UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

BRUNO JACSON MARTYNHAK

EFEITO DA EXPOSIÇÃO A DIFERENTES PADRÕES DE ILUMINAÇÃO NEONATAL SOBRE O TESTE DA PREFERÊNCIA POR SACAROSE EM RATOS ADULTOS

CURITIBA 2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

BRUNO JACSON MARTYNHAK

EFEITO DA EXPOSIÇÃO A DIFERENTES PADRÕES DE ILUMINAÇÃO NEONATAL SOBRE O TESTE DA PREFERÊNCIA POR SACAROSE EM RATOS ADULTOS

Dissertação apresesentada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Roberto Andreatini
Co-orientador: Fernando Mazzilli Louzada

CURITIBA 2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os envolvidos, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho e à bolsa fornecida pela CAPES.

Minha capacidade para ser feliz poderia ser colocada numa caixa de fósforos, sem tirar os fósforos antes

Marvin, o andróide depressivo, personagem de Douglas Adams.

RESUMO

A depressão está associada com alterações dos ritmos circadianos e condições de iluminação constante promovem expressão de comportamento depressivo em roedores. Ratos mantidos em escuro constante expressam o período circadiano endógeno enquanto que a maior parte dos animais sob luz constante perde o ritmo circadiano da atividade locomotora. Exposição ao claro constante durante a lactação previne esta perda da ritimicidade no adulto. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se a exposição à luz constante durante a lactação poderia previnir a anedonia induzida por luz constante no adulto. Em um primeiro experimento, a anedonia induzida pelo claro constante foi replicada em ratos adultos machos e verificamos que o tratamento com imipramina na água de beber reverte esta condição. Em um segundo experimento, ratos durante a lactação foram mantidos em escuro constante (neonatal-EE), claro constante (neonatal-CC) ou em ciclo claro/escuro habitual (neonatal-CE). Após a exposição ao claro constante na vida adulta, o grupo neonatal-CC não reduziu a preferência por sacarose e apresentou maior atividade locomotora que os outros grupos. O grupo neonatal-EE reduziu a preferência por sacarose antes que o grupo controle e apresentou aumento da corticosterona plasmática. Prevenção da perda da ritmicidade circadiana pode ter protegido os animais do grupo neonatal-CC da anedonia induzida pelo claro constante no adulto, enquanto que o grupo neonatal-EE foi mais suscetível a apresentar comportamento depressivo. Estes resultados sugerem que alterações dos ritmos circadianos podem ser um dos fatores predisponentes da depressão e que o estresse neonatal pode modular a responsividade ao estrese na vida adulta.

Palavras-chave: comportamento depressivo, teste de preferência por sacarose, ritmos circadianos, luz constante, estresse neonatal, corticosterona.

ABSTRACT

Depressive episodes are associated with disturbances in circadian rhythm, and constant illumination has been reported to induce depressive-like behavior in rodents. Rats kept in constant darkness express the endogenous circadian rhythm, and most animals under constant light conditions lose circadian locomotor rhythmicity. Exposure to constant light in rats during lactation was reported to prevent this loss of circadian rhythm in adulthood. Thus, the aim of the present study was to verify whether exposure to constant light during lactation prevents anhedonia-like behavior induced by constant light in adult rats. In the first experiment, we replicated the anhedonia-like effects of constant light in adult male rats. We showed that this effect is reversed by imipramine treatment in the drinking water. In the second experiment, we subjected rats to constant darkness (neonatal-DD) or constant light (neonatal-LL) during the neonatal phase and evaluated them after constant light exposure in adulthood. The neonatal-LL group did not reduce their sucrose preference and exhibited greater locomotor activity than the other groups. The neonatal-DD group exhibited decreased sucrose preference earlier than controls and had higher serum corticosterone concentrations. Prevention of arrithymicity might protect neonatal-LL rats from anhedonia-like behavior induced by constant light, whereas constant darkness during the neonatal phase rendered the neonatal-DD group more susceptible to depressive-like behavior. These results suggest that circadian disruption may be one of the causal factors in mood disorders and that early life stress can influence stress responsivity in adulthood.

Keywords: depressive behavior, anhedonia, sucrose preference test, circadian rhythm, constant light, neonatal stress

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Depressão Maior 1
1.2 Ritmos Circadianos 6
1.3 Ritmos Circadianos e Transtornos de Humor 7
2. OBJETIVOS 12
3. MATERIAIS E MÉTODOS 13
3.1 Animais e Desenho experimental do estudo 13
3.2. Teste de preferência por sacarose 15
3.3. Tratamento com imipramina 15
3.4 Teste do campo aberto 16
3.5. Quantificação da corticosterona do soro 16
3.6. Análise estatística 16
4. RESULTADOS 18
4.1. CC no adulto induz anedonia 18
4.2. CC no adulto reduz a atividade locomotora 19
4.3. CC na vida adulta aumenta corticosterona no grupo neonatal-EE 19
5. DISCUSSÃO 24
6. REFERÊNCIAS 28

ANEXO 1 – Valores numéricos da preferência por sacarose 36

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES e TABELAS

Figura 1 – Ritmicidade alterada na depressão maior 8
Figura 2 – Desenho experimental do primeiro experimento 13
Figura 3 – Desenho experimental do segundo experimento 14
Figura 4 – Teste de preferência por sacarose no primeiro experimento 20
Figura 5 – Tratamento com imipramina.....21
Figura 6 – Teste de preferência por sacarose no segundo experimento 22
Figura 7 – Corticosterona no soro após 3 semanas em claro constante 23

Tabela 1 – Locomoção no campo aberto após 3 semanas em claro constante 23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT – Antidepressivo tricíclico

BDNF – Fator de crescimento derivado do cérebro

CC – Claro constante

CE – Claro/escuro 12:12

CMS – *Chronic mild stress*

DSM - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

EE – Escuro constante

HPA –Hipotálamo-hipófise-adrenal

IMAO – Inibidor da monoamino oxidase

ISRS – Inibidor seletivo da recaptação da serotonina

Neonatal-CC – Grupo que permaneceu em claro constante do 10º ao 21º dia de idade

Neonatal-CE – Grupo que permaneceu em ciclo claro/escuro 12:12 do 10º ao 21º dia de idade

Neonatal-EE – Grupo que permaneceu em escuro constante do 10º ao 21º dia de idade

NSQ – Núcleo supraquiasmático

OMS – Organização Mundial da Saúde

SNC – Sistema Nervoso Central

WHO – World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

1.1 Depressão Maior

Os transtornos de humor envolvem a depressão maior, o transtorno bipolar, a distimia e a ciclotimia. A depressão maior é caracterizada pelo humor deprimido e pela anedonia, a perda da capacidade de sentir prazer. Um destes dois sintomas devem estar presentes para se fazer o diagnóstico clínico segundo o DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) (APA, 2000). A depressão bipolar é caracterizada por quadros depressivos que se alternam com episódios de mania ou hipomania, cuja característica principal é o humor eufórico. Na distimia e na ciclotimia os critérios diagnósticos para depressão maior e depressão bipolar, respectivamente, não são atingidos. O paciente distímico apresenta humor deprimido enquanto que o ciclotímico apresenta humor deprimido com numerosos episódios de sintomas hipomaníacos.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS ou WHO, na sigla em inglês), a depressão é um significativo problema de saúde pública. Estima-se que a depressão custe mais de US$ 43 bihões anualmente com tratamento e perda da produtividade. Dados da OMS apontam que o risco de se apresentar um episódio de depressão durante o período de um ano é maior para as mulheres, cerca de 9,5%, enquanto que para homens o risco é de 5,8%, diferentemente da depressão bipolar, em que o risco em homens e mulheres é aproximadamente igual (WHO, 2001). Pacientes deprimidos apresentam comprometimento em vários aspectos de suas vidas, como o cuidado pessoal, responsabilidades familiares, trabalho e interação social. Pode-se comparar a gravidade da invalidez demonstrada por pacientes com diagnóstico de depressão com aqueles portadores de outras doenças crônicas, como hipertensão, diabetes e artrite. Pacientes deprimidos perdem mais dias de trabalho, ficam doentes mais facilmente e tendem a morrer mais jovens quando comparados com a população em geral. A OMS também estima que a depressão seja a maior causa de invalidez sem morte na sociedade, contribuindo com 11,9% dos casos (WHO, 2005). A estimativa para 2020 é

que a depressão esteja atrás apenas da isquemia cardíaca para a conta da invalidez e morte provocada por patologias.

Apesar do elevado custo social da depressão, o investimento em saúde mental ainda é baixo, principalmente em países com baixa e média renda (Chisholm et al., 2007). Além do pouco investimento, a desinformação sobre o tratamento da depressão também é um problema. Recentemente, pesquisadores constataram, através de questionários aplicados a uma amostra representativa da população da Finlândia, que as pessoas ainda consideram que depressão depende apenas da força de vontade do indivíduo e que os antidepressivos podem levar a dependência (Aromaa et al., 2010). A mesma idéia sobre os antidepressivos já havia sido reportada em 1991, durante a campanha britânica de combate à depressão. Cerca de 78% dos participantes relataram acreditar que os antidepressivos induzem dependência e, após cinco anos de campanha, a mudança foi pequena (Paykel et al., 1998).

O tratamento farmacológico para depressão usualmente envolve o aumento da transmissão monoaminérgica no sistema nervoso central (SNC). Desde a descoberta que os fármacos que aumentam a transmissão monoaminérgica melhoram o humor, ocorreu um grande investimento para a síntese de novas drogas com mecanismo similar. O inibidor da monoamino oxidase (IMAO) iproniazida se mostrou eficaz em melhorar o humor dos pacientes, apesar de estar sendo testada para o tratamento da tuberculose (Zeller e Barsky, 1952). A imipramina também foi descoberta por acaso. Este antidepressivo tricíclico (ADT) estava em testes devido à possível propriedade sedativa por se tratar de um derivado iminodibenzílico. Entretanto, Kuhn (1958) observou que a imipramina não apresentava propriedades sedativas, mas melhorava o humor de pacientes deprimidos. Importante ressaltar que embora o acaso faça parte da descoberta da ação antidepressiva dos IMAOs e dos ADTs, segundo Louis Pasteur, “o acaso só favorece a mente preparada” (Knisely, 2008).

