao consumo de ração semanal, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou que não houve diferenças significantes entre os grupos quanto ao tratamento ($F(3,28)=0,08993$, $p>0,05$), mas apontou diferenças quanto ao tempo ($F(2,56)=8,762$, $p<0,001$), sem interação entre os fatores ($F(6,56)=0,7320$, $p>0,05$).

Figure 2.4 – Avaliação do ganho de peso e do consumo de água e de ração de ratos tratados com cetamina (5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentados as médias e seus respectivos erros padrão. N=8 animais/grupo.

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

2.4.2 Efeitos da administração prolongada de cetamina na bateria de observação funcional (FOB)

A Tabela 2.1 mostra os resultados da bateria de observação funcional (FOB) de ratos tratados com cetamina por três semanas. Em relação à atividade geral, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não mostrou diferenças significantes entre os grupos no tratamento ($F(3,28)=2,854$, $p > 0,05$), mas mostrou diferenças no tempo ($F(3,84)=6,174$, $p < 0,001$), sem interação entre os fatores ($F(9,84)=0,7306$, $p > 0,05$).

Em relação aos parâmetros psicomotores (trem posterior, reflexo de endireitamento postural e força de agarrar), só foi possível realizar a análise estatística no parâmetro força de agarrar. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não mostrou diferenças significantes entre os grupos no tratamento ($F(3,28)=0,8567$, $p > 0,05$), mas mostrou diferenças no tempo ($F(3,84)=3,442$, $p < 0,05$), sem interação entre os fatores ($F(9,84)=0,5204$, $p > 0,05$).

Em relação aos parâmetros sensoriais, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não mostrou diferenças significantes devido ao tratamento com cetamina em nenhum dos parâmetros testados [reflexo auricular ($F(3,28)=0,3426$, $p > 0,05$); aperto da cauda ($F(3,28)=0,6585$, $p > 0,05$), reflexo corneal ($F(3,28)=1,930$, $p > 0,05$); resposta ao toque ($F(3,28)=0,3126$, $p > 0,05$)], mas mostrou diferenças significativas no tempo no aperto da cauda e resposta ao toque [reflexo auricular ($F(3,84)=1,492$,

$p > 0,05$); aperto da cauda ($F(3,84)=9,250$, $p < 0,0001$), reflexo corneal ($F(3,84)=2,086$, $p > 0,05$); resposta ao toque ($F(3,84)=3,263$, $p < 0,05$)], com interação no reflexo auricular [reflexo auricular ($F(9,84)=2,399$, $p < 0,05$); aperto da cauda ($F(9,84)=1,334$, $p > 0,05$), reflexo corneal ($F(9,84)=1,007$, $p > 0,05$) e resposta ao toque ($F(9,84)=0,3488$, $p > 0,05$)].

Os demais parâmetros avaliados apresentaram escores iguais entre todos os grupos; portanto, não foi possível realizar análises estatísticas.

Tabela 2.1 – Avaliação da bateria de observação funcional (FOB) de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as medianas e seus respectivos limites. N=6 animais/grupo.

Parâmetro	Dia	Grupos				Parâmetro	Dia	Grupo			
		Salina	Ceta 5	Ceta 10	Ceta 20			Salina	Ceta 5	Ceta 10	Ceta 20
Atividade Geral	1	3 (2-4)	4 (2-4)	4 (4-4)	3 (1-4)	Frêmito Vocal	1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	7	2 (1-4)	3 (1-4)	3 (2-4)	3 (2-4)		7	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	14	3 (1-4)	2 (0-4)	4 (1-4)	2 (1-4)		14	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	21	2 (1-4)	2 (1-3)	3 (1-4)	2 (2-4)		21	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Irritabilidade	1	4 (0-4)	4 (0-4)	4 (0-4)	4 (0-4)	Reflexo Auricular	1	1 (0-3)	1 (1-3)	1 (0-3)	2 (0-2)
	7	4 (0-4)	4 (0-4)	4 (0-4)	4 (0-4)		7	2 (1-3)	2 (1-3)	1 (0-2)	1 (0-2)
	14	4 (0-4)	4 (0-4)	4 (0-4)	4 (0-4)		14	1 (1-3)	1 (1-2)	1 (0-3)	2 (1-3)
	21	4 (0-4)	4 (0-4)	4 (4-4)	0 (0-4)		21	2 (0-3)	2 (0-2)	1 (0-3)	1 (1-3)
Aperto de Cauda	1	3 (1-3)	2 (2-4)	2 (1-3)	2 (2-3)	Reflexo Corneal	1	2 (0-4)	2 (0-3)	1 (0-1)	1 (0-3)
	7	3 (1-3)	1 (1-3)	3 (1-3)	3 (2-3)		7	2 (1-3)	1 (0-1)	1 (1-2)	1 (0-2)
	14	2 (1-3)	2 (0-2)	1 (1-3)	2 (1-3)		14	1 (0-2)	1 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)
	21	1 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-3)	2 (1-3)		21	2 (1-2)	0 (0-0)	1 (0-2)	0 (0-2)

(Continuação).

Parâmetro	Dia	Grupos				Parâmetro	Dia	Grupo			
		Salina	Ceta 5	Ceta 10	Ceta 20			Salina	Ceta 5	Ceta 10	Ceta 20
Resposta ao Toque	1	3 (2-4)	4 (0-4)	3 (1-4)	3 (1-4)	Contorção	1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	7	1 (0-4)	2 (0-4)	1 (0-3)	1 (0-3)		7	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	14	2 (1-4)	2 (0-3)	1 (0-4)	2 (0-4)		14	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	21	1 (0-3)	2 (0-3)	1 (0-4)	3 (0-4)		21	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Trem Posterior	1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	Reflexo de Endireitamento	1	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)
	7	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		7	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)
	14	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		14	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)
	21	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		21	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)
Tônus Corporal	1	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)	Força de Agarrar	1	2 (1-4)	3 (1-4)	3 (1-4)	2 (1-4)
	7	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)		7	3 (1-4)	3 (1-4)	2 (1-4)	2 (0-3)
	14	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)		14	4 (1-4)	3 (1-4)	1 (1-3)	1 (0-3)
	21	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)	4 (4-4)		21	2 (1-2)	1 (1-4)	1 (1-3)	1 (0-4)
Tremores	1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	Convulsões	1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	7	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		7	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	14	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		14	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	21	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		21	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

(Continuação).

Parâmetro	Dia	Grupos				Parâmetro	Dia	Grupo			
		Salina	Ceta 5	Ceta 10	Ceta 20			Salina	Ceta 5	Ceta 10	Ceta 20
Cauda de Straub	1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	Sedação	1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	7	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		7	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	14	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		14	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	21	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		21	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Anestesia	1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	Ataxia	1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	7	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		7	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	14	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		14	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	21	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		21	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Ptose	1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	Lacrimação	1	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	7	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		7	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	14	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		14	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
	21	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)		21	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

p>0,05, ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni.

2.4.3 Efeitos da administração prolongada de cetamina nos níveis de neurotransmissores cerebrais e seus metabólitos

As Figuras 2.5 a 2.19 mostram os resultados da avaliação neuroquímica de diferentes estruturas cerebrais de ratos tratados com cetamina por três semanas. Em relação ao hipotálamo, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes nos parâmetros NOR ($F(3,20)=1,307$, $p>0,05$), VMA/NOR ($F(3,20)=1,422$, $p>0,05$), MHPG/NOR ($F(3,20)=1,313$, $p>0,05$), DA ($F(3,20)=3,159$, $p>0,05$), DOPAC ($F(3,20)=1,347$, $p>0,05$), DOPAC/DA ($F(3,20)=0,1762$, $p>0,05$), HVA/DA ($F(3,20)=1,866$, $p>0,05$), 5HT ($F(3,20)=0,2904$, $p>0,05$), 5HIAA ($F(3,20)=0,2267$, $p>0,05$), mas apontou diferenças significantes nos níveis de VMA ($F(3,20)=4,447$, $p<0,05$), MHPG ($F(3,20)=4,712$, $p<0,05$) e HVA ($F(3,20)=4,551$, $p<0,05$), bem como no *turnover* de 5HIAA/5HT ($F(3,20)=3,791$, $p<0,05$). O teste de Dunnett mostrou que os ratos tratados com as doses de 5 e 20 mg/kg tiveram aumento de VMA e MHPG ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente) e apenas os ratos tratados com a dose de 5 mg/kg tiveram aumento de HVA ($p<0,05$), enquanto os animais tratados com 5 e 10 mg/kg de cetamina apresentaram diminuição na taxa de *turnover* 5HIAA/5HT ($p<0,05$ para os dois grupos) quando comparados com os animais salina – Figura 2.5 a 2.7.

Figura 2.5 – Avaliação do sistema noradrenérgico do hipotálamo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Figura 2.6 – Avaliação do sistema dopaminérgico do hipotálamo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

* $p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Figura 2.7 – Avaliação do sistema serotoninérgico do hipotálamo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

* $p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Em relação ao hipocampo, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes nos parâmetros NOR ($F(3,20)=0,3793$, $p > 0,05$), VMA ($F(3,20)=0,2567$, $p > 0,05$), VMA/NOR ($F(3,20)=0,4201$, $p > 0,05$), MHPG ($F(3,20)=0,6669$, $p > 0,05$), MHPG/NOR ($F(3,20)=0,4462$, $p > 0,05$), DA ($F(3,20)=2,002$, $p > 0,05$), DOPAC ($F(3,20)=1,683$, $p > 0,05$), HVA ($F(3,20)=0,8406$, $p > 0,05$), HVA/DA ($F(3,20)=1,303$, $p > 0,05$) e 5HT ($F(3,20)=2,425$, $p > 0,05$), mas apontou diferenças significantes nos níveis de 5HIAA ($F(3,20)=3,956$, $p < 0,05$) e nas taxas de *turnover* DOPAC/DA ($F(3,20)=6,716$, $p < 0,01$) e 5HIAA/5HT ($F(3,20)=4,187$, $p < 0,05$). O pós-teste de Dunnett apontou que os ratos tratados com 5 e 10 mg/kg de cetamina tiveram diminuição nos níveis de 5HIAA ($p < 0,05$ para ambos os grupos) e aumento na taxa de *turnover* DOPAC/DA ($p < 0,05$ para ambos os grupos), enquanto apenas os ratos tratados com 10 mg/kg de cetamina apresentaram diminuição na taxa de *turnover* 5HIAA/5HT ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo salina – Figura 2.8 a 2.10.

Figura 2.8 – Avaliação do sistema noradrenérgico do hipocampo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Figura 2.9 – Avaliação do sistema dopaminérgico do hipocampo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

* $p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Figura 2.10 – Avaliação do sistema serotoninérgico do hipocampo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

* $p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Em relação ao córtex pré-frontal, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes nos parâmetros VMA ($F(3,20)=1,986$, $p > 0,05$), MHPG ($F(3,20)=0,2311$, $p > 0,05$), MHPG/NOR ($F(3,20)=0,6694$, $p > 0,05$), DA ($F(3,20)=0,7737$, $p > 0,05$), DOPAC ($F(3,20)=1,242$, $p > 0,05$), DOPAC/DA ($F(3,20)=0,7192$, $p > 0,05$), HVA ($F(3,19)=0,6321$, $p > 0,05$), HVA/DA ($F(3,20)=3,119$, $p > 0,05$), 5HT ($F(3,20)=0,7629$, $p > 0,05$), 5HIAA ($F(3,20)=1,187$, $p > 0,05$) e 5HIAA/5HT ($F(3,20)=1,268$, $p > 0,05$), mas apontou diferenças nos níveis de NOR ($F(3,20)=28,76$, $p > 0,05$) e na taxa de *turnover* VMA/NOR ($F(3,20)=4,925$, $p > 0,05$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais dos grupos Ceta 10 e Ceta 20 apresentaram diminuição nos níveis de NOR ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Já em relação ao *turnover* VMA/NOR, o pós-teste de Dunnett não mostrou diferenças significantes entre os grupos – Figura 2.11 a 2.13.

Figura 2.11 – Avaliação do sistema noradrenérgico do córtex pré-frontal de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

***p<0,001, ****p<0,0001, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Figura 2.12 – Avaliação do sistema dopaminérgico do córtex pré-frontal de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

p>0,05, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Figura 2.13 – Avaliação do sistema serotoninérgico do córtex pré-frontal de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Em relação ao corpo estriado, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes nos parâmetros NOR ($F(3,19)=2,363$, $p > 0,05$), VMA ($F(3,19)=1,080$, $p > 0,05$), VMA/NOR ($F(3,19)=0,9170$, $p > 0,05$), MHPG/NOR ($F(3,19)=1,713$, $p > 0,05$), DA ($F(3,19)=0,1972$, $p > 0,05$), DOPAC ($F(3,19)=0,9804$, $p > 0,05$), DOPAC/DA ($F(3,19)=1,804$, $p > 0,05$), HVA ($F(3,19)=0,3701$, $p > 0,05$), HVA/DA ($F(3,19)=1,238$, $p > 0,05$) e 5HT ($F(3,19)=1,682$, $p > 0,05$), mas apontou diferenças nos níveis de MHPG ($F(3,19)=8.636$, $p < 0,001$), 5HIAA ($F(3,19)=1.915$, $p < 0,05$) e na taxa de *turnover* de 5HIAA/5HT ($F(3,19)=3.182$, $p < 0,05$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais dos grupos Ceta 10 e Ceta 20 apresentaram aumento nos níveis de MHPG ($p < 0,01$ para ambos os grupos), enquanto os animais do grupo Ceta 5 apresentaram diminuição nos níveis de 5HIAA ($p < 0,05$). Os ratos tratados com 5 e 20 mg/kg de cetamina tiveram diminuição na taxa de *turnover* de 5HIAA/5HT ($p < 0,05$ para os dois grupos) quando comparados com os animais salina – Figura 2.14 a 2.16.

Figura 2.14 – Avaliação do sistema noradrenérgico do corpo estriado de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

** $p < 0,01$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Figura 2.15 – Avaliação do sistema dopaminérgico do corpo estriado de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Figura 2.16 – Avaliação do sistema serotoninérgico do corpo estriado de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

* $p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Em relação ao cerebelo, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes em nenhum dos parâmetros analisados NOR ($F(3,19)=1,450$, $p > 0,05$), VMA ($F(3,19)=0,9233$, $p > 0,05$), VMA/NOR ($F(3,19)=0,01746$, $p > 0,05$), MHPG ($F(3,19)=1,814$, $p > 0,05$), MHPG/NOR ($F(3,19)=0,4384$, $p > 0,05$), DA ($F(3,19)=1,331$, $p > 0,05$), DOPAC ($F(3,19)=1,157$, $p > 0,05$), DOPAC/DA ($F(3,19)=2,163$, $p > 0,05$), HVA ($F(3,19)=0,3061$, $p > 0,05$), HVA/DA ($F(3,19)=0,3833$, $p > 0,05$), 5HT ($F(3,19)=0,7157$, $p > 0,05$), 5HIAA ($F(3,19)=0,7874$, $p > 0,05$) e 5HIAA/5HT ($F(3,19)=1,377$, $p > 0,05$) – Figura 2.17 a 2.19.

Figura 2.17 – Avaliação do sistema noradrenérgico do cerebelo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Figura 2.18 – Avaliação do sistema dopaminérgico do cerebelo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

Figura 2.19 – Avaliação do sistema serotoninérgico do cerebelo de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as médias e seus erros padrão. N=6 animais/grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

2.4.4 Efeitos da administração prolongada de cetamina nos parâmetros hematológicos

A Figura 2.20 mostra os resultados da avaliação hematológica de ratos tratados com cetamina por três semanas. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: glóbulos brancos ($F(3,28)=0,7752$, $p > 0,05$), linfócitos ($F(3,28)=0,7240$, $p > 0,05$), monócitos ($F(3,28)=1,333$, $p > 0,05$), granulócitos ($F(3,28)=0,8383$, $p > 0,05$), glóbulos vermelhos ($F(3,28)=1,019$, $p > 0,05$), hemoglobina ($F(3,28)=1,337$, $p > 0,05$), hematócrito ($F(3,28)=1,048$, $p > 0,05$), volume corpuscular médio ($F(3,28)=0,5863$, $p > 0,05$), hemoglobina corpuscular média ($F(3,28)=0,1252$, $p > 0,05$) e plaquetas ($F(3,28)=1,003$, $p > 0,05$).

Figura 2.20 – Avaliação hematológica de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as medianas e seus respectivos limites. N=6 animais/grupo.

p>0,05, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

2.4.5 Efeitos da administração prolongada de cetamina nos parâmetros bioquímicos séricos

A Figura 2.21 mostra os resultados dos parâmetros avaliados na análise da bioquímica sérica de ratos tratados com cetamina por três semanas. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: albumina ($F(3,28)=0,3893$, $p>0,05$), ALT ($F(3,28)=0,3212$, $p>0,05$), AST ($F(3,28)=0,1508$, $p>0,05$), FAL ($F(3,28)=0,3821$, $p>0,05$), GGT ($F(3,28)=0,4023$, $p>0,05$), proteína total ($F(3,28)=0,3262$, $p>0,05$), colesterol total ($F(3,28)=0,3381$, $p>0,05$), glicose ($F(3,28)=0,3851$, $p>0,05$), HDL ($F(3,28)=0,1066$, $p>0,05$), triglicérides ($F(3,28)=1,263$, $p>0,05$), creatinina ($F(3,28)=0,4390$, $p>0,05$) e ureia ($F(3,28)=0,1902$, $p>0,05$).

