

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Estudo Comportamental Sobre os Efeitos do Tratamento
Crônico com Imipramina em Ratos Manipulados no
Período Neonatal

André Krumel Portella

Orientadora: Prof. Carla Dalmaz

Porto Alegre, Junho de 2005

Dedicatória

À minha amada esposa...
...sem palavras, somente amor, carinho e paixão...

. II .

Agradecimentos

Ao pessoal do Lab 32, a turma da Prof. Carla e do Prof Alex...

À minha orientadora;

À minha família;

À falta de dinheiro, que me trouxe criatividade;

Ao café, que me manteve acordado e

a fome de saber, que ainda não saciei.

Estudo Comportamental Sobre os Efeitos do Tratamento
Crônico com Imipramina em Ratos Manipulados no
Período Neonatal

Sumário

I.	Resumo	02
II.	Abstract	03
III.	Introdução	08
IV.	Objetivos	12
V.	Material e Métodos	13
VI.	Resultados	20
VII.	Artigo a ser submetido para publicação	21
VIII.	Resultados Adicionais	52
	1. Dose de Imipramina – Fêmeas	53
	2. Efeito do tratamento crônico com Imipramina em ratas fêmeas submetidas ou não à manipulação neonatal, sobre o peso corporal, consumo de ração padrão e de água	56
	3. Efeito do tratamento crônico com imipramina em ratas fêmeas submetidas ou não à manipulação neonatal, sobre o consumo de alimento palatável doce, basal e em resposta a diferentes estímulos	60
	4. Efeito do tratamento crônico com imipramina em ratas fêmeas, submetidas ou não à manipulação neonatal, sobre o desempenho na tarefas de labirinto em cruz elevado e campo aberto	60
	5. Efeito do tratamento crônico com imipramina em ratos fêmeas e machos, submetidos ou não à manipulação neonatal, sobre o desempenho na tarefa de preferência condicionada de lugar (PCL)	64
IX.	Discussão	68
X.	Conclusões e Perspectivas	77
XI.	Referências	80

I. Resumo

Eventos precoces, particularmente diferentes tipos de estresse, como hipóxia-isquemia, infecções, desnutrição/hipernutrição e negligência materna, podem trazer conseqüências para toda a vida. Tais conseqüências variam conforme a qualidade, a intensidade e a janela de tempo em que o agente agressor atuou, além da susceptibilidade do organismo que o recebeu. Os mecanismos pelos quais estes eventos levam a tais alterações ainda não estão totalmente esclarecidos, mas sabe-se que esta fase da vida constitui-se ao mesmo tempo de um período de hiporresponsividade ao estresse, assim como uma fase crítica para desenvolvimento de diversos órgãos e sistemas. Sabe-se que desafiando a homeostasia do organismo nesse momento, ocorre uma programação de diversos sistemas envolvidos na resposta ao estresse a um novo equilíbrio funcional, o que pode alterar a relação saúde-doença na vida adulta.

Dentre os modelos para o estudo de intervenções precoces, temos a Manipulação Neonatal, que consiste numa separação breve da mãe, durante o período hiporresponsivo ao estresse. Nesse trabalho usou-se a separação por 10 min, nos primeiros 10 dias de vida. A partir desta intervenção animais tornam-se menos reativos ao estresse, apresentam comportamento menos ansioso frente a estressores e têm comportamento alimentar caracterizado por um aumento no consumo de alimento palatáveis, sem alteração no consumo de ração padrão.

O controle da alimentação envolve basicamente dois componentes, um homeostático e outro hedônico. A preferência alimentar alterada dos animais manipulados no período neonatal indica possivelmente uma alteração da percepção hedônica do alimento. As vias dopaminérgicas mesolímbicas estão associadas a recompensas naturais ou biológicas como alimentação, sexo, drogadição. Sabe-se que animais manipulados no período neonatal apresentam redução de receptores D3 no núcleo acumbens.

A Imipramina é um antidepressivo tricíclico que age principalmente por inibição da recaptção de serotonina e noradrenalina, e com ações indiretas sobre o sistema dopaminérgico e eixo Hipotálamo – Pituitária - Adrenal. Seu uso crônico reforça a capacidade do organismo de enfrentar o estresse e de sentir recompensas naturais como a da alimentação.

O objetivo desse trabalho foi investigar se o tratamento crônico com Imipramina reverteria o comportamento alimentar alterado de animais manipulados no período neonatal. Adicionalmente investigou-se o efeito deste tratamento sobre outras alterações comportamentais como a menor inibição exploratória no Labirinto em Cruz Elevado e menor habituação no teste do Campo Aberto.

No consumo basal de alimento doce, houve aumento de consumo de alimento doce apenas em machos manipulados, sendo que o tratamento com Imipramina diminuiu este efeito. Os animais machos manipulados não tiveram aumento de consumo em resposta ao estresse de contenção nem à exposição a um ambiente enriquecido, porém responderam à novidade. Novamente aqui o tratamento com Imipramina reverteu o comportamento, pois os animais tratados apresentaram maior reatividade aos estímulos, igualando seu modo de reagir ao dos animais não manipulados. As fêmeas não apresentaram diferenças no consumo de alimento doce no basal, porém o tratamento com Imipramina reduziu a intensidade da resposta aos diferentes estímulos, levando-as a um menor consumo.

Nos testes comportamentais, de um modo geral, animais manipulados, tanto machos (no Labirinto em Cruz Elevado), quanto fêmeas (no Campo Aberto), mostraram sinais de menor ansiedade, sem efeito da Imipramina. Porém entre os não manipulados, a Imipramina teve efeito ansiolítico apenas em fêmeas. Tanto o tratamento medicamentoso, quanto a manipulação neonatal levaram a uma menor habituação ao Campo Aberto. Na Preferência Condicionada de Lugar houve igual desempenho de todos os animais.

O principal achado deste trabalho foi o fato dos animais manipulados não tratados com Imipramina terem apresentado uma reduzida variabilidade nas respostas decorrentes de mudanças ambientais, evidenciado tanto no comportamento alimentar persistentemente mantido no mesmo patamar (independentemente das intervenções), quanto na resistência a habituação ao Campo Aberto. A Imipramina foi eficaz em reverter apenas a alteração do comportamento alimentar de ratos machos manipulados no período neonatal, permitindo-lhes uma maior variabilidade de resposta, o que aproximou o seu comportamento ao dos animais não manipulados.

II. Abstract

Early life events, particularly different kinds of stress, like hypoxia-ischemia, infection, over/under nutrition and maternal negligence, can lead to long lasting consequences. These consequences vary as a matter of the quality, intensity and the window of time where the aggressive agent acted, besides the susceptibility of the target organism. The mechanism by which stress leads to such alterations are not well understood yet, but we know that the neonatal period is, at the same time, a stress hyporesponsive period and a critical time for the development of several organs and systems. By challenging the organism homeostasis in this immature period, we program the several internal mechanisms involved in the stress response to a novel functional balance, which could alter the health/disease relationship in the adulthood.

Among the models used for the study of early life experiences, we have the Neonatal Handling procedure, that consists in repeated brief maternal separation during the stress hyporesponsive period. Upon this intervention the animals become less reactive to stress, present less anxiety behavior and have a feeding behavior characterized by an increased consumption of palatable food, without alterations in the ingestion of standard lab chow. In this work we used 10 minutes of maternal separation during the first 10 days of life.

Feeding control basically evolves two compounds, one homeostatic and another hedonic. The changed feeding behavior of the handled animals possibly denotes an altered perception of the hedonic compound of the food. The dopaminergic pathways in the Mesolimbic system are related to natural or biological reward, such as feeding, drug addiction and sex. We know that neonatal handled animals have a downregulation of the Dopaminergic D3 receptors in the nucleus accumbens.

Imipramine is a tricyclic antidepressant that acts mainly by inhibiting the reuptake of Serotonin and Noradrenaline, and has indirect actions over the Dopaminergic system and the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis. Its chronic use strengthens the capability of the organism to face the stress and to feel natural rewards like those from food.

The objective of this work was to investigate if a chronic Imipramine treatment could reverse the altered feeding behavior of neonatal handled rats. Additionally we investigated the effect of such treatment over another of their altered behaviors, like the less exploratory inhibition in the Plus Maze and their lesser habituation in the Open Field procedure.

Male neonatally handled rats had an increased sweet food consumption in the basal test, that was reversed by Imipramine treatment. The manipulated male animals had not had an increase of consumption in reply to contention stress nor to the exposition to an enriched environment, however they had answered to the novelty. Again the treatment with Imipramine reverted the behavior, therefore the treated animals had presented greater reactivity to the stimulus, equaling its way to react to the one of the non-manipulated animals. The females had not presented differences in the sweet food consumption in the basal test, however the treatment with Imipramine seems to reduce the intensity of the reply to the different stimulus, taking them to a lesser consumption.

In the behavioral tests, in a general way, manipulated animals, both male (in the Plus Maze) and female (in the Open Field), had shown signals of lesser anxiety, without effect of the Imipramine. However, between the non-manipulated, the Imipramine had an anxiolytic effect only in females. Both the drug treatment and the neonatal manipulation had led to a lesser habituation to the Open Field. In the Conditioned Place Preference we had equal performance of all the animals.

What caught more attention in these experiments was the lack of modulation of reply of the manipulated rats, evident both in the feeding behavior as well as in the Open Field. Imipramine effectively reverted the alteration of the alimentary behavior of male rats manipulated in the neonatal period, allowing them to have a bigger variability of reply, which approached its behavior to the one of the non-handled animals.

III. Introdução

O termo “estresse” tem sido largamente usado em várias acepções. Inicialmente foi usado na física, significando o somatório das forças internas em um material, resultante da aplicação de uma carga externa. A partir de 1936, Hans Selye transpôs este termo para a Medicina e a Biologia, dando-lhe o significado de esforço de adaptação do organismo para enfrentar situações consideradas ameaçadoras à sua vida e a seu equilíbrio interno, ou homeostase. “Estressor” seria então definido como um desafio ao indivíduo, que perturba sua homeostase e requer uma resposta fisiológica. Pode também ser apenas uma interpretação errônea da situação, percebida como ameaça, que resulta numa resposta comportamental e/ou hormonal (McEwen, 2002; Tsigos C, Chrousos GP, 2002).

Há três sistemas de resposta ao estresse classicamente descritos (McEwen, 2002; Francis DD, Meaney MJ, 1999):

- 1) o Sistema Neurovegetativo, incluindo a liberação de noradrenalina pelos terminais simpáticos e de adrenalina pela medula adrenal;
- 2) o Sistema Imunológico;
- 3) o Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA).

A ativação aguda desses sistemas promove principalmente aumento da disponibilidade de energia e melhora do fluxo sanguíneo para órgãos-alvo, sendo altamente adaptativa (Tsigos C, Chrousos GP, 2002).

Estímulos externos têm grande impacto sobre o sistema límbico, que se relaciona com o hipotálamo. O controle central do sistema de resposta ao

estresse inclui os neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo. Estas células secretam hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina (AVP) de uma maneira pulsátil, com dois ou três picos por hora (Engler et al., 1989). Durante o estresse agudo, a amplitude e a frequência desses pulsos aumenta, resultando na liberação de adrenocorticotrofina (ACTH) pela hipófise e de cortisol pelo córtex da adrenal (Tsigos C, Chrousos GP, 1994). Citocinas e outros mediadores da inflamação são liberados e potencializam a ação dos vários componentes do eixo HPA.

O ACTH aumenta a síntese de glicocorticóides (em humanos, principalmente o cortisol; em roedores, principalmente a corticosterona) pela adrenal. Em situações críticas, os glicocorticóides têm ações de proteção e manutenção da homeostase: mobilização de estoques energéticos através da lipólise e do catabolismo protéico, este último fornecendo substratos para a gliconeogênese, melhora da função cognitiva, inibição da função gonadal, alteração da homeostase do cálcio (Buckingham JC, 2000). O cortisol tem importância na sua própria regulação neuroendócrina, uma vez que atua em receptores do sistema límbico (especialmente amígdala e hipocampo), do hipotálamo e da hipófise por retroalimentação negativa, encerrando a ativação do eixo (de Kloet et al., 1998). Esse hormônio também regula a atividade do eixo HPA, inibindo as citocinas (Tsigos C, Chrousos GP., 1994). A inibição causada pelos glicocorticóides limita sua própria ação, prevenindo o organismo de seus efeitos catabólicos, antirreprodutivos e imunossupressores (Tsigos C, Chrousos GP. 2002) (Figura 1).

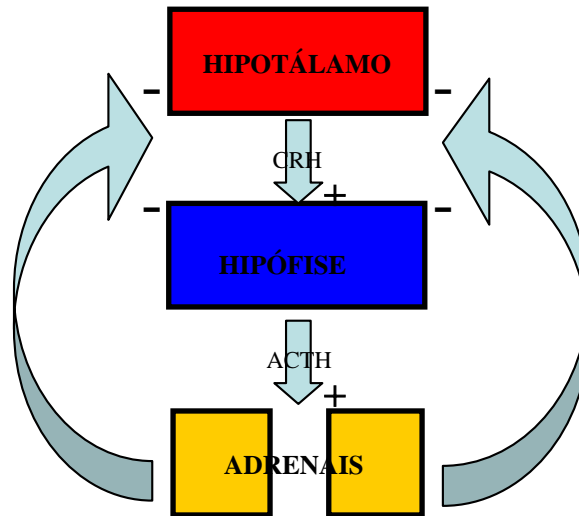


FIGURA 1: Esquema simplificado do eixo HPA, incluindo a alça de retroalimentação negativa.

Entretanto, a exposição crônica ao estresse pode ser danosa ao organismo (Kopp MS, Rethelyi J., 2004), levando a uma série de alterações bioquímicas e comportamentais, que envolvem, entre outras, a sensibilização da resposta locomotora e a alteração do comportamento alimentar (Wunderlich et al., 2004; Nikulina et al., 2004; Holmes et al., 1997). Essas alterações também estão relacionadas ao estresse neonatal (Iwasaki et al., 2000, Silveira et al., 2004; Sanchez et al., 2005).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal apresenta uma regulação peculiar no período pré e pós-natal imediato, apresentando uma reduzida reatividade ao estresse, caracterizada por níveis relativamente baixos e constantes de glicocorticóides. Essa hiporresponsividade é considerada uma resposta benéfica para o desenvolvimento do organismo, pois níveis inadequados de

glicocorticóides (Neal et al., 2004; Leret et al., 2004), tanto baixos quanto altos, têm efeitos prejudiciais sobre o desenvolvimento neural e podem levar a conseqüências fisiológicas e comportamentais a curto e longo prazo. Essa hiporresponsividade ocorre por meio de uma maior eficiência da retroalimentação negativa no hipotálamo (Sapolsky RM, Meaney MJ., 1986; Meaney et al., 1989) e redução da resposta da glândula adrenal ao ACTH (Yoshimura et al., 2003). Além disso, nesse período, os sistemas de resposta ao estresse possuem alta plasticidade, pois ainda estão em desenvolvimento, e distúrbios no padrão normal de secreção de glicocorticóides podem alterar de forma definitiva as respostas do organismo ao estresse (Levine et al., 1967). Desse modo, exigir uma resposta a um estressor num organismo ainda imaturo pode levar a profundas e persistentes alterações fisiológicas e bioquímicas, as quais levam a mudanças comportamentais, nociceptivas e endócrinas na vida adulta (Hermel et al., 2001 ; Gomes et al., 1999 ; Smythe et al., 1994(a) ; Stephan et al ., 2002 ; Schmidt et al., 2004).

Vários são os modelos de estresse precoce, que podem envolver, por exemplo, separação materna, injeção de antígenos imunogênicos, exposição a estressores físicos, como frio, calor, etc. Diferentes tipos de estressores acionam diferentes componentes do sistema de resposta ao estresse, portanto levam a resultados diversos. Dentro da intervenção baseada na separação materna, encontramos na literatura vários modelos e também grande variação de nomenclatura. A separação pode variar desde um breve período de 1 a 15 minutos (chamado de manipulação breve) até períodos mais extensos, como de 24 horas (privação materna / separação materna). Atualmente, acredita-se que períodos mais breves de separação atuariam

mais como um fator de perturbação da relação entre a mãe e a prole, tendo pouca ação direta sobre o filhote (Caldji et al., 1998). Nessa dissertação de mestrado o modelo adotado foi o de separação materna breve por 10 minutos nos primeiros 10 dias de vida (Silveira et al., 2004; 2005).

Vários trabalhos mostram que ratos submetidos a algum tipo de estressor no período neonatal apresentam respostas de ACTH e glicocorticóides alteradas frente a estressores na vida adulta (Gordon et al., 2002; Ader R. e Grot LJ, 1969). Ratos adultos manipulados precocemente têm uma maior densidade de receptores glicocorticóides no hipocampo (Meaney MJ, Aitken DH, 1989) e apresentam reatividade ao estresse agudo diferenciada, com pico de glicocorticoide semelhante a animais não manipulados, mas um retorno mais rápido do hormônio aos níveis basais. No entanto, a privação materna aumenta os níveis basais de ACTH, diminui os sítios de ligação de CRH na adeno-hipófise e os aumenta no núcleo da rafe (Plotsky PM, Meaney MJ, 1993). O mecanismo pelo qual o estresse neonatal leva a essas alterações não está elucidado ainda. Sabe-se, porém, que a manipulação aumenta a taxa de renovação da serotonina durante o período neonatal somente em regiões cerebrais onde há expressão de receptores glicocorticóides, e não em áreas onde não há este tipo de receptor (Smythe et al., 1994 b).

Estudos revelam que intervenções feitas no período neonatal alteram a relação mãe-filhote e que o comportamento da mãe afeta o desenvolvimento do sistema nervoso dos filhotes (Levine S., 1994; Giovanardi et al., 1999). Entre os efeitos comportamentais da manipulação neonatal, observados na vida adulta, poderíamos citar uma diminuição em parâmetros relacionados à

ansiedade (Levine et al., 1967; Silveira et al., 2005) e aumento no consumo de alimento palatável doce e salgado (Silveira et al., 2004). Sabemos também que esse aumento de consumo não é um comportamento relacionado à ansiedade, uma vez que não é revertido pelo uso de benzodiazepínicos (Silveira et al., 2005). Intervenções realizadas precocemente na vida também têm sido modelo para adição a drogas (Kosten et al., 2000).

