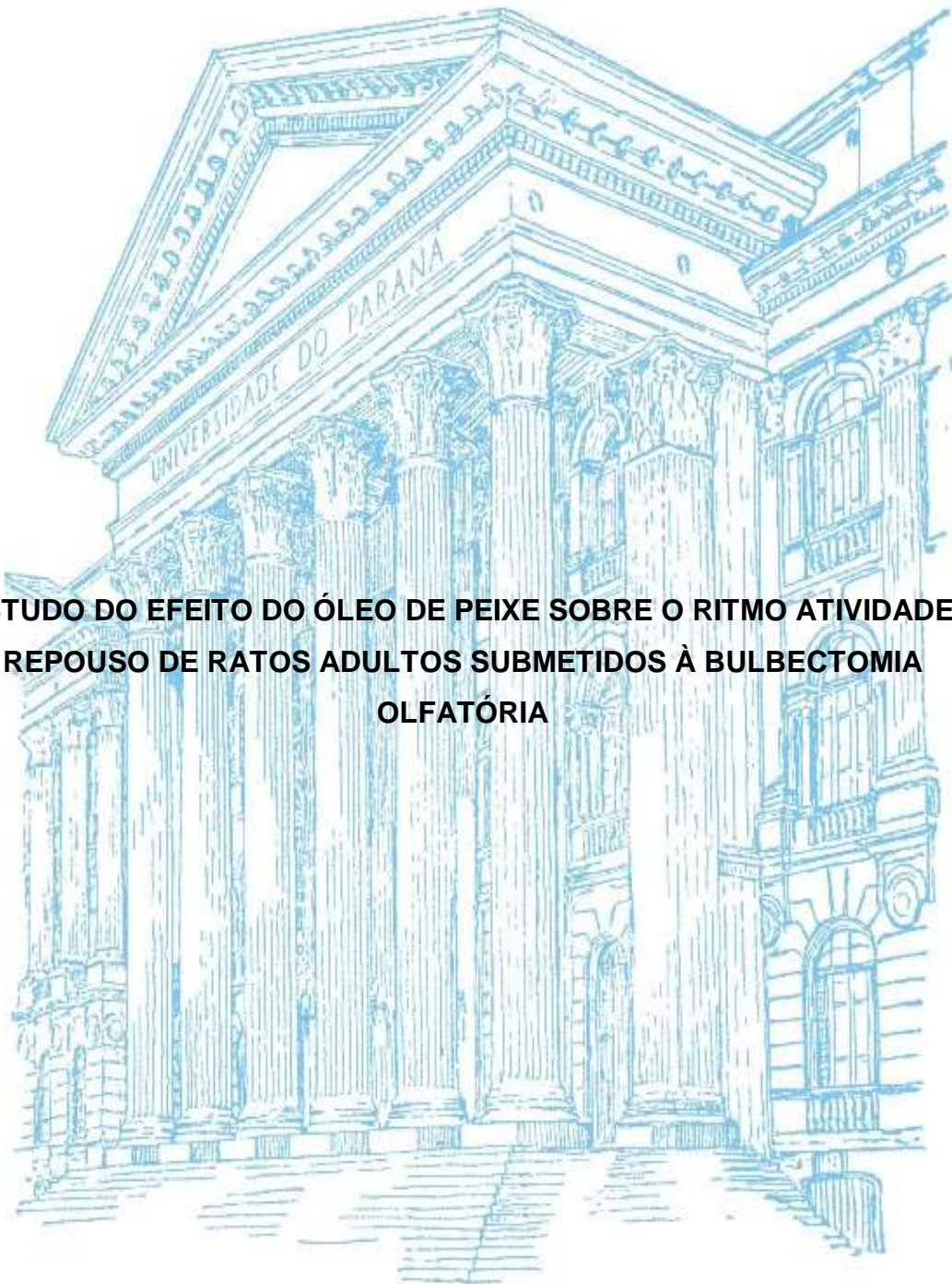


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SIMONE DA SILVA CUNHA



**ESTUDO DO EFEITO DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE O RITMO ATIVIDADE/
REPOUSO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À BULBECTOMIA
OLFATÓRIA**

CURITIBA 2016

SIMONE DA SILVA CUNHA

**ESTUDO DO EFEITO DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE O RITMO ATIVIDADE/
REPOUSO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À BULBECTOMIA
OLFATÓRIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Fisiologia, curso de Pós-graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Profa. Dra. Anete Curte Ferraz

Co-orientação: Prof. Dr. Fernando M. Louzada

CURITIBA 2016

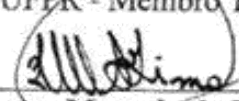
Ata da defesa de dissertação de mestrado de SIMONE DA SILVA CUNHA

Aos trinta e um dias do mês de março do ano de dois mil e dezesseis, foi realizada no Auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestranda **SIMONE DA SILVA CUNHA**, intitulada “**ESTUDO DO EFEITO DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE O RITMO ATIVIDADE/ RESPOUSO DE RATOS ADULTOS SUBMTIDOS À BULBECTOMIA OLFATÓRIA**”. A abertura teve início às 14h00min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora da candidata, Professora Doutora Anete Curte Ferraz. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou à palavra a aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, a Professora Doutora Anete Curte Ferraz passou à palavra a primeira examinadora, a Professora Doutora Janaína Menezes Zanoveli do Departamento de Farmacologia da UFPR. Na sequência, passou a palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima do Departamento de Fisiologia da UFPR. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Anete Curte Ferraz fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “*aprovado*”, habilitando-a ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professora Doutora Anete Curte Ferraz, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

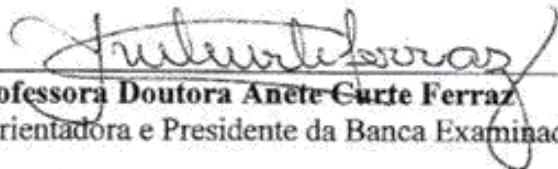
Curitiba, 31 de março de dois mil e dezesseis.



Professora Doutora Janaína Menezes Zanoveli
UFPR - Membro Titular



Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima
UFPR - Membro Titular



Professora Doutora Anete Curte Ferraz
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

Obrigada! Obrigada! Obrigada!

São 3 vezes para representar as muitas vezes em que devo e quero agradecer a todos que permitiram a realização desta pesquisa.

Meu obrigada, especialmente, à minha mãe, parceira, companheira, amiga e incentivadora de todos os momentos.

Ao meu pai (in memoriam), que certamente está feliz com esta realização.

A minha avó, sempre presente e preocupada com o resultado.

Ao meu filho que teve o sono tranquilo na maioria das noites de estudo e que chegou para deixar a vida mais colorida e agitada durante o mestrado.

A minha irmã pelas palavras oportunas.

Aos meus familiares e amigos que souberam entender minhas ausências.

Meu obrigada, mais que especial, à professora Anete orientadora que sempre mostrou profunda dedicação. Que soube de forma singular ensinar, ouvir, falar, corrigir... Que foi sensacional na forma como estimulou e orientou a pesquisa. Que me recebeu de braços abertos e me deixa ir com a certeza de que estive no melhor lugar para adquirir conhecimentos científicos, éticos, metodológicos e honestos.

Ao professor Fernando pelos ensinamentos, ajuda e pela co-orientação.

Aos amigos de laboratório, Bruno e Ana Márcia, por toda a dedicação, ensinamentos, paciência, conversas, pelo absurdo saber científico e desprendimento na transmissão do conhecimento. Ao Bruno, meu obrigada super especial, pela ajuda na realização da bulbectomia olfatória nos ratos.

Aos amigos Adriano e Laís, pela recepção, atenção, ajuda na realização da perfusão, pelas conversas, dicas e exemplo de dedicação.

À querida Ana Nosedá, Cláudia, Fabíola, Patrícia pelo apoio, conversas e ensinamentos.

Meu obrigada a Silvia pela dedicação, ajuda e parceria desde o início do projeto e nos momentos mais exaustivos (suplementação, troca de caixas, treinos e testes).

À Taisa, amiga, confidente, consultora, terapeuta e a mais tranquila dos seres, “Calma Si, vai dar tudo certo”.

Meu muito obrigada a Laura, “Lauríssima”, por saber tudo de “El Temps” (programa de análise de atividade locomotora), ter sido paciente e super

disponível quando precisei.

Aos professores e funcionários do departamento de fisiologia pela acolhida, ensinamentos e ajuda.

Obrigada aos funcionários da UFPR pela colaboração.

“Toda pedra do caminho
Você pode retirar
Numa flor que tem espinhos
Você pode se arranhar
Se o bem e o mal existem
Você pode escolher
É preciso saber viver”

(É preciso saber viver – Erasmo Carlos e Roberto Carlos)

RESUMO

A depressão, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), é a quarta principal causa de incapacitação em todo o mundo, sendo relacionada a fatores genéticos e não genéticos. Dentre as várias alterações sistêmicas e neurológicas que causa no indivíduo, as alterações da ritmicidade circadiana vem tendo interesse científico, pois nos pacientes depressivos há alterações do ritmo biológico associado ao ciclo claro/escuro ambiental. As conexões entre ritmo circadiano e depressão são bem estabelecidas por várias linhas de evidência em humanos e com, no mínimo, algum suporte de trabalhos com modelos animais. Porém, os mecanismos dessa conexão ainda não estão totalmente definidos. Dentre os modelos animais de depressão um dos mais utilizados é a bulbectomia olfatória (OBX), com critérios amplamente estabelecidos e aceitos, no qual a hiperatividade observada nos animais acontece devido às lesões retrógradadas em todas as áreas ligadas ao bulbo olfatório, pelo rompimento das conexões neurais. A OBX provoca um comportamento tipo-depressivo nos animais que é prevenido pela suplementação com óleo de peixe (OP) na fase de gestação e lactação. Assim, o presente estudo investigou se houve alteração do ritmo atividade/repouso nos animais submetidos a este modelo de depressão que foram ou não suplementados com OP, e ainda, o efeito desta suplementação sobre os comportamentos de depressão e atividade locomotora. Os actogramas e a análise do periodograma nos permitiu afirmar que todos os grupos permaneceram sincronizados ao ciclo claro/escuro. Assim, os dados obtidos a partir da OBX não mostraram efeito sobre ritmo atividade/ repouso dos ratos adultos suplementados ou não com OP. A suplementação com óleo de peixe reverteu o comportamento tipo-depressivo e a hiperatividade presentes no modelo de depressão, verificado por meio dos testes de natação forçada modificado e campo aberto. E ainda, os efeitos antidepressivos da suplementação com óleo de peixe parecem não estar relacionados a alterações do ritmo atividade/repouso dos animais, sugerindo que os mecanismos sejam independentes do ritmo circadiano.

Palavras-chave: Depressão; Ritmo Atividade/Repouso; Óleo de peixe; Bulbectomia olfatória;

ABSTRACT

The depression according to the World Health Organization (WHO) is the fourth main cause of inability by the world, being related to genetic and nongenetic factors. Among the many systemic and neurological changes that cause the individual, changes in circadian rhythmicity has had scientific interest, as in depressive patients for changes in biological rhythms associated with the light/dark cycle environment. The connections between depression and circadian rhythm are well established by several lines of evidence in humans and, at least, some support with animal models. However, the mechanisms of this connection are not yet fully defined. Among the animal models of depression one of the most used is the olfactory bulbectomy (OBX), with widely established and accepted criteria, in which the hyperactivity observed in animals is due to retrogressive lesions in all areas related to the olfactory bulb, the disruption of connections neural. The OBX causes a type-depressive behavior of the animals is prevented by supplementation with fish oil (OP) in pregnancy and lactation phase. This study investigated an activity/rest cycle modified in animals subjected to this depression model and supplemented or not with OP, and yet, the effect of supplementation on the behavior of depression and locomotor activity. The actogramas and analysis of the periodogram allowed us to say that all groups remained synchronized to the light/dark cycle. Thus, the data obtained from the OBX showed no shift on rhythm activity/rest of adult rats treated with OP or not OP. The supplementation with fish oil reversed-like and depressive behavior hyperactivity present in the depression model verified by the modified forced swimming test, and open field. Still, the antidepressant effects of supplementation with fish oil does not seem to be related to changes in the rhythm activity / rest of the animals, suggesting that the mechanisms are independent of the circadian rhythm.

Keywords: Depression, Activity /rest cycle, Fish Oil, Olfactory Bulbectomy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Modelo de influência direta e indireta da luz sobre o humor	17
FIGURA 2 - Bulbo olfatório e suas conexões.....	19
FIGURA 3 - Etapas bioquímicas para síntese dos ácidos graxos.....	21
FIGURA 4 – Desenho experimental.....	26
FIGURA 5 – Imagem do procedimento cirurgico.	27
FIGURA 6 – Imagem de uma estante com o sensor de presença.....	28
FIGURA 7 – Imagem do aparato para realização do teste comportamental de campo aberto	29
FIGURA 8 – Imagem do teste de natação forçada modificado.....	30
FIGURA 9 – Gráficos dos resultados do teste campo aberto.....	33
FIGURA10 - Gráficos dos resultados do teste natação forçada modificado.....	35
FIGURA 11 – Actogramas.....	36
FIGURA 12 – Gráficos dos resultados do registro de Atividade total.....	38
FIGURA 13 – Gráficos dos resultados do registro de atividade fase clara.....	39
FIGURA 14 – Gráficos dos resultados do registro de atividade fase escura.....	40
FIGURA 15 – Gráficos dos resultados do registro de atividade 10 dias seguintes à cirurgia.....	41
FIGURA 16 – Gráfico do resultado da análise de periodograma e potência....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AGPIs** – ácidos graxos poli-insaturados
- AMPC** – adenosina monofosfato cíclico
- BDNF** – fator neurotrófico derivado do encéfalo
- BO** – bulbo olfatório
- C** – grupo controle
- CA** – teste campo aberto
- D** - escuro
- DHA** – ácido docosahexaenoico
- e.g.** – por exemplo (do latim *exempli gratia*)
- EPA** – ácido eicosapentaenoico
- IL** - interleucinas
- IMAOs** - enzima monoamino oxidase
- ipRGCs** – células ganglionares fotossensíveis intrínsecas da retina
- L** - claro
- LA** – ácido linoleico
- NFM** – teste natação forçada modificado
- OBX** – bulbectomia olfatória
- OMS** – organização mundial de saúde
- OP** – óleo de peixe
- OPOBX** – grupo óleo de Peixe + bulbectomizado
- NSQ** – núcleo supraquiasmático
- RGCs** – células ganglionares fotossensíveis da retina
- SNC** – sistema nervoso central
- TDM** – transtorno depressivo maior
- TRH** – trato retinohipotalâmico
- ω3** – ômega 3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 DEPRESSÃO	12
1.2 RITMO CIRCADIANO	14
1.3 BULBECTOMIA OLFATÓRIA	18
1.4 ÓLEO DE PEIXE	19
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 ANIMAIS E SUPLEMENTAÇÃO.....	25
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	26
4.3 CIRURGIA.....	27
4.4 REGISTRO DE ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	28
4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	29
4.5.1 Teste campo aberto.....	29
4.5.2 Teste natação forçada modificado	30
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5 RESULTADOS.....	32
5.1 TESTE CAMPO ABERTO	32
5.2 TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO	34
5.3 ANÁLISE DO RITMO ATIVIDADE/REPOUSO	35
5.4 ATIVIDADE	37
5.4.1 Atividade na fase clara	38
5.4.2 Atividade na fase escura	39
5.4.3 Atividade 10 dias seguintes à cirurgia	41
5.5 Periodograma e potência	42
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES	49
8 REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEPRESSÃO

A depressão tem sido descrita pela humanidade há vários milênios, sendo que o termo melancolia foi usado pela primeira vez por Hipócrates perto de 400 anos a.C. (AKISKAL, 2000). Na idade média, a depressão era especialmente nociva, uma vez que o desespero do melancólico era considerado um afastamento de tudo o que era sagrado, um pecado e algumas pessoas eram multadas ou aprisionadas por carregarem esse mal da alma, que não tinha cura (GONÇALES, 2007). Atualmente é a quarta principal causa de incapacitação em todo o mundo, e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), há uma projeção de que em 2020 a depressão seja a segunda maior causa de incapacitação no mundo; e em 2030 esta patologia será o mal mais prevalente do planeta, à frente do câncer e de algumas doenças infecciosas (WHO, 2013; MATHERS e LONCAR, 2006). A incidência é de 20% em mulheres e 12% em homens nos Estados Unidos (EUA), próximo aos dados estatísticos de outros países (GOODIER, 2014).

Clinicamente, esta doença é diagnosticada e classificada como “transtorno depressivo maior (TDM)” baseada nos critérios utilizados do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) - (DSM-5, 2013). Os critérios de diagnóstico são cinco ou mais dos seguintes sintomas: humor deprimido (em crianças ou adolescentes pode ser humor irritável), perda de interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades na maior parte do dia, perda ou ganho de peso acentuado, insônia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga e perda de energia, sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada, capacidade reduzida de pensar ou concentrar-se ou indecisão, e pensamentos de morte recorrentes, desde que os sintomas estejam presentes há pelo menos duas semanas, e que realizem mudança no comportamento anterior do indivíduo. Estes sintomas causam sofrimento ou prejuízo na vida social, ocupacional ou outras áreas da vida do indivíduo. Para complementar o diagnóstico existem especificadores de características ansiosas, de gravidade, mistas, melancólicas, para a caracterização do quadro (DSM-V, 2013).