Figura 2.21 – Avaliação bioquímica sérica de ratos tratados com cetamina (Ceta – 5, 10 ou 20 mg/kg) ou solução salina (controle) por via intraperitoneal diariamente por 3 semanas. São apresentadas as medianas e seus respectivos limites. N=6 animais/grupo.

$p > 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do teste de Dunnett.

2.5 DISCUSSÃO

A depressão é uma doença multifatorial que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e abrange todas as faixas etárias. Ela possui prevalência mais alta em mulheres e se tornou um grave problema socioeconômico (STRASBURGER et al., 2017; WHO, 2017). Muitos indivíduos que sofrem de depressão não conseguem seguir o tratamento até o final ou não respondem de maneira eficaz ao tratamento farmacológico disponível (ZAJECKA, 2000; BROWNE; LUCKI, 2013; DREWNIANY et al., 2015; LANDRIGAN et al., 2018). Com base nesses fatores, há necessidade urgente do desenvolvimento de novos medicamentos e/ou do reposicionamento dos medicamentos já existentes para o tratamento dessa doença. O presente estudo teve como objetivo realizar a avaliação fármaco-toxicológica do tratamento prolongado com cetamina, medicamento sendo considerado como tendo potenciais efeitos antidepressivos.

Apesar de a depressão ser mais prevalente em mulheres, optamos por avaliar os efeitos da cetamina em ratos machos adultos, por ser um modelo animal padrão com perfil hormonal constante e estável. As fêmeas de roedores, por outro lado, possuem ciclo estral de 4-5 dias, processo este que envolve ondas transitórias de liberação de hormônios esteroides sexuais endógenos (estradiol e progesterona), que, por sua vez, influenciam muitos aspectos comportamentais e introduzem variáveis inexequíveis para os estágios iniciais de testes de drogas (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015; DOMONKOS, et al., 2017). No entanto, estudos recentes sugeriram que os efeitos da cetamina são influenciados pelo sexo. McDougall e colaboradores (2019) mostraram aumento na locomoção de ratos machos associados a níveis moderados de cetamina no estriado dorsal, enquanto as fêmeas apresentaram diminuição na locomoção associada a altas concentrações de cetamina. Zanos et al. (2016) mostraram que a cetamina possui maior ação antidepressiva em camundongos fêmeas do que machos no teste de nado forçado. Estudos apontam que mulheres também apresentaram níveis equivalentes de cetamina no cérebro, mas exibiram níveis mais altos do metabólito (2S,6S;2R,6R)-HNK quando comparados com homens (ZARATE et al., 2012). Desse modo, novos estudos devem ser realizados a fim de avaliar os efeitos do tratamento prolongado de cetamina em fêmeas.

Neste estudo foi realizado um tratamento a longo-prazo que consistiu na administração de uma das três diferentes doses de cetamina (5, 10 ou 20 mg/kg) em ratos por um período de 21 dias. Efeitos antidepressivos da cetamina foram observados em doses subanestésicas variando de 10 a 50 mg/kg (BROWNE; LUCKI, 2013). As doses escolhidas foram baseadas em trabalhos anteriores que mostraram efeito antidepressivo da cetamina em ratos, caracterizado pela redução no tempo de imobilidade no teste de nado forçado (GARCIA et al., 2008; TIZABI et al., 2012; PARISE et al., 2013; JIANG et al., 2017). Foi escolhida a via de administração intraperitoneal, uma vez que a literatura indica que esta é a via preferencial para a utilização da cetamina como anestésico de uso veterinário em roedores.

A ação da cetamina no sistema serotoninérgico está associada aos seus efeitos analgésicos (MARTIN; SMITH, 1982). Em contrapartida, o efeito como anestésico dissociativo ocorre devido ao papel da cetamina como antagonista do receptor glutamatérgico NMDA (ZANOS et al., 2018). Embora o efeito dissociativo seja o principal objetivo do uso da cetamina, esse fármaco também causa efeitos psicotomiméticos e simpatomiméticos (NISHIMURA et al., 1998). Os efeitos psicotomiméticos se referem à capacidade desse fármaco em desencadear confusão, delírio e alucinações, de forma semelhante a outros anestésicos, como os opióides (WHITE; ROTH, 2012). Como mencionado anteriormente, a cetamina é capaz de interagir com múltiplos receptores, o que amplia seu potencial terapêutico (LI; VLISIDES, 2016).

Nossos resultados indicam que a cetamina se comporta de forma semelhante a outros antidepressivos, como a fluoxetina, promovendo baixo ganho de peso nas primeiras semanas de tratamento e, após esse período, devido à ocorrência de neuroadaptação, o ganho de peso se torna igual ao do grupo controle (ARTEBURN et al., 2016). Arteburn et al. (2016) avaliaram o ganho de peso em pacientes depressivos que se submeteram ao tratamento monoterápico com antidepressivos e observaram que a bupropiona é o único antidepressivo associado a perda de peso a longo-prazo.

No presente trabalho o ganho de peso, bem como o consumo de água e ração foram monitorados durante todo o procedimento experimental. Os resultados mostraram que os ratos tratados com 20 mg/kg de cetamina tiveram menor ganho

de peso na primeira e na segunda semana de tratamento. Na terceira semana, no entanto, o ganho de peso foi semelhante aos demais grupos. O consumo médio de água e ração não apresentou diferenças entre os grupos tratados e controle. Nossos resultados são semelhantes aos de estudos prévios que mostraram que a administração intravenosa em ratos de 2,5, 5 ou 10 mg/kg de cetamina por 6 semanas provocou leve, mas não significativa, diminuição no consumo de ração, e redução moderada no ganho de peso (EMEA, 1997).

Além do ganho de peso e do consumo de água e ração, também foi realizado o teste FOB como uma medida de toxicidade aguda. O FOB é uma bateria de testes comportamentais simples, utilizado para identificar se uma substância e/ou seus metabólitos exercem efeitos no sistema nervoso (GAUVIN et al., 2015). Esse teste é usado como avaliação preliminar de efeitos neurotóxicos de substâncias químicas e para o estabelecimento da faixa de doses utilizadas para os ensaios subsequentes (MATHIASSEN; MOSER, 2018). Nossos resultados indicaram que a cetamina não possui efeitos neurotóxicos nas doses utilizadas.

Em relação aos efeitos antidepressivos da cetamina, diversos estudos destacam a importância do sistema glutamatérgico (DREWNIAK et al., 2015); contudo, o mecanismo de ação ainda não está claro. Estudos prévios mostraram que doses sub-anestésicas de cetamina ativam de forma transitória a neurotransmissão do glutamato, em vez de inibi-la (MOGHADDAM et al., 1997). Uma vez que a depressão é uma doença que engloba uma gama grande de sintomas, é possível supor o envolvimento de mais de um sistema de neurotransmissão nos efeitos antidepressivos da cetamina.

Os comportamentos tipo-depressivos estão diretamente associados com alterações sinápticas no córtex pré-frontal e no núcleo accumbens. Foi proposto que hipoconectividade sináptica do córtex pré-frontal e do hipocampo, bem como a hiperconectividade do núcleo accumbens, sejam duas vias que contribuam de forma independente para o quadro de depressão clínica (ABDALLAH et al., 2017). Há preocupações de que a administração diária frequente de cetamina ou a ativação crônica de glutamato possam levar a excitotoxicidade e à desconexão sináptica (ABDALLAH et al., 2018). Nesse contexto, foi realizada a avaliação neuroquímica dos sistemas monoaminérgicos em diferentes regiões cerebrais, a fim de investigar os efeitos da cetamina nessas vias com papéis ainda não totalmente elucidado na

literatura e que potencialmente colaboram com os efeitos antidepressivos desse fármaco.

Nossos achados envolvendo o sistema noradrenérgico mostram que, apesar de haver aumento nos níveis de VMA e MHPG no hipotálamo e no corpo estriado, não houve mudanças nos níveis de noradrenalina e nas taxas de *turnover*. Em relação ao sistema dopaminérgico, não foram observadas alterações entre os grupos.

Em relação ao sistema serotoninérgico, estudos mostraram que fármacos, como a fluoxetina, imipramina e cetamina aumentam a fosforilação de proteínas responsáveis pela modulação dos receptores serotoninérgicos (GRIECO et al., 2017; VIANA et al., 2018). Grieco et al. (2017) mostraram que a administração de 10 mg/kg de cetamina em camundongos levou ao aumento da expressão gênica do receptor 5HT do tipo 2 especialmente no hipocampo. Quando a cetamina foi administrada concomitantemente com um antagonista desse receptor, seus efeitos foram reduzidos. Além dos efeitos nos receptores serotoninérgicos, a cetamina também atua no transporte de serotonina. Estudos demonstraram que a cetamina altera a atividade dos transportadores de serotonina, o que faz com que haja menos recaptação de serotonina no neurônio pré-sináptico e mais serotonina livre na fenda sináptica (MARTIN; INTRONA; ARONSTAM, 1990; ZHAO; SUN, 2008; YAMAMOTO et al., 2013).

No presente estudo, foi observada diminuição nos níveis de metabólito e nas taxas de *turnover* de 5HT, corroborando com os estudos mencionados anteriormente. Contudo não foi observado aumento nos níveis de serotonina, fato este que pode ser atribuído a uma alta quantidade desse neurotransmissor na fenda sináptica. Estudos biomoleculares futuros são necessários para esclarecer os efeitos da cetamina no sistema serotoninérgico.

As avaliações neuroquímicas do córtex pré-frontal e do cerebelo não mostraram alterações nos sistemas monoaminérgicos. A cetamina atua primariamente em regiões subcorticais, o que pode ser a razão pela qual não foram encontradas diferenças na avaliação neuroquímica no córtex pré-frontal. Além disso, esse fármaco não causa depressão respiratória, o que pode explicar a falta de modulação no cerebelo (LI; VLISIDES, 2016).

A avaliação hematológica foi realizada com o objetivo de investigar possíveis efeitos tóxicos da administração prolongada de cetamina no sistema hematopoiético. As células sanguíneas são muito sensíveis à ação de agentes tóxicos e podem sofrer mudanças devido à exposição a fatores exógenos. Desse modo, a mensuração dos níveis de células sanguíneas foi utilizada como diagnóstico fisiológico e de anormalidades patológicas (MUKINDA; SYCE, 2007; LIANG et al., 2017). Nossos resultados mostraram que a cetamina não causou efeito nas células sanguíneas circulantes de ratos tratados por período prolongado.

A cetamina é biotransformada no fígado pelo sistema citocromo P450, que, sucintamente, é convertida em norcetamina, um metabólito ativo, que é posteriormente excretado na urina e na bile (CHANG; GLAZKO, 1974; DAHAN et al., 2011). Considerando as vias de biotransformação, no presente estudo avaliou-se os perfis hepático, renal e lipídico, a fim de investigar possíveis efeitos tóxicos da cetamina no processo de biotransformação. Os resultados mostraram que não houve mudanças em nenhum dos parâmetros analisados, indicando que a cetamina não possui efeito tóxico no metabolismo hepático, renal ou lipídico.

Finalizando, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos tóxicos do tratamento prolongado com cetamina, utilizando três doses diferentes em ratos machos adultos. Os resultados mostraram alterações no ganho de peso e no sistema serotoninérgico. Entretanto, as avaliações hematológicas e bioquímicas não mostraram alterações significantes. Em conjunto, esses dados indicam que as alterações observadas são pequenas e podem ser explicadas pelo mecanismo de ação da cetamina. Em conclusão, a cetamina é um promissor candidato para ter seu uso reposicionado como antidepressivo, porém mais estudos são necessários, a fim de avaliar os efeitos antidepressivos em modelos animais empregados para o estudo da depressão, que devem conduzir a subsequentes estudos clínicos.

2.6 CONCLUSÃO

O tratamento prolongado com doses subanestésicas de cetamina em ratos machos adultos:

- Diminuiu o ganho de peso dos animais nas primeiras semanas de tratamento;
- Não interferiu no consumo semanal de água e ração;
- Não causou déficits funcionais evidenciados no FOB;
- Aumentou a atividade do sistema serotoninérgico;
- Não interferiu em parâmetros hemotológicos;
- Não alterou a bioquímica sérica.

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, n.8, p.689–697, 2016.

ABDALLAH, C.G.; JACKOWSKI, A.; SALAS, R.; GUPTA, S.; SATO, J.R.; MAO, X.; COPLA, J.D.; SHUNGU, D.C.; MATHEW, S.J. The nucleus accumbens and ketamine treatment in major depressive disorder. **Neuropsychopharmacology**, v.42, n.8, p.1739-1746, 2017.

ABDALLAH, C.G.; SANACORA, G.; DUMAN, R.S.; KRYSTAL, J.H. The neurobiology of depression, ketamine and rapid-acting antidepressants: Is it glutamate inhibition or activation? **Pharmacology & Therapeutics**, v.190, p.148-158, 2018.

ADAMOWICZ, P.; KALA, M. Urinary excretion rates of ketamine and norketamine following therapeutic ketamine administration: method and detection window considerations. **Journal of Analytical Toxicology**, v.29, n.5, p.376–382, 2005.

ADAMS, J.D.; BAILLIE, T.A.; TREVOR, A.J.; CASTAGNOLI, N. Studies on the biotransformation of ketamine: 1-Identification of metabolites produced in vitro from rat liver microsomal preparations. **Biomedical Mass Spectrometry**, v.8, n.11, p.527–538, 1981.

ADAMS, J.D.; CASTAGNOLI, N.; TREVOR, A.J. Quantitative analysis of ketamine enantiomers. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v.21, p.471–472, 1978.

ARTERBURN, D.; SOFER, T.; BOUDREAU, D.M.; BOGART, A.; WESTBROOK, E.O.; THEIS, M.K.; SIMON, G.; HANEUSE, S. Long-Term weight change after initiating second-generation antidepressants. **Journal of Clinical Medicine**, v.5, n.4, p.1-13, 2016.

BERGMAN, S.A. Ketamine: review of its pharmacology and its use in pediatric anesthesia. **Anesthesia Progress**, v.46, n.1, p.10-12, 1999.

BHUTTA, A.T. Ketamine: a controversial drug for neonates. **Seminars in Perinatology**, v.31, n.5, p.303-308, 2007.

BOWEN, W.D.; HELLEWELL, S.B.; MCGARRY, K.A. Evidence for a multi-site model of the rat brain sigma receptor. **European Journal of Pharmacology**, v.163, n.2-3, p.309–318, 1989.

BRITO, A.S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas, UNICAMP, 1994, p.15-21.

BROWNE, C.A.; LUCKI, I. Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants. **Frontiers of Pharmacology**, v.4, n.161, p.1-18, 2013.

CLEMENTS, J.A.; NIMMO, W.S; GRANT, I.S. Bioavailability, pharmacokinetics, and analgesic activity of ketamine in humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.71, n.5, p.539–542, 1982.

CHANG, T.; GLAZKO, A.J. Biotransformation and disposition of ketamine. **International Anesthesiology Clinics**, v.12, n.2, p.157-177, 1974.

CORA, M.C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. **Toxicologic Pathology**, v.43, n.6, p.776-793, 2015.

CORAZZA, O.; ASSI, S.; SCHIFANO, F. From “Special K” to “Special M”: the evolution of the recreational use of ketamine and methoxetamine. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v.19, n.6, p.454–460, 2013.

CRSIP, T.; PERROTTI, J.M., SMITH, D.L.; STAFINSKY, J.L.; SMITH, D.J. The local monoaminergic dependency of spinal ketamine. **European Journal of Pharmacology**, v.194, n.2-3, p.167-172, 1991.

DAHAN, A.; OLOFSEN, E.; SIGTERMANS, M.; NOPPERS, I.; NIESTERS, M.; AARTS, L.; BAUER, M.; SARTON, E. Population pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of ketamine-induced pain relief of chronic pain. **European Journal of Pain**, v.15, n.3, p.258-267, 2011.

DRUG ENFORCEMENT AGENCY (DEA). **Drugs of abuse: a DEA resource guide**. DEA, 2017. p.1-94, 2017.

DE FELICE, L.J. Monoamine transporters as ionotropic receptors. **Trends in Neurosciences**, v.40, n.4, p.195–196, 2017.

DOMONKOS, E.; BORBÉLYOVÁ, V.; CSONGOVÁ, M.; BOSÝ, M.; KAČMÁROVÁ, M.; OSTATNÍKOVÁ, D.; HODOSY, J.; CELEC, P. Sex differences and sex hormones in anxiety-like behavior of aging rats. **Hormones and Behavior**, v.93, p.159-165, 2017.

DREWNIAŃY, 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, n.2, p.125-130, 2015.

DRIESEN, N.R.; MCCARTHY, G.; BHAGWAGAR, Z.; BLOCH, M.H.; CALHOUN, V.D.; D'SOUZA, D.C.; GUEORGUIEVA, R.; HE, G.; LEUNG, H.C.; RAMANI, R.; ANTICEVIC, A.; SUCKOW, R.F.; MORGAN, P.T.; KRYSTAL, J.H. The impact of NMDA receptor blockade on human working memory-related prefrontal function and connectivity. **Neuropsychopharmacology**, v.38, n.13, p.2613–2622, 2013.

