



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE
FARMÁCIA

DIOGO FERREIRA SANTANA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO DO MANGANÊS EM
ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DO NADO FORÇADO

BRASÍLIA

2015

DIOGO FERREIRA SANTANA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO DO MANGANÊS EM
ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DO NADO FORÇADO**

Trabalho de conclusão de curso de Graduação submetido à Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDUARDO PANDOSSIO

CO-ORIENTADORA: PROF^a.DR^a VIVIAN DA SILVA SANTOS

BRASÍLIA
2015

Nome: SANTANA, Diogo Ferreira

Título: Avaliação do potencial antidepressivo do manganês em animais submetidos ao modelo do nado forçado.

Trabalho de conclusão de curso de Graduação submetido à Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

Prof. Dr. José Eduardo Pandossio

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família: Aucenir, Iara, Dafne, Julio e Helena pelo amor incondicional e por todo apoio e incentivo durante essa etapa de aprendizado.

Aos colegas de laboratório Adriana Tiemi, Isadora Monteiro, Matheus Tavares, Michelly Gonçalves por todo o suporte prestado ao longo desse longo período de experimentos.

Ao Laboratório de Processos Básicos em Psicologia da Universidade Católica de Brasília, Isabelle, Raphael e Vinícius por ter cedido gentilmente o espaço para a realização dos experimentos.

À prof^a Dra. Vivian da Silva Santos pelo auxílio nos procedimentos práticos e teóricos desse trabalho.

Ao meu orientador Prof^o Dr. José Eduardo Pandossio por toda dedicação, paciência, por suas correções e incentivos, pela oportunidade de realizar esse trabalho e pela confiança depositada em mim.

RESUMO

O manganês (Mn) é um metal que, além da comprovada essencialidade, pode modular a ação de substâncias endógenas, como os neurotransmissores. Uma das ferramentas experimentais utilizadas para o estudo dessa modulação é o modelo do nado forçado, idealizado como um contexto que envolve aspectos relacionados à depressão e aos neurotransmissores implicados nesse processo. Baseado nisso, este trabalho teve como objetivo comparar os efeitos da administração de Mn, por 30 dias, em animais machos e fêmeas, submetidos aos modelos do nado forçado e do campo aberto. Nesse sentido, ratos Wistar machos (n=36) e fêmeas (n=35) foram subdivididos nos grupos salina (n=16), imipramina (n=15), Mn 1mg/kg (n=20) e Mn 5mg/kg (n=20) e, após 30 dias com administração diária dos diferentes tratamentos, foram submetidos ao treino no nado forçado, por 15min. Após 24h, foram submetidos ao teste por 5min, seguido pelo campo aberto para avaliação de possível sedação. No nado forçado, os resultados apontaram para um aumento do tempo de imobilidade para o grupo Mn 1mg/kg, em machos e fêmeas, em comparação com outros grupos, enquanto que, no campo aberto, houve uma diminuição na frequência de cruzamentos e levantamentos, bem como um aumento da latência para a mobilidade para o grupo Mn 5mg/kg, diferindo dos outros. Em conjunto, tem-se a indução de um efeito pró-depressivo no nado forçado, corroborado pela hipoatividade encontrada no campo aberto, sugerindo que o Mn pode contribuir para a redução de noradrenalina.

Palavras-chave: manganês, nado forçado, campo aberto, depressão.

ABSTACT

Manganese (Mn) is a metal that, moreover its essenciality, it can modulate the action of endogenous substances, as neurotransmitters. One of the experimental tools used to study this modulation is the forced swim test, applied as a context concerning aspects related to depression and neurotransmitters involved in this process. Based on this, the objective of this work was to compare the Mn effects, for 30 days, in male and female animals, submitted to forced swim and open field tests. In this sense, male (n=36) and female (n=35) Wistar rats were divided into saline (n=16), imipramine (n=15), Mn 1mg/kg (n=20) and Mn 5mg/kg (n=20) groups and, after 30 days of different daily treatment administration, they were submitted to the forced swim training, for 15min. Post 24h, the rats were submitted to the test for 5min, followed by open field to evaluate a putative sedation. In the forced swim test, the results indicated a higher time of immobility in male and female Mn 1mg/kg groups, compared to the others, while, in the open field, there were lower crossing and rearing frequencies, and also a higher latency to mobility in male and female Mn 5mg/kg groups, differing from the others. Taken together, there is a pro-depressive effect induced in the forced swim test, reforced by the hypoactivity verified in the open field, suggesting that Mn can contribute to the noradrenaline reduction.

Keywords: manganese, forced swim, open field, depression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia representativa dos animais agrupados por gaiola..	17
Figura 2 - Fotografia representativa do modelo do nado forçado.....	19
Figura 3 - Fotografia representativa do modelo do campo aberto.....	20
Figura 4 - Efeito das variadas substâncias sobre a latência para imobilidade (em s) para animais submetidos ao nado forçado.....	21
Figura 5 - Efeito das variadas substâncias sobre a latência para imobilidade (em s) para animais machos e fêmeas submetidos ao nado forçado.....	22
Figura 6 - Efeito das variadas substâncias sobre a latência para imobilidade (em s) para animais submetidos ao nado forçado.....	23
Figura 7 - Efeito das variadas substâncias sobre o tempo de imobilidade (em s) para animais submetidos ao nado forçado.....	24
Figura 8 - Efeito das variadas substâncias sobre o tempo de imobilidade (em s) para animais machos e fêmeas submetidos ao nado forçado.....	24
Figura 9 - Efeito das variadas substâncias sobre o tempo de imobilidade (em s) para animais submetidos ao nado forçado.....	25
Figura 10 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de bolos fecais para animais submetidos ao nado forçado.....	26
Figura 11 - Efeito das variadas substâncias sobre sobre a frequência de bolos fecais para animais machos e fêmeas submetidos ao nado forçado.....	27
Figura 12 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de bolos fecais para animais submetidos ao nado forçado.....	28
Figura 13 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de cruzamentos entre quadrantes para animais submetidos ao campo aberto.....	29
Figura 14 - Efeito das variadas substâncias sobre sobre a frequência de cruzamentos entre quadrantes para animais machos e fêmeas submetidos ao campo aberto.....	29
Figura 15 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de cruzamentos entre quadrantes para animais submetidos ao campo aberto.....	30

Figura 16 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de levantamentos para animais submetidos ao campo aberto.....	31
Figura 17 - Efeito das variadas substâncias sobre sobre a frequência de levantamentos para animais machos e fêmeas submetidos ao campo aberto.....	31
Figura 18 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de levantamentos para animais submetidos ao campo aberto.....	32
Figura 19 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de autolimpeza para animais submetidos ao campo aberto.....	33
Figura 20 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de autolimpeza para animais machos e fêmeas submetidos ao modelo do campo aberto.....	33
Figura 21 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de autolimpeza para animais submetidos ao modelo do campo aberto.....	34
Figura 22 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de bolos fecais para animais submetidos ao modelo do campo aberto.....	35
Figura 23 - Efeito das variadas substâncias sobre sobre a frequência de bolos fecais para animais machos e fêmeas submetidos ao modelo do campo aberto.....	35
Figura 24 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de bolos fecais para animais submetidos ao modelo do campo aberto.....	36
Figura 25 - Efeito das variadas substâncias sobre a latência para mobilidade (em s) para animais submetidos ao modelo do campo aberto.....	37
Figura 26 - Efeito das variadas substâncias sobre a latência para mobilidade (em s) para animais animais machos e fêmeas submetidos ao modelo do campo aberto.....	37
Figura 27 - Efeito das variadas substâncias sobre a latência para mobilidade (em s) para animais submetidos ao modelo do campo aberto.....	38
Figura 28 - Fotografia representativa dos animais durante o tratamento com Mn 10mg/kg.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema de realização dos procedimentos com as drogas/ doses e quantidade de animais utilizados para cada grupo.....	18
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido 5-hidróxi indol acético
5-HT	Serotonina
CA1	Corno de Amon 1
CA3	Corno de Amon 3
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-diidroxifenilacético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F	F estatístico ou razão de F
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
i.p.	Intraperitonal
Mn	Manganês
NADR	Noradrenalina
p	p estatístico ou nível de significância
s	segundos
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
\bar{x}	Média aritmética

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. Justificativa.....	17
4. Metodologia.....	17
4.1 Animais.....	17
4.2 Drogas e doses.....	18
4.3 Procedimento.....	19
4.3.1 Teste do nado forçado.....	19
4.3.2. Teste do campo aberto.....	20
4.4 Análise estatística.....	20
5. Resultados.....	21
5.1 Modelo do nado forçado.....	21
5.1.1 Latência para imobilidade.....	21
5.1.2 Tempo de imobilidade.....	23
5.1.3 Frequência de bolos fecais.....	25
5.2 Modelo do campo aberto.....	27
5.2.1 Frequência de cruzamentos entre quadrantes.....	27
5.2.2 Frequência de levantamentos	29
5.2.3 Frequência de autolimpeza.....	32
5.2.4 Frequência de bolos fecais	34
5.2.5 Latência para a mobilidade.....	36
5.3 Administração de Mn na dose de 10mg/kg.....	38
6. Discussão.....	39
7. Conclusões	42
8.Referências Bibliográficas.....	43
Comprovante de aprovação do trabalho pelo Comitê de ética.....	49

1. INTRODUÇÃO

O Manganês (Mn) é um elemento químico de essencialidade comprovada em humanos, uma vez que a sua deficiência no organismo pode levar a déficits de crescimento, anormalidades ósseas e desordens reprodutivas, pois é necessário para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde (SANTAMARIA; SULSKY, 2010; ZLOTKIN et al., 1995). Esse elemento químico é largamente encontrado em todos os tecidos do corpo humano. Todavia, o fígado e o cérebro possuem concentrações mais altas, devido ao elevado número de mitocôndrias, organelas necessárias para a elevada demanda energética desses órgãos. A elevada concentração de Mn na mitocôndria se justifica, pois a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) mitocondrial é dependente de Mn (ASCHNER; ASCHNER, 2005; PROHASKA, 1987), sendo a principal enzima antioxidante que protege as células de estresse oxidativo ao catalisar a dismutação de superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio na mitocôndria. Os estudos indicam que essa enzima protege as células da apoptose e impede a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a atividade glutamatérgica excessiva nas regiões CA1 (Corno de Amon 1) e CA3 (Corno de Amon 3) do hipocampo, respectivamente.

A principal fonte de Mn para o ser humano é a alimentação. Cereais, vegetais, castanhas, frutas, pimentas, chás e café são alimentos ricos no mineral. Por estar presente em uma grande quantidade de alimentos, a deficiência de Mn em adultos é praticamente inexistente (ROTH, 2006).

Entretanto, apesar de sua comprovada essencialidade, dependendo da dose e da duração do tratamento/exposição, o Mn pode exercer uma gama de efeitos tóxicos. Em exposições agudas por Mn, os efeitos são bem identificados e incluem irritabilidade, distúrbios na fala, ações compulsivas e alucinações (BROUILLET et al. 1993). Já em uma exposição crônica ao metal, os efeitos neurológicos são muito semelhantes à Doença de Parkinson e incluem instabilidade postural, rigidez e distúrbios na fala (KRISHNA et al. 2013). Outros estudos têm

demonstrado também que o manganês induz, além de um déficit locomotor em animais submetidos às doses de 1 a 10mg/kg, um déficit emocional como, por exemplo, ansiedade e/ou depressão em humanos (BOWLER et al., 2003; LAOHAUDOMCHOK et al., 2011; O'NEAL et al., 2014).

Nesse sentido, alterações na concentração de Mn podem modular a ação de substâncias endógenas, tais como os neurotransmissores. Assim, em um tratamento crônico com manganês, encontrou-se uma redução significativa na produção de dopamina (DA) no corpo estriado, que pode ser interpretada como o resultado de uma redução da atividade neuronal na via nigroestriatal ou de uma diminuição na quantidade do neurotransmissor liberado na fenda sináptica. No mesmo estudo, os níveis de noradrenalina (NADR) encontraram-se aumentados no hipotálamo e no tronco encefálico (AUTISSIER et al. 1982).

Com isso, o mecanismo geral de ação toxicológica do Mn é resultado de suas interações (quando há uma deposição excessiva) com células dopaminérgicas, desencadeando a auto-oxidação da dopamina e levando à morte celular. A diminuição da dopamina estriatal devido à elevada exposição ao Mn foi verificada em camundongos (LIU et al., 2006), ratos (DORMAN et al., 2000), coelhos (MUSTAFA; CHANDRA, 1971) e primatas (BIRD et al., 1984). A atividade aumentada ou diminuída da dopamina na neurotransmissão leva a uma série de distúrbios, ligados não somente a efeitos como o parkinsonismo, como também à esquizofrenia e outros efeitos neuropsíquicos, o que explica a utilização do termo *Loucura manganica* para designar alguns casos clínicos de intoxicação por esse elemento químico (BEN-JONATHAN; HNASKO, 2001; FINKELSTEIN et al., 2007).

Em outro estudo, a exposição crônica ao Mn na dose de 10mg/kg i.p. em ratos machos afetou os movimentos horizontais, estereotipados e, também, aumentou o tempo de imobilidade no campo aberto quando comparado com o controle. Coincidentemente, o Mn aumentou de forma significativa o teor de DA no tecido neural, bem como seu metabólito principal, o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC). Quanto aos níveis de

serotonina (5-HT) e ácido 5-hidróxi indol acético (5-HIAA), o principal metabólito inativo da 5-HT, não foram aumentados. No córtex frontal, a concentração de NADR e 5-HT diminuiu significativamente em ratos intoxicados por Mn quando comparados com os controles (BOUABID et al., 2014)

Associando mecanismos bioquímicos envolvidos com a presença da SOD e a geração de EROs, demonstrou-se que os níveis basais dessa enzima foram diminuídos em pacientes durante a fase depressiva do transtorno bipolar, em comparação com indivíduos-controle saudáveis. Além disso, após 30 dias de tratamento com a fluoxetina, houve o aumento dos níveis dessa enzima, sugerindo a participação do Mn na modulação dos sintomas apresentados na depressão, uma vez que a SOD depende da ligação com o Mn para ser ativada. De forma interessante, um estudo mostrou que, em pacientes com o diagnóstico de depressão maior, uma redução no volume do córtex pré-frontal e do hipocampo pode estar ligada com mudanças na concentração de SOD (MLYNIEC et al., 2015). Portanto, esses dados mostram que o Mn pode alterar não apenas a neurotransmissão dopaminérgica mas, também, a serotoninérgica.

Ao contrário do que foi encontrado na depressão, o mesmo estudo mostrou que os níveis de Mn estavam significativamente elevados em pacientes com o diagnóstico de ansiedade generalizada, em comparação com indivíduos-controle saudáveis. Ainda, há a indicação de que elevados níveis de Mn no sistema nervoso central (SNC) tendem a acumular-se nos astrócitos, alterando a homeostase do glutamato e provocando neurotoxicidade excitatória. Sabe-se que o glutamato é removido da fenda sináptica por astrócitos e é convertido em glutamina que, novamente dentro do neurônio glutamatérgico, é convertida de volta em glutamato ou ácido gama-aminobutírico (GABA) nos neurônios gabaérgicos. Tem sido relatado que os níveis elevados de Mn podem contribuir para o comprometimento da ciclagem de glutamato-glutamina, por desregulação do seu volume em astrócitos, resultando nas alterações da síntese do GABA e glutamato. Como a disfunção do glutamato e do GABA está

ligada a muitas desordens psiquiátricas, incluindo depressão e ansiedade que, frequentemente, ocorrem nas fases iniciais do manganismo, é muito provável que os elevados níveis de Mn podem também desempenhar um papel no desenvolvimento de transtornos de humor (MLYNIEC et al., 2015).