Os ADTs, cujo mecanismo de ação é inibir a recaptação de serotonina e/ou noradrenalina na fenda sináptica, apresentam uma ampla gama de reações adversas, tais como constipação, sedação, ganho de peso e boca seca. Estas reações são em parte atribuídas à ação não-específica dos ADTs em outros sistemas de neurotransmissão, como os receptores histaminérgicos, α-1 adrenérgicos e

muscarínicos, além de bloquearem canais de sódio. Este último efeito pode levar à depressão cardíaca, apresentando grave risco em pacientes com insuficiência cardíaca (Glassman et al., 1993).

A baixa tolerabilidade aos ADTs estimulou o desenvolvimento de fármacos mais seletivos apenas para a recaptação das monoaminas. Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) incluem a fluoxetina, o citalopram, a paroxetina e a sertralina, enquanto que a reboxetina inibe seletivamente a recaptação de noradrenalina. A venlafaxina é um fármaco que inibe tanto a recaptação de serotonina como de noradrenalina. Embora os ISRS apresentem menos reações adversas que os ADTs, um estudo de meta-análise mostra que os grupos placebo nos estudos com ADTs relatam mais reações adversas que os grupos placebo em estudos com ISRS, evidenciando uma tendenciosidade a superestimar os efeitos colaterais dos ADTs nos estudos (Rief et al., 2009).

Além destes fármacos, também existem os chamados antidepressivos atípicos, os quais incluem a mirtazapina (antagonista alfa-2) e a trazodona (antagonista 5-HT_2). Apesar do mecanismo de ação dos inibidores da recaptação de monoaminas, a tianeptina apresenta ação antidepressiva, ainda que seu efeito seja diminuir a neurotrasmissão monoaminérgica (Lucki e O'Leary, 2004).

O mecanismo de ação dos antidepressivos clássicos (i.e., aumento da neurotransmissão monoaminérgica) levou à hipótese monoaminérgica da depressão. De acordo com esta hipótese, a diminuição dos níveis de monoaminas no sistema nervoso central levaria ao quadro depressivo. Além disso, a reserpina, um antigo antihipertensivo que depleta as reservas de monoaminas, produz sintomas depressivos em alguns pacientes. No entanto, embora a depleção experimental de monoaminas possa piorar o humor de pacientes deprimidos não medicados, o mesmo não ocorre com pacientes controles saudáveis (Ruhé et al., 2007).

IMAOs, ADTs e ISRS podem produzir aumentos imediatos na neurotransmissão monoaminérgica, entretanto o efeito na melhora do humor requer semanas de tratamento (Berton e Nestler, 2006). Sabe-se hoje que o aumento agudo de monoaminas nas fendas sinápticas produzido pelos antidepressivos leva

secundariamente a processos de neuroplasticidade que podem ser responsáveis pelo efeito antidepressivo (Nestler et al., 2002; Pittenger e Duman, 2008).

Antidepressivos administrados cronicamente em animais alteram a expressão do fator de transcrição CREB (proteína que se liga à região CRE do DNA, ou elemento de resposta ao AMPc). A expressão de CREB está diferentemente afetada nos pacientes deprimidos de acordo com a região cerebral. Por exemplo, no hipocampo encontra-se diminuída enquanto que no núcleo accumbens encontra-se aumentada (Nestler e Carlezon, 2006). O tratamento com antidepressivos em modelo animais de depressão restaura a expressão deste fator de transcrição para os níveis basais. (Carlezon et al., 2005). A expressão de CREB também é aumentada no núcleo accumbens em situações de consumo de drogas de abuso e de estresse (Pittenger e Duman, 2008).

Durante situações de estresse ocorre ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e consequente aumento dos níveis de cortisol. Visto que eventos estressantes como perda de emprego e morte de ente querido são fatores relacionados com o quadro depressivo (McEwen, 2000), associa-se o aumento da liberação de glicocorticóides como um dos fatores desencadeantes da depressão. O tratamento agudo com dexametasona, agonista de receptores glicocorticóides, induz quadro de anedonia em roedores, verificada através da diminuição da preferência por solução de sacarose em relação à água, sendo revertido pelo tratamento repetido com paroxetina (Casarotto e Andreatini, 2007). Outra forma de induzir anedonia para se estudar a depressão em modelos animais é através do protocolo de estresse brando, imprevisível e crônico, conhecido pela sigla em inglês CMS (*chronic mild stress*) (Willner et al., 1987). Animais submetidos ao CMS apresentam aumento da corticosterona plasmática, maior ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado e diminuição da preferência por solução de sacarose, sendo estes parâmetros revertidos por administração crônica de antidepressivos (Willner et al., 1987). O CMS apresenta validade de face, preditiva e de constructo, visto que simula situações de estresse antes do desenvolvimento do quadro depressivo, é sensível ao tratamento com antidepressivos e promove alterações neurobiológicas semelhantes às que ocorrem com pacientes deprimidos, como, por exemplo, a redução das células granulares do hipocampo (Jayatissa et al., 2008).

Foi verificado através de neuroimagem que pacientes diagnosticados com depressão apresentam redução do volume do hipocampo e, além disso, o volume retorna ao tamanho considerado normal após o tratamento com antidepressivo e remissão do quadro (Sheline, 2003). A diminuição do volume hipocampal também está associada à redução da neurogênese, que ocorre no hipocampo e no bulbo olfatório durante a vida adulta. Embora o papel da neurogênese no adulto ainda não esteja completamente esclarecido, sabe-se que o tratamento com antidepressivo em modelos animais a restaura (Sahay e Hen, 2007).

Um dos fatores de crescimento relacionados com a neurogênese e demais processos de neuroplasticidade é o BDNF (fator de crescimento derivado do cérebro) (Lee et al., 2002). Os níveis de BDNF encontram-se diminuídos no hipocampo, tanto em vítimas de suicídio (Karege et al., 2005), quanto em animais submetidos ao CMS (Smith et al., 1995). O BDNF atua em receptor ligado à tirosina quinase, o Trk, e raros são os agonistas para este receptor (Massa et al., 2010). O tratamento de animais com BDNF mostrou efeito antidepressivo em alguns estudos (Siuciak et al., 1997; Shirayama et al., 2002; Schmidt e Duman, 2010). Juntando-se ao fato que o aumento de BDNF só ocorre depois de prolongado tratamento com antidepressivos (Chen et al., 2001), a hipótese neurotrófica da depressão ganha mais embasamento. Esta hipótese propõe que a depressão estaria associada à diminuição da neurogênese hipocampal e que os tratamentos antidepressivos atuariam pelo restabelecimento da neurogênese através de um aumento do BNDF (Malberg et al., 2000).

Entretanto, apesar da compreensão de alguns mecanismos associados à ação dos antidepressivos e da introdução de novos medicamentos, duas limitações permanecem na clínica: o retardo na ação antidepressiva (2 a 4 semanas) e baixa eficácia do tratamento na prática clínica: 47% de taxa de resposta e aproximadamente 30% de remissão completa do quadro depressivo (Trivedi et al., 2006). Portanto, deve-se procurar novas estratégias no desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos. Dentre estas estratégias, encontram-se as manipulações dos ritmos circadianos e o entendimento da relação entre transtornos de humor e alterações dos ritmos circadianos (analisada no tópico 1.3).

1.2 Ritmos Circadianos

Os ritmos circadianos, ritmos fisiológicos com duração aproximada de 24h, são encontrados em praticamente todos os seres vivos, incluindo bactérias, plantas e animais. A principal característica dos ritmos circadianos é o seu caráter endógeno. Os ritmos circadianos são gerados endogenamente e sincronizados às 24h do dia da Terra principalmente pelo ciclo claro/escuro. Mesmo em condições ambientais constantes, como o escuro constante para roedores noturnos e o claro constante para humanos, os ritmos ainda são expressos com um período próximo do ciclo da Terra, o que evidencia seu caráter endógeno. Os organismos que estão expressando a ritmicidade nestas condições constantes são ditos em livre-curso, referenciando-se à ausência de pistas temporais do ambiente (Golombeck e Rosenstein, 2010).

Visto que existe a geração de um ritmo endógeno e que este é sincronizado pelo ciclo claro/escuro, pode-se supor que exista uma estrutura que integre estas informações para então ajustar os ritmos de todo o organismo. Nos mamíferos, esta estrutura se localiza nos núcleos supraquiasmáticos (NSQs) do hipotálamo. Os NSQs são compostos por cerca de 10.000 neurônios cada, esquerdo e direito, e recebem fibras glutamatérgicas da retina através do trato retinohipotalâmico. A informação luminosa que se dirige ao hipotálamo é recebida pelo pigmento melanopsina localizado nas células ganglionares da retina. Entretanto, recentemente foi observado que os bastonetes também podem fornecer esta informação (Altimus et al., 2010 e Li et al., 2010). Além de fibras aferentes da retina, os NSQs também recebem aferências serotonérgicas dos núcleos da rafe, expressando receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{-7} (Pickard e Rea, 1997).

Os neurônios dos NSQs são principalmente GABAérgicos e um conjunto de ritmos ultradianos, ritmos com período menor que 24h, gera um padrão circadiano nas eferências destes núcleos. As eferências dos NSQs são diversas, como, por exemplo, para os núcleos paraventricular e arqueado, participando então da modulação da hipófise (Panga e Hogenesch, 2004). Uma das projeções do núcleo paraventricular é o gânglio simpático da raiz cervical da medula, que por sua vez, envia fibras para a pineal, controlando a secreção de melatonina, cuja secreção é inibida pela luz.

É possível fazer uma distinção anatômica dos NSQs e de acordo com os neurotransmissores expressos (Antle e Silver, 2005). A porção dorsomedial é pouco inervada pela retina, sendo então o componente essencial para a geração do ritmo endógeno. A porção ventrolateral recebe fibras da retina através do trato retino-hipotalâmico, levando ao sistema de temporização as informações sobre o ambiente. O desacoplamento entre as porções dorsomedial e ventrolateral pode ser induzido por meio do protocolo de dessincronização forçada. Em ratos, um ciclo claro-escuro de 22 h é imposto ao animal, de forma que ele passe a exibir dois ritmos locomotores, um sincronizado ao ciclo claro-escuro imposto e outro obedecendo ao período circadiano endógeno (de la Iglesia et al., 2004).

Esta dissociação entre as porções dorsomedial e ventrolateral dos NSQs também pode ser observada em roedores quando o horário de apagar ou acender das luzes do biotério é adiantado em três horas (Nagano et al., 2003). Portanto, é provável que mudanças bruscas de horários possam levar a esta dessincronização em humanos também, mais notavelmente em trabalhores em turno e pessoas que atravessam fusos horários em voos, sofrendo o chamado *jet lag*.