DUNDEE, J.W.; KNOX, J.W.; BLACK, G.W.; MOORE, J.; PANDIT, S.K.; BOVILL, J.; CLARKE, R.S.; LOVE, S.H.; ELLIOTT, J.; COPPEL, D.L. Ketamine as an induction agent in anaesthetics. **Lancet**, v.1, n.7661, p.1370-1371, 1970.

EGLIN, R.M. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. **Progress in Medicinal Chemistry**, v.43, p.105–136, 2005.

EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA). **Committee for veterinary medicinal products: Ketamine summary report**. London: EMA, 1997.

GAO, M.; REJAEI, D.; LIU, H. Ketamine use in current clinical practice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.37, n.7, p.865–872, 2016.

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, n.6, p.502–506, 2008.

GAUVIN, D.V.; YODER, J.D.; HOLDSWORTH, D.L.; HARTER, M.L.; MAY, J.R.; COTEY, N.; DALTON, J.A.; BAIRD, T.J. The standardized functional observational

battery: Its intrinsic value remains in the instrument of measure: The rat. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.82, p.90-108, 2016.

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, n.1, p.205-213, 1995.

GRIECO, S.F.; VELMESHEV, D.; MAGISTRI, M.; ELDAR-FINKELMAN, H.; FAGHIHI, M.A.; JOPE, R.S.; BEUREL, E. Ketamine up-regulates a cluster of intronic miRNAs within the serotonin receptor 2C gene by inhibiting glycogen synthase kinase-3. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v.18, n.6, p.445-456, 2017.

HIRLINGER, W.K.; DICK, W. Intramuscular ketamine analgesia in emergency patients. II. Clinical study of traumatized patients. **Anaesthesist**, v.33, n.6, p.272–275, 1984.

HIROTA, K.; LAMBERT, D.G. Ketamine its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. **British Journal of Anesthesia**, v.77, n.4, p.441-444, 1996.

HUSTVEIT, O.; MAURSET, A.; OYE, I. Interaction of the chiral forms of ketamine with opioid, phencyclidine, sigma and muscarinic receptors. **Pharmacology Toxicology**, v.77, n.6, p.355–359, 1995.

IRIFUNE, M.; SATO, T.; KAMATA, Y.; NISHIKAWA, T.; DOHI, T.; KAWAHARA, M. Evidence for GABAA receptor agonistic properties of ketamine: convulsive and anesthetic behavioral models in mice. **Anesthesia & Analgesia**, v.91, n.1, p.230–6, 2000.

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.

JACOB, T.C.; MOSS, S.J.; JURD, R. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. **Nature Reviews Neuroscience**, v.9, n.5, p.331–343, 2008.

JIANG, Y.; WANG, Y.; SUN, X.; LIAN, B.; SUN, H.; WANG, G.; DU, Z.; LI, Q.; SUN, L. Short-and long-term antidepressant effects of ketamine in a rat chronic unpredictable stress model. **Brain and Behavior**, v.7, n.8, p.1-11, 2017.

KAPUR, S.; SEEMAN, P. NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2) receptors-implications for models of schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v.7, n.8, p.837–844, 2002.

KIEFFER, B.L.; GAVÉRIAUX-RUFF, C. Exploring the opioid system by gene knockout. **Progress in Neurobiology**, v.66, n.5, p.285–306, 2002.

KRYSTAL, J.H.; KAPER, L.P.; SEIBYL, J.P.; FREEMAN, G.K.; DELANEY, R.; BREMNER, J.D.; HENINGER, G.R.; BOWERS JR, M.B.; CHARNEY, D.S. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans: psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. **Archives Of General Psychiatry**, v.51, n.3, p.199–214, 1994.

LANDRIGAN, J.; SHAWAF, F.; DWYER, Z.; ABIZAID, A.; HAYLEY, S. Interactive effects of ghrelin and ketamine on forced swimperformance: Implications for novel antidepressant strategies. **Neuroscience Letters**, v.669, p.55-58, 2018.

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

LIANG, J.; CHEN, S.X.; HUANG, S.; WU, Y.Y.; ZHOU, C.J.; JIANG, D.X.; LIANG, C.; YUAN, H.; HOU, S.; LAI, X. Evaluation of toxicity studies of flavonoid fraction of *Lithocarpus polystachyus* Rehd in rodents. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.88, p.283-290, 2017.

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, n.4, p.349-352, 2008.

MALINOVSKY, J.M.; SERVIN, F.; COZIAN, A.; LEPAGE, J.Y.; PINAUD, M. Ketamine and norketamine plasma concentrations after i.v., nasal and rectal administration in children. **British Journal of Anaesthesia**, v.77, n.2, p.203–207, 1996.

MARTIN, D.C.; INTRONA, R.P.; ARONSTAM, R.S. Inhibition of neuronal 5-HT uptake by ketamine, but not halothane, involves disruption of substrate recognition by the transporter. **Neuroscience Letters**, v.112, n.1, p.99-103, 1990.

MARTIN, L.L.; SMITH, D.J. Ketamine inhibits serotonin synthesis and metabolism in vivo. **Neuropharmacology**, v.21, n.2, p.119-125, 1982.

MATHEW, S.J.; MURROUGH, J.W.; ROT, M.; COLLINS, K.A.; REICH, D.L.; CHARNEY, D.S. Riluzole for relapse prevention following intravenous ketamine in treatment-resistant depression: a pilot randomized, placebo-controlled continuation trial. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.13, n.1, p.71–82, 2010.

MATHIASSEN, J.R.; MOSER, V.C. The Irwin test and functional observational battery (FOB) for assessing the effects of compounds on behavior, physiology, and safety pharmacology in rodents. **Current Protocols in Pharmacology**, v.82, n.1, p.1-18, 2018.

MCDUGALL, S.A.; PARK, G.I.; RAMIREZ, G.I.; GOMEZ, V.; ADAME, B.C.; CRAWFORD, C.A. Sex-dependent changes in ketamine-induced locomotor activity and ketamine pharmacokinetics in preweanling, adolescent, and adult rats. **European Neuropsychopharmacology**, v.29, n.6, p.740-755, 2019.

MION, G.; VILLEVIEILLE, T. Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings). **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v.19, n.6, p.370-380, 2013.

MOGHADDAM, B.; ADAMS, B.; VERMA, A.; DALY, D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.8, p.2921-2927, 1997.

MORGAN, C.J.; MOFEEZ, A.; BRANDNER, B.; BROMLEY, L.; CURRAN, H.V. Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers. **Neuropsychopharmacology**, v.29, n.1, p.208–218, 2004.

MUKINDA, J.T.; SYCE, J.A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n.1, p.138-144, 2007.

NISHIMURA, M.; SATO, K.; OKADA, T.; YOSHIYA, I.; SCHLOSS, P.; SHIMADA, S.; TOHYAMA, M. Ketamine inhibits monoamine transporters expressed in human embryonic kidney 293 cells. **Anesthesiology**, v.88, n.3, p.768-774, 1998.

PACHECO, D.F.; ROMERO, T.R.; DUARTE, I.D. Central antinociception induced by ketamine is mediated by endogenous opioids and m- and d-opioid receptors. **Brain Research**, v.1562, p.69–75, 2014.

PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v.14, p.383–400, 2013.

PARISE, E.M.; ALCANTARA, L.F.; WARREN, B.L.; WRIGHT, K.N.; HADAD, R.; SIAL, O.K.; KROECK, K.G.; ÑIGUEZ, S.D.; BOLAÑOS-GUZMÁN, C.A. Repeated ketamine exposure induces an enduring resilient phenotype in adolescent and adult rats. **Biological Psychiatry**, v.74, n.10, p.750-759, 2013.

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, n.9, p.1059–1077, 2016.

PFENNINGER, E.G.; DURIEUX, M.E.; HIMMELSEHER, S. Cognitive impairment after small-dose ketamine isomers in comparison to equianalgesic racemic ketamine in human volunteers. **Anesthesiology**, v.96, n.2, p.357–366, 2002.

ROBSON, M.J.; ELLIOTT, M.; SEMINERIO, M.J.; MATSUMOTO, R.R. Evaluation of sigma (σ) receptors in the antidepressant-like effects of ketamine in vitro and in vivo. **European Neuropsychopharmacology**, v.22, n.4, p.308–317, 2012.

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, n.2, p.123-128, 2002.

ROLAN, P.; LIM, S.; SUNDERLAND, V.; LIU, Y.; MOLNAR, V. The absolute bioavailability of racemic ketamine from a novel sublingual formulation. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.77, n.6, p.1011–1016, 2014.

ROYTBLAT, L.; KOROTKORUCHKO, A.; KATZ, J.; GLAZER, M.; GREENBERG, L.; FISHER, A. Postoperative pain: the effect of low-dose ketamine in addition to general anesthesia. **Anesthesia & Analgesia**, v.77, n.6, p.1161–1165, 1993.

ROYTBLAT, L.; TALMOR, D.; RACHINSKY, M.; GREENBERG, L.; PEKAR, A.; APPELBAUM, A.; GURMAN, G.M.; SHAPIRA, Y.; DUVDENANI, A. Ketamine

attenuates the interleukin-6 response after cardiopulmonary bypass. **Anesthesia & Analgesia**, v.87, n.2, p.266–271, 1998.

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, n.5, p.480–484, 2010.

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**, v.18, n.2, p.227-237, 2010.

SMITH, D.J.; BOUCHAL, R.L.; DE SANCTIS, C.A.; MONROE, P.J.; AMEDRO, J.B.; PERROTTI, J.M.; CRISP, T. Properties of the interaction between ketamine and opiate binding sites in vivo and in vitro. **Neuropharmacology**, v.26, n.9, p.1253-1260, 1987.

STRASBURGER, S.E.; BHIMANI, P.M.; KAABE, J.H.; KRYSIK, J.T.; NANCHANATT, D.L.; NGUYEN, T.N.; POUGH, 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**, v.42, n.2, p.147-154, 2017.

STRAYER, R.J.; NELSON, L.S. Adverse events associated with ketamine for procedural sedation in adults. **American Journal of Emergency Medicine**, v.26, n.9, p.985–1028, 2008.

TIZABI, Y.; BHATTI, B.H.; MANAYE, K.F.; DAS, J.R.; AKINFIRESOYE, L. Antidepressant-like effects of low ketamine dose is associated with increased hippocampal AMPA/NMDA receptor density ratio in female Wistar–Kyoto rats. **Neuroscience**, v.213, p.72-80, 2012.

TRESCOT, A.M.; DATTA, S.; LEE, M.; HANSEN, H. Opioid pharmacology. **Pain Physician**, v.11, p.S133–S153, 2008.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Health effects test guidelines: Neurotoxicity screening battery**. Washington: US EPA; 1998.

VIANA, G.S.B.; XAVIER, C.C.; VALE, E.M.; LOPES, M.J.P.; ALVES, V.J.; COSTA, R.O.; NEVES, K.R.T. The monoaminergic pathways and inhibition of monoamine transporters interfere with the antidepressive-like behavior of ketamine. **IBRO Reports**, v.4, p.7-13, 2018.

VOLLENWEIDER, F.X.; LEENDERS, K.L.; OYE, I.; HELL, D.; ANGST, J. Differential psychopathology and patterns of cerebral glucose utilisation produced by (S)- and (R)-ketamine in healthy volunteers using positron emission tomography (PET). **European Neuropsychopharmacology**, v.7, n.1, p.25–38, 1997.

VYKLICKY, V.; KORINEK, M.; SMEJKALOVA, T.; BALIK, A.; KRAUSOVA, B.; KANIAKOVA, M.; LICHNEROVA, K.; CERNY, J.; KRUSEK, J.; DITTERT, I.; HORAK, M.; VYKLICKY, L. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. **Physiological Research**, v.63, sup.1, p.S191-S203, 2014.

WAN, L.B.; LEVITCH, C.F.; PEREZ, A.M.; BRALLIER, J.W.; IOSIFESCU, D.V.; CHANG, L.C.; FOULKES, A.; MATHEW, S.J.; CHARNEY, D.S.; MURROUGH, J.W. Ketamine safety and tolerability in clinical trials for treatment-resistant depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.76, n.3, p.247–252, 2015.

WANG, J.; MACK, A.L.; COOP, A.; MATSUMOTO, R.R. Novel sigma (σ) receptor agonists produce antidepressant-like effects in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v.17, n.11, p.708–716, 2007.

WEINER, A.L.; VIEIRA, L.; MCKAY, C.A.; BAYER, M.J. Ketamine abusers presenting to the emergency department: a case series. **The Journal of Emergency Medicine**, v.18, n.4, p.447–451, 2000.

WEISMAN, H. Anesthesia for pediatric ophthalmology. **Annals Ophthalmology**, v.3, p.229–232, 1971.

WHITE, K.L.; ROTH, B.L. Psychotomimetic effects of kappa opioid receptor agonists. **Biological Psychiatry**, v.72, n.10, p.797-798, 2012.

WHITE, P.F.; SCHÜTTLER, J.; SHAFER, A.; STANSKI, D.R.; HORAI, Y.; TREVOR, A.J. Comparative pharmacology of the ketamine isomers: studies in volunteers. **British Journal of Anaesthesia**, v.57, n.2, p.197–203, 1985.

WHITE, P.F.; WAY, W.L.; TREVOR, A.J. Ketamine—its pharmacology and therapeutic uses. **Anesthesiology**, v.56, n.2, p.119–136, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Depression and other common mental disorders: Global health estimates**. Geneva: WHO, 2017

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, n.5, p.1167-1174, 2017.

YAMAMOTO, S.; OHBA, H.; NISHIYAMA, S.; HARADA, N.; KAKIUCHI, T.; TSUKADA, H.; DOMINO, E.F. Subanesthetic doses of ketamine transiently decrease serotonin transporter activity: a PET study in conscious monkeys. **Neuropsychopharmacology**, v.38, n.13, p.2666-2674, 2013.

YILMAZ, A.; SCHULZ, D.; AKSOY, A.; CANBEYLI, R. Prolonged effect of an anesthetic dose of ketamine on behavioral despair. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v.71, n.1-2, p.341-344, 2002.

ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; MOREIRA, N.; SANDINI, T.M.; ABREU, G.R.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; RICCI, E.L.; FUKUSHIMA, A.R.; SPINOSA, H.S. Evaluation of prolonged exposure to varenicline in adult rats: haematological, biochemical and anatomopathological studies. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.122, n.3, p.305-309, 2018.

ZAJECKA, J.M. Clinical issues in long-term treatment with antidepressants. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v.61, p.20-25, 2000.

ZANOS, P.; MOADDEL, R.; MORRIS, P.J.; GEORGIU, P.; FISCHER, J.; ELMER, G.I.; ALKONDON, M.; YUAN, P.; PRIBUT, H.J.; SINGH, N.S.; DOSSOU, K.S.S.; FANG, Y.; HUANG, X.P.; MAYO, C.L.; WAINER, I.W.; ALBUQUERQUE, E.X.; THOMPSON, S.M.; THOMAS, C.J.; ZARATE, C.A.; GOULD, T.D. NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. **Nature** v.533, p.481-498, 2016.

ZANOS, P.; MOADDEL, R.; MORRIS, P.J.; RIGGS, L.M.; HIGHLAND, J.N.; GEORGIU, P.; PEREIRA, E.F.R.; ALBUQUERQUE, E.X.; THOMAS, C.J.; ZARATE, C.A.; GOULD, T.D. Ketamine and ketamine metabolite pharmacology: insights into therapeutic mechanisms. **Pharmacological Reviews**, v.70, n.3, p.621-660, 2018.

ZARATE JR, C.A.; BRUTSCHE, N.; LAJE, G.; LUCKENBAUGH, D.A.; VENKATA, S.L.; RAMAMOORTHY, A.; MOADDEL, R.; WAINER, I.W. Relationship of ketamine's

plasma metabolites with response, diagnosis, and side effects in major depression. **Biological Psychiatry**, v.72, n.4, p.331–338, 2012.

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, n.8, p.856–864, 2006.

ZHANG, C.; TANG, W.K.; LIANG, H.J.; UNGVARI, G.S.; LIN, S.K. Other drug use does not impact cognitive impairments in chronic ketamine users. **Drug Alcohol Dependence**, v.186, p.1–8, 2018.

ZHAO, Y.; SUN, L. Antidepressants modulate the in vitro inhibitory effects of propofol and ketamine on norepinephrine and serotonin transporter function. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.15, n.11, p.1264-1269, 2008.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO PROLONGADA DE CETAMINA EM
RATAS INDUZIDAS A DEPRESSÃO PÓS-PARTO PELO MODELO DE
SEPARAÇÃO MATERNA

3.1 INTRODUÇÃO

As primeiras evidências da ação antidepressiva da cetamina foram relatadas em estudos pré-clínicos na década de 1970 que mostraram que esse fármaco exercia efeitos semelhantes aos de antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoamina oxidase em roedores (ZANOS et al., 2018). Esses efeitos foram evidenciados em estudos com camundongos que mostraram que a administração oral de cetamina foi capaz de reverter o estado de hipertemia e prevenir o estado de ptose palpebral, induzidos por reserpina e tetrabenazina, respectivamente, da mesma forma que os antidepressivos clássicos (ZANOS et al., 2018).