Antidepressivos constituem uma classe heterogênea de medicações, que são utilizadas para tratamento de transtornos alimentares, transtornos de ansiedade, do humor e também em síndromes hiperalgésicas (Bacaltchuk J, Hay P., 2003; Krueger et al., 2004). Esses transtornos estão relacionados a alterações do eixo HPA (Heit et al., 1997; Putignano et al., 2001) e do sistema monoaminérgico (Morilak DA, FrazerA., 2004). Há evidências de que sua ação sobre o sistema nervoso central (SNC) reforce a capacidade do organismo de enfrentar o estresse e aumente a efetividade da retroalimentação negativa exercida pelos glicocorticóides, por meio do aumento de receptores mineralocorticóides no hipotálamo (Barden N., 2004; Reul et al., 1993) e da redução de ácido ribonucléico mensageiro (ARNm) para o CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo (Brady et al., 1991). Pré-tratamento com imipramina também atenua o efeito do estresse agudo por isolamento sobre o comportamento locomotor e exploratório (Plaznik et al., 1993). A fluoxetina diminui a ingestão calórica em geral (proteínas, gorduras e, com menos intensidade, carboidratos) (Heisler et al., 1997). Um estudo também observou inibição do aumento de consumo de alimento doce palatável (rico em carboidratos), induzido por privação alimentar (“*binge*

eating') (Hagan et al., 1997). Acredita-se que, em parte, o sucesso de tratamentos de distúrbios alimentares com o uso de antidepressivos ocorra devido a sua propriedade de aumentar a capacidade do indivíduo em sentir prazer com a alimentação, reforçando a sensação de saciedade (Papp M., 1989; Heal et al., 1998).

Poucos estudos têm usado antidepressivos na tentativa de reverter efeitos do estresse neonatal. Um deles é o estudo de Huot et al (Huot et al, 2001), sobre dependência a drogas e ansiedade, que usou a paroxetina para reverter dependência a drogas causada pela separação materna (Huot et al., 2001). A imipramina foi eficaz em reverter a hiperalgesia encontrada em ratos submetidos a privação materna no período neonatal (Stephan et al., 2002). O estresse neonatal altera a nocicepção, mas essas alterações variam muito conforme o modelo de estresse utilizado, levando a dados diversos na literatura (Smythe et al., 1994 (b); Stephan et al., 2002).

A imipramina é um antidepressivo tricíclico, cujo mecanismo primário de ação se dá por inibição da recaptação de serotonina e de noradrenalina (Briley M., Moret C, 1993) e, em menor escala, tendo ação anti-histaminérgica (Ookuma et al., 1990) e anticolinérgica (Gumilar et al., 2003). Uma vantagem do uso da imipramina para estudos em modelos animais envolvendo estresse é a possibilidade de sua administração ser efetuada por via oral, o que evita injeções repetidas durante o tratamento. A injeção repetida causa estresse crônico leve nos animais, levando a diversas alterações comportamentais, como, por exemplo, redução do consumo de alimentos palatáveis, e é usada como modelo de anedonia (Grippe et al., 2004). A prevenção de tal efeito é conseguida exatamente pelo tratamento

crônico com antidepressivo (Monleon et al., 1995). Em nosso desenho experimental, as injeções poderiam levar a um falseamento importante dos resultados (os injetados com salina poderiam ter seu comportamento alimentar alterado pela indução de anedonia).

Nossa hipótese é que o tratamento crônico com imipramina, por interferir com os mecanismos de resposta ao estresse e com o sistema monoaminérgico, aumentando a capacidade de percepção da recompensa pela alimentação, reverteria o aumento de consumo de alimentos palatáveis em animais manipulados no período neonatal.

IV. Objetivos

Esta dissertação tem por objetivo estudar o efeito do tratamento crônico com um antidepressivo, administrado na idade adulta, sobre as alterações comportamentais causadas pela manipulação no período neonatal. Embora nossa hipótese se relacione aos efeitos sobre o comportamento alimentar e a percepção de alimento como recompensa, também estudaremos efeitos sobre ansiedade e atividade motora. Assim, mais especificamente, pretendemos avaliar o efeito da imipramina em animais (ratos machos e fêmeas) submetidos a manipulação breve no período neonatal nos seguintes testes:

- Comportamento alimentar: consumo de alimentos palatáveis salgados e doces no estado alimentado (basal) e, no caso de alimento doce, em resposta a diferentes estímulos (estresse agudo por contenção, exposição à novidade e ambiente);
- Comportamento no labirinto em cruz elevado;
- Comportamento no campo aberto;
- Comportamento desempenho em um teste de preferência condicionada de lugar.

V. Material e Métodos

1. Animais Experimentais

Ratas Wistar adultas prenhes, selecionadas ao acaso, durante a última semana de gestação, foram obtidas do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo mantidas individualmente em caixa-moradia. Aguardou-se o nascimento dos filhotes, sendo então padronizados num número de 8 filhotes por ninhada. O dia do nascimento foi considerado dia zero (D0). Os filhotes foram mantidos com a mãe até o 21^o dia de vida, quando foram então desmamados e separados entre machos e fêmeas, sendo randomizados, com o objetivo de não se manter mais do que dois irmãos por caixa, e mantidos em grupos de não mais do que 5 animais. As caixas-moradia eram confeccionadas em "plexiglas", medindo 41 x 34 x 16 cm, com assoalho recoberto de serragem, trocada pelo menos uma vez por semana. Os animais foram submetidos a um ciclo diário claro/escuro de 12 por 12 horas, com ração padronizada e água "ad libitum", luzes ligadas às 7:00 horas. Desde o nascimento e até o desmame, as únicas intervenções permitidas foram a colocação de ração e a troca da água; qualquer intervenção que envolvesse manipulação das ninhadas, como a troca da serragem, não foi realizada.

2. Manipulação Neonatal

As ninhadas foram divididas em dois grupos:

A. Ninhada não manipulada: os filhotes permanecem com suas mães nas caixas-moradia, não sofrendo qualquer espécie de manipulação (tanto os filhotes quanto as mães) até o 21^o dia de vida.

B. Ninhada manipulada: os filhotes foram retirados da caixa e colocados em conjunto em uma incubadora a 36 graus centígrados, onde permaneceram por 10 minutos, sendo então devolvidos a sua caixa. Este procedimento foi realizado do 1^o ao 10^o dia de vida.

Após a sexagem aos 21 dias de vida, os animais foram distribuídos randomicamente em oito grupos, a saber:

- Grupo machos não manipulados, recebendo água (MñMA);
- Grupo machos manipulados, recebendo água (MMA);
- Grupo machos não manipulados, recebendo imipramina (MñMI);
- Grupo machos manipulados, recebendo imipramina (MMI);
- Grupo fêmeas não manipuladas, recebendo água (FñMA);
- Grupo fêmeas manipuladas, recebendo água (FMA);
- Grupo fêmeas não manipuladas, recebendo imipramina (FñMI);
- Grupo fêmeas manipuladas, recebendo imipramina (FMI).

3. Tarefas Comportamentais

3.1 Tarefa de comportamento alimentar

O animal foi colocado em caixa retangular (corredor) com tampa de vidro, por 3 min. No seu interior, havia um recipiente com 10 unidades de alimento palatável doce. Como alimento doce foi usado o Froot Loops® da Kellogs. Antes do dia do teste, o animal foi habituado a esse tipo de alimento durante 5 dias, em restrição alimentar de 80% do consumo habitual. A quantidade de alimento ingerido em restrição e no estado alimentado foi medida (Ely et al., 1997).

3.2 Comportamento alimentar em resposta ao estresse agudo de contenção

Os ratos foram submetidos a restrição de movimentos, em dispositivos plásticos confeccionados com garrafas "PET" de COCA-COLA 600mL, cortadas em seu bocal e fundo, e feito um corte transversal para permitir o ajuste ao tamanho do animal. O rato foi colocado no interior das garrafas cortadas, firmemente contido e mantido assim por um período de 1h. Após esse período, os animais aguardaram em uma caixa semelhante à caixa-moradia por 10 minutos, sendo a seguir testados para consumo de alimento doce conforme item 3.1.

3.3 Estresse por exposição à novidade e exposição a ambiente enriquecido

Os ratos foram colocados em um ambiente novo e desconhecido para eles, constituído de um aquário de vidro sem água, enriquecido com 4 brinquedos de plástico com cores e formas diversas, por um período de 5 minutos. Após este período, o rato foi colocado em um ambiente neutro, composto por uma caixa de "plexiglas" individual, durante 2 minutos, sendo a seguir testado o consumo de alimento palatável doce em corredor conforme item 3.1.

O procedimento foi repetido como descrito acima por mais dois dias, eliminando-se o efeito de novidade, para permitir a avaliação do componente de estimulação ambiental.

3.5 Exposição ao labirinto em cruz elevado

O labirinto consiste em quatro braços dispostos perpendicularmente que se cruzam centralmente. Dois braços são fechados lateralmente com paredes de 40cm de altura. Os outros dois braços formam uma passarela aberta. Existe, entre os braços, uma região intermediária de 10 x 10 cm. Esse ponto de intersecção entre os braços delimita uma área central, denominada quadrado central (10 X 10 cm). O labirinto permanece suspenso do chão a uma altura de 50 cm.

Os animais foram expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE) por um período de cinco minutos. O comportamento dos animais foi observado e foram registradas variáveis espaciais e temporais (porcentagem de entradas

e tempo de permanência nos braços abertos e fechados).

3.6 Exposição ao campo aberto

O teste de campo aberto consiste de um caixa confeccionada em madeira com a frente em acrílico (40 x 50 x 60 cm). É empregado para avaliar as atividades exploratórias dos animais, sendo avaliados a movimentação espontânea dos animais (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), o número de comportamentos de levantar (“*rearings*”), assim como o tempo de latência para iniciar a exploração, como índices de emocionalidade e atividade motora, registrados durante um período de 5 minutos. A tendência natural do animal em um ambiente novo é de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente desconhecido. Neste trabalho de dissertação, realizamos duas seções, aqui denominadas treino e teste, em dias consecutivos, sendo a diferença entre um dia e outro (habituação) interpretada como índice de memória, pois o animal tende a explorar menos um ambiente já conhecido.

3.7 Preferência Condicionada ao Lugar

Neste procedimento experimental, utilizamos uma caixa confeccionada em madeira com 10 x 70 x 27,5 cm, dividida em dois ambientes distintos de igual tamanho, um claro com chão liso, outro escuro com chão coberto por uma tela de arame trançado. O aparato apresentava uma porta removível dividindo os dois ambientes.

O experimento teve duração de 8 dias. No primeiro dia, realizou-se um teste basal, medindo-se o número de entradas e tempo gasto no compartimento claro e no compartimento escuro num período de 15 min, com a finalidade de avaliarmos a preferência basal do animal. Esta primeira exposição também fornece dados sobre a ansiedade gerada pela exposição à novidade.

Do 2º ao 7º dia, os ratos foram expostos, em regime de restrição alimentar, ao lado claro, considerado aversivo para o rato, onde foi colocado alimento doce palatável, ou ao lado escuro, onde não havia alimento. Tais seções tiveram duração de 30 minutos a cada dia e os animais foram expostos alternadamente aos lados claro e escuro (Obs: os ratos foram habituados previamente ao alimento doce palatável - *Froot Loops*).

No 8º dia foi realizado novo teste, nos mesmos moldes do primeiro dia. Os resultados do 1º e do 8º dia foram então confrontados para avaliarmos se houve alteração de preferência.

4. Tratamento Farmacológico

A imipramina (cloridrato de imipramina) foi diluída na água de beber dos animais, numa concentração de 40 mg/dL, conforme descrição de Stephan et al (Stephan et al, 2002). A droga foi administrada a partir do 60º dia de vida (idade adulta) e foi mantida durante a execução de todos os experimentos. Os ratos foram tratados por um período de 30 dias antes do início das avaliações comportamentais. Durante todo o tempo de

administração do fármaco, foi monitorada a ingestão hídrica dos animais para controle da dose.

5. Análise Estatística

Os dados (quantidade de alimento consumida, número de respostas de orientação e cruzamentos no campo aberto, tempo e número de entradas nos braços do labirinto em cruz elevado, tempo e cruzamentos no teste de preferência condicionada de lugar) foram analisados por testes paramétricos e foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por análise de variância de uma via ou duas vias, com análise repetida quando era o caso, seguidas essas análises de variância pelo teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls, quando indicado, ou, quando entre dois grupos, pelo teste t de Student para amostras dependentes ou independentes (Bliss, 1967; Zar, 1996).

VI. Resultados

Os resultados do presente trabalho de dissertação serão apresentados na forma de um artigo, a ser encaminhado para publicação, e de resultados adicionais, que foram obtidos mas não aparecerem no artigo.

VII. Artigo a ser submetido para publicação

Chronic Imipramine Treatment Reverses the Increased Sweet Food Consumption of Neonatal Handled Rats

André K. Portella, Patrícia P. Silveira, Carla Dalmaz

PPG Neurociências e Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Research supported by CNPq.

Correspondence :

AK Portella, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo) Lab. 32.

90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Fax: 51- 3316-5535.

E-mail: akportella@terra.com.br

Running title: Neonatal handling, imipramine and sweet food consumption

ABSTRACT

PORTELLA AK; SILVEIRA PP; DALMAZ C. Chronic Imipramine Treatment Reverses the Increased Sweet Food Consumption of Neonatal Handled Rats

Introduction: Neonatal handling (Neo-H) permanently affects several aspects of an individual's life. We had previously reported that Neo-H increases ingestion of palatable food (PF) in adult rats. Antidepressives are used to treat feeding behavior and mood disorders, probably through actions in the HPA axis and monoaminergic system, which are also altered in the neonatal handled rat. The aim of this study is to verify the effect of a chronic treatment with imipramine on feeding behavior of animals subjected to neonatal handling. **Material and Methods:** Litters of randomly selected pregnant Wistar rats were divided into non handled (NH) and handled (H) groups. Handling procedure was performed on days 1-10 after birth, 10 min/day. At 60 days of life, the two groups were subdivided, receiving water(-Water) or imipramine (-Imip), diluted in the tap water (mean dose of 4.3 mg/Kg/day). At 90 days of life, we tested the consumption of sweet food at basal and after exposure to acute restraint stress (ARS), novelty (Nov), and exposure to an enriched environment (EE). We also evaluated the behavior of the animals in the plus maze and open field tests. **Results:** H rats weighted less than NH rats, and imipramine treated rats showed a reduction in weight gain after 30 days of treatment. No differences were observed in standard lab chow and water intake, but H-Water consumed more PF (basal measurement). Novelty increased PF intake in all rats; ARS did not increase PF consumption in H-Water and H-Imipramine rats, whereas EE increased PF consumption, except in H-Water group. In the plus maze, handled rats showed less anxiety

behavior, which was not influenced by the drug. Both imipramine treated and neonatal handled rats presented impaired habituation to the open field.

Conclusions: We concluded that Imipramine treatment: (1) reverses the increased basal sweet food consumption of handled rats, (2) restores the feeding behavior reactivity to the environment, (3) reduces weight gain, probably by changing energy balance, (4) had no effect on the plus maze test, and (5) leads to the same impairment of habituation in the open field found in neonatally handled animals. We discuss these results in terms of stress, mesolimbic monoaminergic reactivity and hedonic food consumption.

Key words: feeding behavior, neonatal handling, palatable food ingestion, imipramine, antidepressive, open field, plus maze, anxiety, body weight

INTRODUCTION

Perinatal events have been implicated in several neuroendocrine and behavioral alterations in adulthood. Several studies have documented the impact of early life events, like maternal separation and neonatal handling, on hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis function and on behavior (1, 2, 3, 4). The Central Nervous System (CNS) is very vulnerable in the neonatal period, when a hyporesponsive, immature and yet very plastic neural system can be permanently altered by different environmental challenges. During this period, an efficient maternal care is critical for the neonate to develop optimally (5, 6).

The HPA axis is the chief component activated in response to actual or presumed challenges. It is intimately linked to the monoaminergic system, as several of its dysfunctions also leads to alterations in the monoaminergic system. Examples of these alterations are the sensitization of the dopaminergic system (7, 8, 9, 10), and the dysregulation of the serotonergic system (12) induced by chronic stress. Both systems are involved in the etiopathogenesis of major psychoses and altered feeding behaviors (18, 19, 20, 21). Alterations of the HPA axis have also been reported to accompany certain psychiatric diseases, such as major depression (24) and feeding disorders (25).

Perinatal events are also related to similar alterations later in life (13, 14, 15). Neonatal handling is known to lead to permanent alterations in brain dopaminergic and serotonergic systems (16, 17). It has been related to decreased anxiety, reduced fear in a new environment (6, 22), and less

reactivity to stress, with lower HPA reactivity (1, 23). An increased number of type 2 glucocorticoid receptors in hippocampus and reduced Corticotrofin Releasing Hormone (CRH) in hypothalamus, locus ceruleus and median eminence are some of the neurochemical alterations found in these animals (3, 4).

Antidepressives are a heterogeneous group of drugs used for the treatment of depression, anxiety and feeding disorders. Their mechanisms of action have in common the modulation of neurochemical systems, including a hyperactive HPA axis (24), and a disturbed monoaminergic system (27). Imipramine is a reference tricyclic antidepressive, with primary actions in blocking the reuptake of Serotonin (5HT) and Noradrenalin (NA) (28), and, in a less extent, antihistaminergic (29) and anticholinergic effects (30). Chronic antidepressive treatment has regulatory effects on HPA axis, increasing the effectiveness of the negative feedback of cortisol (31). Chronic imipramine treatment reverses the reduction in palatable food consumption observed in rats exposed, during adulthood, to chronic mild stress, in a model of anhedonia (32), probably by increasing the functions of the dopaminergic system (33). Some of the success in the treatment of feeding disorders by antidepressives are credited to their ability in increasing the rewarding aspect of food, thus improving satiety (39, 40).