Tanto o jet lag quanto o trabalho em turno podem trazer problemas para a saúde. Por exemplo, o trabalho em turno é associado a diversas patologias, como aumento da incidência de câncer, dispepsias gástricas, hipertensão e infarto do miocárdio (Foster e Wulff, 2005). Dentre elas ainda se enquadram questões de saúde mental, envolvendo depressão e ansiedade, tópico discutido a seguir.

1.3 Ritmos Circadianos e Transtornos de Humor

Episódios depressivos têm sido associados a alterações do ritmo circadiano. Variações no humor ao longo do dia são comuns em pacientes deprimidos (Gordijin et al., 1994) e, além disso, um padrão pior de humor pela manhã foi incorporado aos critérios do DSM-IV para o diagnóstico do subtipo melancólico da depressão maior. Alterações nos ritmos circadianos, incluindo o ciclo vigília/sono, são heterogêneas na depressão maior, mas em geral incluem alta temperatura corporal durante a noite, secreção de cortisol com avanço de fase, além de redução no sono de ondas lentas,

adiantamento de fase do sono REM, bem como o aumento da duração total do sono REM (revisado em Monteleone et al., 2008; Monteleone et al., 2010). A temperatura corporal pode até mesmo deixar de apresentar a ritmicidade de 24h em alguns pacientes deprimidos (van Londen et al., 2001). Um esquema representando possíveis alterações dos ritmos circadianos é mostrado na figura 1. De forma geral, pode-se dizer que os pacientes apresentam uma dessincronização interna e/ou encontram-se em livre-curso (Ehlers et al., 1988; Stetler et al., 2004). Uma das formas de se conceber esta dessincronização interna é a relação de fase entre o ciclo vigília/sono com a secreção de melatonina. Muitos pacientes deprimidos apresentam a secreção de melatonina muito adiantada em relação ao horário de dormir, sendo inclusive importante para as abordagens terapêuticas envolvendo luz intensa (Wehr et al., 1979), a ser discutido adiante. Além disso, ratos submetidos ao CMS apresentam uma alteração dos ritmos circadianos, como, por exemplo, diminuição da amplitude do ritmo da atividade motora (Gorka et al., 1996), reforçando a hipótese da associação entre alteração de ritmos biológicos e depressão.

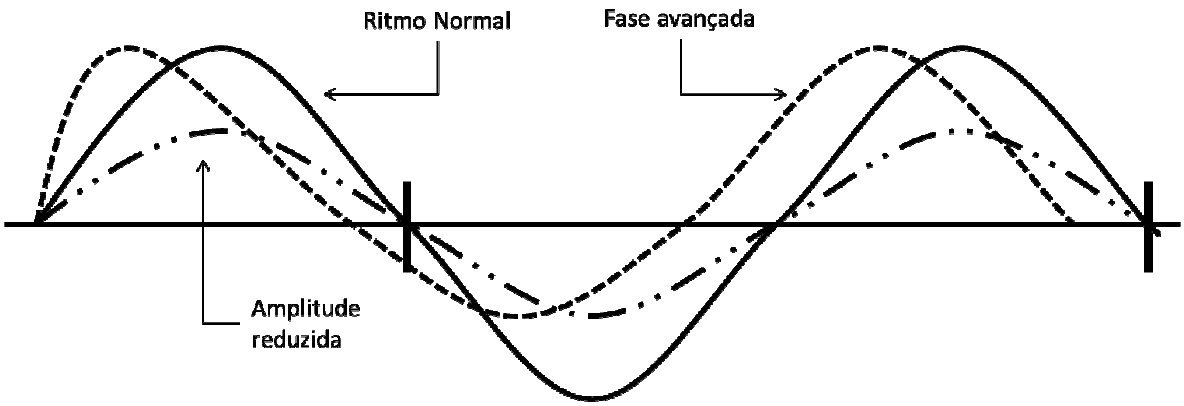

Figura 1 - Esquema representando um ritmo hipotético de uma variável com oscilação circadiana (como a temperatura, cortisol ou melatonina). Em indivíduos deprimidos, a ritmicidade pode se encontrar com a fase adiantada e/ou com a amplitude reduzida (traço pontilhados) em relação ao esperado da população (traço inteiro).

Distúrbios nas propriedades de sincronização do sistema de temporização circadiano também são observados em mutações de genes relógio. Além de seu papel potencial na preferência por horários de sono e na síndrome da fase atrasada de sono (Archer et al., 2003; Pereira et al., 2005), o gene relógio *PER3* também foi associado a

características dos transtornos de humor, como a responsividade ao tratamento com antidepressivo e a idade do aparecimento do transtorno (Artioli et al., 2007).

Diferenças individuais nas preferências por horários de sono também são relacionadas com depressão. Existe uma associação entre a vespertinidade, preferência por horários de dormir e acordar mais tardios, com a depressão maior (Kim et al., 2010). Apesar de não ser um dado surpreendente, visto que os indivíduos vespertinos estão frequentemente privados de sono e também apresentam maior prevalência para outros transtornos, como esquizofrenia, depressão bipolar (Wood et al., 2009) e déficit de atenção (Caci et al., 2009), a associação entre vespertinidade e depressão é curiosa devido à maior parte dos indivíduos deprimidos apresentarem a ritmicidade mais adiantada, e não mais atrasada. Por outro lado, estes dados reforçam a hipótese da dessincronização temporal interna, visto que os horários de sono estão com menor acoplamento com o ritmo da temperatura, melatonina e cortisol. Além disso, a exposição à luz intensa pela manhã, conhecida por adiantar os ritmos, também apresenta efeito antidepressivo (Golden et al., 2005).

Diversos estudos apontam a eficácia do tratamento com luz intensa para a depressão. Existem no mercado os mais variados produtos para produzir esta luz intensa, passando de despertadores até bonés com lâmpadas, embora ainda não todos sejam devidamente padronizados quanto à intensidade e tempo recomendado de exposição. Imagina-se que ao adiantar o relógio biológico do paciente, elimina-se a dessincronização interna, fazendo com que ocorra uma alocação do ciclo vigília/sono com menor relação de fase entre os ritmos da temperatura e da melatonina (Wehr et al., 1979; Wirz-Justice, 2003).

A privação de uma noite de sono, assim como a privação da última metade da noite de sono, também promove efeito antidepressivo em pacientes deprimidos. Assim como pacientes bipolares diagnosticados com depressão maior que iniciam o tratamento com ISRS podem apresentar um episódio de mania, pacientes bipolares também podem entrar em quadro de mania quando são privados de sono (Riemann et al., 2002). A privação de uma noite de sono em roedores, assim como o tratamento com antidepressivos, aumenta a neurogênese no hipocampo (Grassi Zucconi et al., 2006). Entretanto, a privação de 72h de sono promove o efeito oposto: ocorre diminuição da

neurogênese (Mirescu et al., 2006). Caso seja imposta uma restrição crônica de sono, roedores passam a apresentar comportamento depressivo (Novati et al., 2008).

Tanto manipulações dos ritmos biológicos podem levar a efeitos antidepressivos, como o tratamento com fármacos antidepressivos pode alterar os ritmos circadianos. Um dos efeitos do tratamento com inibidores da recaptação de monoaminas é o adiantamento dos ritmos (Cuesta et al., 2008). Os neurônios dos NSQs apresentam receptores para a serotonina, podendo então ser diretamente sensíveis ao aumento de serotonina na fenda sináptica. Outro fármaco que afeta os ritmos circadianos é a agomelatina. A agomelatina é um agonista dos receptores de melatonina e antagonista 5-HT_{2C} (de Bodinat et al., 2010). Além disso, há evidências apontando para maior eficácia da agomelatina em relação à sertralina (Kasper et al., 2010).

Em humanos, a depressão também é associada com a redução do fotoperíodo que ocorre durante o inverno. A depressão sazonal ocorre mais frequentemente em países localizados em altas latitudes, ou seja, em áreas do mundo onde há pouca luz solar por extensos períodos de tempo (Booker et al., 1991; Mersch et al., 1999). A maioria dos pacientes apresenta atraso nos seus ritmos. Entretanto, um pequeno subgrupo apresenta avanços de fase durante a depressão de inverno (Lewy et al., 2006). Em concordância, ratos diurnos mantidos em fotoperíodos curtos ou que receberam administrações de melatonina durante a fase clara do ciclo apresentaram comportamento depressivo nos testes de preferência por sacarose e natação forçada (Einat et al., 2005; Ashkenazy et al., 2009a). Além disso, exposição por uma hora de luz intensa foi suficiente para reverter o comportamento depressivo no teste da natação forçada (Ashkenazy et al., 2009b). A completa privação de luz, ou seja, o escuro constante, após seis semanas também promoveu a indução de comportamento depressivo em ratos, além de acarretar danos em neurônios monoaminérgicos, principalmente noradrenérgicos, sendo ambos os efeitos remediados por tratamento com desipramina, um ADT noradrenérgico (Gonzalez e Aston-Jones, 2008). Os autores observaram aumento no tempo de imobilidade e diminuição no comportamento de escalada no teste da natação forçada. A diminuição do comportamento de escalada e o maior dano dos neurônios noradrenérgicos reforçam a distinção do comportamento de escalada e natação como relacionados predominantemente com um componente

noradrenérgico e serotonérgico, respectivamente (Detke et al., 1995). Este é um dado de grande importância tanto para o estudo dos transtornos de humor como para a cronobiologia em geral, visto que exposição ao escuro constante é rotina comum para se avaliar o período endógeno dos roedores. Estudos futuros devem levar em conta os efeitos deletérios de tal manipulação.

No outro extremo, camundongos expostos por três semanas à luz constante apresentaram comportamento depressivo, mensurado pelos testes da natação forçada e da preferência por sacarose, que é parcialmente prevenido pelo enriquecimento do ambiente com um tubo opaco, permitido aos animais escaparem da luz (Fonken et al., 2009). Exposição prolongada à iluminação constante também promove arritmicidade nos neurônios dos NSQs (Ohta et al., 2005) e na atividade locomotora (Honma e Hiroshige, 1978; Eastman et al., 1983). Entretanto, exposição neonatal ao claro constante previne a perda da ritmicidade do ritmo da atividade locomotora (Cambras et al., 1998; Canal-Corretger et al., 2001). Assim, neste trabalho foi estudada a relação entre exposição a diferentes padrões de iluminação neonatal com a resposta à exposisão ao claro constante no animal adulto.