Estudos em seres humanos sugerindo efeitos antidepressivos da cetamina foram relatados pela primeira vez em 1973 por Khorramzadeh e Lofty (1973). Eles relataram que a administração intravenosa de doses subanestésicas (0,2 a 1 mg/kg) resultou em resposta emocional que contribuiu com a recuperação de pacientes diagnosticados com diversas doenças psiquiátricas.

Apesar dessas evidências, o primeiro estudo clínico controlado com placebo para avaliar os efeitos antidepressivos da cetamina foi realizado apenas nos anos 2000. Berman e colaboradores (2000) mostraram que a infusão intravenosa de 0,5 mg/kg de cetamina por 40 minutos induziu resposta antidepressiva rápida em pacientes diagnosticados com depressão em relação aos pacientes que receberam placebo. Como consequência, a comunidade científica passou a conduzir diversos estudos para elucidar os efeitos antidepressivos da cetamina e estabelecer esse fármaco para o uso terapêutico com essa finalidade.

A cetamina possui características importantes em relação a sua ação antidepressiva: ela se mostrou eficaz em pacientes resistentes aos tratamentos com antidepressivos clássicos e possui efeito rápido, dentro de poucas horas ou dias, diferente dos antidepressivos clássicos (ZARATE et al., 2006; ENGIN; TREIT; DICKSON, 2009). Assim, cada vez mais a cetamina vem sendo cotada para esse novo uso, sendo considerada como uma nova forma de farmacoterapia para o tratamento de depressão. Isso é chamado de reposicionamento de fármacos, referindo-se ao processo de descoberta de novos usos terapêuticos para fármacos já aprovados para outras indicações clínicas.

3.1.1 Mecanismo de ação antidepressiva

Estudos em modelos animais de depressão associaram alterações no sistema glutamatérgico de neurotransmissão com a expressão do comportamento tipo-depressivo apresentado por esses animais (MAENG et al., 2008). Desse modo, a hipótese glutamatérgica da depressão foi formulada, indicando o glutamato como neurotransmissor importante no desenvolvimento de depressão maior e transtorno bipolar (LENER et al., 2016).

O trabalho de revisão feito por Lener e colaboradores (2016) descreve os circuitos envolvidos na neurotransmissão cerebral de glutamato e de ácido gama-aminobutírico (GABA). Sucintamente, o glutamato é produzido nos neurônios, a partir de glicose, e acondicionado em vesículas para, posteriormente, ser submetido à exocitose. Quando um neurônio é despolarizado, o glutamato é liberado na fenda sináptica e ocorre a ligação desse neurotransmissor com um de seus receptores (ionotrópicos – NMDA, AMPA, cainato – ou metabotrópicos). Para prevenir excesso de excitabilidade, o glutamato é removido da fenda sináptica por transportadores de glutamato, localizados nos astrócitos, e transformado em glicina. Essa glicina é então liberada dos neurônios pré-sinápticos para ser convertida em glutamato e iniciar o ciclo novamente. Os neurônios inibitórios GABAérgicos também utilizam glutamato para a síntese de GABA (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Mecanismos moleculares da ação da cetamina no metabolismo de neurotransmissão de glutamato (Glu) e de ácido gama aminobutírico GABA. BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; Gln = glutamina.

Fonte: Lener et al. (2016).

Estudos com técnicas de imagem identificaram alterações nas atividades, tanto do glutamato, quanto do GABA, em pacientes com depressão; esses indivíduos apresentaram redução nas concentrações de glutamato e GABA na região do córtex pré-frontal (YILDIZ-YESILOGLU; ANKERST, 2006; HASLER et al., 2007), além de redução da energia mitocondrial necessária para produção e conversão do glutamato (ABDALLAH et al., 2014). Esses achados indicam disfunção da sinalização excitatória e/ou inibitória como parte fundamental para a psicopatologia da depressão (LENER et al., 2016).

A ação da cetamina nesses sistemas de neurotransmissão ocorre devido a sua atividade antagonista dos receptores NMDA localizados nos interneurônios GABAérgicos e nos neurônios pós-sinápticos, desbloqueando os neurônios GABAérgicos corticais e estimulando a síntese de fatores de crescimento intracelulares nos neurônios pós-sinápticos; além disso, a cetamina também se liga nos receptores cainato e aumenta a atividade de moléculas responsáveis pela neuroplasticidade e sinaptogênese (HOMAYOUN; MOGHADDAM, 2007; LI et al., 2010; LI et al., 2011; DREWNIAKY et al., 2015; LENER et al., 2016) – Figura 3.1.

Estudo realizado por Harraz et al. (2016) mostrou que a cetamina aumenta a síntese do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – *brain-derived neurotrophic factor*), através da geração de óxido nítrico. Esse processo promove a estabilização da Rheb, um tipo de proteína G, que ativa o alvo de mamíferos da rapamicina (mTOR – *mammalian target of rapamycin*). Todas essas moléculas parecem estar envolvidas na psicopatologia da depressão, possivelmente pelo papel que exercem na neurogênese (YANG et al., 2013; STRASBURGER et al., 2017; VAN CALKER et al., 2018).

A ação antidepressiva da cetamina também está relacionada com a via metabólica da quinurenina. O ácido quinolínico, um dos componentes da via da quinurenina, possui a função de estimular as vias inflamatórias; a cetamina, ao inibir a ação desse ácido, reduz as concentrações de citocinas pró-inflamatórias envolvidas no desenvolvimento do quadro de depressão, como a interleucina-1 β (IL-1 β), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α – *tumor necrosis factor- α*) (STRASBURGER et al., 2017; TAN et al., 2017).

Outro fator envolvido no desenvolvimento da depressão é a ação de hormônios no sistema nervoso central (PAYNE; MAGUIRE, 2019). Há poucos estudos na literatura que relacionaram a ação antidepressiva da cetamina com alterações nos níveis hormonais. Carrier e Kabbaj (2013) avaliaram a diferença de sensibilidade à ação antidepressiva da cetamina em ratos machos e fêmeas e constataram que as fêmeas são mais sensíveis a ação da cetamina, provavelmente devido a mediação da progesterona e do estrogênio. Contudo, mais estudos são necessários a fim de elucidar o papel dos hormônios no mecanismo de ação antidepressiva da cetamina.

3.1.2 Estudos pré-clínicos

Estudos em animais mostraram que a cetamina 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 2008a-b, 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).

Engin, Treit e Dickson (2009) mostram que a administração de 10 ou 50 mg/kg em uma única injeção intraperitoneal em ratos reduziu o tempo de imobilidade no teste de nado forçado, sem causar alteração no comportamento avaliado no campo aberto, de forma semelhante a outro antidepressivo clássico (fluoxetina). A cetamina também produziu efeito ansiolítico, observado tanto em modelo comportamental (labirinto em cruz elevado), quanto em modelo neurofisiológico (observação da frequência de oscilações das ondas teta hipocâmpais).

Estudo em ratos, realizado por Yang e colaboradores (2013), mostrou que a administração de única dose intraperitoneal de 10 e 15 mg/kg de cetamina diminuiu o tempo de imobilidade no nado forçado e aumentou as concentrações de BDNF e mTOR nos neurônios do hipocampo.

Trabalho feito por Garcia et al. (2008a) revelou que o tratamento por 14 dias com 5, 10 e 15 mg/kg de cetamina por via intraperitoneal, em ratos, reduziu o tempo de imobilidade e aumentou o tempo de natação e escalada no teste de nado forçado sem alterar a locomoção no campo aberto.

Réus e colaboradores (2015) avaliaram o potencial antidepressivo da cetamina em ratos com comportamento tipo-depressivo devido à separação materna quando filhotes. O tratamento com 15 mg/kg de cetamina via intraperitoneal por 14 dias consecutivos foi capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo observado no modelo de nado forçado.

3.1.3 Estudos clínicos

Estudos em indivíduos com depressão também sugerem efeito antidepressivo do tratamento com cetamina. Zarate et al. (2006) mostrou que uma única infusão de cetamina (0,5 mg/kg) administrada por via intravenosa por um período de 40 minutos foi capaz de diminuir os sintomas da depressão em pacientes por cerca de uma semana.

Abdallah e colaboradores (2016), em trabalho de revisão, mostraram 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 seus efeitos antidepressivo.

Irwin et al. (2013) estudaram o efeito da administração prolongada de 0,5 mg/kg via oral de cetamina. Os resultados mostraram que o tratamento por 28 dias resultou em efeito antidepressivo prolongado, não sendo relatados efeitos psicomiméticos, porém com efeitos colaterais, como perturbações no sono e diarreia.

Estudos conduzidos em pacientes bipolares resistentes ao tratamento revelou que a cetamina apresenta efeito antidepressivo mais rápido quando administrada concomitantemente ao tratamento com valproato de sódio e lítio (BROWNE; LUCKI, 2013).

Vande Voort e colaboradores (2016) estudaram o efeito antidepressivo da cetamina em pacientes com depressão resistentes aos tratamentos clássicos. O estudo foi realizado em duas fases: a primeira consistiu na administração de infusão intravenosa de 0,5 mg/kg de cetamina, três vezes por semana por duas semanas; os pacientes que apresentaram diminuição dos sintomas da depressão foram submetidos a segunda fase do estudo, que consistiu em administrações semanais de mesma dose e via da primeira fase, por quatro semanas adicionais. Ao final do tratamento grande parte dos pacientes apresentou diminuição dos sintomas da depressão que persistiu por quatro semanas após o fim do tratamento. Esses pacientes também manifestaram de efeitos colaterais, porém de forma leve e transitória.

Um dos sintomas importantes da depressão é a ideação suicida. Trabalhos mostram que 0,5 mg/kg de cetamina é capaz de reduzir a taxa de pensamentos

suicidas em pacientes com depressão 24 horas após o tratamento (DIAZGRANADOS et al., 2010; GRUNEBAUM et al., 2017).

3.1.4 Tratamento para depressão pós-parto

Apesar da grande quantidade de estudos avaliando o efeito do tratamento com cetamina em quadros de depressão, há poucos estudos que mostram a atuação desse fármaco no tratamento da depressão pós-parto. Até o momento, foram encontrados na literatura apenas quatro artigos com o tema, sendo dois estudos em camundongos e dois em pacientes humanos.

Os trabalhos em camundongos avaliaram o efeito do tratamento agudo com 30 mg/kg de cetamina na sinalização Akt-mTOR no hipocampo das mães e da prole após exposição da mãe a estresse durante a gestação. Em ambos os trabalhos, a cetamina foi capaz de reverter os déficits comportamentais e o comprometimento da sinalização do Akt-mTOR, tanto nas mães, quanto na primeira geração da prole (XIA et al., 2016; WU et al., 2017).

Os trabalhos em seres humanos investigaram a eficácia da administração de 0,25 mg/kg e 0,5 mg/kg de cetamina via intravenosa em mulheres durante a cirurgia de cesariana na prevenção da depressão pós-parto. A avaliação da depressão foi feita de três a seis dias e de seis a oito semanas após o nascimento dos bebês e os resultados mostraram que a dose de 0,25 mg/kg de cetamina não causou diferença entre o grupo tratado e o placebo, porém a dose de 0,5 mg/kg de cetamina foi capaz de diminuir a prevalência de depressão pós-parto (XU et al., 2017; MA et al., 2019). Esses achados reforçam a importância de mais estudos sobre os efeitos desse fármaco com essa finalidade.

3.1.5 Justificativa

O tratamento farmacológico para depressão está em expansão nas últimas décadas, explorando novos alvos moleculares e sistemas de neurotransmissão. 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. A

cetamina, por possuir mecanismo de ação misto, vem sendo bastante estudada para o uso como antidepressivo.

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. Os tratamentos farmacológicos apresentam riscos sobre a saúde da mãe e também para a prole. Em relação aos estados gestacional e lactante requerem uma atenção especial; sendo assim, é necessário avaliar as consequências do tratamento farmacológico sob esses estados.

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.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos do tratamento prolongado com três doses subanestésicas de cetamina em ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna.

3.2.2 Objetivos específicos

Avaliar, em ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna, os efeitos da administração prolongada de cetamina:

- No ganho de peso;
- Nos comportamentos materno, materno agressivo, preferência olfatória, caixa claro/escuro e nado forçado;
- Nos níveis de neurotransmissores cerebrais e seus metabólitos;
- Nos níveis hormonais;
- Na expressão de RNA mensageiro de genes cerebrais;
- Nos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Animais

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar virgens, com aproximadamente 90 dias de vida, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (41 x 34 x 18 cm) com maravalha autoclavada como substrato e mantidos 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 (a luz acende às 6h e apaga às 18h). Os animais tiveram água e comida *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

Os experimentos foram conduzidos na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) e na Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM), sendo aprovados pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ/USP, sob o protocolo de número 2099010218, e pela CEUA da UPM sob o protocolo de número 168-04-2018.

3.3.2 Fármaco

Nesse estudo foi utilizado cloridrato de cetamina da mesma forma como descrito no Capítulo 2, item 2.3.2. O tratamento com cetamina ou solução salina ocorreu diariamente, logo após o modelo de separação materna (entre 13 h e 13h30) durante toda a lactação.

3.3.3 Procedimentos

3.3.3.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

O acasalamento e o diagnóstico de prenhez foram feitos como descrito no Capítulo 1, item 1.3.2.1.

3.3.3.2 Avaliação do desempenho reprodutivo e do ganho de peso

A avaliação do desempenho reprodutivo e do ganho de peso foi feita como descrito no Capítulo 1, item 1.3.2.2.

3.3.3.3 Modelo de separação materna

A utilização do modelo de separação materna para indução da depressão pós-parto foi feita como descrito no Capítulo 1, item 1.3.2.3.

3.3.3.4 Avaliação comportamental

A avaliação comportamental foi realizada através dos testes de comportamento materno, comportamento materno agressivo, preferência olfatória, caixa claro/escuro e nado forçado, como descrito no Capítulo 1, item 1.3.2.4.

3.3.3.5 Eutanásia e coleta de material biológico

A eutanásia e a coleta de material biológico foram realizadas como descrito no Capítulo 1, item 1.3.2.5.

3.3.3.6 Dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos

A dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos foi realizada como descrito no Capítulo 1, item 1.3.2.6.

3.3.3.7 Dosagem hormonal

A dosagem hormonal foi realizada como descrito no Capítulo 1, item 1.3.2.7. As dosagens dos hormônios T3, T4 e TSH foram realizadas com a colaboração do Prof. Dr. Antônio Carlos Bianco da *Section of Endocrinology, Diabetes & Metabolism, Biological Sciences Division, University of Chicago*, durante o programa de Doutorado Sanduíche.

3.3.3.8 Avaliação da expressão de RNA

A avaliação da expressão de RNA foi realizada como descrito no Capítulo 1, item 1.3.2.8. Essa avaliação foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Antônio Carlos Bianco da *Section of Endocrinology, Diabetes & Metabolism, Biological Sciences Division, University of Chicago*, durante o programa de Doutorado Sanduíche.

3.3.3.9 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias

A dosagem de citocinas pró-inflamatórias foi realizada como descrito no Capítulo 1, item 1.3.2.9.

3.3.4 Delineamento experimental

Quarenta ratas adultas lactantes foram divididas em quatro grupos: um controle e três experimentais (n=10 fêmeas/grupo), como descritos no Quadro 3.1. As ratas foram induzidas à depressão através do modelo de separação materna do DPN2 ao DPN12. O tratamento com solução salina ou diferentes doses de cetamina foi feito por via intraperitoneal durante todo o período de lactação, do DPN2 ao DPN21.

Quadro 3.1 – Divisão dos grupos experimentais.

Grupos	Descrição do tratamento
Salina	Solução salina (Na Cl) 0,9%
Ceta 5	Cetamina 5 mg/kg
Ceta 10	Cetamina 10 mg/kg
Ceta 20	Cetamina 20 mg/kg

A avaliação do desempenho reprodutivo foi realizada no DPN2 e a mensuração do peso foi feita diariamente durante toda a gestação e a lactação. Os testes comportamentais foram realizados do DPN11 ao DPN21, como descrito no Quadro 3.2. No DPN21, logo após o término do último teste comportamental, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação para coleta de diferentes

estruturas cerebrais e sangue para a análise neuroquímica, hormonal, de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de RNA.

Quadro 3.2 – Testes comportamentais realizados nas fêmeas submetidas ao modelo de depressão pós-parto por separação materna (DPN = dia pós-natal).

Teste Comportamental	DPN
Comportamento materno	11
Comportamento materno agressivo	12
Preferência olfatória	12
Caixa claro/escuro	20
Nado forçado	21

3.3.4 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 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 $p < 0,05$.

3.4 RESULTADOS

São apresentados, a seguir, os resultados obtidos.

3.4.1 Efeitos da administração prolongada de cetamina no desempenho reprodutivo e no ganho de peso de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna

A Figura 3.2 mostra os resultados da avaliação do desempenho reprodutivo e do ganho de peso materno semanal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. Em relação ao desempenho reprodutivo, a ANOVA de uma via não apontou diferenças significantes entre os grupos no número total de filhotes ($F(3,28)=1,323$, $p>0,05$) e número de fêmeas ($F(3,28)=0,7746$, $p>0,05$), mas apontou diferenças no número de machos ($F(3,28)=4,736$, $p<0,01$). O pós-teste de Dunnett apontou que as ratas do grupo Ceta 5 tiveram mais filhos machos que do as do grupo salina ($p<0,05$).