Previous studies from our group showed that neonatal handling alters feeding behavior. Neonatal handled rats present an increased preference for palatable foods (14), and this behavior is not related to anxiety, as it is not reversed by diazepam, nor is accompanied by anxiety like behavior (26). Feeding behavior is regulated by several homeostatic and hedonic factors.

The altered food preference of the neonatal handled rats is most probably due to hedonic factors, since there is no change in standard lab chow consumption (14). Changes in dopaminergic neurotransmission have been demonstrated in these animals (34), and the dopaminergic system is known to be involved in sensitivity to food reward (35). Since chronic use of imipramine can regulate the monoaminergic system and HPA axis, we hypothesized that imipramine could act restoring some of the alterations found in neonatal handled rats, such as their altered feeding behavior. Our secondary aim was to observe the effects of such treatment on behavioral tasks related to locomotion, anxiety, reactivity to stress, novelty and an enriched environment.

MATERIAL AND METHODS

Subjects:

Pregnant Wistar rats from our breeding stock were randomly selected and housed alone in home cages made of Plexiglas (65 x 25 x 15 cm), with the floor covered with sawdust, and maintained in a controlled environment (lights on between 07:00h and 19:00h, temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Within 24 h after birth, all litters were standardized to eight pups and they were maintained undisturbed, with minimal care until weaning – there was no sawdust exchange or any manipulations except for the handling procedure. Weaning occurred on postnatal day 22. No more than two male pups were used per litter per group. Rats were housed in groups of four to five per cage. A total of 78 (seventy eight) adult male rats were used. They had free access to food (standard lab rat chow) and water. Tasks were performed between 13:00h

and 16:00h h in proper rooms with the same controlled environmental conditions. Rats were first habituated to the room where the behavioral tasks were performed for at least 20 minutes. After being exposed to the behavioral tasks, animals were returned to their cages. When a group was exposed to more than one subsequent task, we respected a minimum of three days of resting. Drug treatment was not interrupted during the experiments. All animal treatments were in accordance with the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) and received ethical approval from the the Federal University of Rio Grande do Sul Ethical Committee.

Neonatal Handling procedure:

Non-handled group – Pups were left undisturbed with the dam until weaning.

Handling – Pups were removed from their home cage and placed in a clean cage lined with clean paper towels. This cage was placed in an incubator at 34.0 ± 2.0 °C. After 10 minutes, pups were returned to their dams. This procedure was performed during the first ten days of life, and the pups were then left undisturbed until weaning.

Chronic imipramine treatment:

The two groups mentioned above [non-handled (NH) and handled (H) groups] were subdivided into water and imipramine treated groups. Imipramine chloridrate was dissolved in drinking water in a concentration of 40 mg/L, using light protected bottles (36), allowing a final mean ingestion of 4.24 ± 0.25 mg/Kg in the NH group and 4.38 ± 0.11 mg/Kg in the H group

(Student's t test, $P=0.643$). The chronic treatment was initiated at 60 days of age, and behavioral tasks were applied at least 30 days later. Imipramine treatment was maintained during all the period the experiments took place.

Standard lab chow ingestion, water consumption and weight measurement

The standard lab chow and water consumption were measured during a period of six days, by leaving a determined amount of food in the cage and water in the bottle and checking the remainder each day. The average ingestion per day per cage was calculated. We used this approach to exclude the effect of acute social isolation stress. Body weight was measured in three different occasions, at 90 days of life (before the beginning of the behavioral tasks; $n=13-19$ /group), at 120 days of life ($n=13-19$ /group), and, in a sample of the animals in each group, at 150 days of life ($n=5-8$ /group).

Behavioral tasks:

Sweet food ingestion

Rats were tested as adults (ninety days old). The animals were placed in a lightened rectangular box (40 x 15 x 20 cm) with floor and side walls made of wood and a semi-transparent glass ceiling. Ten Froot loops (Kellogg's[®] - pellets of wheat and corn starch and sucrose) were placed in one extremity of the box. Each animal was submitted to five habituation trials of three minutes each, on subsequent days, under food restriction of 80% of habitual ingestion. After being habituated, animals were left with *ad libidun* food access for 24h, and were then put in the same apparatus for a 3 min test session, when the number of ingested pellets was counted (14, 26, 36). A

protocol was established so that when the animals ate part of the Froot loops (e.g.: 1/3 or 1/4), this fraction was considered. The counting was done always by the same person to exclude interobserver bias.

Stress-Induced Feeding Test

Rats were put in an adjustable plastic cylinder (25.0 x 7.0 cm), and restrained by adjusting the cylinder with plaster tape on the outside for a period of 1 h. After this period, they were left in individual home-cages for 10 minutes and then tested for palatable food consumption in the same way as described above.

Novelty- and enriched environment-induced feeding test

In the first day the animals were first presented to an empty glass aquarium measuring 25 x 55 x 26 cm, that contained three small toys of different shapes and colors. After a period of 5 minutes, the animals were removed to a neutral environment (an individual cage) for 10 minutes, when consumption of palatable food was evaluated. The consumption in this first day was used to evaluate the effect of novelty on ingestion. During three consecutive days, the same procedure was performed. The ingestion of sweet food after exposure to this enriched environment (when no novelty was present) was also evaluated.

Open field exposure

Open field consisted in an open wooden arena (53,5 x 35 cm) divided into twelve equal squares, measuring 12.5 x 12.5 cm. Forty-five cm high walls

bordered the field. The animals were gently placed facing the left corner and observed directly and continuously for 5 minutes. The following behavioral components were measured: horizontal locomotion (the number of line crossings), rearing (standing upright on the hind legs), and latency to leave the first square (in seconds). These measurements were made in two sequential days (training and test sessions). The difference in the values of crossings, rearings and latency between the test (Day2) and the training (Day1) trials was used as a measure of memory retention (habituation).

Elevated plus-maze test

The elevated plus maze apparatus was made of wood and consisted of two opposed open arms (50 X 10 cm), two opposed enclosed arms with no roof (50 X 10 X 40 cm), and an open square (10 X 10 cm) in the center. The maze was elevated 80 cm above the floor. The behavioral test was conducted in the observational room using red light illumination. The animal was placed into the center of the plus-maze, facing one of the open arms, and remained in the apparatus for five minutes. We analyzed the number of entries and the time spent on open and enclosed arms. A rat was considered to have entered one arm of the maze when all four feet were within the arm. During the 5-min test period, conventional parameters of anxiety-like behavior were monitored, i.e., the number of entries into the closed arms, entries into the open arms, and the total time spent in each arm. The ratio "time spent in the open arms/time spent in all (i.e., open and closed) arms" was calculated and multiplied by 100, to yield the percentage of time spent in open arms. This parameter is considered

to reflect fear-induced inhibition from entering the open arms and can be related to the "anxiety" level experienced by the animal.

Statistical analysis:

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean, and analyzed by a one or two-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test, or by repeated measures ANOVA (36). SPSS 8.0 statistical package software was used. Results were considered statistically significant if $p < 0.05$.

RESULTS

Body weight

Two-way ANOVA showed an effect of handling at 90 days of life (Two-way ANOVA; $n=11-16$ per group; $F_{(1, 54)} = 5.444$; $P = 0.023$ for handling; $F_{(1, 54)} = 0.098$; $P = 0.755$ for imipramine treatment; $F_{(1, 54)} = 0.105$; $P = 0.747$ for the interaction): H rats weighted less than NH. At 120 days of age, the effect of handling was still evident, and we also observed an effect of the chronic imipramine treatment, impairing the rate of weight gain in both H and NH groups (Two-way ANOVA; $11-16$ per group; $F_{(1, 54)} = 6.078$; $P = 0.017$ for handling; $F_{(3, 54)} = 4.099$; $P = 0.048$ for imipramine; $F_{(1, 54)} = 0.006$; $P = 0.938$ for the interaction). The same effects were still evident at 150 days (Two-way ANOVA; $n = 5-8$ per group; $F_{(1, 19)} = 4.690$; $P = 0.043$ for handling; $F_{(1, 19)} = 9.122$; $P = 0.007$ for imipramine treatment; $F_{(1, 19)} = 0.192$; $P = 0.666$ for the interaction) (Figure 1).

Fig. 1

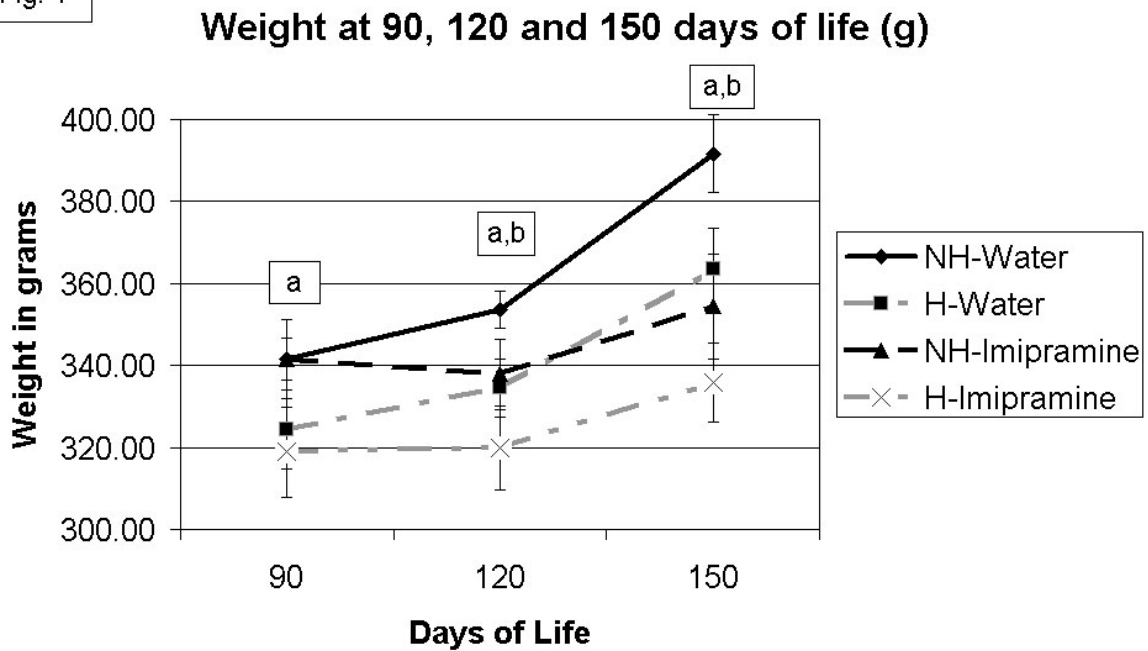


Figure 1: Body weight at 90, 120 and 150 days of life in animals submitted to neonatal handling and controls, and subjected or not to imipramine treatment when adults (data in grams, Mean \pm S.E.M.). (a) Statistical significant effect of handling in all ages measured. (b) Statistical significant effect of Imipramine treatment at 120 and 150 days of age (60 and 90 days of treatment). S.E.M. = Standard Error of the Mean. NH = Non Handled; H = Handled. (Y axis starts at 300g to better visualize the effects).

Standard lab chow ingestion and water consumption

As displayed in Table 1, there were no statistical differences between the groups in mean standard lab chow consumption (Two-way ANOVA; $n = 4-7$; $F_{(1, 16)} = 0.290$; $P = 0.598$ for handling; $F_{(1, 16)} = 0.006$; $P = 0.937$ for imipramine; $F_{(1, 16)} = 0.847$; $P = 0.371$ for the interaction). Adjusting for consumption according to weight did not change the significance of the results (data not show). There were no statistical differences between groups on water consumption (Two-way ANOVA; $n = 4-7$; $F_{(1, 16)} = 0.019$; $P = 0.892$ for handling; $F_{(1, 16)} = 0.007$; $P = 0.935$ for imipramine; $F_{(1, 16)} = 1.959$; $P = 0.181$ for the interaction).

Table 1:

Groups	Mean daily consumption of standard lab chow (g±S.E.M.)	Mean daily intake of water (mL±S.E.M.)
NH-Water	35.25 ±1.02 g	21.56 ±0.97 ml
H-Water	36.73 ±0.97 g	21.90 ±0.86 ml
NH-Imipramine	36.99 ±1.69 g	22.44 ±0.50 ml
H-Imipramine	35.18 ±0.87 g	21.16 ±0.61 ml

Table 1: Mean daily consumption of standard lab chow and mean daily intake of drinking water in the cage per rat, values in g per animal and mL per animal, respectively. There are no statistically significant differences (see text). S.E.M. = Standard Error of Mean. NH = Not Handled; H = Handled.

Behavioral tasks:

Sweet food ingestion

Animals handled during the neonatal period presented increased consumption of sweet food at three months of age (One-way ANOVA; $n = 16-21$; $F_{(3, 73)} = 2,768$; $P = 0.048$), post hoc analysis (Duncan) showed that, while handled animals ate more sweet food, the handled animals treated with imipramine presented no such effect (Figure 2).

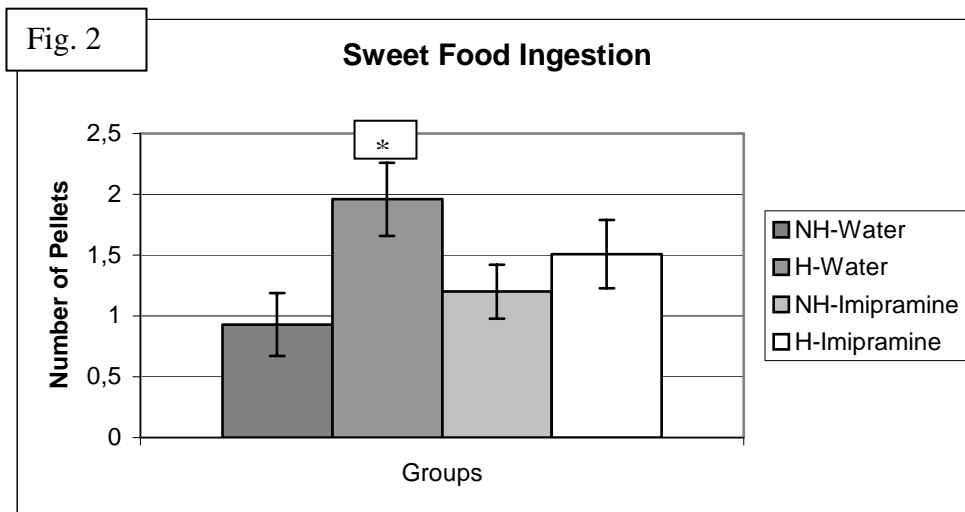


Figure 2: Basal sweet food ingestion (data in number of pellets, Mean \pm S.E.M.). (*) Statistical significant effect of handling only in rats not treated with Imipramine. NH = Non Handled; H = Handled.

Sweet food ingestion after acute restraint stress

Almost every group increased their intake from basal, but this effect was less evident in Handled rats, specially in the H-Water group (Repeated Measures ANOVA, $n=8$, $F_{(1,28)} = 8.475$, $P = 0.07$, overall, without significative interactions). (Figure 3a).

Sweet food ingestion after exposure to novelty and to an enriched environment

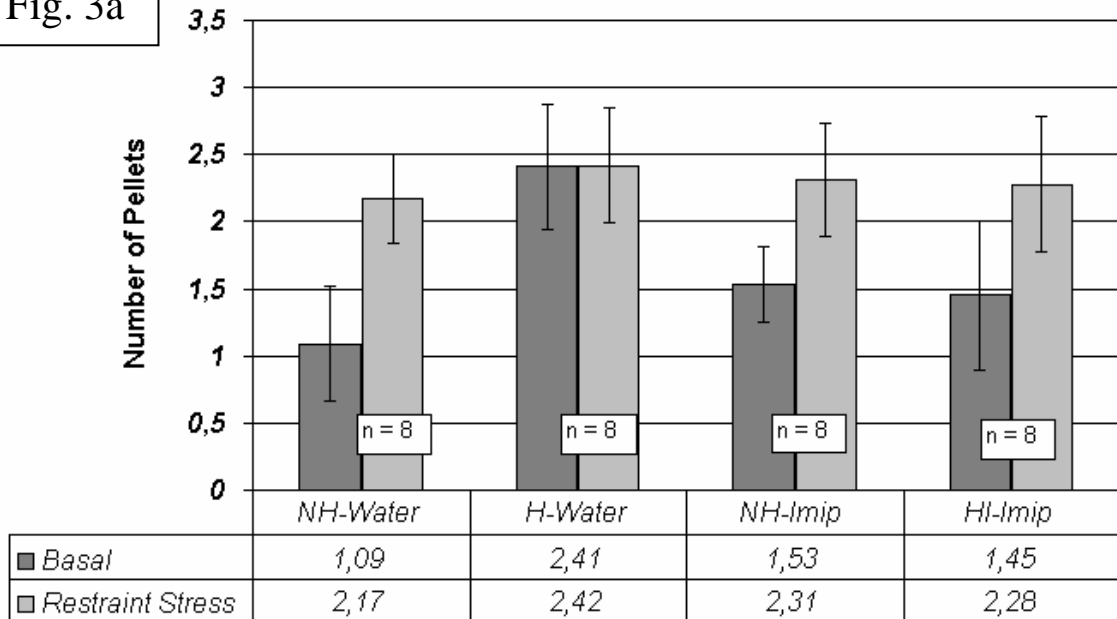
All groups presented increased sweet food intake after exposure to novelty, when compared to the basal consumption (Repeated Measures

ANOVA, Basal x Day1, n= 8-11 per group, $F_{(1,31)} = 28.129$, $P < 0.001$, overall, with significant interaction for handling x drug treatment $F_{(1,31)} = 4,797$, $P = 0.036$).