2. OBJETIVOS

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi replicar a indução da anedonia induzida pelo claro constante e verificar se o tratamento com imipramina reverte esta anedonia. Além disso, foi investigada a hipótese de que a exposição neonatal ao claro constante poderia previnir a anedonia induzida pela iluminação constante no adulto e previnir aumento na secreção de corticosterona, visto que esta manipulação neonatal previne a arritmicidade locomotora em ratos adultos induzidos pela exposição ao claro constante. A confirmação desta hipótese reforça a associação entre perda da ritmicidade e o desenvolvimento de quadros de depressão maior.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Desenho experimental do estudo

Ratos Wistar machos adultos foram obtidos do biotério da Universidade Federal do Paraná e mantidos sob temperatura controlada (22±3 ◦C), ciclo claro/escuro de 12:12 (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h) e água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados tiveram aprovação prévia pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (CEEA, protocolo # 389).

No primeiro experimento, ratos machos de 11 semanas foram mantidos em aclimatação por duas semanas antes do início dos experimentos. Após os testes basais de preferência por sacarose (descritos no item 3.1), os animais foram pareados de acordo com a preferência por sacarose e então randomizados em dois grupos: luz constante (CC, ~ 150 lux) e controles (CE) (n=18/grupo), em salas separadas. No final da terceira semana, os ratos foram testados no campo aberto. No final da quarta semana, com o grupo CC ainda mantido em luz constante, o tratamento com imipramina ou água foi iniciado, conforme esquematizado na figura 1.

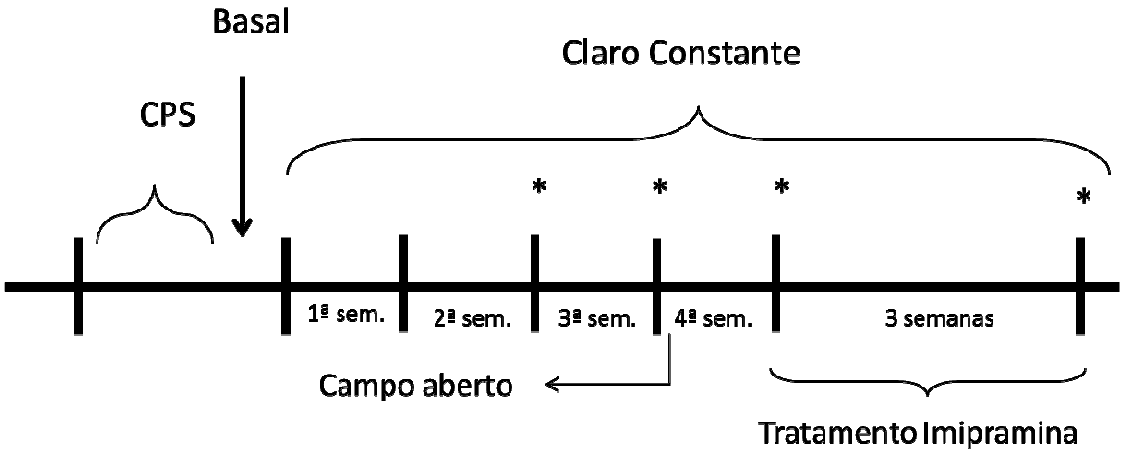

Figura 2 – Desenho experimental do primeiro experimento. CPS (Curva de preferência por sacarose), Basal (teste de preferência por sacarose 0,5% tomado como referência para comparações posteriores), * (teste de preferência por sacarose 0,5%, realizados no final da segunda e terceira semana de claro constante e após o tratamento com imipramina).

No segundo experimento (figura 2), foi realizado o cruzamento entre ratos machos e fêmeas, sempre mantidos em ciclo claro/escuro 12:12. Dez dias após o nascimento dos filhotes, os animais foram designados para 3 grupos distintos: neonatal-CE (controle, claro/escuro 12:12), neonatal-EE (escuro constante, <0,5 lux) e neonatal-CC (claro constante, ~ 100 lux). Todos os animais foram mantidos na mesma sala e ao mesmo tempo. Os ratos dos grupos neonatal-CC e neonatal-EE foram mantidos em um container de ciclo circadiano (Insight, Riberirão Preto, SP, Brazil), enquanto os animais do grupo neonatal-CE foram mantidos fora do container, de uma forma que todos os animais permaneceram sob mesma temperatura e barulho ambiente.

Os animais permaneceram nestas condições até o 22º dia de idade, quando foram desmamados e machos e fêmeas foram separados em caixas distintas. Aos 90 dias, os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos para o primeiro experimento, com a exceção que neste experimento todos os animais foram colocados em claro constante após os testes basais de preferência por sacarose e apenas metade dos animais foi submetida ao teste do campo aberto, sendo que a outra metade foi sacrificada após 3 dias por decaptação (entre 14h e 17h) para coleta de sangue (descrito no item 2.5).

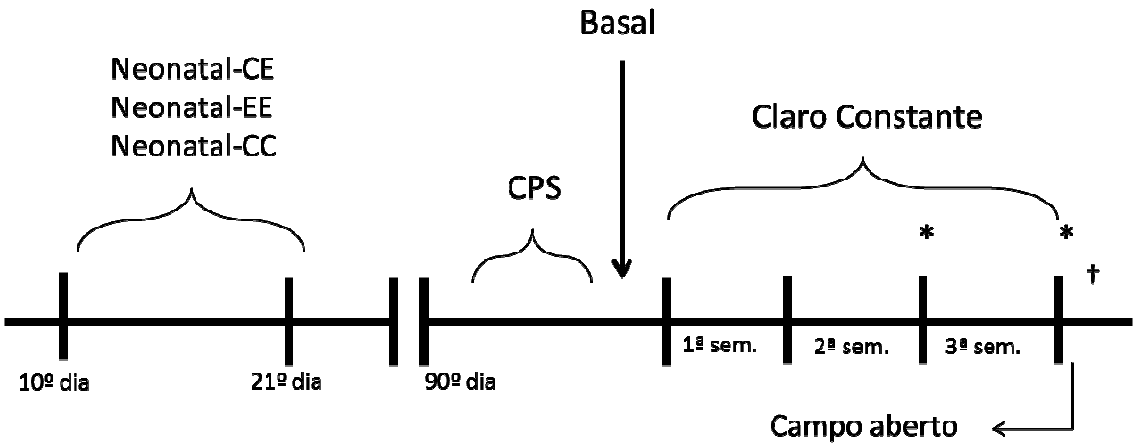

Figura 3 – Desenho experimental do segundo experimento. Neonatal-CE (ciclo claro/escuro 12:12), neonatal-EE (escuro constante do 10º ao 22º dia de idade), neonatal-CC (claro constante do 10º ao 22º dia de idade). CPS (Curva de preferência por sacarose), Basal (teste de preferência por sacarose 0,5% tomado como referência para comparações posteriores), * (teste de preferência por sacarose 0,5% realizados no final da segunda e terceira semana de claro constante e após o tratamento com imipramina), † (sacrifício dos ratos).

3.2. Teste de preferência por sacarose

Para avaliar o comportamento de anedonia, foi utilizado o teste de preferência por sacarose (Willner et al., 1987). O teste consistiu de uma versão modificada do procedimento de escolha por duas garrafas (Bolaños et al., 2003). Após habituação inicial a duas garrafas de água por 3 dias, foram oferecidas aos ratos a escolha entre uma garrafa com água ou uma garrafa com concentrações crescentes de sacarose (0, 0,25, 0,5, 1, 2%) por 24h cada concentração. As garrafas foram pesadas antes do teste e 24h depois. Após o estabelecimento da curva de preferência, um segundo teste com a concentração de sacarose de 0,5% foi realizada e chamada de basal. A concentração de 0,5% foi escolhida por ser a menor concentração de sacarose que os ratos denotaram preferência. O teste de preferência por sacarose foi realizado no final da segunda e da terceira semana em claro constante para ambos os experimentos e também no final da quarta semana e após o tratamento com imipramina no primeiro experimento.

3.3. Tratamento com imipramina

No primeiro experimento, ratos dos grupos CE e CC, separadamente, foram pareados de acordo com a preferência de sacarose no final da quarta semana de experimento em claro constante e randomizados nos grupos tratatos com imipramina e controles (n=9/grupo). Para evitar que os animais utilizassem o tratamento diário como temporizador, a imipramina foi dada via água de beber. Os ratos foram pesados, e o consumo de água para cada rato foi calculado. As soluções de imipramina foram trocadas 3 vezes por semana, e as concentrações de imipramina foram ajustadas de acordo com o consumo de líquido dos animais (variando entre 55-110 mg imipramina/L). Os ratos consumiram entre 10-15 mg imipramina/dia/kg. Não foram observadas mudanças no consumo de líquido. Após 3 semanas de tratamento, os ratos foram testados novamente para a preferência de sacarose. As garrafas foram oferecidas às 9h e, para prevenir sintomas de abstinência, uma administração

intraperitonial de imipramina (10 mg/kg) foi realizada às 14h. Para tanto, as garrafas foram retiradas durante a administração, sendo recolocadas logo em seguida.

3.4 Teste do campo aberto

Os ratos foram testados no campo aberto para avaliação da atividade locomotora. O campo aberto consiste em uma arena redonda (97 cm de diâmetro, 32,5 cm de altura) dividida em 3 círculos que são então subdivididos em 19 regiões aproximadamente iguais. Foram quantificados a ambulação (central e periférica) e o comportamento de levantar. A ambulação era registrada quando o animal cruzava com as quatro patas de uma região para a outra. A area central foi definina como a região compreendendo os dois círculos mais internos. Os animais eram colocados no círculo central e a atividade era registrada por 5 minutos. O aparato era então lavado com etanol a 5% para remover possíveis odores e resíduos do animal testado anteriormente.

3.5. Quantificação da corticosterona do soro

O sangue foi coletado por decaptação e centrifugado a 1500 x g por 15 minutos. O soro foi congelado a -80ºC até a análise. A corticosterona do soro foi quantificada utilizando um kit commercial para radioimunoensaio para ratos e camundongos (MP Biomedicals, Orangeburg, NY, USA). A sensitividade do teste foi de 0,25 ng/ml.