Em relação ao ganho de peso, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não apontou diferenças significantes entre os grupos no tratamento ($F(3,28)=1,346$, $p>0,05$), porém apontou diferenças no tempo ($F(2,56)=43,94$, $p<0,0001$), sem interação entre os fatores ($F(6,56)=1,330$, $p>0,05$). O pós-teste de Bonferroni apontou que as ratas do grupo Ceta 5 perderam menos peso na terceira semana de lactação do que as ratas do grupo salina ($p<0,05$).

Figura 3.2 – Avaliação do desempenho reprodutivo e do ganho de peso semanal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de 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, e ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

3.4.2 Efeitos da administração prolongada de cetamina no comportamento de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna

São apresentados, a seguir, os diferentes comportamentos avaliados em ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna.

3.4.2.1 Comportamento materno

Foi observado apenas no grupo Ceta 20 que as ratas passaram boa parte do teste se locomovendo pela caixa moradia de forma constante e sem propósito,

ignorando a presença dos filhotes, que se encontravam espalhados pela caixa desprotegidos. Em alguns casos, as ratas perdiam o equilíbrio e caíam, mas retomavam a locomoção agitada rapidamente.

A Figura 3.3 mostra os resultados do comportamento materno de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas em nenhum parâmetro: recolhimento dos filhotes [primeiro filhote ($F(3,28)=0,7546$, $p>0,05$); segundo filhote ($F(3,28)=0,5064$, $p>0,05$); terceiro filhote ($F(3,28)=0,6130$, $p>0,05$); quarto filhote ($F(3,28)=0,8960$, $p>0,05$)], latência agrupamento ($F(3,28)=1,838$, $p>0,05$), filhotes no ninho ($F(3,28)=2,379$, $p>0,05$), *grooming* nos filhotes ($F(3,28)=0,7280$, $p>0,05$), *self-grooming* ($F(3,28)=2,282$, $p>0,05$), latência para a amamentação ($F(3,28)=4,023$, $p>0,05$) e amamentação ($F(3,28)=3,452$, $p>0,05$).

Figura 3.3 - Parâmetros avaliados no comportamento materno de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

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

3.4.2.2 Comportamento materno agressivo

A Figura 3.4 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no teste de comportamento materno agressivo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: interação mãe-intruso ($F(3,28)=2,349$, $p>0,05$), latência para a primeira luta ($F(3,28)=0,9009$, $p>0,05$), lutas ($F(3,28)=0,9333$, $p>0,05$), *boxing* ($F(3,28)=1,156$, $p>0,05$), interação mãe-filhotes ($F(3,28)=1,691$, $p>0,05$), *grooming* da mãe ($F(3,28)=2,554$, $p>0,05$), interação intruso-filhotes ($F(3,28)=0,5619$, $p>0,05$) e *grooming* do intruso ($F(3,28)=0,8909$, $p>0,05$).

Figura 3.4 - Parâmetros avaliados no comportamento materno agressivo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

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

3.4.2.3 Preferência olfatória

A Figura 3.5 mostra os resultados dos parâmetros avaliados no teste de preferência olfatória de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos na frequência na zona limpa ($F(3,28)=2,619$,

$p > 0,05$), mas mostrou diferenças significantes nos parâmetros frequência na zona suja ($F(3,28)=4,746$, $p < 0,05$) e tempo na zona limpa ($F(3,28)=3,081$, $p < 0,05$). O pós-teste de Dunnett mostrou que as ratas tratadas com 20 mg/kg de cetamina entraram mais vezes na zona suja ($p < 0,01$) e permaneceram menos tempo na zona limpa ($p < 0,05$) em comparação com as ratas do grupo salina. Em relação ao parâmetro frequência na zona suja, a ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos ($F(3,28)=3,114$, $p < 0,05$), porém o pós-teste de Dunnett não apontou nenhuma diferença.

Figura 3.5 - Parâmetros avaliados na preferência olfatória de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de 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 teste de Dunnett.

3.4.2.4 Caixa claro/escuro

Durante o teste da caixa claro/escuro foi observado que as ratas do grupo Ceta 20 apresentaram um padrão de locomoção mais agitado, entrando e saindo dos compartimentos sem de fato explorá-los. Além disso, esses animais, ao se apoiarem apenas nas patas traseiras na tentativa de exploração vertical da caixa, escorregavam e caíam no piso da caixa.

A Figura 3.6 mostra os resultados dos parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos na latência para a primeira passagem ($F(3,28)=5,883$, $p<0,05$), mas mostrou diferenças significantes nos parâmetros número de cruzamentos ($F(3,28)=11,76$, $p<0,0001$), tempo no compartimento claro ($F(3,28)=4,096$, $p<0,05$), tempo no compartimento escuro ($F(3,28)=4,096$, $p<0,05$), frequência no compartimento claro ($F(3,28)=18,59$, $p<0,0001$) e frequência no compartimento escuro ($F(3,28)=19,33$, $p<0,0001$). O pós-teste de Dunnett mostrou que os animais tratados com 5 mg/kg passaram mais tempo no compartimento claro e menos tempo no compartimento escuro ($p<0,05$ em ambos os parâmetros) em comparação com os animais tratados com salina. As ratas do grupo Ceta 20 tiveram aumento no número de cruzamentos ($p<0,0001$) e nas frequências em cada compartimento ($p<0,001$ para ambos os parâmetros) em comparação com as ratas do grupo salina.

Figura 3.6 – Parâmetros avaliados na caixa claro/escuro de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8 animais por grupo.

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett.

3.4.2.5 Nado forçado

Foi observado que apenas as ratas do grupo Ceta 20, ao serem colocadas na cuba, exibiram um padrão de natação circular de forma ininterrupta durante toda a duração do teste.

A Figura 3.7 mostra os resultados do teste de nado forçado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos no parâmetro latência para a primeira imobilidade ($F(3,28)=3,681$, $p > 0,05$), mas apontou diferenças significantes entre os grupos nos parâmetros tempo de imobilidade ($F(3,28)=10,13$, $p < 0,001$) e tempo de atividade ($F(3,28)=3,216$, $p < 0,01$). O pós-teste de Dunnett mostrou que as ratas tratadas com 20 mg/kg de cetamina apresentaram diminuição no tempo de imobilidade e aumento no tempo de atividade ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) em comparação com as ratas tratadas com salina.

Figura 3.7 – Parâmetros avaliados no teste do nado forçado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-9 animais por grupo.

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

3.4.3 Efeitos da administração prolongada de cetamina nos níveis de neurotransmissores cerebrais e seus metabólitos de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna

As Figuras 3.8 a 3.23 mostram os resultados da avaliação neuroquímica de diferentes estruturas cerebrais de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. Em relação ao hipotálamo, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes em nenhum dos parâmetros avaliados: 5HT ($F(3,28)=0,1646$, $p>0,05$), 5HIAA ($F(3,28)=0,4483$, $p>0,05$), 5HIAA/5HT ($F(3,28)=0,7533$, $p>0,05$), NOR ($F(3,28)=0,3599$, $p>0,05$), VMA ($F(3,28)=0,1401$, $p>0,05$), VMA/NOR ($F(3,28)=1,670$, $p>0,05$), DA ($F(3,28)=2,526$, $p>0,05$), DOPAC ($F(3,28)=1,725$, $p>0,05$), DOPAC/DA ($F(3,28)=0,7599$, $p>0,05$), HVA ($F(3,28)=0,7548$, $p>0,05$), HVA/DA ($F(3,28)=1,634$, $p>0,05$), ASP ($F(3,20)=1,028$, $p>0,05$), GLU ($F(3,20)=0,6448$, $p>0,05$), GLI ($F(3,20)=0,5555$, $p>0,05$) e GABA ($F(3,20)=0,8731$, $p>0,05$) – Figura 3.8 a 3.11.

Figura 3.8 – Avaliação do sistema serotoninérgico do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Figura 3.9 – Avaliação do sistema noradrenérgico do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Figura 3.10 – Avaliação do sistema dopaminérgico do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Figura 3.11 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Em relação ao hipocampo, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes nos seguintes parâmetros 5HT ($F(3,27)=0,3747$, $p > 0,05$), 5HIAA ($F(3,28)=1,101$, $p > 0,05$), 5HIAA/5HT ($F(3,28)=0,1833$, $p > 0,05$), VMA ($F(3,28)=1,291$, $p > 0,05$), DA ($F(3,28)=0,7219$, $p > 0,05$), DOPAC ($F(3,28)=1,965$, $p > 0,05$), DOPAC/DA ($F(3,28)=1,316$, $p > 0,05$), HVA ($F(3,28)=5,208$, $p > 0,05$), HVA/DA ($F(3,28)=2,194$, $p > 0,05$), ASP ($F(3,20)=1,215$, $p > 0,05$), GLU ($F(3,20)=0,4294$, $p > 0,05$), GLI ($F(3,20)=0,7604$, $p > 0,05$), GABA ($F(3,20)=0,4453$, $p > 0,05$), mas apontou diferenças nos parâmetros NOR ($F(3,28)=7,676$, $p < 0,01$) e VMA/NOR ($F(3,28)=5,382$, $p < 0,0001$). O pós-teste de Dunnett mostrou que as ratas tratadas com 20 mg/kg de cetamina apresentaram aumento nos níveis de NOR ($p < 0,01$) e as ratas do grupo Ceta 10 e Ceta 20 apresentaram diminuição na taxa de turnover VMA/NOR ($p < 0,05$).

e $p < 0,001$, respectivamente) em comparação com as ratas tratadas com salina – Figura 3.12 a 3.15.

Figura 3.12 – Avaliação do sistema serotoninérgico do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Figura 3.13 – Avaliação do sistema noradrenérgico do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Figura 3.14 – Avaliação do sistema dopaminérgico do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Figura 3.15 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Em relação ao córtex pré-frontal, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes nos seguintes parâmetros avaliados: 5HT ($F(3,27)=1,466$, $p > 0,05$), 5HIAA ($F(3,27)=0,9722$, $p > 0,05$), 5HIAA/5HT ($F(3,27)=0,3938$, $p > 0,05$), NOR ($F(3,27)=2,549$, $p > 0,05$), VMA ($F(3,27)=1,705$, $p > 0,05$), VMA/NOR ($F(3,27)=0,8717$, $p > 0,05$), DA ($F(3,27)=1,499$, $p > 0,05$), DOPAC ($F(3,27)=2,304$, $p > 0,05$), DOPAC/DA ($F(3,27)=1,562$, $p > 0,05$), HVA ($F(3,27)=0,2089$, $p > 0,05$), HVA/DA ($F(3,27)=1,271$, $p > 0,05$), ASP ($F(3,20)=0,3216$, $p > 0,05$), GLI ($F(3,20)=1,659$, $p > 0,05$), GABA ($F(3,20)=1,176$, $p > 0,05$), mas apontou diferenças no parâmetro GLU ($F(3, 19) = 3,653$, $p < 0,05$). O pós teste de Dunnett mostrou que as ratas do grupo Ceta 5 apresentaram aumento nos níveis de NOR ($p < 0,05$) e as ratas do grupo Ceta 20 apresentaram aumento nos níveis de GLU ($p < 0,05$) em relação às do grupo salina – Figura 3.16 a 3.19.

Figura 3.16 – Avaliação do sistema serotoninérgico do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Figura 3.17 – Avaliação do sistema noradrenalina do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Figura 3.18 – Avaliação do sistema dopamina do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Figura 3.19 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Em relação ao corpo estriado, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes em nenhum dos parâmetros avaliados: 5HT ($F(3,26)=0,4893$, $p > 0,05$), 5HIAA ($F(3,26)=0,8533$, $p > 0,05$), 5HIAA/5HT ($F(3,26)=1,108$, $p > 0,05$), NOR ($F(3,25)=0,2525$, $p > 0,05$), VMA ($F(3,26)=0,9809$, $p > 0,05$), VMA/NOR ($F(3,25)=1,262$, $p > 0,05$), DA ($F(3,26)=0,9182$, $p > 0,05$), DOPAC ($F(3,26)=2,025$, $p > 0,05$), DOPAC/DA ($F(3,26)=0,7361$, $p > 0,05$), HVA ($F(3,26)=0,1067$, $p > 0,05$), HVA/DA ($F(3,26)=2,950$, $p > 0,05$), ASP ($F(3,20)=1,326$, $p > 0,05$), GLU ($F(3,20)=0,5035$, $p > 0,05$), GLI ($F(3,20)=0,1008$, $p > 0,05$), GABA ($F(3,20)=0,9904$, $p > 0,05$). Contudo, o pós-teste de Dunnett mostrou que as ratas tratadas com 20 mg/kg de cetamina apresentaram aumento na taxa de *turnover* HVA/DA ($p < 0,05$) em comparação com as ratas tratadas com salina – Figura 3.20 a 3.23.

Figura 3.20 – Avaliação do sistema serotoninérgico do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Figura 3.21 – Avaliação do sistema noradrenérgico do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Figura 3.22 – Avaliação do sistema dopaminérgico do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

Figura 3.23 – Avaliação dos aminoácidos neurotransmissores do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6-8 animais por grupo.

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

3.4.4 Efeitos da administração prolongada de cetamina nos níveis hormonais de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna

A Figura 3.24 mostra os resultados dos parâmetros da avaliação sérica dos níveis hormonais de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: corticosterona ($F(3,28)=1,392$, $p > 0,05$), progesterona ($F(3,28)=2,013$, $p > 0,05$), estradiol ($F(3,28)=0,8158$, $p > 0,05$), FSH ($F(3,28)=2,295$, $p > 0,05$), LH ($F(3,28)=2,290$, $p > 0,05$), ocitocina ($F(3,28)=2,044$, $p > 0,05$), prolactina ($F(3,28)=2,834$, $p > 0,05$), T3 ($F(3,25)=0,3120$, $p > 0,05$), T4 ($F(3,25)=0,7052$, $p > 0,05$) e TSH ($F(3,22)=0,4383$, $p > 0,05$).

Figura 3.24 – Parâmetros avaliados na dosagem hormonal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-10 animais por grupo.

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

3.4.5 Efeitos da administração prolongada de cetamina na expressão de RNA mensageiro de genes cerebrais de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna

A Figura 3.25 mostra os resultados da avaliação expressão de RNA mensageiro de genes do hipotálamo de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. A ANOVA de uma via não apontou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos genes avaliados: *TRH* ($F(3,20)=0,09164$, $p>0,05$), *Dio2* ($F(3,20)=2,931$, $p>0,05$), *Dio3* ($F(3,20)=1,579$, $p>0,05$), *Sst* ($F(3,20)=0,9592$, $p>0,05$), *PAP-2* ($F(3,20)=1,328$, $p>0,05$).

Figura 3.25 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro de genes do hipotálamo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=5-7 animais por grupo.

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

A Figura 3.26 mostra os resultados da avaliação expressão de RNA mensageiro de genes do hipocampo de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. A

ANOVA de uma via não apontou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos genes avaliados: *Dio2* ($F(3,16)=1,327$, $p>0,05$) e *Dio3* ($F(3,14)=1,724$, $p>0,05$).

Figura 3.26 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro de genes do hipocampo de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=5 animais por grupo.

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

A Figura 3.27 mostra os resultados da avaliação expressão de RNA mensageiro de genes do córtex pré-frontal de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. A ANOVA de uma via não apontou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos genes avaliados: *Dio2* ($F(3,20)=1,370$, $p>0,05$) e *Dio3* ($F(3,20)=1,068$, $p>0,05$).

Figura 3.27 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro de genes do córtex pré-frontal de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=6 animais por grupo.

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

A Figura 3.28 mostra os resultados da avaliação expressão de RNA mensageiro de genes do corpo estriado de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. A ANOVA de uma via não apontou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos genes avaliados: *Dio2* ($F(3,20)=0,5058$, $p > 0,05$), *Dio3* ($F(3,20)=0,8591$, $p > 0,05$), *Hr* ($F(3,20)=2,885$, $p > 0,05$), *Aldh1a1* ($F(3,20)=2,058$, $p > 0,05$), *Cnr1* ($F(3,20)=0,3159$, $p > 0,05$), *Slc22a3* ($F(3,20)=0,4894$, $p > 0,05$) e *Dbp* ($F(3,20)=1,137$, $p > 0,05$).

Figura 3.28 – Avaliação da expressão de RNA mensageiro de genes do corpo estriado de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de 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.

3.4.6 Efeitos da administração prolongada de cetamina nos níveis de citocinas pró-inflamatórias de ratas lactantes induzidas à depressão pelo modelo de separação materna

A Figura 3.29 mostra os resultados dos parâmetros da avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados: IL-1 β ($F(3,28)=1,941$, $p > 0,05$), IL-6 ($F(3,28)=1,325$, $p > 0,05$), IL-10 ($F(3,28)=1,424$, $p > 0,05$) e TNF- α ($F(3,28)=0,5019$, $p > 0,05$).

Figura 3.29 – Parâmetros avaliados na dosagem dos níveis de citocinas pró-inflamatórias de ratas submetidas ao modelo de separação materna e tratadas com diferentes doses de cetamina (Ceta 5, 10 e 20 mg/kg) ou salina durante o período de lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N=8-10 animais por grupo.