A vulnerabilidade para depressão é relacionada a fatores genéticos e apresenta fatores predisponentes não genéticos, como estresse, trauma

emocional e infecções virais (AKISKAL, 2000; FAVA e KENDLER, 2000). Todavia, nos últimos anos, diferentes hipóteses foram estudadas na tentativa de embasar sua complexa etiologia. Classicamente, a depressão é relacionada ao sistema monoaminérgico, que leva a manifestação do conjunto de características clínicas da doença (ULAK, *et al.*, 2010; BEAR, 2008; RANG e DALE, 2007). Neste contexto, a depressão é uma consequência do defeito em um dos sistemas modulatórios difusos (serotoninérgico ou noradrenérgico) que leva a um desequilíbrio destes neurotransmissores “monoaminérgicos” liberados no encéfalo. Para SCHILDKRAUT, 1965, a hipótese catecolaminérgica foi considerável valor heurístico, proporcionando ao pesquisador um quadro de referência que integrava grande parte da experiência com agentes farmacológicos que produziam alterações nos estados afetivos humanos. Posteriormente, houve o progresso na investigação sobre as funções de receptores serotoninérgicos no encéfalo, a partir de estudos usando antagonistas específicos de serotonina (COOPER, 1988). Estas hipóteses surgiram originalmente de associações entre os efeitos clínicos de vários fármacos que levavam ou não aos sintomas da depressão e seus efeitos neuroquímicos (NESTLER, 2002). Os inibidores da enzima monoamino oxidase (IMAOs) e drogas que inibem a recaptção desses neurotransmissores, como os antidepressivos tricíclicos e os inibidores seletivos da recaptção da serotonina e/ou noradrenalina, reforçam esta teoria (BOLDRINI, 2012). Assim, baseados nesta teoria monoaminérgica, a maioria dos medicamentos aumentam a neurotransmissão das monoaminas, por meio de diferentes mecanismos (KISS, 2008).

BOLDRINI *et al.*, (2002) ressaltam a importância do BDNF na função neuronal, uma vez que é uma das principais neurotrofinas responsáveis pela modulação da plasticidade no hipocampo e estas fazem parte de outra hipótese, na qual a redução do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) parece ter forte participação na patogênese da depressão (LUO, *et al.*, 2010). Um estudo de metanálise mostrou que os níveis de BDNF estão associados com alterações clínicas na depressão; suportando a noção de que a melhora do TDM está relacionada a mudanças de neuroplasticidade (BRUNONI, *et al.*, 2008).

É interessante ressaltar que os antidepressivos favorecem o aumento de BDNF, no entanto, estudos têm sugerido que os antidepressivos são efetivos apenas para uma parcela dos pacientes que sofrem de depressão (DOWLATI, *et*

al., 2010), com aproximadamente 30 – 40% de pacientes classificados como não responsivos, e período de latência clínica demasiadamente longo (WILLNER, *et al.*, 2013).

Com a redução da melhora clínica dos pacientes sob ação dos antidepressivos, estudos sugerem que o TDM vem acompanhado de um desequilíbrio do sistema imunológico, especificamente na ativação da resposta inflamatória, pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-6, interferon, fator de necrose tumoral, entre outras; este aumento de citocinas pode ser clinicamente importante, pois as citocinas pró-inflamatórias podem contribuir diretamente para o desenvolvimento de sintomas depressivos (ANISMAN, *et al.*, 2002; DAHL, *et al.*, 2014; DOWLATI, *et al.*, 2010). Há estudos apontando a inflamação como etiologia da depressão (AUBERT, 1999; KIM, *et al.*, 2016). Em um estudo de metanálise, que usou antidepressivo associado a anti-inflamatório, os resultados apontaram para melhor eficácia do anti-inflamatório em relação ao placebo (NA, *et al.*, 2014). Autores como, SANTIAGO, *et al.*, 2014, investigaram os anti-inflamatórios na atividade antidepressiva em modelos animais de depressão, e os resultados sugeriram que os efeitos do tipo antidepressivo de drogas anti-inflamatórias poderiam ser atribuídos a defesas antioxidantes aumentadas e atenuação do estresse oxidativo no hipocampo. Importante lembrar que o aumento dos mediadores pró-inflamatórios pode não causar, necessariamente, dano ao tecido normal, pois o objetivo primário da ação inflamatória é defender e restaurar a integridade do sistema nervoso central lesado. Entretanto, se não controlada, a ação inflamatória tem efeitos prejudiciais e pode agravar a lesão, porque ocorre o desequilíbrio entre as atividades pró e anti-inflamatória, resultando em inflamação crônica podendo levar ao prejuízo da memória espacial, perda neuronal, gliose no hipocampo e depressão (KIM, *et al.*, 2016).

1.2 RITMO CIRCADIANO

Dentre as várias alterações sistêmicas e neurológicas que a depressão causa no indivíduo, as alterações da ritmicidade circadiana vem tendo interesse científico, podendo ser uma hipótese na etiologia da depressão. Nos pacientes depressivos há alterações da ritmicidade circadiana, que é o ritmo biológico associado ao ciclo claro/escuro ambiental e apresenta período de aproximadamente 24 horas, do Latim – “*circa diem*” (BOYCE e BARRIBALL,

2010; MONTELEONE, *et al.*, 2011; KRONFELD-SCHOR, *et al.*, 2012; TAL-KRIVISKY, *et al.*, 2015). Na realidade, alterações no ritmo circadiano de pacientes deprimidos tem sido descritas há mais de 25 anos (TUREK, *et al.*, 1986) e estas alterações do ciclo circadiano, como no ciclo sono-vigília, são heterogêneas na depressão, e geralmente, incluem mudanças, como aumento, redução, avanço, atraso, do ritmo da temperatura corporal, secreção hormonal, fases do sono e ciclo repouso/ atividade (MONTELEONE, *et al.*, 2011).

O humor é diretamente afetado pelo processo circadiano, e não surpreende que distúrbios da ritmicidade façam parte da fisiopatologia dos distúrbios do humor, como mostram evidências da relação entre depressão e ritmo circadiano em humanos, bem como em modelos animais (KRONFELD-SCHOR, 2012). Ressaltando que nessa relação, depressão e ritmos circadianos, as mudanças mais frequentes que afetam o pessoas saudáveis são a variação do humor, atividade encefálica, atividade motora e a variação de humor sazonal. E dessas alterações, o ciclo sono/vigília é, de longe, o mais descrito distúrbio circadiano associado à depressão (GORWOOD, 2010; MONTELEONE, *et al.*, 2011; KRONFELD-SCHOR, 2012).

Nas últimas décadas tem-se estudado a ritmicidade circadiana de vários organismos – *Drosophila*, *Neurospora*, *Chlamydomonas*, hamsters, camundongos, ratos, sapos e outros – e os genes e circuitos que regulam esta ritmicidade circadiana têm sido identificados (McCLUNG, 2011; REPERT, 2000). A maioria dos organismos, incluindo o humano, apresenta ritmos circadianos em quase todos os níveis de organização, os quais podem ser estudados em bases genética, fisiológica e cognitiva (KRONFELD-SCOR, 2012). Estes ritmos circadianos, como, por exemplo, o ritmo de atividade/repouso, continuam a se expressar, mostrando o seu caráter endógeno (BOYCE e BARRIBALL, 2010), mesmo quando o organismo é mantido livre de pistas ambientais externas, situação denominada de livre-curso. Por exemplo, um animal noturno em escuro constante, vai expressar ritmo de aproximadamente e não exatamente 24 horas. Já se sabe que em humanos e ratos a média do período em livre curso é de 24,3 horas e 23,7 horas, respectivamente (BOLLINGER, 2014).

O sistema circadiano, que possibilita a sincronização entre os ritmos gerados endogenamente e o ciclo claro/escuro ambiental, é formado pelos seguintes componentes principais: via de entrada, a qual transmite a informação

ambiental, ciclo claro/escuro para estruturas neurais e endócrinas que compõem o sistema de temporização e a via de saída que sincroniza os relógios celulares e dos órgãos presentes no encéfalo e em estruturas periféricas (MOHAWK, 2011).

Em mamíferos os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) atuam como relógio circadiano principal, gerando o ritmo circadiano. Estes núcleos recebem a informação luminosa via trato retinohipotalâmico (TRH) a partir das células ganglionares fotossensíveis da retina (RGCs), que expressam o fotopigmento melanopsina, e assim, a entrada ajuda sincronizar os ritmos. Os efeitos da luz nos ritmos, sono e humor são mediados por uma subpopulação destas RGCs, as células ganglionares fotossensíveis intrínsecas da retina (ipRGCs), que expressam níveis variados da proteína melanopsina (LEGATES, *et al.*, 2012), indicando que cada subtipo poderia ter participação intrínseca na detecção da luz em um mecanismo diferente da sinalização de cones e bastonetes para o encéfalo (LEGATES, *et al.*, 2014). Ressaltando que a luz através das ipRGCs influencia comportamentos que são essenciais para a saúde e qualidade de vida (WASSLE, 2004). Esta influência da luz acontece pois as ipRGCs não tem uma membrana especializada, o que as torna menos sensíveis a luz do que os cones e bastonetes. No entanto, as ipRGCs são capazes de incorporar o sinal de luz por mais tempo, resultando em um aumento de sua sensibilidade durante um estímulo de luz prolongado (QIU, *et al.*, 2005).

O NSQ envia sinais para várias regiões do encéfalo, o qual, e por meio de hormônios e peptídeos sincroniza vários tecidos (FOSTER, 2007; McCLUNG, 2011). Na figura 1 podemos ver que a luz regula o humor e aprendizado alterando ou não o sono e a ritmicidade circadiana (LEGATES, *et al.*, 2014). Assim, o efeito da luz sobre o humor pode ou não envolver o sistema de temporização.

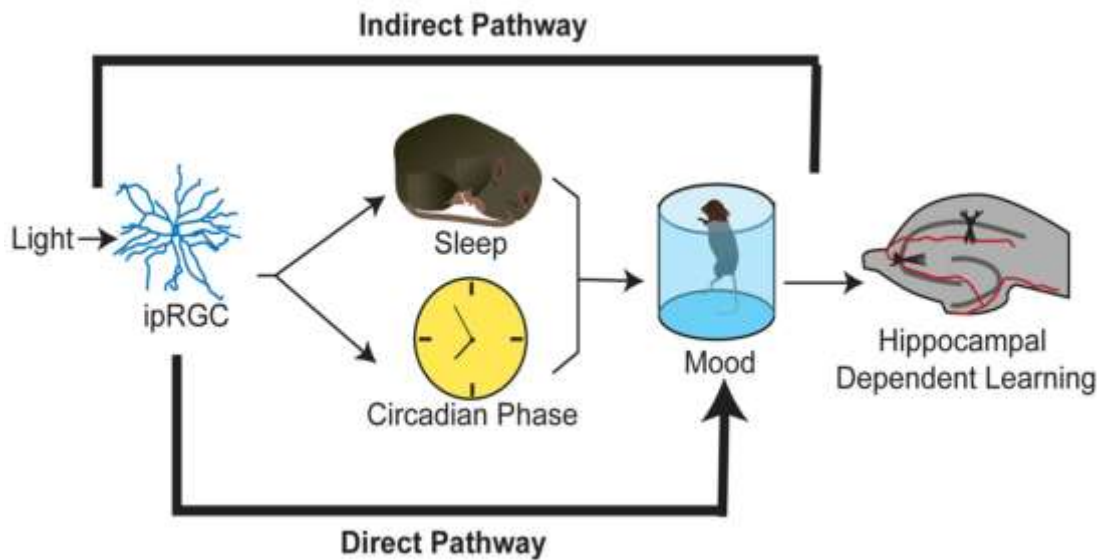


Figura 1 – Modelo de influência direta e indireta da luz sobre o humor.
Fonte: LEGATES, et al., (2014).

Excetuando a via visual, a maior via aferente para o NSQ é a via constituída de neurônios serotoninérgicos, cujos corpos celulares se encontram nos núcleos da rafe no mesencéfalo (ROCA, *et al.*, 1993), e a destruição deste impulso serotoninérgico não elimina o ritmo circadiano de livre-curso. Por outro lado, a amplitude e a regularidade dos ritmos são afetadas, além de ocorrer um avanço de fase no ritmo de atividade/repouso. Sabe-se também que a serotonina ou drogas serotoninérgicas causam alteração na frequência de disparos dos neurônios do NSQ tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sendo que a serotonina parece inibir a frequência de disparos. A somatória destes efeitos sugere uma regulação modulatória da serotonina (ROCA, *et al.*, 1993).

Apesar da inquestionável importância do NSQ, estudos anteriores sugerem que o bulbo olfatório (BO) é uma região que preenche todos os critérios funcionais de um marcapasso circadiano, exibindo ritmicidade de forma independente da função do NSQ (MONTÚFAR-CHAVEZNAVA, *et al.*, 2012). Um estudo que investigou o desenvolvimento do sistema circadiano do coelho, que caracteriza o padrão de 24 h de expressão dos genes do relógio do BO e NSQ, relatou pela primeira vez que *Per1*, *Cry1* e *Bmal1* são expressos na OB de coelhos recém-nascidos e juvenis. E que o padrão de variação diurna da expressão do gene do relógio se desenvolve mais cedo no BO que no NSQ de coelhos recém-nascidos. Dada a maturação precoce do mecanismo de relógio molecular e a relevância biológica desta estrutura durante o desenvolvimento, é possível que o BO desempenhe um papel importante na regulação temporal durante a vida pré-visual em coelhos (MONTÚFAR-CHAVEZNAVA, *et al.*,

2012). Esta modulação circadiana pode ser desencadeada pela ativação do BO a partir de exposição odorífera (GRANADOS-FUENTES, *et al.*, 2006). Vários estudos indicam que esta região interage com o sistema de entrada no NSQ, e que a bulbectomia olfatória afeta a funcionalidade deste núcleo, entretanto, a função biológica do BO como marcapasso ainda permanece vaga (MONTÚFAR-CHAVEZNAVA, *et al.*, 2012). As conexões entre ritmo circadiano e depressão são bem estabelecidas por várias linhas de evidência em humanos e com, no mínimo, algum suporte de trabalhos com modelos animais. Porém, os mecanismos dessa conexão ainda não estão totalmente definidos (KRONFELD-SCHOR e EINAT, 2012).

1.3 BULBECTOMIA OLFATÓRIA

Dentre os modelos animais de depressão um dos mais utilizados é a bulbectomia olfatória (SONG, 2010), com critérios amplamente estabelecidos e aceitos para um modelo animal de depressão, estabelece o requisito mínimo proposto: a) semelhança no comportamento do animal com sintomas observados em pacientes com depressão; b) as mudanças comportamentais que ocorrem no animal devem poder ser medidas objetivamente; e c) as mudanças de comportamento podem ser revertidas por qualquer tratamento que seja terapêuticamente eficaz (WILLNER, 1984; SONG, 2005). Os animais bulbectomizados mostram várias mudanças comportamentais, incluindo prejuízo na função cognitiva e aumento da atividade locomotora (SATO, 2010; PUDELL, *et al.*, 2013; TAKAHASHI, *et al.*, 2011, MATURANA, *et al.*, 2015). O modelo da bulbectomia olfatória (OBX) bilateral tem sido amplamente utilizado, pois promove alterações comparáveis às vistas em pacientes com depressão maior em vários sentidos: comportamentais, neuroendócrinas, neurobiológicas e neuroimunológicas (ZUEGER, *et al.*, 2005). A cirurgia de OBX foi descrita por BREUER, *et al.*, (2007) e leva a uma lesão retrógrada em todos os sistemas dos quais os bulbos recebem e/ou enviam informações. As principais alterações ocorrem normalmente duas semanas após realização do procedimento cirúrgico (MUCIGNAT-CARETTA, 2006). O bulbo olfatório se projeta para várias áreas do encéfalo (figura 2), incluindo regiões corticais, amígdala e hipocampo, o que embasa as mudanças comportamentais inerentes ao modelo (SONG, 2005; BORRE, *et al.*, 2012). Nos ratos bulbectomizados, ocorre diminuição da liberação de serotonina, noradrenalina e dopamina (SATO, *et al.*, 2010; SONG,

2005), que pode estar associada às alterações comportamentais decorrentes da bulbectomia (HARKIN, 2003; SONG, 2005). Além disso, a OBX reduz a neurogênese hipocampal, um suposto mecanismo para etiologia da depressão (KOO, *et al.*, 2010).

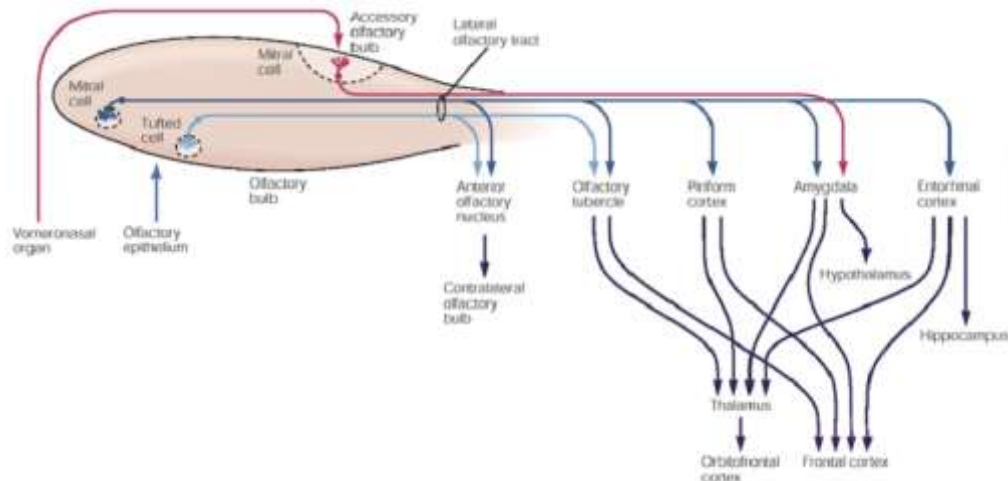


Figura 2 – Bulbo olfatório e suas conexões.