3.6. Análise estatística

Os dados foram analisados por estatística paramétrica e não-paramétrica de acordo a distribuição normal dos dados e homoscedasticidade das variâncias. Comparações da preferência por sacarose com o basal foram realizadas pelo teste pareado de Wilcoxon no primeiro experimento, enquanto que no segundo experimento o teste de Wilcoxon foi precedido da ANOVA de Friedman. A preferência de sacarose e o consumo total de líquido entre grupos e a ambulação central no campo aberto foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney no primeiro experimento e por ANOVA de Kruskal-Wallis seguida do teste de comparações múltiplas no segundo experimento. A ambulação total e periférica e comportamento de levantar no campo aberto foram

analisados por ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Newman-Keuls no segundo experimento e pelo teste t de Student no primeiro experimento. Os dados da corticosterona foram transformados em logaritmo para obtenção de homoscedasticidade das variâncias no teste de Levene e então foram analisados por ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Newman-Keuls. A correlação entre preferência por sacarose e a ambulação no campo aberto foi realizada pela correlação de Spearman.

4. RESULTADOS

4.1. CC no adulto induz anedonia

A curva de preferência por sacarose do primeiro experimento é mostrada na figura 3A. Não houve nenhuma diferença na preferência por sacarose antes da randomização dos grupos. No primeiro experimento, após 3 semanas de iluminação constante, o grupo CC exibiu redução da preferência de sacarose em relação ao basal e apresentou menor preferência que o grupo CE ($T=29$, $p<0,05$; $U=79$, $p<0,05$, figura 3B). A diferença do grupo CC em relação ao basal e ao grupo CE foi mantida na quarta semana em luz constante ($T=4$, $p<0,05$; $U=96,0$, $p<0,05$). O consumo total de líquido foi diferente entre os grupos, tanto na terceira semana, como na quarta, sendo maior no grupo CE em relação ao grupo CC ($U=45$, $p<0,05$, $U=26$, $p<0,05$, respectivamente). O tratamento com imipramina reverteu a anedonia induzida pelo claro constante (figura 4). No grupo CC, os animais tratados com imipramina apresentaram maior preferência por sacarose quando comparados com os controles também do grupo CC ($U=9$, $p<0,05$), embora não tenha sido verificada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos CC e CE que receberam apenas água.

A curva de preferência por sacarose do segundo experimento é mostrada na figura 5A. No segundo experimento, tanto na segunda como na terceira semana, houve diferença dos grupos em relação ao basal (ANOVA de Friedman, $\chi^2=11,27$, $p<0,05$ e $\chi^2=19,27$, $p<0,05$, respectivamente). Os animais neonatal-EE exibiram significante redução da preferência por sacarose na segunda semana de claro constante no adulto ($T=26$, $p<0,05$), enquanto que os animais do grupo neonatal-CE apresentaram redução da preferência por sacarose apenas na terceira semana ($T=21$, $p<0,05$, figura 5B). Os animais do grupo neonatal-CC não exibiram alterações da preferência por sacarose em comparação com o basal, além disso, a preferência por sacarose na terceira semana foi significativamente maior em comparação com ambos os grupos neonatal-CE e neonatal-EE ($H=19,03$, $p<0,05$). Ao final da terceira semana em claro constante, o consumo total de líquido foi significativamente menor nos animais do grupo neonatal-EE

em relação aos animais dos grupos neonatal-CE e neonatal-CC ($H=16,31$, $p<0,05$ e $H=15,57$, $p<0,05$, respectivamente).

4.2. CC no adulto reduz a atividade locomotora

No primeiro experimento, os animais do grupo CC exibiram reduzida atividade locomotora total ($t=-4,66$, $p<0,05$), tanto na periferia ($U=46$, $p<0,05$) como na região central ($U=77$, $p<0,05$) do campo aberto. Estes animais também apresentaram reduzido comportamento de levantar em relação aos animais do grupo CE ($t=-8,61$, $p<0,05$, tabela 1).

No segundo experimento, após 3 semanas em luz constante, os animais do grupo neonatal-CC exibiram maior locomoção total ($F[16,68]$, $p<0,05$) e periférica ($F[18,61]$, $p<0,05$), comparados aos animais neonatal-CE e neonatal-EE (tabela 1). A análise estatística também detectou uma tendência para menor locomoção total nos animais do grupo neonatal-EE em relação aos animais do grupo neonatal-CE ($F[16,68]$, $p=0,055$). A frequência de comportamento de levantar foi maior no grupo neonatal-CC em relação ao grupo neonatal-CE ($F[4,09]$, $p<0,05$), mas não em relação ao grupo neonatal-EE.

A preferência por sacarose se correlacionou positivamente e de forma significativa ($p<0,05$) com a atividade total no campo aberto, tanto no primeiro experimento ($r=0,51$ na terceira semana e $r=0,45$ na quarta semana em claro constante), como no segundo ($r=0,51$ na terceira semana em claro constante).

4.3. CC na vida adulta aumenta os níveis de corticosterona no grupo neonatal-EE

Os níveis de corticosterona foram significativamente maiores no grupo neonatal-EE comparados com os grupos neonatal-CE e neonatal-CC ($F[5,077]$, $p<0,05$, figura 6).

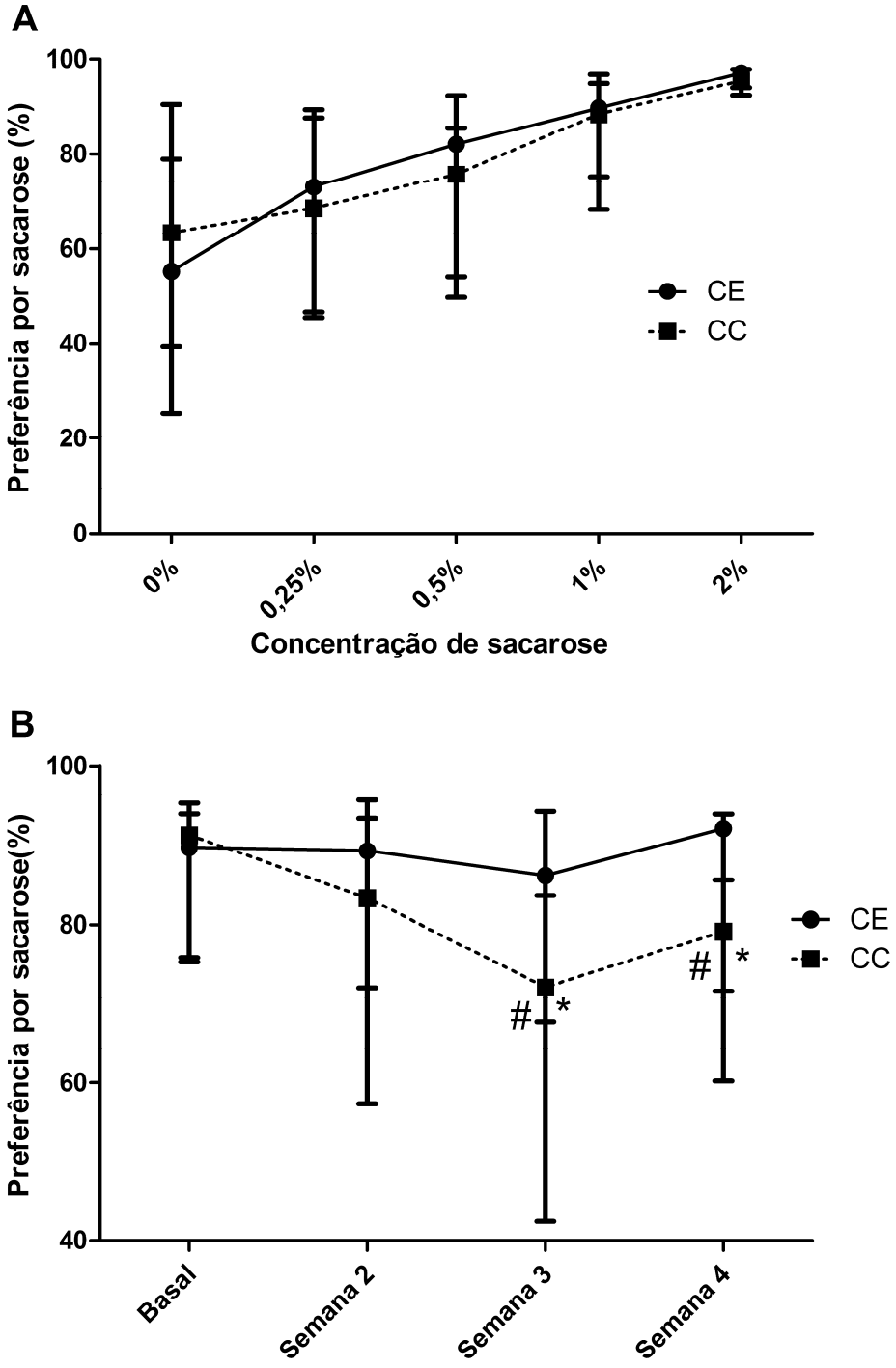

Figura 4 – Teste de preferência por sacarose no primeiro experimento (n=18 animais/grupo). (A) Teste de preferência por sacarose antes da randomização dos grupo e exposição ao claro constante no adulto. (B) Efeito da luz constante no adulto sob a preferência por sacarose. CE (ciclo claro/escuro 12:12), CC (claro constante). Dados expressos por mediana ± intervalo interquartil (IQ). #p < 0,05, diferença significativa entre o basal comparando-se com o mesmo grupo; *p < 0,05, diferença significativa entre grupos.

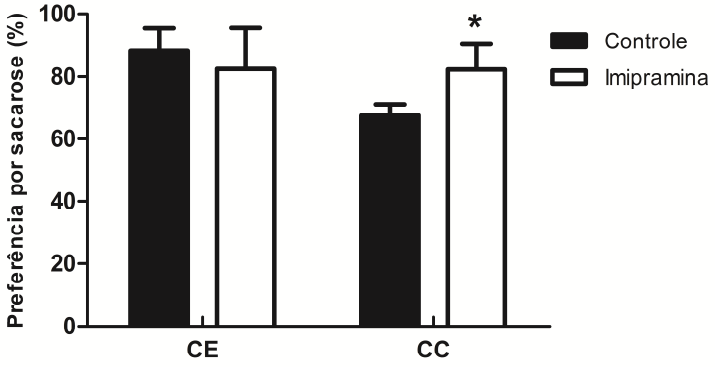

Figura 5 – Efeito do tratamento com imipramina (10-15 mg/kg/dia por 3 semanas) sob a anedonia induzia por claro constante (n= 9 animais/grupo). CE (ciclo claro/escuro 12:12), CC (claro constante). Dados expressos por mediana ± intervalo interquartil (IQ). *$p < 0.05$, comparado com os animais controles do grupo CC.