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

3.5 DISCUSSÃO

A cetamina é um anestésico dissociativo que vem sendo bastante estudada para o uso como antidepressivo (ZARATE et al., 2006; IRWIN et al., 2013; ABDALLAH et al., 2016). Até o presente momento, poucos estudos focaram no uso desse medicamento como terapia para a depressão pós-parto (XIA et al., 2016; WU et al., 2017; XU et al., 2017; MA et al., 2019). Desse modo, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos antidepressivos da cetamina em um modelo animal de depressão pós-parto.

Para a indução da depressão pós-parto foi utilizado o mesmo modelo de separação materna empregado no Capítulo 1, que faz uso do estresse da separação da mãe de seus filhotes como estímulo para o desenvolvimento de um estado tipo-depressão (VETULANI, 2013).

O tratamento com a cetamina foi realizado diariamente durante toda a lactação com as mesmas doses utilizadas no Capítulo 2, uma vez que evidências da literatura apontam efeito antidepressivo dessas doses em testes comportamentais, sem apresentar toxicidade aos animais (GARCIA et al., 2008; TIZABI et al., 2012; PARISE et al., 2013; JIANG et al., 2017; ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2020a). A administração da cetamina foi realizada por via intraperitoneal, assim como no Capítulo 2, por ser a via de administração mais comum desse fármaco para fins terapêuticos.

A avaliação do desempenho reprodutivo foi realizada no segundo dia após o parto e, durante toda a lactação, foi feito o acompanhamento do ganho de peso semanal das ratas. Os resultados mostraram que as ratas do grupo Ceta 5 apresentaram maior número de filhotes machos e perderam menos peso na terceira semana de lactação do que as ratas do grupo salina. A diferença no número de filhotes machos, apesar de estatisticamente significativa, ocorreu ao acaso, pois o tratamento com a cetamina foi iniciado após o nascimento dos filhotes e, portanto, não possui significado para esse experimento. Da mesma forma, a diferença no ganho de peso foi pequena e não foi acompanhada de nenhum outro sinal de toxicidade da cetamina e, assim, também não apresenta importância para o estudo.

A avaliação comportamental foi realizada da mesma forma que no Capítulo 1 e consistiu nas mensurações dos comportamentos maternos, por meio dos testes de

comportamento materno, materno agressivo e preferência olfatória, bem como por comportamentos tipo-ansioso, por meio do teste da caixa claro/escuro, e comportamento tipo-depressivo, por meio do teste de nado forçado.

Foi encontrado apenas um estudo na literatura que avaliou os efeitos do tratamento com cetamina nos cuidados maternos. Yamamuro (2005) avaliou o efeito da administração, nos dias 3 ou 9 da lactação, de uma dose anestésica de cetamina (50 mg/kg) no comportamento materno de ratas, após 4 h de isolamento da mãe de seus filhotes. Foi observado que as ratas tratadas com cetamina demoraram mais tempo para recolher os filhotes, indicando perda da motivação materna. Nossos resultados não mostraram diferenças entre os grupos no parâmetro recolhimento dos filhotes, porém mostraram que as ratas do grupo Ceta 10 e Ceta 20 apresentaram maior latência para amamentar os filhotes e passaram menos tempo realizando esse comportamento em comparação com as ratas do grupo salina, indicando um comprometimento do comportamento materno causado pela cetamina, corroborando o trabalho de Yamamuro (2005).

Em relação ao comportamento materno agressivo, não foram encontrados trabalhos na literatura que estudaram os efeitos da cetamina nesse comportamento. No entanto, Takahashi, Morato e Monteiro-de-Lima (1984) mostraram as consequências da exposição a esse fármaco na agressividade de roedores machos. Esses autores demonstraram que a administração aguda das doses de 3 e 5 mg/kg de cetamina, por via intraperitoneal, aumentaram a agressividade de ratos, enquanto o tratamento com 10 mg/kg bloqueou esse comportamento.

No mesmo sentido, estudo feito por Covington et al. (2018) mostrou que a administração aguda de 7,5 e 10 mg/kg de cetamina foi capaz de suprimir a agressão em camundongos adultos. Shin et al. (2019), em seu trabalho, mostraram que a administração de 15 mg/kg de cetamina por 7 dias diminuiu a agressão expressa por camundongos jovens após estresse causado por separação materna durante a lactação.

Diferente dos trabalhos mencionados, os nossos resultados mostraram que não houve diferenças entre as ratas tratadas com cetamina e as tratadas com solução salina, indicando que esse fármaco não causou efeito no comportamento materno agressivo. Uma possível explicação para a discordância nos resultados encontrados com os da literatura se dá pelo fato de que os mecanismos fisiológicos

responsáveis pela agressão materna são diferentes dos relacionados com a agressão expressa por machos, devido ao envolvimento de células, regiões cerebrais e níveis hormonais distintos em cada sexo (BOSCH et al., 2005; HASHIKAWA et al., 2018).

O teste de preferência olfatória foi utilizado como complemento para o comportamento materno, uma vez que o olfato faz parte da regulação do comportamento materno (LÉVY; KELLER; POINDRON, 2004). Não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliaram o efeito da exposição a cetamina no sistema olfatório de roedores. Contudo, estudo de Cavalcante et al. (2017) mostrou que a exposição a um antagonista do receptor glutamatérgico NMDA (AP5) não causou efeito no reconhecimento social de ratos machos. Baseado nesse estudo, é possível supor que a cetamina apresente efeito semelhante por também ser um antagonista do receptor glutamatérgico NMDA.

Nossos resultados mostraram que as ratas do grupo Ceta 20 apresentaram maior frequência na zona com a maravalha com o odor dos filhotes e passaram menos tempo na zona com a maravalha limpa quando comparadas com as ratas do grupo salina. Contudo, os demais parâmetros avaliados nesse teste não foram alterados, indicando que não houve preferência por nenhum odor (maravalha limpa *versus*. maravalha com odor dos filhotes). Assim, esses resultados sugerem que a cetamina não interfere no reconhecimento olfatório das mães, de forma semelhante ao apresentado no trabalho de Cavalcante et al. (2017) no reconhecimento social de ratos machos.

Diversos estudos da literatura mostraram os efeitos do tratamento com doses antidepressivas de cetamina nos comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo de roedores. Esses estudos são importantes para a validação de modelos animais para o estudo de depressão e para avaliar a eficácia do tratamento de fármacos antidepressivos, uma vez que a ansiedade e a depressão são duas condições diretamente correlacionadas (KUMAR; BHAT; KUMAR, 2013; CZÉH et al., 2016).

Ainda não há um consenso na comunidade científica em relação aos efeitos de doses antidepressivas de cetamina no comportamento tipo-ansioso. Estudo realizado por Engin, Treit e Dickson (2009) mostrou que o tratamento com dose única de 50 mg/kg de cetamina promoveu aumento na porcentagem de entradas no braço aberto do labirinto em cruz elevada. Parise et al. (2013), em seu estudo,

mostraram que a administração por período prolongado (15 dias) de 20 mg/kg de cetamina aumentou o tempo de permanência de ratos nos braços abertos no labirinto em cruz elevado. Esses trabalhos indicam, portanto, um efeito ansiolítico desse fármaco.

No entanto, há trabalhos que não apontam efeito ansiolítico ou ansiogênico de doses antidepressivas de cetamina. Becker et al. (2003) mostraram que ratos, após tratamento por 5 dias com 30 mg/kg de cetamina, não apresentaram diferença em nenhum parâmetro avaliado no labirinto em cruz elevado em relação aos ratos controle. Browne e Lucki (2013), em seu trabalho de revisão, apontam que a cetamina só induz efeito ansiolítico em roedores no labirinto em cruz elevada em doses mais altas e não em doses antidepressivas.

Nossos resultados mostraram que as ratas do grupo Ceta 5 passaram menos tempo no compartimento claro e mais tempo no compartimento escuro da caixa claro/escuro em comparação às ratas do grupo salina. Esses resultados indicam comportamento tipo-ansioso das ratas tratadas com 5 mg/kg de cetamina, de forma diferente da apresentada pelos demais estudos da literatura. Já as ratas do grupo Ceta 20 apresentaram aumento no número de cruzamentos e nas frequências nos dois comportamentos na caixa claro/escuro quando comparadas com as ratas do grupo salina. Esses resultados indicam maior agitação e locomoção pela caixa das ratas tratadas com a maior dose de cetamina. Assim, esses nossos resultados sugerem que a caixa claro/escuro não parece ser um teste comportamental sensível para avaliar o comportamento tipo-ansioso em ratas lactantes.

Grande parte dos estudos da literatura que avaliaram os efeitos de doses antidepressivas de cetamina no comportamento tipo-depressivo de roedores utilizou o teste do nado forçado. Diversos trabalhos mostraram que a administração única de doses variando de 10 a 50 mg/kg de cetamina causam efeito antidepressivo no nado forçado, evidenciado pela diminuição no tempo de imobilidade dos animais e aumento no tempo de nado (GARCIA et al., 2008b; BROWNE; LUCKI, 2013; YANG et al., 2013). Estudos com um tratamento prolongado (10 a 21 dias de tratamento) com doses antidepressivas de cetamina (5 a 20 mg/kg) também mostraram efeito antidepressivo desse fármaco (GARCIA et al., 2008a; TIZABI et al., 2012; PARISE et al., 2013; AKINFIRESOYE; TIZABI, 2013; RÉUS et al., 2015; KARA et al., 2017).

Nossos resultados mostraram que as ratas do grupo Ceta 20 apresentaram diminuição no tempo de imobilidade e aumento no tempo de nado em comparação com as ratas do grupo salina, sugerindo efeito antidepressivo desse fármaco, corroborando os achados da literatura anteriormente mencionados.

Deve ser ressaltado que, além dos parâmetros avaliados nos testes comportamentais já mencionados, foi observado a expressão de um comportamento anormal das ratas tratadas com 20 mg/kg de cetamina, evidenciado pela locomoção constante, agitada e sem propósito, pela perda de equilíbrio exibida durante os testes de comportamento materno e caixa claro/escuro, e pelo padrão de natação circular ininterrupto no teste de nado forçado. Essas observações sugerem o desenvolvimento de um comportamento estereotipado em virtude do tratamento prolongado com a maior dose de cetamina.

A estereotipia consiste em movimentos repetitivos e sem finalidade aparente; em roedores, ela se apresenta como a repetição de respostas como cheirar, lambear, morder, verticalização do corpo, escalar e ambulação (CARLINI, 2011). Desse modo, há a interrupção de comportamentos direcionados a um objetivo, como, por exemplo, alimentação e ingestão de água, para a expressão de comportamentos sem finalidade (WOLGIN, 2012).

O comportamento estereotipado se desenvolve devido a uma disfunção na neuroquímica cerebral dos animais, em especial no circuito corticoestriatal (FULFORD; MARSDEN, 2007). Diversos neurotransmissores estão envolvidos na modulação desse circuito cerebral, como dopamina, serotonina, opioides, GABA e glutamato, o que faz com que a neurobiologia da estereotipia seja complexa (LANGEN et al., 2011).

Condições ambientais adversas, como confinamento e estresse, podem levar os animais a desenvolverem um comportamento estereotipado (LANGEN et al., 2011). Diversas substâncias, como, anfetaminas, cocaína e neurolépticos, também são capazes de induzir estereotipia em animais (CARLINI, 2011; WOLGIN, 2012).

Diversos estudos da literatura mostram que a administração de antagonistas do receptor glutamatérgico NMDA, como a cetamina, induz o desenvolvimento de comportamento estereotipado em ratos (KOROS et al., 2007; DIX et al., 2010; KOTERMANSKI; JOHNSON; THIELS, 2013). Trofimiuk et al. (2019) mostraram que a administração de 4 mg/kg de cetamina, por via subcutânea, por 21 dias causou a

expressão de comportamento estereotipado em ratos. O estudo de Koros et al. (2007) mostrou que a administração de 8 e 16 mg/kg de cetamina, por via intraperitoneal, por três dias também provocou a expressão de comportamento estereotipado em ratos.

Radford et al. (2017) mostraram em seu estudo que, tanto a administração em *bolus* de cetamina (5 mg/kg em 1 h), quanto a administração via bomba de infusão (20 mg/kg/h) acarretaram em estereotipia em ratos machos adultos. Nossas observações do comportamento anormal das ratas tratadas com 20 mg/kg de cetamina estão de acordo com os dados da literatura, indicando a expressão de um comportamento estereotipado nesses animais.

Diversos trabalhos da literatura apontam que o efeito antidepressivo da cetamina está relacionado com a sua atuação nos sistemas de neurotransmissão glutamatérgico e GABAérgico (HOMAYOUN; MOGHADDAM, 2007; LI et al., 2010; LI et al., 2011; DREWNIAKY et al., 2015; LENER et al., 2016; PAYNE; MAGUIRE, 2019). Entretanto, esse fármaco também atua em outros sistemas de neurotransmissão que possuem papel importante na neurobiologia da depressão, especialmente os sistemas monoaminérgicos (HIROTA; LAMBERT, 1996; SILVA et al. 2010; ZANOS, et al. 2018). Desse modo, foi feita a dosagem dos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos e seus metabólitos, bem como a taxa de *turnover*, com o objetivo de avaliar se o tratamento prolongado com cetamina exerceria seu efeito antidepressivo no modelo de separação materna pelas vias monoaminérgicas.

As estruturas cerebrais selecionadas para essa avaliação foram as mesmas do Capítulo 1 devido a seu papel importante na neurobiologia da depressão. Nossos resultados mostraram poucas alterações nos sistemas monoaminérgicos no hipocampo, no córtex pré-frontal e no corpo estriado nos animais tratados com cetamina: 1) as ratas do grupo Ceta 5 apresentaram aumento dos níveis de NOR no córtex pré-frontal; 2) as ratas do grupo Ceta 10 apresentaram diminuição na taxa de *turnover* VMA/NOR no hipocampo; 3) as ratas do grupo Ceta 20 apresentaram aumento dos níveis de NOR e diminuição do *turnover* VMA/NOR no hipocampo e aumento na taxa de *turnover* HVA/DA no corpo estriado.

Poucos trabalhos da literatura avaliaram os efeitos da exposição a cetamina nos níveis de monoaminas cerebrais para o tratamento de depressão, sendo a

maioria com enfoque no sistema dopaminérgico. Kokkinou e colaboradores (2018), em sua revisão sistemática com metanálise, mostraram que o tratamento agudo com cetamina (doses variando de 10 a 50 mg/kg) aumentou os níveis de dopamina no córtex pré-frontal, corpo estriado e *nucleus accumbens* de roedores, sugerindo que o efeito antidepressivo da cetamina poderia ser consequência dessa alteração no sistema dopaminérgico. Nossos resultados mostraram apenas aumento da taxa de *turnover* HVA/DA nos animais do grupo tratado com maior dose, porém sem alteração nos níveis de DA ou de seu metabólito HVA, indicando que não há relevância nesse resultado.

Não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliaram os efeitos do tratamento com cetamina no sistema noradrenérgico cerebral. Nossos resultados mostraram alterações nos níveis de NOR e/ou no *turnover* VMA/NOR nos três grupos experimentais, porém em estruturas cerebrais diferentes. Esses achados, apesar de estatisticamente significantes, não apresentam significado relevante.

Não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliaram os efeitos do tratamento com cetamina no sistema noradrenérgico cerebral. Nossos resultados mostraram alterações nos níveis de NOR e/ou no *turnover* VMA/NOR nos três grupos experimentais, porém em estruturas cerebrais diferentes. Esses achados, apesar de estatisticamente significantes, não apresentam significado relevante.

Em relação a avaliação dos níveis de aminoácidos neurotransmissores, nossos resultados mostraram apenas alteração nos níveis de glutamato no córtex pré-frontal: as ratas do grupo Ceta 20 apresentaram aumento nos níveis desse neurotransmissor em comparação com as do grupo salina. Não foram encontradas alterações nos níveis dos demais aminoácidos neurotransmissores em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas.

A cetamina possui ação antagonista dos receptores glutamatérgicos, entretanto há evidências na literatura de que o tratamento agudo com doses subanestésicas desse fármaco ocasiona ativação transitória da neurotransmissão glutamatérgica no córtex pré-frontal antes do bloqueio dessa via (ABDALLAH et al., 2018). Essa ativação leva a ocorrência de outros processos intracelulares, como a liberação de BDNF, a ativação da sinalização mTORC1 e o aumento de síntese proteica (LEPACK et al., 2016). Os mecanismos pelos quais a cetamina induz essa ativação transitória dos receptores glutamatérgicos do córtex pré-frontal ainda não

são totalmente conhecidos, porém a principal hipótese é de que as doses subanestésicas de glutamato inibem preferencialmente os receptores NMDA em neurônios piramidais (ABDALLAH et al., 2018).

Nossos resultados mostraram aumento dos níveis de glutamato no córtex pré-frontal de ratas tratadas com 20 mg/kg de cetamina, bem como tendência de aumento nos níveis de glutamato nessa mesma estrutura de ratas tratadas com 10 mg/kg. Esses dados sugerem ativação transitória de glutamato no córtex pré-frontal com efeito dose-resposta, da mesma forma como mencionado nos trabalhos da literatura (LEPACK et al., 2016; ABDALLAH et al., 2018).