Fonte: KANDEL, E., SCHWARTZ, J.H. *Principles of Neural Science*, 4ed., (2014).

Com maior entendimento dos mecanismos subjacentes à depressão ampliaram-se as opções para possíveis alvos terapêuticos para esta patologia.

1.4 ÓLEO DE PEIXE

Sabe-se que além de satisfazer as necessidades de nutrição corporal, a dieta pode modular diversas funções no organismo. Conceitos na ingestão de nutrientes funcionais ou suplementos estão se expandindo a partir de estudos que enfatizam o uso de alimentos para promover um estado de bem-estar, saúde, e redução do risco de doenças.

Classicamente se sabe que o encéfalo possui grandes concentrações de lipídeos complexos, os quais determinam propriedades estruturais e funcionais das membranas das células e das organelas (FAROOQUI, *et al.*, 2000). Estes lipídeos têm um papel importante no metabolismo encefálico, influenciando o desempenho cognitivo, a acuidade visual, metabolismo de neurotransmissores e desenvolvimento neural (CHALON, *et al.*, 2001), sendo que sua deficiência pode causar perda de habilidades de aprendizagem, memória ou culminar em

doenças neurológicas na vida adulta (YOU DIM, *et al.*, 2000; FEDOROVA, *et al.*, 2007).

Os ácidos graxos compõem um conjunto de moléculas biológicas com funções de reserva energética, composição das membranas celulares, um importante papel na sinalização celular e precursor de moléculas bioativas (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) (RIEMER, *et al.*, 2010; ALBERTS, *et al.*, 2004; COOPER, 2007).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) podem ser divididos em duas grandes famílias: ômega-3 (ω -3), e ômega-6 (ω -6), as quais são estruturalmente classificadas (1) pelo número de carbonos presentes na cadeia de hidrocarbonetos (≥ 18 carbonos); (2) número de duplas ligações; e (3) e pela proximidade da primeira dupla ligação com o grupamento metil (ômega) terminal. Estes são considerados ácidos graxos essenciais, pois os mamíferos não os conseguem sintetizar devido à ausência natural das enzimas dessaturases Δ -15 e -12 e devem, obrigatoriamente, ser adquiridos através da alimentação (BOTHAM, 2007; CALDER, 2003).

Os ácidos graxos essenciais como o ácido alfa-linolênico (18:3 ω -3, LNA) e ácido linoléico (18:2 ω -6, LA) são AGPIs (figura 3) e fazem parte das etapas bioquímicas que sintetizam os ácidos eicosapentanoico (EPA– 20:5 ω -3), e docosahexaenóico (DHA– 22:6 ω -3), e ácido araquidônico (AA, 20:4 ω -6) - (JIMÉNEZ, *et al.*, 1997; ATTAR-BASHI *et al.*, 2004; LEVANT, *et al.*, 2006).

Os principais integrantes da família de ácidos graxos ω -3 (DHA e EPA) são encontrados principalmente em peixes de águas frias profundas, como salmão, atum e truta, em alguns vegetais como a linhaça, agrião, brócolis e espinafre, e em menor quantidade em frutos do mar. Já os ácidos graxos ω -6 podem ser encontrados em óleos vegetais como de girassol, canola, milho e soja, no leite de cabra e vaca, no abacate, além de na maioria das amêndoas (MARTIN, *et al.*, 2006).

Os AGPIs são lípidios de fonte dietética encontrados nas membranas celulares, mais abundantemente no sistema nervoso central (SNC) - (PASCOE, *et al.*, 2011; GOMEZ, 2008), ressaltando que o DHA tem um papel importante no metabolismo encefálico, influenciando o desempenho cognitivo, a acuidade visual, metabolismo de neurotransmissores e desenvolvimento neural (JIMÉNEZ, *et al.*, 1997; CHALON, *et al.*, 2001). E ainda, os ácidos graxos são capazes de promover alterações na função encefálica por modificarem as

características físico-químicas das membranas dos neurônios, participando ativamente de processos de sinalização celular através do funcionamento de receptores e da recaptação de neurotransmissores (BODNAR e WISNER, 2005); bem como alterando o metabolismo dos eicosanóides e as atividades enzimáticas (JUMPSEN, *et al.*, 1997).

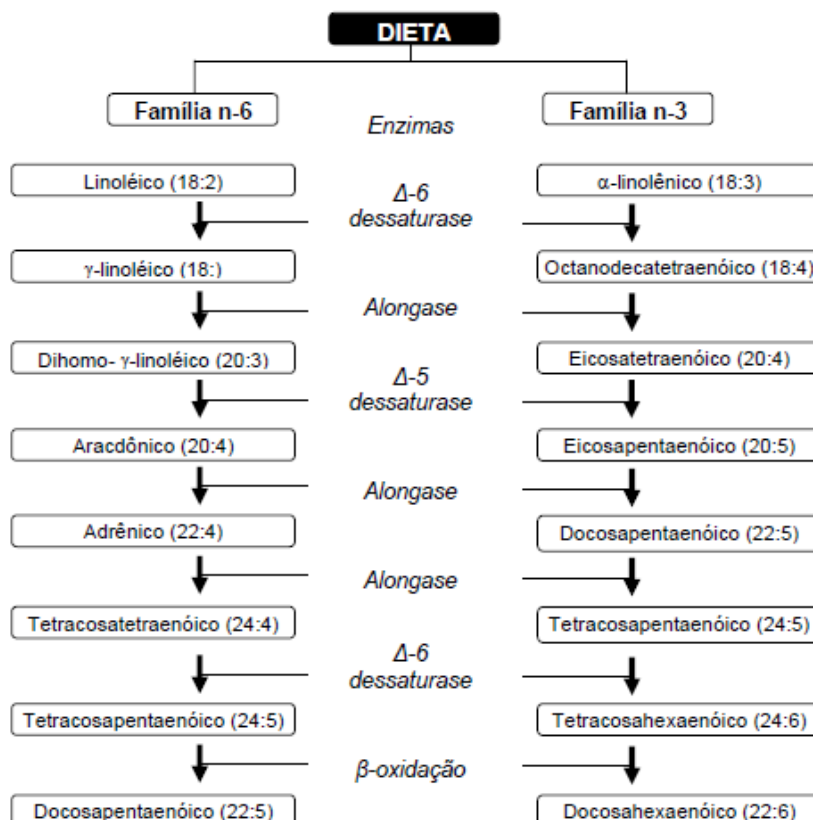


Figura 3 – Etapas bioquímicas para síntese dos ácidos graxos.
Fonte: Adaptado de LAURITZEN *et al.*, (2001).

Um crescente número de estudos clínicos e epidemiológicos mostra que os ácidos DHA e EPA podem ser efetivos no tratamento e prevenção da depressão (LIN, *et al.*, 2010; McNAMARA, *et al.*, 2010). Há estudos que mostram que a alteração do perfil dos ácidos graxos essenciais, particularmente do DHA, pode representar um fator não genético, na etiologia, tanto na depressão não puerperal como na depressão pós-parto (McNAMARA, *et al.*, 2007; LEVANT, *et al.*, 2006). O DHA está largamente envolvido com função neural, estrutura encefálica e tem um importante papel no desenvolvimento fetal e neonatal (OTTO, *et al.*, 2000; NALIWAIKO, *et al.*, 2004). Outros estudos têm

demonstrado diferenças nos níveis de ácidos graxos da família ω -3 em pacientes com transtornos psiquiátricos quando comparados a grupos controle, principalmente nos níveis de DHA (GREEN, *et al.*, 2006). A administração de DHA e EPA durante períodos críticos do desenvolvimento do SNC é essencial para a maturação cortical e mielinização e ainda, representa um risco diminuído para o desenvolvimento de psicopatologias em jovens adultos (FERRAZ, *et al.*, 2008). O decréscimo do DHA nas membranas dos neurônios é associado a alterações das atividades, em especial relacionadas à funcionalidade de transportadores e receptores, incluindo proteína G acoplada a receptores, canais iônicos, e a alterações do metabolismo da dopamina e serotonina (BERTRAND, *et al.*, 2006). Um estudo realizado no nosso laboratório, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), mostrou que animais suplementados com óleo de peixe durante as fases de gestação e lactação apresentaram um comportamento não depressivo quando submetidos aos testes de natação forçada quando adultos. Tal efeito antidepressivo foi corroborado pelo aumento dos níveis corticais e hipocâmpais de BDNF e da neurotransmissão serotoninérgica, particularmente no hipocampo e na ativação dos receptores 5-HT_{1A} (VINES, *et al.*, 2012). Outro estudo também do nosso laboratório, examinou o impacto da suplementação com OP, também, no período pré e pós-natal de desenvolvimento encefálico e, verificou que este óleo preveniu a ocorrência de comportamento depressivo, ansiedade e disfunções cognitivas em ratos submetidos ao modelo de depressão da bulbectomia olfatória. Observou-se também que a suplementação foi eficaz em prevenir o déficit de BDNF provocado pela bulbectomia olfatória (PUDELL, *et al.*, 2014). VINES, *et al.*, 2012 mostraram que a suplementação com OP *per se* foi capaz de aumentar os níveis de BDNF, o que confirmou dados anteriores de nosso laboratório onde os níveis de BDNF estavam aumentados no córtex e no hipocampo, e ainda mostrou um efeito antidepressivo do óleo de peixe, o qual estava possivelmente relacionado à indução desta expressão do BDNF e aumento na transmissão serotoninérgica no hipocampo.

Assim, muitos estudos vêm ao longo do tempo, reforçando o efeito antidepressivo induzido pelo OP quando administrado em fases prematuras do desenvolvimento do sistema nervoso central, como as fases de gestação e lactação tanto em humanos quanto em modelos animais, incluindo o modelo de depressão da bulbectomia olfatória.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que a modulação do humor é afetada pelo processo circadiano, e que distúrbios da ritmicidade podem fazer parte da fisiopatologia dos distúrbios do humor, decidimos investigar o ritmo de atividade/repouso de animais submetidos a um modelo de depressão, como o da bulbectomia olfatória. Além disso, sabendo-se que o bulbo olfatório de ratos parece agir como um marcapasso circadiano auto-sustentável, independente ou complementar do NSQ, o estudo da interação fisiológica entre estes núcleos e a possível relação dos mesmos na etiologia da depressão torna-se extremamente importante. Ainda importante é o fato de que o comportamento tipo depressivo manifestado em ratos bulbectomizados ser revertido pela suplementação com OP, rico nos ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA, durante a gestação e lactação. O conjunto destas informações nos levou a realizar uma investigação sobre o ritmo de atividade/repouso de animais suplementados ou não com OP durante fases do desenvolvimento do SNC em animais bulbectomizados e controles. Nossa hipótese é que a bulbectomia olfatória altere a ritmicidade e contribua para o desenvolvimento de depressão e que, o efeito antidepressivo do OP verificado neste modelo envolva proteção e/ou restabelecimento da ritmicidade circadiana.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do óleo de peixe sobre o ritmo atividade/repouso de ratos adultos submetidos à bulbectomia olfatória.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Investigar efeito da suplementação com óleo de peixe sobre os comportamentos de depressão e atividade locomotora;

2 - Investigar os efeitos da bulbectomia olfatória sobre o ritmo atividade/repouso de ratos adultos suplementados ou não com óleo de peixe.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e Suplementação

Ratas fêmeas Wistar de aproximadamente 90 dias de idade foram usadas como matrizes para obtenção de ratos Wistar machos. Todo o experimento foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, protocolo número 750, seguindo exigências estabelecidas no “*Guide for care and use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*”. Estas ratas foram obtidas do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob ciclo claro/escuro (12h/12h, luz ligada às 7:00 horas e apagada às 19:00 horas), com temperatura ambiente controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, recebendo água e ração *ad libitum*, e com troca de sepilho e gaiolas em dias alternados. Inicialmente as fêmeas foram aleatoriamente distribuídas em dois grupos: grupo experimental da suplementação com óleo de peixe (OP) e grupo controle (C). Os animais do grupo OP, além da ração para ratos, receberam diariamente, por meio de agulha de gavagem, 3,0 g/kg via oral de uma mistura de óleo de peixe composta de 12% de DHA, 18% de EPA e antioxidante tocoferol, gentilmente doada pelo Laboratório Herbarium Botânico S/A. As fêmeas do grupo C receberam ração para ratos em todo o período, e também, água filtrada (via gavagem) para serem submetidas ao mesmo procedimento do grupo OP. O período de suplementação ocorreu durante uma fase de adaptação ao biotério de 15 dias precedentes ao acasalamento, e aconteceu, sem interrupção, durante as fases de gestação e lactação até os 21 dias de vida dos filhotes (Figura 3). Para o acasalamento foram usados ratos machos obtidos do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, os quais foram colocados com as fêmeas em gaiolas, na proporção de um macho para cada grupo de 3 fêmeas, onde ficaram por oito dias. Ao nascimento, foram selecionados os filhotes machos, de cada grupo, que permaneceram nas caixas de manutenção com as respectivas mães, sendo amamentados até os 21 dias de vida, data em que foram desmamados, separados das mães e alojados em gaiolas no biotério, onde, a partir dessa data, passaram a receber somente ração para ratos e água à vontade. Após o desmame, os filhotes foram mantidos separados em 2 grupos, grupo OP e grupo C. O **Grupo Óleo de Peixe**: Animais que receberam suplementação de óleo de peixe na gestação e lactação; **Grupo**

Controle: Animais que não receberam suplementação de óleo de peixe na gestação e lactação;

4.2 Desenho Experimental

Aos 65 dias de vida estes grupos foram subdivididos em outros 2 (grupo bulbectomizado e grupo sham), formando então 4 grupos experimentais (Controle sham, Óleo de Peixe sham, Bulbectomizado, Óleo de Peixe Bulbectomizado) os quais foram monitorados para avaliação de atividade motora e, conseqüentemente dos ritmos circadianos por 35 dias. Este monitoramento foi realizado 15 dias pré e 20 após a realização da cirurgia de bulbectomia olfatória. Aos 80 dias de vida dos animais a bulbectomia olfatória foi realizada, aos 95 e 96 dias os testes comportamentais e aos 100 dias a perfusão dos encéfalos. Para maiores detalhes segue o desenho experimental na figura 4.

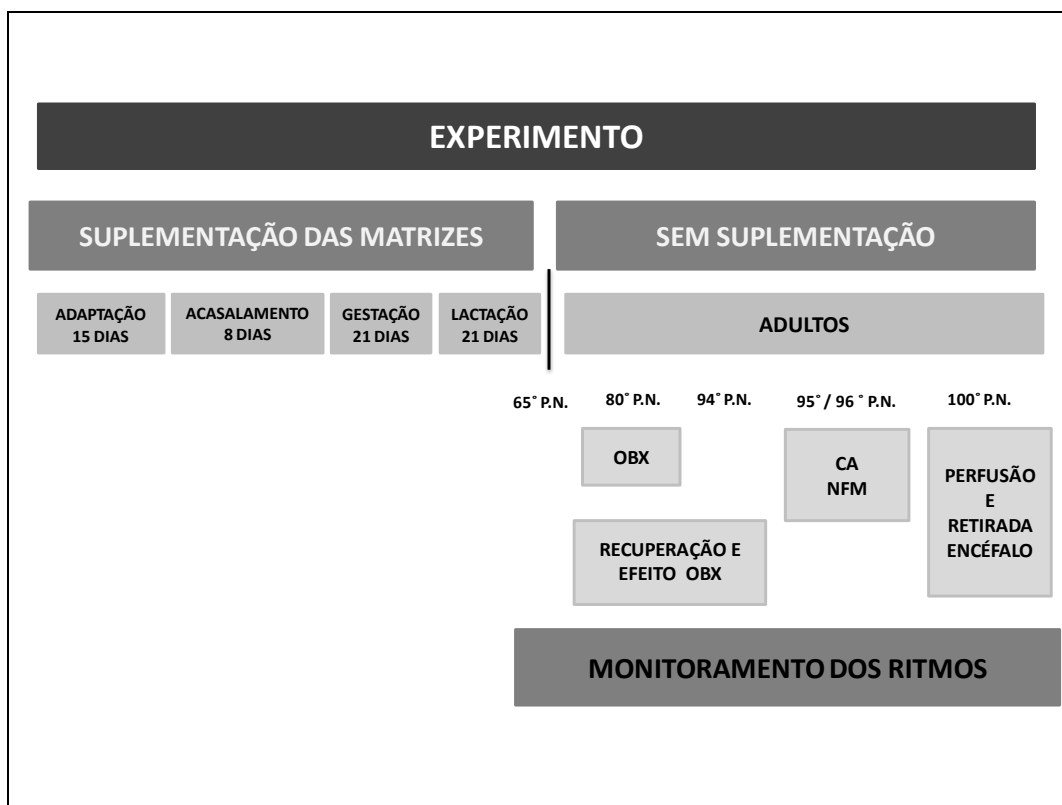


Figura 4 - Desenho experimental. As barras não estão representadas em escala. P.N.: pós-natal; OBX: bulbectomia olfatória; CA: teste do campo aberto; NFM: teste da natação forçada modificado.