A depressão é um transtorno neurocomportamental caracterizado por duas ou mais semanas de humor deprimido, associado com sintomas como distúrbios do sono, anedonia, diminuição do apetite e da libido, alterações psicomotoras, concentração reduzida, culpa excessiva e pensamentos suicidas ou tentativas. É um dos principais problemas de saúde pública no mundo e a segunda principal causa de incapacidade na faixa etária de 15-44 anos para ambos os sexos, superada apenas pela doença cardíaca isquêmica (ALBERT; BENKELFAT; DESCARRIES, 2012).

Várias teorias têm sido propostas para tentar explicar os sintomas fisiopatológicos gerais da depressão como, por exemplo, distúrbios no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e os ritmos circadianos anormais. Entretanto, a teoria mais aceita é a da diminuição da neurotransmissão das monoaminas. Essa hipótese, inicialmente com base na deficiência de NADR e 5-HT, é estendida também à DA (MASSART; MONGEAU; LANFUMEY, 2012).

Assim como a depressão, a esquizofrenia e a doença de Parkinson são patologias conhecidas por apresentar uma disfunção do SNC na liberação de DA. Além disso, existem similaridades entre os sintomas da doença de Parkinson, esquizofrenia e depressão. Alguns sintomas da depressão, tais como anedonia e diminuição da atividade motora, também são observados na esquizofrenia. Os sintomas da doença de Parkinson, tais como retardo psicomotor e a diminuição da motivação são comuns em pacientes deprimidos (DAILLY et al, 2004).

Com base nisso, os modelos animais foram propostos a fim de estudar aspectos envolvidos em distúrbios psicopatológicos (ansiedade, esquizofrenia, depressão, entre outros), que podem estar presentes em animais. Para isso, eles mimetizam situações que ocorrem

frequentemente nessas doenças. Entretanto, para um modelo animal ser válido, deve obedecer a três critérios: previsibilidade farmacológica (os efeitos farmacológicos observados no laboratório são semelhantes aos observados na clínica), analogia (comportamentos semelhantes observados em laboratório e na clínica sob uso da mesma substância), e homologia (envolvimento dos mesmos substratos neurais de uma condição clínica e de uma condição experimental) (CASTRO, 2013; WILLNER, 1984).

Como exemplo de modelo animal de psicopatologia tem-se o modelo do nado forçado, validado por Porsolt, Pichon e Jalfre (1977) como um contexto para o estudo de elementos relacionados com a depressão e para a investigação do envolvimento de neurotransmissores implicados nesse processo, por meio da indução de comportamentos como a imobilidade frente a uma situação inescapável. Nesse sentido, em um trabalho comparando ratos machos e fêmeas submetidos a esse modelo, utilizando as mesmas doses de sertralina (10 e 40mg/kg), as fêmeas apresentaram um maior tempo de imobilidade em relação aos machos. O tratamento com sertralina intraperitoneal (i.p.) não teve efeito sobre a latência para a imobilidade em machos enquanto que, nas fêmeas, apenas a dose mais elevada (40mg/kg) foi eficaz no aumento da latência. Ambos os sexos passaram mais tempo nadando após o uso de sertralina, tanto em doses baixas (10mg/kg) quanto em doses altas (40mg/kg) se comparado com o controle (KOKRAS et al., 2015), mostrando que é possível haver a modulação comportamental induzida por fármacos no nado forçado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Comparar os efeitos da administração i.p. de Mn, por 30 dias, em animais machos e fêmeas, submetidos aos modelos do nado forçado e do campo aberto.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o tempo que o animal levou para ficar imóvel (latência) e o tempo de imobilidade, bem como o número de bolos fecais, em animais submetidos ao modelo do nado forçado.
- Avaliar a frequência de cruzamentos e levantamentos (no centro e na periferia), de autolimpeza, de bolos fecais, e a latência para o movimento em animais submetidos ao modelo do campo aberto.

3. JUSTIFICATIVA

Vários estudos têm demonstrado a deposição neural de Mn e sua relação com a diminuição de monoaminas como, por exemplo, a DA. Entretanto, não há trabalhos que façam uma comparação entre ratos machos e fêmeas submetidos à administração i.p. de Mn. Além disso, não há relatos na literatura comparando o efeito do Mn com antidepressivos em modelos animais de psicopatologia. Assim, este trabalho visa estudar o efeito do Mn sobre o comportamento de ratos machos e fêmeas, comparado com um antidepressivo (imipramina) no nado forçado.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados 46 ratos Wistar machos e 45 ratos Wistar fêmeas, da espécie *Rattus norvegicus*, provenientes do biotério do curso de Psicologia da Universidade Católica de Brasília (UCB) (Brasília, DF, Brasil), mantidos em salas com estantes climatizadas



Figura 1 – Fotografia representativa dos animais agrupados por gaiola.

sob temperatura controlada de $22^{\circ}\text{C}\pm 2$, com ciclo claro/escuro 12h/12h (as luzes acendem às 6h), luz com intensidade entre 250 e 500 LUX a 76cm do piso do ambiente, sendo mantidos em gaiolas de polietileno com maravalha e com alimento e água *ad libitum*, sendo agrupados em 4 por gaiola (fig 1).

Os animais foram divididos em grupos de 7, 8 ou 10 animais, sendo pesados semanalmente para ajuste de dosagem.

Segue abaixo (tabela 1) a descrição dos grupos de tratamento:

Tabela 1 - Esquema de realização dos procedimentos com as drogas/ doses e quantidade de animais utilizados para cada grupo.

Grupo	machos/ fêmeas	Tratamento	Dosagem
Grupo 1	8/8	NaCl 0,9%	-
Grupo 2	8/7	Cloridrato de Imipramina	15 mg/Kg
Grupo 3	10/10	Cloreto de Manganês	1 mg/Kg
Grupo 4	10/10	Cloreto de Manganês	5mg/kg
Grupo 5	10/10	Cloreto de Manganês	10mg/kg

Os experimentos foram realizados em conformidade com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), baseadas no National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, sendo o projeto submetido ao Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB) e aprovado (Protocolo/UnBDoC nº 33255/2015).

4.2 Drogas e doses

- Salina (NaCl 0,9%) (Aster, Sorocaba, SP, Brasil), como controle geral do experimento.

- Cloridrato de imipramina (Farmacotécnica, Brasília, DF, Brasil), dissolvida em salina, na dose de 15mg/kg, como controle positivo para o nado forçado (Porsolt, Le Pichon, Jalfre, 1977).
- Cloreto de manganês tetra hidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos).

Todos os animais receberam o mesmo volume de injeção (1ml/kg).

4.3 Procedimento

Foram realizadas administrações i.p. das substâncias supracitadas, por um período de 30 dias, uma vez ao dia. No trigésimo dia procedeu-se ao teste do nado forçado, conforme descrito abaixo.

4.3.1 Teste do nado forçado

Para realização do nado forçado, os animais passaram por um período de treino, 24 horas antes da realização do teste. Para o treino, após terem recebido a injeção i.p. de qualquer substância há, pelo menos, uma hora, eles foram colocados individualmente em um recipiente sem apoio lateral ou basal, com cerca de 40cm de água (fig. 2) a uma temperatura de 26°C, controlada com o auxílio de um termômetro e aquecedor. Após 15min de nado, os animais foram retirados da



Figura 2 – Fotografia representativa do modelo do nado forçado.

água, secados com uma toalha e colocados em uma gaiola individual à temperatura ambiente. Depois de 15min retornaram à gaiola de origem.

Após 24 horas da realização do treino, foi feito o teste, que consistiu em colocar o animal novamente no recipiente com água, na

mesma temperatura de 26°C, por 5min, sendo cronometrado o tempo de imobilidade do animal, assim como a latência para a imobilidade e a frequência de bolos fecais. Depois de retirado da água e secado, o animal foi submetido ao teste de campo aberto.

4.3.2. Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi originalmente descrito por Calvin Hall (HALL,1934) para o estudo das emoções em ratos. Entretanto, devido à sua simplicidade e eficácia, o teste passou a ser muito utilizado para medir comportamentos e efeitos de drogas, como comportamentos relacionados à ansiedade e efeitos sedativos. O procedimento consistiu

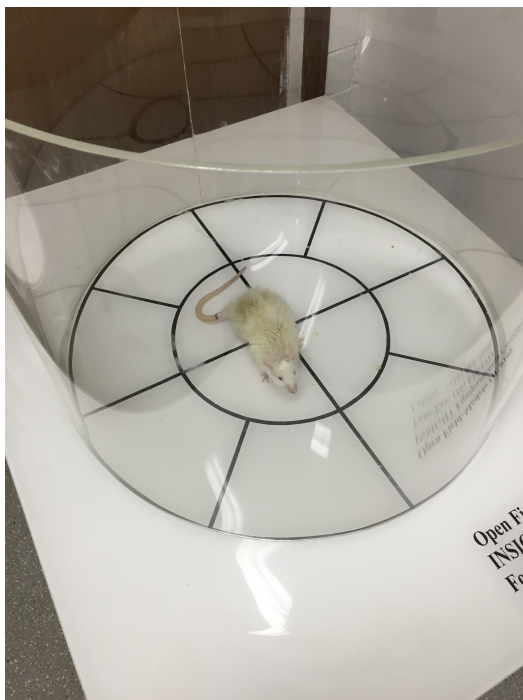


Figura 3 – Fotografia representativa do modelo do campo aberto

em submeter o animal a uma arena circular, com 60cm de diâmetro e 50cm de altura, colocado sobre base acrílica, de forma que o animal não conseguisse escapar. O assoalho, subdividido em 12 secções concêntricas, permitiu a quantificação da atividade motora do animal (fig. 3).

O animal foi colocado no centro do modelo e os comportamentos foram observados e cronometrados por um período de 5min: frequência de cruzamentos, levantamentos e autolimpeza, bem

como a frequência de bolos fecais. Devido ao fato de alguns animais sob efeito do Mn terem permanecido imóveis na parte central assim que foram ali colocados, avaliou-se o tempo gasto para a exploração do modelo (latência para a mobilidade).

4.4 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Testes estatísticos foram realizados de acordo com a distribuição dos resultados através do software Sigmastat/Sigmaplot® versão 13.0. Foi aplicada a ANOVA de duas vias (ANOVA 2-way), sendo uma variável o tratamento e a outra, o sexo do animal. Foi também descrita a possível interação entre essas variáveis. Os testes foram seguidos pelo *post-hoc* Tukey para identificar entre quais grupos poderia haver diferença nos testes avaliados ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Modelo do nado forçado

5.1.1 Latência para Imobilidade

Em relação à latência para imobilidade (em segundos (s)), a ANOVA 2-way, mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos tratamentos utilizados, conforme mostrado a seguir: grupo salina (Média (\bar{x}) = 102,6; Erro Padrão da Média (EPM) = 14,2), imipramina (\bar{x} = 124,0; EPM = 14,7) Mn 1mg/kg (\bar{x} = 90,2 ; EPM = 12,7), Mn 5mg/kg (\bar{x} = 122,8; EPM = 12,7), $F_{(3,67)} = 1,52$, $p = 0,21$ (fig. 4).

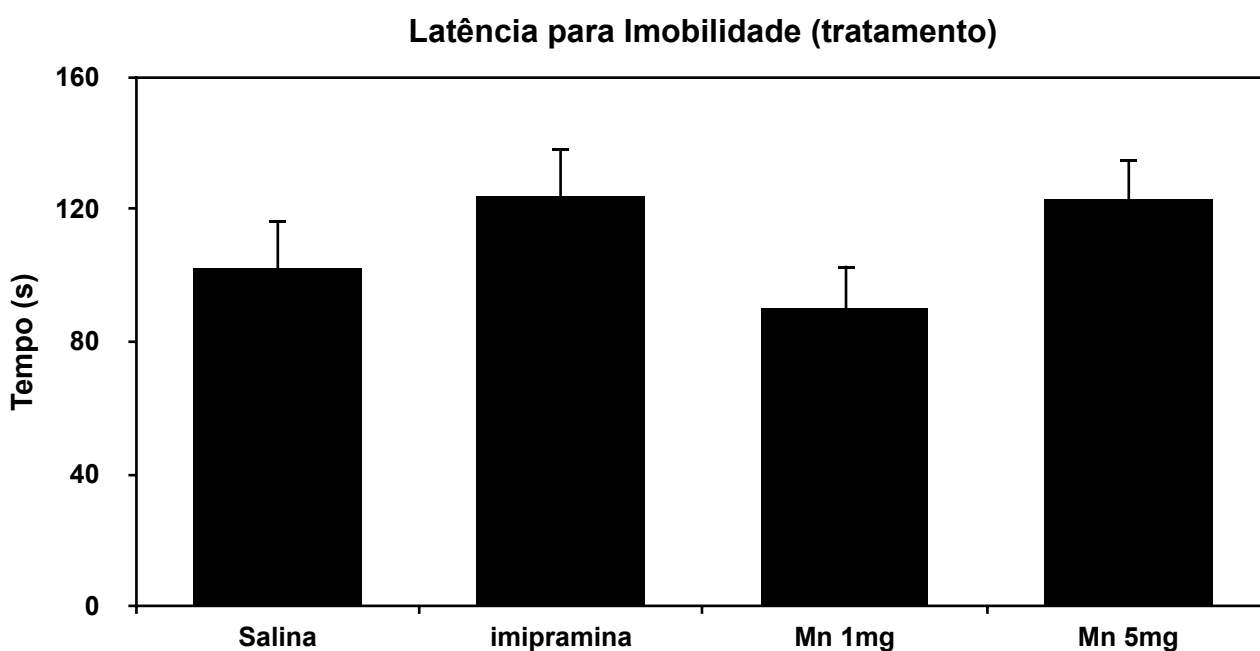


Figura 4 - Efeito das variadas substâncias sobre a latência para imobilidade (s) para animais submetidos ao nado forçado. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% (n = 16), Imipramina 15mg/kg (n = 15) Mn 1mg/kg (n = 20) Mn 5mg/kg (n = 20).

Em relação ao sexo, também não houve diferença estatisticamente significativa: machos ($\bar{X} = 107,8$; EPM = 9,55), fêmeas ($\bar{X} = 112,0$; EPM = 9,74) $F_{(1,69)} = 0,09$, $p = 0,76$ (fig.5).

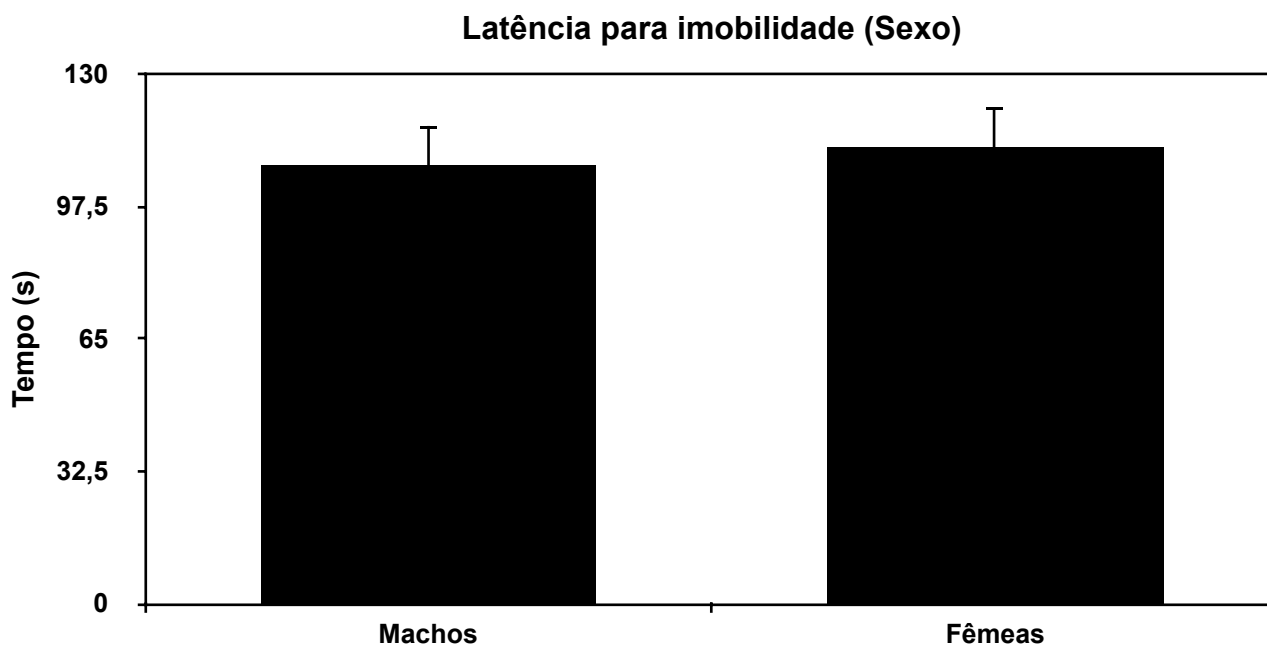


Figura 5 - Efeito das variadas substâncias sobre a latência para imobilidade (s) para animais machos e fêmeas submetidos ao nado forçado. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% (n = 16), Imipramina 15mg/kg (n = 15) Mn 1mg/kg (n = 20) Mn 5mg/kg (n = 20).