Assim, é possível inferir que a cetamina causou poucas alterações na neuroquímica cerebral de ratas induzidas à depressão pelo modelo de separação materna de modo a reverter esse quadro depressivo e que mais estudos devem ser feitos para elucidar a ação antidepressiva desse fármaco.

No Capítulo 1 foi discutido o papel importante de diversos hormônios (corticosterona, sexuais, hipotalâmicos e tireoidianos) na psicopatologia da depressão pós-parto e na expressão dos comportamentos avaliados no presente trabalho (BLOCH; DALY; RUBINOW, 2003; MAGUIRE; MODY, 2016; CAMARGO et al., 2017; PAYNE; MAGUIRE, 2019). Desse modo, neste capítulo, foi avaliado os efeitos da administração de doses subanestésicas de cetamina nos níveis séricos desses hormônios. Não foram encontrados trabalhos na literatura que estudaram os efeitos do tratamento com cetamina nos níveis hormonais em ratas lactantes, porém existem trabalhos que avaliaram as implicações desse fármaco em roedores adultos.

Não há concordância na literatura quanto aos efeitos da cetamina nas concentrações de corticosterona em roedores. Estudo realizado por Wang et al. (2019) mostrou que o tratamento agudo com 10 mg/kg de cetamina por via intraperitoneal diminuiu as concentrações plasmáticas de corticosterona de camundongos expostos a um modelo de estresse por 10 dias, mas não alterou os níveis desse hormônio em animais que não foram expostos a nenhum estresse. Garcia et al. (2009) mostraram em seu trabalho que a administração única e o tratamento por 7 dias com 15 mg/kg de cetamina por via intraperitoneal diminuíram as concentrações de corticosterona de ratos induzidos a depressão pelo modelo de estresse crônico imprevisível por 40 dias.

Entretanto, o trabalho de Clarke et al. (2017) mostrou que, tanto a exposição aguda a 5 mg/kg de cetamina por via intraperitoneal, quanto o tratamento prolongado com 10 mg/kg de cetamina por via intraperitoneal (1 vez por semana por 3 semanas) em camundongos induzidos a depressão por modelo de estresse não causaram alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona. Nossos resultados mostraram que o tratamento com doses subanestésicas de cetamina não alterou os níveis séricos de corticosterona das ratas ao final da lactação, corroborando os achados de Clarke et al. (2017).

Diversos estudos na literatura mostraram que fêmeas possuem maior sensibilidade a doses mais baixas de cetamina do que machos devido a ação dos hormônios gonadais (SALAND; SCHOEPFER; KABBAJ, 2016; SALAND; KABBAJ, 2018). Estudo de Carrier e Kabbaj (2013), em ratos, mostrou que fêmeas tratadas com dose única de 2,5, 5 e 10 mg/kg de cetamina por via intraperitoneal apresentaram diminuição no tempo de imobilidade no nado forçado e diminuição na latência para se alimentar no teste de supressão alimentar, enquanto apenas os machos tratados com as doses de 5 e 10 mg/kg apresentaram esses comportamentos.

Esse mesmo trabalho de Carrier e Kabbaj (2013) também mostrou que o tratamento com 2,5 mg/kg de cetamina por via intraperitoneal não teve efeito no comportamento de ratas ovariectomizadas no teste do nado forçado, sendo observado maior tempo de imobilidade. Contudo, ao serem tratadas com doses fisiológicas de estrógeno e progesterona, essas ratas ovariectomizadas que receberam cetamina diminuíram o tempo de imobilidade, indicativo de efeito antidepressivo desse fármaco. Esses resultados sugerem, portanto, a participação dos hormônios gonadais na resposta antidepressiva da cetamina. Nossos resultados mostraram que o tratamento com cetamina não alterou os níveis séricos de progesterona e estradiol nas ratas durante a lactação.

Em relação aos efeitos do tratamento da cetamina nos níveis séricos de FSH e LH, o estudo de Qi e colaboradores (2017) mostrou que o tratamento prolongado com doses altas de cetamina (40 e 60 mg/kg) diminuiu as concentrações séricas desses hormônios em ratos machos, indicando um efeito tóxico reprodutivo desse fármaco; já a dose de 20 mg/kg não alterou os níveis desses hormônios. Nossos resultados mostraram que o tratamento com doses subanestésicas de cetamina não

alteraram os níveis de FSH e de LH, corroborando os achados do trabalho de Qi et al. (2017).

Poucos trabalhos da literatura avaliaram os efeitos do tratamento com cetamina nos níveis séricos de prolactina em roedores, sendo todos estudos com o objetivo de elucidar as implicações da administração de doses anestésicas de cetamina nas concentrações de prolactina. Lawson e Gala (1975), em seu trabalho, mostraram que a exposição aguda a 50 mg/kg de cetamina por via intra-arterial diminuiu os níveis de prolactina em ratas ovariectomizadas e tratadas com estradiol. Estudos de Meltzer et al. (1978), Matzen, Knigge e Warberg (1987) e Nazian (1988) mostraram que a administração de dose única de 100 e 200 mg/kg de cetamina por via intraperitoneal ou intramuscular não alterou os níveis de prolactina em ratos machos adultos. Nossos resultados mostraram que nenhuma das doses subanestésicas de cetamina utilizadas alterou os níveis séricos de prolactina nas ratas, corroborando os achados dos trabalhos da literatura.

Em relação aos efeitos da cetamina nos níveis de ocitocina, não foram encontrados estudos que fizeram essa investigação em roedores. Entretanto, Huang et al. (2018) mostraram que indivíduos usuários de cetamina como droga de abuso apresentaram baixas concentrações plasmáticas basais de ocitocina e, após duas semanas de abstinência desse fármaco, os níveis de ocitocina aumentaram, porém ainda permaneceram abaixo dos observados nos indivíduos controle. Esses dados indicam que a cetamina afeta o metabolismo de ocitocina.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com cetamina não alterou os níveis séricos de ocitocina nas ratas ao final da lactação. Esses resultados não estão de acordo com os encontrados por Huang et al. (2018). Uma possível explicação para essa diferença nos resultados é a utilização de doses de cetamina e vias de administração distintas nos dois trabalhos. Aqui, os animais foram tratados por período prolongado com doses baixas de cetamina, enquanto no trabalho de Huang et al. (2018), apesar de não se saber a dose exata utilizada pelos indivíduos, sabe-se que estes são usuários e dependentes de cetamina como droga de abuso. A utilização da cetamina como droga de abuso se dá por diversas vias de administração e em doses mais altas do que as utilizadas nesse trabalho (WOLFF; WINSTOCK, 2006), assim, é possível que o regime de tratamento empregado aqui não seja suficiente para causar alteração nos níveis séricos de ocitocina.

São escassos os estudos da literatura que relacionam a exposição à cetamina com os níveis de hormônios tireoidianos, sendo os poucos trabalhos encontrados fizeram avaliações dos efeitos de doses anestésicas desse fármaco no metabolismo tireoidiano. Assim, estudo de Chikenji, Mtztjtani e Kitsukawa (1990) mostrou que a administração por infusão de 100 a 125 mg de cetamina como anestésico para cirurgia abdominal em seres humanos não interferiu nos níveis de TSH, T4 e rT3, porém diminuiu as concentrações de T3 uma hora após a administração do fármaco.

Massart et al. (1991), em seu estudo, observaram alteração na função de tirócitos humanos *in vitro* após tratamento com altas concentrações de cetamina, evidenciado pela inibição na produção de tireoglobulina e de T3. Contudo, essas alterações só foram observadas em concentrações acima das encontradas no plasma de seres humanos após uso terapêutico como anestésico desse fármaco. Nossos resultados mostraram que o tratamento com doses subanestésicas de cetamina não alterou os níveis séricos dos hormônios tireoidianos nas ratas tratadas durante a lactação, da mesma forma como observado nos trabalhos da literatura.

Apesar da ausência de alterações nos níveis dos hormônios tireoidianos, foi feita a avaliação dos efeitos do tratamento prolongado com doses subanestésicas de cetamina na expressão de RNA mensageiro de TRH e das desidases em diferentes estruturas cerebrais relacionadas com o desenvolvimento da depressão pós-parto.

Como já mencionado no Capítulo 1, o TRH e as desidases possuem papel importante no metabolismo dos hormônios tireoidianos no sistema nervoso central. Além disso, as alterações observadas por Massart et al. (1991) parecem estar relacionadas com alterações no funcionamento das desidases. Nossos resultados mostraram que o tratamento com doses subanestésicas de cetamina não alterou a expressão de RNA mensageiro de nenhum dos genes avaliados em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas. Esses resultados em conjunto com as dosagens dos hormônios tireoidianos sugerem que doses subanestésicas de cetamina não influenciam o funcionamento do metabolismo tireoidiano.

Como já discutido no Capítulo 1, as respostas anti-inflamatórias desempenham papel importante na psicopatologia da depressão. Assim, foi feita a dosagem das citocinas pró-inflamatórias com o objetivo de estudar se o tratamento prolongado com cetamina exerceria algum efeito sobre essas citocinas.

Wang et al. (2015) mostraram que a administração única de 10 mg/kg por via intraperitoneal foi capaz de diminuir os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase no hipocampo de ratos após serem submetidos pelo modelo de estresse crônico imprevisível. Estudo de Réus et al. (2015) mostrou que a administração de 15 mg/kg de cetamina por via intraperitoneal por 14 dias foi capaz de reduzir os níveis séricos das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 em ratos adultos após privação materna na infância. Nossos resultados não mostraram diferenças entre as ratas tratadas com cetamina e as tratadas com solução salina, indicando que a cetamina não foi capaz de causar alterações nos níveis séricos de citocinas como os demais trabalhos da literatura.

Esses dados tomados em conjunto sugerem que o tratamento prolongado com doses subanestésicas de cetamina não causou efeito antidepressivo em ratas induzidas à depressão pós-parto pelo modelo de separação materna, uma vez que foram encontradas poucas alterações no comportamento materno, na caixa claro/escuro e na neuroquímica cerebral. Além disso, a dose de 20 mg/kg foi capaz de induzir um comportamento estereotipado, evidenciado pelo comportamento anormal exibido por essas ratas nos testes de comportamento materno, caixa claro/escuro e nado forçado.

3.6 CONCLUSÃO

O tratamento prolongado com doses subanestésicas de cetamina em ratas lactantes induzidas a depressão pelo modelo de separação materna:

- Causou diminuição no ganho de peso das ratas tratadas com 5 mg/kg no final da lactação;
- Causou comprometimento do comportamento materno nas ratas tratadas com 10 e 20 mg/kg;
- Induziu comportamento tipo-ansioso nas ratas tratadas com 5 mg/kg avaliadas na caixa claro/escuro;
- Induziu comportamento estereotipado nas ratas tratadas com 20 mg/kg, evidenciado por comportamento anormal nos testes de comportamento materno, caixa claro/escuro e nado forçado;
- Induziu poucas alterações na neuroquímica do hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado;
- Não alterou os níveis séricos hormonais;
- Não alterou a expressão de RNA mensageiro de genes cerebrais;
- Não alterou os níveis de citocinas pró-inflamatórias.

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, n.8, p.689–697, 2016.

ABDALLAH, C.G.; JIANG, L.; DE FEYTER, H.M.; FASULA, M.; KRYSTAL, J.H.; ROTHMAN, D.L.; MASON, G.F.; SANACORA, G. Glutamate metabolism in major depressive disorder. **The American Journal of Psychiatry**, v.171, n.12, p.1320–1327, 2014.

ABDALLAH, C.G.; SANACORA, G.; DUMAN, R.S.; KRYSTAL, J.H. The neurobiology of depression, ketamine and rapid-acting antidepressants: Is it glutamate inhibition or activation? **Pharmacology & Therapeutics**, v.190, p.148-158, 2018.

AKINFIRESOYE, L.; TIZABI, Y. Antidepressant effects of AMPA and ketamine combination: role of hippocampal BDNF, synapsin, and mTOR. **Psychopharmacology (Berlin)**, v.230, n.2, p.291–298, 2013.

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, n.4, p.687-700, 2003.

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, n.4, p.351–354, 2000.

BLOCH, M.; DALY, R.C.; RUBINOW, D.R. Endocrine factors in the etiology of postpartum depression. **Comprehensive Psychiatry**, v.44, n.3, p.234–246, 2003.

BOSCH, O.J.; MEDDLE, S.L.; BEIDERBECK, D.I.; BRANTEN, A.J. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. **The Journal of Neuroscience**, v.25, p.6807–6815, 2005.

BROWNE, C.A.; LUCKI, I. Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants. **Frontiers of Pharmacology**, v.4, n.161, p.1-18, 2013.

CAMARGO, E.R.L.A.; ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; FUKUSHIMA, A.R.; SPINOSA, H.S. Comportamento materno: uma revisão da inter-relação com a toxicologia do desenvolvimento em roedores. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, v.17, n.1, p.8-25, 2017.

CARLINI, E.A. Modelos animais para o estudo de drogas neurolépticas. In: CARLINI, E.A.; MENDES, F.R. **Protocolos em psicofarmacologia comportamental**. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011. p.267-291.

CARRIER, N.; KABBAJ, M. Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. **Neuropharmacology**, v.70, p.27–34, 2013.

CAVALCANTE, L.E.S.; ZINN, C.G.; SCHIDT, S.D.; SAENGER, B.F.; FERREIRA, F.F.; FURINI, C.R.G.; MYSKIW, J.C.; IZQUIERDO, I. Modulation of the storage of social recognition memory by neurotransmitter systems in the insular cortex. **Behavioral Brain Research**, v.334, p.129-134, 2017.

CHIKENJI, T.; MTZJTANI, M.; KITSUKAWA, Y. Anaesthesia, not surgical stress, induces increases in serum concentrations of reverse triiodothyronine and thyroxine during surgery. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v.95, n.2, p.217-223, 1990.

CLARKE, M.; RAZMJOU, S.; PROWSE, N.; DWYER, Z.; LITTELJOHN, D.; PENTZ, R.; ANISMAN, H.; HAYLEY, S. Ketamine modulates hippocampal neurogenesis and pro-inflammatory cytokines but not stressor induced neurochemical changes. **Neuropharmacology**, v.112(pt A), p.210-220, 2017.

COVINGTON, H.E.; NEWMAN, E.L.; TRAN, S.; WALTON, L.; HAYEK, W.; LEONARD, M.Z.; DEBOLD, J.F.; MICZEK, K.A. The urge to fight: persistent escalation by alcohol and role of NMDA receptors in mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.12, p.1-14, 2018.

CZÉH, B.; FUCHS, E.; WIBORG, O.; SIMON, M. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.64, p.293–310, 2016.

DIAZGRANADOS, N.; IBRAHIM, L.; BRUTSCHE, N.E.; NEWBERG, A.; KRONSTEIN, P.; KHALIFE, S.; KAMMERER, W.A.; QUEZADO, Z.; LUCKENBAUGH, D.A.; SALVADORE, G.; MACHADO-VIEIRA, R.; MANJI, H.K.; ZARATE JR, C.A. A Randomized add-on trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant bipolar depression. **Archives of General Psychiatry**, v.67, n.8, p.793-802, 2010.

DIX, S.; GILMOUR, G.; POTTS, S.; SMITH, J.W.; TRICKLEBANK, M. A within-subject cognitive battery in the rat: differential effects of NMDA receptor antagonists. **Psychopharmacology (Berlin)**, v.212, n.2, p.227-242, 2010.

DREWNIAKY, 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, n.2, 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, n.2, p.359-369, 2009.

FULFORD, A.J.; MARSDEN, C.A. An intact dopaminergic system is required for context-conditioned release of 5-HT in the nucleus accumbens of postweaning isolation-reared rats. **Neuroscience**, v.149, n.2, p.392-400, 2007.

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, n.6, p.502-506, 2008a.

GARCIA, L.S.B.; COMIM, C.M.; VALVASSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; BARBOSA, L.M.; ANDREAZZA, A.C.; STERTZ, L.; FRIES, G.R.; GAVIOLI, E.C.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.32, n.1, p.140-144, 2008b.

GARCIA, L.S.B.; COMIM, C.M.; VALVASSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; STERTZ, L.; KAPCZINSKI, F.; GAVIOLI, E.C.; QUEVEDO, J. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.33, n.3, p.450-455, 2009.

GRUNEBaum, M.F.; GALFALVY, H.C.; CHOO, T.H.; KEILP, J.G.; MOITRA, V.K.; PARRIS, M.S.; MARVER, J.E.; BURKE, A.K.; MILAK, M.S.; SUBLETT, M.E.; OQUENDO, M.A.; MANN, J.J. Ketamine for rapid reduction of suicidal thoughts in

major depression: a midazolam-controlled randomized clinical trial. **The American Journal of Psychiatry**, v.175, n.4, p.327-335, 2018.

HARRAZ, M.M.; TYAGI, R.; CORTES, P.; SNYDER, S.H. Antidepressant action of ketamine via mTOR is mediated by inhibition of nitroergic Rheb degradation. **Molecular Psychiatry**, v.21, n.3, p.313-319, 2016.