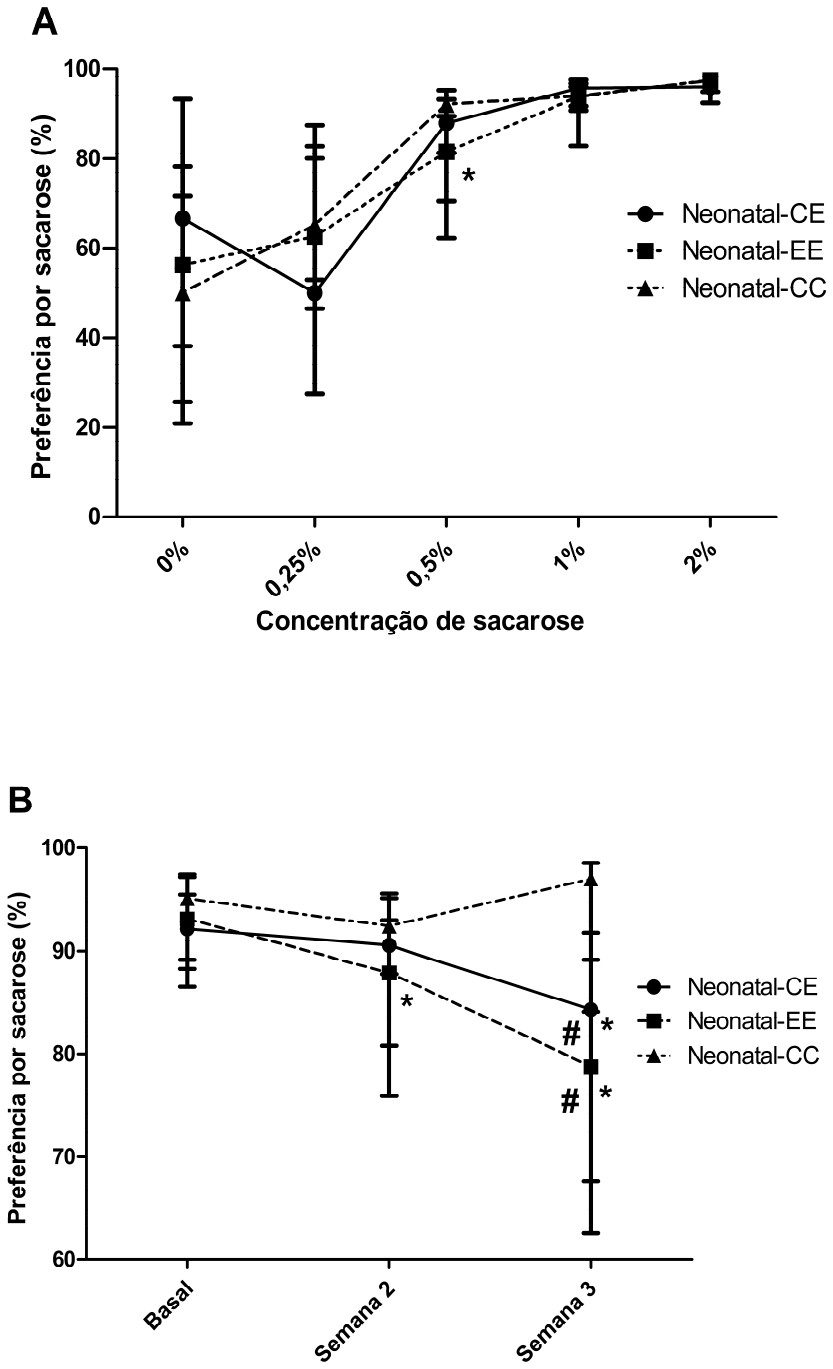

Figura 6 – Teste de preferência por sacarose no segundo experimento (n=20 animais/grupo). (A) Teste de preferência por sacarose antes da exposição ao claro constante no adulto. (B) Efeito da luz constante no adulto sob a preferência por sacarose. Neonatal-CE (ciclo claro/escuro normal), neonatal-EE (escuro constante do 10º ao 21º dia de idade), neonatal-CC (claro constante do 10º ao 21º dia de idade). Dados expressos por mediana ± intervalo interquartil (IQ). #p < 0,05, diferença significativa entre o basal comparando-se com o mesmo grupo; *p < 0,05, diferença significativa entre grupos.

Tabela 1 – Atividade locomotora no campo aberto em ambos os experimentos após 3 semanas de claro constante no adulto

	Primeiro Experimento		Segundo Experimento		
Neonatal	CE	CE	CE	EE	CC
Adulto	CE	CC	CC	CC	CC
Total	115,1 ± 15,6	81,4 ± 4.5*	113,0 ± 10,1	92.5 ± 6.0 ‡	150,7 ± 4,7 †£
Periférico	99,8 ± 4,9	72,9 ± 4,4*	99,5 ± 7,6	82,3 ± 4,7 ‡	134,3 ± 5,8 †£
Central	15 (9-21)	9 (8-10)*	14,5 (4-21)	7 (5-15)	19 (9-23)
Levantar	21,2 ± 1,0	9,4 ± 0,89*	7,8 ± 1,3	10,1 ± 1,1	13,9 ± 2,0 †

Dados representados por média ± erro padrão da média, com exceção da ambulação central, que é espressa por mediana ± intervalo interquartil. CE (ciclo claro/escuro 12:12), EE (escuro constante), CC (claro constante). *p < 0,05, comparado com o grupo controle no primeiro experimento; †p < 0,05, comparado com grupo neonatal-CE group; £p < 0,05, comparado com o grupo neonatal-EE; ‡ 0,05<p<0,06, comparado com o grupo neonatal-CE.

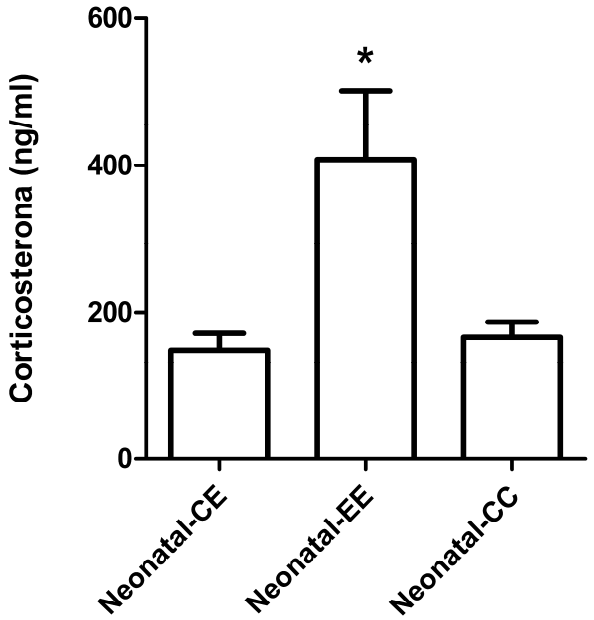

Figura 7 – Quantificação da corticosterona no soro após 3 semanas em claro constante (n = 9-10/grupo). Neonatal-CE (ciclo claro/escuro normal), neonatal-EE (escuro constante do 10º ao 21º dia de idade), neonatal-CC (claro constante do 10º ao 21º dia de idade). Dados expressos média ± erro padrão da média *p < 0.05, comparado com os grupos neonatal-CE e neonatal-CC.

5. DISCUSSÃO

Corroborando a hipótese do trabalho, os animais expostos ao claro constante na fase neonatal não apresentaram redução na preferência por solução de sacarose após a exposição ao claro constante na vida adulta, sugerindo a importância da manutenção da ritmicidade circadiana para a regulação do humor. Assim como descrito em camundongos por Fonken et al. (2009), foi observado que a exposição à luz constante por 3 semanas reduz a preferência por solução de sacarose em ratos controles, sugerindo que os animais passaram expressar um comportamento depressivo. Além disso, até o momento, este é o primeiro relato da reversão da anedonia induzida por este modelo através do tratamento com imipramina, o que também corrobora a indução de um comportamento depressivo. A redução na preferência por sacarose observada na terceira semana se manteve também na quarta semana de exposição ao claro constante. Entretanto, após mais 3 semanas (fase de tratamento com imipramina), a diferença entre o grupo controle e claro constante, ambos não tratados com imipramina, deixou de ser significafiva. Uma possível explicação é o efeito da redução do número de animais por grupo junto com a maior variabilidade do grupo controle.

Também foi observado que animais mantidos em escuro constante durante a amamentação são mais suscetíveis a apresentar comportamento depressivo neste modelo, sugerido pela redução antecipada da preferência por sacarose, aumento da corticosterona plasmática e atividade locomotora reduzida no campo aberto após exposição ao claro constante durante a vida adulta. Em contraste, os ratos expostos à iluminação constante até o desmame aparentemente foram protegidos da anedonia induzida pelo claro constante no adulto. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade de que estes animais apresentariam maior tendência ao comportamento maníaco, visto que, por exemplo, alta preferência por sacarose já foi proposta como um modelo relacionado à mania na linhagem Black-Swiss de camundongs e que esta elevada preferência é diminuída com o tratamento com estabilizadores de humor (Flaisher-Grinberg et al., 2009). Além disso, o CMS, um modelo em que se espera a indução do comportamento depressivo também acarreta em resultados “anômalos” em algumas vezes, como diminuição da imobilidade no teste da natação forçada e aumento da

preferência por sacarose (Willner, 2005; Schweizer et al., 2009). Esta possibilidade pode ser levada para o presente trabalho, visto que os animais do grupo neonatal-CC apresentaram elevada atividade locomotora após três semanas em claro constante quando comparados aos controles do primeiro experimento (animais sempre mantidos em ciclo claro/escuro 12:12). Embora este dado favoreça a hipótese da mania, a comparação entre os diferentes experimentos não é permitida, visto que a atividade locomotora nos grupos com exposição ao ciclo claro/escuro 12:12 neonatal e expostos ao claro constante na vida adulta são diferentes. Também a atividade locomotora dos animais neonatal-CE após o claro foi muito similar ao controle do primeiro experimento. Não se excluindo a possibilidade de algum fator externo ter ocasionado a redução da atividade locomotora no primeiro experimento, os dados do campo aberto podem estar enviesados, visto que não foi acessada a fase circadiana em que os animais se encontravam durante o teste. Considerando que os animais do grupo neonatal-CC tendem a manter a ritmicidade em claro constante, estes animais poderiam estar expressando a fase ativa do ciclo circadiano, assim como os animais dessincronizados poderiam estar em um surto de atividade de um ritmo ultradiano (Honma e Hiroshige, 1978). Em contraste, o teste de preferência por sacarose, da maneira como foi utilizado, ao abranger um ciclo completo, fornece resultados mais adequados. Apesar do consumo total de líquido ter diferido entre os grupos, a análise através da preferência por sacarose ao invés do consumo total é menos sensível a alterações de peso, atividade locomotora e consumo absoluto nos animais (Matthews et al., 1995).