Não houve interação entre as variáveis analisadas: salina macho ($\bar{X} = 86,5$; EPM = 20,1) salina fêmea ($\bar{X} = 118,6$; EPM = 20,1); imipramina macho ($\bar{X} = 120,9$; EPM = 20,1) imipramina fêmea ($\bar{X} = 127,1$; EPM = 21,5); Mn 1mg/kg macho ($\bar{X} = 80,8$; EPM = 18) Mn 1mg/kg fêmea ($\bar{X} = 99,6$; EPM = 18) Mn 5mg/kg macho ($\bar{X} = 143$; EPM = 18) Mn 5mg/kg fêmea ($\bar{X} = 102,5$; EPM = 18), $F_{(7,63)} = 1,45$, $p = 0,23$ (fig.6).

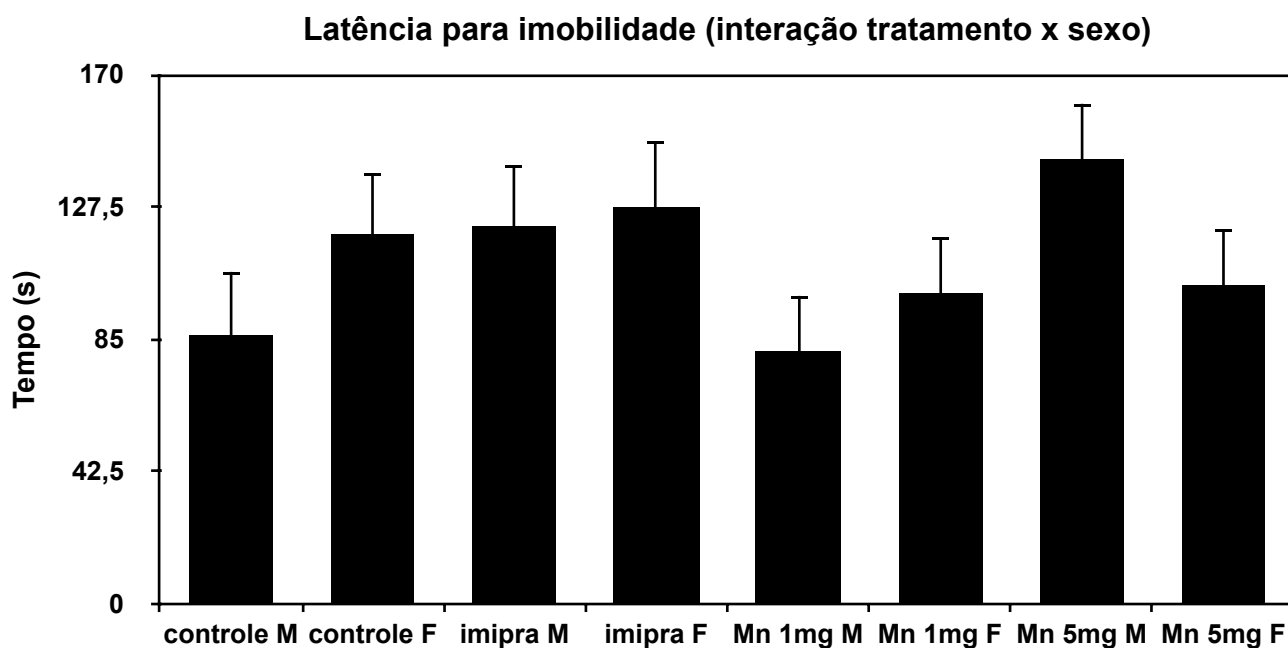


Figura 6 - Efeito das variadas substâncias sobre a latência para imobilidade (s) para animais submetidos ao nado forçado. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% machos (n = 8), salina 0,9% fêmeas (n = 8) imipramina 15mg/kg machos (n = 8), imipramina 15mg/kg fêmeas (n = 7), Mn 1mg/kg machos (n = 10), Mn 1mg/kg fêmeas (n = 10), Mn 5mg/kg machos (n = 10), Mn 5mg/kg fêmeas (n = 10). imipra indica imipramina, M indica machos e F indica fêmeas.

5.1.2 Tempo de Imobilidade

Em relação ao tempo de imobilidade (em s), a ANOVA 2-way, seguida pelo teste de Tukey, mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos imipramina ($\bar{x} = 129,6$; EPM = 13,2) e Mn 1mg/kg ($\bar{x} = 187$; EPM = 11,4), $F_{(3,67)} = 4,13$, $p < 0,005$. Para os demais tratamentos, não houve diferença: grupo salina ($\bar{x} = 149,9$; EPM = 12,8), Mn 5mg/kg ($\bar{x} = 171,5$; EPM = 11,4) (fig.7).

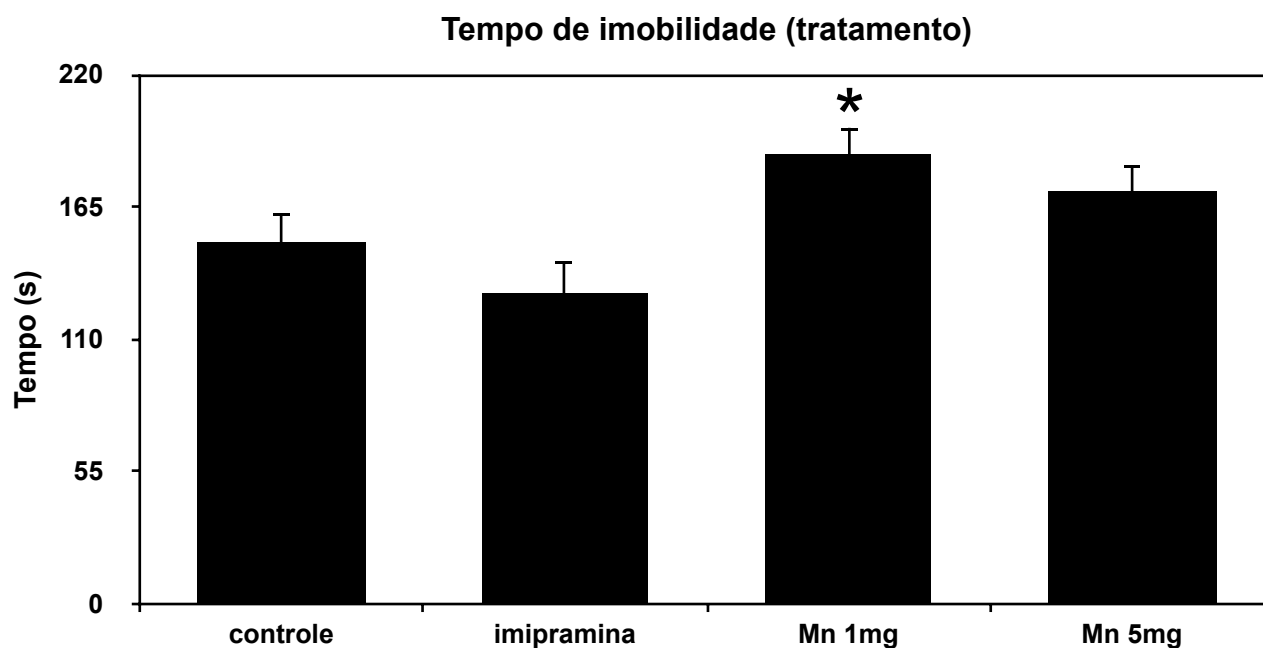


Figura 7 - Efeito das variadas substâncias sobre o tempo de imobilidade (s) para animais submetidos ao nado forçado. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p < 0,05$ segundo o teste Tukey. * Indica diferença significativa entre o grupo Mn 1mg/kg ($n = 20$) com os grupos Salina 0,9% ($n = 16$), Imipramina 15mg/kg ($n = 15$), Mn 5mg/kg ($n = 20$).

Em relação ao sexo, não houve diferença estatisticamente significativa: machos ($\bar{X} = 149,6$; EPM = 8,56), fêmeas ($\bar{X} = 169,4$; EPM = 8,73) $F_{(1,69)} = 2,61$, $p = 0,11$ (fig.8).

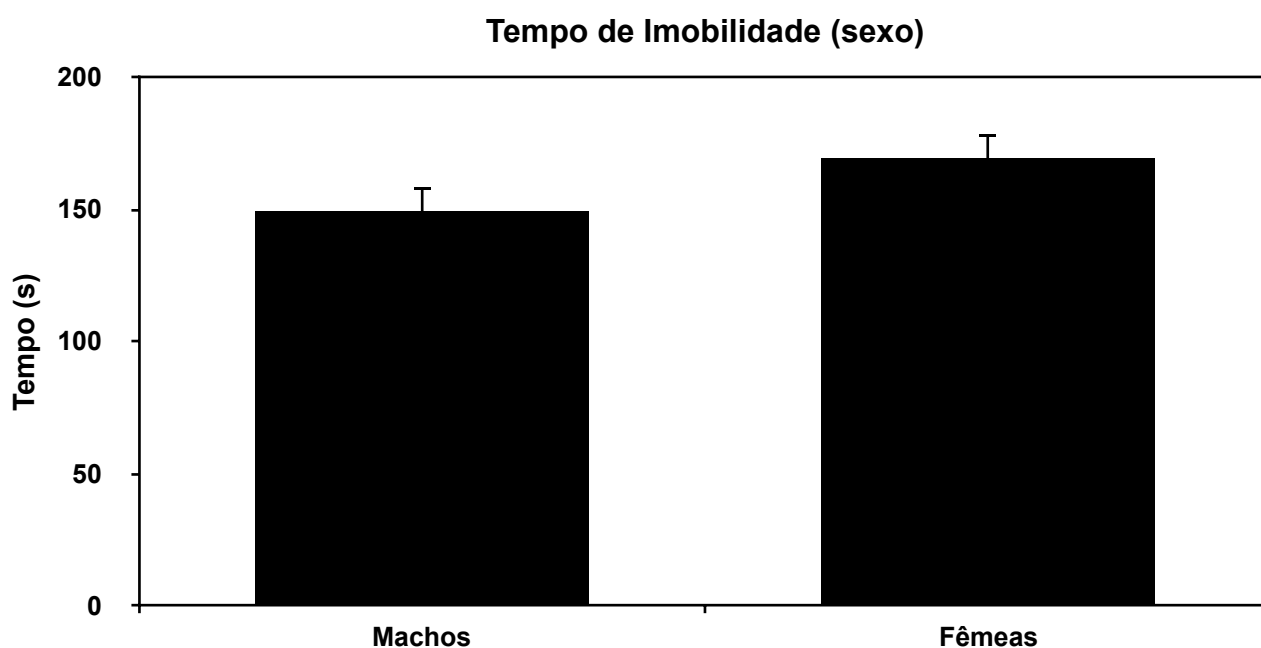


Figura 8 - Efeito das variadas substâncias sobre o tempo de imobilidade (s) para animais machos e fêmeas submetidos ao nado forçado. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% ($n = 16$), Imipramina 15mg/kg ($n = 15$), Mn 1mg/kg ($n = 20$) Mn 5mg/kg ($n = 20$).

Houve interação entre as variáveis analisadas para os seguintes grupos: imipramina macho (\bar{x} = 123; EPM = 18,1) e salina macho (\bar{x} = 117,9; EPM = 18,1) com Mn 1mg/kg macho (\bar{x} = 205,5; EPM = 16,1), $F_{(7,63)} = 3,30$, $p = 0,02$. Quanto aos demais grupos, não houve interação: salina macho (\bar{x} = 117,9; EPM = 18,1) salina fêmea (\bar{x} = 181,9; EPM = 18,1); imipramina fêmea (\bar{x} = 136,3; EPM = 19,3); Mn 1mg/kg fêmea (\bar{x} = 168,5; EPM = 16,1) Mn 5mg/kg macho (\bar{x} = 152,1; EPM = 16,1) Mn 5mg/kg fêmea (\bar{x} = 190,8; EPM = 16,1) (fig.9).

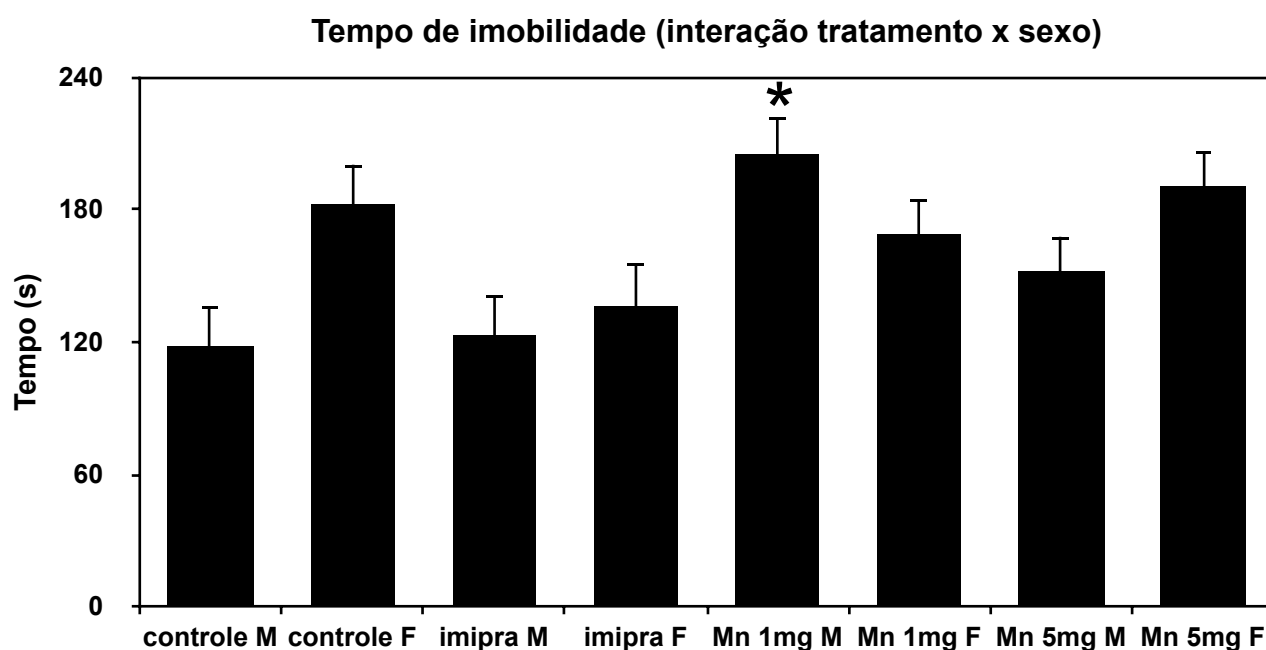


Figura 9 - Efeito das variadas substâncias sobre o tempo de imobilidade (s) para animais submetidos ao nado forçado. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p < 0,05$ segundo o teste Tukey. * Indica diferença significativa entre o grupo Mn 1mg/kg macho ($n = 10$) com os grupos salina 0,9% machos ($n = 8$), salina 0,9% fêmeas ($n = 8$) imipramina 15mg/kg machos ($n = 8$), imipramina 15mg/kg fêmeas ($n = 7$), Mn 1mg/kg fêmeas ($n = 10$), Mn 5mg/kg machos ($n = 10$), Mn 5mg/kg fêmeas ($n = 10$). imipra indica imipramina, M indica machos e F indica fêmeas.