HASHIKAWA, K.; HASHIKAWA, Y.; LISCHINSKY, J.; LIN, D. The neural mechanisms of sexually dimorphic aggressive behaviors. **Trends in Genetics**, v.34, n.10, p.755-776, 2018.

HASLER, G.; VAN DER VEEN, J.W.; TUMONIS, T.; MEYERS, N.; SHEN, J.; DREVETS, W.C. Reduced prefrontal glutamate/glutamine and γ -aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. **Archives of General Psychiatry**, v.64, n.2, p.193–200, 2007.

HIROTA, K.; LAMBERT, D.G. Ketamine its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. **British Journal of Anesthesia**, v.77, n.4, p.441-444, 1996.

HOMAYOUN, H.; MOGHADDAM, B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. **The Journal of Neuroscience**, v.27, n.43, p.11496-11500, 2007.

HUANG, M.C.; CHEN, L.Y.; CHANG, H.M.; LIANG, X.Y.; CHEN, C.K.; CHENG, W.J.; XU, K. Decreased blood levels of oxytocin in ketamine-dependent patients during early abstinence. **Frontiers in Psychiatry**, v.9, p.1-7, 2018.

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.

JIANG, Y.; WANG, Y.; SUN, X.; LIAN, B.; SUN, H.; WANG, G.; DU, Z.; LI, Q.; SUN, L. Short and long-term antidepressant effects of ketamine in a rat chronic unpredictable stress model. **Brain and Behavior**, v.7, n.8, p.1-11, 2017.

KARA, N.Z.; AGAM, G.; ANDERSON, G.W.; ZITRON, N.; EINAT, H. Lack of effect of chronic ketamine administration on depression-like behavior and frontal cortex autophagy in female and male ICR mice. **Behavioural Brain Research**, v.317, p.576–580, 2017.

KHORRAMZADEH, E.; LOTFY, A.O. The use of ketamine in psychiatry. **Psychosomatics**, v.14, n.6, p.344-346, 1973.

KOKKINO, M.; ASHOK, 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.59-69, 2018.

KOROS, E.; ROSENBROCK, H.; BIRK, G.; WEISS, C.; SAMS-DODD, F. The selective mGlu5 receptor antagonist MTEP, similar to NMDA receptor antagonists, induces social isolation in rats. **Neuropsychopharmacology**, v.32, p.562-576, 2007.

KOTERMANSKI, S.E.; JOHNSON, J.W.; THIELS, E. Comparison of behavioral effects of the NMDA receptor channel blockers memantine and ketamine in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.109, p.67-76, 2013.

KUMAR, V.; BHAT, Z.A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: A comprehensive review. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.68, n.2, p.175–183, 2013.

LANGEN, M.; KAS, M.J.H.; STAAL, W.G.; VAN ENGELAND, H.; DURSTON, S. The neurobiology of repetitive behavior: of mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.35, n.3, p.345–355, 2011.

LAWSON, D.M.; GALA, R.R. Influence of anaesthetics on basal, perphenazine-induced and thyrotrophin releasing hormone-induced prolactin secretion in ovariectomized, oestrogen-treated rats. **Journal of Endocrinology**, v.66, n.2, p.151-157, 1975.

LENER, M.S.; NICIU, M.J.; BALLARD, E.D.; PARK, M.; PARK, L.T.; NUGENT, A.C.; ZARATE JR, C.A. Glutamate and gamma-aminobutyric acid systems in the pathophysiology of major depression and antidepressant response to ketamine. **Biological Psychiatry**, v.81, n.10, p.886-897, 2016.

LEPACK, A.E.; BANG, E.; LEE, B.; DWYER, J.M.; DUMAN, R.S. Fast-acting antidepressants rapidly stimulate ERK signaling and BDNF release in primary neuronal cultures. **Neuropharmacology**, v.111, p.242-252, 2016.

LÉVY, F.; KELLER, M.; POINDRON, P. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. **Hormones and Behavior**, v.46, n.3, p.284–302, 2004.

LI, N.; LEE, B.; LIU, R.J.; BANASR, M.; DWYER, J.M.; IWATA, M.; LI, X.Y.; AGHAJANIAN, G.; DUMAN, R.S. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v.329, n.5994, p.959–964, 2010.

LI, N.; LIU, R.J.; DWYER, J.M.; BANASR, M.; LEE, B.; SON, H. LI, X.Y.; AGHAJANIAN, G.; DUMAN, R.S. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. **Biological Psychiatry**, v.69, n.8, p.754-761, 2011.

MA, J.; WANG, S.; YU, H.; LI, D.; LUO, S.; ZHENG, S.; WAN, L.; DUAN K. 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, n.4, p.349-352, 2008.

MAGUIRE, J.; MODY, I. Behavioral deficits in juveniles mediated by maternal stress hormones in mice. **Neural Plasticity**, v.16, p.1-13, 2016.

MASSART, C.; LE TELLIER, C.; MALLÉDANT, Y.; LECLECH, G.; NICOL, M. Modulation of the functional properties of human thyrocytes in monolayer or follicle culture: effects of some anaesthetic drugs. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.7, n.1, p.57-62, 1991.

MATZEN, S.; KNIGGE, U.; WARBERG, J. Effect of anaesthetics on PRL and LH secretion in rats. **Acta Endocrinologica (Copenh)**, v.115, n.4, p.528-536, 1987.

MELTZER, H.Y.; STANISIC, D.; SIMONOVIC, M.; FANG, V.S. Ketamine as an anesthetic for obtaining plasma for rat prolactin assay. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.159, p.12-15, 1978.

NAZIAN, S.J. Serum concentrations of reproductive hormones after administration of various anesthetics to immature and young adult male rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.187, n.4, p.482-487, 1988.

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. **Biological Psychiatry**, v.74, n.10, p.750-759, 2013.

PAYNE, J.L.; MAGUIRE, J. Pathophysiological mechanisms implicated in postpartum depression. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.52, p.165-180, 2019.

QI, L.; LIU, J.Y.; ZHU, Y.L.; LIU, W.; ZHANG, S.D.; LIU, W.B.; JIANG, J.J. Toxic effects of ketamine on reproductive system via disrupting hypothalamic-pituitary-testicular axis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.21, n.8, p.1967-1973, 2017.

RADFORD, K.D.; PARK, T.Y.; LEE, B.H.; MORAN, S.; OSBORNE, L.A.; CHOI, K.H. Dose-response characteristics of intravenous ketamine on dissociative stereotypy, locomotion, sensorimotor gating, and nociception in male Sprague-Dawley rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.153, p.130-140, 2017.

RÉUS, G.Z.; NACIF, M.P.; ABELAIRA, H.M.; TOMAZ, D.B.; SANTOS, M.A.B.; CARLESSI, A.S.; LUZ, J.R.; GONÇALVES, R.C.; VUOLO, F.; DAL-PIZZOL, F.; CARVALHO, A.F.; QUEVEDO, J. Ketamine ameliorates depressive-like behaviors and immune alterations in adult rats following maternal deprivation. **Neuroscience Letters**, v.584, p.83–87, 2015.

SALAND, S.K.; KABBAJ, M. Sex Differences in the pharmacokinetics of low-dose ketamine in plasma and brain of male and female rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.367, n.3, p.393-404, 2018.

SALAND, S.K.; SCHOEPPER, K.J.; KABBAJ, M. Hedonic sensitivity to low-dose ketamine is modulated by gonadal hormones in a sex-dependent manner. **Scientific Reports**, v.6, p.1-16, 2016.

SHIN, S.Y.; BAEK, N.J.; HAN, S.H.; MIN, S.S. Chronic administration of ketamine ameliorates the anxiety- and aggressive-like behavior in adolescent mice induced by neonatal maternal separation. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v.23, n.1, p.81-87, 2019.

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**, v.18, n.2, p.227-237, 2010.

STRASBURGER, S.E.; BHIMANI, P.M.; KAABE, J.H.; KRYSIAK, J.T.; NANCHANATT, D.L.; NGUYEN, T.N.; POUGH, 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**, v.42, n.2, p.147-154, 2017.

TAKAHASHI, R.N.; MORATO, G.S.; MONTEIRO-DE-LIMA, T.C. Effects of ketamine on experimental animal models of aggression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.17, n.2, p.171-178, 1984.

TAN, S.; WANG, Y.; CHEN, K.; LONG, Z.; ZOU, J. Ketamine alleviates depressive-like behaviors via down-regulating inflammatory cytokines induced by chronic restraint stress in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.40, n.8, p.1260-1267, 2017.

TIZABI, Y.; BHATTI, B.H.; MANAYE, K.F.; DAS, J.R.; AKINFIRESOYE, L. Antidepressant-like effects of low ketamine dose is associated with increased hippocampal AMPA/NMDA receptor density ratio in female Wistar–Kyoto rats. **Neuroscience**, v.213, p.72–80, 2012.

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

VAN CALKER, D.; SERCHOV, T.; NORMANN, C.; BIBER, K. Recent insights into antidepressant therapy: distinct pathways and potential common mechanisms in the treatment of depressive syndromes. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v.88, p.63-72, 2018.

VANDE VOORT, J.L.; MORGAN, R.J.; KUNG, S.; RASMUSSEN, K.G.; RICO, J.; PALMER, B.A.; SCHAK, K.M.; TYE, S.J.; RITTER, M.J.; FRYE, M.A.; BOBO, W.V. Continuation phase intravenous ketamine in adults with treatment-resistant depression. **Journal of Affective Disorders**, v.206, p.300–304, 2016.

VETULANI, J. Early maternal separation: a rodent model of depression on a prevailing human condition. **Pharmacological Reports**, v.65, n.6, p.1451-1461, 2013.

WANG, W.; LIU, L.; YANG, X.; GAO, H.; TANG, Q.K.; YIN, L.Y.; YIN, X.Y.; HAO, J.R.; GENG, D.Q.; GAO, C. Ketamine improved depressive-like behaviors via

hippocampal glucocorticoid receptor in chronic stress induced- susceptible mice. **Behavioural Brain Research**, v.364, p.75-84, 2019.

WANG, N.; YU, H.Y.; SHEN, X.F.; GAO, Z.Q.; YANG, C.; YANG, J.J.; ZHANG, G.F. The rapid antidepressant effect of ketamine in rats is associated with down-regulation of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v.120, n.4, p.241-248, 2015.

WOLGIN, D.L. Amphetamine stereotypy, the basal ganglia, and the "selection problem". **Behavioural Brain Research**, v.231, n.2, p.297-308, 2012.

WOLFF, K.; WINSTOCK, A.R. Ketamine: from medicine to misuse. **CNS Drugs**, v.20, n.3, p.199–218, 2006.

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. **Progress in 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 Reports**, v.6, p.1-12, 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, n.5, p.1167-1174, 2017.

YAMAMURO, Y. Exposure to common anesthetic agents alters pup-retrieval response in lactating rats. **Experimental Animals**, v.54, n.4, p.369-372, 2005.

YANG, C.; HUM Y.; ZHOU, Z.; ZHANG, G.; YANG, J. Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v.118, n.1, p.3–8, 2013.

YILDIZ-YESILOGLU, A.; ANKERST, D.P. Review of 1H magnetic resonance spectroscopy findings in major depressive disorder: a meta-analysis. **Psychiatry Research**, v.147, n.1, p.1–25, 2006.

YILMAZ, A.; SCHULZ, D.; AKSOY, A.; CANBEYLI, R. Prolonged effect of an anesthetic dose of ketamine on behavioral despair. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v.71, n.1-2, 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, n.1, p.24–35, 2020.

ZANOS, P.; MOADDEL, R.; MORRIS, P.J.; RIGGS, L.M.; HIGHLAND, J.N.; GEORGIU, P.; PEREIRA, E.F.R.; ALBUQUERQUE, E.X.; THOMAS, C.J.; ZARATE, C.A.; GOULD, T.D. Ketamine and ketamine metabolite pharmacology: insights into therapeutic mechanisms. **Pharmacological Reviews**, v.70, n.3, p.621-660, 2018.

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 an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Archives of General Psychiatry**, v.63, n.8, p.856–864, 2006.

ANEXO 1

Novas tendências do uso da cetamina nos transtornos de depressão: implicações no desenvolvimento da prole¹

JULIA ZACCARELLI-MAGALHÃES

Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.
E-mail: julia.zaccarelli@usp.br

ANDRÉ RINALDI FUKUSHIMA

Universidade São Judas Tadeu (USJT), São Paulo, SP, Brasil.
E-mail: prof.rinaldi@usjt.br

ESTHER LOPES RICCI

Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM), São Paulo, SP, Brasil.
E-mail: estherlopesricci@gmail.com

HELENICE DE SOUZA SPINOSA

Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.
E-mail: hspinosa@usp.br

Resumo

Os receptores glutamatérgicos NMDA são apontados como potenciais alvos de novas terapias para o tratamento da depressão, sendo a cetamina, um antagonista desses receptores, uma dessas terapias. Considerando que há uma tendência para a ampliação do uso clínico da cetamina como antidepressivo e que há poucas informações sobre a segurança e eficácia do seu uso prolongado e no período perinatal, esta revisão tem como objetivo apresentar as informações mais recentes sobre os efeitos da depressão no desenvolvimento da prole e o possível uso da cetamina como tratamento para a depressão pós-parto. Para tanto, foi realizado levantamento bibliográfico em diretrizes e periódicos obtidos nas bases de dados SciELO, PubMed e ScienceDirect, entre os anos de 2000 e 2017, utilizando os seguintes termos

¹ Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Recebido em: 07.10.2017

Aprovado em: 05.04.2018

como critérios de inclusão: depressão, depressão pós-parto, cetamina, antidepressivo e escetamina. Os trabalhos selecionados mostraram que a terapêutica tradicional para o tratamento da depressão durante o período pós-parto apresenta riscos para o desenvolvimento da progênie, e, por isso, são necessários estudos que gerem o desenvolvimento de novas terapias para essa doença. A cetamina tem potencial promissor para o tratamento dos transtornos depressivos no geral, incluindo a depressão pós-parto, minimizando os riscos para o desenvolvimento da prole.

Palavras-chave

Cetamina. Depressão. Desenvolvimento. Progênie. Antidepressivo.

INTRODUÇÃO

A depressão é uma das doenças mais comuns e mentalmente incapacitantes atualmente no mundo (HOLUBOVA et al., 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 350 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 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; STRASBURGER 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), incapacitando-os para o trabalho e demais atividades da vida.

Existem diversos subtipos de depressão, e a depressão pós-parto se destaca entre eles por afetar tanto a saúde da mãe quanto o desenvolvimento da progênie (MORAES et al., 2006). Essa doença ocorre nas primeiras semanas após o parto e afeta uma a cada sete mulheres no mundo atual (FRIEDMAN; RESNICK, 2009; XIA et al., 2016). Também é considerada a principal complicação do parto, e cerca de 50% das mulheres com essa doença não são diagnosticadas e não recebem o tratamento adequado (FRIEDMAN; RESNICK, 2009).

Há vários tratamentos farmacológicos e não farmacológicos para a depressão, incluindo antidepressivos, terapia eletroconvulsiva e psicoterapia; apesar da variedade de terapias existentes, muitos pacientes não conseguem seguir o tratamento até o final (ZAJECKA, 2000).

Assim como nos outros subtipos de depressão, o tratamento para a depressão pós-parto também emprega meios farmacológicos e não farmacológicos. Uma das grandes preocupações com o tratamento farmacológico é de que esses medicamentos podem afetar a progênie por meio da amamentação

ANEXO 2

Pharmacological Reports
<https://doi.org/10.1007/s43440-019-00014-z>

ARTICLE

Preclinical toxicological study of prolonged exposure to ketamine as an antidepressant

Julia Zaccarelli-Magalhães¹ · André Rinaldi Fukushima¹ · Natalia Moreira¹ · Marianna Manes¹ · Gabriel Ramos de Abreu¹ · Esther Lopes Ricci^{2,3} · Paula A. Faria Waziry⁴ · Helenice de Souza Spinosa¹

Received: 17 April 2019 / Revised: 7 August 2019 / Accepted: 26 September 2019
© Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences 2019

Abstract

Background Depression is one of the most common mentally debilitating diseases in the world. Ketamine has been recently identified as a potential novel antidepressant. Further animal model evaluations of the use of ketamine as an antidepressant are necessary to determine safety parameters for clinical use. Therefore, the objective of this study was to perform toxicological tests of prolonged treatment using three different doses of ketamine in adult male rats.

Methods The animals were divided into four groups: three treated with 5, 10 or 20 mg/kg of ketamine and a control group treated with saline solution. Intraperitoneal route of treatment was administered daily for 3 weeks. Body weight, water and food intake were measured once a week, as well as evaluation of the functional observational battery, which includes methodic monitoring of motor activity, motor coordination, behavioral changes, and sensory/motor reflex responses. Upon completion of treatment period, all animals were euthanized by decapitation followed by immediate collection of samples, which included brain structures and blood for neurochemical, hematological and biochemical analyses.

Results Rats treated with the highest tested dosage (20 mg/kg) of ketamine had lower weight gain in the 1st and 2nd weeks of treatment and all experimental groups had measurable alterations in the serotonergic system.

Conclusions Our data indicate that the alterations observed are minor and due to a predicted mechanism of action, which implies that ketamine is a promising drug for repurposing as an antidepressant.

Keywords Ketamine · Antidepressant · Toxicological safety · Neurochemistry · Biochemistry