4.3 Cirurgia

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados previamente com Xilazina (0,5mL, i.m.; *Syntec do Brasil Ltda*) e Ketamina (0,5mL, i.m.; *Syntec do Brasil Ltda*). A cirurgia de bulbectomia olfatória foi realizada por meio de estereotaxia, figura 5, com incisão na pele em 2cm ao centro da posição rostral-caudal. Foram realizadas incisões na calota craniana nas seguintes coordenadas, antero-posterior (AP): + 8mm em relação ao bregma e latero-lateral (LL): ± 2 mm em relação à linha média e (AP): $\pm 3,5$ mm e (LL): ± 2 mm. A partir destas perfurações foi aberta uma janela no crânio do rato, para o acesso do bulbo olfatório (PAXINOS e WATSON, 2005). O bulbo olfatório foi então removido por aspiração e a pele suturada. O grupo sham passou pelos mesmos procedimentos cirúrgicos, com abertura da calota craniana, sem, todavia, retirada do bulbo olfatório, que permaneceu intacto. Os animais foram mantidos aquecidos sob lâmpada, por 3 horas, durante a recuperação e posteriormente, retornaram ao sistema de avaliação de atividade. Durante o momento da remoção dos encéfalos, os animais que apresentavam algum dano no córtex frontal, bem como resíduos de tecido bulbar foram excluídos.

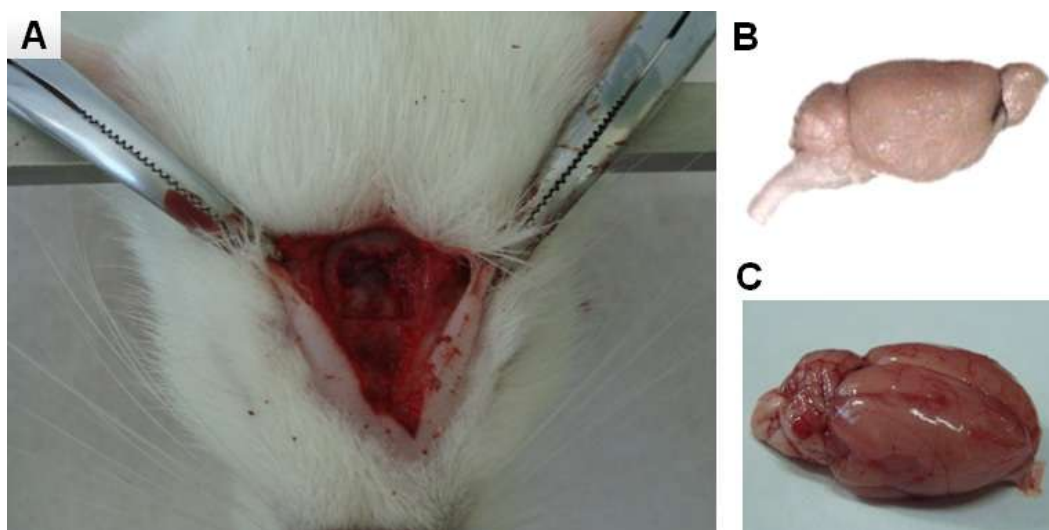


FIGURA 5 - Imagem do procedimento cirúrgico. (A) Janela para acesso ao bulbo olfatório; (B) Encéfalo intacto do rato; (C) Encéfalo bulbectomizado do rato.

4.4 Registro da Atividade Locomotora

O registro da atividade locomotora foi realizado por 35 dias, por meio de um Sistema de Aquisição de Controle, desenvolvido pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). O sistema (figura 6) consiste em um sensor de presença acoplado acima da caixa do animal conectado a uma placa de aquisição de dados (iUSBDAQ – U120816AO) ligada via USB em um computador. Os dados da placa de aquisição são computados pelo programa SAP (Software de Acionamento Programado). Durante todo o experimento, enquanto os ratos estiveram isolados em suas respectivas caixas, a atividade locomotora foi registrada para análises posteriores em um ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) no qual houve exposição de claro (L) / escuro (D), ciclo 12/ 12 horas, iluminado com luz fria branca 270-300 lux. Os dados de atividade foram agrupados em blocos de 5 minutos para a construção (no programa “Èl temps”) de actogramas, periodograma (análise geral dos ritmos) e gráfico de potência (o quanto um ritmo predomina sobre os outros). A capacidade de sincronização ao ciclo claro/escuro, atividade locomotora total e durante a fase clara e escura foram comparadas entre os grupos (C, OP, OBX e OPOBX). E ainda, foram analisados em 4 fases temporais (pré-cirurgia, pós-cirurgia, pós-testes comportamentais e 10 dias seguintes à cirurgia).

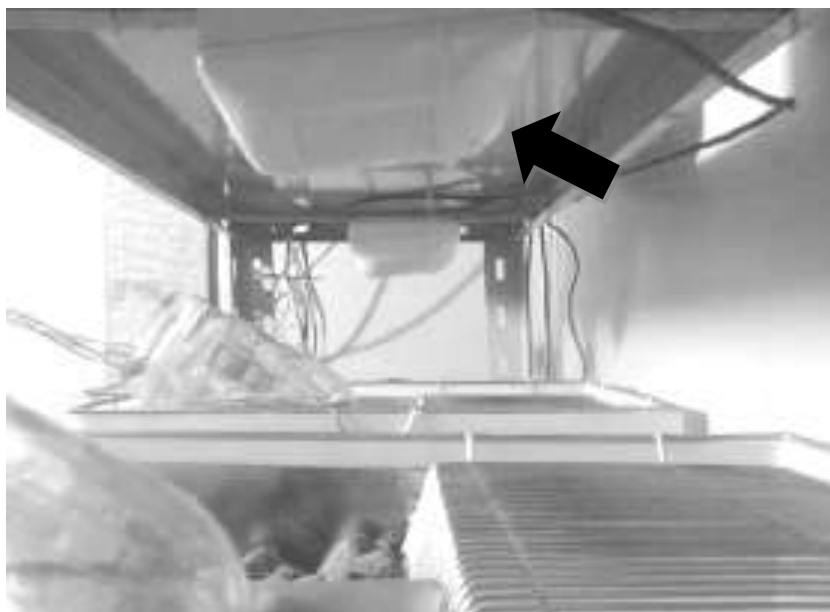


FIGURA 6 - Imagem de uma estante com o sensor de presença acoplado acima das caixas. A seta preta indica o sensor de presença.

4.5 Testes Comportamentais

Os animais foram submetidos aos testes comportamentais realizados em dias distintos no horário das 8 às 12 horas. Os testes foram campo aberto (CA) e de natação forçada modificado (NFM).

4.5.1 Teste campo aberto

Este teste foi efetuado após 15 dias da OBX. Para tal, os animais foram colocados em uma arena circular com 1m de diâmetro, limitada por uma parede circular de 40 cm de altura, iluminada por duas lâmpadas de 60 Watts, e com piso preto sem divisões aparentes. Para a avaliação os animais foram individualmente e gentilmente colocados na região central da arena e deixados explorar o ambiente livremente durante cinco minutos. Neste período, uma câmera acoplada a um programa para analisar as imagens (Smart Junior System Panlab, Harvard Apparatus, Spain) foi usada para quantificar o comportamento locomotor do animal por meio das análises da distância percorrida, velocidade média e tempo de exploração em cada região da arena (central ou periférica) - (CARRIE et al., 2000; NALIWAIKO et al., 2004).

O campo aberto, figura 7 foi cuidadosamente limpo após cada teste com uma solução de álcool etílico a 5% e seco.

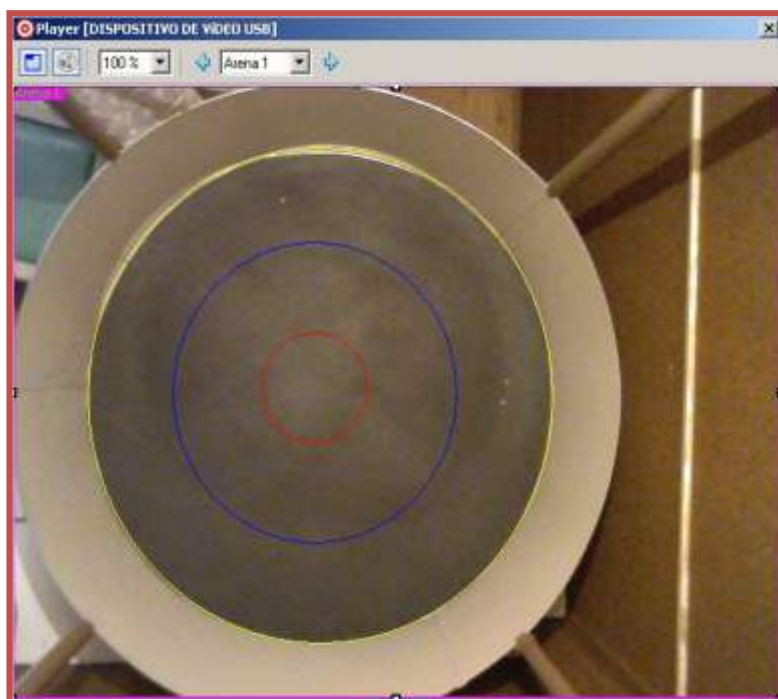


FIGURA 7 - Imagem do aparato para realização do teste comportamental de campo aberto.

4.5.2 Teste natação forçada modificado

O teste da natação forçada, figura 8, foi efetuado conforme descrito por DETKE, *et al.*, (1995); CRYAN, *et al.*, (2002) e CONSONI, *et al.*, (2006), modificado do método clássico proposto por PORSOLT *et al.*, (1978). Os animais foram colocados em cilindros plásticos opacos (diâmetro: 20 x altura: 50cm) preenchidos com coluna de água de 30cm, a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os animais foram submetidos a uma sessão de treino com 15 minutos de duração, e 24 horas depois do treino passaram pelo teste, propriamente dito, com duração de 5 minutos cada animal. As sessões de testes foram gravadas em DVD (Disco Digital Versátil com capacidade de gravar dados em um formato digital com grande capacidade de armazenamento) via câmera posicionada sobre o cilindro para posterior análise. Durante a sessão de teste foram mensuradas as frequências dos comportamentos de imobilidade (quando os animais permanecem boiando sem se movimentarem), natação (quando apresentam movimentos de natação através do cilindro) e escalada (movimentos para cima com as patas dianteiras sobre as paredes do cilindro). O tempo em cada parametro foi marcado ao longo dos 300 segundos de filmagem para cada animal. A água do cilindro foi trocada após os testes de cada animal, para evitar ou minimizar possíveis interferências, e após o teste, os animais foram secos e acomodados nas caixas plásticas.

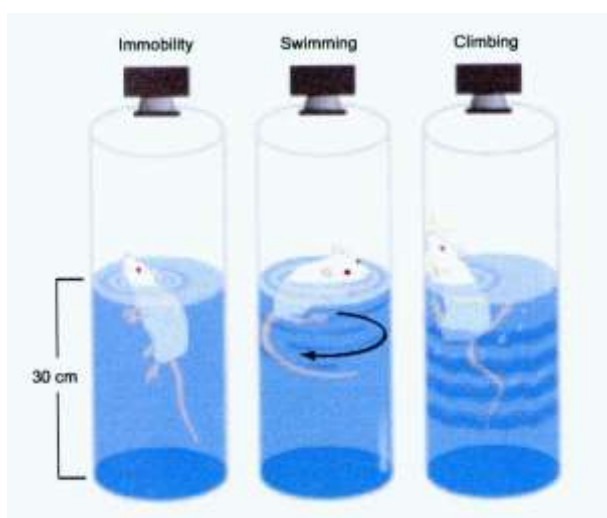


FIGURA 8 - Imagem do teste comportamental de natação forçada modificado.

4.6 Análise Estatística

Análises realizadas no *Statistica 7.0 software* (StatSoft, USA). Os dados paramétricos foram expressos como média e erro padrão da média e analisados por análise de variância, (ANOVA) de duas vias, seguida de análise pelo pós-teste de Newman-Keuls. A variável dependente foi avaliação locomotora, as variáveis independentes foram óleo de peixe e a bulbectomia olfatória. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Teste campo aberto

A (figura 9) mostra a distância total (A), distância periférica (B), distância do centro (C), tempo na periferia (D) e velocidade média (E) percorrida pelos animais experimentais quando avaliados no aparato do campo aberto. A ANOVA de duas vias revelou um aumento da mobilidade total (A) no grupo bulbectomizado ($F_{1,27} = 7,83$, $p = 0,009$), ausência de efeito *per se* da suplementação com óleo de peixe ($F_{1,27} = 1,77$, $p = 0,19$), mas uma interação significativa entre suplementação e OBX ($F_{1,27} = 4,13$, $p = 0,05$) uma vez que houve reversão deste parâmetro nos animais OPOBX.

Para a distância periférica não houve efeito da OBX ($F_{1,27} = 3,87$, $p = 0,06$) e do OP ($F_{1,27} = 1,86$, $p = 0,18$), assim como não houve efeito da interação entre as variáveis ($F_{1,27} = 7,72$, $p = 0,009$).

Como demonstrado na figura (C), a distância percorrida no centro do aparato não foi alterada pelas variáveis OBX ($F_{1,27} = 0,23$, $p = 0,63$), suplementação ($F_{1,27} = 0,31$, $p = 0,57$), ou interação entre elas ($F_{1,27} = 0,64$, $p = 0,42$).

Para tempo na periferia (D) mostra efeito da suplementação ($F_{1,27} = 9,0$, $p = 0,005$), da interação ($F_{1,27} = 10,1$, $p = 0,003$), e não teve efeito OBX ($F_{1,27} = 0,5$, $p = 0,49$).

Considerando a velocidade (E), a resposta foi significativa para OBX ($F_{1,27} = 8,9$, $p = 0,005$), e não para OP ($F_{1,27} = 2,2$, $p = 0,14$) e a interação OP e OBX ($F_{1,27} = 3,5$, $p = 0,07$).

Após a realização do pós teste de Newman-Keuls pudemos observar que a OBX aumentou distância total, distância periférica, tempo na periferia e velocidade ($p \leq 0,02$).

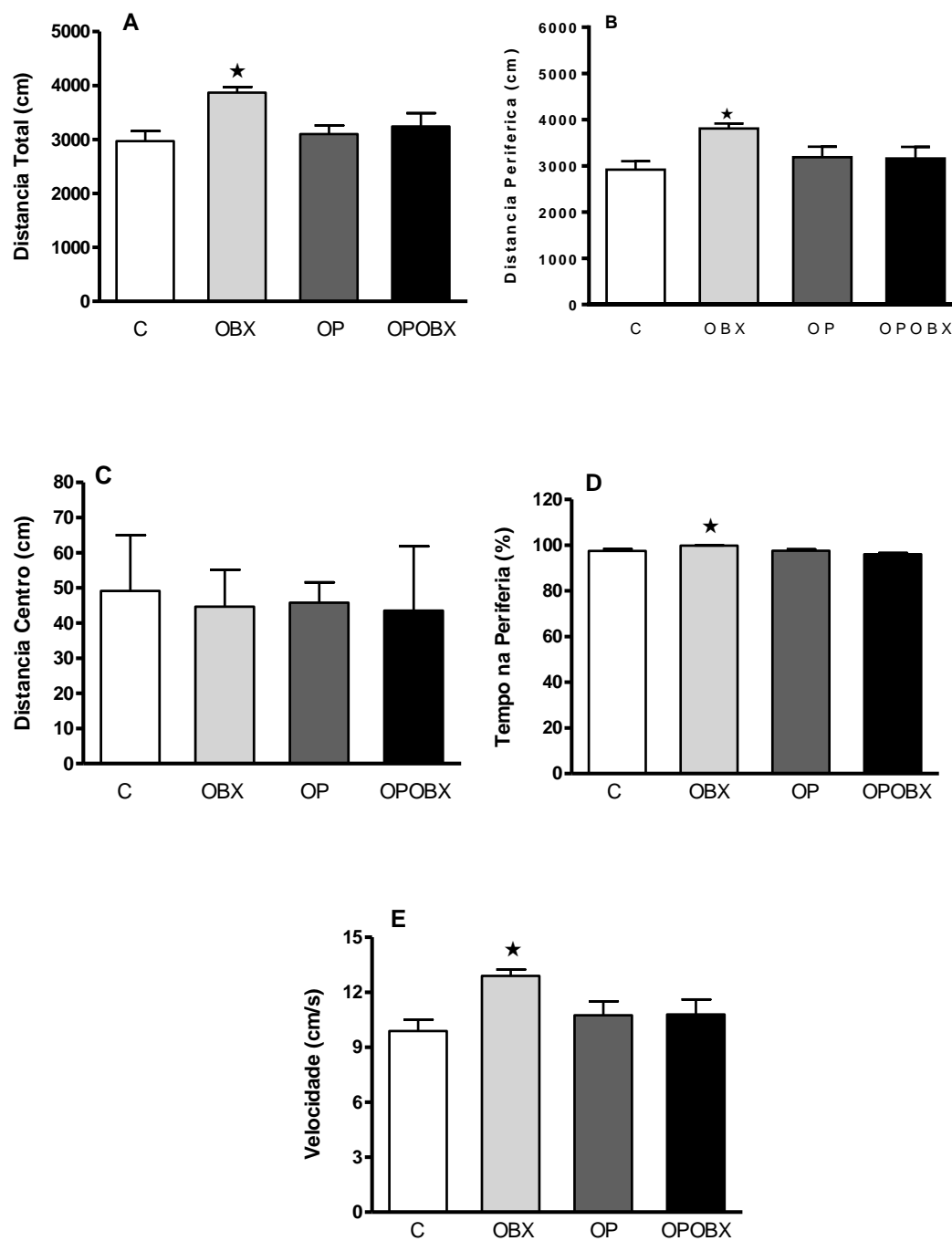


Figura 9 - Resultados do teste campo aberto. (A) Distância total. (B) Distância periférica. (C) Distância no centro. (D) Tempo na periferia. (E) Velocidade. Grupo controle (C), $n = 8$; grupo óleo de peixe (OP), $n = 8$; grupo bulbectomizado (OBX), $n = 7$; grupo suplementado e bulbectomizado (OPOBX), $n = 8$. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ comparado aos animais controle.