5.1.3 Frequência de bolos fecais

Em relação à frequência dos bolos fecais, a ANOVA 2-way, seguida pelo teste de Tukey, mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos imipramina (\bar{x} = 4,22; EPM = 0,55) e Mn

1mg/kg ($\bar{x} = 5,85$; EPM = 0,48), $F_{(3,67)} = 2,69$, $p = 0,053$. Para os demais tratamentos, não houve diferença: grupo salina ($\bar{x} = 4,25$; EPM = 0,53), Mn 5mg/kg ($\bar{x} = 5,50$; EPM = 0,48) (fig.10).

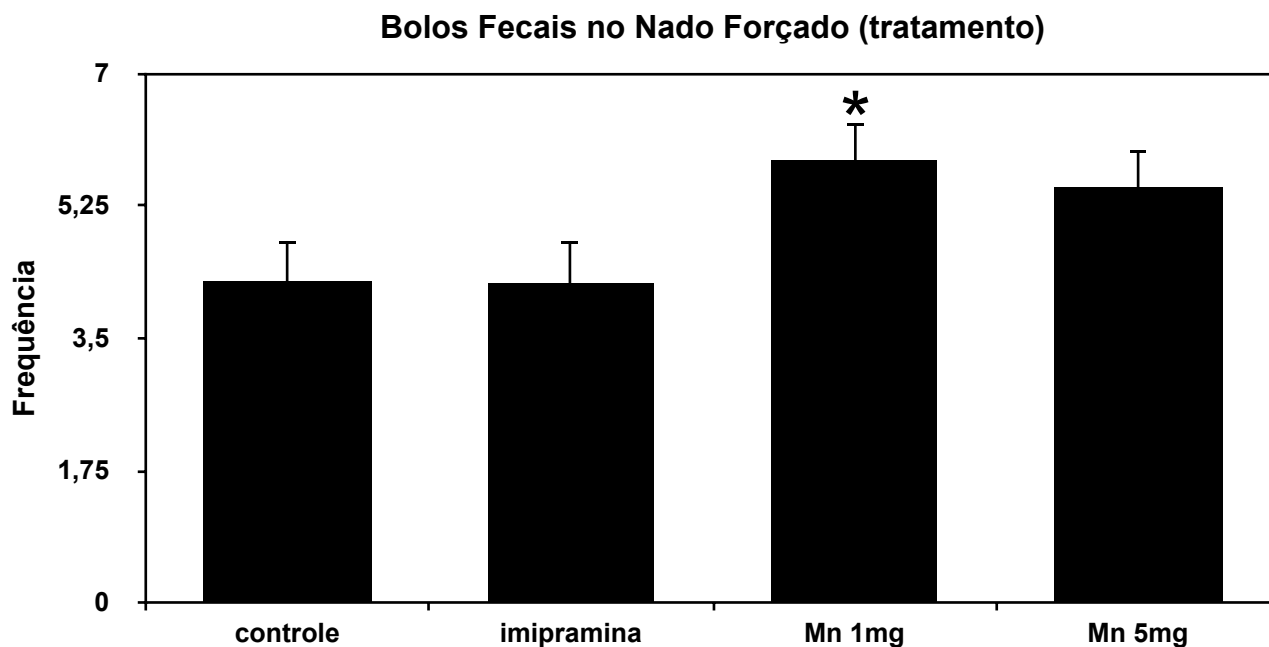


Figura 10 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de bolos fecais para animais submetidos ao nado forçado. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p < 0,05$ segundo o teste Tukey. * Indica diferença significativa entre o grupo Mn 1mg/kg ($n = 20$) com os grupos salina 0,9% ($n = 16$), Imipramina 15mg/kg ($n = 15$) Mn 1mg/kg ($n = 20$) Mn 5mg/kg ($n = 20$).

Em relação ao sexo, houve diferença estatisticamente significativa entre machos ($\bar{x} = 4,25$; EPM = 0,36) e fêmeas ($\bar{x} = 5,66$; EPM = 0,36) $F_{(1,69)} = 7,53$, $p < 0,05$ (fig.11).

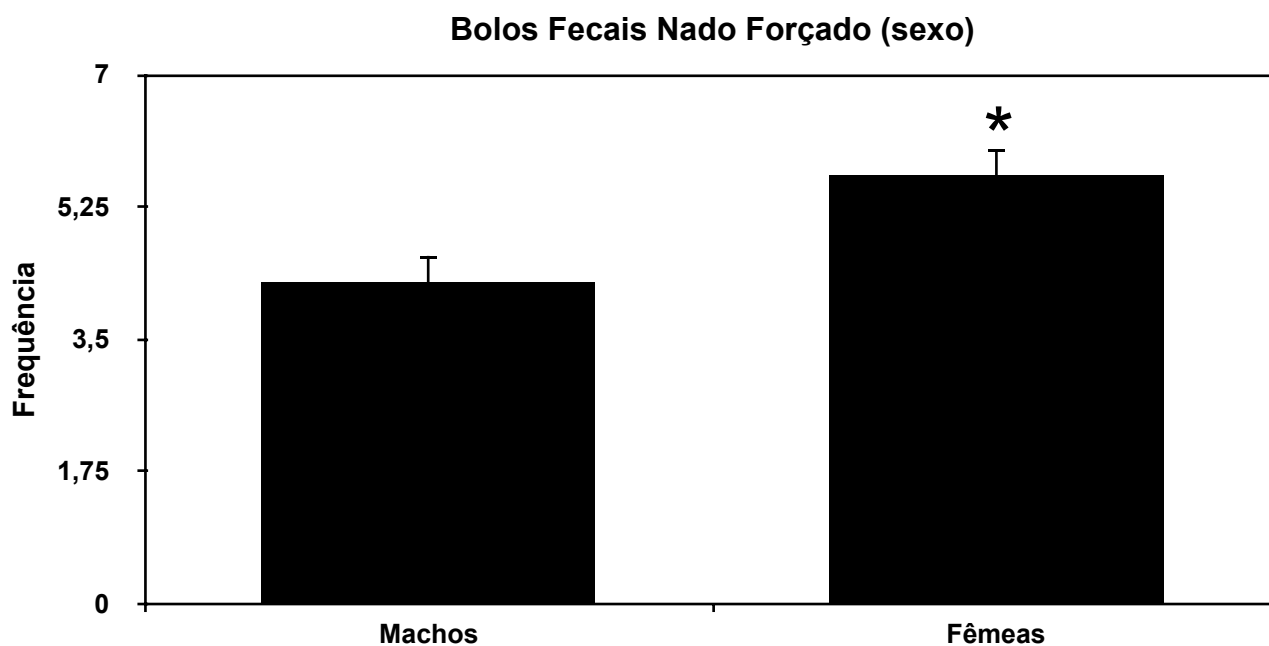


Figura 11 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de bolos fecais para animais machos e fêmeas submetidos ao nado forçado. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p < 0,05$ segundo o teste Tukey. * Indica diferença significativa entre machos e fêmeas Salina 0,9% (n = 16), Imipramina 15mg/kg (n = 15) Mn 1mg/kg (n = 20) Mn 5mg/kg (n = 20).

Não houve interação entre as variáveis analisadas: salina macho ($\bar{X} = 4,12$; EPM = 0,75) salina fêmea ($\bar{X} = 4,37$; EPM = 0,75); imipramina macho ($\bar{X} = 2,88$; EPM = 0,75) imipramina fêmea ($\bar{X} = 5,57$, EPM = 0,88); Mn 1mg/kg macho ($\bar{X} = 5,10$; EPM = 0,67) Mn 1mg/kg fêmea ($\bar{X} = 6,6$; EPM = 0,67) Mn 5mg/kg macho ($\bar{X} = 4,9$; EPM = 0,67) Mn 5mg/kg fêmea ($\bar{X} = 6,10$; EPM = 0,67), $F_{(7,63)} = 0,85$, $p = 0,46$ (fig.12).

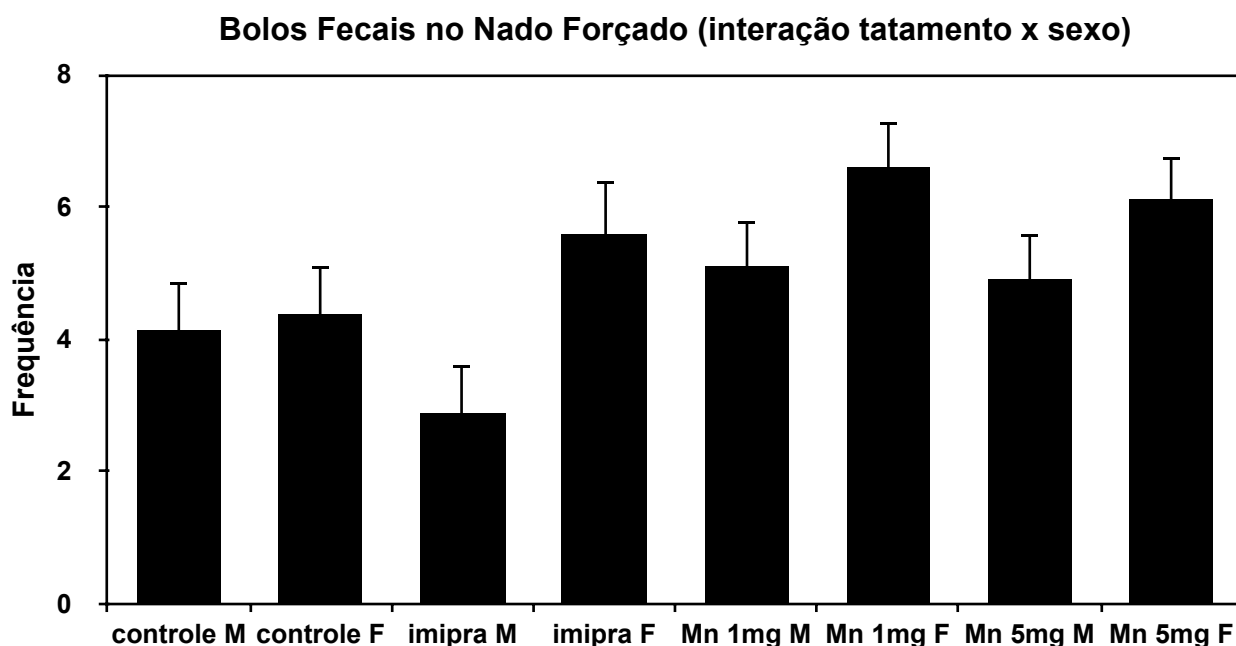


Figura 12 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de bolos fecais para animais submetidos ao nado forçado. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% machos (n = 8), salina 0,9% fêmeas (n = 8) imipramina 15mg/kg machos (n = 8), imipramina 15mg/kg fêmeas (n = 7), Mn 1mg/kg machos (n = 10), Mn 1mg/kg fêmeas (n = 10), Mn 5mg/kg machos (n = 10), Mn 5mg/kg fêmeas (n = 10). imipra indica imipramina, M indica machos e F indica fêmeas.

5.2 Modelo do campo aberto

5.2.1 Frequência de cruzamentos entre quadrantes

Em relação à frequência de cruzamentos entre quadrantes, a ANOVA 2-way, seguida pelo teste de Tukey, mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos salina ($\bar{x} = 10,88$; EPM = 2,27), Mn 5mg/kg ($\bar{x} = 2,80$; EPM = 2,03), $F_{(3,67)} = 2,85$, $p < 0,05$. Para os demais tratamentos, não houve diferença: imipramina ($\bar{x} = 8,37$; EPM = 2,35), Mn 1mg/kg ($\bar{x} = 9,35$; EPM = 2,03) (fig.13).

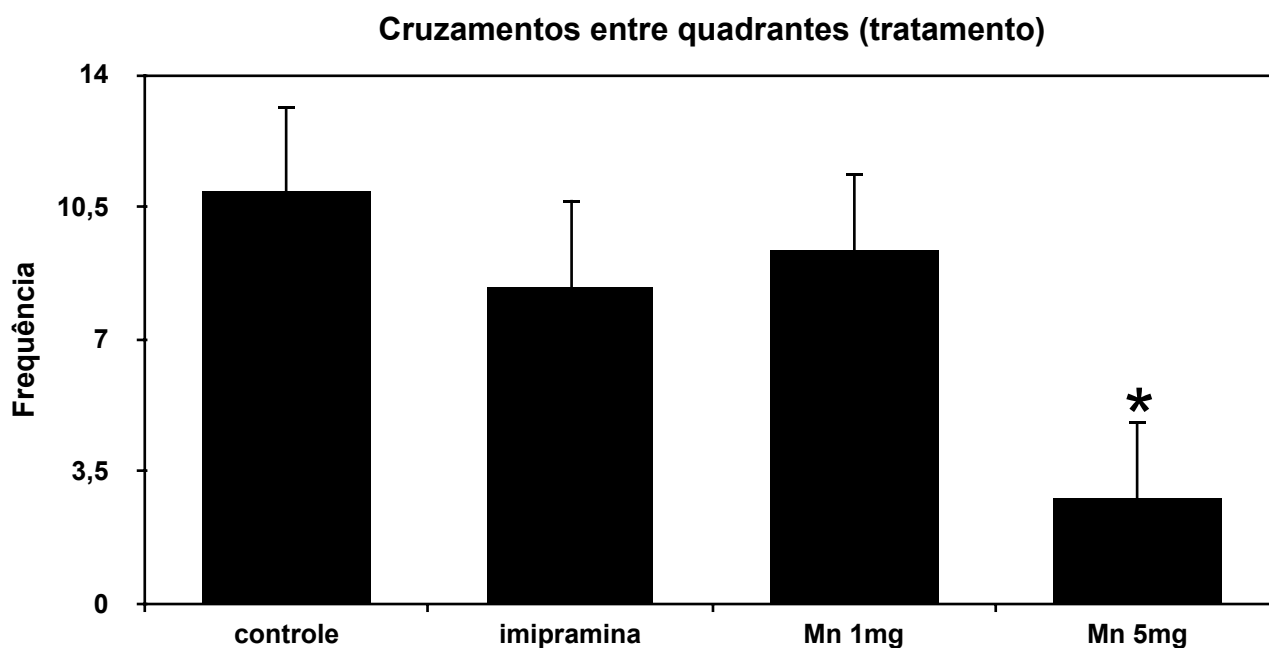


Figura 13 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de cruzamentos entre quadrantes para animais submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p < 0,05$ segundo o teste Tukey. * Indica diferença significativa entre o grupo Mn 5mg/kg ($n = 20$) com os grupos salina 0,9% ($n = 16$), Imipramina 15mg/kg ($n = 15$), Mn 1mg/kg ($n = 20$).

Em relação ao sexo, não houve diferença estatisticamente significativa: machos ($\bar{x} = 6,71$; EPM = 1,52), fêmeas ($\bar{x} = 8,98$; EPM = 1,55) $F_{(1,69)} = 1,09$, $p = 0,29$ (fig.14).

