



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Maria Claudia de Castro Souza

Orientador(a): Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Co-orientador (a): Caroline Morini Calil

Ano de Conclusão do Curso: 2005



TCC 198

Maria Claudia de Castro Souza

**Análise Farmacológica do Comportamento de Imobilidade em Protocolos
Experimentais de Natação**

Monografia apresentada ao Curso de
Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Piracicaba –
UNICAMP, para obtenção do diploma
de Cirurgião – Dentista.

Orientadora Prof^ª Dr^ª Fernanda Klein Marcondes

Piracicaba
-2005-

Dedico esse trabalho ao meu pai e à minha mãe
que sempre estiveram do meu lado

Agradecimentos

À Professora Fernanda pela habilidade com que orientou esse trabalho.

Fazemos especial agradecimento a Caroline Morini Calil, que atuou como co-orientadora deste trabalho.

À FAPESP pelo auxílio financeiro, na forma de auxílio pesquisa concedido à professora orientadora (Processo 99/00793-1), e bolsa de Iniciação Científica a mim concedida (Processo 03/03283-1).

Sumário

	Página
Resumo	1
Introdução.....	1
Material e Métodos	4
Resultados e discussão.....	8
Conclusão.....	13
Referências Bibliográficas	13

1. Resumo

A natação é um modelo experimental utilizado em estudos sobre a fisiologia do estresse e sobre os mecanismos envolvidos na depressão, no qual a resposta comportamental de imobilidade de animais de laboratório é interpretada, respectivamente como uma resposta adaptativa ou como desespero comportamental. Tendo em vista que se tratam de modelos muito usados na pesquisa científica, e que o significado da imobilidade não é consenso na literatura, em um estudo inicial, testamos a hipótese de que a interpretação do tempo de imobilidade (desamparo aprendido ou adaptação) pode variar conforme o modelo utilizado (teste da natação forçada ou estresse por natação). Nossos dados mostram que o estresse por natação e o teste da natação forçada induziram respostas fisiológicas e comportamentais distintas em ratos. Parecem portanto representar situações diferentes para o animal. O objetivo deste estudo é validar farmacologicamente esta hipótese, comparando o efeito do antidepressivo desipramina e do ansiolítico diazepam nos dois modelos experimentais.

2. Introdução

Atualmente, no Brasil, percebe-se que o Cirurgião Dentista, demonstra uma certa insegurança na prescrição de medicamento de uso odontológico. Qual seria o grande motivo para explicar tal comportamento? Se for feita uma análise bem detalhada da formação acadêmica deste profissional da saúde, pode se observar que a grande maioria dos currículos do país menosprezam as disciplinas de Fisiologia e Farmacologia básicas em relação as disciplinas da área clínica. Esse fato colabora para que o acadêmico, ao concluir o curso,

ainda não apresenta a segurança para receitar os principais medicamentos de uso odontológico, incluindo o ansiolítico como medicação pré anestésica e em tratamentos com crianças não colaboradoras e pacientes muito nervosos ou ansiosos.

O tratamento odontológico geralmente induz um quadro de ansiedade e apreensão nos pacientes. Sendo assim, mesmo os indivíduos que declaram não ter medo do tratamento odontológico podem apresentar reações desagradáveis durante a intervenção, dificultando a realização dos procedimentos odontológicos.

A insegurança apresentada pela maioria dos cirurgiões dentistas em relação ao emprego de ansiolíticos pode estar relacionada á falta de conhecimento de alguns aspectos relacionados ao mecanismo de ação e farmacocinética do medicamentos.

Não só em estudos clínicos mas em trabalhos desenvolvidos com animais de laboratório, existem modelos muito bem definidos e consagrados na literatura para o estudo do estresse e da depressão.