5.2 Teste da natação forçada modificado

Neste teste, foram analisados três parâmetros: imobilidade, natação e escalada (figura 10).

Em relação à imobilidade (A), para ANOVA de duas vias, houve efeito da OBX ($F_{1,27} = 13,22$, $p = 0,001$) e da suplementação ($F_{1,27} = 9,69$, $p = 0,004$), todavia não observamos interação entre estes fatores OPOBX ($F_{1,27} = 0,06$, $p = 0,80$). No pós teste de Newman-Keuls a análise revelou que o grupo OBX apresentou um aumento do comportamento de imobilidade quando comparado ao grupo C ($p = 0,03$), ao grupo OP ($p = 0,0004$) e ao grupo OPOBX ($p = 0,03$).

Para a natação houve efeito da OBX ($F_{1,27} = 18,62$, $p = 0,0001$) e da suplementação ($F_{1,27} = 16,0$, $p = 0,0004$). Para relação OPOBX não houve efeito ($F_{1,27} = 0,25$, $p = 0,61$). A análise no pós-teste para este comportamento mostrou que o grupo OBX nadou menos comparando com os outros grupos, C ($p = 0,006$), OP ($p = 0,0002$) e OPOBX ($p = 0,004$).

Para o comportamento de escalada o grupo OBX ($F_{1,27} = 17,70$, $p = 0,0003$), escalou significativamente menos em relação ao controle ($p = 0,002$) e ao grupo OP ($p = 0,003$). Com relação ao grupo OPOBX não houve diferença ($p = 0,09$).

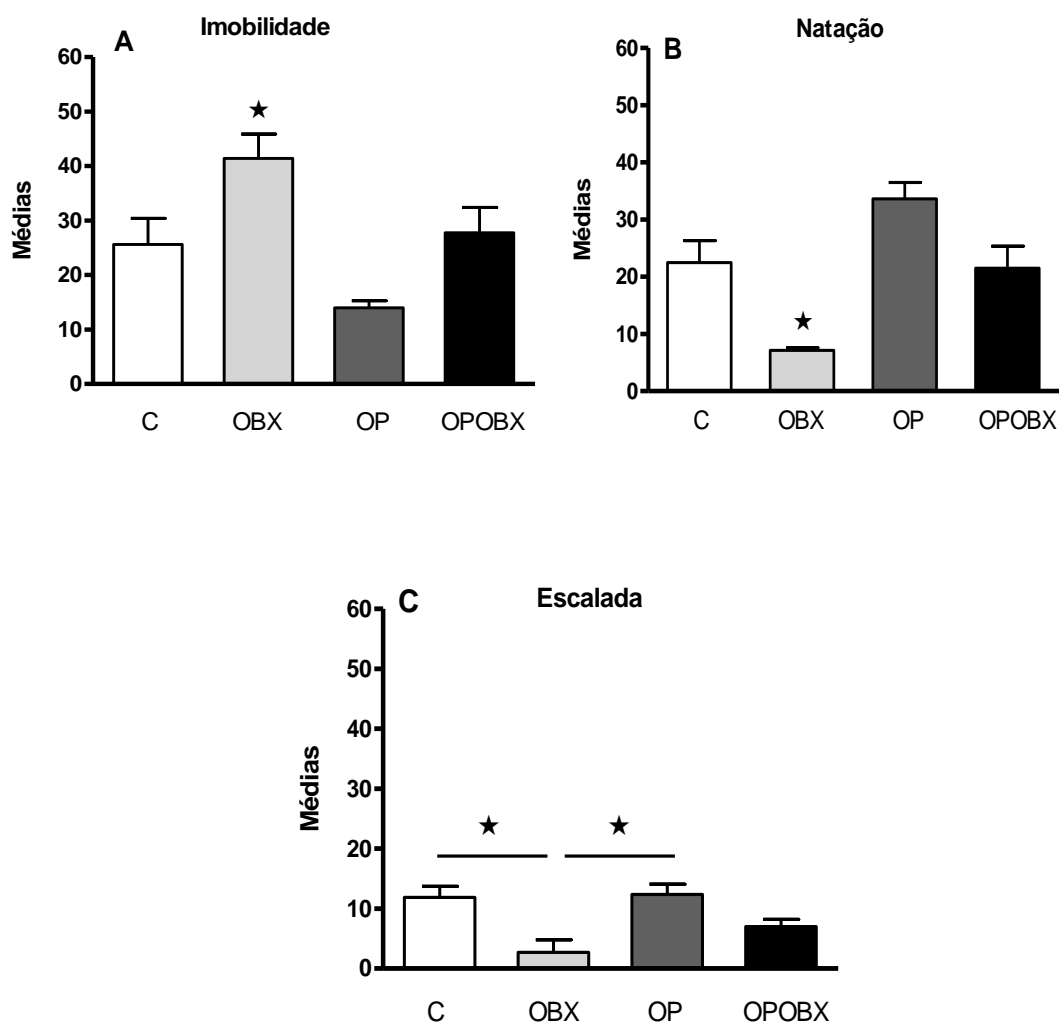


Figura 10 - Resultados do teste NFM. (A) Imobilidade. (B) Natação. (C) Escalada. Grupo controle (C), $n = 8$; grupo óleo de peixe (OP), $n = 8$; grupo bulbectomizado (OBX), $n = 7$; grupo suplementado e bulbectomizado (OPOBX), $n = 8$. Valores expressos como média \pm erro padrão da média, na ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ comparado aos animais controle.

5.3 Análise do Ritmo Atividade/Repouso

A figura 11 apresenta actogramas representativos do ritmo de atividade/repouso de um animal de cada um dos 4 grupos; Actograma A representa o grupo controle, B o grupo submetido à cirurgia C o grupo suplementado, e o D o grupo suplementado e submetido à cirurgia.

Por meio de inspeção visual dos actogramas foi possível identificar que todos os grupos estudados mostraram-se sincronizados ao ciclo claro/escuro, com ritmo circadiano de atividade/repouso com período de aproximadamente 24h durante o experimento, como mostra a figura 11.

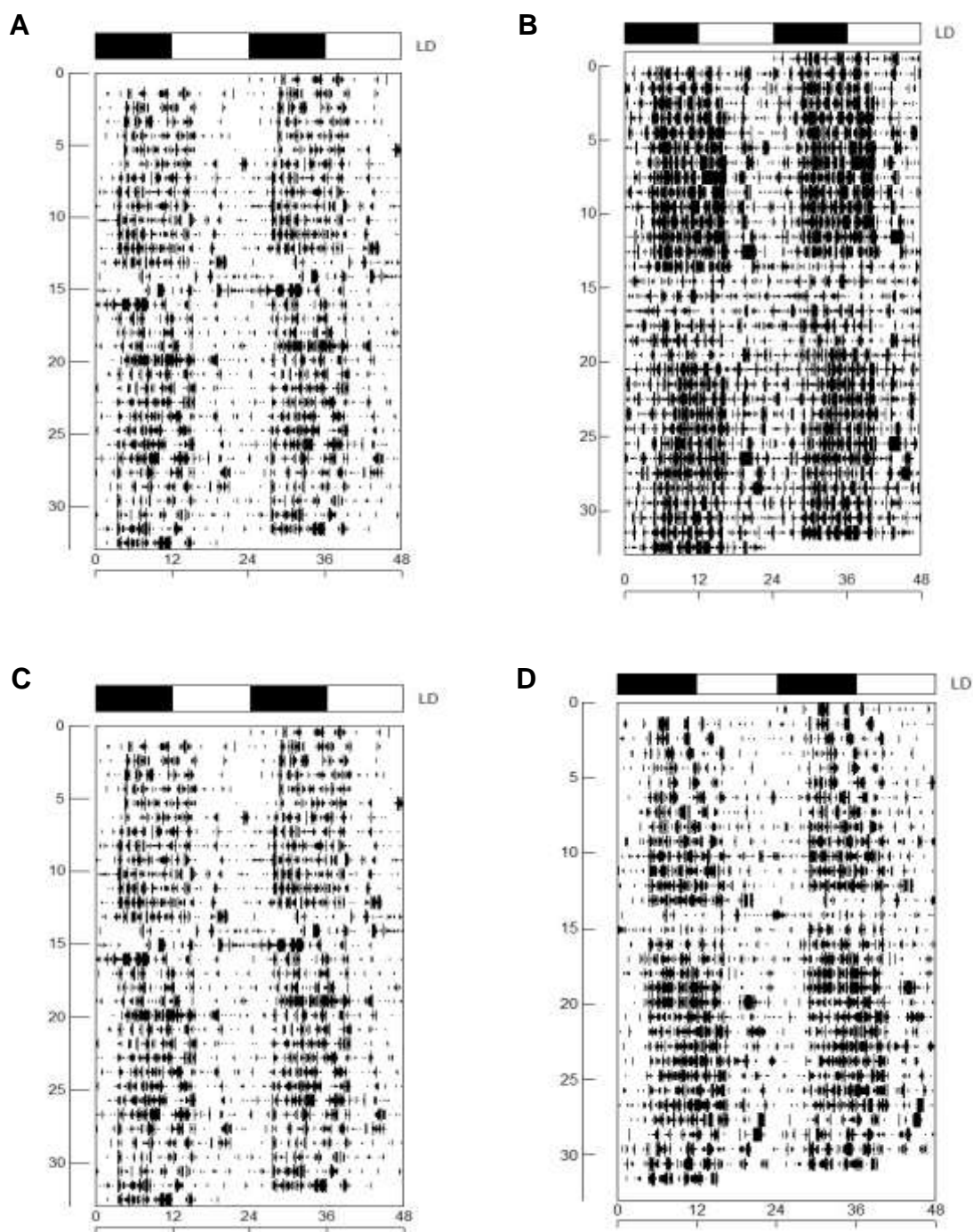


Figura 11 - Actogramas de ratos mantidos em ciclo claro/escuro 12h:12 horas. O gráfico está duplicado na horizontal para facilitar a visualização dos dados. Cada linha representa um dia, e as barras verticais pretas indicam atividade do animal. Ritmo de atividade/repouso sincronizado com acender e apagar das luzes. (A) Actograma de rato Controle. (B) – Actograma de rato submetido a Bulbectomia olfatória. (C) – Actograma de rato suplementado com Oléo de Peixe. (D) – Actograma de rato suplementado com Oléo de Peixe e submetido a bulbectomia olfatória .

5.4 Atividade

A análise por ANOVA de duas vias para atividade total (figura 12) dos animais não foi diferente entre os grupos, OP ($F_{1,27} = 0,46$, $p = 0,49$), OBX ($F_{1,27} = 2,05$, $p = 0,16$) e interação ($F_{1,27} = 1,53$, $p = 0,22$).

Nos três momentos (pré-cirurgia, pós-cirurgia e pós-testes comportamentais) em que dividimos as análises, houve diferença para atividade somente para o grupo OP.

A atividade pré-cirurgia do grupo OP foi menor ($F_{1,27} = 17,75$, $p = 0,0002$) com pós-teste ($p = 0,0001$) em relação aos outros 3 grupos.

No pós-cirurgia, também, o grupo OP ($F_{1,27} = 3,5$, $p = 0,07$) com teste de Neuman – Keuls ($p = 0,0009$) foi diferente dos outros grupos.

No pós-testes comportamentais, na ANOVA de duas vias, o OP teve valor de ($F_{1,27} = 2,20$, $p = 0,15$), em relação ao OBX ($F_{1,27} = 13,35$, $p = 0,001$) e para OPOBX ($F_{1,27} = 1,10$, $p = 0,30$). Nesta fase ainda, no pós-teste, o grupo OP apresentou menor atividade, diferente do OBX ($p = 0,006$) e para OPOBX ($p = 0,007$).

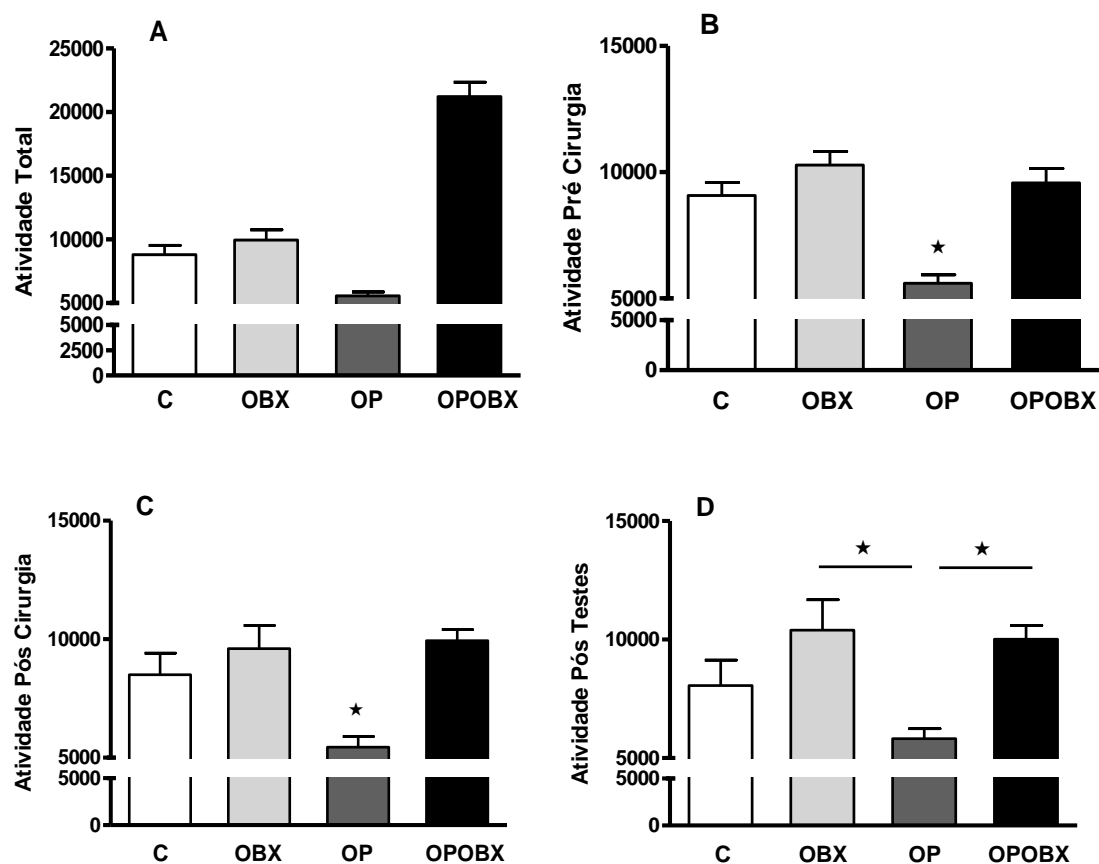


Figura 12 - Resultados do registro de: (A) Atividade total; (B) Atividade pré- cirurgia; (C) Atividade pós-cirurgia; (D) Atividade pós- testes comportamentais. Grupo controle (C), $n = 8$; grupo óleo de peixe (OP), $n = 8$; grupo bulbectomizado (OBX), $n = 7$; grupo suplementado e bulbectomizado (OPOBX), $n = 8$. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ comparado aos animais controle.

5.4.1 Atividade na Fase Clara

Na fase clara total a menor atividade foi do grupo OP ($F_{1,27} = 11,41$, $p = 0,002$) e no pós-teste ($p = 0,0001$) diferente dos grupos C, OBX e OPOBX.

No pré-cirurgia ocorreu o mesmo ($F_{1,27} = 9,13$, $p = 0,005$) e pós teste ($p = 0,0004$) diferença do grupo C, ($p = 0,0003$) diferença do grupo OBX e ($p = 0,0002$) diferença do grupo OPOBX.

No pós-cirurgia OP ($F_{1,1} = 9,04$, $p = 0,005$), com pós-teste grupo C ($p = 0,004$), grupo OBX ($p = 0,001$) e grupo OPOBX ($p = 0,002$).

E no pós-testes comportamentais o efeito foi igual, ($F_{1,27} = 5,61$, $p = 0,02$) menor atividade OP, diferente do C ($p = 0,002$), OBX ($p = 0,004$) e OPOBX ($p = 0,002$) no pós- teste, como mostra a figura 13.