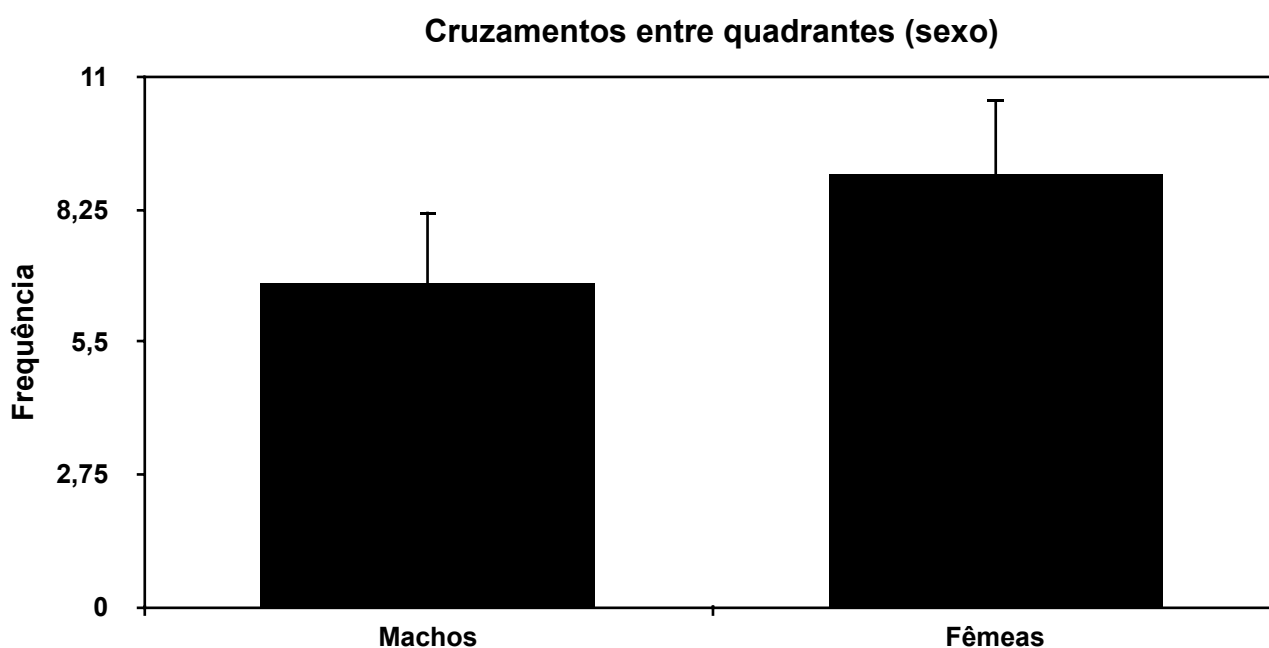


Figura 14 - Efeito das variadas substâncias sobre sobre a frequência de cruzamentos entre quadrantes para animais machos e fêmeas submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% ($n = 16$), Imipramina 15mg/kg ($n = 15$), Mn 1mg/kg ($n = 20$), Mn 5mg/kg ($n = 20$).

Não houve interação entre as variáveis analisadas: salina macho ($\bar{x} = 8,88$; EPM = 3,21) salina fêmea ($\bar{x} = 12,88$; EPM = 3,21); imipramina macho ($\bar{x} = 8,88$; EPM = 3,21) imipramina fêmea ($\bar{x} = 7,86$; EPM = 3,49); Mn 1mg/kg macho ($\bar{x} = 5,10$; EPM = 2,87); Mn 1mg/kg fêmea ($\bar{x} = 13,6$; EPM = 2,87); Mn 5mg/kg macho ($\bar{x} = 4$; EPM = 2,87) Mn 5mg/kg fêmea ($\bar{x} = 1,6$; EPM = 2,87) e $F_{(7,63)} = 1,44$, $p = 0,23$ (fig. 15).

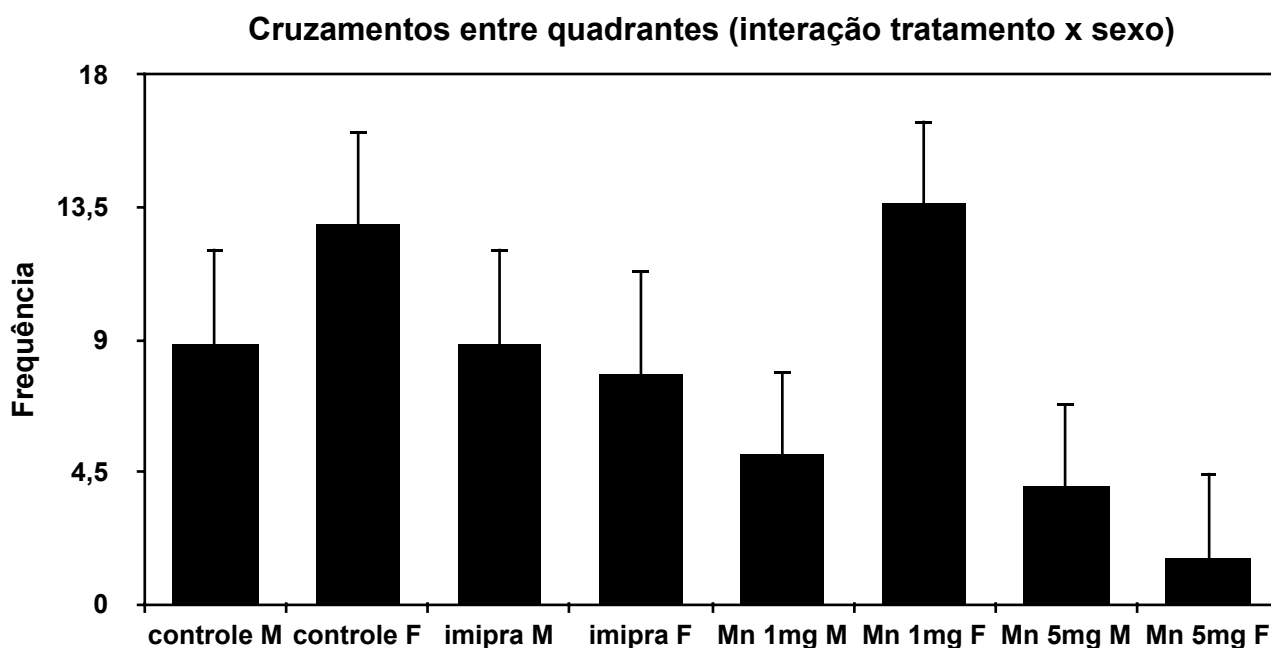


Figura 15 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de cruzamentos entre quadrantes para animais submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% machos (n = 8), salina 0,9% fêmeas (n = 8) imipramina 15mg/kg machos (n = 8), imipramina 15mg/kg fêmeas (n = 7), Mn 1mg/kg machos (n = 10), Mn 1mg/kg fêmeas (n = 10), Mn 5mg/kg machos (n = 10), Mn 5mg/kg fêmeas (n = 10). imipra indica imipramina, M indica machos e F indica fêmeas.

5.2.2 Frequência de levantamentos

Em relação à frequência de levantamentos, a ANOVA 2-way , seguida pelo teste de Tukey, mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos salina ($\bar{x} = 4,06$; EPM = 0,93), Mn 5mg/kg ($\bar{x} = 0,25$; EPM = 0,83), $F_{(3,67)} = 3,30$, $p < 0,05$. Para os demais tratamentos, não houve diferença: imipramina ($\bar{x} = 1,08$; EPM = 0,96), Mn 1mg/kg ($\bar{x} = 1,9$; EPM = 0,83) (fig. 16).

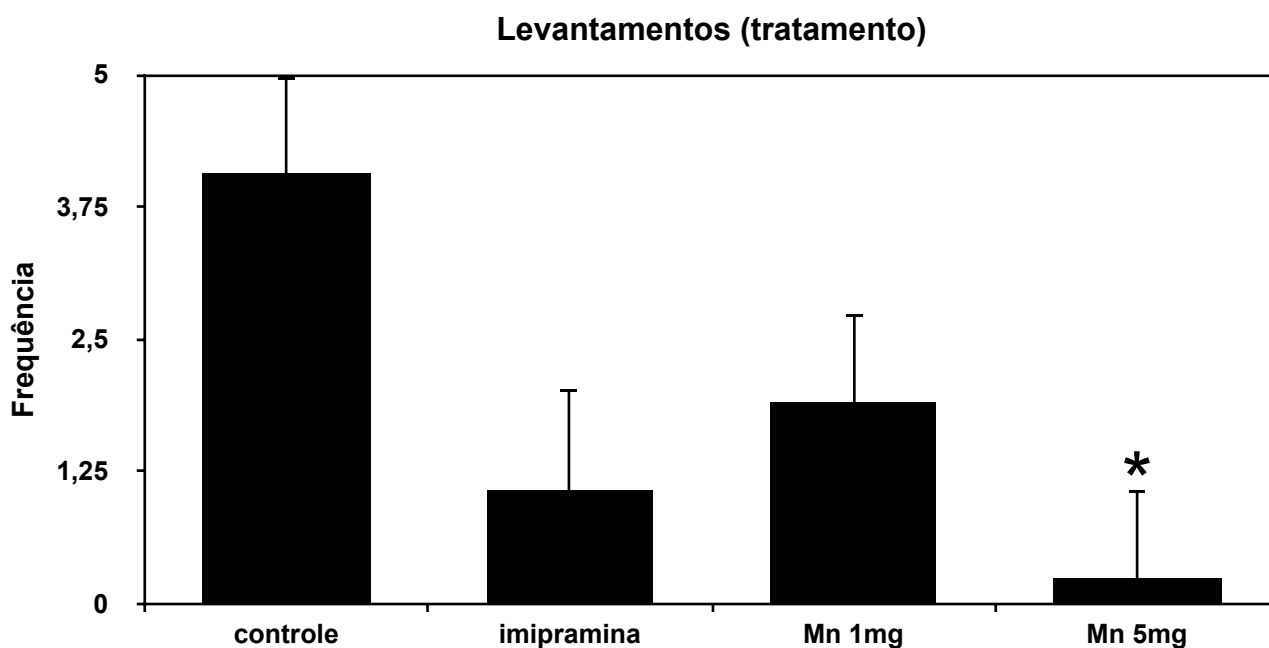


Figura 16 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de levantamentos para animais submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p < 0,05$ segundo o teste Tukey. * Indica diferença significativa entre o grupo Mn 5mg/kg ($n = 20$) com os grupos salina 0,9% ($n = 16$), Imipramina 15mg/kg ($n = 15$), Mn 1mg/kg ($n = 20$).

Em relação ao sexo, não houve diferença estatisticamente significativa: machos ($\bar{x} = 1,18$; EPM = 0,62), fêmeas $\bar{x} = 2,47$; EPM = 0,63) $F_{(1,69)} = 1,09$, $p = 0,29$ (fig.17).

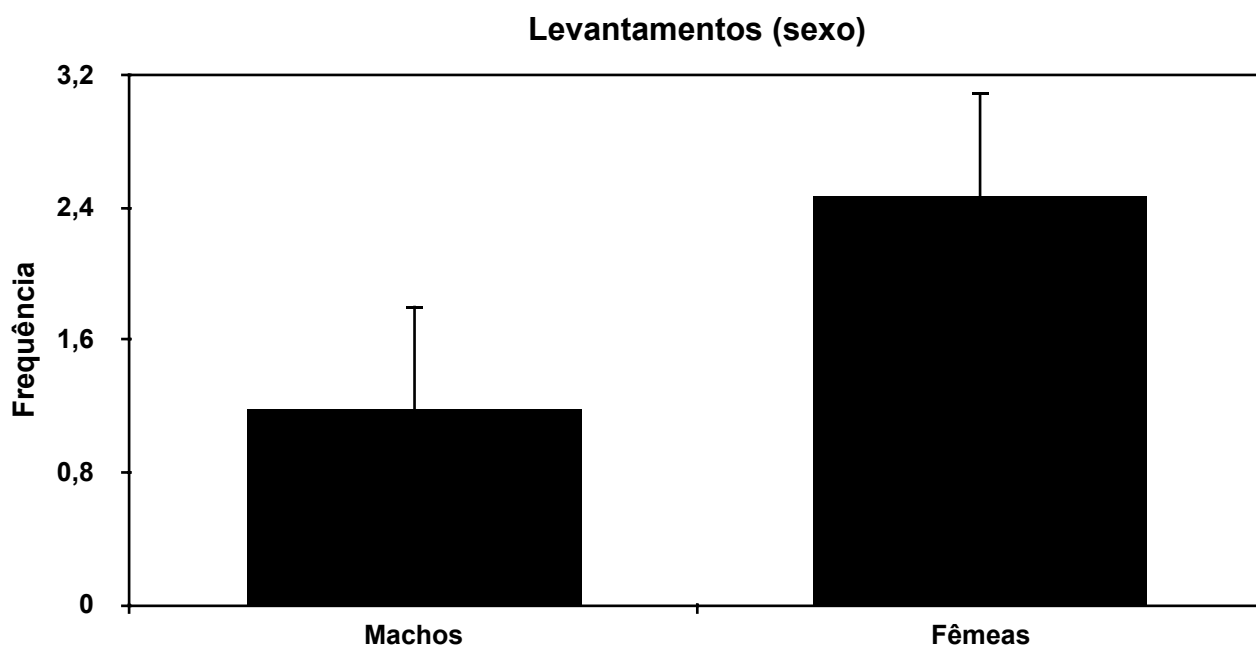


Figura 17 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de levantamentos para animais machos e fêmeas submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% ($n = 16$), Imipramina 15mg/kg ($n = 15$), Mn 1mg/kg ($n = 20$) Mn 5mg/kg ($n = 20$).

Não houve interação entre as variáveis analisadas: salina macho ($\bar{X} = 2,25$; EPM = 1,32) salina fêmea ($\bar{X} = 5,87$; EPM = 1,32); imipramina macho ($\bar{X} = 1,87$; EPM = 1,32) imipramina fêmea ($\bar{X} = 0,28$; EPM = 1,41); Mn 1mg/kg macho ($\bar{X} = 0,3$; EPM = 1,18); Mn 1mg/kg fêmea ($\bar{X} = 3,5$; EPM = 1,18); Mn 5mg/kg macho ($\bar{X} = 0,3$; EPM = 1,18) Mn 5mg/kg fêmea ($\bar{X} = 0,2$; EPM = 1,18) e $F_{(7,63)} = 1,93$, $p = 0,13$ (fig.18).

Levantamentos (interação tratamento x sexo)

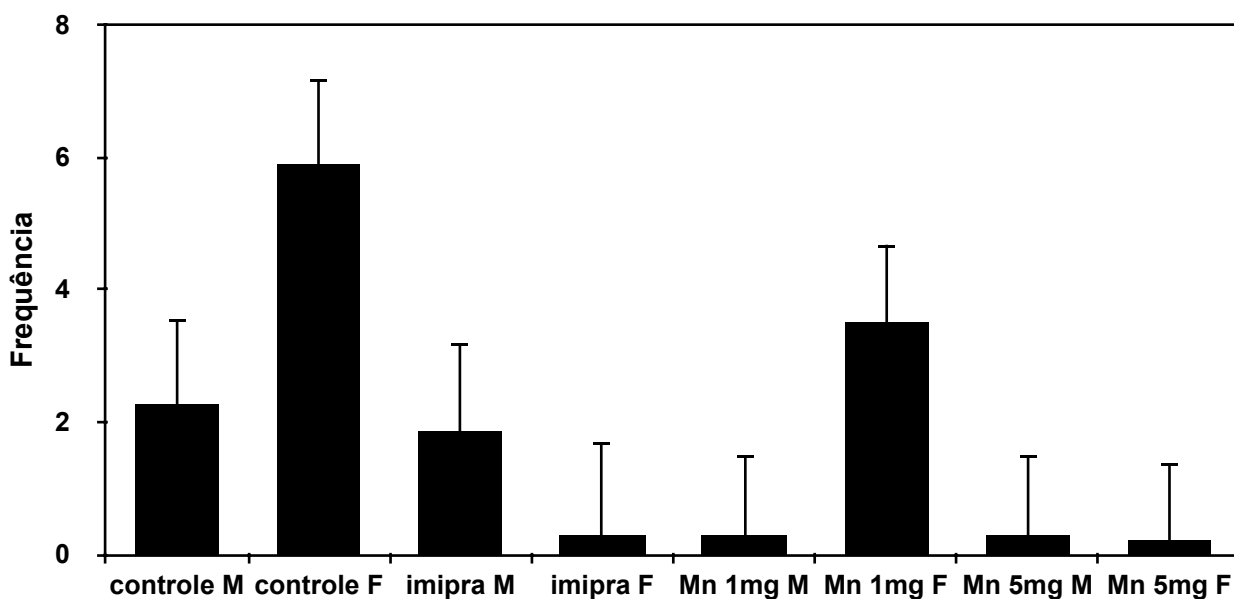


Figura 18 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de levantamentos para animais submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% machos (n = 8), salina 0,9% fêmeas (n = 8) imipramina 15mg/kg machos (n = 8), imipramina 15mg/kg fêmeas (n = 7), Mn 1mg/kg machos (n = 10), Mn 1mg/kg fêmeas (n = 10), Mn 5mg/kg machos (n = 10), Mn 5mg/kg fêmeas (n = 10). imipra indica imipramina, M indica machos e F indica fêmeas.

5.2.3 Frequência de autolimpeza

Em relação à frequência de autolimpeza, a ANOVA 2-way mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos salina ($\bar{X} = 0,12$; EPM = 0,14), imipramina ($\bar{X} = 0,19$; EPM = 0,17), Mn 1mg/kg ($\bar{X} = 0,35$; EPM = 0,14), Mn 5mg/kg ($\bar{X} = 0,3$; EPM = 0,14), $F_{(3,67)} = 0,41$, $p = 0,74$ (fig.19).

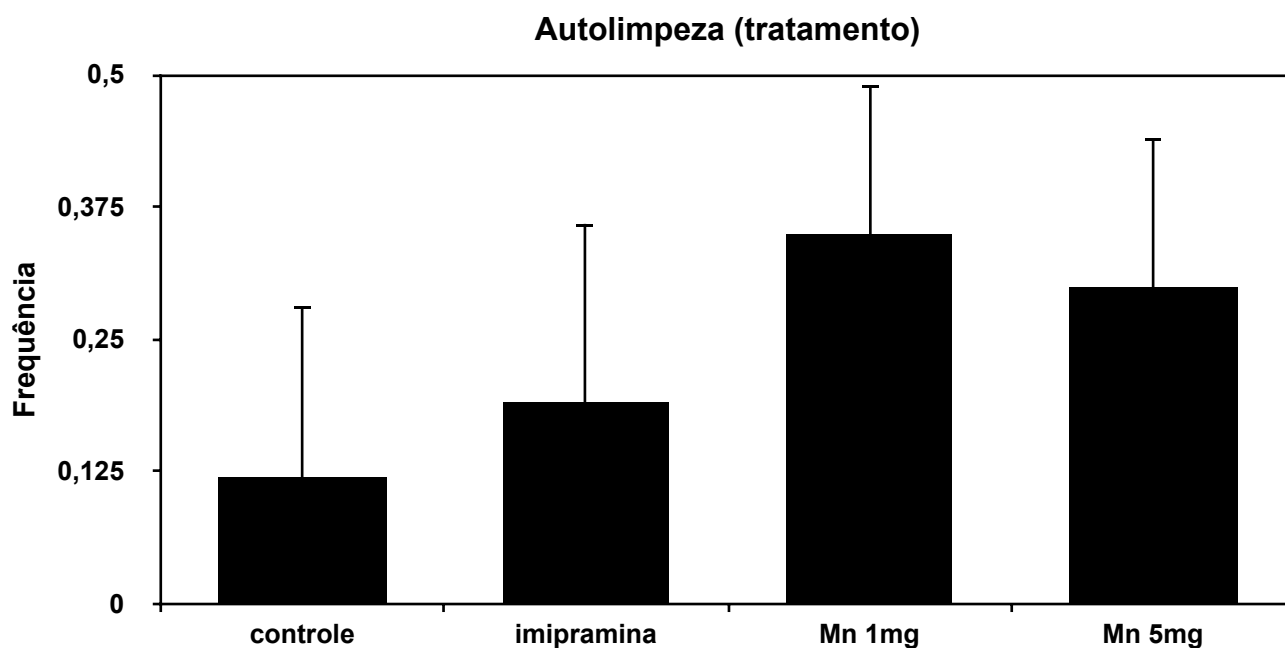


Figura 19 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de autolimpeza para animais submetidos ao campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% (n = 16), Imipramina 15mg/kg (n = 15), Mn 1mg/kg (n = 20) Mn 5mg/kg (n = 20).

Em relação ao sexo, não houve diferença estatisticamente significativa: machos ($\bar{X} = 0,25$; EPM = 0,11), fêmeas ($\bar{X} = 0,23$; EPM = 0,11) $F_{(1,69)} = 0,008$, $p = 0,92$ (fig.20).

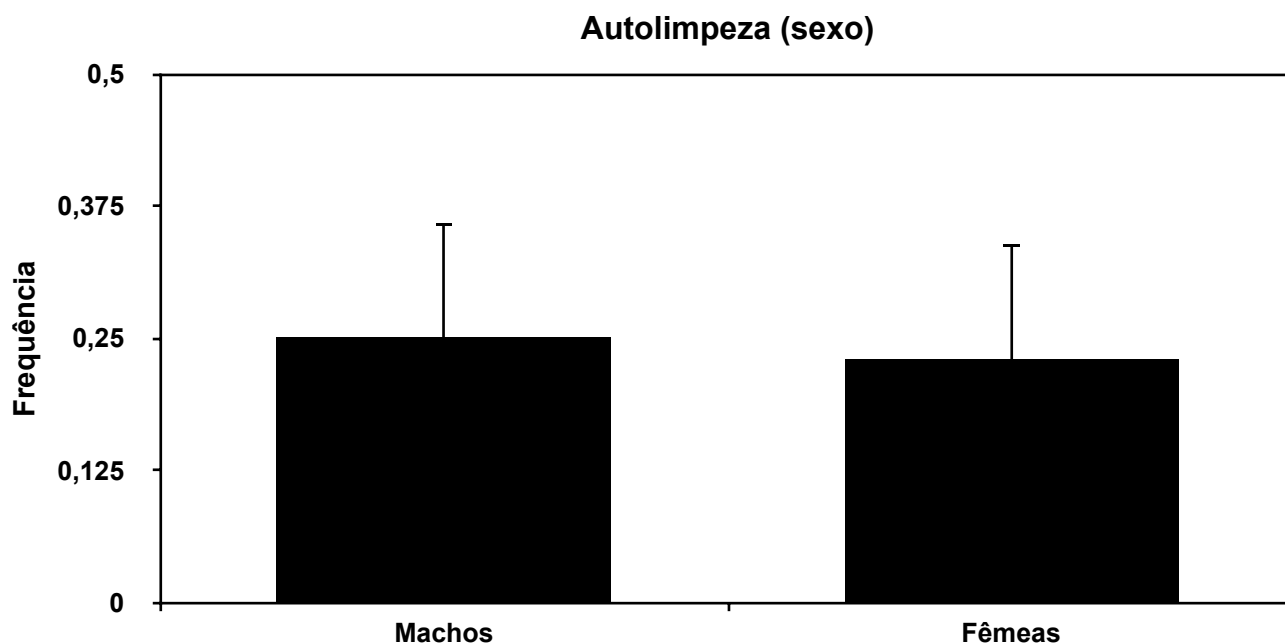


Figura 20 - Efeito das variadas substâncias sobre sobre a frequência de autolimpeza para animais machos e fêmeas submetidos ao modelo do campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% (n = 16), Imipramina 15mg/kg (n = 15), Mn 1mg/kg (n = 20), Mn 5mg/kg (n = 20).

Não houve interação entre as variáveis analisadas: salina macho ($\bar{x} = 2,5$; EPM = 0,23), salina fêmea ($\bar{x} = 5,87$; EPM = 1,32); imipramina macho ($\bar{x} = 2,5$; EPM = 0,23) imipramina fêmea ($\bar{x} = 1,43$; EPM = 0,24); Mn 1mg/kg macho ($\bar{x} = 1,39$; EPM = 0,2) Mn 1mg/kg fêmea ($\bar{x} = 3,5$; EPM = 1,18); Mn 5mg/kg macho ($\bar{x} = 5,0$; EPM = 0,2) Mn 5mg/kg fêmea ($\bar{x} = 1,0$; EPM = 0,2), $F_{(7,63)} = 0,27$, $p = 0,051$ (fig.21)

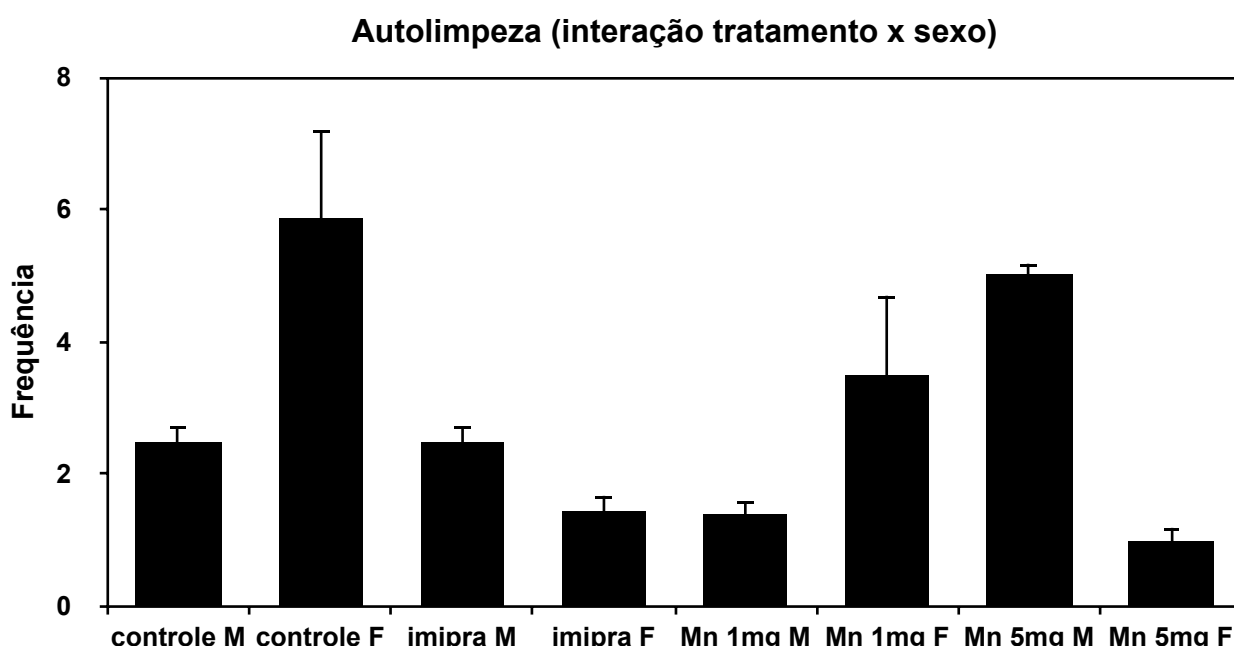


Figura 21 - Efeito das variadas substâncias sobre a autolimpeza para animais submetidos ao modelo do campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% machos (n = 8), salina 0,9% fêmeas (n = 8) imipramina 15mg/kg machos (n = 8), imipramina 15mg/kg fêmeas (n = 7), Mn 1mg/kg machos (n = 10), Mn 1mg/kg fêmeas (n = 10), Mn 5mg/kg machos (n = 10), Mn 5mg/kg fêmeas (n = 10). imipra indica imipramina, M indica machos e F indica fêmeas.

5.2.4 Frequência de bolos fecais

Em relação à frequência dos bolos fecais, a ANOVA 2-way mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos tratamentos utilizados: grupo salina ($\bar{x} = 0,93$; EPM = 0,24), imipramina ($\bar{x} = 0,45$; EPM = 0,25) e Mn 1mg/kg ($\bar{x} = 0,55$; EPM = 0,22), Mn 5mg/kg ($\bar{x} = 0,45$; EPM = 0,22), $F_{(3,67)} = 0,88$, $p = 0,45$ (fig.22).

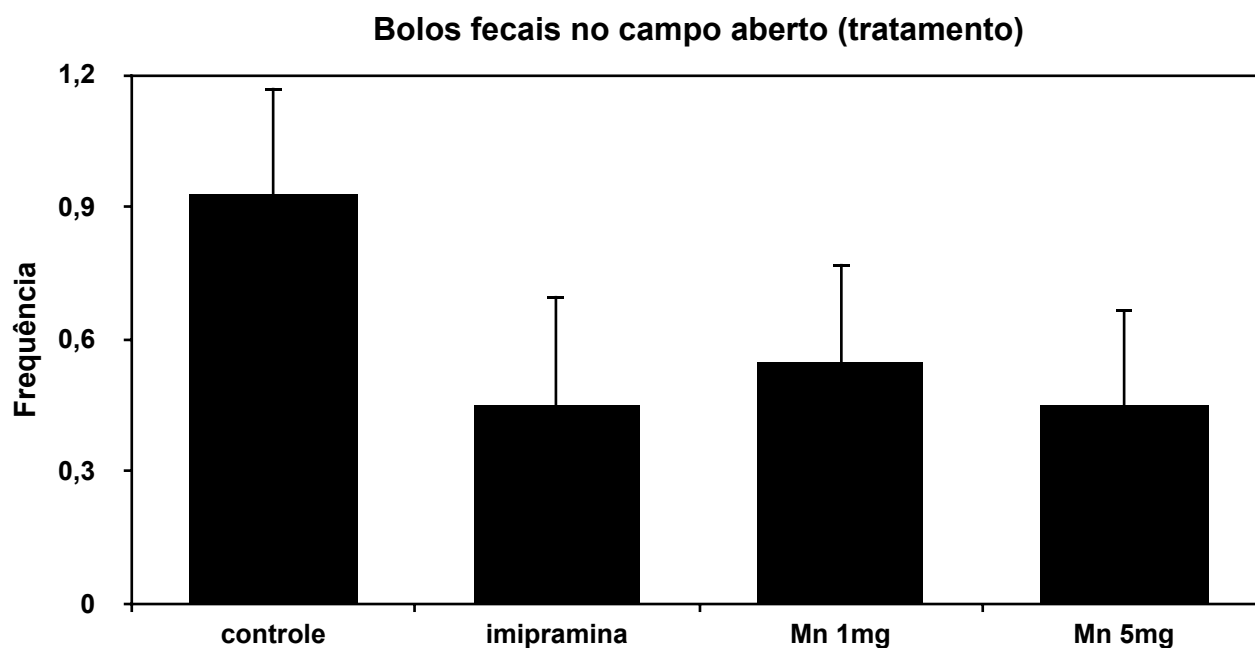


Figura 22 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de bolos fecais para animais submetidos ao modelo do campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% (n = 16), Imipramina 15mg/kg (n = 15), Mn 1mg/kg (n = 20), Mn 5mg/kg (n = 20).

Em relação ao sexo, não houve diferença estatisticamente significativa entre machos ($\bar{X} = 0,71$; EPM = 0,16) e fêmeas ($\bar{X} = 0,47$; EPM = 0,17) $F_{(1,69)} = 1,01$, $p = 0,31$ (fig.23).

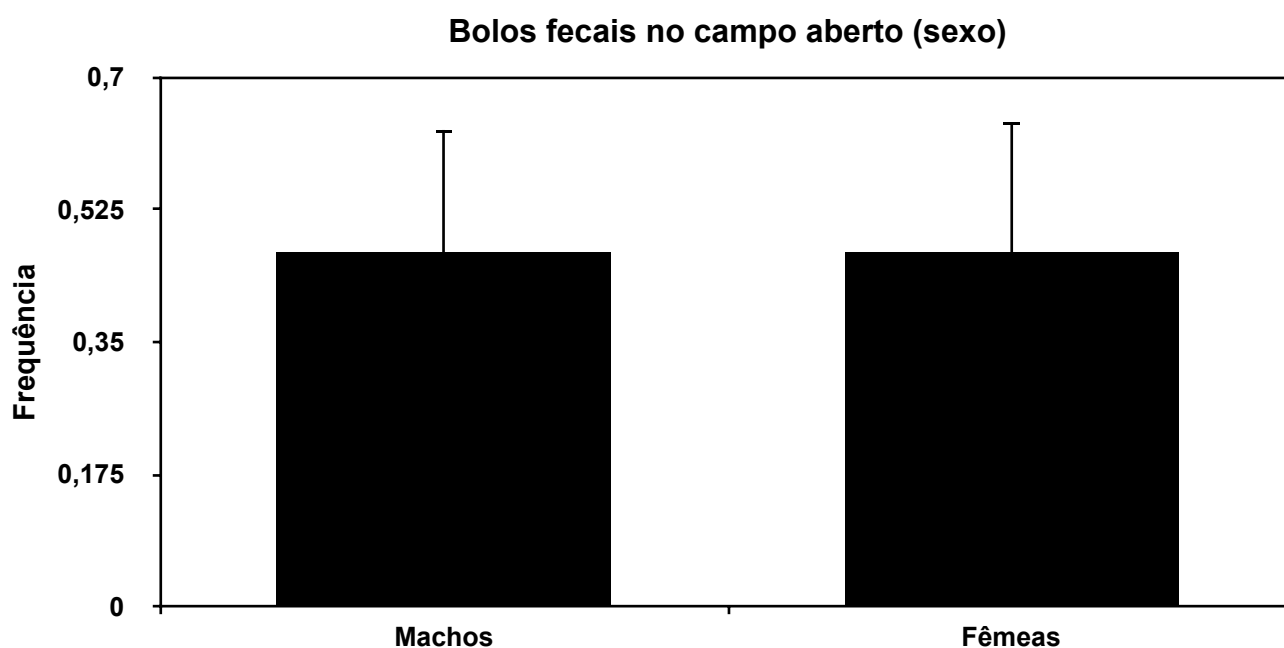


Figura 23 - Efeito das variadas substâncias sobre sobre a frequência de bolos fecais para animais machos e fêmeas submetidos ao modelo do campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% (n = 16), Imipramina 15mg/kg (n = 15), Mn 1mg/kg (n = 20), Mn 5mg/kg (n = 20).

Não houve interação entre as variáveis analisadas: salina macho (\bar{x} = 0,75; EPM = 0,35) salina fêmea (\bar{x} = 1,12; EPM = 0,35); imipramina macho (\bar{x} = 0,62; EPM = 0,35) imipramina fêmea (\bar{x} = 0,28, EPM = 0,37); Mn 1mg/kg macho (\bar{x} = 0,9; EPM = 0,31) Mn 1mg/kg fêmea (\bar{x} = 0,2; EPM = 0,31) Mn 5mg/kg macho (\bar{x} = 0,6; EPM = 0,31) Mn 5mg/kg fêmea (\bar{x} = 0,3; EPM = 0,31), $F_{(7,63)} = 0,87$, $p = 0,45$ (fig.24)

Bolos fecais no campo aberto (interação tratamento x sexo)

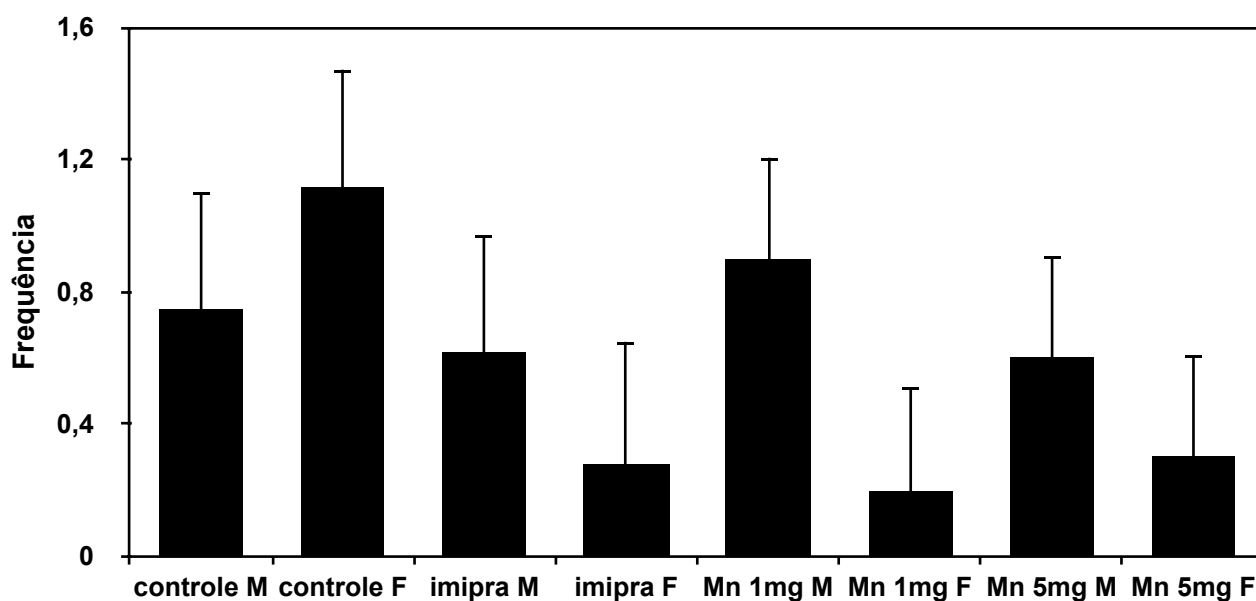


Figura 24 - Efeito das variadas substâncias sobre a frequência de bolos fecais para animais submetidos ao modelo do campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% machos (n = 8), salina 0,9% fêmeas (n = 8) imipramina 15mg/kg machos (n = 8), imipramina 15mg/kg fêmeas (n = 7), Mn 1mg/kg machos (n = 10), Mn 1mg/kg fêmeas (n = 10), Mn 5mg/kg machos (n = 10), Mn 5mg/kg fêmeas (n = 10). imipra indica imipramina, M indica machos e F indica fêmeas.

5.2.5 Latência para a mobilidade

Em relação à latência para a mobilidade, a ANOVA 2-way, seguida pelo teste de Tukey, mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos imipramina (\bar{x} = 61,1; EPM = 30,5) e Mn 5mg/kg (\bar{x} = 199,6; EPM = 26,4), $F_{(3,67)} = 4,2$, $p < 0,05$. Para os demais grupos não houve diferença grupo salina (\bar{x} = 113,3; EPM = 29,5), e Mn 1mg/kg (\bar{x} = 148,6; EPM = 26,4) (fig.25).

Latência para a mobilidade (tratamento)

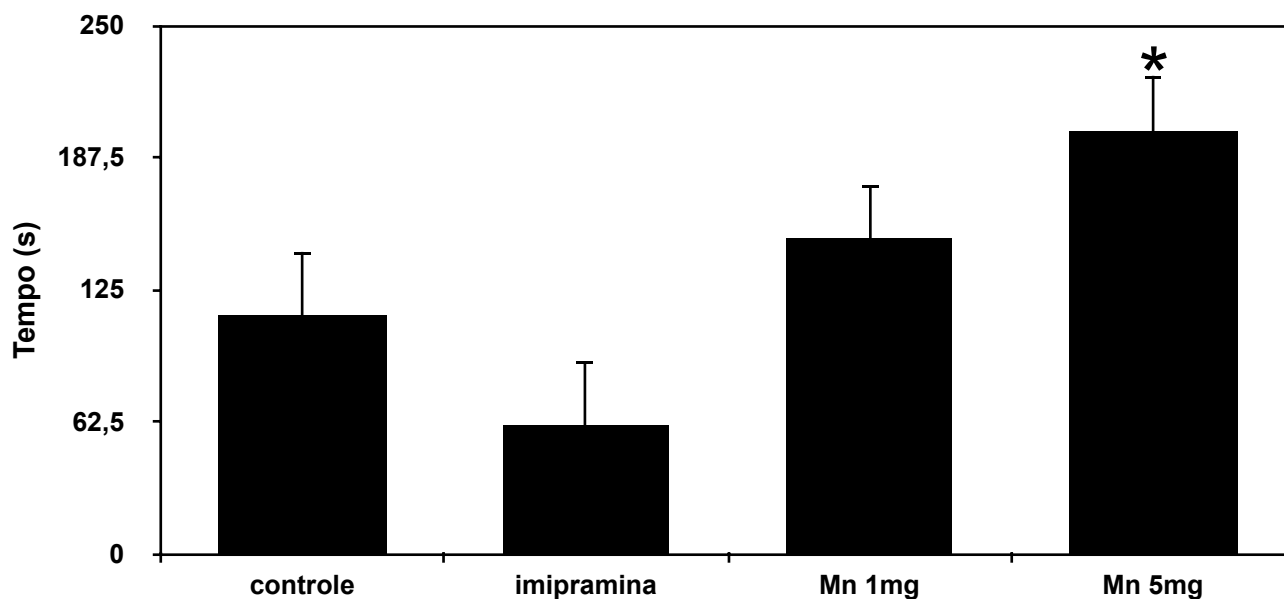


Figura 25 - Efeito das variadas substâncias sobre a latência para a mobilidade (s) para animais submetidos ao modelo do campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p < 0,05$ segundo o teste Tukey. * Indica diferença significativa entre o grupo Mn 5mg/kg ($n = 20$) com os grupos salina 0,9% ($n = 16$), Imipramina 15mg/kg ($n = 15$), Mn 1mg/kg ($n = 20$).

Em relação ao sexo, não houve diferença estatisticamente significativa entre machos ($\bar{x} = 129,4$; EPM = 19,8) e fêmeas ($\bar{x} = 131,9$; EPM = 20,2) $F_{(1,69)} = 0,007$, $p = 0,93$ (fig.26).

Latência para a mobilidade (sexo)

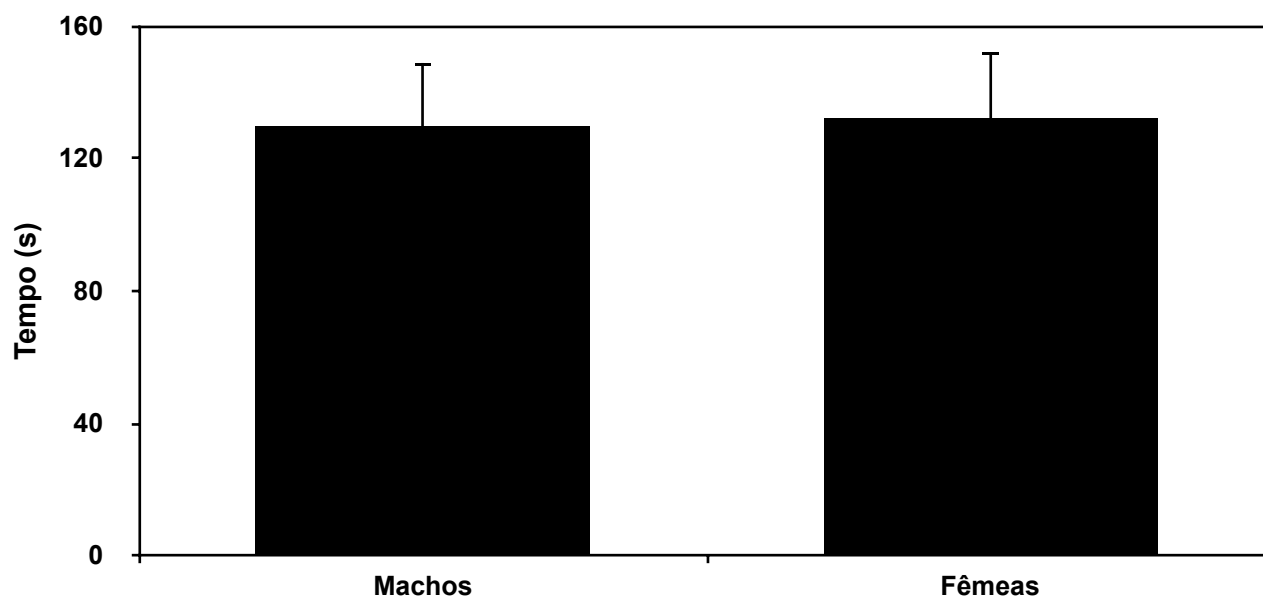


Figura 26 - Efeito das variadas substâncias sobre a latência para a mobilidade (s) para animais machos e fêmeas submetidos ao modelo do campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. Salina 0,9% ($n = 16$), Imipramina 15mg/kg ($n = 15$), Mn 1mg/kg ($n = 20$), Mn 5mg/kg ($n = 20$).

Houve interação entre os grupos: Mn 5mg/kg fêmea (\bar{x} = 271; EPM = 37,3) com os seguintes grupos: imipramina macho (\bar{x} = 60,4; EPM = 41,7), imipramina fêmea (\bar{x} = 61,9, EPM = 44,6); salina fêmea (\bar{x} = 102,9; EPM = 41,7) e Mn 5mg/kg macho (\bar{x} = 128,1; EPM = 37,3), $F_{(7,63)} = 4,02$, $p < 0,05$. Para os demais grupos não houve interação salina macho (\bar{x} = 123,8; EPM = 41,7), Mn 1mg/kg macho (\bar{x} = 205,5; EPM = 37,3) Mn 1mg/kg fêmea (\bar{x} = 91,7; EPM = 37,3) (fig.27).

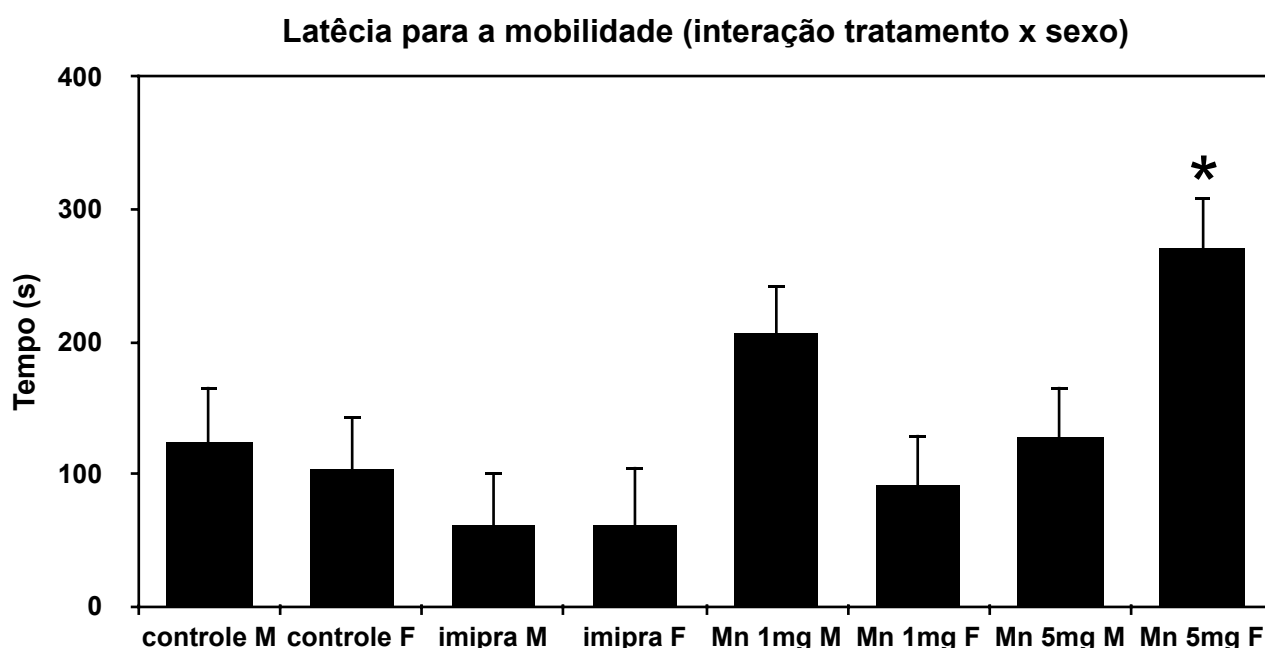


Figura 27 - Efeito das variadas substâncias sobre a latência para a mobilidade (s) para animais submetidos ao modelo do campo aberto. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $p < 0,05$ segundo o teste Tukey. * Indica diferença significativa entre o grupo Mn 1mg/kg fêmea ($n = 10$) com os grupos salina 0,9% machos ($n = 8$), salina 0,9% fêmeas ($n = 8$) imipramina 15mg/kg machos ($n = 8$), imipramina 15mg/kg fêmeas ($n = 7$), Mn 1mg/kg macho ($n = 10$), Mn 5mg/kg machos ($n = 10$), Mn 5mg/kg fêmeas ($n = 10$). imipra indica imipramina, M indica machos e F indica fêmeas.

5.3 Administração de Mn na dose de 10mg/kg

Foram realizadas duas tentativas de tratamento com uma injeção diária de Mn na dose de 10mg/kg, sendo a primeira para oito animais, por doze dias, e a segunda para dez animais, por uma semana, machos e fêmeas. Em ambas as tentativas, houve a indução de edema nas patas, no escroto e na cauda, evidenciado pela cor arroxeada dessas regiões

(fig.28), levando à morte de todos os animais. A partir disso, não foi dada continuidade no tratamento com essa dose de Mn, sugerindo efeito tóxico.



Figura 28 - Fotografia representativa dos animais durante o tratamento com Mn 10mg/kg.

6. DISCUSSÃO

De acordo com os dados obtidos neste trabalho, observou-se que as doses de 1mg/kg e 5mg/kg de Mn alteraram o comportamento de animais submetidos tanto ao modelo do nado forçado quanto no campo aberto.

No nado forçado, quanto ao tempo de imobilidade, foi verificado um aumento para o grupo que recebeu a dose de 1mg/kg de Mn em relação aos grupos imipramina e salina, apenas para os animais machos. Ainda, apesar do grupo que recebeu a dose de 5mg/kg de Mn não ter apresentado diferença estatisticamente significativa com os demais grupos, houve também um aumento do tempo de imobilidade em comparação com o grupo imipramina. Em conjunto, esses dados sugerem que o Mn, nas duas doses utilizadas, apresentou um efeito contrário ao antidepressivo (efeito pró-depressivo), pois promoveu um aumento do tempo de imobilidade quando comparado com o controle positivo do experimento, que apresenta um efeito antidepressivo conhecido e, nesse modelo, induz uma diminuição no tempo de imobilidade. Isso está de

acordo com Bouabid et al. (2014), que mostraram um aumento no tempo de imobilidade em ratos machos tratados com Mn 10mg/kg, quando comparados ao controle. Outros estudos (KRISHNA et al. 2013, BANGASSER et al., 2013) também observaram um aumento no tempo de imobilidade dos animais tratados com Mn.

Nesse sentido, o grupo imipramina apresentou a menor média em relação ao tempo de imobilidade em comparação com todos os outros grupos atuando, de fato, como controle positivo.

Mesmo não tendo sido obtida diferença estatisticamente significativa entre machos e fêmeas com relação ao tempo de imobilidade, os dados mostram que o grupo Mn, na dose de 1mg/kg, apresentou uma média superior ao grupo submetido à administração da mesma dose em fêmeas. Esse resultado está de acordo com Alonso et al. (1989), que mostraram, no nado forçado, um maior tempo de imobilidade de machos em comparação com fêmeas.

Em relação à latência para a imobilidade, não foi obtida diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. Apesar disso, o grupo dos animais machos que recebeu a dose de 1mg/kg de Mn foi o que apresentou a menor média quanto a esse parâmetro, complementando o que foi encontrado para o tempo de imobilidade. Esse dado está de acordo com Carlezon et al. (2002), que apontam a latência para a imobilidade como um parâmetro sensível na detecção de efeitos antidepressivos, além de ser um método rápido e fácil para tal detecção. Isso justifica o fato de não ter sido encontrada diferença estatisticamente significativa para esse parâmetro com a administração de Mn, pois não houve ação antidepressiva.

Com relação à frequência de bolos fecais no nado forçado, houve um aumento estatisticamente significativo para as fêmeas que receberam a dose de 1mg/kg de Mn em comparação com o grupo imipramina. Sendo um antidepressivo tricíclico, a imipramina pode atuar como antagonista competitivo de receptores muscarínicos do subtipo I, levando à constipação intestinal (STAHL, 2010). Ao mesmo tempo, tem-se que os metais são excretados, preferencialmente, pela bile, por meio das fezes,

explicando as maiores médias obtidas entre os animais que receberam a administração de Mn (DORMAN; MELANIE; BRIAN, 2002; SALGADO, 2008), tanto machos quanto fêmeas.

No modelo do campo aberto, os grupos que receberam a dose de 5mg/kg de Mn apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa na frequência de cruzamentos e levantamentos em comparação com o grupo salina. Esses dados são complementados a partir da observação de que a mesma dose de Mn promoveu, em fêmeas, o aumento estatisticamente significativo da latência para a mobilidade, quando comparado com o grupo imipramina. Ao contrário, os grupos que receberam o Mn administrado na dose de 1mg/kg apresentaram um aumento na frequência de cruzamentos e levantamentos, bem como uma diminuição na latência para a mobilidade nessa mesma dose. Esses dados estão de acordo com outros trabalhos da literatura, mostrando que a administração de Mn na dose de 10mg/kg, por 5 semanas, promoveu a redução da exploração horizontal (cruzamentos), levantamentos e comportamentos estereotipados em animais submetidos ao campo aberto. Além disso, houve também o aumento da latência para a mobilidade (O'NEAL et al., 2014; BOUABID et al., 2014). Isso sugere que pode haver uma relação dose-resposta do Mn, sendo que altas doses induziriam hipoatividade em comparação com baixas doses, apontando para um possível efeito tóxico.

Ao contrário do que foi obtido com a dose de 5mg/kg de Mn, os animais tratados com imipramina apresentaram um aumento da frequência de cruzamentos e levantamentos, assim como uma diminuição na latência para a mobilidade no campo aberto. Conhecendo-se o mecanismo de ação da imipramina, tem-se o aumento da oferta de monoaminas na fenda sináptica, entre elas, a NADR, devido à inibição de sua recaptação (STAHL, 2010). Esse dado sugere que doses crescentes de Mn podem alterar a neurotransmissão noradrenérgica, promovendo sua diminuição, pois o mesmo resultado foi encontrado quando houve a administração de 10mg/kg de Mn em ratos submetidos ao campo aberto (BOUABID et al., 2014). Ademais, os mesmos autores apontam que, no

córtex frontal, a concentração de NADR e 5-HT diminuiu significativamente em ratos intoxicados por Mn na dose de 10mg/kg quando comparados com os controles, reforçando a hipótese acima.

Ainda, confrontando os dados do nado forçado e do campo aberto, observou-se que machos apresentaram um maior tempo de imobilidade no nado forçado, enquanto que fêmeas apresentaram uma maior latência para a mobilidade no campo aberto. Nesse sentido, Alonso et al. (1989) mostraram que, em ambos os modelos, machos apresentam maior hipoatividade em comparação com fêmeas, sugerindo que o comportamento locomotor está relacionado com diferentes fatores nos diferentes modelos. Um desses fatores poderia ser a resposta a um estímulo estressante único, sendo os machos mais suscetíveis a isso, enquanto que as fêmeas seriam mais vulneráveis ao estresse repetitivo, como aquelas submetidas ao nado forçado seguido pelo campo aberto (ALONSO et al., 1989).

Nesse sentido, descarta-se a influência hormonal presente nas diferentes fases do ciclo estral em fêmeas submetidas ao nado forçado, conforme mostrado por Alonso et al. (1989), sugerindo que a variação hormonal que ocorre nas diferentes fases não foi suficiente para induzir alterações comportamentais nas fêmeas. Além disso, esse dado da literatura reforça a viabilidade de estudos comparativos utilizando-se animais de diferentes sexos para a avaliação do comportamento, apontando para a falta de alterações significativas induzidas por diferenças hormonais.

7. CONCLUSÕES

- As doses utilizadas do Mn, principalmente a dose de 1mg/kg, resultaram em um efeito pró-depressivo, aumentando o tempo de imobilidade nos animais submetidos ao modelo do nado forçado, indicando uma possível participação da NADR nessa resposta, uma

vez que vincula-se, na literatura, a diminuição desse neurotransmissor com esse padrão de resposta.

- No modelo do campo aberto foi observada uma variação da atividade exploratória dependente da dose de Mn utilizada, obtendo-se a hipoatividade com a maior dose (5mg/kg), sugerindo um possível efeito tóxico, possivelmente devido a uma alteração na neurotransmissão dopaminérgica.
- Quanto à diferença entre machos e fêmeas, os machos apresentaram maior hipoatividade no nado forçado, e as fêmeas no campo aberto, sugerindo a existência de diferentes fatores envolvidos nos dois modelos que podem influenciar diferentemente os dois sexos. Ressalta-se que este é um dos poucos trabalhos comparativos entre machos e fêmeas submetidos ao modelo do nado forçado, sugerindo a necessidade de futuros trabalhos para a pesquisa de possíveis respostas diferenciadas.
- Como uma limitação deste trabalho, aponta-se o pequeno número de animais por grupo pois, em ambos os modelos, verificou-se grande variabilidade de respostas. Além disso, outra limitação envolveu o uso de apenas duas doses de Mn sugerindo-se, em futuros trabalhos, a utilização de doses maiores que 5mg/kg.
- Este é um dos poucos trabalhos que investigam a ação do Mn sobre o comportamento de animais submetidos a modelos para o estudo de psicopatologias, apontando a importância de novas investigações envolvendo o uso de metais e sua relação com transtornos mentais, principalmente utilizando administração intracerebral de Mn.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, P. R.; BENKELFAT, C.; DESCARRIES, L. The neurobiology of depression – revisiting the serotonin hypothesis. I. Cellular and molecular mechanisms. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, Canadá, v. 367, p. 2378-2381, 2012.

ALONSO, S. J.; CASTELLANO, M. A.; AFONSO, D.; RODRIGUEZ, M. Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. **Physiology & Behavior**, Estados Unidos, v. 49, p. 69-72, 1989.

ASCHNER, J. L.; ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**, Estados Unidos, v. 26, p. 353-362, 2005.

AUTISSIER, N. et al. Dopamine and norepinephrine turnover in various regions of the rat brain after chronic manganese chloride administration. **Toxicology**, França, v. 24, p. 175-182, 1982.

BANGASSER, D. A. et al. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) reveals brain circuitry involved in responding to an acute novel stress in rats with a history of repeated social stress. **Physiology & Behavior**, Estados Unidos, v. 122, p. 228–236, 2013

BEN-JONATHAN, N.; HNASKO, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. **Endocrine Reviews**, Estados Unidos, v. 22, n. 6, p. 724-763, 2001.

BIRD, E. D.; ANTON, A. H.; BULLOCK, B. The effects of manganese inhalation on basal ganglia dopamine concentrations in rhesus monkey. **Neurotoxicology**, Estados Unidos, v. 5, p. 59-65, 1984.

BOUABID, S. et al. Manganese-induced atypical parkinsonism is associated with altered basal ganglia activity and changes in tissue levels of monoamines in the rat. **Plos One**, França, v. 9, 2014.

BOWLER, R. M. et al. Neuropsychological sequelae of exposure to welding fumes in a group of occupationally exposed men. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Estados Unidos, v. 206, p. 517-529, 2003.

BROUILLET, E. P. et al. Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesion by impairing energy metabolism. **Experimental Neurology**, Estados Unidos, v.120, p. 89-94, 1993.

CARLEZON Jr., W. A. et al. Antidepressant-like effects of cytidine in the forced swim test in rats. **Biological Psychiatry**, Estados Unidos, v. 51, p. 882– 889, 2002.

CASTRO, W. F. **Efeitos da administração intraperitoneal de neuroesteróides sobre o comportamento de animais submetidos ao modelo do nado forçado**. Brasília: Universidade de Brasília, 2013.

DAILLY, E. et al. Dopamine, depression and antidepressants. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, França, v.18, p. 601-607, 2004.

DORMAN, D. C. et al. Neurotoxicity of manganese chloride in neonatal and adult CD rats following subchronic (21-days) high-dose oral exposure. **Journal of Applied Toxicology**, Estados Unidos, v. 20, p. 179-187, 2000.

FINKELSTEIN, Y. et al. Modulation of cholinergic systems by manganese. **Neurotoxicology**, Israel, v. 28, p.1003-1014, 2007.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, Estados Unidos, v.18, p. 385-403, 1934.

KOKRAS, K. et al. Forced swim test: What about females? **Neuropharmacology**, Holanda, v. 91, p. 1-14, 2015.

KRISHNA, S. et al. Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water. **Archives of Toxicology**, Estados Unidos, v. 88, p.47-64, 2013.

LIU, X. et al. Manganese-induced neurotoxicity: the role of astroglial-derived nitric oxide in striatal interneuron degeneration. **Toxicological Sciences**, Estados Unidos, v. 91, p. 521-531, 2006.

LAOHAUDOMCHOK, W. et al. Neuropsychological effects of low-level manganese exposure in welders. **NeuroToxicology**, Estados Unidos, v. 32, p.171-179, 2011.

MASSART, R.; MONGEAU, R.; LANFUMEY, L; Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, Canadá, v. 367, p. 2485-2494, 2012.

MLYNIEC, K. et al. Essential elements in depression and anxiety. Part II. **Pharmacological Reports**, Polônia, v. 67, p. 187–194, 2015.

MUSTAFA, S. J.; CHANDRA, S. V. Levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and norepinephrine in whole brain of rabbits in chronic manganese toxicity. **Journal of Neurochemistry**, India, v. 18, p. 931-404, 1971.

O'NEAL, S. L. et al. Subacute manganese exposure in rats is a neurochemical model of early manganese toxicity. **NeuroToxicology**, Estados Unidos, v. 44, p. 303-313, 2014

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, Reino Unido, v. 266, p. 730-732, 1977

PROHASKA, J. R. Function of trace elements in brain metabolism. **Physical Review**, v. 67, p. 858-901, 1987.

ROTH, J. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. **Biological Research**, Estados Unidos, v. 39, p. 45-57, 2006.

SANTAMARIA, A. B.; SULSKY, S. I. Risk assessment of an essential element: Manganese. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 73, p. 128-155, 2010.

STAHL, S. M. Antidepressivos. In: **Psicofarmacologia: Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas**, 3a. ed., Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, p. 337-444, 2010.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, Inglaterra, v. 83, p. 1-16, 1984.

ZLOTKIN, S. H.; ATKINSON, S.; LOCKITCH, G. Trace elements in nutrition for premature infants. **Clinics in Perinatology**, Canadá, v. 22, p. 223-240, 1995.

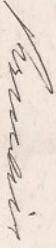
Brasília, 6 de abril de 2015.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO E TOXICOLÓGICO DO MANGANÊS EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DO NADO FORÇADO.", UnBDOC n.º 33255/2015, sob responsabilidade do Professor José Eduardo Pandóssio foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus*: 50. A presente aprovação é válida pelo período de 10/5/2015 a 1/12/2015.




 Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
 Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.