Desde que foi descrito por Porsolt et al. (1977), o teste da natação forçada tem sido usada como um modelo experimental para o estudo da depressão. O protocolo clássico é realizado em dois dias. O animal é submetido à natação, por 15 minutos , em um tanque de 20cm de diâmetro, com uma coluna de água de 15cm a 25°C. Inicialmente, os ratos apresentam um comportamento de luta, caracterizado por uma vigorosa atividade. Esta, após alguns minutos diminui, até os animais que passam a fazer somente os movimentos necessários para manter a cabeça fora da água, o que foi denominado de imobilidade (Porsolt et al., 1977; 1978 a; 1978 b). No segundo dia, o animal é submetido novamente à

natação, nas mesmas condições, durante 5 minutos e o tempo de imobilidade é medido, sendo este comportamento interpretado como desespero comportamental (Porsolt et al., 1977; 1978 a; 1978 b; Barros, Ferigolo, 1998). Neste modelo experimental clássico, a maioria dos antidepressivos, como por exemplo, a desipramina, reduz a imobilidade, estimulando o comportamento de luta (Lucki et al., 1997). Como este efeito está significativamente correlacionado com o potencial clínico daqueles fármacos, e o modelo é suficientemente específico para discriminar antidepressivos de neurolépticos e ansiolíticos, o teste da natação forçada tem sido amplamente utilizado para o estudo da depressão (Porsolt et al., 1977; 1978 a; 1978 b; Borsini, Meli, 1988; Bejamini et al., 1998; Contreras et al., 1998; Barros, Ferigolo, 1998; Stogner, Holmes, 2000).

Devido ao exercício físico e ao componente emocional, relacionado à impossibilidade de fuga e à novidade que este estímulo representa para o animal, a natação também é usada em estudos sobre a fisiologia do estresse, como um potente agente estressor (Marcondes et al., 1996; Shors et al., 1999; Tanno et al., 2002 a; Tanno et al., 2002 b). No estresse por natação, ao ser colocado na água pela primeira vez, o rato rapidamente passa a nadar em torno das bordas do tanque, aparentemente procurando escapar (Bianchi et al., 2001). Depois de alguns minutos seus movimentos passam a ser menos vigorosos e o animal passa a boiar, alternando a natação com momentos de imobilidade (Bianchi et al., 2001). Segundo Bruner, Vargas (1994), a movimentação do animal na água parece estar negativamente correlacionada com suas chances de sobrevivência. Assim sendo, a diminuição da atividade,

caracterizada pela imobilidade, representaria uma resposta adaptativa, neste modelo de estresse por natação.

Tendo em vista que o significado da imobilidade parece variar entre os modelos acima, e que divergência entre pesquisadores que utilizavam estes modelos de natação já foram evidenciadas na literatura científica (Borsini et al., 1986; Nishimura et al., 1988 a;b;), o objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que, sendo situações diferentes, a interpretação do tempo de imobilidade pode variar conforme o modelo utilizado. Para isso, os modelos de natação forçada e estresse por natação foram comparados, por meio de avaliações comportamentais, com e sem o uso de antidepressivo e ansiolítico.

Assim, este trabalho teve como objetivo acadêmico, além de testar os modelos de natação envolvendo fármacos, aprofundar os conhecimentos do aluno em Fisiologia, disciplina básica que é tão importante quanto qualquer outra disciplina clínica no curso de Odontologia.

3. Material e Métodos

3.1. Delineamento experimental

Os animais utilizados foram ratos Wistar, com 3 meses de idade, pesando entre 300 a 350 gramas. Eles foram mantidos no Biotério da FOP sob condições padrões de ciclo claro/escuro de 12/12h e climatização de 22 +/- 2°C, sendo colocados 4 animais por gaiola recebendo água e ração à vontade. Os experimentos foram realizados entre 7:00 e 12:30h. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação

Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEA - IB / UNICAMP).

Os animais foram submetidos, individualmente, à natação em um tanque de acrílico medindo 50cm x 50cm x 50cm (estresse por natação – TANNO *et al.*,) ou 20cm x 20cm x 50cm (natação forçada – BEIJAMINI *et al.*, 1998), entre 7:30 e 11:30h. O procedimento proposto seguiu o protocolo definido para o teste da natação forçada. Os experimentos foram filmados para análise comportamental. Antes de serem submetidos aos procedimentos acima descritos, os animais receberam a administração intraperitoneal do agente antidepressivo desipramina, ou ansiolítico diazepam ou de veículo. Foram avaliados os seguintes grupos experimentais:

Tabela 1. Grupos experimentais para avaliação comparativa do efeito da desipramina e do diazepam no tempo de imobilidade de ratos submetidos a duas sessões de natação forçada ou de estresse por natação.

Grupo	N
Natação forçada – veículo	15
Natação forçada – desipramina	15
Natação forçada – diazepam	13
Estresse por natação - veículo	15
Estresse por natação - desipramina	13
Estresse por natação – diazepam	13

3.2. Tratamentos farmacológicos

O efeito de drogas que alteram o nível de ansiedade e o tempo de imobilidade de ratos submetidos à natação foi utilizado como um parâmetro para comparação entre os modelos da natação forçada e o modelo de estresse

por natação. Com este objetivo, os animais foram tratados com injeção i.p. de solução salina (veículo), desipramina (15 mg/Kg – FERIGOLO et al., 1998) ou diazepam (1 mg/Kg – MOURA & DE MORAES, 1994; DRAGO et al., 1999). A desipramina foi administrada em três etapas : a primeira, imediatamente após a primeira sessão de natação. A segunda dose, às 7: 00 h da manhã do dia da segunda sessão e finalmente a terceira 1h antes da segunda sessão de natação (MARTI & ARMARIO, 1993). O diazepam foi administrado meia hora antes da segunda sessão de natação (MARTI & ARMARIO, 1993; FERIGOLO et al., 1998).

Com o objetivo de realizarmos este estudo com o menor número possível de animais, por indicação da Comissão de Ética na Experimentação Animal, e obedecendo às normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), o efeito da aplicação de veículo foi avaliado em dois subgrupos de animais. Para cada modelo de natação, um subgrupo recebeu a solução salina em três administrações conforme será realizado nos animais do grupo tratado com desipramina . O segundo subgrupo recebeu somente uma injeção i.p. de veículo de acordo com a administração de diazepam (MARTI & ARMARIO, 1993). Foi avaliado se havia diferença entre estes grupos. Como não houve diferença significativa estes dados foram agrupados e foi utilizado este grupo como veículo.

3.3. Sessões de natação e avaliação comportamental

Houve uma sessão de pré-teste, na qual os animais foram submetidos a 15 min de natação. Imediatamente depois, foram retirados da água, secos com uma toalha e mantidos próximo a um aquecedor de ambiente. Após estarem

completamente secos (cerca de 30 min) foram recolocados em suas gaiolamorado e transportados ao biotério de experimentação.

No dia seguinte, 24 h após a sessão de pré-teste, os animais foram novamente submetidos à natação, no mesmo protocolo, durante 5 min.

O comportamento de cada animal foi filmado nas duas sessões de natação. Com um cronômetro foi registrado o tempo, em segundos, de nado ativo nas proximidades das bordas do tanque. Este comportamento, denominado de "tentativa de fuga" (IWAMOTO & MARCONDES, 1998; BIANCHI et al., 1999) caracteriza-se por grande movimentação das quatro patas, sendo que com as patas anteriores o animal aparenta querer "subir" pela parede do aquário para sair da água. Também foi registrado o tempo de imobilidade. Neste caso, o animal bóia, fazendo apenas movimentos necessários para manter a cabeça fora da água.

Segundo LYNCH & KATCHER (1974) durante um mergulho a demanda de oxigênio aumenta, crescendo também a possibilidade de hipóxia a conseqüentemente, o risco de afogamento. Ratos que realizam um grande número de mergulhos tendem a morrer mais facilmente do que ratos que nadam ritmicamente ou somente flutuam (BINIK et al ; 1983). Animais que repetidamente afundarem na água, aparentando fadiga, foram retirados do tanque, a fim de evitar a morte dos mesmos. Os dados referentes a estes animais foram descartados.

3.4. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados empregando-se teste "t" de Student (subgrupos veículo) ou análise de variância seguida do teste de Tukey. Valores de p menores do que 0,05 serão indicativos de significância estatística.

4. Resultados e Discussão

No presente trabalho avaliamos o comportamento de ratos tratados com desipramina ou veículo e diazepam ou veículo, submetidos ao teste da natação forçada ou ao modelo de estresse por natação. O protocolo utilizado foi o descrito para o teste da natação forçada, cujo modelo tem sido utilizado recentemente para testar novos compostos de ação antidepressiva com o mínimo de efeitos colaterais indesejáveis (Yamada & Sugimoto, 2001; Aranda *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2002). Foi realizada uma sessão de pré teste com 15 minutos de natação e, 24 horas depois uma sessão de teste foi aplicada com duração de 5 minutos.. Para avaliação do efeito da desipramina foram aplicadas três doses deste fármaco sendo a primeira 24 horas, a segunda 5 horas e a terceira 1 hora antes da segunda sessão de natação, já para avaliação do efeito do diazepam foi aplicada uma única dose 30 minutos antes da segunda sessão de natação.

Os dados apresentados na figura 1 referem-se a comparação do efeito da desipramina, e do diazepam em relação ao veículo em ratos submetidos a segunda sessão de natação, tanto no teste da natação forçada quanto no estresse por natação. No teste da natação forçada (Figura 1 A) o tratamento com desipramina diminuiu o tempo de imobilidade dos animais em relação aos

animais tratados com veículo ($p < 0.05$). Por outro lado o diazepam não alterou o comportamento dos ratos submetidos ao teste da natação forçada.

De acordo com a proposta de Thierry et al. (1984) o animal submetido a natação pode apresentar duas estratégias opostas, uma ativa e outra passiva. A estratégia mais adaptativa mudaria de uma situação para outra dependendo de vários fatores, incluindo características comportamentais, capacidade objetivas e subjetivas e as características do ambiente. A integração de todos esses fatores determina o comportamento do animal em uma situação particular. Foi proposto que o comportamento dos animais no teste da natação forçada depende da tendência individual do animal em adotar estratégias passivas ou ativas. Os antidepressivos exercem um efeito na diminuição da imobilidade através da potencialização de estratégias ativas (Armário et al., 1988). Nossos dados mostram que a desipramina parece não ter intensificado o comportamento de luta, uma estratégia ativa contra a situação inescapável na qual se encontra o animal. Com relação ao diazepam nossos dados confirmam os resultados de outros autores (Porsolt et al., 1977, 1978 a; Kawashima et al., 1986; Calil et al., 2002) e indicam que a imobilidade não estava relacionada à ansiedade ou medo, no teste da natação forçada.

Portanto, o comportamento de imobilidade no teste da natação forçada reflete um estado depressivo (Porsolt et al., 1977) ou uma tendência em adotar estratégias passivas em situações inescapáveis e aversivas, efeitos estes que são revertidos pelos antidepressivos.

A figura 1 B mostra a comparação entre o tempo de imobilidade de ratos tratados com desipramina, diazepam e veículo no modelo estresse por natação. No estresse por natação, o tratamento com desipramina não alterou o tempo

de imobilidade de animais ($p>0.05$). Por outro lado, animais tratados com diazepam apresentaram aumento neste parâmetro, em relação aos animais tratados com veículo ($p<0.05$).

O modelo de estresse por natação além de ser uma situação aversiva e inescapável, representa para o animal uma ameaça de afogamento e morte eminente, caso não possa manter a cabeça fora da água. A imobilidade nesta situação poderia representar uma resposta adaptativa. A menor movimentação do animal na água resultaria em economia de energia para o organismo que está sendo submetido ao exercício físico (Bruner, Vargas., 1994). O aumento do tempo de imobilidade, induzido pelo tratamento com diazepam, no modelo de estresse por natação, indica que a diminuição da ansiedade potencializou a capacidade adaptativa do animal. Por outro lado, como neste protocolo não houve efeito significativo da desipramina, a imobilidade parece não representar um estado de desamparo aprendido.

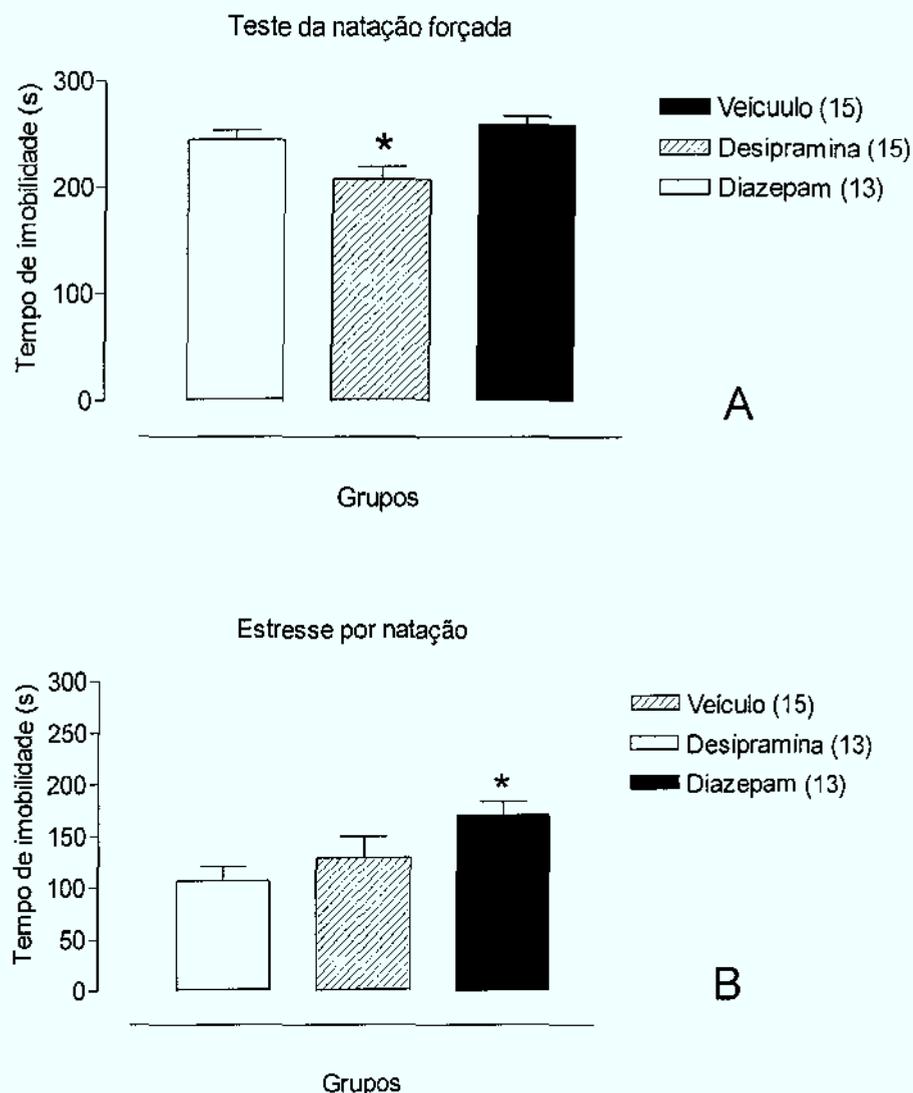


Figura1. Tempo de imobilidade de ratos submetidos ao teste da natação forçada (A) ou ao modelo de Estresse por natação (B), tratados com veículo, desipramina ou diazepam. *Estatisticamente diferente do grupo tratado com veículo($p < 0.05$). O número de animais por grupo está indicado entre parênteses.

Na Tabela 2 apresentamos o número de animais que mergulharam, em cada modelo de natação. Devido ao pequeno número de animais que

realizaram mergulho, não foi possível analisar estatisticamente esta variável. Observa-se porém que o diazepam parece diminuir a frequência deste comportamento no teste da natação forçada, sem alterá-lo no estresse por natação (Tabela 2).

Segundo Lynch e Katcher (1974) durante um mergulho a demanda de oxigênio aumenta, crescendo também a probabilidade de hipóxia e conseqüentemente de afogamento. Ratos que realizam um grande número de mergulhos tendem a morrer mais facilmente do que ratos que nadam ritmicamente ou somente flutuam (Binik et al; 1983). Logo um menor número (ou ausência) de mergulho estaria ligado à maior probabilidade de sobrevivência do animal submetido à natação. Como este comportamento foi avaliado na segunda sessão, sugerimos que, de alguma forma, os animais possam ter “aprendido” que seriam retirados da água, e isto pode ter diminuído o estresse dos mesmos, diminuindo a probabilidade de realizarem mergulhos.

Tabela 2. Número de mergulhos realizados por ratos, durante a segunda sessão de natação (dia2) no teste da natação forçada (TNF) e estresse por natação (EN).

GRUPO	N	Nº de ratos que mergulharam	Porcentagem de ratos que mergulharam
TNF - veículo	15	2	13%
TNF - diazepam	13	1	7%
EN - veículo	15	0	0%
EN - diazepam	13	0	0%

5. Conclusão

Os resultados obtidos confirmam a hipótese de que o teste da natação forçada e o modelo de estresse representam duas situações distintas para o animal de laboratório, e portanto o comportamento de imobilidade nestes protocolos têm diferentes interpretações: desamparo aprendido no teste da natação forçada, e adaptação no modelo do estresse por natação.

6. Referências Bibliográficas

- ABEL, E.L. Behavioral and physiological effects of different water depths in the forced swim test. **Physiol. Behav.**, **56**: 411-414, 1994.
- BEIJAMINI, V.; SKALISZ, L.L.; JOCA, S.R.L. & ANDREATINI, R. The effect of oxcarbazepine on behavioural despair and learned helplessness. **Eur. J. Pharmacol.**, **347**: 23-27, 1998.
- BARROS, H. M.T. & FERIGOLO, M. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, **23**: 279-286, 1998.
- BIANCHI, F.J, TANNO, A.P., MARCONDES, F.K. Relação entre nível de estresse e supersensibilidade à noradrenalina em ratas no proestro. **Rev. Braz. J. Pharmac. Sci**, **37**: 391-398, 2001.
- BINIK, Y.M.; THERIAULT, G.& SHUSTACK, B. Sudden swimming deaths: a psychomotor reonterpretation. **Psychophysiology**, **20**: 670-681, 1983.
- BORSINI, F.; VOLTERRA, G. & MELI, A. Does the behavioral despair test measure despair? **Physiol. Behav.**, **38**: 385-386, 1986.

- BRUNER, C.A. & VARGAS, I. The activity of rats in a swimming situation as a function of water temperature. **Physiol. Behav.**, **55**: 21-28, 1994.
- CALIL, CM. Interpretação do significado do tempo de imobilidade de ratos no estresse por natação e no teste da natação forçada. **Relatório Final - Bolsa de Iniciação Científica, FAPESP 99/08286-1, 02/2000-03/2001.**
- CALIL, CM, BIANCHI FJ, TANNO AP, CUNHA TS & MARCONDES FK. Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natação. **Braz. J. Pharmac. Sci**, **38**: 479-485, 2002.
- FERIGOLO, M.; BARROS, J. M. T.; MARQUARDT, A. R.; TANHAUSER, M. Comparison of behavioral effects of moclobemide and depreny during forced swimming. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **60(2)**: 431-437, 1998.
- HUNT, H.F. & OTIS, L.S. Conditioned and unconditioned emotional defecation in the rat. **J Comp. Physiol. Psychol.**, **46** : 378-382, 1953.
- LYNCH, J.J. & KATCHER, A . H. Human handling and sudden death in laboratory rats. **J. Nerv. Ment. Dis.**, **159** : 362-365, 1974.
- MARCONDES, FK; VANDERLEI, L.C.M.; LANZA, L.L.B. & SPADARI-BRATFISCH, R.C. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **74**: 663-669, 1996.
- MARTÍ, J., ARMARIO, A. Effects of diazepam and desipramine in the forced swimming test: influence of previous experience with the situation. **Eur. J. Pharmacol.**, **236**: 295-299, 1993.
- Martinez-Mota L, Estrada-Camarena E, Lopez-Rubalcava C. Indorenate produces antidepressant-like actions in the rat forced swimming test via 5-

HT1A receptors. **Psychopharmacology** 2002 Dec;165(1):60-6. 2002 Oct 23.

PORSOLT, R.D.; LePICHON, M. & JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, **266**: 730- 32, 1977.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N. & JALFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment. **Eur. J. Pharmacol.**, **47**: 379-391, 1978a.

PORSOLT, R.D.; BETIN, A. & JALFRE, M. "Behavioral despair" in rats and mice: strain differences and the effect of imipramine. **Eur. J. Pharmacol.**, **51**: 291-294, 1978b.

TANNO, A.P., BIANCHI, F.J., MARCONDES, F.K. Supersensibilidade da resposta cronotrópica à noradrenalina em ratas submetidas a estresse na fase de proestro. **Rev. Braz. J. Pharmac. Sci**, **38**: 63-70, 2002a.

TANNO, A.P., BIANCHI, F.J., MOURA, M.J.C.S., MARCONDES, F.K. Atrial supersensitivity to noradrenaline in stressed female rats. **Life Sci.**, **71**: 2973-81, 2002b.

THIERRY, B.; STERU, L. CHERMAT, R. SIMON, P. Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? **Behav. Neural. Biol.**, **41** (2): 180-189, 1984.