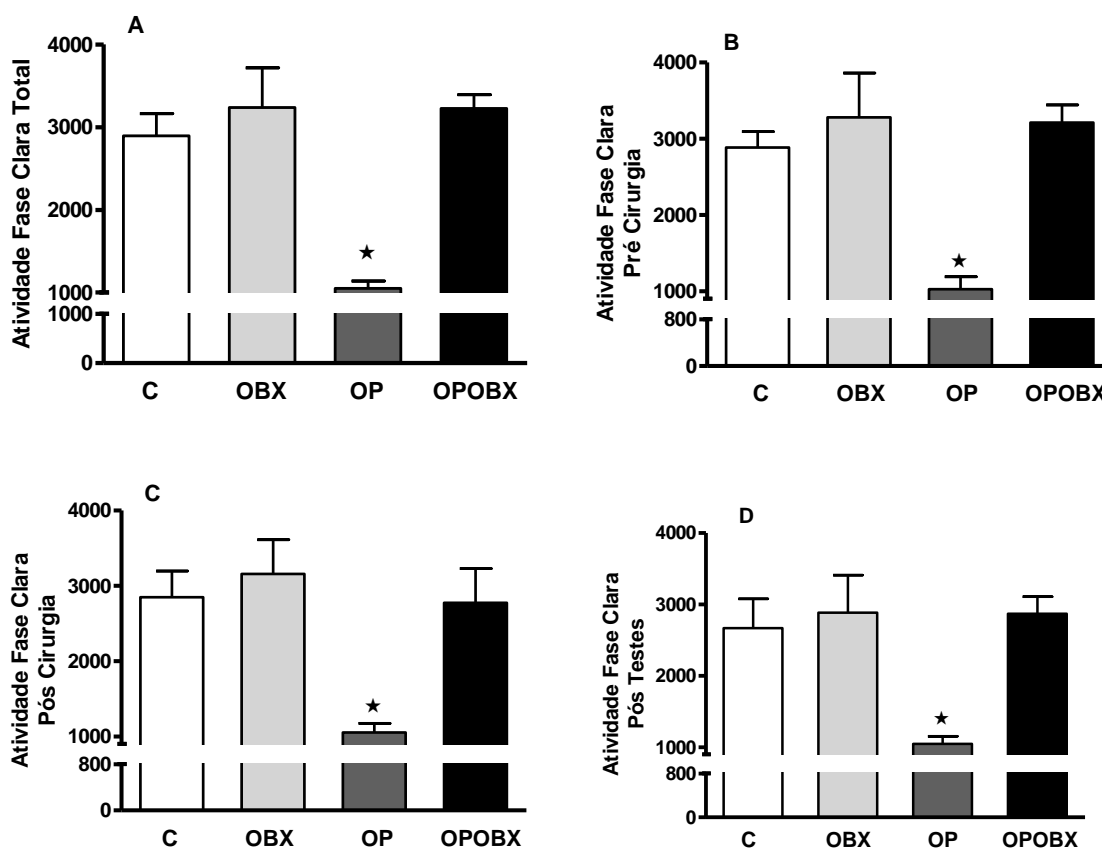


Figura 13 - Resultados do registro de: (A) Atividade fase clara; (B) Atividade fase clara pré-cirurgia; (C) Atividade fase clara pós-cirurgia; (D) Atividade fase clara pós-testes comportamentais. Grupo controle (C), $n = 8$; grupo óleo de peixe (OP), $n = 8$; grupo bulbectomizado (OBX), $n = 7$; grupo suplementado e bulbectomizado (OPOBX), $n = 8$. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ comparado aos animais controle.

5.4.2 Atividade na Fase Escura

Na fase escura (figura 14) houve diminuição da atividade total para o fator OP ($F_{1,27} = 2,09$, $p = 0,15$), para OBX ($F_{1,27} = 10,3$, $p = 0,003$) e para interação entre estes fatores ($F_{1,27} = 2,25$, $p = 0,14$). O pós-teste de Newman Keuls mostrou que o OP apresenta-se diminuído com relação aos grupos C ($p = 0,04$), OBX ($p = 0,007$) e OPOBX ($p = 0,012$).

Na fase pré-cirurgia o OP apresentou menor atividade, com diferença do grupo OBX ($F_{1,27} = 9,54$, $p = 0,004$) e não para interação ($F_{1,27} = 0,36$, $p = 0,55$). No pós-teste os valores foram para OBX ($p = 0,007$), OPOBX ($p = 0,04$) e grupo C sem efeito de ($p = 0,08$).

Após a cirurgia, a atividade do grupo OP foi similar ao da pré-cirurgia, com diferença do grupo OBX ($F_{1,27} = 8,08$, $p = 0,008$), e sem diferença para interação suplementação e cirurgia ($F_{1,27} = 1,96$, $p = 0,17$). No pós-teste a diferença foi para OBX ($p = 0,04$) e OPOBX ($p = 0,02$).

No período pós-testes comportamentais, a atividade na fase escura não apresentou diferença significativa, no ANOVA para OBX ($F_{1,27} = 9,97$, $p = 0,003$), suplementação ($F_{1,27} = 0,48$, $p = 0,49$) e interação ($F_{1,27} = 0,02$, $p = 0,86$). No pós teste Newman-Keuls os valores de “ p ” foram, OP ($p = 0,54$), OBX ($p = 0,10$) e OPOBX ($p = 0,09$).

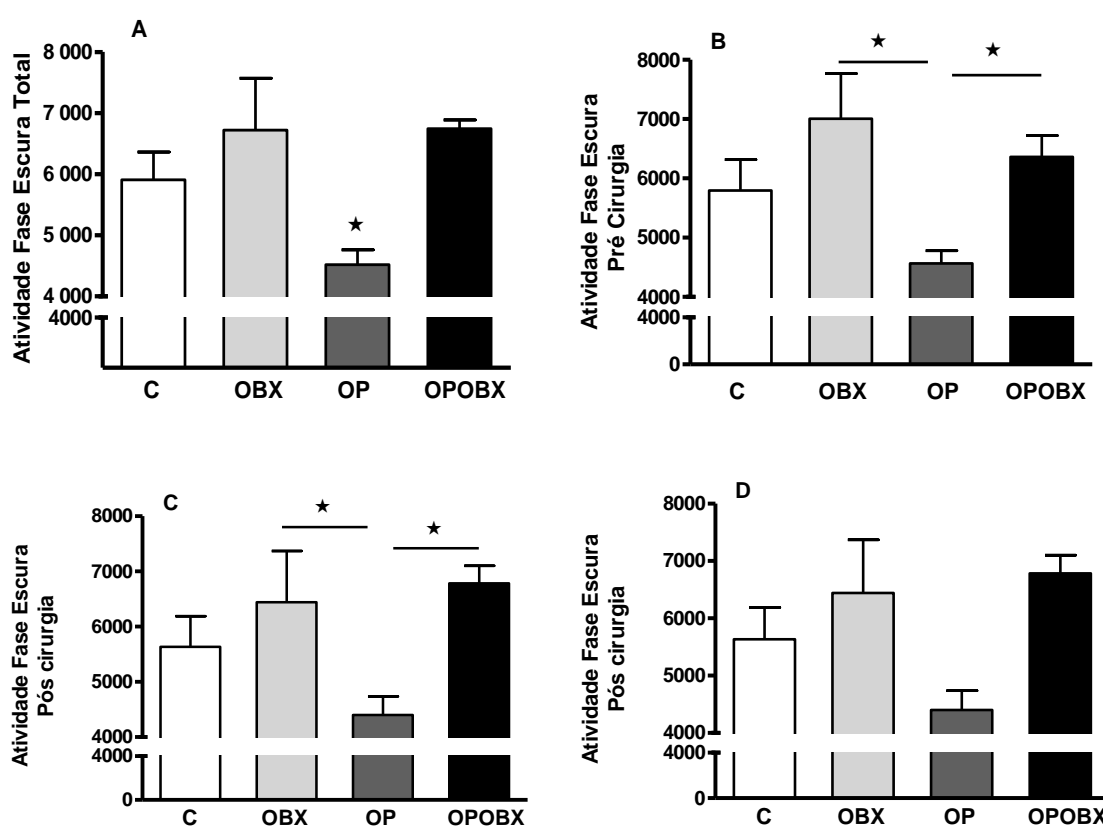


Figura 14 - Resultados do registro de: (A) Atividade total fase escura; (B) Atividade fase escura pré-cirurgia; (C) Atividade fase escura pós-cirurgia; (D) Atividade fase escura pós-testes comportamentais. Grupo controle (C), $n = 8$; grupo óleo de peixe (OP), $n = 8$; grupo bulbectomizado (OBX), $n = 7$; grupo suplementado e bulbectomizado (OPOBX), $n = 8$. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ comparado aos animais controle.

5.4.3 Atividade 10 dias seguintes à cirurgia

Verificamos os resultados nos 10 dias seguintes à cirurgia (figura 15) e a atividade foi menor no grupo OP ($F_{1,27} = 3,99$, $p = 0,05$) e no pós teste ($p = 0,01$) diferente do grupo Controle. Para o grupo OBX ($F_{1,27} = 0,46$, $p = 0,50$) e para OPOBX ($F_{1,27} = 7,52$, $p = 0,01$), no pós-teste ($p = 0,35$) para OPOBX e ($p = 0,32$) para o grupo OBX.

No mesmo período, na fase clara, o grupo OP também apresentou menor atividade ($F_{1,27} = 7,42$, $p = 0,01$) e no pós teste o OP foi diferente de todos os grupos grupo C ($p = 0,0006$). No grupo OBX ($F_{1,27} = 8,94$, $p = 0,005$) e pós-teste ($p = 0,001$) e grupo OPOBX, no ANOVA, ($F_{1,27} = 8,21$, $p = 0,007$) e pós-teste ($p = 0,98$).

Na fase escura não houve diferença, suplementação ($F_{1,27} = 0,70$, $p = 0,40$), grupo da cirurgia ($F_{1,27} = 1,77$, $p = 0,19$) e interação ($F_{1,27} = 5,60$, $p = 0,02$). No pós-teste Newman-Keuls o grupo OP ($p = 0,07$), OBX ($p = 0,47$) e o OPOBX ($p = 0,73$).

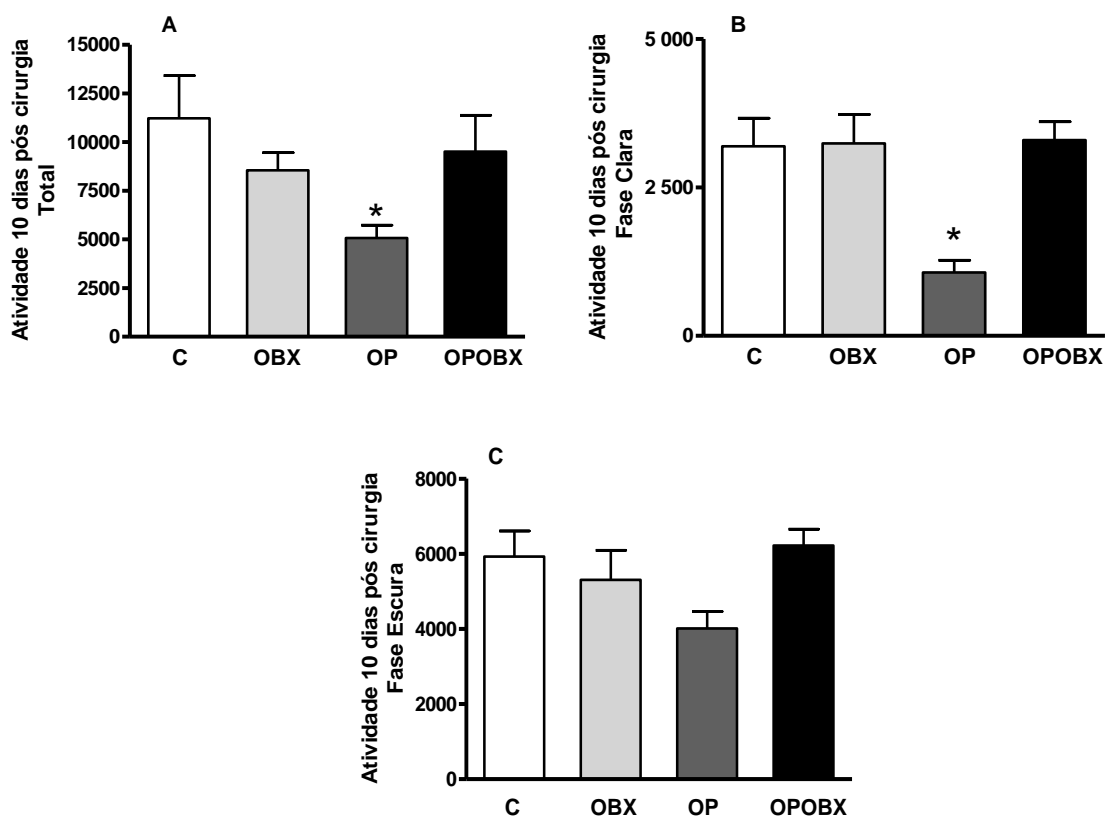


Figura 15 - Resultados do registro de: (A) Atividade 10 dias pós-cirurgia; (B) Atividade 10 dias pós-cirurgia fase clara; (C) Atividade 10 dias pós-cirurgia fase escura. Grupo controle (C), $n = 8$; grupo óleo de peixe (OP), $n = 8$; grupo bulbectomizado (OBX), $n = 7$; grupo suplementado e bulbectomizado (OPOBX), $n = 8$. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida do pós teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ comparado aos animais controle.

5.5 Periodograma e potência

O periodograma (figura 16) dos animais foi de aproximadamente 1440 minutos, e não houve diferença significativa, na suplementação ($F_{1,27} = 1$, $p = 0,46$), OBX ($F_{1,27} = 0$, $p = 0,65$) e OPOBX ($F_{1,27} = 0$, $p = 0,65$). No pós-teste o valor de OP ($p = 0,97$), OBX ($p = 0,53$) e o OPOBX ($p = 0,84$).

Nos momentos analisados (pré-cirurgia, pós-cirurgia e pós-testes comportamentais), também não houve diferença no periodograma, apresentou os valores em seguida.

Na pré-cirurgia os valores na ANOVA de duas vias foram, OP ($F_{1,27} = 2$, $p = 0,21$), OBX ($F_{1,27} = 0$, $p = 0,84$) e OPOBX ($F_{1,27} = 1$, $p = 0,38$) e pós-teste OP ($p = 0,43$), OBX ($p = 0,62$) e a interação OPOBX ($p = 0,72$).

Na fase pós-cirurgia, os valores se apresentaram nessa forma OP ($F_{1,27} = 2,62$, $p = 0,11$), OBX ($F_{1,27} = 1,24$, $p = 0,27$) e OPOBX ($F_{1,27} = 2,01$, $p = 0,16$) e pós-teste OP ($p = 0,88$), OBX ($p = 0,08$) e a interação OPOBX ($p = 0,93$).

No pós-testes comportamentais, a suplementação teve ($F_{1,27} = 0$, $p = 0,99$), OBX ($F_{1,27} = 1,1$, $p = 0,29$) e OPOBX ($F_{1,27} = 0,1$, $p = 0,72$) e pós-teste de Newman-Keuls o OP ($p = 0,80$), OBX ($p = 0,75$) e o grupo OPOBX ($p = 0,73$).

A potência também não mostrou diferença significativa. ANOVA do grupo OP ($F_{1,27} = 0,03$, $p = 0,86$), OBX ($F_{1,27} = 0,12$, $p = 0,72$) e OPOBX ($F_{1,27} = 6,96$, $p = 0,013$) e pós-teste Newman-Keuls OP ($p = 0,13$), OBX ($p = 0,17$) e o OPOBX ($p = 0,70$).

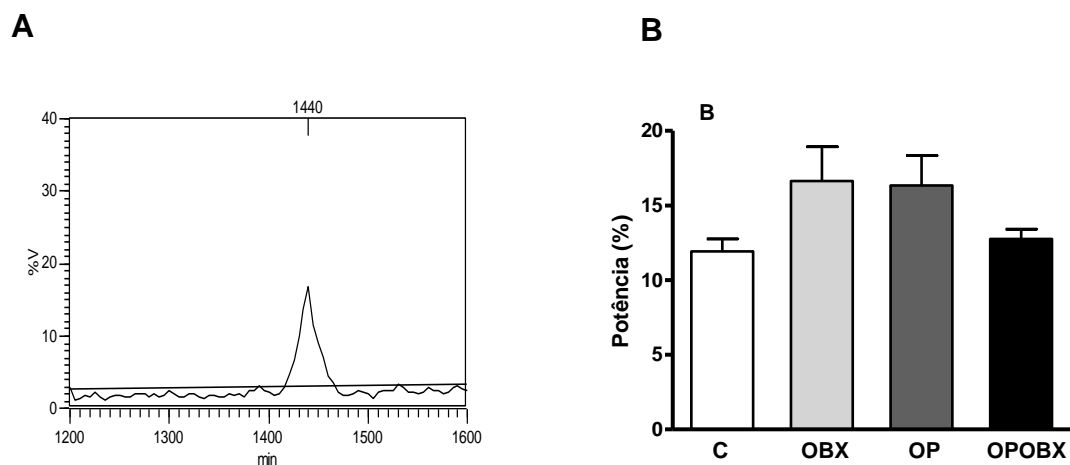


Figura 16 – Gráfico do (A) Resultado da análise de periodograma de Sokolove-Bushell. Imagem gráfica representativa de um animal do grupo OBX, expressando período endógeno de 24 horas (1440 minutos), no qual o eixo Y representa o valor % de atividade e o eixo X o tempo em minutos. E (B) potência.

6 DISCUSSÃO

Tendo em vista o conhecido efeito antidepressivo do óleo de peixe em comportamento tipo-depressivo decorrentes da bulbectomia olfatória, o qual envolve restauração dos níveis de serotonina (PUDELL, *et al.*, 2013), o presente estudo investigou se houve alteração do ritmo circadiano nos animais submetidos ao modelo de depressão da bulbectomia olfatória que foram ou não suplementados com óleo de peixe, rico em EPA e DHA; e ainda, o efeito desta suplementação sobre os comportamentos de depressão e atividade locomotora.

A hipótese inicial do estudo era de que o típico comportamento tipo-depressivo apresentado por animais submetidos à remoção dos bulbos olfatórios poderia estar ligado a alterações do ciclo de atividade/repouso destes animais e que uma das ações antidepressivas do óleo de peixe pudesse estar associada a manutenção dos ritmos. Considerando o bulbo olfatório, sede central de elaboração das impressões olfativas primárias transmitidas pelo primeiro par de nervos cranianos (nervo olfatório) ao cérebro imaginamos que o mesmo influenciasse o ritmo atividade/repouso dos ratos Wistar.

Com relação a alterações de neurotransmissão foi descrito que a bulbectomia causa uma redução significativa de serotonina, do seu metabólito 5-HIAA e da taxa de renovação no hipocampo (PUDELL, *et al.*, 2013), córtex e em outras áreas do sistema nervoso central (HIRSCH, 1980), além de aumentar a concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) no núcleo supraquiasmático (VAGELL, *et al.*, 1991).

No atual estudo, os resultados do teste comportamental do campo aberto revelaram que o grupo submetido à OBX apresentou parâmetros elevados para distância total, distância periférica, tempo na periferia e velocidade. Várias investigações (BREUER, *et al.*, 2007; PUDELL, *et al.*, 2013; SONG e LEONARD, 2005; WANG, *et al.*, 2010; ZUEGER, *et al.*, 2005) corroboram nossos resultados confirmando a boa realização do procedimento cirúrgico no animal. A hiperatividade observada nesse modelo de depressão acontece devido às lesões retrógradadas em todas as áreas ligadas ao bulbo olfatório, pelo rompimento das conexões neurais (SONG e LEONARD, 2005).

Juntamente com a hiperatividade observamos nos animais submetidos à OBX aumento na ansiedade expressa pelo aumento no tempo de ambulação na periferia do campo aberto, dados também encontrados por outros autores

(PUDELL, *et al.*, 2013; SONG e LEONARD, 2005; WANG, *et al.*, 2007; MATURANA, *et al.*, 2015). Este resultado também garante o efeito do perfeito procedimento cirúrgico. Tal comportamento ansioso diminuiu nos animais do grupo OPOBX, pois os mesmos apresentaram valores semelhantes aos controles, mostrando um efeito do óleo de peixe.

Quanto à suplementação com OP, não houve efeito *per se* da mesma na melhoria dos efeitos motores no campo aberto. Dados esses reforçam estudos anteriores do nosso laboratório, que utilizaram a suplementação na mesma janela temporal utilizada neste estudo (NALIWAIKO, *et al.*, 2004; FERRAZ, *et al.*, 2008; FERRAZ, *et al.*, 2011; VINES, *et al.*, 2012; PUDELL, *et al.*, 2013). Além disso, o óleo de peixe foi capaz de prevenir os sintomas induzidos pela OBX no campo aberto, como mostra os resultados do grupo OPOBX, que foram valores semelhantes aos grupos C e OP.

Em relação ao teste de natação forçada modificado, que foi desenvolvido por POLSOLT, *et al.*, (1977) como um modelo de depressão e hoje referendado como um teste preditivo de efeitos antidepressivos, nossos resultados mostraram que a bulbectomia olfatória desencadeou um comportamento tipo-depressivo neste teste comportamental, expresso pelas frequências diminuída de natação e aumentada de imobilidade. Os dados do atual trabalho corroboram estudos clássicos que avaliaram e relacionaram a bulbectomia com o surgimento de depressão hiperativa (HARKIN, *et al.*, 2003; SONG e LEONARD, 2005), assim como trabalhos anteriores de nosso laboratório (PUDELL, *et al.*, 2013). Os ratos bulbectomizados apresentaram então o comportamento tipo-depressivo, o qual foi prevenido pela suplementação com OP durante as fases de gestação e lactação.

Essa ação protetora do OP com relação ao comportamento tipo-depressivo estabelecido após a OBX, vem sendo atribuído aos seus efeitos em aumentar os níveis de BDNF e serotonina no hipocampo de ratos adultos (VINES, *et al.*, 2012; PUDELL, *et al.*, 2014; CARABELLI, *et al.*, 2015). PUDELL, *et al.*, (2012) investigaram o efeito do OP em restaurar possíveis alterações neuroquímicas induzidas pelo modelo de depressão-OBX, estudo que resultou em decréscimo de serotonina e seu metabólito (5-HIAA) após a bulbectomia olfatória, dados que estão de acordo com outros autores (POSSIDENTE, *et al.*, 1996; SONG, *et al.*, 2010.). Interessantemente a serotonina parece assumir um papel regulador sobre o relógio biológico o que sugere que a possível

interferência causada nos ritmos circadianos pela bulbectomia seja permeada pela alteração serotoninérgica. Porém, no atual estudo não foi encontrada alteração dos ritmos circadianos após a bulbectomia olfatória.

Neste sentido, após a confirmação do efeito da cirurgia de bulbectomia olfatória pelos testes comportamentais, investigamos parâmetros de ritmicidade nos animais submetidos ou não a bulbectomia. A inspeção visual dos actogramas e a análise do periodograma nos permitiu afirmar que todos os grupos permaneceram sincronizados ao ciclo claro/escuro.

Nosso estudo mostrou que a OBX não teve efeito sobre o ritmo atividade/repouso dos animais. No entanto, em trabalhos anteriores que, também avaliaram o efeito da OBX sobre o ritmo de atividade/repouso em ratos, camundongos e hamsters, os autores observaram um retardo no início da atividade desencadeado pela bulbectomia (LUMIA, *et al.*, 1992); outros encontraram um maior período em livre curso (POSSIDENTE, *et al.*, 1992; PIEPER, *et al.*, 1991) e outros um aumento significativo nos níveis de atividade do animal (POSSIDENTE, *et al.*, 1996).

Em revisão apresentada por MARTYNHAK, *et al.*, (2015), em geral, o desenvolvimento de comportamento tipo-depressivo está associado com arritmicidade ou alongamento do período circadiano. Porém, surpreendentemente, no atual trabalho, apesar do comportamento tipo-depressivo apresentado pelos animais bulbectomizados, não houve alteração do ritmo atividade/repouso.

POSSIDENTE, *et al.*, (1996) investigaram a ação da bulbectomia e o efeito da fluoxetina, inibidor da receptação de serotonina, sobre a atividade circadiana em camundongos por meio do monitoramento da atividade destes animais submetidos a ciclo claro/escuro e sob escuro constante. Estes autores observaram em camundongos que a bulbectomia promoveu um maior período de livre curso e atrasou o início da atividade, além disso, mostraram que a fluoxetina normalizou os níveis elevados de atividade nos animais bulbectomizados e encurtou o período circadiano de livre curso.

Por outro lado, GRANADOS-FUENTES, *et al.*, (2004) mostraram que a remoção do bulbo olfatório não foi suficiente para gerar padrões circadianos de locomoção alterados e nem para o arrastamento fótico ou período de regulação da atividade locomotora.

LEGATES, *et al.*, (2012) investigaram se ciclos de luz brilhante (3,5 h de luz e 3,5 h de escuro) afetavam humor e função cognitiva. Apesar dos animais apresentarem ritmicidade normal exibiram comportamentos tipo-depressivo aumentado, além de prejuízo de aprendizagem e potenciação de longa duração hipocampal diminuída.

Portanto, o conjunto destes resultados parece evidenciar que alterações de ritmicidade não participariam da gênese das alterações de humor desencadeadas pela bulbectomia. Na verdade, as interações entre ciclo claro/escuro, ritmicidade circadiana e transtornos de humor são complexas.

Assim, apesar da não constatação de alterações de ritmicidade provocadas pela bulbectomia ao longo dos registros realizados nos períodos claro e escuro, outra análise importante seria o monitoramento da atividade circadiana dos animais submetidos ao escuro constante, livres de pistas ambientais. Esta condição experimental possibilitaria a investigação do comportamento do animal em uma situação de livre-curso, permitindo a identificação de possíveis efeitos da cirurgia sobre o período endógeno dos animais. Trabalhos futuro explorarão este tópico.

Alterações da exposição ao ciclo claro/escuro e, conseqüentemente, à luz, podem afetar o humor de maneiras distintas. Segundo LEGATES, *et al.*, (2014) o humor e a cognição podem ser influenciados pela luz de duas maneiras. Pela via direta, a luz pode afetar o humor sem alterar o mecanismo de regulação do sono e da ritmicidade circadiana. A via indireta é aquela por meio da qual a luz regula o humor secundariamente à modulação do sono e do ritmo circadiano.

A atividade total dos animais não foi diferente entre os grupos. Porém, nas três fases temporais estudadas (pré-cirurgia, pós-cirurgia e pós-testes comportamentais) em que dividimos as análises, houve diferença para atividade somente para o grupo OP que apresentou menor atividade locomotora sendo diferente do grupo bulbectomizado e do grupo óleo de peixe/operado.

Ao analisarmos os dados referentes às fases clara e escura observamos redução significativa de atividade locomotora especificamente no grupo OP. Este resultado foi bastante surpreendente haja vista que desconhecemos efeito do óleo de peixe *per se* em reduzir o comportamento motor, porém há um estudo de 2008 que sugeriu que a deficiência dietética de ácidos graxos poli-insaturados em hamsters, levou a uma hiperlocomoção associado com aumento de dopamina

estriatal (LAVIALLE, *et. al.*, 2008). Uma possível explicação a este achado teria sido a intensidade luminosa que não se apresentou rigorosamente igual entre animais experimentais OP e os demais animais. Este achado merece uma investigação mais efetiva a partir de futuros experimentos.

7 CONCLUSÕES

Os achados obtidos nos grupos suplementados com óleo de peixe ou não, a partir do modelo de depressão, bulbectomia olfatória, mostraram que:

- 1) A suplementação com óleo de peixe reverteu o comportamento tipo-depressivo e a hiperatividade presentes no modelo de depressão de bulbectomia olfatória.
- 2) Os dados obtidos a partir do modelo de depressão de bulbectomia olfatória não alteraram ritmo atividade/ repouso dos ratos adultos suplementados ou não com óleo de peixe;
- 3) Os efeitos antidepressivos da suplementação com óleo de peixe parecem não estar relacionados a alterações do ritmo atividade/ repouso dos animais, sugerindo que os mecanismos sejam independentes do sistema de temporização;

8 REFERÊNCIAS

- AKISKAL, H.S. Mood disorders: introduction and overview. In **Comprehensive Textbook of Psychiatry**: B.J. Sadock and V.A. Sadock, eds. (New York: Lippincott, Williams & Wilkins); 1284–1298, 2000.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013.
- ANISMAN, H., MERALI, Z. Cytokines, stress, and depressive illness. **Brain, Behavior, and Immunity**; 16; 513-524, 2002.
- ATTAR-BASHI, N.M., FRAUMAN, A.G., SICLAIR, A.J. α -linolenic acid and the risk of prostate cancer. What is the evidence? **The Journal of Urology**; 171: 1402-1407, 2004.
- AUBERT, A. Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**; 23, 1029–1036, 1999.
- BANASR, M., CHOWDHURY, G.M., TERWILLIGER, R., NEWTON, S.S., DUMAN, R.S., BEHAR, K.L., SANACORA, G. Glial pathology in an animal model of depression: Reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. **Mol Psychiatry**; 15: 501–511, 2010.
- BEAR, F.B., CONNORS, B.W., PARADISO, M.A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BERNE, R. M., LEVY, M. N., KOEPPEN, B. M., STANTON, B. A. **Fisiologia**. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- BERTRAND, P. C., O'KUSKY, J. R., INNIS, S. M. Maternal dietary n-3 fatty acid deficiency alters neurogenesis in the embryonic rat brain. **J. Nutr.**; 136: 1570-1575, 2006.
- BODNAR, L. M.; WISNER, K. L.. Nutrition and Depression: Implications for Improving Mental Health Among Childbearing-Aged Women. **Biological Psychiatry**; 58: 679–685, 2005.
- BOLDRINI, M., HEN, R., UNDERWOOD, M.D., ROSOKLIJA, G.B., DWORK, A.J., MANN, J.J., ARANGO, V. Hippocampal Angiogenesis and Progenitor Cell Proliferation Are Increased with Antidepressant Use in Major Depression. **Biol Psychiatry**; 72: 562-571, 2012.
- BOLLINGER, T., SCHIBLER, U. Circadian rhythms – from genes to physiology and disease. *Medical intelligence*; 24:1-11, 2014.

- BORRE, Y., BOSMAN, E., LEMSTRA, S., WESTPHAL, K.G., OLIVIER, B., OOSTING, R.S. Memantine partly rescues behavioral and cognitive deficits in an animal model of neurodegeneration. **Neuropharmacology**; 62: 2010-2017, 2012.
- BOTHAM, K. M.; MAYES, P. A. Biossíntese dos ácidos graxos e eicosanóides. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. **Harper Bioquímica Ilustrada**. 27ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007.
- BOYCE, P., BARRIBALL, E. Circadian rhythms and depression. **Australian Family physician**; 39: 35, 2010.
- BREUER, M.E., GROENINK, L., OOSTING, R.S., WESTENBERG, H.G.M and OLIVIER, B. Long term behavioral changes after cessation of chronic antidepressant treatment in olfactory bulbectomized rats. **Biol. Psychiatry**; 61: 990-995, 2007.
- BRUNONI, A.R., BOGGIO, P.S., FREGNI, F. Can the 'yin and yang' BDNF hypothesis be used to predict the effects of rTMS treatment in neuropsychiatry? **Medical Hypotheses**; 71; 279-282, 2008.
- CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; 36: 433-446, 2003.
- CAMBRA, T., VILAPLANA, J., TORRES, A., CANAL M. M., CASAMITJANA, N., CAMPUZANO, A., DIEZ- NOGUERA, A. Constant Bright Light (LL) during Lactation in Rats Prevents Arrhythmicity Due to LL. **Physiology & Behavior**; 63: 875-882, 1998.
- CHALON, S., VANCASSEL, S., ZIMMER, L., GUILLOTEAU, D., DURAND, G. Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. **Lipids**; 36: 937- 944, 2001.
- CIZZA, G.; RONSAVILLE, D.S.; KLEITZ, H.; ESKANDARI, F.; MISTRY, S. et.al. Clinical Subtypes of Depression Are Associated with Specific Metabolic Parameters and Circadian Endocrine Profiles in Women: The Power Study. **Plos One**; 7, 2012.
- CONSONI, F. T., VITAL, M. A. B. F., ANDREATINI, R. Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test. **European Neuropsychopharmacology**; 16: 451-458, 2006.
- COOPER, S., ABBOTT, A. Clinical psychopharmacology may benefit from new advances in 5-HT pharmacology. **Trends in pharmacological Sciences**. (9) 108, 1988.
- COOPER, G. M., HAUSMAN, R. **A célula. Uma abordagem molecular**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

- CRYAN, J. F., PAGE, M. E., LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. **Eur J Pharmacol**; 436:197-205, 2002.
- DAHL, J., ORMASTAD, H., AASS, H.C.D., MALT, U.F., BENDZ, L.T., SANDVIK, L., BRUNDIN, L., ANDREASSEN, O.A. The plasma levels of various cytokines are increased during ongoing depression and are reduced to normal levels after recovery. **Psychoneuroendocrinology**; 45: 77-86, 2014.
- DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology (Berl)**, 121: 66-72., 1995.
- DENIS, I., POTIER, B., VANCASSEL, S., HEBERDEN, C., LAVIALLE, M. Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: Body of evidence and possible mechanisms. **Ageing Research Reviews**; 12: 579-594, 2013.
- DOWLATI, Y., HERRMANN, N., SWARDFAGER, W., LUI, H., SHAM, L., REIM, E.K., LANCTÔT, K.L. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. **Biol Psychiatry**, 67: 446–457, 2010.
- FAROOQUI, A. A., HORROCKS, L. A., FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. **Chem Phys Lipids**; 106: 1-29, 2000.
- FAVA, M., KENDLER, K.S. Major depressive disorder. **Neuron**; 28: 335-41, 2000
- FEDOROVA, I., HUSSEIN, N., DI MARTINO, C., MORIGUCHI, T., HOSHIBA, J., MAJCHRZAK, S., SALEM JR, N. An n-3 fatty acid deficient diet affects mouse spatial learning in the Barnes circular maze. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**; 77: 269- 277, 2007.
- FERRAZ, A.C., KISS, A., ARAÚJO, R.L.F., SALLES, H.M.R., NALIWAIKO, K., PAMPLONA, J., MATHEUSSI, F. The antidepressant role of dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**; 78: 183-188, 2008.
- FERRAZ, A.C., DELATTRE, A.M., ALMENDRA, R.G., SONAGLI, M., BORGES, C., ARAUJO, P., ANDERSEN, M.L., TUFIK, S., LIMA, M.M.S. Chronic ω -3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. **Behavioural Brain Research**; 219: 116–122, 2011.
- FOSTER, R.G., HANKINS, M.W. Circadian vision. **Current Biology**; 17: R746-R751, 2007.
- GONÇALES, C.A.V., MACHADO, A.L. DEPRESSÃO, O MAL DO SÉCULO: DE QUE SÉCULO? **R Enferm UERJ**, 15(2):298-304, 2007.

- GOMEZ-PINILLA, F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. **Nature Reviews Neuroscience**; 9: 568-578, 2008.
- GOODIER,R. Is Depression Less Common Among Men, or Are They Less Likely to Acknowledge It? Nova Iorque: Medscape; 28 de abril de, 2014 [acessado em 07 de novembro de 2015]. Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/824217>
- GORWOOD, P. Restoring circadian rhythms: a new way to successfully manage depression. **J. Psychopharmacology**; 24: 15-19, 2010
- GRANADOS-FUENTES,D.,SAXENA,M.T.,PROLO,L.M.,ATON,S.J., ERZOG,E.D. Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. **Eur J Neurosci.**; 19: 898-906, 2004.
- GRANADOS-FUENTES,D., PROLO,L.M., ABRAHAM,U., HERZOG,E.D. The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. **J Neurosci**, 2006.
- GRANDIN,L.D., ALLOY,L.B., ABRAMSON,L.Y., The social zeitgeber theory, circadian rhythms, and mood disorders: review and evaluation. **Clin. Psychol. Rev.**; 26: 679-694, 2006.
- GREEN, P., HERMESH, H., MONSELISE, A., MAROM, S., PRESBURGER, G., WEIZMAN, A. Red cell membrane omega-3 fatty acids are decreased in nondepressed patients with social anxiety disorder. **European Neuropsychopharmacology**; 16: 107-113, 2006.
- HAMADA, T., HONMA,S., HONMA,K. Light responsiveness of clock genes, *Per1* and *Per2*, in the olfactory bulb of mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**; 409: 727-731, 2011.
- HARKIN,A. K., LEONARD, B. E. A review of the relevance and validity of olfactory bulbectomy as a model of depression. **Clinical Neuroscience Research**; 3: 253-264, 2003.
- HENDRIKSEN,H., MEULENDIJKS,D., DOUMA,T.N., BINK,D.I., BREUER,M.E., WESTPHAL,K.G.C., OLIVIER,B., OOSTING,R.O. Environmental enrichment has antidepressant-like action without improving learning and memory deficits in olfactory bulbectomized rats. **Neuropharmacology**; 62: 270-277, 2012.
- HIRSCH, J., The neurochemical sequelae of olfactory bulbectomy. **Life Sci.**; 26: 1551-1559, 1980.
- JIMÉNEZ, J., BOZA, J., SUARÉZ, M.D. and GIL, A. "The effect of a formula supplemented with n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids on plasma phospholipid, liver microsomal, retinal, and brain fatty acid

- composition in neonatal piglets”, **Nutritional Biochemistry**; 8: 217–223, 1997.
- JUMP, D. B. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. **J Biol Chem**; 277: 8755-8758, 2002.
- JUMPSSEN, J.A., LIEN, E.L., GOH, Y.K., CLANDININ, M.T. During neuronal and glial cell development diet n-6 to n-3 fatty acid ratio alters the fatty acid composition of phosphatidylinositol and phosphatidylserine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism**; 1347: 40-50, 1997.
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J.H., SIEGELBAUM, S.A. *Princípios de Neurociência*. 5ª ed. Porto Alegre. Artmed, 2014.
- KIM, Y., Na, K., MYINT, A., LEONARD, B.E. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**; 64: 277-284, 2016.
- KISS, J.P. Theory of active antidepressants: A nonsynaptic approach to the treatment of depression. **Neurochemistry International**; 52: 34-39, 2008.
- KOO, J., RUSSO, S., FERGUSON, D., NESTLER, E., DUMAN, R. Nuclear factor-KappaB is a critical of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 107: 2669-2674, 2010.
- KRISHNAN, V., BERTON, O., NESTLER, E. The use of animal models in psychiatric research and treatment. **Am. J. Psychiatry**; 165-1109, 2008.
- KRISHNAN & NESTLER. The molecular neurobiology of depression. **Nature**; 455: 894-902, 2008.
- KRONFELD-SCHOR, N.; EINAT, H. Circadian rhythms and depression: Human psychopathology and animal models. **Neuropharmacology**; 62: 101-114, 2012.
- LAURITZEN, L., HANSEN, H. S., JORGENSEN, M. H., MICHAELSEN, K. F. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. **Prog Lipid Res**; 40: 1-94, 2001.
- LAVIALLE, M., CHAMPEIL-POTOKAR, G., ALESSANDRI, J.M., BALASSE, L., GUESNET, P., PAPIILLON, C., PÉVET, P., VANCASSEL, S., VIVIEN-ROELS, B., DENIS, L. An (n-3) polyunsaturated fatty acid-deficient diet disturbs daily locomotor activity, melatonin rhythm, and striatal dopamine in Syrian hamsters. **J Nutr**. 138 (9):1719-24, 2008.
- LEHNINGER, A.L. *Princípios de Bioquímica*. 4ª ed. São Paulo. Sarvier, 2006.

- LEGATES,T.A., ALTIMUS,C.M., WANG,H., LEE,H.K., YANG,S.,ZHAO,H., KIRKWOOD,A., WEBER,E.T., HATTAR,S. Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. **Nature**; 491, 2012.
- LEGATES,T.A., FERNANDE,D.C., HATTAR,S. Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. **Nat Rev Neurosci.**; 15 :443-454, 2014.
- LENT, ROBERTO. **Cem Bilhões de Neurônios? Conceitos Fundamentais de Neurociência.** 2ª ed. Rio de Janeiro. Atheneu, 2010.
- LEVANT, B.; OZIAS, M. K.; CARLSON, S. E. Diet (n-3) polyunsaturated fatty acid content and parity interact to alter maternal rat brain phospholipid fatty acid composition. **J. Nutr.**; 136: 2236 - 2242, 2006.
- LIN, P. Y., HUANG, S. Y., SU, K. P. A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. **Biol Psychiatry**; 68: 140-147, 2010.
- LUMIA, A.R., TEICHER, M.H., SALCHLI, F., AYERS, E. e POSSIDENTE, B.,Olfactory bulbectomy as a model for agitated hyposerotonergic depression, *Brain Res.*, 587; 181-185,1992.
- LUO,K., HONG,C., LIOU,J., HOU,S., HUANG,Y., TSAI,S. Differential regulation of neurotrophin S100B and BDNF in two rat models of epression.**Progress in Neuro- Psychopharmacology and Biological Psychiatry**; 34:1433 - 1439, 2010.
- MALKESMAN,O., AUSTIN,D.R., CHEN,G. Acute D-serine treatment produces anti depressant-like effects in rodents. **Int J Neuropsychopharmacol**; 15 :1135-1148, 2012.
- Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. Texto Revisado (DSM-5-TR). **American Psychiatric Association.** 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- MARTIN,T., BRUHN,J.G., BOHLIN,L. Food for thought . **Drug Discovery Today**; 11: 1115-1121, 2006.
- MARTYNHAK, B.J., CORREIA,D., MORAIS,L.H., ARAUJO,P., ANDERSEN,M.L., LIMA,M.M.S., LOUZADA,F.M., ANDREATINI,R. Neonatal exposure to constant light prevents anhedonia-like behavior induced by constant light exposure in adulthood. **Behavioural Brain Reseach**; 222: 10-14, 2011.
- MARTYNHAK, B.J., PEREIRA, M., SOUZA,C.P. e ANDREATINI,R. Stretch, Shrink, and Shatter the Rhythms: The Intrinsic Circadian Period in Mania and Depression. **CNS & Neurological Disorders- Drug Targets**; 14: 963-969, 2015.
- MATHERS, C.D., LONCAR,D. Updated projections of global mortality and burden of disease, 2002-2030: data sources, methods and results. **Evidence and Information for Policy**; WHO, 2006.

- MATURANA,M.J., PUDELL,C., TARGA,A.D., RODRIGUES,L.S., NOSEDA,A.C., FORTES,M.H., DOS SANTOS,P. DA CUNHA, C., ZANATA,A.C., LIMA,M.M. REM sleep deprivation reverses neurochemical and other depressive-like alterations induced by olfactory bulbectomy. **Mol Neurobiol.** 51(1):349-60, 2015.
- McCLUNG, C.A. Circadian rhythms and mood regulation: Insights from pre-clinical models. **European Neuropsychopharmacology**; 21: S683-S693, 2011.
- McNAMARA, R. K.; HAHAN, C. G.; JANDACEK, R.; RIDER, T., TSO, P.; STANFORD, K. E.; RICHTAND, N. M. Selective deficits in the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. **Biol. Psychiatry**; 62: 17-2, 2007.
- MCMNAMARA, R. K., JANDACEK, R., RIDER, T., TSO, P., COLE-STRAUSS, A., LIPTON, J. W. Omega-3 fatty acid deficiency increases constitutive pro-inflammatory cytokine production in rats: relationship with central serotonin turnover. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.**; 83: 185-191, 2010.
- MOHAWK,J.A., GREEN, C.B., TAKAHASHI,J.S. Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. **Annu. Rev. Neurosci.**; 35:445–62, 2012.
- MONTELEONE,P., MARTIADIS,V., MAJ, M. Circadian Rhythms and treatment implications in depression. **Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**; 35: 1569-1574, 2011.
- MONTÚFAR-CHAVEZNAVA,R., HERNÁNDEZ-CAMPOS,O., HUDSON,R., CALDELAS,I. Differential maturation of the molecular clockwork in the olfactory bulb and suprachiasmatic nucleus of the rabbit. **Neuroscience**; 207: 198-207, 2012.
- MOYER,R.W., KENNAWAY,D,J. Immunohistochemical localization of serotonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus. **Neuroscience Letters**; 271: 147-150, 1999.
- MUCIGNAT-CARETTA,C., BONDI,M., CARETTA, A.. Time course of alterations after olfactory bulbectomy in mice. **Physiol Behav.**; 89: 637-643, 2006.
- MURRAY,R.K., GRANNER,D.K., RODWELL,V.W. **Harper: bioquímica ilustrada.** 27 ed. São Paulo: MacGraw-Hill, 2007.
- NA, K.S., LEE, K.J., LEE, J.S., CHO, Y.S., JUNG, H.Y., Efficacy of adjunctive celecoxib treatment for patients with major depressive disorder: a meta-analysis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**; 48: 79–85, 2014.
- NALIWAIKO, K., ARAÚJO, R.L.F., FONSECA, R.V., CASTILHO, J.C., ANDREATINI, R., BELLISSIMO, M.I., OLIVEIRA, B.H., MARTINS, E.F.,

- CURI, R., FERNANDES, L.C., FERRAZ, A.C. Effects of fish oil on the central nervous system: a new potential antidepressant? **Nutr. Neurosci.**; 7: 91–99, 2004.
- NESTLER, E.J, BARROT, M, DILEONE, R.J, EISCH, A. J, GOLD, S. J, MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of Depression. **Neuron**, 2002.
- MOHAWK,J.A., TAKAHASHI,J.S. Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators.**Trends in Neurosciences**; 34: 349-358 , 2011.
- OTTO,S.J., HOUWELINGEN,A.C., HORNSTRA,G. The effect of different supplements containing docosahexaenoic acid on plasma and erythrocyte fatty acids of healthy non-pregnant women. **Nutrition Research**; 20: 917-927, 2000.
- PARKER, G.B., HERUC, G.A., HILTON, T.M., OLLEY, A., BROTHIE, H., HADZI-PAVLOVIC, D., FRIEND, C., WALSH, W.F., STOCKER, R. Low levels of docosahexaenoic acid identified in acute coronary syndrome patients with depression. **Psychiatry Research**; 141: 279- 286, 2006.
- PASCOE, M.C., CREWETHER,S.G., CAREY,L.M., CREWETHER,D.P. What you eat is what you are – A role for polyunsaturated fatty acids in neuroinflammation induced depression? **Clinical Nutrition**; 30: 407-415, 2011.
- PAXINOS G, WATSON C. The rat brain stereotaxic coordinates. **Academic Press**, San Diego, 5th edition, 2005.
- PIEPER, D.R. e LOBOCKI, C.A., Olfactory bulbectomy lengthens circadian period of locomotor activity in golden hamsters, **Am. J.Physiol.**; 30: R973-R978, 1991.
- PORSOLT, R.D., LE PICHON, M., JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. **Nature**; 266: 730–732, 1977.
- POSSIDENTE, B., LUMIA, A. R., MCELDOWNEY, S., RAPP, M. Fluoxetine shortens circadian period for wheel running activity in mice, **Brain Res. Bull.**; 28: 629-631, 1992.
- POSSIDENTE,B.,LUMIA, A.R., MCGINNIS,M.Y., RAPP, M., MCELDOWNEY, S. Effects of fluoxetine and olfactory bulbectomy on mouse circadian activity rhythms. **Brain Research**; 713: 108-113, 1996.
- PUDELL,C., VICENTE,B.A., DELATTRE,A.M., CARABELLI,B., MORI,M.A., SUCHECKI,D., MACHADO,R.B., ZANATA,S.M., VISENTAINER,J.V., SANTOS JUNIOR,O.O., LIMA,M.M.S., FERRAZ,A.C. Fish oil improves anxiety-like, depressive-like and cognitive behaviors in olfactory bulbectomised rats. **European Journal of Neuroscience**; 39: 266-274, 2014.

- QIU, X., *et al.*, Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. **Nature**; 433: 745–9, 2005.
- RANG & DALE. **Farmacologia**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- REPPERT,S.M. Cellular and molecular basis of circadian timing in mammals. **Seminars in Perinatology**; 24: 243-246, 2000.
- RIEMER, S.,MAES, M.,CHRISTOPHE, A.,RIEF, W. Lowered omega-3 PUFAs are related to major depression, but not to somatization syndrome. **J Affect Disord.**; 123: 173-180, 2010.
- ROCA, A.L., WEAVER,D.R., REPPERT,S.M. Serotonin receptor gene expression in the rat suprachiasmatic nuclei. **Brain Research**; 608: 159-165, 1993.
- SANTIAGO, R.M., BARBIERO, J., MARTYNHAK, B.J., BOSCHEN, S.L., DA SILVA, L.M., WERNER, M.F., DA CUNHA, C., ANDREATINI, R., LIMA, M.M., Vital, M.A. Antidepressant-like effect of celecoxib piroxicam in rat models of depression. **J Neural Transm (Vienna)**. 121(6):671-82, 2014.
- SATO, A.,NAKAGAWASAI, O.,TAN-NO, K.;ONOGI, H.,NIIJIMA, F.,TADANO, T. Influence of olfactory bulbectomy on maternal behavior and dopaminergic function in nucleus accumbens in mice. **Behav Brain Res**; 215:141-145, 2010.
- SCHILDKRAUT,J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry** ; 122(5):509-22,1965.
- SIDHU, K. S.. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**; 38: 336–344, 2003.
- SONG, C., LEONARD, B. E. The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. **Neurosci Biobehav Rev**; 29: 627-647, 2005.
- SONG,C., WANG, H. Cytokines mediated inflammation and decreased neurogenesis in animal models of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**; 35: 760-768, 2010.
- TAKAHASHI,K., MURASAWA,H., YAMAGUCHI,K., YAMADA,M., NAKATANI,A., YOSHIDA,M., IWAI,T., INAGAKI,M., YAMADA,M., SAITOH,A. Riluzole rapidly attenuates hyperemotional responses in olfactory bulbectomized rats, an animal model of depression. **Behavioural Brain research**; 216: 46-52, 2011.
- TAL-KRIVISKY,K., KRONFELD-SCHOR,N., EINAT,H. Voluntary exercise enhances activity rhythms and ameliorates anxiety- and depression-like behaviors in the sand rat model of circadian rhythm-related mood changes. **Physiology & Behavior**; 151:441-447, 2015.

- TUREK,F.W. LOSSE-OLSON,S., SWANN,J.M., HORWATH,K,VANCAUTER,E., MILETTE,J.J. Circadian and seasonal control of neuroendocrine - gonadal activity. **Journal of Steroid Biochemistry**; 27: 573-579, 1987.
- ULAK,G., MUTLU,O., TANYERI,P., KOMSUOGLU,F.I., AKAR,F.Y., ERDEN,B.F. Involvement of serotonin receptor subtypes in the antidepressant-like effect of trim in the rat forced swimming test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.**; 95: 308–314, 2010.
- VAGELL, M.E., MCGINNIS, M.Y., POSSIDENTE, B., NARASIMHAN, V. e LUMIA, A.R. Olfactory bulbectomy increases basal suprachiasmatic cyclic AMP levels in male rats. **Brain Res. Bull.**, 27; 839-842, 1991.
- VINES, A., DELATTRE, A. M., LIMA, M. M., RODRIGUES, L. S., SUCHECKI, D., MACHADO, R. B., TUFIK, S., PEREIRA, S. I., ZANATA, S. M., FERRAZ, A. C. The role of 5-HT(1)A receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: a possible antidepressant mechanism. **Neuropharmacology**; 62:184-191, 2012.
- VITATERNA,M.H., KO,C.H., CHANG,A.M., BURH,E.D., FRUECHTE, E.M., SCHOOK,A., ANTOCH,M.P., TUREK,F.W. TAKAHASHI,J.S. The mouse Clock mutation reduces circadian pacemaker amplitude and enhances efficacy of resetting stimuli and phase response curve amplitude. **Proc. Natl. acad. Sci. U.S.A.**,103, 9327-9332, 2006.
- WANG, J.,DRANOVSKY,A., HEN,R. The When and Where of BDNF and the Antidepressant Response. **Biological Psychiatry**; 63: 640-641, 2008.
- WANG, W., QI, W. J., XU, Y., WANG, J. Y., LUO, F. The differential effects of depression on evoked and spontaneous pain behaviors in olfactory bulbectomized rats. **Neurosci Lett**; 472: 143-147, 2010.
- WASSLE, H. Parallel processing in the mammalian retina. **Nat Rev Neurosci.**; 5: 747-57, 2004.
- WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**; 83: 1-16, 1984.
- WILLNER,P., SCHEEL-KRUGER,J., BELZUNG,C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**; 37: 2331-2371, 2013.
- WHO. **Depression**. Acesso em 12/06/2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/> .
- YONGSOON, P., HYOUN-JUNG,M., SEOK-HYEON,K. N-3 polyunsaturated fatty acid consumption produces neurobiological effects associated with prevention of depression in rats after the forced swimming test. **Journal of Nutritional Biochemistry**; 23: 924-928, 2012.

YOU DIM, M. B., YEHUDA, S. The neurochemical basis of cognitive deficits induced by brain iron deficiency: involvement of dopamine-opiate system. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**; 46: 491-500, 2000.

ZUEGER, M., URANI, A., CHOURBAJI, S., ZACHER, C., ROCHE, M., HARKIN, A., GASS, P. Olfactory bulbectomy in mice induces alterations in exploratory behavior. **Neurosci Lett**; 374: 142-146, 2005.