A coleta de sangue para a corticosterona também apresenta o mesmo viés temporal que o campo aberto, visto que apenas um ponto foi coletado, após o sacrifício. Embora os animais neonatal-CE tenham diminuído a preferência por sacarose, seus níveis de corticosterona não aumentaram como no grupo neonatal-EE. Tanto aumento (Vitale et al., 2009) como não alteração (Salomons et al., 2010) dos níveis plasmáticos da corticosterona já foram relatados após o protocolo de CMS. Além disso, como já mencionado anteriormente, o tratamento agudo com dexametasona (Casarotto e Andreatini, 2007) ou crônico com corticosterona (Gourley et al., 2008) induz comportamento depressivo em modelos animais, o que reforça o papel dos glicocorticóides na etiologia da depressão. Em constraste, Fonken et al. (2009)

observaram níveis plasmáticos de corticosterona diminuídos em camundongos após duas semanas em claro constante comparado com os controles, embora aumento da corticosterona tenha sido relatado após uma semana de iluminação constante (Van der Meer et al., 2004). Neste experimento, os grupos neonatal-CE e neonatal-CC podem ter reduzido a ativação do eixo HPA ao estresse durante a exposição ao claro constante, enquanto o grupo neonatal-EE não foi capaz. Coletas de sangue ou fezes em diferentes pontos ao longo das 3 semanas de claro constante poderiam elucidar esta questão, podendo ser observado um aumento inicial da corticosterona seguido de redução, ou então não ser observado este aumento.

O aumento da corticosterona e a maior predisposição ao comportamento depressivo podem estar relacionados aos conhecidos efeitos do estresse neonatal, como por exemplo, a separação materna, embora a manipulação neonatal resulte aparentemente em um sistema HPA irresponsivo ao estresse de imobilização (Liu et al., 2000). Entretanto, a ocorrência de alterações nos ritmos circadianos nos animais neonatal-EE não está descartada, visto que o escuro constante durante a lactação reduz o número de neurônios e células da glia nos núcleos supraquiasmáticos, enquanto que a luz constante não provoca tal alteração em ratos machos (Cambras et al., 2005). Mais provavelmente, entretanto, ambos os fatores podem estar interconectados e fazer parte do mesmo processo.

Além disso, no presente trabalho, a exposição neonatal à luz constante preveniu a anedonia induzida por claro constante no adulto. Consideranto que este protocolo visa a prevenir a arritmicidade em condições de iluminação constante, especula-se que os animais neonatal-CC, devido a um sistema de temporização circadiano mais robusto, foram protegidos da anedonia induzida pelo claro constante, confirmando a hipótese do trabalho. Embora a ritmicidade circadiana da atividade locomotora não tenha sido mensurada, a linhagem de ratos (Wistar) utilizada foi a mesma utilizada por Cambras et al. (1998) e Canal-Corretger et al. (2001) nos estudos que observaram a manutenção da ritmicidade locomotora durante a exposição ao claro constante em animais expostos ao claro constante durante a lactação. Adicionalmente, a manipulação neonatal foi realizada dentro da janela mais crítica de sensibilidade à luz (Canal-Corretger, et al. 2001), reforçando que os animais neonatal-CC deste trabalho mantiveram a ritmicidade

circadiana da atividade locomotora quando expostos à iluminação constante. Em conclusão, os dados do presente estudo reforçam as evidências e teorias sobre o papel causal tanto do comprometimento dos ritmos circadianos, como do estresse neonatal, no desenvolvimento de transtornos de humor. Adicionalmente às terapias cronobiológicas existentes para a depressão, como a privação de uma noite de sono e a luz intensa pela manhã (Wirz-Justice, 2009), acrescenta-se que a prevenção de distúrbios dos ritmos circadianos pode reduzir o risco de desenvolvimento de um quadro de depressão maior.

6. REFERÊNCIAS

Altimus CM, Güler AD, Alam NM, Arman AC, Prusky GT, Sampath AP, Hattar S. Rod photoreceptors drive circadian photoentrainment across a wide range of light intensities. **Nat Neurosci**, v. 13, p. 1107-1112, 2010.

American Psychiatric Association. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**, 4ª ed., texto revisado. American Psychiatric Press, Washington, DC, 2000.

Antle MC, Silver R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. **Trends Neurosci**, v. 28, p. 145-151, 2005.

Archer SN, Robilliard DL, Skene DJ, Smits M, Williams A, Arendt J, von Schantz M. A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. **Sleep**, v. 26, p. 413-5, 2003.

Aromaa E, Tolvanen A, Tuulari J, Wahlbeck K. Attitudes towards people with mental disorders: the psychometric characteristics of a Finnish questionnaire. **Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol**, v. 56, p. 265-273, 2010.

Artioli P, Lorenzi C, Pirovano A, Serretti A, Benedetti F, Catalano M, Smeraldi E. How do genes exert their role? Period 3 gene variants and possible influences on mood disorder phenotypes. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 17, p. 587-594, 2007.

Ashkenazy T, Einat H, Kronfeld-Schor N. We are in the dark here: induction of depression- and anxiety-like behaviours in the diurnal fat sand rat, by short daylight or melatonin injections. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 12, p. 83-93, 2009a.

Ashkenazy T, Einat H, Kronfeld-Schor N. Effects of bright light treatment on depression- and anxiety-like behaviors of diurnal rodents maintained on a short daylight schedule. **Behav Brain Res,** v. 201, p. 343-346, 2009b.

Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, p. 137-151, 2006.

Bolaños CA, Barrot M, Berton O, Wallace-Black D, Nestler EJ. Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. **Biol Psychiatry**, v. 54, p. 1317-1329, 2003.

Booker JM, Hellekson CJ, Putilov AA, Danilenko KV. Seasonal depression and sleep disturbances in Alaska and Siberia: a pilot study. **Arctic Med Res**, suppl, p. 281-284, 1991.

Caci H, Bouchez J, Baylé FJ. Inattentive symptoms of ADHD are related to evening orientation. **J Atten Disord**, v. 13, p. 36-41, 2009.

Cambras T, Vilaplana J, Torres A, Canal MM, Casamitjana N, Campuzano A, Díez-Noguera A. Constant bright light (LL) during lactation in rats prevents arrhythmicity due to LL. **Physiol Behav**, v. 63, p. 875-882, 1998.

Cambras T, López L, Arias JL, Díez-Noguera A. Quantitative changes in neuronal and glial cells in the suprachiasmatic nucleus as a function of the lighting conditions during weaning. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 157, p. 27-33, 2005.

Canal-Corretger MM, Vilaplana J, Cambras T, Díez-Noguera A. Functioning of the rat circadian system is modified by light applied in critical postnatal days. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, p. 1023-1030, 2001.

Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. **Trends Neurosci**, v. 28, p. 436-445, 2005.

Casarotto PC, Andreatini R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 17, p. 735-742, 2007.

Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry**, v. 50, 9.260-265, 2001.

Chisholm D, Lund C, Saxena S. Cost of scaling up mental healthcare in low- and middle-income countries. **Br J Psychiatry**, v. 191, p. 528-535, 2007.

Cuesta M, Clesse D, Pévet P, Challet E. New light on the serotonergic paradox in the rat circadian system. **J Neurochem**, v. 110, p. 231-243, 2009.

de Bodinat C, Guardiola-Lemaitre B, Mocaër E, Renard P, Muñoz C, Millan MJ. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, p. 628-642, 2010.

de la Iglesia HO, Cambras T, Schwartz WJ, Díez-Noguera A. Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. **Curr Biol**, v. 14, p. 796-800, 2004.

Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 121, p. 417-427, 1995.

Eastman C, Rechtschaffen A. Circadian temperature and wake rhythms of rats exposed to prolonged continuous illumination. **Physiol Behav**, v. 31, p. 417-427, 1983.

Ehlers CL, Frank E, Kupfer DJ. Social zeitgebers and biological rhythms. A unified approach to understanding the etiology of depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 45, p. 948-952, 1988.

Einat H, Kronfeld-Schor N, Eilam D. Sand rats see the light: short photoperiod induces a depression-like response in a diurnal rodent. **Behav Brain Res**, v. 173, p. 153-157, 2006.

Flaisher-Grinberg S, Overgaard S, Einat H. Attenuation of high sweet solution preference by mood stabilizers: a possible mouse model for the increased reward-seeking domain of mania. **J Neurosci Methods**, v. 177, p. 44-50, 2009.

Fonken LK, Finy MS, Walton JC, Weil ZM, Workman JL, Ross J, Nelson RJ. Influence of light at night on murine anxiety- and depressive-like responses. **Behav Brain Res**, v. 205, p. 349-354, 2009.

Foster RG, Wulff K. The rhythm of rest and excess. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, p. 407-414, 2005.

Glassman AH, Roose SP, Bigger JT Jr. The safety of tricyclic antidepressants in cardiac patients. Risk-benefit reconsidered. **JAMA**, v. 269, p. 1993.

Golden RN, Gaynes BN, Ekstrom RD, Hamer RM, Jacobsen FM, Suppes T, Wisner KL, Nemeroff CB. The efficacy of light therapy in the treatment of mood disorders: a review and meta-analysis of the evidence. **Am J Psychiatry**, v. 162, p. 656-662, 2005.

Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of circadian entrainment. **Physiol Rev**, v. 90, p. 1063-1102, 2010.

Gonzalez MMC, Aston-Jones G. Light deprivation damages monoamine neuron and produces a depressive behavioral phenotype in rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, p. 4898-4903, 2008.

Gordijn MC, Beersma DG, Bouhuys AL, Reinink E, Van den Hoofdakker RH. A longitudinal study of diurnal mood variation in depression; characteristics and significance. **J Affect Disord**, v. 31, p. 261-273, 1994.

Gorka Z, Moryl E, Papp M. Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, p. 229-234, 1996.

Gourley SL, Kiraly DD, Howell JL, Olausson P, Taylor JR. Acute hippocampal brain-derived neurotrophic factor restores motivational and forced swim performance after corticosterone. **Biol Psychiatry**, v. 64, p. 884-890, 2008.