During the second and third days of exposure to this enriched environment, however, H-Water rats no more presented such increase in sweet consumption from basal levels (Repeated Measures ANOVA, Basal x Day2, n= 8-11 per group, $F_{(1,31)} = 21.096$, $P < 0.001$, overall, with significant interaction for drug treatment, $F_{(1,31)} = 4.115$, $P = 0.051$ and handling x drug treatment $F_{(1,31)} = 11.152$, $P = 0.002$; Basal x Day3: n= 8-11 per group, $F_{(1,31)} = 22.825$, $P < 0.001$, overall, with almost significant interaction for handling x drug treatment $F_{(1,31)} = 3.954$, $P = 0.056$). Spreading the analysis to all days, we saw the same result (Repeated Measures ANOVA, Basal x Day1 x Day2 X Day3, n= 8-11 per group, $F_{(1,31)} = 18.740$, $P < 0.001$, overall, with significant interaction for handling, $F_{(1,31)} = 4,415$, $P = 0.044$ and handling x drug treatment $F_{(1,31)} = 5,385$, $P = 0.027$). (Figure 3b).

Sweet Food Intake After Acute Restraint Stress

Fig. 3a



Sweet Food Consumption After Novelty and Enriched Environment

Fig. 3b

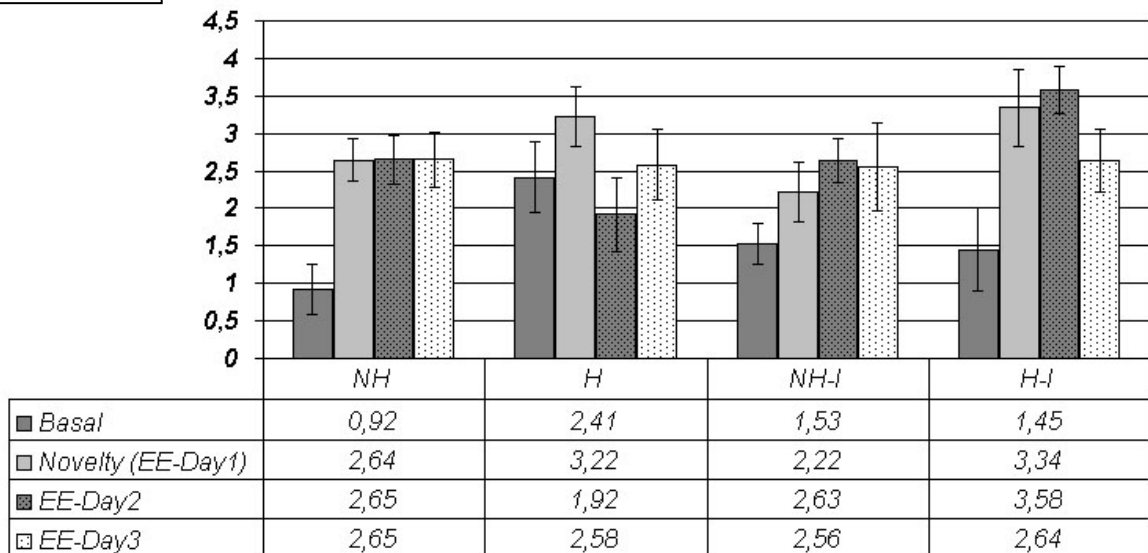


Figure 3: (a) Sweet food consumption after acute restraint stress. Only NH rats significantly increased their sweet food consumption, but H-imipramine rats showed a higher increase than H-Water rats. (b) Sweet food consumption after novelty and enriched environment expositions. H-Water rats increased their ingestion only after novelty. Data expressed as number of pellets consumed, Mean \pm S.E.M. NH = Non Handled; H = Handled.

Open Field Test

There were no differences in the number of crossings during the first or the second days, but we observed an overall effect of habituation (Repeated Measures ANOVA, $n = 11-16$ per group, $F_{(1,51)} = 14,400$, $P < 0.001$, with an almost significant interaction with handling x Imipramine, $F_{(1,51)} = 2,992$, $P = 0.090$ that seems to be due to the increased magnitude of the decrease in the number of crossings in the NH-water group).

Concerning rearings, in the first day (training session), we observed a decreased number of rearings in the handled groups, indicating an effect of the handling procedure (Two-way ANOVA, $n = 11-16$; $F_{(1,51)} = 4.810$; $P = 0.033$ for handling; $F_{(1,51)} = 1.843$; $P = 0.181$ for imipramine; $F_{(1,51)} = 1.034$; $P = 0.314$ for the interaction). In the test session, there was an interaction between handling and imipramine treatment, where NH-Imipramine rats still presented an increased number of rearings (Two-way ANOVA, $n = 11-16$; $F_{(1,51)} = 3.054$; $P = 0.087$ for handling; $F_{(1,51)} = 1.995$; $P = 0.164$ for imipramine; $F_{(1,51)} = 3.893$; $P = 0.05$ for the interaction, followed by post hoc (Duncan)). Repeated Measures ANOVA showed no effect of habituation ($F_{(1,51)} = 2.543$, $P = 0.117$).

Latency to leave the first square was not different between the groups, in both first and second days. We observed an overall effect of habituation (Repeated Measures ANOVA, $n = 11-16$ per group, $F_{(1,51)} = 4.632$, $P = 0.036$) (Table 2).

Table 2:

Open Field	Crossings		Rearings		Latency	
	Day1	Day2 [%]	Day1	Day2	Day1	Day2 [%]
NH – Water	57.82 ±5.88	31.18 ±5.71	7.18 ±1.92 [*]	4.27 ±1.77	3.26 ±0.44	1.50 ±0.19
H – Water	57.58 ±5.78	51.08 ±7.80	5.17 ±1.23	4.67 ±1.59	4.21 ±0.83	2.21 ±0.33
NH– Imipramine	50.06 ±5.47	42.94 ±6.21	11.25 ±1.92 [*]	10.19 ±2.16 [*]	3.06 ±0.94	2.72 ±0.44
H – Imipramine	56.38 ±8.07	46.56 ±7.00	5.75 ±1.46	3.69 ±1.08	4.44 ±0.86	3.18 ±1.41

Table 2: Open field results, values expressed as mean ±SEM.

[%] significant difference from D1, $p < 0.05$ (Repeated Measures ANOVA);

^{*} significant difference within the groups in the same day, with $p < 0.05$ (One Way ANOVA with post hoc when needed; Duncan);

Plus maze test

A two-way ANOVA showed an increased proportional time spent in the open arms in the H-Water and H-Imipramine groups ($n=11-16$ per group; $F_{(1, 51)} = 4.022$; $P = 0.050$ for handling; $F_{(1, 51)} = 0.104$; $P = 0.749$ for imipramine; $F_{(1, 51)} = 0.203$; $P = 0.654$ for the interaction). There were no statistical differences in the total number of entries and the number of entries in the open or closed arms between groups (Table 3).

Table 3:
Plus
Maze

	Time spent in open arms	Time spent in closed arms	% Time in open arms	Number of entries in open arms	Number of entries in closed arms	Total number of entries
NH – Water	122.91±7.34	170.45±7.63	41.92±2.52	6.64±0.70	5.73±0.60	12.36±1.16
H – Water	159.08±14.75*	130.50±14.95*	54.97±5.22*	8.08±0.68	6.67±0.89	14.75±1.13
NH – Imipramine	119.25±17.31	163.88±18.82	42.60±6.17	6.38±0.85	5.73±0.60	13.44±1.02
H – Imipramine	141.94±13.49*	138.44±14.52*	50.87±4.92*	6.69±0.79	6.19±0.52	12.88±0.81

Table 3: Performance in the elevated plus maze. Data expressed as Mean ± S.E.M. of the time and the percentage of time spent in the open arms, as well as the number of entries during 5 minutes exposure to the elevated plus maze. H-Water and H-Imipramine rats spent more time in the open arms. (*) p<0.05 -Two Way ANOVA.

Discussion

In this study, we demonstrated that imipramine reversed the effects of neonatal handling on feeding behavior in adulthood, reducing the increased basal consumption of sweet food and increasing their reaction to environmental challenges. We also observed an effect of the drug preventing the weight gain without altering the normal feeding (standard lab chow ingestion) in both groups.

Neonatal handling increased sweet food ingestion without alteration of lab chow ingestion, as reported earlier (14, 26). Therefore, it is believed that hedonic mechanisms are involved. We hypothesized that neonatally handled rats experience less pleasure when eating a palatable food, seeking to eat more to feel better. It is known, however, that imipramine can increase the reward value of reinforcers. When using this antidepressive, these animals presented the same feeding behavior as controls concerning ingestion of sweet food. It is possible that they acquire an increased perception of the rewarding value of the sweet food, and will eat and behave similarly to control rats.

Nevertheless, we cannot totally discard the possibility of a “ceiling effect”, impairing the sweet food test ability to present an increased consumption in those animals with a high basal intake, although previous studies from our laboratory showed that rats can frequently eat more than that (11).

Stress alters feeding behavior in several ways. Such modulation of the appetite involves the release of stress hormones, like CRH and glucocorticoids, concomitantly with the activation of the dopaminergic and

opioid mesocorticolimbic systems (43). Considering behavioral alterations observed in rats submitted to handling in the neonatal period, Lucion and coworkers (55) have suggested that this procedure could affect the interpretation the animal makes of different environment stimuli. Since handled animals respond in a lesser extend to an environmental challenge, presenting a decreased stress response (1, 23), this could explain the decreased response to stressors on sweet food ingestion in this group. Imipramine-treated neonatally handled rats increased their ingestion in relation to handled-water group in response to stressors, maybe due to a different response to stress in these animals, which could be closer to the response presented by control rats. Possibly, neonatally handled imipramine-treated rats respond more efficiently to the external stimulus and this is reflected in the sweet food consumption. Alternatively, we could explain this effect as an increased sensitivity of the dopaminergic mesolimbic system, as imipramine effectively upregulate this system (40).

Depending on stress nature, intensity and duration, it can either increase, as it has been reported after chronic restraint and after acute tail pinch stress (11, 43), or decrease feeding, like in psychological and restraint stress (41, 42). Our results are in contrast with this last study, as our rats increased their consumption after restraint stress. This probably is due to methodological issues, especially regarding the time chose to evaluate consumption, as we measured the intake of sweet food in a period of 3 minutes beginning just 10 min from the end of restraint.

Another interesting result was the weight difference at 90 days of life, were H rats presented a higher body weight than NH ones. This observation

does not agree with some previous results, when differences between the groups were not significant (14, 39, 44). Another interesting result was the reduced weight gain in the imipramine treated rats after 30 days of treatment. This effect coincides with the onset of the antidepressive effect of the drug, and could be due to an alteration in the metabolic efficiency of the organism, since there were no differences in the standard lab chow consumption. There are evidences that antidepressive treatment increases thermogenesis in the resting state and in reaction to glucose ingestion (45, 46). Another possible explanation would be a diminished reaction to stress, leading to chronically lower levels of glucocorticoids, and, consequently, less deposition of abdominal fat (47); nevertheless, it should be noted that handled rats, which also present decreased glucocorticoids levels, have more deposition of intraperitoneal fat (38).

Not all effects of neonatal handling were reversed by imipramine treatment. Although sweet food consumption and the feeding behavior in response to stress in handled animals treated with imipramine are similar to control animals, the performance in the plus maze was not affected by this drug, suggesting that the reduced anxiety levels observed in the adulthood in neonatal handled rats is not affected by imipramine. This dissociation of results further suggests that the effects of handling during the neonatal period on sweet food ingestion are not related to a different anxiety level, which agrees with a previous study (48).

Additionally, results from the exposure to the open field suggest that both treatments, handling and chronic imipramine, impaired habituation in this task. Reports concerning memory in animals handled during the neonatal period

shows that handling is protective to the deleterious effects of aging (49), mild stressors (50) and neonatal hypoxia-ischemia (51) on spatial memory. However, it is important to consider that handled animals could present different levels of emotional reactivity interfering with memory. It has been shown that the stress level induced by exposure to the behavioral task used to evaluate memory may lead to different results in memory retention (54). Memory is known to require some level of activation of stress hormones in order to present adequate storage (52, 53). Here again, since handling reduces the stress response (49), this could be involved in the impaired effect observed in this group on habituation.

In conclusion, we believe that handled rats present a resistance to change their behavior in response to environmental stimuli, as we have observed in the exposure to the open field and in the consumption of sweet food in response to external stimuli (restraint, changes in the environment). Imipramine was able to reverse this pattern of behavior only regarding feeding. These findings contribute to the study of neonatal interventions and the posterior behavior alterations, and emphasize the necessity for additional studies on the effects of neonatal interventions, particularly in relation to eating disorders and drug addiction, and the possible reversion of such findings with pharmacological treatment.

REFERENCES

- 1) Durand M, Sarrieau A, Aguerre S, Mormede P, Chaouloff F. Differential Effects Of Neonatal Handling On Anxiety, Corticosterone Response To Stress, And Hippocampal Glucocorticoid And Serotonin (5-Ht)2a Receptors In Lewis Rats Psychoneuroendocrinology, Vol. 23, No. 4, pp. 323–335, 1998
- 2) Plotsky, P. M.; Meaney M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotrophin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress induced release in adult rats. Mol. Br. Res. 18: 185-200; 1992.
- 3) Liu, D.; Diorio, J.; Tannenbaum, B.; Caldji, C.; Francis, D.; Freedman, A.; Sharma, S.; Pearson, D.; Plotsky, P. M.; Meaney, M. J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary- adrenal responses to stress. Science. 277: 1659-1662; 1996.
- 4) Parfitt DB, Levin JK, Saltstein KP, Klayman AS, Greer LM, Helmreich DL. Differential early rearing environments can accentuate or attenuate the responses to stress in male C57BL/6 mice. Brain Res.1016(1):111-8; 2004.
- 5) Levine, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: The influence of maternal factors. Ann. NY Acad. Sci. 746: 275-289; 1994
- 6) Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(9):5335-40,1998.

- 7) Wunderlich GR, Rotzinger S, Bush DE, DeSousa NJ, Vaccarino FJ. Cholecystokinin modulation of locomotor behavior in rats is sensitized by chronic amphetamine and chronic restraint stress exposure. *Brain Res.* 1001(1-2):95-107; 2004.
- 8) Nikulina EM, Covington HE 3rd, Ganschow L, Hammer RP Jr, Miczek KA. Long-term behavioral and neuronal cross-sensitization to amphetamine induced by repeated brief social defeat stress: Fos in the ventral tegmental area and amygdala. *Neuroscience.* 123(4):857-65; 2004.
- 9) Araujo AP, DeLucia R, Scavone C, Planeta CS. Repeated predictable or unpredictable stress: effects on cocaine-induced locomotion and cyclic AMP-dependent protein kinase activity. *Behav Brain Res.* 139(1-2):75-81; 2003.
- 10) Flugge G, Van Kampen M, Mijster MJ. Perturbations in brain monoamine systems during stress. *Cell Tissue Res.* 315(1):1-14; 2004.
- 11) Ely, D. R.; Dapper, V.; Marasca, J.; Corrêa, J. B.; Gamaro, G. D.; Xavier, M. H.; Michalovski, M. B.; Catelli, D.; Rosat, R.; Ferreira, M. B. C.; Dalmaz, C. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol. Behav.* 61: 395-398; 1997.
- 12) Holmes MC, French KL, Seckl JR. Dysregulation of diurnal rhythms of serotonin 5-HT_{2C} and corticosteroid receptor gene expression in the hippocampus with food restriction and glucocorticoids. *J Neurosci.* 17(11):4056-65; 1997.
- 13) Iwasaki, S.; Inoue, K.; Kiriike, N.; Hikiji, K. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. *Physiol. Behav.* 70: 551-556; 2000.

- 14) Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Bassani E, Tabajara AS, Gamaro GD, Dantas G, Torres IL, Lucion AB, Dalmaz C. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol Behav.* 80(5):739-45; 2004.
- 15) Sanchez MM, Noble PM, Lyon CK, Plotsky PM, Davis M, Nemeroff CB, Winslow JT. Alterations in diurnal cortisol rhythm and acoustic startle response in nonhuman primates with adverse rearing. *Biol Psychiatry.* 57(4):373-81; 2005.
- 16) Papaioannou A, Dafni U, Alikaridis F, Bolaris S, Stylianopoulou F. Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain. *Neuroscience.* 114(1):195-206; 2002.
- 17) Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ, Gratton A. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci.* 19(7):1863-74; 2004.
- 18) Dikeos DG, Papadimitriou GN, Avramopoulos D, Karadima G, Daskalopoulou EG, Souery D, Mendlewicz J, Vassilopoulos D, Stefanis CN. Association between the dopamine D3 receptor gene locus (DRD3) and unipolar affective disorder. *Psychiatr Genet.* 9(4):189-95; 1999.
- 19) Steiger H, Israel M, Gauvin L, Ng Ying Kin NM, Young SN. Implications of compulsive and impulsive traits for serotonin status in women with bulimia nervosa. *Psychiatry Res.* 120(3):219-29; 2003.
- 20) Kuikka JT, Tammela L, Karhunen L, Rissanen A, Bergstrom KA, Naukkarinen H, Vanninen E, Karhu J, Lappalainen R, Repo-Tiihonen E, Tiihonen J, Uusitupa M. Reduced serotonin transporter binding in binge eating women. *Psychopharmacology (Berl).* 155(3):310-4; 2001.

- 21) Dailly E, Chenu F, Renard CE, Bourin M. Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam Clin Pharmacol.* 18(6):601-7; 2004.
- 22) Severino GS, Fossati IA, Padoin MJ, Gomes CM, Trevizan L, Sanvitto GL, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Lucion AB. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of females. *Physiol Behav.* 81(3):489-98; 2004.
- 23) Ader, R.; Grotta, L. J. Effects of early experience on adenocortical reactivity. *Physiol. Behav.* 4: 303-305; 1969.
- 24) Heit, S.; Owens, M. J.; Plotsky, P.; Nemeroff, C. B. Corticotrophin-release factor, stress and depression. *Neuroscientist.* 3: 186-194; 1997.
- 25) Putignano P, Dubini A, Toja P, Invitti C, Bonfanti S, Redaelli G, Zappulli D, Cavagnini F. Salivary cortisol measurement in normal-weight, obese and anorexic women: comparison with plasma cortisol. *Eur J Endocrinol.* 145(2):165-71; 2001.
- 26) Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci.* 23(1):93-9; 2005.
- 27) Morilak DA, Frazer A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 7(2):193-218; 2004.
- 28) Briley M, Moret C. Neurobiological mechanisms involved in antidepressant therapies. *Clin Neuropharmacol.* 16(5):387-400; 1993.

- 29) Ookuma K, Sakata T, Fujimoto K. Evidence for feeding elicited through antihistaminergic effects of tricyclic antidepressants in the rat hypothalamus. *Psychopharmacology (Berl)*. 101(4):481-5; 1990.
- 30) Gumilar F, Arias HR, Spitzmaul G, Bouzat C. Molecular mechanisms of inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by tricyclic antidepressants. *Neuropharmacology*. 45(7):964-76; 2003.
- 31) Yau JL, Noble J, Hibberd C, Rowe WB, Meaney MJ, Morris RG, Seckl JR. Chronic treatment with the antidepressant amitriptyline prevents impairments in water maze learning in aging rats. *J Neurosci*. 22(4):1436-42; 2002.
- 32) Monleon S, D'Aquila P, Parra A, Simon VM, Brain PF, Willner P. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology (Berl)*. 117(4):453-7; 1995.
- 33) Papp M, Klimek V, Willner P. Parallel changes in dopamine D2 receptor binding in limbic forebrain associated with chronic mild stress-induced anhedonia and its reversal by imipramine. *Psychopharmacology (Berl)*. 115(4):441-6; 1994.
- 34) Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ, Gratton A. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci*. 19(7):1863-74; 2004.
- 35) Davis C, Strachan S, Berkson M. Sensitivity to reward: implications for overeating and overweight. *Appetite*. 42(2):131-8; 2004.
- 36) Gamaro GD, Prediger ME, Lopes JB, Dalmaz C. Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacol Biochem Behav*. 76(2):327-33; 2003.

- 36) Stephan M, Helfritz F, Pabst R, von Horsten S. Postnatally induced differences in adult pain sensitivity depend on genetics, gender and specific experiences: reversal of maternal deprivation effects by additional postnatal tactile stimulation or chronic imipramine treatment. *Behav Brain Res.* 133(2):149-58; 2002.
- 37) Downe, N. M.; Heath, R. W. *Basic statistical methods.* New York: Harper & Row; 1970: 234-276
- 38) Young JB. Effects of neonatal handling on sympathoadrenal activity and body composition in adult male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279(5):R1745-52; 2000.
- 39) Heal DJ, Aspley S, Prow MR, Jackson HC, Martin KF, Cheetham SC. Sibutramine: a novel anti-obesity drug. A review of the pharmacological evidence to differentiate it from d-amphetamine and d-fenfluramine. *Int J Obes Relat Metab Disord. Suppl 1:S18-28; discussion S29; 1998.*
- 40) Papp M. Differential effects of short-and long-term antidepressant treatments on the food-induced place preference conditioning in rats. *Behav Pharmacol.* 1(1):69-74; 1989.
- 41) Sekino A, Ohata H, Mano-Otagiri A, Arai K, Shibasaki T. Both corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 are involved in stress-induced inhibition of food intake in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 176(1):30-8. Epub 2004 Apr 8; 2004.
- 42) Hotta M, Shibasaki T, Arai K, Demura H. Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates emotional stress-induced inhibition of food intake and behavioral changes in rats. *Brain Res.* 823(1-2):221-5; 1999.

- 43) Samarghandian S, Ohata H, Yamauchi N, Shibasaki T. Corticotropin-releasing factor as well as opioid and dopamine are involved in tail-pinch-induced food intake of rats. *Neuroscience*. 116(2):519-24; 2003.
- 44) Panagiotaropoulos T, Papaioannou A, Pondiki S, Prokopiou A, Stylianopoulou F, Gerozissis K. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology*. 79(2):109-18; 2004.
- 45) Kudoh A, Takase H, Takazawa T. Chronic treatment with antidepressants decreases intraoperative core hypothermia. *Anesth Analg*. 97(1):275-9; 2003.
- 46) Bondi M, Menozzi R, Bertolini M, Venneri MG, Del Rio G. Metabolic effects of fluoxetine in obese menopausal women. *J Endocrinol Invest*. 23(5):280-6; 2000.
- 47) Rosmond R, Bjorntorp P. The role of antidepressants in the treatment of abdominal obesity. *Med Hypotheses*. 54(6):990-4; 2000.
- 48) Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci*. 23(1):93-9; 2005.
- 49) Meaney MJ, Aitken DH, van Berkel C, Bhatnagar S, Sapolsky RM. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science*. 239(4841 Pt 1):766-8; 1988.
- 50) Garoflos E, Panagiotaropoulos T, Pondiki S, Stamatakis A, Philippidis E, Stylianopoulou F. Cellular mechanisms underlying the effects of an early experience on cognitive abilities and affective states. *Ann Gen Psychiatry*. 4(1):8; 2005.

- 51) Chou IC, Trakht T, Signori C, Smith J, Felt BT, Vazquez DM, Barks JD. Behavioral/environmental intervention improves learning after cerebral hypoxia-ischemia in rats. *Stroke*. 32(9):2192-7; 2001.
- 52) Izquierdo I, da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol*. 58(1):16-26; 1992.
- 53) Roozendaal B, Nguyen BT, Power AE, McGaugh JL. Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(20):11642-7; 1999.
- 54) Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(3):853-8. 2004.
- 55) Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HM, Lucion AB. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci*. 115(6):1332-40; 2001.

VIII Resultados Adicionais

1. Dose de Imipramina - Fêmeas

A dose média de imipramina em fêmeas ficou cerca de 20% maior do que em machos (ANOVA de Duas Vias; $n = 4-6$ caixas por grupo ; $F_{(1, 9)} = 0,15$; $P = 0,5$ para manipulação; $F_{(1, 9)} = 14,132$; $P = 0,009$ para gênero; $F_{(1, 9)} = 1,627$; $P = 0,249$ para interação), devido ao fato de as fêmeas consumirem mais água por kg de peso corporal, e a concentração da solução de imipramina ser a mesma para ambos os sexos. Em função desse resultado, os demais resultados serão analisados separadamente, para machos e fêmeas (veja a Figura 2 para a dose de imipramina nas fêmeas).

Figura 2:

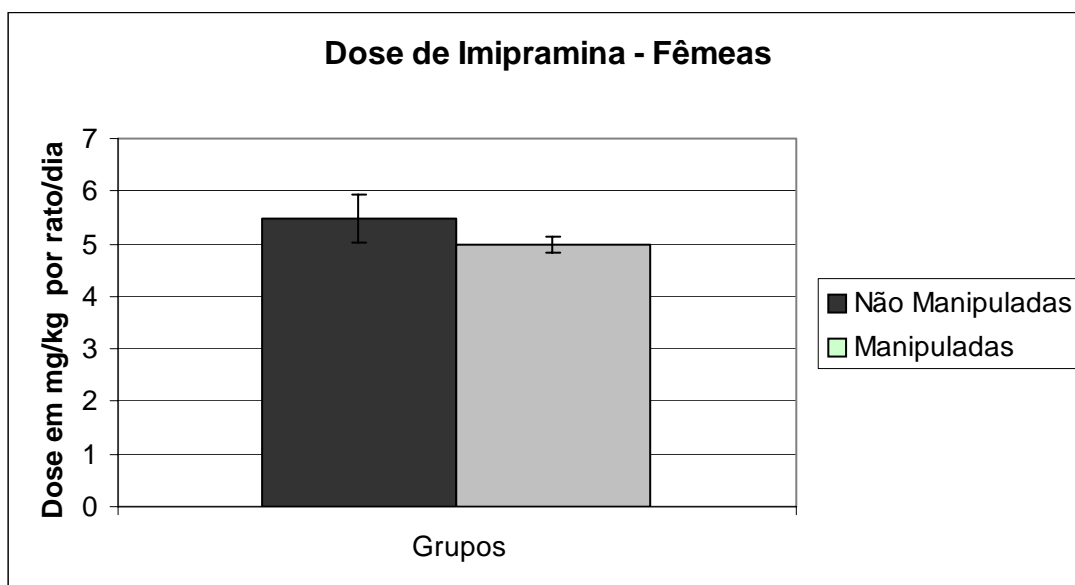


Figura 2: Dose de imipramina (mg/kg) para ratas fêmeas manipuladas ou não manipuladas) no período neonatal. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste t de Student, $t = 1,065$; $P = 0,399$).

2. Efeito do tratamento crônico com Imipramina em ratas fêmeas submetidas ou não à manipulação neonatal, sobre o peso corporal, consumo de ração padrão e de água.

2.1 Peso aos 90 e 120 dias

Não houve diferença entre os pesos das fêmeas, quando comparados os diferentes grupos (Figura 3; ANOVA de Duas Vias para 90 dias; $n = 12-17$ por grupo; $F_{(3, 56)} = 1,926$; $P = 0,171$ para manipulação; $F_{(3, 56)} = 0,183$; $P = 0,671$ para imipramina; $F_{(3, 56)} = 0,326$; $P = 0,570$ para interação). O tratamento com imipramina não influenciou o ganho de peso (ANOVA de Medidas Repetidas; $n = 12-17$ por grupo; $F_{(1, 53)} = 0,64$, $P=0,427$ para tempo; $F_{(1, 53)} = 0,19$; $P = 0,662$ para manipulação; $F_{(1, 53)} = 0,33$; $P = 0,568$ para imipramina; $F_{(1, 53)} = 1,04$, $P = 0,313$ para interação).

Figura 3:

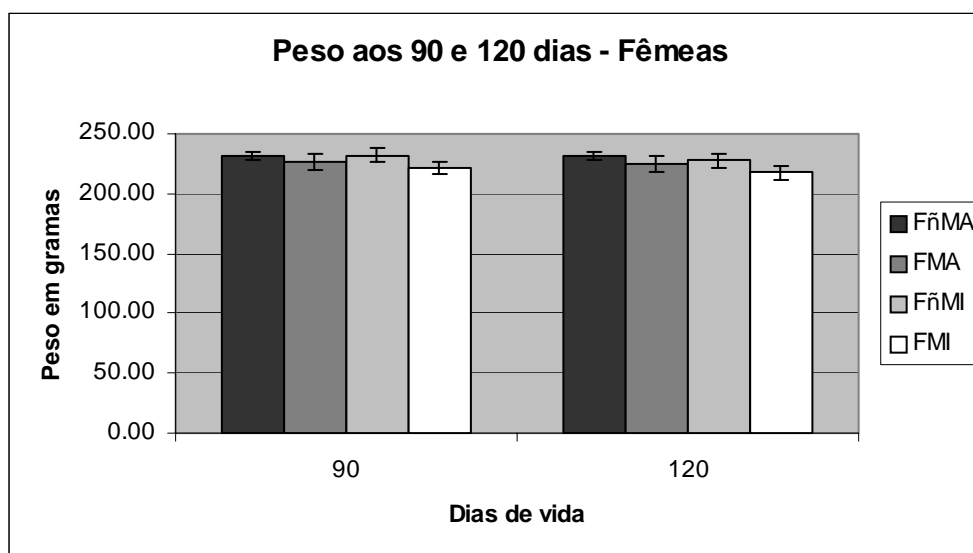


Figura 3: Efeito da manipulação no período neonatal sobre o peso de ratas fêmeas aos 90 e 120 dias de vida, tratadas ou não com imipramina na idade adulta. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (FñMA: Fêmeas Não manipuladas - Água; FMA: Fêmeas Manipuladas - Água; FñMI: Fêmeas Não manipuladas - Imipramina; FMI: Fêmeas Manipuladas - Imipramina).

2.2 Consumo de Ração Padrão

Observamos um efeito do tratamento crônico com imipramina sobre o consumo de ração padrão em fêmeas, sem efeito da manipulação neonatal (ANOVA de Duas Vias; $n = 5$ caixas por grupo; $F_{(1, 12)} = 0,282$; $P = 0,605$ para manipulação; $F_{(1, 12)} = 5,343$; $P = 0,039$ para imipramina; $F_{(1, 12)} = 0,007$; $P = 0,934$ para interação) (Figura 4).

Figura 4:

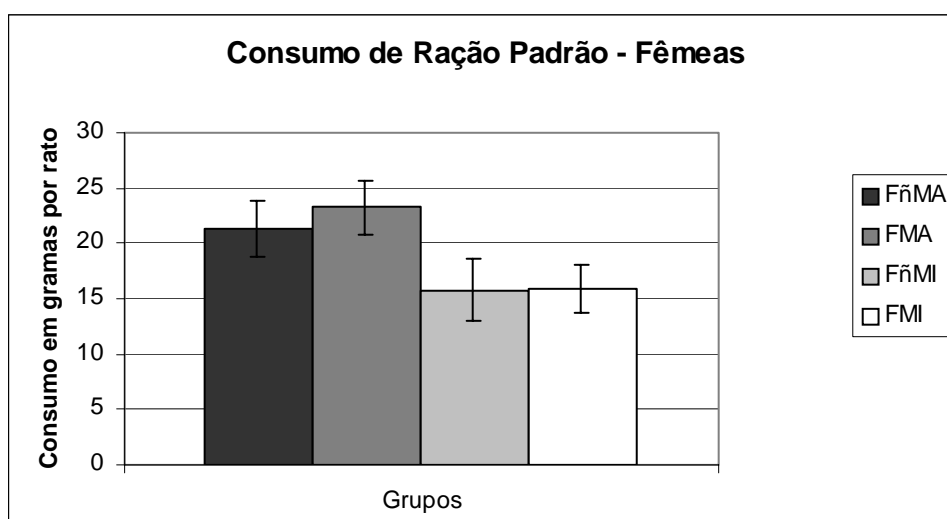


Figura 4: Efeito da manipulação no período neonatal sobre o consumo de ração padrão em ratas fêmeas tratadas ou não com imipramina na idade adulta. Houve uma redução na ingestão, causada pelo tratamento com imipramina (ANOVA de duas vias, $P < 0,05$ para imipramina). (FñMA: Fêmeas Não manipuladas - Água; FMA: Fêmeas Manipuladas - Água; FñMI: Fêmeas Não manipuladas - Imipramina; FMI: Fêmeas Manipuladas - Imipramina).

2.3 Consumo de água

O consumo de água não foi diferente entre os grupos (ANOVA de Duas Vias; $n=3-4$ caixas por grupo; $F_{(1, 13)} = 3,921$; $P = 0,076$ para manipulação; $F_{(1, 13)} = 1,383$; $P = 0,267$ para imipramina; $F_{(1, 13)} = 2,864$; $P = 0,121$ para interação), conforme mostrado na Figura 5.

Figura 5:

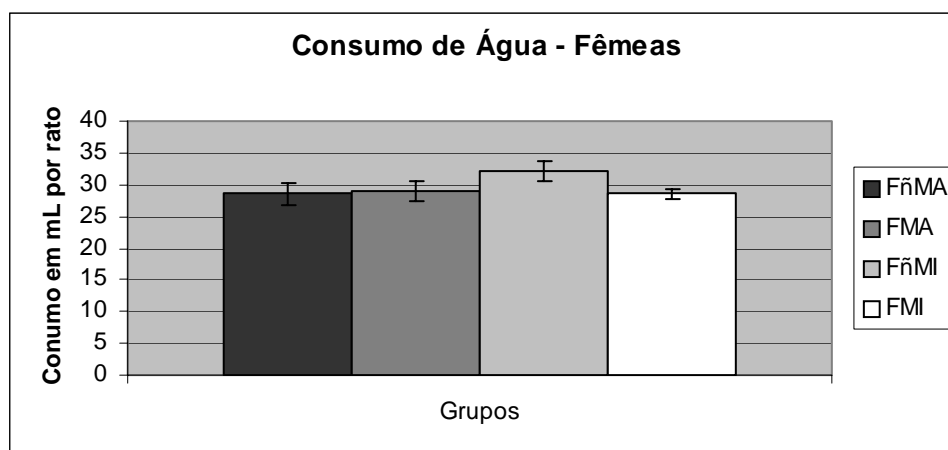


Figura 5: Efeito da manipulação no período neonatal sobre o consumo de água em ratas fêmeas tratadas ou não com imipramina na idade adulta. Não houve diferença entre os grupos. (FñMA: Fêmeas Não manipuladas - Água; FMA: Fêmeas Manipuladas - Água; FñMI: Fêmeas Não manipuladas - Imipramina; FMI: Fêmeas Manipuladas - Imipramina).

3. Efeito do tratamento crônico com imipramina em ratas fêmeas submetidas ou não à manipulação neonatal, sobre o consumo de alimento palatável doce, basal e em resposta a diferentes estímulos.

3.1 Consumo de alimento doce no estado basal

Não houve diferença no consumo de alimento palatável doce (ANOVA de Duas Vias; $n = 17-21$ por grupo; $F_{(1,74)} = 0,281$; $P = 0,598$ para manipulação; $F_{(1,74)} = 0,709$; $P = 0,402$ para imipramina; $F_{(1,74)} = 0,752$; $P = 0,389$ para interação) (Figura 6).

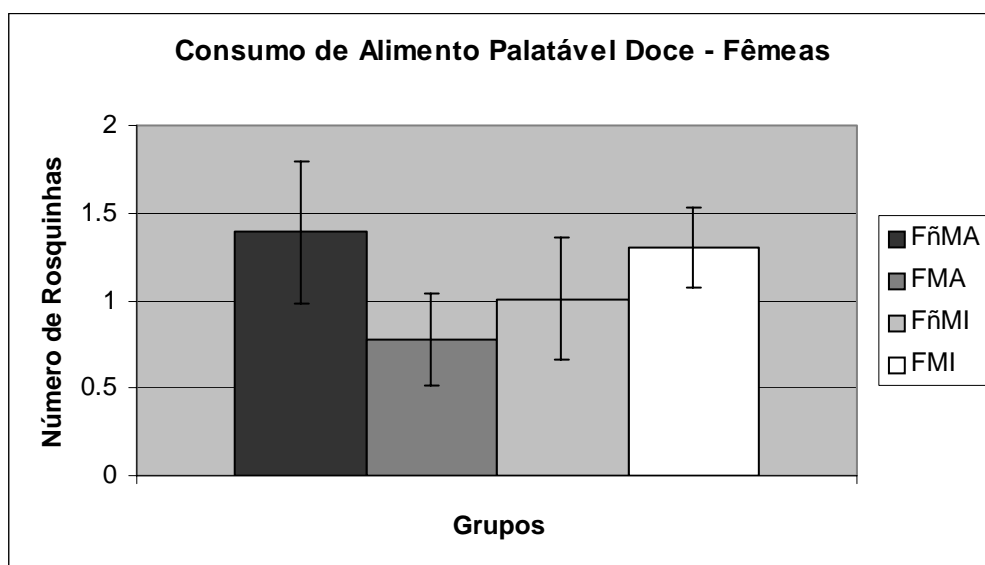


Figura 6: Efeito da manipulação no período neonatal sobre o consumo de alimento palatável doce em ratas fêmeas tratadas ou não com imipramina na idade adulta. Não houve diferença entre os grupos. (FñMA: Fêmeas Não manipuladas - Água; FMA: Fêmeas Manipuladas - Água; FñMI: Fêmeas Não manipuladas - Imipramina; FMI: Fêmeas Manipuladas - Imipramina).

3.2 Consumo de alimento doce após estresse de contenção

Todos os grupos responderam ao estresse de contenção com aumento do consumo (ANOVA de medidas repetidas $F_{(1,34)} = 24,167$; $P < 0,001$), sem interação com imipramina ($F_{(1,34)} = 0,375$; $P = 0,544$), manipulação ($F_{(1,34)} = 3,128$; $P = 0,086$) ou imipramina e manipulação ($F_{(1,34)} = 0,290$; $P = 0,594$).

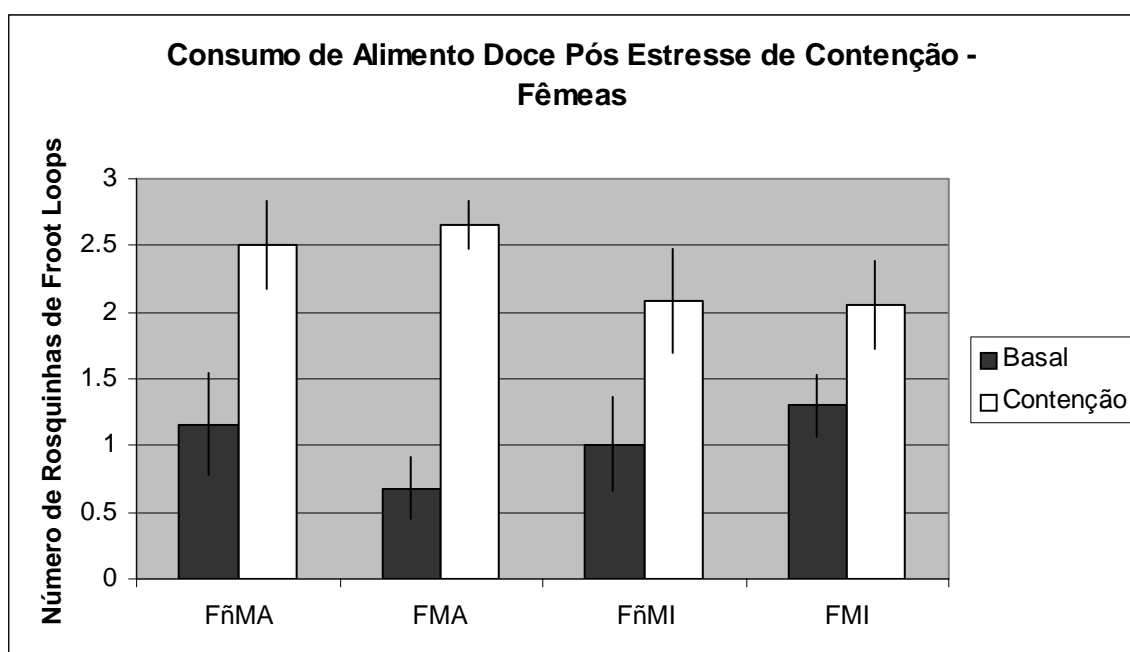


Figura 7: Efeito da manipulação no período neonatal sobre o consumo de alimento palatável doce em resposta ao estresse de contenção em ratas fêmeas tratadas ou não com imipramina na idade adulta. Anova de medidas repetidas mostrou efeito do estresse de contenção em aumentar o consumo em todos os grupos ($p < 0,001$). (FñMA: Fêmeas Não manipuladas - Água; FMA: Fêmeas Manipuladas - Água; FñMI: Fêmeas Não manipuladas - Imipramina; FMI: Fêmeas Manipuladas - Imipramina).

3.3 Consumo de alimento doce após exposição à novidade e ao ambiente enriquecido.

3.3.1 Efeito da Novidade

Todos os grupos responderam à exposição ao ambiente novo com aumento do consumo em relação ao basal, porém o efeito é atenuado pelo uso da imipramina (ANOVA de medidas repetidas, basal x novidade, interação com Imipramina, $F_{(1,34)}=6,59$; $P = 0,015$, sem interação com manipulação, $F_{(1,34)}=1,95$; $P = 0,172$) ou entre imipramina e manipulação, $F_{(1,34)} = 0,61$; $P = 0,440$).

3.3.2 Efeito exposição continuada ao ambiente enriquecido

O resultado é o mesmo na ausência de novidade, quando os animais são expostos a este ambiente enriquecido, ou seja, todos aumentaram o consumo em relação ao basal, mas as ratas tratadas com imipramina tiveram atenuação do efeito (ANOVA de medidas repetidas, basal x novidade x dia 2 x $F_{(1,34)}=52,317$; $P < 0,001$, $F_{(3,96)}=32,10$; $P < 0,001$; interação com imipramina, $F_{(3,96)} = 4,52$; $P = 0,005$, sem interação com manipulação, $F_{(3,96)}=1,22$; $P = 0,306$) sem interação entre imipramina e manipulação, $F_{(3,96)} = 0,36$; $P = 0,781$). Veja a Figura 8.

Figura 8:

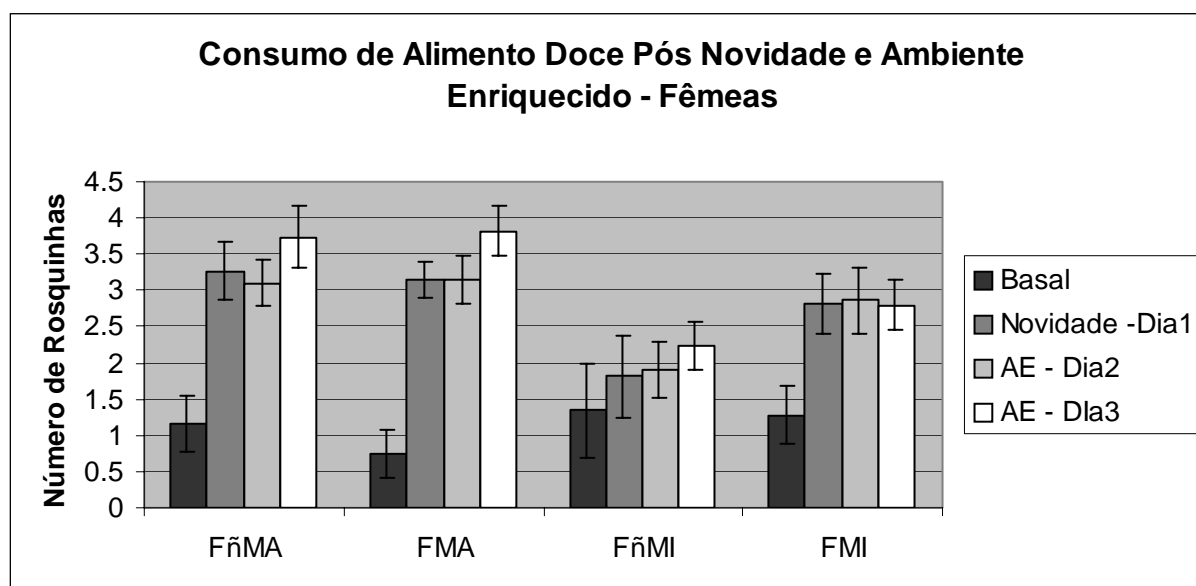


Figura 8: Efeito da manipulação no período neonatal sobre o consumo de alimento palatável doce em resposta à novidade e ao ambiente enriquecido em ratas fêmeas tratadas ou não com imipramina na idade adulta. ANOVA de medidas repetidas mostrou aumento do consumo em todos os grupos, tanto para novidade quanto para ambiente enriquecido, $p < 0,001$, com atenuação do efeito nas ratas tratadas com imipramina (interação $p < 0,05$). (FñMA: Fêmeas Não manipuladas - Água; FMA: Fêmeas Manipuladas - Água; FñMI: Fêmeas Não manipuladas - Imipramina; FMI: Fêmeas Manipuladas - Imipramina; AE: Ambiente Enriquecido).

4. Efeito do tratamento crônico com imipramina em ratas fêmeas, submetidas ou não à manipulação neonatal, sobre o desempenho na tarefas de labirinto em cruz elevado e campo aberto.

4.1 Labirinto em cruz elevado

Na variável de tempo nos braços abertos houve interação manipulação x imipramina (ANOVA de Duas Vias; $n = 12-16$ por grupo ; $F_{(1, 55)} = 0,416$; $P = 0,522$ para manipulação; $F_{(1, 55)} = 2,012$; $P = 0,162$ para imipramina; $F_{(1, 55)} = 6,042$; $P = 0,017$ para interação), análise *post-hoc* (Duncan) mostrou efeito da imipramina em aumentar o tempo no braço aberto apenas nas fêmeas não manipuladas. Considerando-se a porcentagem de tempo despendida nos braços abertos, o resultado é semelhante (ANOVA de Duas Vias; $n = 12-16$ por grupo; $F_{(3, 55)} = 0,195$; $P = 0,660$ para manipulação; $F_{(3, 55)} = 2,130$; $P = 0,150$ para imipramina; $F_{(3, 55)} = 5,993$; $P = 0,018$ para interação).

No número de entradas nos braços abertos também houve interação manipulação x tratamento (ANOVA de Duas Vias; $n = 12-16$ por grupo; $F_{(1, 55)} = 1,874$; $P = 0,177$ para manipulação; $F_{(1, 55)} = 0,026$; $P = 0,873$ para imipramina; $F_{(1, 55)} = 9,218$; $P = 0,004$ para interação); análise *post-hoc* (Duncan) mostrou efeito da droga em aumentar o número de entradas no aberto apenas nas fêmeas não manipuladas.

Não houve diferenças no número de entradas nos braços fechados (ANOVA de Duas Vias; $n = 12-16$ por grupo; $F_{(1, 55)} = 0,536$; $P = 0,467$ para manipulação; $F_{(1, 55)} = 0,763$; $P = 0,386$ para imipramina; $F_{(1, 55)} = 0,001$; $P = 0,975$ para interação). Veja a tabela 2.

Tabela 2:

Labirinto em Cruz Elevado	Tempo nos Braços Abertos	Tempo nos Braços Fechados	% Tempo nos Braços Abertos	Número de Entradas nos Braços Abertos	Número de Entradas nos Braços Fechados
FÑMA	118,25±14,57	172,00±14,47	40,72±4,95	8,00±1,04	8,42±0,92
FMA	141,40±11,62	143,73±11,62	49,58±4,04	9,47±0,84	8,93±0,78
FÑMI	167,75±11,12*	123,81±12,96*	57,99±4,13*	10,81±1,05*	7,75±0,61
FMI	128,13±13,61	153,81±14,28	45,21±4,50	6,94±0,51	8,31±0,66

Tabela2: Efeito da manipulação no período neonatal sobre o comportamento na tarefa do Labirinto em Cruz Elevado em ratas fêmeas tratadas ou não com imipramina na idade adulta. Anova de duas vias mostrou menor inibição da exploração dos braços abertos nas fêmeas não manipuladas tratadas com imipramina, $p < 0,05$. (FÑMA: Fêmeas Não manipuladas - Água; FMA: Fêmeas Manipuladas - Água; FÑMI: Fêmeas Não manipuladas - Imipramina; FMI: Fêmeas Manipuladas - Imipramina).

* $p < 0,05$ - ANOVA de 1 ou 2 vias, seguida de *post hoc* – Duncan.

4.2 Campo aberto

4.2.1 Número de cruzamentos horizontais

Houve habituação para esta tarefa, representada por uma diferença no comportamento entre as seções [ANOVA de medidas repetidas $F_{(1,54)} = 4,121$; $P = 0,047$), sem interação com imipramina ($F_{(1,54)} = 2,593$; $P=0,113$), ou entre imipramina e manipulação ($F_{(1,54)} = 0,001$; $P = 0,982$), porém houve quase efeito da manipulação ($F_{(1,54)} = 3,843$; $P = 0,055$).

A ANOVA de duas vias no Dia 2 mostra maior número de cruzamentos nos grupos manipulados, sem efeito da imipramina (ANOVA de Duas Vias; $n = 12-16$ por grupo; $F_{(1,52)} = 8,475$; $P = 0,005$ para manipulação; $F_{(1,52)} = 0,025$; $P = 0,875$ para imipramina; $F_{(1,52)} = 1,132$; $P = 0,292$ para interação).

4.2.2 Número de respostas de orientação vertical ("Rearings")

Houve habituação, representada pela diferença de comportamento entre as duas sessões, sem interação entre sessão e imipramina ou manipulação [ANOVA de medidas repetidas $F_{(1,55)}=6,131$; $P=0,016$), sem interação com imipramina ($F_{(1,55)} = 0,50$; $P = 0,824$), manipulação ($F_{(1,55)} = 0,139$; $P=0,711$), ou imipramina e manipulação ($F_{(1,55)} = 0,208$; $P = 0,650$).

4.2.3 Latência para deixar o primeiro retângulo

Houve habituação, representada pela diferença de comportamento entre as duas sessões, sem interação com imipramina ou manipulação [ANOVA de medidas repetidas, $F = 6,13$; $P = 0,016$), sem interação com

imipramina ($F = 0,05$; $P = 0,824$), manipulação ($F = 0,14$; $P = 0,711$), ou imipramina e manipulação ($F = 0,21$; $P = 0,650$]. No entanto apenas as ratas manipuladas ficam no segundo dia com uma latência menor (ANOVA de Duas Vias; $n = 12-16$ por grupo; $F_{(3, 52)} = 5,122$; $P = 0,028$ para manipulação; $F_{(3, 52)} = 0,252$; $P = 0,618$ para imipramina; $F_{(3, 52)} = 0,180$; $P = 0,673$ para interação). Veja a tabela 3).

Tabela 3:

Campo Aberto	Cruzamentos		"Rearings"		Latência	
	Dia1	Dia2 ^{\$}	Dia1	Dia2 ^{\$}	Dia1	Dia2 ^{\$}
FÑMA	77,55 ±6,73	52,00 ±7,53	14,92 ±3,15	9,67 ±3,00	3,81 ±0,85	2,38 ±0,36
FMA	92,80 ±6,35	86,33 ±7,44*	18,33 ±2,90	13,40 ±2,90	2,81±0, 39	1,33 ±0,21*
FÑMI	72,69 ±5,32	63,56 ±7,28	17,94 ±3,10	15,25 ±3,94	2,61±0, 39	2,84 ±0,78
FMI	73,56 ±6,77	79,50 ±7,98*	16,25 ±4,51	10,44 ±2,34	3,59±0, 73	1,61 ±0,17*

Tabela 3: Efeito da manipulação no período neonatal sobre o comportamento na tarefa de campo aberto em ratas fêmeas tratadas ou não com imipramina na idade adulta. Anova de Medidas Repetidas mostra um efeito geral de habituação em todas as variáveis, $p < 0,05$, porém ela é mais evidente no grupo não manipulado água. (FÑMA: Fêmeas Não manipuladas - Água; FMA: Fêmeas Manipuladas - Água; FÑMI: Fêmeas Não manipuladas - Imipramina; FMI: Fêmeas Manipuladas - Imipramina).

\$ - Dia1 difere do Dia2 – ANOVA de medidas repetidas, $p < 0,05$.

- - Diferença entre os grupos no mesmo dia - ANOVA de Duas Vias, $p < 0,05$.

5. Efeito do tratamento crônico com imipramina em ratos fêmeas e machos, submetidos ou não à manipulação neonatal, sobre o desempenho na tarefa de preferência condicionada de lugar (PCL).

5.1. Fêmeas

5.1.1 Tempo no compartimento claro

Houve habituação entre as seções [ANOVA de medidas repetidas $F_{(1,54)} = 35,374$ $P < 0,001$, sem interação entre sessão e imipramina ($F_{(1,54)} = 0,342$; $P = 0,561$), manipulação ($F_{(1,54)} = 2,555$; $P = 0,116$) ou entre imipramina e manipulação ($F_{(1,54)} = 1,852$; $P = 0,179$)].

A ANOVA de duas vias no dia 1 e no dia 8 mostra que as ratas tratadas com imipramina passam menos tempo no lado claro (Dia 1; $n = 12-16$ por grupo; $F_{(3, 54)} = 0,479$; $P = 0,492$ para manipulação; $F_{(3, 54)} = 4,192$; $P = 0,045$ para imipramina; $F_{(3, 54)} = 0,251$; $P = 0,618$ para interação / Dia8 : $n = 12-16$ por grupo; $F_{(3, 54)} = 0,908$; $P = 0,345$ para manipulação; $F_{(3, 54)} = 5,495$; $P = 0,023$ para imipramina; $F_{(3, 54)} = 0,788$; $P = 0,379$ para interação).

5.1.2 Cruzamentos

Houve diferença entre as seções [ANOVA de medidas repetidas $F_{(1,54)} = 30,886$; $P < 0,001$, sem interação com imipramina ($F_{(1,54)} = 0,481$; $P = 0,491$), manipulação ($F_{(1,54)} = 0,028$; $P = 0,869$) ou imipramina e manipulação ($F_{(1,54)} = 0,004$; $P = 0,947$)]. Veja a Tabela 4.

Tabela 4

PCL	Tempo no Claro		Cruzamentos	
	Dia1	Dia8 [§]	Dia1	Dia8 [§]
FÑMA	279,50±38,48	333,00±29,80	19,50±1,92	24,42±2,41
FMA	249,60±25,79	389,73±44,75	20,73±1,98	25,20±1,64
FÑMI	211,38±21,64*	288,13±19,05*	17,38±1,79	23,50±1,47
FMI	206,27±22,40*	290,13±22,87*	19,60±1,17	25,53±1,59

Tabela 4: Efeito da manipulação no período neonatal sobre o comportamento na tarefa da Preferência Condicionada de Lugar em ratas fêmeas tratadas ou não com imipramina na idade adulta. Anova de Medidas Repetidas mostra um efeito geral de alteração de preferência em todos os grupos, $p < 0,05$. Ratas tratadas com imipramina ficam menos tempo no lado claro, tanto no dia 1 quanto no dia 2 (Anova de duas vias). (FÑMA: Fêmeas Não manipuladas - Água; FMA: Fêmeas Manipuladas - Água; FÑMI: Fêmeas Não manipuladas - Imipramina; FMI: Fêmeas Manipuladas - Imipramina).

§ - Dia 1 difere de Dia 8 – ANOVA de medidas repetidas, $p < 0,05$.

* - Diferente dos grupos não tratados com imipramina no mesmo dia) - ANOVA de Duas Vias, $p < 0,05$.

5.2 Machos

5.2.1 Tempo no Claro

Houve habituação entre as seções [ANOVA de medidas repetidas, $F_{(1,51)} = 76,107$; $P < 0,001$, sem interação entre sessão e imipramina ($F_{(1,51)} = 2,566$; $P = 0,115$), manipulação ($F_{(1,51)} = 0,150$; $P = 0,700$) ou imipramina e manipulação ($F_{(1,51)} = 0,319$; $P = 0,575$)].

A ANOVA de duas vias no Dia 1 e no Dia 8 mostra que não há diferença entre os grupos (Dia 1: $n = 12-16$ por grupo; $F_{(1, 51)} = 0,032$; $P = 0,859$ para manipulação; $F_{(1, 54)} = 2,056$; $P = 0,158$ para imipramina; $F_{(1, 51)} = 0,367$; $P = 0,547$ para interação / Dia 8: $n = 12-16$ por grupo; $F_{(1, 51)} = 0,093$; $P = 0,762$ para manipulação; $F_{(1, 51)} = 0,727$; $P = 0,398$ para imipramina; $F_{(1, 51)} = 0,907$; $P = 0,345$ para interação).

5.2.2 Cruzamentos

Houve diferença entre as seções [ANOVA de medidas repetidas, $F_{(1,51)} = 87,958$; $P < 0,001$, sem interação entre sessão e imipramina ($F_{(1,51)} = 0,637$; $P = 0,428$), manipulação ($F_{(1,51)} = 0,775$; $P = 0,383$) ou imipramina e manipulação ($F_{(1,51)} = 1,571$; $P = 0,216$)].

A ANOVA de duas vias no Dia 1 e no Dia 8 mostra que também não há diferença entre os grupos (Dia 1; $n = 12-16$ por grupo; $F_{(1, 51)} = 0,783$; $P = 0,380$ para manipulação; $F_{(1, 54)} = 3,474$; $P = 0,068$ para imipramina; $F_{(1, 51)} = 2,420$; $P = 0,126$ para interação / Dia 8: $n = 12-16$ por grupo; $F_{(1, 51)} = 3,145$; $P = 0,082$ para manipulação; $F_{(1, 51)} = 1,967$; $P = 0,167$ para imipramina; $F_{(1, 51)} = 0,428$; $P = 0,516$ para interação). Veja a Tabela 5.

Tabela 5

PCL	Tempo no Claro		Cruzamentos	
	Dia1	Dia8 [§]	Dia1	Dia8 [§]
MÑMA	153,00±22,90	299,36±43,30	12,73±1,32	19,55±1,43
MMA	171,33±26,83	325,17±35,22	17,50±2,83	23,75±2,46
MÑMI	133,63±18,52	371,31±43,46	12,13±1,70	18,25±1,63
MMI	123,63±23,99	321,19±32,89	10,81±1,67	20,19±1,26

Tabela 5: Efeito da manipulação no período neonatal sobre o comportamento na tarefa da Preferência Condicionada de Lugar em ratos machos tratadas ou não com imipramina na idade adulta. Anova de Medidas Repetidas mostra um efeito geral de alteração de preferência em todos os grupos, $p < 0,05$. (MÑMA: Machos Não manipulados - Água; MMA: Machos Manipulados - Água; MÑMI: Machos Não manipulados - Imipramina; MMI: Machos Manipulados - Imipramina).

§ - Dia 1 difere do Dia 8 – ANOVA de medidas repetidas, $p < 0,05$.

IX Discussão

1. Consumo de alimento palatável: medidas basais e em resposta a diferentes intervenções

A manipulação neonatal aumentou o consumo de alimento doce apenas em machos, mas não em fêmeas. Essa diferença entre sexos pode ter ocorrido devido a fatores hormonais relacionados ao ciclo estral, que não foi controlado neste estudo. De fato há evidências de que os efeitos do estresse neonatal apresentam dimorfismo sexual (Panagiotaropoulos et al., 2004; Park et al., 2003). É importante, porém, ressaltarmos que, em nossa experiência, em alguns trabalhos as fêmeas manipuladas apresentam efeitos semelhantes aos observados para os machos no que se refere ao comportamento alimentar (Silveira et al., 2004 e 2005).

O estrógeno tem efeitos conhecidos sobre o consumo alimentar, aumentando o consumo de alimento doce (Gamaro et al., 2003; Boswell et al., 2005), além de sensibilizar o funcionamento do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, intimamente ligado ao consumo de alimentos palatáveis, propensão a droga-adição e relacionado com a resposta ao estresse (Smith et al., 2004; Hu et al., 2004).

O tratamento com imipramina teve efeito de atenuar o maior consumo de alimento doce em ratos machos manipulados no período neonatal, no estado alimentado e sem a influência de fatores ambientais (estressantes e / ou agradáveis).

Em resposta ao estresse de contenção, observamos aqui que os machos manipulados, especialmente aqueles não tratados com imipramina, não aumentaram o consumo da mesma forma que os animais não manipulados, após terem sido expostos a esse tipo de estressor. Novamente, o tratamento com imipramina parece alterar o comportamento alimentar de machos manipulados, ainda que não significativamente. No entanto, uma ressalva a ser feita é sobre a possibilidade de um possível efeito teto ter impossibilitado o aumento de consumo nos machos manipulados recebendo água. Apesar de considerarmos essa possibilidade, temos observado, nas mesmas condições experimentais, em nosso laboratório, que é comum ratos apresentarem consumo maior que o observado aqui, seja no estado de jejum ou alimentado (Ely et al., 1997). Além disso, os machos manipulados tratados com imipramina, após serem expostos à novidade, mostraram ser possível um consumo maior. As fêmeas reagiram uniformemente ao estresse de contenção com aumento do consumo.

No teste de exposição à novidade, todos os animais apresentaram aumento do consumo de alimento palatável, porém nota-se um efeito da imipramina em diminuir a resposta de aumento do consumo alimentar nas fêmeas, principalmente as não manipuladas. Na exposição continuada ao ambiente enriquecido, apenas os machos manipulados, que receberam água, voltaram a ter um consumo igual ao basal. A imipramina, neste caso, quando administrada a machos manipulados, novamente torna o comportamento desses animais mais parecido com o de ratos não manipulados.

A exposição à novidade pode ser considerada como estresse leve, portanto gerando um resultado semelhante ao estresse de contenção agudo,

porém aqui fica mais evidente uma recuperação da reatividade ao ambiente, pelos machos manipulados tratados com imipramina. Esses resultados sugerem que a alteração do comportamento alimentar, relacionada a alimentos palatáveis doces, encontrada em ratos machos foi, em grande parte, revertida pela utilização crônica do antidepressivo imipramina.

O consumo alimentar em resposta ao estresse envolve a participação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no hipotálamo, que em níveis baixos a moderados, correspondentes a estresse leve a moderado, leva ao aumento do consumo alimentar, e também da concomitante liberação de dopamina e opióides endógenos no sistema mesocorticolímbico (Samarghandian et al., 2003). Esses resultados permitem supor que a resposta alimentar a um estressor moderado e leve, impingido ao animal de forma aguda, está preservada em todos os grupos, sendo menos evidente nos machos manipulados e nas fêmeas, sejam não manipuladas ou manipuladas, tratadas com imipramina. Esse caso é favorável ao fato já conhecido de que a reatividade ao estresse agudo está preservada nos ratos machos manipulados, com igual ou maior elevação inicial dos níveis de CRH, ACTH e cortisol, porém com mais rápido retorno aos níveis basais, gerando uma menor exposição total aos hormônios de reação ao estresse (Levine, 2000; Liu et al., 1997 e 2000; Panagiotaropoulos et al., 2004), semelhante ao que ocorre com o uso crônico de imipramina em humanos sadios (Michelson et al., 1997). Ao que se sabe, tanto o tratamento crônico com antidepressivo, quanto a manipulação neonatal levam a níveis basais de CRH menores, não alteram a resposta ao estresse agudo, mas tornam os animais mais resistentes ao estresse crônico (Butterweck et al., 2001).

Os resultados em fêmeas notoriamente demonstram um dimorfismo sexual importante no que tange ao comportamento em estudo. Observamos uma falta de efeito da manipulação em fêmeas, que se comportam como não manipuladas, sugerindo que possuem uma maior reatividade à novidade, fato que concorda com o resultado do estudo de Park e colaboradores, onde a manipulação neonatal levou a uma maior reatividade ao estresse em fêmeas (Park et al., 2003). A reversão pelo uso do antidepressivo, evidente no teste da novidade, corrobora esta hipótese.

Resta esclarecer o porquê dessa reversão do comportamento alimentar em machos manipulados, uma vez que já possuem o eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal menos reativo (Plotsky PM, Meaney MJ 1992, Francis et al 1999). Neste caso, a imipramina poderia atuar alterando apenas os sistemas monoaminérgicos, em especial as vias dopaminérgicas, tornando-as mais reativas, ou sensibilizadas. O estresse crônico é capaz de gerar anedonia em ratos, e essa anedonia, caracterizada por um menor consumo de alimentos doces, está associada a um menor número de receptores D2 no sistema mesolímbico. A imipramina, em tratamento crônico, restaura o consumo de alimento doce nesses ratos, e essa restauração também está associada a uma recuperação no número de receptores D2. No entanto, em animais não estressados, a imipramina reduz o receptores D1, tanto no sistema mesolímbico quanto estriatal (Papp et al., 1994).

Van der Elst, estudando linhagens de ratos Wistar selecionadas conforme a reatividade a apomorfina (agonista D1/D2), mostrou que ratos hiper-responsivos à apomorfina, que também são mais responsivos ao estresse, apresentam maior e mais duradoura liberação de dopamina no

Núcleo Acumbens em resposta à novidade (van der Elst et al., 2005). Sabe-se também que esse mesmo tipo de animal, em condições basais, ingere menos álcool, comparado a animais hipo-responsivos à apomorfina (Sluyter et al., 2000), porém em resposta a um desafio estressor consomem mais álcool que os hiper-responsivos (Van der Kam et al., 2005). Resultados semelhantes aos encontrados aqui, onde em geral os ratos com maior reatividade ao estresse apresentam menor consumo de alimento doce em condições basais, porém possuem maior aumento de consumo quando desafiados. Possivelmente, o sistema mesocorticolímbico, que é o responsável pela intermediação de comportamentos relacionado a prazer e recompensa, esteja alterado nestes animais. Evidências disso são os achados recentes de que há redução nos receptores D3 de Dopamina no núcleo acumbens em ratos machos manipulados (Brake, 2004).

2. Labirinto em cruz elevado, campo aberto e preferência condicionada de lugar

Ratos machos manipulados passam mais tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, não tendo diferenças significativas no número de entradas, nos braços abertos e fechados. Este resultado mostra que a manipulação neonatal resultou em uma menor inibição do comportamento exploratório nestes ratos frente à exposição a um ambiente ansiogênico. Este resultado concorda com estudos prévios de nosso e de outros laboratórios (Silveira et al., 2005; Padoin et al., 2001, Kalinichev et al. 2002). Não houve efeito da imipramina nestas variáveis estudadas em machos. No caso dos ratos não manipulados, a ausência de efeito ansiolítico pode ser pela baixa dose utilizada, em torno de 4,3 mg/kg/dia. Ainda, de acordo com a literatura, já não se encontrou efeito ansiolítico da imipramina no labirinto em cruz elevado, mesmo em doses maiores, de até 10 mg/kg (Griebel et al., 1997). Nas fêmeas, na variável de tempo proporcional nos braços abertos, houve interação entre manipulação e tratamento, onde se nota que o tratamento com imipramina teve efeito de aumentar o tempo nos braços abertos apenas em ratas não manipuladas. O número de entradas nos braços abertos também foi maior nesse grupo. Juntos, estes dados nos permitem sugerir que a imipramina teve efeito de reduzir a ansiedade apenas em fêmeas não manipuladas, sugerindo uma maior sensibilidade ao tratamento com este fármaco para a resposta ansiolítica em fêmeas não manipuladas. A ausência de efeito da droga em fêmeas manipuladas talvez se deva a alterações

bioquímicas / fisiológicas destes animais, que estejam levando a uma maior resistência à ação da droga.

No campo aberto, nota-se uma maior resposta locomotora das fêmeas manipuladas, e também uma menor latência no segundo dia, sugerindo também menor ansiedade e/ou uma maior atividade locomotora. No entanto, o principal resultado, pela magnitude e consistência do achado entre os grupos, é a menor habituação, tanto dos animais manipulados, fato já constatado na literatura (Silveira et al 2005), mas também em animais tratados com imipramina.

Uma possível explicação para essa menor habituação seria a de que haveria um menor estímulo para a formação de memória pela menor reatividade ao estresse desses animais, pois nesses encontra-se uma menor reatividade à novidade com menor liberação de glicocorticoides e dopamina, que são necessários para a consolidação de memória (Mele et al., 2004, Ferretti et al., 2005). Também se sabe que a imipramina dificulta a formação de memória não associativa através do “*downregulation*” de receptores 5TH2A e ações anticolinérgicas (Mogensen et al., 2003).

No teste de preferência condicionada de lugar houve igual alteração de preferência dos animais, sem interação com sexo, intervenção neonatal ou tratamento com imipramina, mostrando que os mecanismos de formação de associação e recompensa estão preservados nestes animais. Sabe-se que a integridade do sistema dopaminérgico é essencial para a realização desta tarefa, porém o teste é pouco sensível para detecção de alterações mais leves (Papp, 1989).

3. Ganho de peso e consumo alimentar de ração padrão

Um resultado chamativo foi a diferença de peso aos 90 dias de vida dos ratos machos, porém uma limitação do estudo foi o fato de não se ter uma medida de peso anterior, o que nos dificulta afirmar que este achado se deva ao procedimento de manipulação neonatal. Além do mais, estudos prévios de nosso laboratório não encontraram tal diferença, e na revisão da literatura há estudos que mostram que os ratos manipulados pesam mais que os controles não manipulados (Panagiotaropoulos et al., 2004; Young, 2000), porém em porcos a manipulação neonatal também levou a uma diminuição de peso (Weaver et al., 2000).

Também se encontrou uma redução da velocidade de ganho de peso dos ratos machos tratados cronicamente com imipramina a partir dos 90 dias de vida. Tomando este dado junto com o fato de que não houve diferença no consumo de ração padrão, pode-se supor que o tratamento com imipramina, de alguma forma, possa ter alterado o metabolismo energético e ganho de peso nesses animais. De fato, na literatura encontram-se evidências de que antidepressivos aumentam a termogênese em repouso e em resposta à ingestão de glicose (Kudoh et al., 2003; Bondi et al., 2000). Outra possível explicação para isso seria uma menor reatividade ao estresse induzida pelo tratamento com imipramina, com menores concentrações de glicocorticóides cronicamente, levando a uma menor deposição de gordura (Rosmond e Bjorntorp, 2000).

Ao contrário dos machos, as fêmeas não apresentaram diferenças no peso. No entanto, as ratas tratadas com imipramina apresentaram um menor consumo alimentar de ração padrão. Esse dado favorece a hipótese de

alteração do metabolismo energético proposta para os machos, sendo que nas fêmeas, possivelmente por não haver uma propensão para o crescimento nas idades avaliadas, o efeito se manifeste por uma redução do consumo alimentar, por um mecanismo de auto-regulação da ingestão de alimentos.

X. Conclusões

Assim sendo, considerando os resultados obtidos e discutidos acima, chegamos às seguintes conclusões:

1) Confirmando estudos prévios, animais machos manipulados no período neonatal ingerem mais alimento doce em condições sem estresse, apresentam comportamento menos ansioso no Labirinto em Cruz Elevado e menor habituação no Campo Aberto.

2) Machos e fêmeas responderam de maneira diversa à manipulação neonatal, no que se refere ao comportamento alimentar.

3) Animais machos manipulados no período neonatal apresentam menor modulação do consumo de alimento doce em resposta a estressores ambientais.

4) Tratamento crônico com imipramina reverte os efeitos induzidos pela manipulação neonatal sobre o comportamento alimentar de ratos machos.

5) Tratamento crônico com imipramina reduz o efeito da novidade e da estimulação ambiental em fêmeas.

6) Tratamento crônico com imipramina altera o ganho de peso, sem reduzir o consumo de ração padrão em animais machos, e reduz o consumo de ração padrão sem alterar o ganho de peso em fêmeas.

Perguntas que ficam (Perspectivas)

1. Porque fêmeas manipuladas são diferentes dos machos manipulados?

Possíveis hipóteses seriam a interação com hormônios femininos, fatores genéticos, sensibilização das vias dopaminérgicas pelo estrógeno e um efeito diferente da manipulação neonatal (Panagiotaropoulos et al., 2004; Park et al., 2003; Gamaro et al., 2003; Boswell et al., 2005).

2. Porque machos manipulados comem mais doce em condições sem estresse?

Seria pelo fato de serem hipo-reatores ao estresse e à dopamina?

3. Quais as conseqüências metabólicas a longo prazo do maior consumo de alimentos palatáveis em condições de pouco estresse?

Provavelmente dependeria do meio. Se o ambiente for pouco estressante e a oferta abundante na maior parte do tempo, a tendência seria a de se ingerir mais alimentos ricos em açúcares, com conseqüências metabólicas de indução de arteriosclerose, Hipertensão Arterial Sistêmica e Síndrome Metabólica (Liu et al., 2001, Jeppesen et al., 1997, Coutinho et al., 1999). No entanto, em ambiente mais adverso, provavelmente os animais não manipulados teriam mais problemas metabólicos, pois reagiriam mais, pelo menos igualando a preferência por alimentos palatáveis, e ao mesmo tempo estariam expostos a maior quantidade de glicocorticóides, uma combinação

metabolicamente mais danosa para o organismo. São possibilidades que podem ser testadas futuramente.

XI. Referências

Ader, R.; Grotta, L. J. Effects of early experience on adrencortical reactivity. *Physiol. Behav.* 4: 303-305; 1969.

Bacaltchuk J, Hay P. Antidepressants versus placebo for people with bulimia nervosa. *Cochrane Database Syst Rev.* (4):CD003391; 2003.

Barden N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. *J Psychiatry Neurosci.* 29(3):185-93; 2004.

Beaufour CC, Le Bihan C, Hamon M, Thiebot M. Extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during reward, punishment and novelty-associated behaviour. Effects of diazepam. *Pharmacol Biochem Behav.* 69(1-2):133-42; 2001.

Bliss CL; *Statistics in Biology and Medicine.* New York, McGraw Hill. P.247-57; 1967.

Bondi M, Menozzi R, Bertolini M, Venneri MG, Del Rio G. Metabolic effects of fluoxetine in obese menopausal women. *J Endocrinol Invest.* 23(5):280-6; 2000.

Boswell KJ, Reid ML, Fitch JV, Bennett SM, Narciso SP, Hubbell CL, Reid LD. Estradiol valerate and intake of sweetened water. *Pharmacol Biochem Behav.* 80(1):1-7; 2005.

Brady LS, Whitfield HJ Jr, Fox RJ, Gold PW, Herkenham M. Long-term antidepressant administration alters corticotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase, and mineralocorticoid receptor gene expression in rat brain. Therapeutic implications. *J Clin Invest.* 87(3):831-7; 1991.

Briley M, Moret C. Neurobiological mechanisms involved in antidepressant therapies. *Clin Neuropharmacol.* 16(5):387-400; 1993.

Buckingham JC (eds: Fink G) (2000) "Glucocorticoids: Role in stress" *The Encyclopaedia of Stress* pp. 261-279 Academic Press, New York.

Butterweck V, Winterhoff H, Herkenham M. St John's wort, hypericin, and imipramine: a comparative analysis of mRNA levels in brain areas involved in HPA axis control following short-term and long-term administration in normal and stressed rats. *Mol Psychiatry.* 6(5):547-64; 2001.

Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(9):5335-40; 1998.

Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care.* 22(2):233-40; 1999.

D'Amour FE, Smith DI ; *J Pharmacol Ther.* 72: 74-9; 1941.

de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endoc Ver.* 19 (3): 269-301; 1998.

Ellenbroek BA, Cools AR. Apomorphine susceptibility and animal models for psychopathology: genes and environment. *Behav Genet.* 32(5):349-61; 2002.

Ely DR, Dapper V, Marasca J, Correa JB, Gamaro GD, Xavier MH, Michalowski MB, Catelli D, Rosat R, Ferreira MB, Dalmaz C. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav.* 61(3):395-8; 1997.

Engler O, Pham T, Fullenon MJ, Ooi G, Funder JW, Clarke IJ. Studies of the secretion of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin into hypophyseal portal circulation of the conscious sheep. *Neuroendocrinol.* 49: 367-81; 1989.

Ferretti V, Florian C, Costantini VJ, Rouillet P, Rinaldi A, De Leonibus E, Oliverio A, Mele A. Co-activation of glutamate and dopamine receptors within the nucleus accumbens is required for spatial memory consolidation in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 179(1):108-16; 2005.

Francis DD, Meaney MJ. Maternal care and the development of stress responses. *Curr Op Neurobiol.* 9 (1) 128-134; 1999.

Gamaro GD, Prediger ME, Lopes JB, Dalmaz C. Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacol Biochem Behav.* 76(2):327-33; 2003.

Gilad G.M., Rabey J.M., Gilad V.H, Presynaptic effects of glucocorticoids on dopaminergic and cholinergic synaptosomes. Implications for rapid endocrine– neural interactions in stress, *Life Sci.* 40 (1987) 2401– 2408.

Giovenardi M, Consiglio AR, Barros HM, Lucion AB. Pup age and aggressive behavior in lactating rats. *Braz J Med Biol Res.* 33(9):1083-8; 2000.

Gomes CM, Frantz PJ, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JA, Lucion AB. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Braz J Med Biol Res.* 32(10):1239-42; 1999. Gonzalez JC, Peinado V, Machin C, Rua C, Leret ML. Effects of maternal adrenalectomy on the developing dopaminergic system. *Brain Res Dev Brain Res.* 149(2):153-6; 2004.

Gordon HW. Early environmental stress and biological vulnerability to drug abuse. *Psychoneuroendocrinology*. 27(1-2):115-26; 2002.

Griebel G, Rodgers RJ, Perrault G, Sanger DJ. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav*. 57(4):817-27; 1997.

Grippe AJ, Sullivan NR, Damjanoska KJ, Crane JW, Carrasco GA, Shi J, Chen Z, Garcia F, Muma NA, Van de Kar LD. Chronic mild stress induces behavioral and physiological changes, and may alter serotonin 1A receptor function, in male and cycling female rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 179(4):769-80; 2005.

Gumilar F, Arias HR, Spitzmaul G, Bouzat C. Molecular mechanisms of inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by tricyclic antidepressants. *Neuropharmacology*. 45(7):964-76; 2003.

Hagan MM, Holguin FD, Cabello CE, Hanscom DR, Moss DE. Combined naloxone and fluoxetine on deprivation-induced binge eating of palatable foods in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 58(4):1103-7; 1997.

Heal DJ, Aspley S, Prow MR, Jackson HC, Martin KF, Cheetham SC. Sibutramine: a novel anti-obesity drug. A review of the pharmacological evidence to differentiate it from d-amphetamine and d-fenfluramine. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 22 Suppl 1:S18-28; discussion S29; 1998.

Heisler LK, Kanarek Rb, Gerstein A. Fluoxetine decreases fat and protein intakes but not carbohydrate intake in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 58(3):767-73; 1997.

Heit, S.; Owens, M. J.; Plotsky, P.; Nemeroff, C. B. Corticotrophin-release factor, stress and depression. *Neuroscientist*. 3: 186-194; 1997.

Hermel EE, Severino GS, Ceconello AL, Pereira FM, Sanvitto GL, Lucion AB. Neonatal handling and the expression of immunoreactivity to tyrosine hydroxylase in the hypothalamus of adult male rats. *Braz J Med Biol Res.* 34(9):1191-5; 2001.

Holmes MC, French KL, Seckl JR. Dysregulation of diurnal rhythms of serotonin 5-HT_{2C} and corticosteroid receptor gene expression in the hippocampus with food restriction and glucocorticoids. *J Neurosci.* 17(11):4056-65; 1997.

Huot RL, Thirivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl).* 158(4):366-73; 2001.

Hu M, Crombag HS, Robinson TE, Becker JB. Biological basis of sex differences in the propensity to self-administer cocaine. *Neuropsychopharmacology.* 29(1):81-5; 2004.

Imperato A., Puglisi-Allegra S., Casolini P., Zocchi A., Angellucci L., Stress-induced enhancement of dopamine and acetylcholine release in limbic structures: role of corticosterona, *Eur. J. Pharmacol.* 165 (1989) 337–338.

Iwasaki, S.; Inoue, K.; Kiriike, N.; Hikiji, K. Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. *Physiol. Behav.* 70: 551-556; 2000.

Jeppesen J, Schaaf P, Jones C, Zhou MY, Chen YD, Reaven GM. Effects of low-fat, high-carbohydrate diets on risk factors for ischemic heart disease in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 65(4):1027-33; 1997. Erratum in: *Am J Clin Nutr* 1997.

Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 73(1):131-40; 2002.

Kopp MS, Rethelyi J. Where psychology meets physiology: chronic stress and premature mortality—the Central-Eastern European health paradox. *Brain Res Bull.* 62(5):351-67; 2004.

Kosten TA, Miserendino MJ, Kehoe P. Enhanced acquisition of cocaine self-administration in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Brain Res.* 1;875(1-2):44-50; 2000.

Krueger RF, Tackett JL, Markon KE. Structural models of comorbidity among common mental disorders: connections to chronic pain. *Adv Psychosom Med.* 25:63-77; 2004.

Kudoh A, Takase H, Takazawa T. Chronic treatment with antidepressants decreases intraoperative core hypothermia. *Anesth Analg.* 97(1):275-9; 2003.

Leret ML, Peinado V, Suarez LM, Tecedor L, Gamallo A, Gonzalez JC. Role of maternal adrenal glands on the developing serotonergic and aminoacidergic systems of the postnatal rat brain. *Int J Dev Neurosci.* 22(2):87-93; 2004.

Liu S, Manson JE, Stampfer MJ, Holmes MD, Hu FB, Hankinson SE, Willett WC. Dietary glycemic load assessed by food-frequency questionnaire in relation to plasma high-density-lipoprotein cholesterol and fasting plasma triacylglycerols in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 73(3):560-6; 2001.

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

Meaney MJ, Aitken DH. The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Brain Res.* 354(2):301-4; 1985.

Meaney MJ, Aitken DH, Sharma S, Viau V, Sarrieau A. Postnatal handling increases hippocampal type II glucocorticoid receptors and enhances adrenocorticoid negative feedback efficacy in the rat. *Neuroendocrinology* 50:597–604; 1989.

McEwen BS. Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiol Aging.* 23: 921-939; 2002.

Mele A, Avena M, Roullet P, De Leonibus E, Mandillo S, Sargolini F, Coccorello R, Oliverio A. Nucleus accumbens dopamine receptors in the consolidation of spatial memory. *Behav Pharmacol.* 15(5-6):423-31; 2004.

Neal CR Jr, Weidemann G, Kabbaj M, Vazquez DM. Effect of neonatal dexamethasone exposure on growth and neurological development in the adult rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287(2):R375-85; 2004.

Netto CA, Siegfried B, Izquierdo I;. *Behav Neural Biol.*48: 304-309; 1987.

Nikulina EM, Covington HE 3rd, Ganschow L, Hammer RP Jr, Miczek KA. Long-term behavioral and neuronal cross-sensitization to amphetamine induced by repeated brief social defeat stress: Fos in the ventral tegmental area and amygdala. *Neuroscience.* 123(4):857-65; 2004.

Michelson D, Galliven E, Hill L, Demitrack M, Chrousos G, Gold P. Chronic imipramine is associated with diminished hypothalamic-Pituitary-adrenal axis responsivity in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(8):2601-6; 1997.

Mogensen J, Svendsen G, Lauritsen KT, Ermens P, Hasman A, Elvertorp S, Plenge P, Mellerup E, Wortwein G. Associative and nonassociative learning after chronic imipramine in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 76(1):197-212; 2003.

Monleon S, D'Aquila P, Parra A, Simon VM, Brain PF, Willner P. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology (Berl).* 117(4):453-7; 1995.

Morilak DA, Frazer A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 7(2):193-218; 2004.

Ookuma K, Sakata T, Fujimoto K. Evidence for feeding elicited through antihistaminergic effects of tricyclic antidepressants in the rat hypothalamus. *Psychopharmacology (Berl).* 101(4):481-5; 1990.

Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HM, Lucion AB. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci.* 115(6):1332-40; 2001.

Panagiotaropoulos T, Papaioannou A, Pondiki S, Prokopiou A, Stylianopoulou F, Gerozissis K. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology.* 79(2):109-18; 2004.

Papp M. Differential effects of short-and long-term antidepressant treatments on the food-induced place preference conditioning in rats. *Behav Pharmacol.* 1(1):69-74; 1989.

Papp M, Klimek V, Willner P. Parallel changes in dopamine D2 receptor binding in limbic forebrain associated with chronic mild stress-induced anhedonia and its reversal by imipramine. *Psychopharmacology (Berl).* 115(4):441-6; 1994.

Park MK, Hoang TA, Belluzzi JD, Leslie FM. Gender specific effect of neonatal handling on stress reactivity of adolescent rats. *J Neuroendocrinol.* 15(3):289-95; 2003.

Plotsky, P. M.; Meaney M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotrophin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress induced release in adult rats. *Mol. Br. Res.* 18: 185-200; 1992.

Plaznik A, Palejko W, Stefanski R, Kostowski W. Open field behavior of rats reared in different social conditions: the effects of stress and imipramine. *Pol J Pharmacol.* 45(3):243-52; 1993.

Putignano P, Dubini A, Toja P, Invitti C, Bonfanti S, Redaelli G, Zappulli D, Cavagnini F. Salivary cortisol measurement in normal-weight, obese and anorexic women: comparison with plasma cortisol. *Eur J Endocrinol.* 145(2):165-71; 2001.

Reul JM, Stec I, Soder M, Holsboer F. Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Endocrinology.* 133(1):312-20; 1993.

Rogoz Z, Skuza G. Repeated imipramine treatment enhances the 7-OH-DPAT-induced hyperactivity in rats: the role of dopamine D2 and D3 receptors. *Pol J Pharmacol.* 53(6):571-6; 2001.

Rosmond R, Bjorntorp P. The role of antidepressants in the treatment of abdominal obesity. *Med Hypotheses.* 54(6):990-4; 2000.

Rouge-Pont F., Marinelli M., Le Moal M., Herve S., Piazza V., Stress-induced sensitisation and glucocorticoids: II. Sensitisation of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterona secretion, *J. Neurosci.* 15 (1995) 7189– 7195.

Samarghandian S, Ohata H, Yamauchi N, Shibasaki T. Corticotropin-releasing factor as well as opioid and dopamine are involved in tail-pinch-induced food intake of rats. *Neuroscience.* 116(2):519-24; 2003.

Sanchez MM, Noble PM, Lyon CK, Plotsky PM, Davis M, Nemeroff CB, Winslow JT. Alterations in diurnal cortisol rhythm and acoustic startle response in nonhuman primates with adverse rearing. *Biol Psychiatry.* 57(4):373-81; 2005.

Sapolsky RM, Meaney MJ. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res Rev.* 11:65–76; 1986.

Schmidt M, Enthoven L, van Woezik JH, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS. The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *J Neuroendocrinol.* 16(1):52-7; 2004.

Sluyter F., Hof M., Ellenbroek B.A., Degen S.B. , Cools A.R., Genetic, sex, and early environmental effects on the voluntary alcohol intake in Wistar rats, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 67,801–808; 2000.

Smith GP. Accumbens dopamine mediates the rewarding effect of orosensory stimulation by sucrose. *Appetite*. 43(1):11-3; 2004.

Smythe JW, McCormick CM, Rochford J, Meaney MJ. (a) The interaction between prenatal stress and neonatal handling on nociceptive response latencies in male and female rats. *Physiol Behav*. 55(5):971-4; 1994.

Smythe JW, Rowe WB, Meaney MJ. (b)(1994) Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT₂ receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Brain Res Dev Brain Res*. 80(1-2):183-9; 1994.

Stephan M, Helfritz F, Pabst R, Von Horsten S. Postnatally induced differences in adult pain sensitivity depend on genetics, gender and specific experiences: reversal of maternal deprivation effects by additional postnatal tactile stimulation or chronic imipramine treatment. *Behav Brain Res*. 133(2):149-58; 2002.

Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Bassani E, Tabajara AS, Gamaro GD, Dantas G, Torres IL, Lucion AB, Dalmaz C. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol Behav*. 80(5):739-45; 2004.

Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci*. 23(1):93-9; 2005.

Tanganelli S., Fuxe K., VonEuler G., Eneroth P., Agnati L.F., Ungerstedt U., Changes in pituitary– adrenal activity affect the apomorphine and cholecystokinin-8-induced changes in striatal dopamine release using microdialysis, *J. Neural Transm*. 81 (1990) 183– 194.

Tsigos C, Chrousos GP. Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 23: 451-66; 1994.

Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 53: 865-871; 2002.

van der Elst MC, Verheij MM, Roubos EW, Ellenbroek BA, Veening JG, Cools AR. A single exposure to novelty differentially affects the accumbal dopaminergic system of apomorphine-susceptible and apomorphine-unsusceptible rats. *Life Sci.* 76(12):1391-406; 2005.

van der Kam, E.L., Coolen, J.C.M., Ellenbroek, B.A., Cools, A.R. The effects of stress on alcohol consumption: mild acute and sub-chronic stressors differentially affect apomorphine susceptible and unsusceptible rats. *Life Sciences*, 76(15):1759-70; 2005.

van der Kam EL, Coolen JC, Ellenbroek BA, Cools AR. The effects of stress on alcohol consumption: mild acute and sub-chronic stressors differentially affect apomorphine susceptible and unsusceptible rats. *Life Sci.* 76(15):1759-70; 2005.

Weaver SA, Aherne FX, Meaney MJ, Schaefer AL, Dixon WT. Neonatal handling permanently alters hypothalamic-pituitary-adrenal axis function, behaviour, and body weight in boars. *J Endocrinol.* 164(3):349-59; 2000.

Wunderlich GR, Rotzinger S, Bush DE, DeSousa NJ, Vaccarino FJ. Cholecystokinin modulation of locomotor behavior in rats is sensitized by chronic amphetamine and chronic restraint stress exposure. *Brain Res.* 1001(1-2):95-107; 2004.

Yoshimura S, Sakamoto S, Kudo H, Sassa S, Kumai A, Okamoto R.

Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids*. 68(5):439-45; 2003.

Young JB. Effects of neonatal handling on sympathoadrenal activity and body composition in adult male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279(5):R1745-52; 2000.

Zar JH; *Biostatistical Analysis*. 3^a edição. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey; 1996.