Grassi Zucconi G, Cipriani S, Balgkouranidou I, Scattoni R. 'One night' sleep deprivation stimulates hippocampal neurogenesis. **Brain Res Bull**, v. 69, p. 375-381, 2006.

Honma, K.; Hiroshige, T. Endogenous ultradian rhythms in rats exposed to prolonged continuous light. **Am J Physiol**, v. 135, 250-256, 1978.

Honma KI, Hiroshige T. Endogenous ultradian rhythms in rats exposed to prolonged continuous light. **Am J Physiol**, v. 235, p. 250-256, 1978.

Jayatissa MN, Bisgaard CF, West MJ, Wiborg O. The number of granule cells in rat hippocampus is reduced after chronic mild stress and re-established after chronic escitalopram treatment. **Neuropharmacology**, v. 54, p. 530-541, 2008.

Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 136, p. 29-37, 2005.

Kasper S, Hajak G, Wulff K, Hoogendijk WJ, Montejo AL, Smeraldi E, Rybakowski JK, Quera-Salva MA, Wirz-Justice AM, Picarel-Blanchot F, Baylé FJ. Efficacy of the novel antidepressant agomelatine on the circadian rest-activity cycle and depressive and anxiety symptoms in patients with major depressive disorder: a randomized, double-blind comparison with sertraline. **J Clin Psychiatry**, v. 71, p. 109-120, 2010.

Kim SJ, Lee YJ, Kim H, Cho IH, Lee JY, Cho SJ. Age as a moderator of the association between depressive symptoms and morningness-eveningness. **J Psychosom Res**, v. 68, p. 159-164, 2009.

Knisely J. Where observation is concerned, chance favours only the prepared mind. **Lancet Oncol**, v. 9, p. 502, 2008.

Kuhn, R. The treatment of depressive states with G22355 (imipramine hydrochloride). **Am J Psychiatry**, v. 115, p. 459-464, 1958.

Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. **J Neurochem**, v. 86, p. 1367-1375, 2002.

Lewy AJ, Lefler BJ, Emens JS, Bauer VK. The circadian basis of winter depression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 7414-7419, 2006.

Li W, Chen S, DeVries SH. A fast rod photoreceptor signaling pathway in the mammalian retina. **Nat Neurosci**, v. 13, p. 414-416, 2010.

Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinepherine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. **J Neuroendocrinol**, v. 12, p. 5-12, 2000.

Lucki I, O'Leary OF. Distinguishing roles for norepinephrine and serotonin in the behavioral effects of antidepressant drugs. **J Clin Psychiatry**, suppl. 65, p. 11-24, 2004.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurosci**, v. 20, p. 9104-9110, 2000.

Massa SM, Yang T, Xie Y, Shi J, Bilgen M, Joyce JN, Nehama D, Rajadas J, Longo FM. Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents. **J Clin Invest**, v. 120, p. 1774-1785, 2010.

Matthews K, Forbes N, Reid IC. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. Physiol Behav, v. 57, p. 241-248, 1995.

McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. **Prog Brain Res**, v. 122, p. 25-34, 2000.

Mersch PP, Middendorp HM, Bouhuys AL, Beersma DG, van den Hoofdakker RH. Seasonal affective disorder and latitude: a review of the literature. **J Affect Disord**, v. 53, p. 35-48, 1999.

Mirescu C, Peters JD, Noiman L, Gould E. Sleep deprivation inhibits adult neurogenesis in the hippocampus by elevating glucocorticoids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 19170-19175, 2006.

Monteleone P, Maj M. The circadian basis of mood disorders: recent developments and treatment implications. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 18, p. 701-11, 2008.

Monteleone P, Martiadis V, Maj M. Circadian rhythms and treatment implications in depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. No prelo.

Nagano M, Adachi A, Nakahama K, Nakamura T, Tamada M, Meyer-Bernstein E, Sehgal A, Shigeyoshi Y. An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. **J Neurosci**, v. 23, p. 6141-6151, 2003.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, p. 13-25, 2002.

Nestler EJ, Carlezon WA Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiatry**, v. 59, p. 1151-1159, 2006.

Novati A, Roman V, Cetin T, Hagewoud R, den Boer JA, Luiten PG, Meerlo P. Chronically restricted sleep leads to depression-like changes in neurotransmitter receptor sensitivity and neuroendocrine stress reactivity in rats. **Sleep**, v. 31, p. 1579-1585, 2008.

Ohta H, Yamazaki S, McMahon DG. Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. **Nat Neurosci**, v. 8, p. 267-269, 2005.

Panda S, Hogenesch JB. It's all in the timing: many clocks, many outputs. **J Biol Rhythms**, v. 19, p. 374-387, 2004.

Paykel ES, Hart D, Priest RG. Changes in public attitudes to depression during the Defeat Depression Campaign. **Br J Psychiatry**, v. 173, p. 519-522, 1998.

Pereira DS, Tufik S, Louzada FM, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Lemos NA, Korczak AL, D'Almeida V, Pedrazzoli M. Association of the length polymorphism in the human Per3 gene with the delayed sleep-phase syndrome: does latitude have an influence upon it? **Sleep**, v. 28, p. 29-32, 2005.

Pickard GE, Rea MA. Serotonergic innervation of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and photic regulation of circadian rhythms. **Biol Cell**, v. 89, p. 513-523, 1997.

Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 88-109, 2008.

Rief W, Nestoriuc Y, von Lilienfeld-Toal A, Dogan I, Schreiber F, Hofmann SG, Barsky AJ, Avorn J. Drug Saf. Differences in adverse effect reporting in placebo groups in SSRI and tricyclic antidepressant trials: a systematic review and meta-analysis. **Drug Saf**, v. 32, p. 1041-1056, 2009.

Riemann D, Voderholzer U, Berger M. Sleep and sleep-wake manipulations in bipolar depression. **Neuropsychobiology**, 45 suppl, p. 7-12, 2002.

Ruhé HG, Mason NS, Schene AH. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. **Mol Psychiatry**, v. 12, p. 331-359, 2007.

Salomons AR, Kortleve T, Reinders NR, Kirchhoff S, Arndt SS, Ohl F. Susceptibility of a potential animal model for pathological anxiety to chronic mild stress. **Behav Brain Res**, v. 209, p 241-248, 2010.

Sahay A, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. **Nat Neurosci**, v. 10, p. 1110-1115, 2007.

Schmidt HD, Duman RS. Peripheral BDNF Produces Antidepressant-Like Effects in Cellular and Behavioral Models. **Neuropsychopharmacology**, 2010. No prelo.

Schweizer MC, Henniger MS, Sillaber I. Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity. **PLoS One**, v. 4, p. e4326, 2009.

Sheline YI. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. **Biol Psychiatry**, v. 54, p. 338-352, 2003.

Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **J Neurosci**, v. 22, p. 3251-3261, 2002.

Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Pharmacol Biochem Behav**, v. 56, p. 131-137, 1997.

Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. **J Neurosci**, v. 15, 9. 1768-1777, 1995.

Stetler C, Dickerson SS, Miller GE. Uncoupling of social zeitgebers and diurnal cortisol secretion in clinical depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, p.1250-1259, 2004.

Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L, Norquist G, Howland RH, Lebowitz B, McGrath PJ, Shores-Wilson K, Biggs MM, Balasubramani GK, Fava M; STAR*D Study Team. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. **Am J Psychiatry**, v. 163, n. 28-40, 2006.

Van der Meer E, Van Loo PL, Baumans V. Short-term effects of a disturbed light-dark cycle and environmental enrichment on aggression and stress-related parameters in male mice. **Lab Anim**, v. 38, p. 376-383, 2004.

van Londen L, Goekoop JG, Kerkhof GA, Zwinderman KH, Wiegant VM, De Wied D. Weak 24-h periodicity of body temperature and increased plasma vasopressin in melancholic depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 11, p. 7-14, 2001.

Vitale G, Ruggieri V, Filaferro M, Frigeri C, Alboni S, Tascedda F, Brunello N, Guerrini R, Cifani C, Massi M. Chronic treatment with the selective NOP receptor antagonist [Nphe 1, Arg 14, Lys 15]N/OFQ-NH 2 (UFP-101) reverses the behavioural and biochemical effects of unpredictable chronic mild stress in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 207, p. 173-189, 2009.

Wehr TA, Wirz-Justice A, Goodwin FK, Duncan W, Gillin JC. Phase advance of the circadian sleep-wake cycle as an antidepressant. **Science**, v. 206, p. 70-713, 1979.

Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 93, p. 358-364, 1987.

Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, p. 90-110, 2005.
Wiz-Justice A. Chronobiology and mood disorders. Dialogues Clin Neurosci, 2003, v. 5, p. 315-325, 2003.

Wirz-Justice A. From the basic neuroscience of circadian clock function to light therapy for depression: on the emergence of chronotherapeutics. **J Affect Disord**, v. 116, p. 159-160, 2009.

Wood J, Birmaher B, Axelson D, Ehmann M, Kalas C, Monk K, Turkin S, Kupfer DJ, Brent D, Monk TH, Nimgainkar VL. Replicable differences in preferred circadian phase between bipolar disorder patients and control individuals. **Psychiatry Res**, v. 166, p. 201-209, 2009.

World Health Organization. **The world health report - Mental Health: New Understanding, New Hope**, Geneva, 2001.

World Health Organization. **Revised global burden of disease (GBD) 2002 estimates**, Geneva, 2005.

Zeller EA, Barsky J. In vivo inhibition of liver and brain monoamine oxidase by 1-Isonicotinyl-2-isopropyl hydrazine. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 81, p. 459-461, 1952.

ANEXO 1

Valores numéricos da preferência por sacarose no primeiro e no segundo experimento

	Grupo	Preferência por Sacarose (%)	Intervalo Interquartil
Basal	CE	85,1	71-92
	CC	83,3	62-89
	Neonatal-CE	85,6	76-94
	Neonatal-DD	86,3	78-90
	Neonatal-CC	92,5	85-95
Segunda Semana	CE	89,3	74-95
	CC	83,3	58-93
	Neonatal-CE	90,5	82-95
	Neonatal-DD	87,9	76-93
	Neonatal-CC	92,4	88-95
Terceira Semana	CE	92,1	78-94
	CC	72,0	65-85
	Neonatal-CE	84,3	68-91
	Neonatal-DD	78,8	64-84
	Neonatal-CC	97,0	90-98
Quarta Semana	CE	86,2	73-94
	CC	79,1	46-82

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo