

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA

EFEITOS DA DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) SOBRE O
COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO DE RATOS MACHOS E FÊMEAS

Susie de Andrade

Porto Alegre – RS

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA

EFEITO DE DESIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) SOBRE O
COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO DE RATOS MACHOS E FÊMEAS

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Fisiologia, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas: Fisiologia.

Susie de Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Helena Maria Tanhauser Barros

Porto Alegre – RS

2005

*“Aqueles que esperam no Senhor
renovam as suas forças.
Voam alto como águias,
correm e não ficam exaustos,
andam e não se cansam”. Is. 40:31*

Dedico este trabalho...
...ao maior tesouro que alguém pode
ter: Pâmella, Larissa e Giuseppe.

...À Luane. Após tenebrosa noite,
venceu, e como raio de luz, aquece e
ilumina nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Caminhos...

Vales profundos, desafiadoras
montanhas.

Na estrada,

Pedras...

Espinhos...

Desníveis traiçoeiros.

Mas nesta caminhada, uma etapa foi
vencida. Não é o fim. É apenas um pequeno
intervalo para olhar o que já foi
percorrido.

E é nestes momentos que observamos,
com carinho e lágrimas de gratidão, a
existência de flores entre espinhos, de
pontes sobre os abismos, de pegadas ao
lado das nossas. Elas nos falam de braços
fortes, acolhedores, companheiros,
encorajadores.

A estes, o registro de sua
incalculável importância.

Ao meu Deus...

Àquele que tudo devo; a qual minha
vida é uma prova de Suas promessas
verdadeiras. Tu me disseste: "Não tenhas

medo, por que Eu sou contigo... Jr. 41:10. Quando passares por águas profundas - grandes dificuldades, Eu estarei ao teu lado; quando tiveres que atravessar grandes rios - problemas difíceis, não te afogarão; quando tiveres que passar pelo fogo - sofrimentos, não te queimarão. Is. 43:1-3.

Hoje, só posso agradecer-te, Senhor.

Até aqui me trouxeste com Tua mão.

Vamos continuar caminhando juntos!

Filhos...

O que há de mais valioso não pode ser comparado ao supremo dom de tê-los.

Todas as dificuldades de desvanecem ao receber faces sorridentes, beijinhos doces e abraços carinhosos...

Jóias preciosas possuem três nomes: Pâmella, Larissa e Giuseppe.

Pai e mãe...

Se nesta conquista algum valor há, qualquer mérito ou recompensa, os deponho a vossos pés. Já fizestes tudo. Tudo o que vier a fazer, terá sido pouco.

Família...

Somos um, enquanto diferentes. Dias escuros passamos. A conclusão desta etapa é a prova de que entre as cinzas, brota e renova a vida.

Dia de vitória. É de todos nós.

Orientadoras...

Flávia

Fafá...

Mais do que orientação, a amizade.

Se hoje comemoramos, tens "culpa" nisto!

Conselhos, encorajamento, consolo.

Um braço amigo,

Um sorriso que traz alegria e aquece o coração.

Obrigada!

Helena

Paciência, direcionamento, experiência.

Obrigada por acreditar que era possível.

Rosane

Rô...

Sempre por perto... Ora ensinando a fazer, ora ensinando a pensar...

Tudo com um jeitinho especial que conquistou!

Obrigada por tua incansável solicitude e o carinho, sempre presente.

Amigos...

Embora sejam muitos, sinta-se único. Pois cada um, de forma singular, tornou a vida mais simples, mais rica, mais bela.

Portanto, a VOCÊ, que, ao falar, me olhou nos olhos. Que ouviu minhas

tristezas com paciência, e mesmo não compreendendo, respeitou meus sentimentos. Que brigou ao meu lado sem precisar ser convocado. Que foi amigo o suficiente para dizer-me as verdades que eu não queria ouvir. Que teimou em ser leal, simples e justo. Companheiro, nas guerras e alegrias, e que no meio da tempestade, inda disse: "Nós ainda vamos rir muito de disso tudo" e rimos muito. Que acreditou e que acredita, nesta coisa misteriosa, desacreditada, quase impossível: a amizade.

Adaptado - Charles Chaplin
Você é especial. Obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 DHEA, ESTERÓIDES, ESTERÓIDES NEUROATIVOS E NEUROESTERÓIDES.....	1
1.2 DHEA, DEPRESSÃO E GÊNERO.....	12
2. HIPÓTESE.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 ANIMAIS.....	24
4.2 FÁRMACOS.....	24
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	25
4.3.1 Ciclo estral.....	25
4.3.2 Modelo comportamental de Depressão.....	28
4.3.3 Modelo comportamental de Locomoção.....	31
4.3.4 Coleta de sangue.....	31
4.3.4 Dosagens hormonais.....	32
4.4 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL.....	34
4.4.1 Experimento 1 – Agudo DHEA.....	34
4.4.1.1 Experimento 1a – curva dose-resposta.....	34

4.4.1.2	.Experimento 1b – Complemento curva dose-resposta.....	35
4.4.2	Experimento 2 – Crônico DHEA.....	35
4.4.3	Experimento 3 – Determinação das concentrações basais de DHEA e corticosterona.....	36
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5.	RESULTADOS.....	39
5.1	RESULTADOS COMPORTAMENTAIS.....	39
5.2	DOSAGENS HORMONAIS.....	41
6.	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÕES.....	68
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biossíntese dos neuroesteróides.....	3
Figura 2	Fotomicrografia do ciclo estral de roedores.....	27
Figura 3	Teste do nado forçado.....	29
Figura 4	Caixa de locomoção.....	33
Figura 5	Duração da imobilidade(s) no teste do nado forçado após tratamento agudo com DHEA.....	44
Figura 6.	Locomoção(f) após tratamento agudo com DHEA.....	46
Figura 7	Duração da imobilidade(s) em ratos machos no teste do nado forçado após tratamento agudo com DHEA.....	47
Figura 8	Duração da imobilidade(s) no teste do nado forçado após tratamento crônico com DHEA.....	49
Figura 9A	Concentrações basais de DHEA sérica (ng/mL).....	51
Figura9B	Concentrações de DHEA sérica (ng/mL) após o teste do nado forçado e tratamento agudo com DHEA.....	51
Figura 9C	Concentrações de DHEA sérica (ng/mL) após o teste do nado forçado e tratamento crônico com DHEA.....	51
Figura 10A	Concentrações basais de corticosterona sérica (ng/mL).....	52
Figura 10B	Concentrações de corticosterona sérica (ng/mL) após o teste do nado forçado e tratamento agudo com DHEA.....	52
Figura 10C	Concentrações de corticosterona sérica (ng/mL) após o teste do nado forçado e tratamento crônico com DHEA.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cronograma Esquemático do experimento 1 A- curva dose-resposta.....	35
Tabela 2	Diagrama esquemático do experimento 2 –Crônico.....	36
Tabela 3	Duração e freqüência dos comportamentos de imobilidade e mobilidade detalhados, no teste do nado forçado após tratamento agudo com DHEA.....	45
Tabela 4	Duração e freqüência dos comportamentos de imobilidade e mobilidade detalhados, no teste do nado forçado em ratos machos após tratamento agudo com DHEA.....	48
Tabela 5	Duração e freqüência dos comportamentos de imobilidade mobilidade detalhados, no teste do nado forçado após tratamento crônico com DHEA.....	50

RESUMO

A depressão é uma desordem de importância relevante, sendo que as mulheres apresentam o dobro da incidência desta patologia em relação aos homens. No entanto, os trabalhos realizados em modelos animais não conseguem reproduzir estas condições consistentemente. DHEA é um neuroesteróide que está relacionado à depressão. Suas concentrações estão alteradas em pacientes deprimidos e já tem sido usada na clínica, produzindo, no entanto, resultados contraditórios.

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da administração de desidroepiandrosterona (DHEA) sobre o comportamento tipo depressivo e níveis hormonais de ratos, machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral, submetidos ao teste do nado forçado, um modelo animal de depressão. Para isto, foram utilizados ratos Wistar, adultos, machos e fêmeas em diestro II e em proestro, 8 por grupo. Receberam injeções intraperitoneais de DHEA: 0; 2; 10 e 50 mg/kg, nos tempos de 24, 5 e 1 h antes do teste do nado forçado. No primeiro dia os animais foram treinados por 15 minutos em aquários contendo água a $25^{\circ} \pm 1$ e 27 cm de profundidade. Após 24 h, foram recolocados no aquário e seus comportamentos gravados por 5 minutos para análise posterior. Os comportamentos foram analisados detalhadamente: *head-shake*, mergulho, imobilidade (flutuar + congelar) e mobilidade (nadar + escalar). Trinta minutos após o nado, os animais foram mortos e o sangue troncular coletado, para posterior dosagem de DHEA e corticosterona séricas. Um experimento para complementar a curva dose-resposta foi realizado, com a dose de 1 mg/kg, com machos, porém,

experimento crônico, onde, no dia seguinte ao treino, os animais receberam a sem resultados significativos nos comportamentos. Foi realizado, então, primeira injeção de DHEA, na dose de 2 mg/kg, com intervalos de 24 horas, durante dois ciclos estrais completos das fêmeas. No dia seguinte à última injeção, os animais foram submetidos ao teste do nado, com duração de 5 minutos e seus comportamentos gravados e analisados. O sangue troncular foi coletado trinta minutos após o nado, para as dosagens de DHEA e corticosterona séricas. Para fins de comparação, DHEA e corticosterona sérica de ratos machos, fêmeas em proestro e em diestro II não submetidos ao nado, foram dosados por radioimunoensaio. No experimento agudo, DHEA, na dose de 2 mg/kg aumentou o tempo de congelar para o grupo proestro. As concentrações séricas de DHEA e de corticosterona aumentaram significativamente. As fêmeas responderam com aumento destes hormônios significativamente maior dos que os machos. No experimento crônico, machos e fêmeas apresentaram diferenças em comportamentos no teste do nado forçado, dependendo de estímulos estressores continuados, evidenciado pelo maior tempo de escalar das fêmeas controle em diestro II. Tratamento com DHEA aumentou o tempo de escalar e a imobilidade das fêmeas no diestro II. As concentrações de DHEA e de corticosterona não aumentaram em relação ao basal, e as diferenças de sexo desapareceram, indicando uma correlação das respostas de corticosterona e DHEA com eventos estressores interagindo com os hormônios sexuais e o tempo de estresse experimentado. A maior resposta hormonal das fêmeas no experimento agudo parece ter impedido a resposta comportamental no nado. Após manipulação crônica, houve adaptação desta resposta e o efeito depressivo de DHEA apareceu.

Estes resultados são importantes especialmente quando consideradas estratégias para o tratamento da depressão e doenças relacionadas ao estresse.

1. INTRODUÇÃO

1.1 DHEA, ESTERÓIDES, ESTERÓIDES NEUROATIVOS E NEUROESTERÓIDES

Esteróides são álcoois sólidos que abundam em plantas e animais. O esteroide mais importante no homem é o colesterol. Os esteróides têm uma estrutura comum: um esqueleto de 4 anéis (3 hexanos e 1 pentano), onde podem ser agregadas ou retiradas cadeias. Este esqueleto comum é o ciclo-pentano-periidrofenantreno.

Por sua estrutura e função, os hormônios esteróides podem ser agrupados em famílias:

a) Gonadais: São os progestogênios, de onde derivam os androgênios e os estrogênios. Esses hormônios possuem função na caracterização sexual secundária, comportamento sexual e manutenção da gestação. Aqui também estão incluídos os hormônios placentários

b) Glicocorticóides e mineralocorticóides – esteróides derivados do pregnano, com 21 carbonos. São reguladores do metabolismo intermediário e do equilíbrio eletrolítico.

c) Tocoferóis – ou secoesteróides. Vitamina D, com 25 carbonos. Atua na absorção de Ca^{2+} (CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998).

A biossíntese dos hormônios esteróides é restrita a alguns poucos tecidos como córtex da supra-renal, testículo, ovário e placenta.

O principal precursor para a biossíntese dos esteróides é o colesterol, que pode ser obtido:

- a) pela síntese *de novo* a partir de acetil CoA;
- b) captado das reservas depositadas em gotículas intracelulares sob a forma de ésteres de colesterol;
- c) a partir das lipoproteínas plasmáticas, seja de baixa densidade (LDL) como no homem, ou de alta densidade (HDL) como no rato.

A reação de biossíntese dos esteróides é catalisada por uma forma de citocromo P-450 existente na mitocôndria (Figura 1). O passo limitante e inicial da biossíntese é a conversão de colesterol em pregnenolona. A partir da pregnenolona, a síntese de hormônios esteróides pode se processar por duas vias principais: Δ_4 e Δ_5 .

Pela via Δ_4 , a pregnenolona é convertida em progesterona pela 3β -hidrosteróide redutase/isomerase (3β HSD). A progesterona é precursora para os demais esteróides, e a metabolização destes depende das enzimas presentes nas células.

Na via Δ_5 a pregnenolona é convertida, pela ação da 17α -hidroxilase, em 17-OH-pregnenolona, e esta, origina a desidroepiandrosterona (DHEA) por ação da $17,20$ desmolase. Este hormônio é precursor dos hormônios sexuais. A desidroepiandrosterona (DHEA) é um hormônio esteróide sintetizado principalmente no córtex da supra-renal e transformado, na própria glândula e no fígado, pela sulfatransferase, em sulfato de desidroepiandrosterona sulfatada (DHEAs), um “reservatório” circulante de DHEA (RAVAGLIA *et al*, 1996). É estimado que 30% do androgênio e 90% do estrogênio, após a

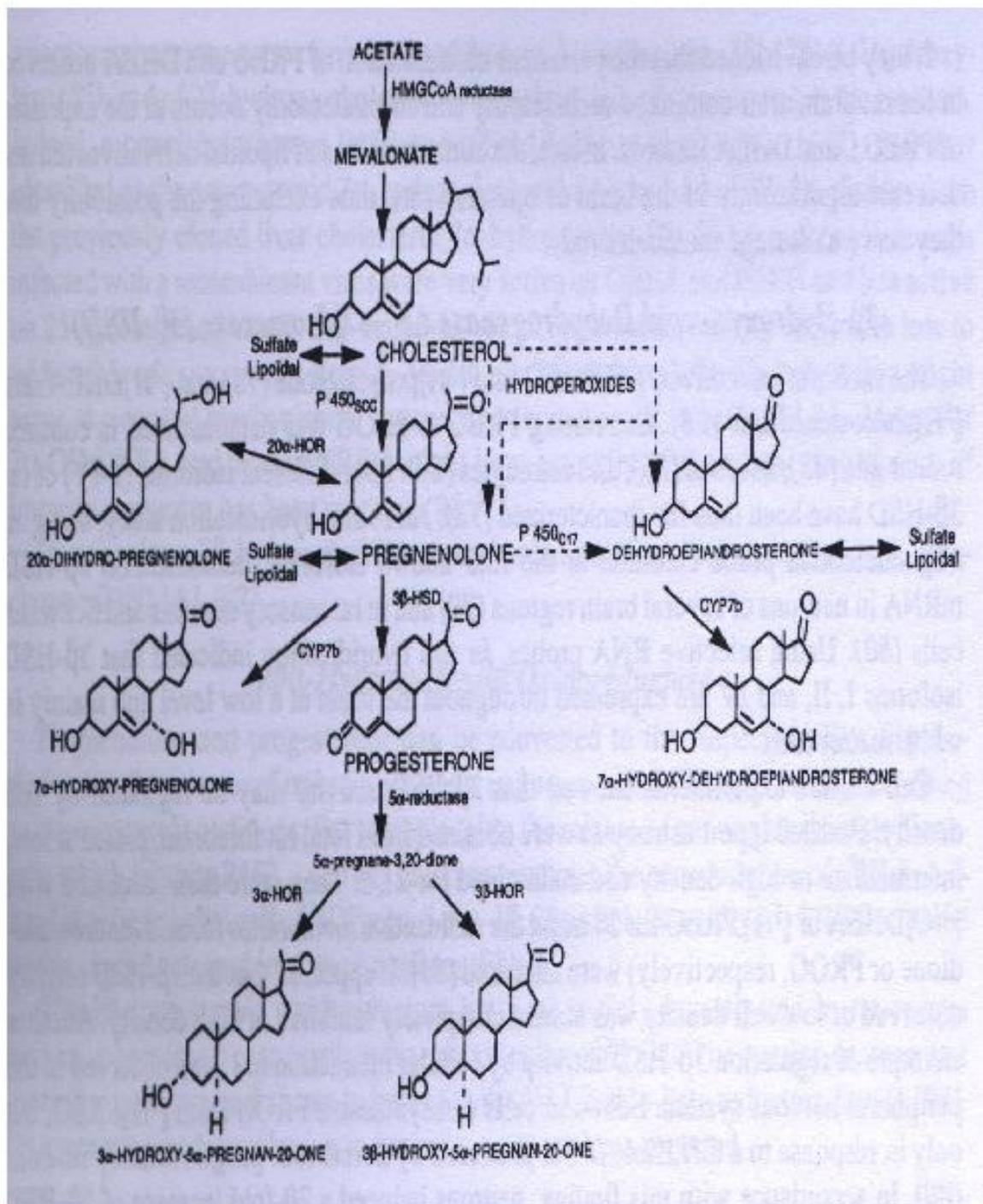


Figura 1. Biossíntese dos neuroesteróides. Retirado de BAULIEU, E.E., *et al.*, 1999.

menopausa da mulher, sejam derivados da conversão periférica de DHEA ou DHEAs. A secreção de DHEA pela zona reticular do córtex da glândula suprarrenal humana é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cuja secreção é pulsátil, com aumento da frequência e amplitude dos pulsos à noite. DHEA é produzida em prodigiosas quantidades na suprarrenal humana durante a vida uterina, onde serve como precursor para a formação do estrogênio placentário. Logo após o nascimento, sua produção é diminuída e volta a aumentar justamente antes da maturação gonadal, na adrenarca. Finalmente, sua secreção é suprimida com o envelhecimento, tanto no sangue como no sistema nervoso central (YEN, 2001; CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998; DUBROVSKY, 2005; PARKER, 1999; HERBERT, 1998).

O sistema nervoso é alvo de muitas ações dos esteróides, que agem modulando várias funções neuroendócrinas, como retroalimentação hormonal, crescimento, reprodução, comportamento e memória, além de ações neuroprotetoras importantes especialmente no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas. (CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998). DHEA é um esteróide com ação no sistema nervoso central e por isso é denominada esteróide neuroativo. É produzida nas suprarrenais e atravessa a barreira hematoencefálica, onde pode ser sulfatada (FRYE e LACY, 1999), convertida a hormônios sexuais (BOUDARENE *et al*, 2002; SOMA e WINGFIELD, 2001) ou interagir diretamente com diversos sistemas de neurotransmissores. Esteróides neuroativos, bem como neuroesteróides, têm um papel importante como moduladores endógenos de funções neuronais e comportamentais. Modificações seletivas nas concentrações dos neuroesteróides em certas partes do encéfalo têm sido encontradas em diferentes comportamentos ou

situações ambientais como comportamento sexual, desenvolvimento, memória, gravidez e estresse (CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998; AKWA e BAULIEU, 1999; ENGEL e GRANT, 2001)

O tecido nervoso é capaz de produzir e acumular esteróides, no mínimo parcialmente independente da secreção periférica (SCHUMACHER *et al*, 2000; BAULIEU e ROBEL, 1998). O termo "neuroesteróide" foi proposto por Baulieu (1980, 1987) referindo-se aos esteróides que se acumulam no sistema nervoso central (SNC), através de mecanismos independentes das glândulas esteroidogênicas. "Eles podem ser sintetizados *de novo* no sistema nervoso, ou a partir de precursores esteróides metabolizados *in situ*".

Os principais neuroesteróides são: progesterona, 5 α -pregnane-ol-ona (alopregnenolona), pregnenolona, desidroepiandrosterona (DHEA), e seus respectivos ésteres sulfatados (pregnenolona sulfatada e DHEAS) (CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998; DUBROVSKY, 2005; BAULIEU e ROBEL, 1998).

Os neuroesteróides são sintetizados no tecido neuronal em diversas categorias celulares, como oligodendrócitos, células de Schwann, astrócitos tipo I e neurônios (PLASSART-SCHIESS e BAULIEU, 2001; SCHUMACHER *et al*, 2000; AKWA e BAULIEU, 1999; AKWA *et al*, 1993)

A síntese dos neuroesteróides é semelhante à dos órgãos esteroidogênicos. O citocromo P450 está presente em várias estruturas do SNC como córtex, amígdala, hipocampo e mesencéfalo, e em vários tipos celulares como oligodendrócitos, astrócitos e células de Schwann (SCHUMACHER *et al*, 2000; ROBEL e BAULIEU, 1998; DUBROVSKY, 2005; AKWA *et al*, 1993). Assim, a conversão do colesterol em pregnenolona por meio do citocromo P450 mitocondrial ocorre da mesma forma que em todos os

tecidos esteroidogênicos. Esta enzima é a mesma que a das supra-renais e gônadas (OLIVARES e BRENA, 1997; BAULIEU e ROBEL, 1998; CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998; DUBROVSKY, 2005).

Os astrócitos e oligodendrócitos podem ainda utilizar esteróides sistêmicos e convertê-los em esteróides ativos, ou sulfatá-los, como no caso da pregnenolona e DHEA (CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998; FRYE e LACEY, 1999). Cascio *et al* (2000) demonstraram uma via alternativa de produção de DHEA, sem a atividade da enzima P450c17, que é responsável pela conversão de pregnenolona em DHEA. Esta é uma via oxidativa observada em oligodendrócitos, dependente de Fe^{2+} e do estresse.

O metabolismo da pregnenolona e DHEA por células astrogliais pode ser regulado pela densidade celular da atividade 3β -HSD é fortemente inibida por culturas de células de alta densidade (AKWA *et al*, 1993; RUPPRECHT, 2003; KHISTI *et al*, 2000; REDDY *et al.*, 1998; BITRAN *et al.*, 1992; KAUR e KULKARNI, 2002).

Classicamente, os esteróides exercem efeitos fisiológicos pela regulação da transcrição gênica. Os esteróides são lipossolúveis. Portanto, atravessam a membrana e, ao se ligarem ao receptor intracelular cognato, mudam sua conformação. Este complexo esteróide/receptor se introduz no núcleo e se liga aos respectivos elementos de resposta. Modulam, então, a expressão de genes e a síntese de proteínas, pela interação estereoquímica direta com o DNA, em seqüências conhecidas como elementos de resposta a hormônios esteróides, mediante uniões eletrostáticas e pontes de hidrogênio. Após, ocorre a síntese de RNA, e posteriormente, no citosol, de proteínas, que podem ser enzimas, receptores ou hormônios, que executarão a adaptação ao estímulo

químico recebido. Estes efeitos têm maior latência e duração do que os não-genômicos (CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998). A inter-relação entre efeitos genômicos e não-genômicos, pode prover a base molecular para a ação dos esteróides no SNC (RUPPRECHT, 2003).

Os neuroesteróides realizam as mais diversas funções neuromoduladoras e neuroprotetoras no encéfalo. Podem alterar dentro de milissegundos a excitabilidade neuronal, por sítios de ligação presentes em canais iônicos dependentes de neurotransmissores, por mecanismos inibitórios ou excitatórios. Interagem com vários tipos de receptores ionotrópicos, como o do ácido gama aminobutírico tipo A ($GABA_A$), o glutamatérgico tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), o nicotínico e o da glicina, abundantes no SNC (PLASSART-SCHIESS e BAULIEU, 2001). Estes receptores têm sido implicados em comportamentos como analgesia, ansiedade, aquisição de memória, plasticidade sináptica e excitotoxicidade neuronal (LAMBERT *et al*, 2001; CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998; DUBROVSKY, 2005).

GABA é o inibidor mais importante do SNC. O GABA exerce seu efeito sobre dois tipos de receptores: $GABA_A$ e $GABA_B$. O receptor $GABA_B$ está associado a proteínas G e ativa segundos mensageiros, pertencendo ao grupo de receptores metabotrópicos. Sobre este tipo de receptor não se tem relatado atividades de neuroesteróides. Existe também o receptor $GABA_C$, identificado somente na retina (OLIVARES e BRENA, 1997; CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998).

O receptor $GABA_A$ é um canal de cloro oligomérico (heteropentâmero) que, quando ativado por GABA ou agonistas, leva à entrada de Cl^- nos neurônios e assim hiperpolariza a membrana e reduz a excitabilidade neuronal.

Este receptor é formado pelas subunidades α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , π , θ , e ρ (1-3). Possui sítios para barbitúricos, benzodiazepínicos, etanol e neuroesteróides que, ao se ligarem, podem potencializar ou inibir seu efeito farmacológico. A presença de um grupo 3α hidroxil dentro do anel A é determinante para a atividade alostérica positiva do receptor GABA_A (CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998; RUPRECHT, 2003).

A ação do receptor depende da sua distribuição e composição das suas subunidades, que, ao se ligarem ao GABA, influenciam suas propriedades fisiológicas e farmacológicas. As subunidades $\alpha 3$, $\beta 1$ e $\gamma 2$ são necessárias para que a família de esteróides pregnanos tenha efeito sobre o receptor, assim como a presença da subunidade δ inibe a modulação de atividade do receptor GABA_A por esteróides. Suas propriedades sedativas são dependentes da subunidade $\alpha 1$ e o efeito ansiolítico é dependente da subunidade $\alpha 2$. A subunidade α é mais específica para GABA sendo que α e β têm afinidade para barbitúricos e a γ mais afinidade pelos benzodiazepínicos (OLIVARES e BRENA, 1997; PLASSART-SCHIESS e BAULIEU, 2001; LAMBERT *et al*, 2001; CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998).

Em revisão sobre os efeitos dos esteróides, esteróides neuroativos ou neuroesteróides nas psicopatologias, Dubrovsky (2005) verificou que no córtex de mamíferos coexistem vários subtipos de receptores GABA_A. Foram localizadas regiões com maior sensibilidade aos neuroesteróides, e algumas combinações de subunidades têm mais afinidade por estes compostos que outras. A modulação dos esteróides neuroativos, ou neuroesteróides no complexo receptor GABA depende do gênero, sítio cerebral, idade e *status* endócrino.

Após o GABA, a glicina medeia a maior parte da inibição sináptica restante. Este aminoácido também ativa canais de cloreto. Cada receptor é composto de cinco domínios transmembrana com subunidades α , que ligam o neurotransmissor, e β , em que estes não se ligam. Esteróides se ligam a este canal (RUPPRECHT, 2003)

O glutamato é o mais importante aminoácido que funciona como excitador do SNC. Possui três subtipos de receptores ionotrópicos: NMDA, cainato e AMPA. Cada um deles é um canal iônico ativado por glutamato. Os outros receptores são metabotrópicos. Os canais ativados por AMPA são permeáveis tanto ao Na^+ quanto ao K^+ . Seu efeito principal é permitir a entrada de Na^+ na célula, causando uma despolarização rápida e intensa. Receptores AMPA coexistem com receptores NMDA em muitas sinapses no encéfalo, de forma que muitos potenciais excitatórios mediados por glutamato possuem componentes formados por ambos.

Canais ativados por NMDA apresentam sítios que abrem canais de Ca^{2+} que, ao entrar na célula, a despolariza. Na região pós-sináptica, o cálcio pode ativar muitas enzimas, regular a abertura de diversos canais e afetar a expressão gênica. Pode também causar modificações que participam na memória de longa duração (DUBROVSKY, 2005). Neuroesteróides modulam canais ativados por glutamato (PLASSART-SCHIESS e BAULIEU, 2001; DUBROVSKY, 2005; LHULLIER *et al*, 2004).

O receptor de acetilcolina tipo nicotínico é membro de uma superfamília de receptores acoplados a canal. Ao interagir com duas moléculas de acetilcolina, permite a entrada de Na^+ e de Ca^{2+} e saída de K^+ , despolarizando a célula. São compostos de subunidades α (2-10), β (2-4), δ , e γ que podem

formar combinações hetero-oligoméricas ou homo-oligoméricas, com distintas propriedades farmacológicas. Os neuroesteróides interagem com o receptor de acetilcolina tipo nicotínico, independente da presença de acetilcolina. Os neuroesteróides pregnano podem atuar de forma não competitiva com o sítio de ligação da acetilcolina ao receptor (PLASSART-SCHIESS e BAULIEU, 2001; CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998; DUBROVSKY, 2005; KARISHMA e HERBERT 2002).

O receptor sigma é sensível à modulação esteroideal e também pode ligar a vários neuroesteróides. Sulfato de pregnenolona é agonista inverso do receptor sigma-1, DHEAs é agonista, e progesterona e DHEA são antagonistas sigma 1 (REDDY *et al*, 1998; CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998; DUBROVSKY, 2005; KHISTI *et al*, 2000).

Os neuroesteróides podem ser classificados em agonistas ou antagonistas dos receptores de membrana. Os neuroesteróides que modulam o receptor GABA_A nas membranas de células nervosas inibindo sua atividade, são neuroesteróides excitatórios. Sua ação resulta da interação alostérica antagonista com o receptor deste neurotransmissor inibitório, resultando em diversos efeitos comportamentais (PLASSART -SCHIESS e BAULIEU, 2001).

Os principais neuroesteróides excitatórios são a pregnenolona sulfatada e a DHEAs; os inibitórios são DHEA, progesterona e seus metabólitos. Os sulfatados, pela carga negativa do SO₄, provavelmente se introduzem no sítio do canal de Cl⁻ do receptor GABA_A, bloqueando-o, o que explica o efeito antagonístico dos neuroesteróides sulfatados sobre o receptor GABA_A (CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998). Neuroesteróides agonistas de GABA, estão

relacionados a aumento de sono, diminuição da ansiedade, efeitos anestésicos e antiepiléticos (CALIXTO e BRAILOWSKY, 1998).

Os antagonistas apresentam maior complexidade, pois regulam dois neurotransmissores antagônicos, ao mesmo tempo: são antagonistas GABA_A e agonistas glutamatérgicos tipo NMDA. A pregnenolona sulfatada, bem como a DHEA, possuem efeito bimodal: agonista GABA_A em quantidades pequenas, e em doses fisiológicas antagonista, um efeito que pode ser reforçado pela potencialização do receptor NMDA. Os neuroesteróides excitatórios não só exercem uma atividade excitatória, como até convulsiva, bloqueando o influxo de Cl⁻ mediado pelo receptor GABA_A e aumentando a atividade do ácido glutâmico sobre os canais NMDA facilitando o influxo neuronal de Ca²⁺ (OLIVARES e BRENA, 1997; DUBROVSKY, 2005; BAULIEU, 1997; REDDY e KULKARNI, 1997).

A modulação por esteróides é específica: enquanto concentrações nanomolares de esteróides são suficientes para a ativação de receptores intracelulares de esteróides e para modular positivamente o receptor GABA_A, a modulação antagonística de vários canais iônicos dependente de ligando para esteróides neuroativos requerem usualmente concentrações na faixa de micromolar.

A ação modulatória dos esteróides não está restrita a interações alostéricas diretas com canais iônicos dependentes de ligando, uma vez que mecanismos acoplados a proteínas G também possuem um papel na modulação de esteróides de canais de Ca²⁺, e receptores cainato (RUPPRECHT, 2003). O receptor de ocitocina foi recentemente identificado como o primeiro receptor acoplado a proteína G em que esteróides podem ser

ligados (RUPPRECHT, 2003). A modulação alostérica dos receptores de neurotransmissores por esteróides e por neuroesteróides é um fenômeno muito complexo que é dependente da estrutura molecular do respectivo esteróide, da composição do aminoácido do receptor individual e das propriedades físico-químicas da membrana celular. Esteróides parecem ser moléculas promíscuas, com amplo espectro de efeitos biológicos (RUPPRECHT, 2003).

1.2 DHEA, DEPRESSÃO E GÊNERO

DHEA têm sido estudada amplamente, apresentando efeitos metabólicos e comportamentais. O tratamento com DHEA reduz a acumulação lipídica, induz a captação de glicose em adipócitos e protege contra a resistência insulínica em ratos (HAN *et al*, 1998; KAJITA *et al*, 2000). DHEA estimula a formação de tecido ósseo e a maturação vaginal em mulheres na pós-menopausa sem o risco potencial de câncer uterino e mamário (LABRIE *et al*, 2001). Além disso, o tratamento com DHEA pode exercer uma influência benéfica no sistema endócrino, revertendo a redução da expressão do mRNA do hormônio liberador de corticotropina e hormônio liberador de gonadotropinas, que acontecem em consequência do envelhecimento (GIVALOIS *et al*, 1997; LI *et al*, 1997; GIVALOIS *et al*, 1999). DHEA atua na neuroplasticidade, reduzindo os efeitos da injúria neuronal e glial (DUBROVSKY, 2005). Aumenta a neurogênese no hipocampo e antagoniza o efeito inibitório de aumento dos glicorticóides na sobrevivência neuronal e na formação de novos neurônios. Também aumenta o crescimento de neuritos, o

que é antagonizado por bloqueio do receptor NMDA (KARISHMA e HERBERT 2002). A DHEA tem efeitos ansiolíticos, reduz o comportamento agressivo em camundongos, melhora a memória e pode reduzir a ingestão alimentar regulando os níveis de serotonina e leptina (SCHUMACHER *et al*, 2000; BAULIEU e ROBEL, 1998; CATALINA *et al*, 2001; CARMINA *et al*, 1999; LHULLIER *et al* 2004; DUBROVSKY, 2005). Morales *et al* (1994) relatam efeito benéfico sobre o estado físico e sensação de bem estar em homens e mulheres tratados durante seis meses com DHEA.

Vários estudos demonstraram que há uma relação entre depressão e neuroesteróides. Parece que distúrbios da homeostase de esteróides neuroativos podem ser um fator de risco no desenvolvimento de doenças psiquiátricas (KARISHMA e HERBERT 2002; POOR *et al*, 2004). Foi observado que há um desequilíbrio nas taxas dos neuroesteróides associado com a prevalência e exacerbação das desordens afetivas, como depressão pós-parto, depressão maior e síndrome de estresse pós-traumático (SCHULE *et al*, 2003; PADBERG *et al*, 2002). Pacientes com depressão mostram níveis plasmáticos mais baixos de DHEA e progesterona (SCHIMIDT *et al*, 2002; FABIAN *et al*, 2001; VAN BROEKHOVEN e VERKES, 2003). Desta forma, alguns autores propõem que a DHEA pode ser usada como um hormônio para tratamento na depressão contrabalançando os efeitos deletérios dos glicocorticóides, bem como restabelecendo o equilíbrio dos esteróides neuroativos (KAMINSKA, 2000; RUPPRECHT, 2003).

A desordem depressiva maior, conhecida comumente como depressão, é caracterizada como uma mudança severa e crônica do estado emocional,

com proeminente sentimento subjetivo de tristeza, afastamento, apatia, baixa auto-estima e auto-avaliação negativa.

A causa da depressão é bastante discutida. A doença pode resultar de uma falha ou disfunção dos sistemas neurotransmissores do encéfalo como um efeito primário, ou pode ser resultado de uma resposta comportamental mal adaptada para o estresse no ambiente social. Ainda existe um elemento genético em suas causas (BARROS, 1987).

As principais hipóteses de disfunção dos sistemas de neurotransmissores constituem as dos sistemas catecolaminérgico, serotoninérgico e gabaérgico.

A hipótese monoaminérgica da depressão surgiu a partir da observação de que o tratamento com fármacos que aumentam as monoaminas no cérebro melhoram esta patologia. Lechin *et al* (1996) verificaram uma hiperatividade do sistema noradrenérgico, enquanto ocorre uma exaustão da atividade serotoninérgica na depressão endógena, e uma hiperatividade serotoninérgica central, com hipoatividade noradrenérgica na depressão distímica. Os antidepressivos mais efetivos são os que aumentam a atividade serotoninérgica ou adrenérgica. Logo foram descobertos fármacos que aumentam a atividade de ambos, sistema noradrenérgico e serotoninérgico, através dos inibidores da monoamino oxidase (MAO), enzima degradadora destas monoaminas. Após, foram desenvolvidos os inibidores da recaptção de serotonina, que aumentam a biodisponibilidade de serotonina na sinapse, resultando em menos efeitos colaterais. No entanto, o significativo número de pacientes não-responsivos ao tratamento com drogas serotoninérgicos levou à consideração de outras hipóteses (SHORS e LEUNER, 2003).

Bosker *et al.*, 2004, propôs a caracterização de antidepressivos de acordo com seus alvos:

1. receptores de monoaminas
2. receptores não monoaminérgicos
3. receptores para neuropeptídeos
4. receptores para hormônios

Os fármacos antidepressivos incluem vários agentes farmacológicos que agem em vários destes sistemas de neurotransmissores, onde podem desencadear mais do que um mecanismo neurofarmacológico e agem sobre mais do que um sistema de neurotransmissores (WHALE *et al*, 2001).

Há ainda componentes genéticos para os distúrbios na neurotransmissão gabaérgica, tendo possível potencial fisiopatológico para desordens de humor (YOSHIKAWA, 2004; ZHANG *et al*, 2005; WEISSMAN *et al*, 2005).

A depressão também é considerada como a incapacidade de adaptação ao estresse ou estímulo aversivo. É uma das desordens psiquiátricas relacionadas com estresse mais comuns e mais estudadas (KUIPERS *et al*, 2003). A má adaptação ao estresse leva a mudanças metabólicas, hormonais e neuroquímicas, como a exaustão dos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico, que favorece o aparecimento de doenças como a depressão. Na teoria da depressão como resposta mal-adaptada ao estresse, ocorre a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (HPA), que é um sistema tipicamente afetado. O cortisol exerce um amplo espectro de ações fisiológicas, comportamentais e cognitivas e suas concentrações podem estar elevadas em inúmeros contextos que podem ou não ser estressores no sentido aversivo do

termo. A constante elevação dos glicocorticóides pode levar a conseqüências fisiológicas e cognitivas adversas. Prolongada exposição a elevadas concentrações de cortisol pode resultar em fadiga, depressão, ou em redução da capacidade de concentração. Conseqüências de elevação continuada de cortisol, dentro do contexto de estresse repetido, inclui atrofia neural no hipocampo e córtex pré-frontal medial, diminuição da densidade mineral óssea e comprometimento da função do sistema imunológico (ERICKSON, *et al*, 2003).

O eixo HPA está sujeito à influência gonadal. O *cross-talk* entre o eixo gonadal e a suprarrenal é em grande parte devido aos efeitos interrelacionados dos hormônios sexuais e glicocorticóides, talvez explicando as diversas doenças ligadas ao estresse e dependentes do sexo (AKINCI e JOHNSTON, 1997; SHORS e LEUNER, 2003; VIAU, 2002). Ainda, há evidências de uma interação do sistema hormonal e neurotransmissores. Glicocorticóides regulam a atividade serotoninérgica, e o tratamento com antidepressivos reduz a atividade de neurônios contendo fator liberador de corticotropina (SHORS e LEUNER, 2003). DHEA diminui com a idade. Desta forma, a relação cortisol/DHEA aumenta com a idade, fato que está relacionado com o aumento da atividade do eixo HPA e o declínio cognitivo associado com o envelhecimento e o risco de psicopatologia (como desordem depressiva maior) (KARISHMA e HERBERT, 2002; YEN, 2001; PARKER, 1999).

Enquanto as relações entre o eixo HPA e a depressão têm sido longamente estabelecidas, as anormalidades nos níveis de esteróides neuroativos foram descritas mais recentemente, desde 1980 (DUBROVSKY, 2005; WOLKOWITZ *et al*, 2001).

Estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que o estresse ou a depressão podem levar à atrofia e perda celular de regiões límbicas que são criticamente envolvidas na depressão, como o hipocampo. A neurogênese está diminuída (DUMAN, 2004; HENN e VOLLMEYER, 2004). Ocorrem adaptações no nível molecular e celular comprometendo a plasticidade neuronal que poderiam contribuir para a fisiopatologia das desordens induzidas pelo estresse. Proteínas envolvidas na organização do esqueleto neuronal e sinais neurotróficos têm sua ação modificada, confirmando o dano do estresse na atividade cortical. Neurotrofinas, como BDNF, têm sido alvo de estudos para tratamento da depressão, (KUIPERS *et al.*, 2003; SHIMIZU *et al.*, 2004), assim como componentes do citoesqueleto, como os microtúbulos. Foi demonstrado que o tratamento com neuroesteróides atua a neste nível, promovendo crescimento neuronal (REINES, 2004; PLASSART-SCHIESS e BAULIEU, 2001)

Hoje, vários autores acreditam que a diversificação de estratégias é a forma mais adequada para melhorar a eficácia do tratamento antidepressivo. São aceitas outras abordagens, que levam em conta relações com o gênero e resposta ao estresse, como a adição de neuromoduladores ou hormônios aos antidepressivos tradicionais (BOSKER *et al.*, 2004; ROGOZ *et al.*, 2002). Esta abordagem é coerente com o fato da baixa taxa de pacientes responsivos ao tratamento, e a baixa taxa de remissão (para uma revisão ver em DAVID e FRAZER, 2004). Certamente, mais estudos são necessários para elucidar o tratamento para esta importante patologia.

Em vários países, o uso de DHEA está em crescente demanda. Foram publicados vários trabalhos, onde os autores relataram melhora do bem-estar,

após tratamento com DHEA em humanos (LABRIE *et al*, 2001; GENAZZANI e PETRAGLIA e, 1999) bem como diminuição do comportamento tipo depressivo em animais (PRASAD *et al*, 1997; REDDY *et al*, 1998).

No entanto, há necessidade de observar com mais atenção os efeitos contrários relatados em outros trabalhos, e considerar a taxa risco-benefício do uso de DHEA, que deve ser melhor estudada. Em pacientes com esquizofrenia, a administração de DHEA aumenta sintomas negativos, depressivos e a ansiedade da esquizofrenia (STROUS *et al*, 2003). Sondergaard *et al*. (2002), relataram piora na depressão apresentada por pacientes com Desordem de Estresse Pós-Traumático. DHEA está associada à resistência a terapia eletroconvulsiva (um tratamento para depressão) em certos pacientes deprimidos (MAAYAN *et al.*, 2000). Há certos grupos de usuários de DHEA que podem desenvolver sintomas psiquiátricos (DUBROVSKY, 2005) Ainda, em animais, a administração de DHEA, e DHEA na sua forma sulfatada, produz resultados contraditórios (PRASAD *et al*, 1997; REDDY *et al*, 1998; URANI *et al*, 2001). Certamente, o papel da DHEA na depressão e na terapia antidepressiva deve receber melhor consideração.

A diferença entre os sexos na depressão é conhecida pelo fato de que as mulheres apresentam duas vezes mais depressão do que os homens (EARLS, 1987; YONKERS e BRAWMAN-MINTZER, 2002). Estas diferenças estão relacionadas possivelmente às flutuações hormonais que ocorrem no ciclo feminino, aumentando a vulnerabilidade para depressão em ocasiões como no período pós-parto, durante a gravidez, na fase perimenstrual, na menopausa (RUPPERCHT, 2003; ALTEMUS *et al*, 2004; KELLY *et al*, 1999, YONKERS, e BRAWMAN-MINTZER, 2002).

A depressão é considerada como uma resposta ineficiente a um processo estressor. A resposta ao estresse é dimórfica, aparecendo em vários aspectos diferentes. Há diferença após o procedimento estressor na neurotransmissão de monoaminas centrais (BOWMAN *et al*, 2003), bem como diferenças neuroquímicas em ratos machos e fêmeas após o teste do nado forçado: a atividade serotoninérgica hipocampal e hipotalâmica e a atividade do eixo HPA foram afetadas pela aplicação do teste do nado forçado de maneira específica ao sexo, assim como alguns aspectos comportamentais no nado. Segundo Drossopoulou *et al*, (2004) ocorrem também mudanças morfológicas após o estresse: sob estas condições, fêmeas em proestro apresentam maior densidade de espinhos dendríticos hipocampais do que os machos. Ainda, as concentrações de corticosterona, que é o hormônio clássico usado para medir a resposta ao estresse em modelos animais, são diferentes quanto ao gênero. Fêmeas têm mais altas concentrações deste hormônio, indicando uma resposta do sistema HPA ao sistema gonadal (BOWMAN *et al*, 2003). Em recente trabalho realizado em modelo animal, Soma *et al* (2004) mostraram, em aves, que a enzima 3β -HSD expressa no encéfalo de maneira específica ao sexo e à região, e as diferenças nesta enzima no encéfalo são reguladas pelo estresse com modulação rápida.

No entanto, nem sempre é possível associar estas diferenças aos comportamentos. Há situações em que é possível relacionar diferenças estruturais no encéfalo com comportamentos dimórficos sexuais. Por exemplo: administrando hormônios femininos, as fêmeas respondem com aumento nos espinhos dendríticos e conectividade sináptica, indução da expressão do receptor de progesterona e apresentam lordose em resposta ao macho;

respostas estas que são diferentes nos machos (KELLY *et al*, 1999). Por outro lado, apesar das diferenças estruturais no encéfalo quanto ao gênero, comportamentos idênticos podem ser gerados. Exemplo: analgesia é produzida nos dois sexos por estresse, mas pode ser induzida por vias neurológicas diferentes (KELLY *et al*, 1999). Isto ocorre porque o comportamento dimórfico sexual em mamíferos é considerado o resultado final de influências sexuais, gonadais, efeitos organizacionais e ativacionais de hormônios no cérebro, ações tróficas de hormônios, e influência ambiental social. Situações experimentais onde estes aspectos começam a ser dissociados têm contribuído para aprofundar nosso conhecimento das diferenças de gênero.

Fêmeas têm se mostrado mais vulneráveis que os machos em certos modelos animais de depressão (KENNETT *et al*, 1986), o que demonstra a importância de usar ambos, machos e fêmeas, em modelos de patologias como o teste do nado forçado. Um problema em muitos dos estudos prévios usando o teste do nado forçado, é a falta da inclusão de fêmeas juntamente com os machos, embora a importância do estudo destas diferenças já tenha sido salientada desde 1993, onde a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) anunciou mudanças que encorajam a inclusão de mulheres em estudos de farmacocinética e enfatizam a necessidade de análises com grupos usando parâmetros como sexo e idade (YONKERS e BRAWMAN-MINTZER, 2002).

Embora o estudo dos efeitos da administração aguda ou crônica de DHEA nos comportamentos do nado forçado não resolveria os conflitos existentes a respeito das ações benéficas x depressivas da DHEA, esta investigação poderia trazer alguma luz sobre esses efeitos que já foram demonstradas em outros paradigmas comportamentais.

Este é o primeiro trabalho que estuda as diferenças apresentadas por machos e fêmeas, e destas, entre as diferentes fases do ciclo, após tratamento com DHEA, no modelo do teste do nado forçado. Embora não se possa extrapolar diretamente os resultados obtidos em animais para seres humanos, sempre se busca esclarecer as diferenças observadas em homens e mulheres, e destes, em fases específicas como durante pós-parto, menopausa, e imediatamente antes da menstruação, onde há fortes flutuações hormonais.

2 HIPÓTESE

DHEA tem sido utilizada na clínica como antidepressivo principalmente para mulheres. No entanto, os relatos ainda permanecem inconsistentes. São poucos os trabalhos com modelos animais, e mais deve ser estudado.

Diante destas considerações, nossas hipóteses são:

Machos e fêmeas apresentam diferenças nos comportamentos tipos depressivos no teste do nado forçado, com as mudanças hormonais das fêmeas, refletidas nas diferentes fases do ciclo estral, interferindo nestas respostas.

DHEA afeta o comportamento tipo depressivo neste modelo animal para depressão de maneira diferenciada quanto ao gênero.

As respostas comportamentais ao procedimento estressor do nado forçado, bem como ao tratamento com DHEA, estão relacionadas às mudanças nas concentrações plasmáticas de corticosterona, um hormônio clássico de resposta ao estresse, bem como de DHEA.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da administração de desidroepiandrosterona (DHEA) sobre o comportamento tipo depressivo e níveis hormonais de ratos, machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral, submetidos ao teste do nado forçado, um modelo animal de depressão.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar as diferenças entre os comportamentos de ratos machos e fêmeas em proestro e diestro II, no modelo do nado forçado;
- Avaliar as diferenças entre os comportamentos de ratos machos e fêmeas em proestro e diestro II, tratados com diferentes doses de DHEA, e submetidos ao teste do nado forçado;
- Comparar os efeitos do tratamento agudo e crônico no teste do nado forçado;
- Verificar o efeito da DHEA sobre a atividade locomotora;
- Determinar as concentrações séricas de DHEA e corticosterona nos animais em condições basais de laboratório;
- Determinar as concentrações plasmáticas de DHEA e corticosterona após tratamento agudo ou crônico com DHEA, após natação forçada .

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram usados ratos Wistar, adultos, pesando aproximadamente 250 g, com média de 75 dias de idade no início dos experimentos, provenientes do biotério da Fundação Faculdade de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA).

Os animais foram separados em grupos de, no máximo, cinco ratos por gaiola, com livre acesso à ração e água, exceto durante o teste comportamental.

Os animais permaneceram em ambiente controlado, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 7 h às 19 h) e temperatura ambiental de $20 \pm 2^\circ$ C.

Todos os experimentos foram realizados no mesmo horário, entre as 13:00 e as 16:00 horas. Durante todos os procedimentos, os animais foram deixados em suas gaiolas com o máximo de silêncio possível.

O protocolo experimental utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.2 FÁRMACOS

A desidroepiandrosterona (CALBIOCHEM, San Diego, EUA), foi diluída em solução de β -ciclodextrina (FLUKA-Sigma Aldrich) a 10% em água

destilada, constituindo-se três diferentes concentrações: 2 mg/kg, 10 mg/kg e 50 mg/kg. Os grupos controle receberam solução de β -ciclodextrina a 10%. As soluções foram preparadas no máximo vinte e quatro horas antes do experimento e armazenadas na geladeira. Todas as soluções foram administradas em um volume de 1 ml/Kg.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 CICLO ESTRAL

A partir de 75 dias de vida, o ciclo estral das fêmeas foi acompanhado mediante esfregaço vaginal diário, segundo a técnica de LONG EVANS (1922). Os esfregaços foram obtidos por lavagem vaginal diária com solução salina, utilizando-se ponteiros descartáveis de pipetas automáticas. A ponteira era gentilmente introduzida no canal vaginal e a solução era aplicada e retirada duas a três vezes. O material era analisado a fresco em microscópio óptico durante duas a três semanas antes de iniciar o teste comportamental. As fases do ciclo eram determinadas pela observação citológica. No proestro, a citologia vaginal é composta por células epiteliais nucleadas e arredondadas, que aparecem individualmente ou em grupos (Figura 2A). No estro, a citologia vaginal é composta por grupos de células escamosas cornificadas, sem núcleos visíveis, de forma irregular e com citoplasma granular (Figura 2B). No diestro ocorre predominância de pequenos leucócitos e células epiteliais escamosas cornificadas. Na fase de diestro II são observadas (Figura 2C) células epiteliais dispersas com pequenos núcleos (Figura 2D). Foram

selecionadas as fêmeas com 2 a 3 ciclos regulares completos, e que estavam nas fases de proestro e diestro II.

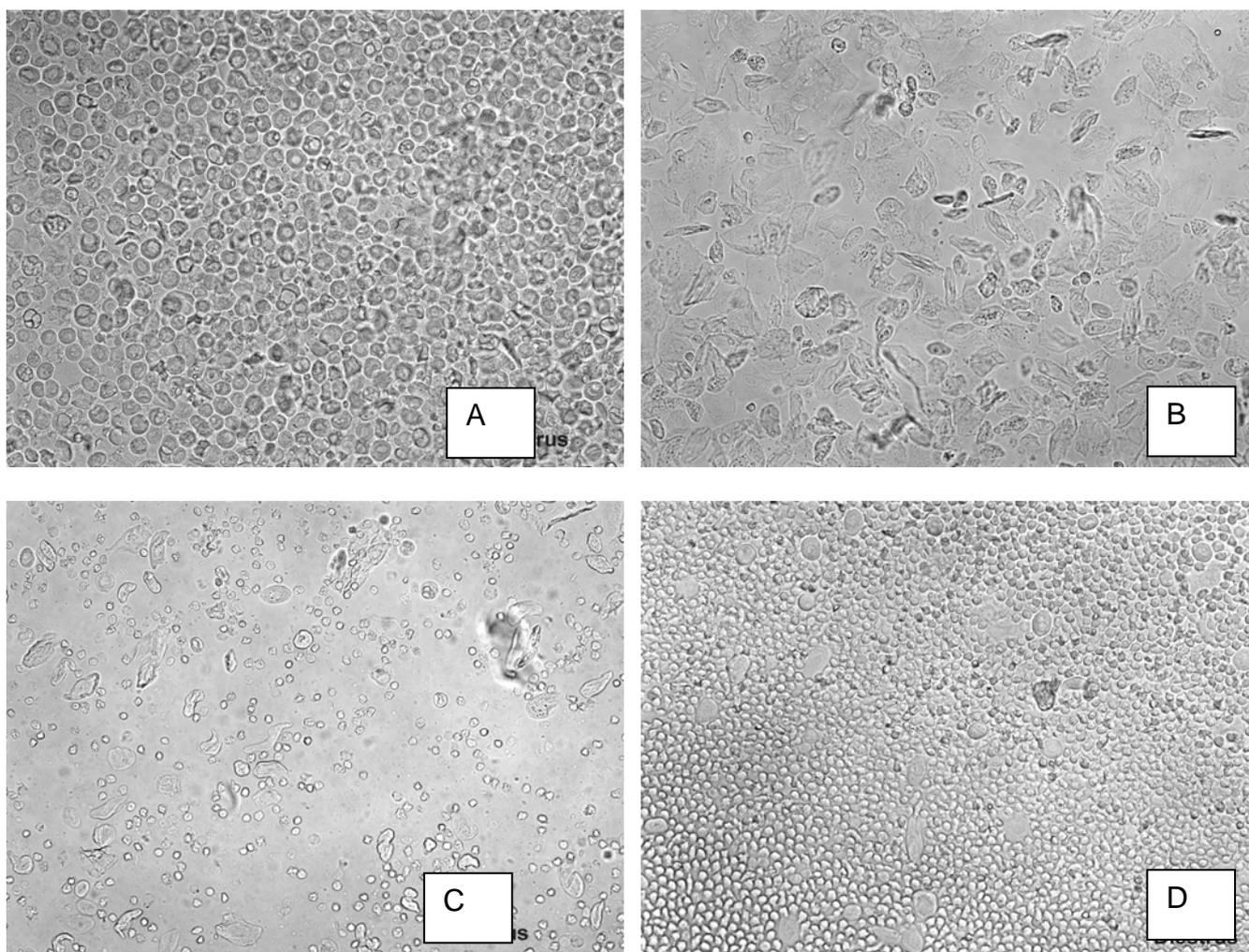


Figura 2. Fotomicrografia do ciclo estral de roedores. A – proestro; B- estro; C- diestro I; D- Diestro II. Retirado de www.princeton-edu

4.3.2 MODELO COMPORTAMENTAL DE DEPRESSÃO

O teste do nado forçado é um modelo animal clássico desenvolvido por Porsolt, em 1977, usado para testar o efeito antidepressivo de fármacos. Sucintamente, os animais são colocados individualmente em aquários de vidro opaco (25 x 25 x 40 cm) com água a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, até uma altura de 28 cm, para impossibilitar que os animais se apoiem com as patas ou cauda no fundo do aquário, e sem possibilidade de fuga (Figura 3).

No primeiro dia (treino), os animais são colocados a nadar por 15 minutos, ao final dos quais são retirados, secos e recolocados em suas gaiolas. Após vinte e quatro horas, são submetidos à segunda sessão de nado chamada de teste, com duração de 5 minutos. Entre as duas sessões, são administrados os fármacos em teste para atividade antidepressiva em três momentos, quais sejam: 24, 5 e 1 hora antes do teste.

Neste modelo, os animais, após um período inicial de nado vigoroso, passam a executar apenas movimentos para manter a cabeça fora da água. Este comportamento de imobilidade é interpretado por Porsolt, seu idealizador, como perda de motivação, ou “Desespero Comportamental”. A redução da duração da imobilidade por um fármaco é considerada como efeito antidepressivo ou antidesespero (PORSOLT *et al.*, 1977).

As sessões de teste foram gravadas em vídeo. Com o recurso atual de gravação dos comportamentos em fita de videocassete, vários parâmetros comportamentais, além do tempo de imobilidade, têm sido explorados na tentativa de melhor descrever os atos e posturas dos animais. Esse detalhamento tem como objetivo determinar a duração e frequência dos comportamentos, construindo etogramas que os especificam frente à situação



Figura 3. Teste do nado forçado

do teste do nado forçado, bem como as alterações produzidas por doenças ou pelo emprego de fármacos (RASNOW *et AL.*, 1997; PARMIGIANI *ET AL.*, 1999; FERIGOLO *et al*, 1998; GOMEZ e BARROS, 2000). Neste trabalho, foram detalhados os comportamentos de imobilidade e de mobilidade conforme descrito a seguir.

Considera-se imobilidade quando o rato deixa de se esforçar e move-se unicamente para manter a cabeça acima da água com pequenos movimentos (comportamento de flutuar), ou permanece totalmente imóvel (congelar).

Os comportamentos analisados na mobilidade foram: escalar, mergulhar, nadar central, mergulhar e *head-shake*. O comportamento de escalar se define quando o animal tenta escapar do aquário pelas laterais, tentando escalar as paredes. No comportamento de mergulhar, a tentativa de fuga é pelo fundo do aquário. O nadar central ocorre quando o rato tenta escapar pelo centro do aquário, através de nado vigoroso. O *head-shake* consiste na tentativa de retirar a água que entrou nos ouvidos ou no focinho, por uma rápida sacudida na cabeça (GOMEZ & BARROS, 2000).

Estes comportamentos foram posteriormente analisados no software específico Wabehav (um programa eletrônico de escrita em BASIC) pela observação das filmagens. A análise foi conduzida por apenas um observador previamente treinado para observar e distinguir as diversas posturas de imobilidade e de mobilidade. Cada comportamento (nadar central, mergulhar, escalar, flutuar, congelar e *head-shake*) foi codificado por uma tecla, onde os parâmetros de duração e frequência eram registrados durante 300 segundos mediante o toque da tecla código de cada comportamento no início e fim do mesmo, constituindo, desta forma, os etogramas. Os comportamentos de

mobilidade e de imobilidade foram contabilizados pela soma, respectivamente, dos comportamentos de “nadar”, “mergulhar” e “escalar”, bem como de “flutuar” e “congelar”.

Após a construção dos etogramas com os registros de frequência e duração de cada comportamento, o banco de dados subsequente foi submetido à análise estatística.

4.3.3 MODELO COMPORTAMENTAL DE LOCOMOÇÃO

Para detectar eventuais alterações motoras que pudessem comprometer as observações comportamentais no teste do nado forçado, os animais foram colocados em caixas de locomoção. O teste de locomoção, com duração de cinco minutos, foi realizado imediatamente antes do teste do nado forçado (2º dia). Estas caixas (30 x 30 x 72 cm) apresentam três células fotossensíveis dispostas longitudinalmente, que captam o número de passagens do animal. Ligado a cada caixa, existe um contador que fornece o registro numérico destas passagens (Figura 4).

4.3.4 COLETA DE SANGUE

Os ratos foram mortos por decapitação para coleta de sangue troncular, trinta minutos após o término do teste do nado forçado. As amostras foram coletadas e centrifugadas a aproximadamente 1000g, durante 10 minutos. O soro foi separado e estocado a -80° C para posterior dosagem hormonal.

O sacrifício era realizado em uma sala ao lado daquela onde eram realizados os experimentos e onde se encontravam as gaiolas com os ratos. O transporte dos animais entre as salas foi feito em menos de 15 segundos,

evitando o contato dos mesmos com cheiro de sangue, ruído ou qualquer estresse previsível no momento da decapitação.

4.3.5 DOSAGENS HORMONAIS

As concentrações séricas de DHEA e corticosterona foram determinadas por radioimunoensaio. Foram utilizados kits da MP BIOMEDICALS, Orangeburg, NY, com limite de detecção de DHEA de 0,2 a 30 ng/mL e de corticosterona de 25 a 1000 ng/mL. O limite de sensibilidade foi de 0,02 ng/mL. Os resultados foram expressos em ng/mL, considerando-se a curva padrão fornecida no kit como referência. A radioatividade foi contada em contador gama (LKB), com eficiência aproximada de 82%. Os grupos analisados foram os que receberam o tratamento agudo ou crônico com a dose de 2,0 mg/kg e basal, que refere-se animais sem tratamento e que não foram submetidos ao teste do nado forçado. Os coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio para DHEA foram de 10,6 % e 10,2%, respectivamente, e para corticosterona foram de 7,1% e 10,3%.



Figura 4- Caixa de Locomoção

4.4 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

4.4.1 . EXPERIMENTO 1- AGUDO

4.4.1.1 Experimento 1a – curva dose-resposta

O ciclo das fêmeas foi acompanhado durante 2 a 3 semanas anteriores ao teste comportamental. Foram selecionadas ratas que estivessem em proestro ou diestro II no dia do teste do nado forçado. Os grupos proestro e diestro II, juntamente com os machos, foram submetidos ao nado durante 15 minutos (treino). Logo após, foram retirados da água e secos. Trinta minutos após o término do treino, a primeira injeção do neuroesteróide foi administrada. Outras duas injeções foram administradas nos tempos de 5 e 1 hora antes do teste do dia seguinte. As doses de DHEA foram 2,0 mg/kg, 10 mg/kg e 50 mg/kg e foi constituído um grupo controle.

No dia do teste, a fase do ciclo das fêmeas, proestro ou diestro II, foi confirmada após a segunda administração de DHEA. Os animais que não estivessem na fase esperada eram descartados. Imediatamente antes do teste, os ratos eram colocados nas caixas de locomoção. Os comportamentos no teste do nado forçado foram registrados em filmagem VHS realizada durante 5 minutos. Trinta minutos após o nado forçado, os animais foram decapitados, e foi realizada a coleta de sangue. O sangue foi centrifugado e estocado para posterior dosagem de DHEA e corticosterona por radioimunoensaio. Os comportamentos foram analisados no software específico e submetidos à análise estatística.

Tabela 1: Cronograma Esquemático do experimento 1a - curva dose-resposta.

Esfregaço vaginal	Teste do Nado Forçado	
	0-15° dia	16° dia
<ul style="list-style-type: none"> - Determinação do ciclo estral - Seleção dos indivíduos 	<ul style="list-style-type: none"> - Ciclo: confirmação por esfregaço. - Treino: 15 min. - 1ª injeção- 30 min. após o treino. - DHEA: 0,2, 10 e 50 mg/kg i.p. 	<ul style="list-style-type: none"> - Injeção: 5 e 1 hora antes do nado. - Ciclo: confirmação mediante esfregaço. - Teste: 5 minutos - Filmagem - Sacrifício - Coleta de sangue

n= 8 - 10 por grupo

4.4.1.2. Experimento 1b –complemento da curva dose-resposta.

Embora o tratamento agudo com a dose de 2,0 mg/kg de DHEA tenha alterado o comportamento de congelar no teste do nado forçado, este resultado não se refletiu na imobilidade total. Foi testado então, um tratamento com uma dose mais baixa, 1,0 mg/kg, em ratos machos. Os demais procedimentos experimentais foram idênticos ao já descrito.

4.4.2 EXPERIMENTO 2 – CRÔNICO

Como nos experimentos anteriores, o ciclo das fêmeas foi acompanhado durante as 2 a 3 semanas que antecediam o teste comportamental. Foram selecionadas ratas que estivessem em proestro ou diestro II no dia do treino do nado forçado.

A primeira administração de DHEA na dose de 2,0 mg/kg e veículo para o grupo controle, ocorreu na manhã seguinte, e as demais foram realizadas em intervalos de 24 horas, por um período de 7 a 9 dias, durante os quais o ciclo das fêmeas continuou a ser acompanhado, totalizando o tratamento durante dois ciclos completos das fêmeas. Desta forma, as fêmeas que foram selecionadas para o treino estavam na mesma fase do ciclo estral no teste.

Os comportamentos no teste do nado forçado foram registrados e analisados conforme já descrito.

Tabela 2: Diagrama esquemático do experimento 2 –Crônico

Esfregaço vaginal	Teste do Nado Forçado (treino)	Ciclo e Tratamento	Teste do Nado Forçado
0-15° dia	16° dia	17° – 25° dia	26° dia
-Determinação do ciclo estral - Seleção dos indivíduos	-Treino: 15 min. - 1 ^a Injeção - Doses: 0 e 2,0 mg/kg <i>i.p</i>	- 2 ciclos completos; - Injeções: uma vez ao dia. - DHEA: 0 e 2,0 mg/kg <i>i.p</i>	-Teste: 5 min. - Filmagem - Sacrifício -Coleta de sangue

n: 8-10 por grupo.

4.4.3 EXPERIMENTO 3 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES BASAIS DE DHEA E CORTICOSTERONA.

Para fins de comparação, foram determinados os níveis basais de corticosterona e DHEA dos animais do laboratório. O ciclo estral das fêmeas foi acompanhado durante 2 a 3 ciclos completos e regulares. Foram selecionados machos e fêmeas em proestro e em diestro II, com 7 animais por grupo. O

sangue foi coletado, centrifugado, e o soro armazenado a -80° C para posterior dosagem hormonal por radioimunoensaio.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

De acordo com os resultados obtidos, as médias, os erros padrões e os desvios padrões foram calculados para cada comportamento analisado, do ponto de vista da frequência e da duração para cada grupo estudado. O tamanho da amostra (n) de cada grupo está especificado nas legendas. Foi aplicada análise de variância (ANOVA) de duas vias, usando sexo/fase do ciclo e tratamento como fatores independentes, seguida pelo teste *post hoc* de comparações múltiplas de Student-Newmann-Keuls, sempre que apropriado. No estudo comportamental os fatores considerados foram sexo, (machos, fêmeas em diestro II ou em proestro) e tratamentos. Para as dosagens hormonais foi realizada análise de variância (ANOVA) de duas vias, para comparação das concentrações de hormônios entre os sexos e os tratamentos. Para as dosagens basais de hormônios foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma via para comparação entre os grupos. Foi realizada Correlação de Pearson, para verificar a existência de correlações entre os comportamentos e as concentrações hormonais.

Os resultados foram expressos pela média \pm EPM, e o nível crítico fixado foi de 5% ($p < 0,05$) para se admitir diferenças estatisticamente significativas. O software SigmaStat 2.0 foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados.

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS COMPORTAMENTAIS

No experimento 1a, onde foi realizada uma curva dose-resposta para avaliação dos efeitos da administração aguda de DHEA, ocorreu interação entre o tratamento e sexo no comportamento de congelar (ANOVA, $F_{(6,88)} = 2,33$; $p = 0,03$). As fêmeas em proestro apresentaram a duração de congelar significativamente maior, na dose de 2,0 mg/kg (ANOVA, $F_{(6,88)} = 2,33$; $p = 0,03$) e a frequência deste comportamento foi significativamente maior que nos machos, independentemente do tratamento (ANOVA, $F_{(6,88)} = 1,41$; $P = 0,04$). Quando avaliamos os outros comportamentos, verificamos que, neste experimento, a frequência e a duração dos comportamentos de escalar, nadar central, mergulhar, flutuar ou *head-shake* (Tabela 3), não foram modificados significativamente pela administração de quaisquer das três doses de DHEA. Conseqüentemente, a imobilidade total no teste do nado forçado não foi modificada por nenhuma das doses, assim como machos e fêmeas também não apresentaram diferenças neste comportamento (Figura 5). Nestes mesmos animais, observamos que a locomoção aumentou significativamente em todos os grupos tratados com DHEA, na dose 50 mg/kg (Figura 6).

Como a dose de 2 mg/kg de DHEA alterou o comportamento de congelar, foi realizado um tratamento adicional com uma dose ainda mais baixa de DHEA (1mg/kg), em machos. A Figura 7 mostra que o tratamento com esta dose não modificou significativamente a duração do comportamento de

imobilidade neste grupo de animais. Realizando um detalhamento da frequência e duração dos comportamentos, observamos na Tabela 4 as médias de imobilidade (congelar e flutuar), de mobilidade (escalar, nadar central e mergulhar), bem como de *head-shake*, que também não foram diferentes estatisticamente.

O tratamento crônico com DHEA na dose de 2,0 mg/kg, em machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo, produziu uma interação entre tratamento e sexo no comportamento de imobilidade (ANOVA, $F_{(2,42)} = 4,226$; $p=0,02$) (figura 8). O tratamento aumentou o tempo de imobilidade apenas para as fêmeas em diestro II. Porém, flutuar e congelar, que representam no seu conjunto o comportamento de imobilidade, não foram alterados quando isolados. O tempo de escalar apresentou uma interação entre sexo e tratamento: (ANOVA, $F_{(2,42)} = 3,41$; $p=0,04$). O tratamento com DHEA (2,0 mg/kg) diminuiu o escalar em fêmeas em diestro II, que foi refletido no resultado final de imobilidade. Interessantemente, nos animais controle, as fêmeas em diestro II apresentaram maior tempo de escalar do que as fêmeas em proestro (ANOVA, $F_{(2,42)} = 3,41$; $p=0,04$). Quando analisamos o tempo de nadar central, vimos que, de forma contraditória, o tratamento aumentou significativamente este comportamento (ANOVA, $F_{(1,42)} = 4,544$, $p=0,03$). Finalizando, o tempo de mergulhar e de *head shake* não foram alterados. O mesmo ocorreu com as frequências de todos os comportamentos (Tabela 5).

Visto que a DHEA é um neuroesteróide precursor de androgênios, podendo interferir no ciclo das fêmeas conforme a dosagem e forma de tratamento, nos preocupamos em avaliar se o tratamento crônico com DHEA

modifica o ciclo estral das ratas. Não foi observada alteração do ciclo estral das fêmeas com este tratamento.

5.2 DOSAGENS HORMONAIS

As Figuras 9 e 10 mostram as concentrações séricas basais de DHEA e corticosterona de ratos não tratados e que não passaram pelo procedimento do nado forçado. As concentrações basais de DHEA não apresentaram diferenças significativas entre os sexos (Figura 9A). No entanto, as concentrações basais de corticosterona apresentaram diferenças significativas entre os sexos (ANOVA, $F_{(2,15)} = 7,512$; $p = 0,005$). As fêmeas em proestro têm concentrações de corticosterona maiores que os machos (Figura 10A). De forma semelhante, a relação corticosterona/DHEA foram significativamente maiores em fêmeas do que em machos.

Foram dosados DHEA e corticosterona séricas, nos grupos tratados com DHEA 2,0 mg/kg, a única dose que induziu efeito comportamental. Fêmeas em diestro II e em proestro apresentaram concentrações de DHEA mais elevadas do que os machos, após o teste do nado forçado (ANOVA, $F_{(2,28)} = 5,747$; $p = 0,008$). O tratamento com DHEA aumentou significativamente a concentração sérica de DHEA em todos os grupos (ANOVA, $F_{(1,28)} = 118,445$; $p < 0,001$) (Figura 9B). Quanto ao sexo, a corticosterona sérica também foi semelhante à DHEA: fêmeas em diestro II apresentaram corticosterona significativamente maior que os machos. (ANOVA, $F_{(2,28)} = 4,231$; $p = 0,02$). A relação corticosterona/ DHEA foi mais baixa nos animais tratados do que nos animais controle (ANOVA, $F_{(1,25)} = 67,024$; $p < 0,001$). Porém, não há correlação

entre o tempo de imobilidade e as concentrações de DHEA, corticosterona, ou sobre a relação corticosterona/ DHEA.

No experimento 2, onde os ratos receberam tratamento crônico com 2,0 mg/kg de DHEA, as dosagens hormonais por radioimunoensaio mostraram que, conforme a figura 9C, as concentrações de DHEA sérica após o tratamento aumentaram significativamente (ANOVA, $F_{(1,30)}=34,149$; $p<0,001$). Os ratos não tratados, mas que passaram pelo procedimento experimental, não apresentaram diferenças significativas entre os sexos, ou entre as fases do ciclo estral nas fêmeas, na concentração de DHEA sérica. Quanto às concentrações de corticosterona nos grupos macho, proestro e diestro II a Figura 10C mostra que não há diferença significativa entre os diferentes grupos, tratados ou não. Da mesma forma que no experimento agudo, a relação corticosterona/DHEA foi alterada pelo tratamento, mas não há correlação entre os níveis de corticosterona, DHEA, ou relação corticosterona/DHEA e o comportamento de imobilidade no procedimento crônico.

Quando verificamos o efeito do estresse do nado forçado e da manipulação aguda e crônica, representado pelos animais controle nos experimentos 1 e 2, através das concentrações séricas de DHEA e corticosterona, verificamos que: as fêmeas em diestro II e em proestro respondem diferentemente ao procedimento agudo e crônico, em relação às suas concentrações de DHEA sérica. DHEA aumenta significativamente nas fêmeas após o teste do nado forçado sob tratamento agudo com DHEA, o que não ocorre nos machos. Este aumento é abolido no experimento crônico. O procedimento agudo provoca aumento da DHEA sérica, independentemente do grupo, que da mesma forma é abolido no experimento crônico.

Quanto às concentrações de corticosterona sérica nestes animais, a Figura 10 mostra que os níveis aumentam significativamente em relação ao basal no experimento agudo, e diminuem significativamente após tratamento crônico. Em condições basais, e após o teste do nado forçado agudo, as fêmeas em proestro possuem mais corticosterona que os machos, o que não aparece após experimento crônico.

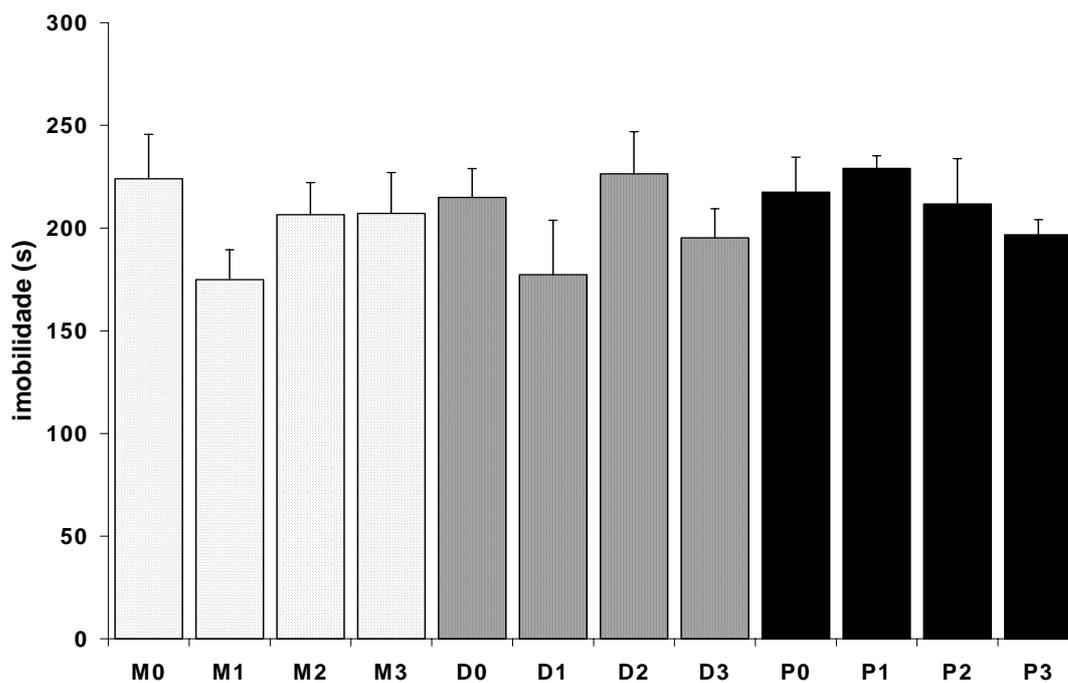


Figura 5: Duração da imobilidade (s) no teste do nado forçado após tratamento agudo com DHEA (i.p.); Doses: 2 mg/kg (1), 10 mg/kg (2), e 50 mg/kg (3). M=Machos; D=Diestro II; P= Proestro. N= 8-10 por grupo. Histogramas representam média \pm EPM

Tabela 3: Duração e freqüência dos comportamentos de imobilidade e mobilidade detalhados, no teste do nado forçado após tratamento agudo com DHEA (*i.p*) nas doses 2, 10 e 50 mg/kg ou veículo (β -ciclodextrina). N= 8-10 por grupo. Valores representam a média + EPM. *Proestro difere do controle, das outras doses e dos machos (ANOVA $F_{(6,88)} = 2,33$; $p=0,03$). **Proestro difere dos machos (ANOVA $F_{(6,88)} = 1,41$; $p=0,04$)

DURAÇÃO						
Machos	congelar	flutuar	escalar	nadar central	mergulhar	head shake
0 mg/Kg	13,62 ± 8,94	210,37 ± 18,75	67,25 ± 19,88	5,25 ± 2,67	0 ± 0	3,12 ± 1,84
2 mg/Kg	0 ± 0	174,87 ± 14,51	106,75 ± 13,65	12,62 ± 6,04	3,37 ± 3,23	3,87 ± 1,36
10 mg/Kg	30,87 ± 22,68	175,62 ± 17,68	70 ± 15,53	17,62 ± 7,17	3,25 ± 3,25	6,25 ± 2,38
50 mg/Kg	18,75 ± 13,25	188,37 ± 19,00	77,12 ± 19,68	11,5 ± 5,07	0,37 ± 0,37	3,12 ± 1,64
Diestro						
0mg/Kg	10,12 ± 8,78	204,75 ± 12,36	68,12 ± 11,42	14,37 ± 7,40	1,87 ± 0,83	4,5 ± 1,88
2 mg/Kg	2,9 ± 1,81	174,4 ± 25,30	108 ± 24,80	12,7 ± 0	0,7 ± 0,33	4,9 ± 1,70
10 mg/Kg	30,62 ± 14,61	195,75 ± 18,96	67,75 ± 19,36	3,87 ± 2,54	2,75 ± 2,35	7 ± 5,06
50 mg/Kg	25,11 ± 19,71	170,11 ± 24,71	89,88 ± 10,50	11,11 ± 4,82	2,55 ± 1,61	7,44 ± 2,46
Proestro						
0 mg/Kg	39 ± -24,05	1,78,5 ± -20,01	73,37 ± -16,41	6,75 ± -3,65	0,12 ± -0,12	6,87 ± -2,65
2 mg/Kg	82,12 ± 32,46*	147 ± 28,02	48 ± 9,96	12,75 ± 5,46	6,87 ± 6,73	5,75 ± 3,64
10 mg/Kg	8,75 ± 3,14	203 ± 21,85	80,62 ± 20,59	12,5 ± 5,18	1,25 ± 0,86	2,5 ± 1,28
50 mg/Kg	27 ± 15,66	169,77 ± 22,38	92,55 ± 23,22	10,88 ± 5,17	1 ± 0,78	3 ± 1,30
FREQÜÊNCIA						
Machos						
0 mg/Kg	0,62 ± 0,41	3,87 ± 0,54	2,87 ± 0,61	1,37 ± 0,65	0 ± 0	9,87 ± 5,55
2 mg/Kg	0 ± 0	4,37 ± 1,28	5,62 ± 1,29	3,75 ± 1,63	0,87 ± 0,74	20 ± 5,96
10 mg/Kg	1,5 ± 0,70	6,62 ± 1,30	5,12 ± 1,17	2,87 ± 1,20	0,75 ± 0,75	26,75 ± 7,97
50 mg/Kg	0,87 ± 0,35	4 ± 0,70	3,37 ± 0,82	2,12 ± 0,74	0,25 ± 0,25	12,5 ± 5,89
Diestro						
0mg/Kg	0,37 ± 0,26	4,87 ± 0,61	4,62 ± 0,98	1,87 ± 0,87	0,62 ± 0,18	18,25 ± 6,71
2 mg/Kg	0,3 ± 0,15	4,5 ± 0,63	4,7 ± 0,7	2,6 ± 0,76	0,4 ± 0,16	23,4 ± 7,06
10 mg/Kg	0,87 ± 0,39	4,5 ± 0,82	4,5 ± 0,88	1,12 ± 0,71	0,37 ± 0,26	18 ± 7,11
50 mg/Kg	1,33 ± 0,47	5,11 ± 0,90	6,44 ± 1,17	2,66 ± 0,94	0,66 ± 0,28	27,88 ± 7,99
Proestro						
0 mg/Kg	1 ± 0,37**	5,25 ± -1,04	6 ± -1,48	1,5 ± -0,62	0,12 ± -0,12	26,62 ± -11,53
2 mg/Kg	2 ± 0,59**	5,25 ± 0,97	4,25 ± 0,88	2,37 ± 0,92	0,75 ± 0,61	16,12 ± 7,73
10 mg/Kg	1,12 ± 0,39**	5,75 ± 0,81	6,37 ± 1,30	2 ± 0,80	0,75 ± 0,49	11,87 ± 5,18
50 mg/Kg	1,55 ± 0,66**	5,77 ± 0,68	5,55 ± 0,68	2,22 ± 0,54	0,33 ± 0,23	14,33 ± 5,88

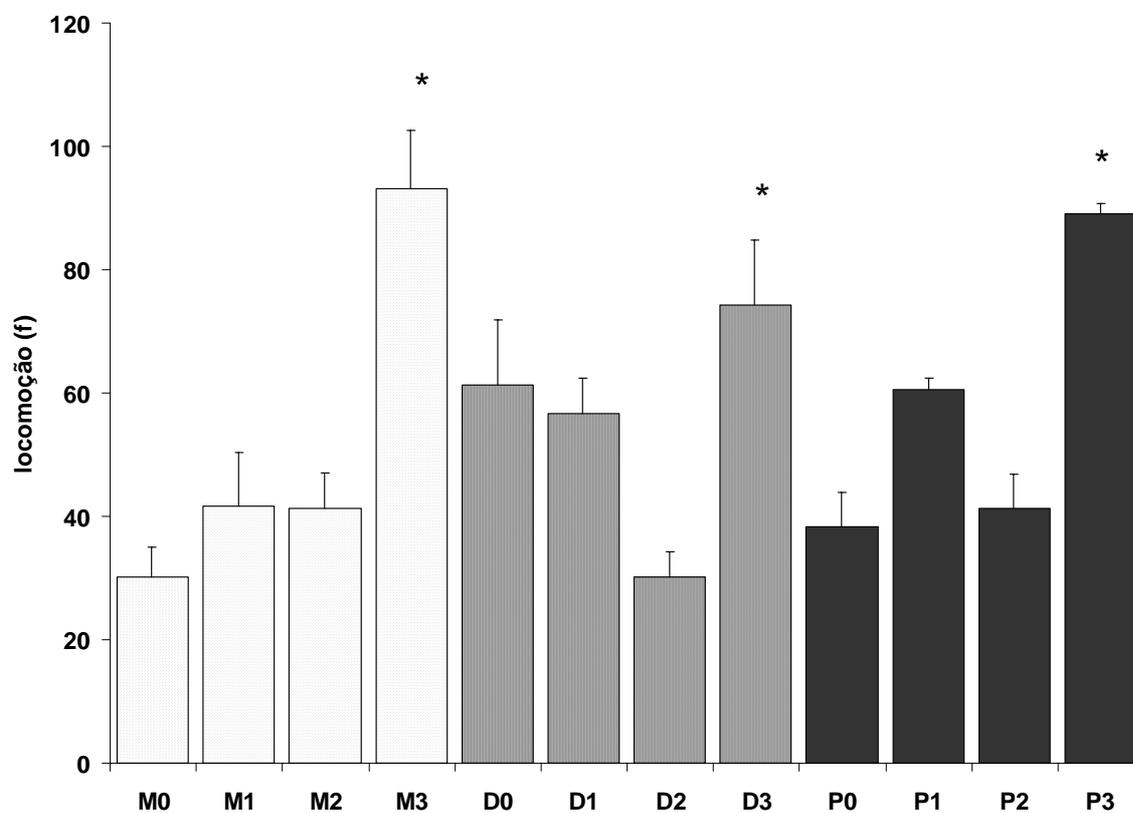


Figura 6: Locomção (f) após tratamento agudo com DHEA (i.p.); Dose: 2 mg/kg (1). M=Machos; D=Diestro; P= Proestro. N= 8 -10 por grupo. Histogramas representam média \pm EPM. * Difere do controle (ANOVA $F_{(2,42)}=4,226$; $p=0,02$).

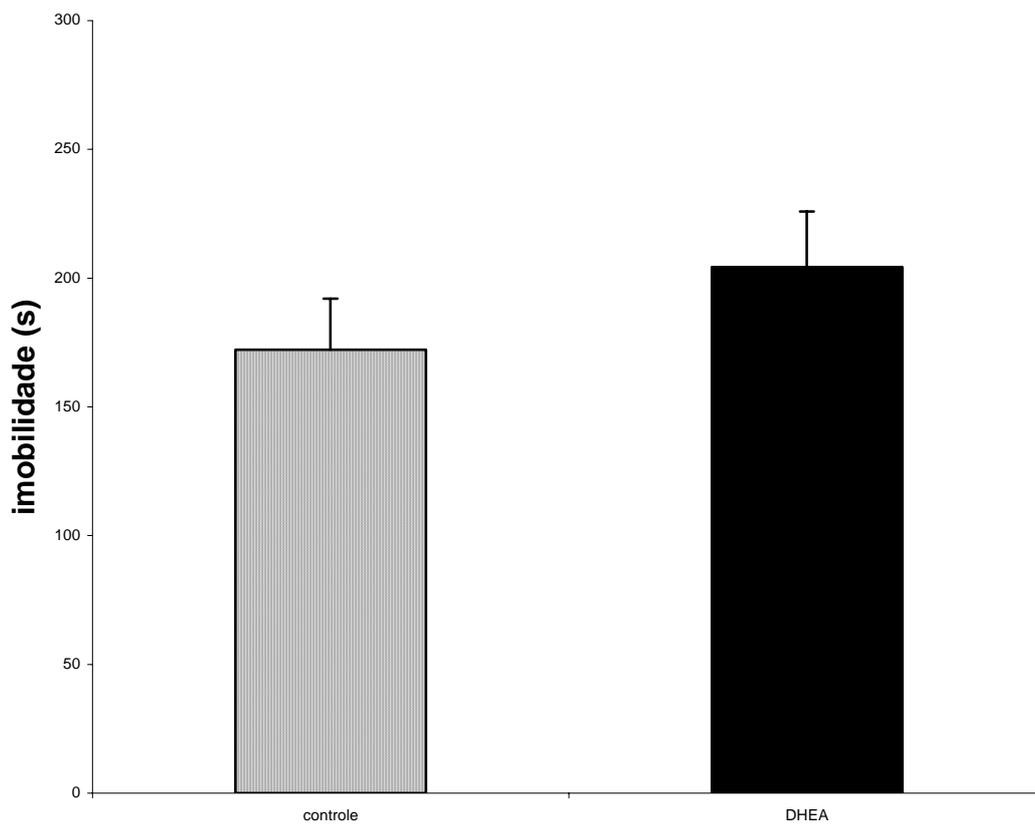


Figura 7: Duração da imobilidade(s) em ratos machos no teste do nado forçado após tratamento agudo com DHEA (i.p.); Dose: 1 mg/kg N= 8 por grupo. Histogramas representam média \pm EPM.

Tabela 4: Duração e frequência dos comportamentos de imobilidade e mobilidade detalhados, no teste do nado forçado em ratos machos após tratamento agudo com DHEA (*i.p*) ou veículo (β -ciclodextrina). N= 8 por grupo. Valores representam a média + EPM.

Comportamentos	Frequência		Duração (s)	
	Controle	DHEA	Controle	DHEA
Congelar	0,50 \pm 0,27	1,25 \pm 0,65	5,87 \pm 4,78	48,50 \pm 27,78
Flutuar	5,25 \pm 0,84	5,37 \pm 0,73	166,37 \pm 17,18	155,75 \pm 26,40
Escalar	7,00 \pm 1,69	3,62 \pm 0,75	97,25 \pm 16,39	71,50 \pm 16,20
Nadar Central	2,12 \pm 1,03	0,00 \pm 0,00	3,25 \pm 1,52	0,00 \pm 0,00
<i>Head shake</i>	42,37 \pm 8,24	24 \pm 10,52	8,62 \pm 6,59	5,87 \pm 2,34
Mergulhar	0,00 \pm 0,00	0,12 \pm 0,13	0,00 \pm 0,00	0,35 \pm 0,13 \pm

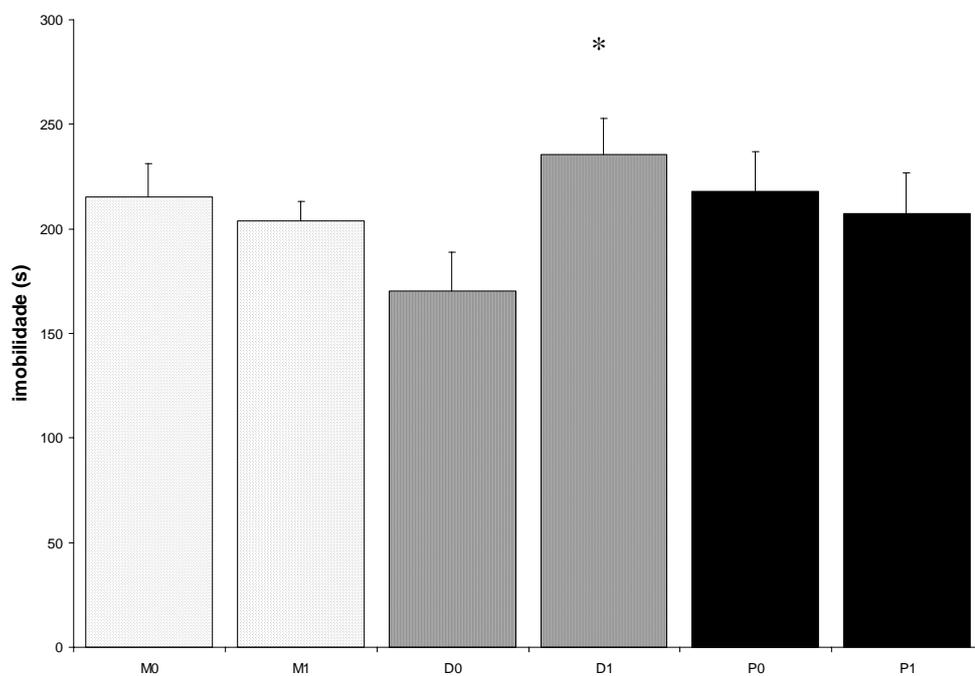


Figura 8: Duração da imobilidade(s) no teste do nado forçado após tratamento crônico com DHEA (i.p.); Dose: 2 mg/kg (1). M=Machos; D=Diestro; P= Proestro. N= 8 -10 por grupo. Histogramas representam média \pm EPM. * Difere do controle (ANOVA $F_{(2,42)} = 4,226$; $p = 0,02$).

Tabela 5: Duração e freqüência dos comportamentos de imobilidade mobilidade detalhados, no teste do nado forçado após tratamento crônico com DHEA (*i.p*) na dose 2,0 mg/kg ou veículo (β -ciclodextrina). N= 8-10 por grupo. Valores representam a média + EPM. *Difere de proestro controle (ANOVA $F_{(2,42)}=3,417$; $p=0,04$). ** Difere de diestro controle (ANOVA $F_{(2,42)}=3,417$; $p=0,04$). # Difere dos controle (ANOVA $F_{(1,42)}=4,544$; $p=0,03$)

Tempo						
Machos	congelar	flutuar	escalar	nadar central	mergulhar	head shake
0 mg/Kg	47,75 ± 25,70	167,38 ± 33,85	86,13 ± 15,61	0,38 ± 0,26	0 ± 0	8,25 ± 2,42
2 mg/Kg	72,63 ± 31,17	131,38 ± 28,00	81,88 ± 9,26	5,13 ± 2,19[#]	0,25 ± 0,25	9,88 ± 3,26
Diestro						
0mg/Kg	55,13 ± 23,06	115,25 ± 15,13	125,50±17,59*	4,63 ± 3,28	0,75 ± 0,75	11,75 ± 3,35
2 mg/Kg	109,38 ± 34,40	124,88 ± 22,93	62,25 ± 16,06**	3,75 ± 2,02[#]	0 ± 0	6,88 ± 2,35
Proestro						
0 mg/Kg	58,13 ± 39,60	159,75 ± 26,05	74,00 ± 17,51	4,00 ± 1,35	0,88 ± 0,88	7,38 ± 1,83
2 mg/Kg	76,50 ± 39,05	130,13 ± 31,78	77,13 ± 16,10	11,38 ± 3,29[#]	1,13 ± 0,88	8,50 ± 1,81
Freqüência						
Machos						
0 mg/Kg	1,63 ± 0,75	4,38 ± 1,00	4,63 ± 0,73	0,38 ± 0,18	0 ± 0	37,13 ± 10,47
2 mg/Kg	2,00 ± 0,73	4,38 ± 0,73	5,50 ± 0,60	2,13 ± 0,85	0,25 ± 0,25	35,25 ± 8,50
Diestro						
0mg/Kg	1,13 ± 0,44	3,38 ± 0,91	7,13 ± 2,89	1,75 ± 0,96	0,13 ± 0,13	32,75 ± 8,30
2 mg/Kg	1,88 ± 0,40	5,13 ± 0,97	5,50 ± 1,13	1,88 ± 0,93	0 ± 0	25,25 ± 8,06
Proestro						
0 mg/Kg	0,50 ± 0,27	5,13 ± 0,97	6,25 ± 1,25	3,38 ± 1,88	0,13 ± 0,13	31,25 ± 7,43
2 mg/Kg	1,63 ± 0,50	5,50 ± 1,07	7,25 ± 1,35	3,75 ± 1,13	0,50 ± 0,38	33,00 ± 6,81

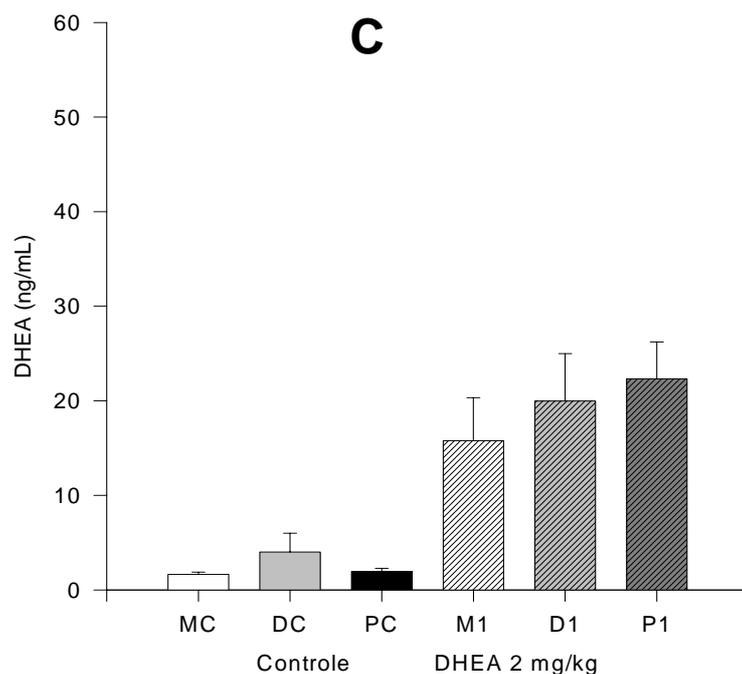
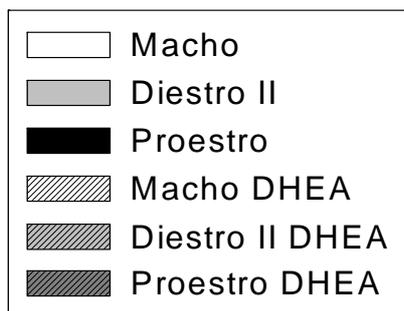
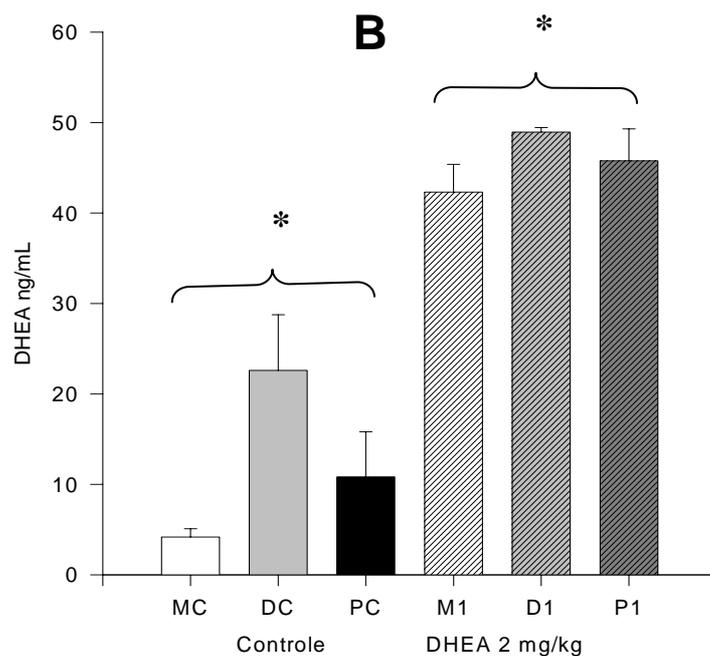
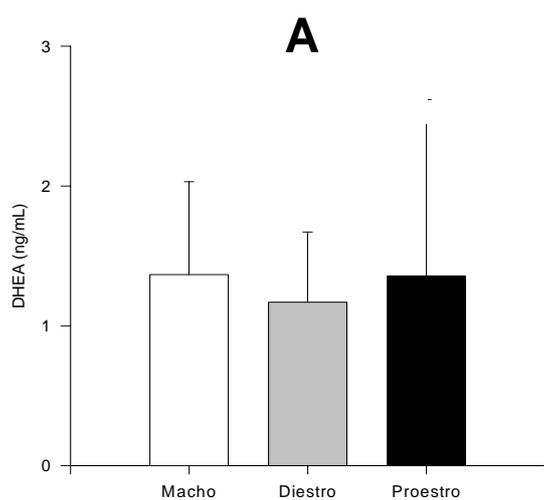


Figura 9: Concentrações de DHEA sérica (ng/mL). A- concentrações basais; B- coleta realizada 30 minutos após o teste do nado forçado e tratamento agudo com DHEA (i.p.); Dose: 2 mg/kg (1) ou veículo (c). C- coleta realizada 30 minutos após o teste do nado forçado e tratamento crônico com DHEA (i.p.); Dose: 2 mg/kg (1) ou veículo (c). M=Machos; D=Diestro; P= Proestro. Histogramas representam média \pm EPM. A- * Difere de machos controle (ANOVA $F_{(2,28)}=5,747$; $p=0,008$). B- *Difere do controle (ANOVA $F_{(1,28)}=118,445$; $p<0,001$). C- *Difere do controle (ANOVA $F_{(1,30)}=39,149$; $p<0,001$).

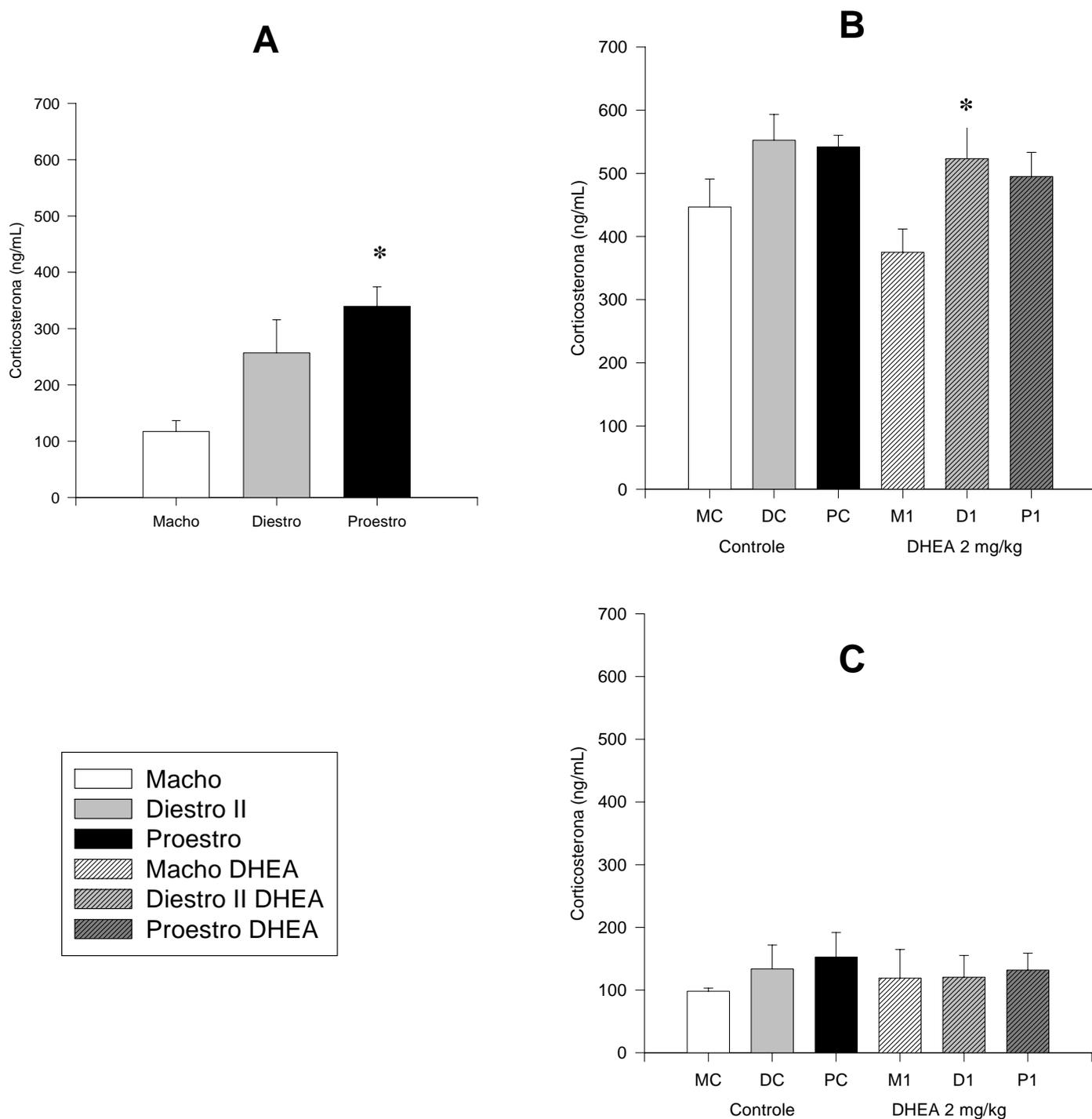


Figura 10: Concentrações de corticosterona sérica (ng/mL). A- concentrações basais; B- coleta realizada 30 minutos após o teste do nado forçado e tratamento agudo com DHEA (i.p.); Dose: 2 mg/kg (1) ou veículo (c). C- coleta realizada 30 minutos após o teste do nado forçado e tratamento crônico com DHEA (i.p.); Dose: 2 mg/kg (1) ou veículo (c). M=Machos; D=Diestro; P= Proestro. Histogramas representam média \pm EPM. A- * Difere de machos controle (ANOVA $F_{(2,28)}=5,747$; $p=0,008$). A- *Difere de machos (ANOVA $F_{(2,15)}=7,512$; $p=0,005$). B- *Difere de machos (ANOVA $F_{(2,28)}=4,231$; $p=0,02$).

6. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi examinar o efeito da administração de DHEA sobre os comportamentos e em parâmetros hormonais em ratos machos e fêmeas submetidos ao teste do nado forçado. Os resultados demonstraram que a administração aguda ou crônica de DHEA produz efeitos comportamentais e hormonais diferenciados, em ratos no teste do nado forçado, e que estes efeitos são influenciados pelo gênero e por mudanças hormonais que ocorrem nas ratas fêmeas durante o ciclo estral.

Detalhando os resultados do presente estudo, surgem alguns dados interessantes. Machos e fêmeas apresentam diferenças em comportamentos no teste do nado forçado, dependendo de estímulos estressores continuados, evidenciado pelo maior tempo de escalar das fêmeas controle em diestro II no experimento crônico. Outros estudos detectaram ou não diferenças entre machos e fêmeas no teste do nado forçado. Quando os animais foram analisados no treino do nado forçado, fêmeas se mostraram mais ativas, resultado que foi revertido no dia do teste (BARROS e FERIGOLO, 1998). Similarmente, o efeito da administração de melatonina apareceu unicamente durante a exposição inicial ao teste do nado forçado, desaparecendo no segundo dia (BROTTO *et al*, 2000). Estes dados podem explicar o resultado de David *et al* (2003) que não detectaram diferenças entre os sexos no nado forçado agudo.

No entanto, quando os experimentos foram conduzidos após repetidas experiências estressoras ou o simples manuseio prévio, como o

acompanhamento do ciclo estral por esfregaço vaginal, as diferenças relacionadas ao sexo surgiram no nado forçado, com as fêmeas mostrando maiores durações nos comportamentos de mobilidade (CONTRERAS *et al*, 1998; CAMPBELL *et al*, 1989; ALONSO *et al*, 1991; MARVAN *et al*, 1997; BROTTTO *et al*, 2000) ou ainda, especificamente, do comportamento de escalar (CONTRERAS *et al*, 1998; CAMPBELL *et al*, 1989), refletindo o esforço de sair de uma condição estressora (BARROS e FERIGOLO, 1998).

Desta forma, podemos concluir que machos e fêmeas respondem diferentemente ao teste do nado forçado, e esta resposta está relacionada ao tempo de manipulação e procedimentos estressores com os animais, bem como à influência de muitos fatores, como processamento sensorial, velocidade motora, atenção e resposta ao estresse, que são sexualmente dimórficos (AKINCI e JOHSTON, 1997; KELLY *et al*, 1999).

Nosso estudo pode apresentar algumas importantes implicações clínicas. A depressão é uma desordem de humor conhecida por muitos, sendo que 20% da população experimenta algum tipo de depressão em suas vidas (KESSLER *et al*, 1994). Além disso, é bem estabelecido que as mulheres apresentam duas vezes mais episódios depressivos do que os homens (EARLS, 1987; YONKERS e BRAWMAN-MINTZER, 2002). Conseqüentemente, um importante fato acerca do modelo do nado forçado é o fato da discrepância das mais altas taxas de mulheres sofrendo de depressão do que os homens, enquanto fêmeas mostram menos imobilidade do que machos (BARROS e FERIGOLO, 1998).

Em humanos, a mais alta incidência de depressão no sexo feminino, e, em vários casos, a severidade da depressão está associada com a modificação

dos hormônios ovarianos (YONKERS e BRAWMAN-MINTZER, 2002). No entanto, estudos com modelos animais que buscam reproduzir estas situações são falhos. Modelos como gonadectomia, reposição de hormônios ovarianos, ou indução de pseudogravidez (animais induzidos artificialmente a atingir altos níveis de progesterona plasmática) ainda apresentam resultados controversos. Por exemplo, foram encontrados aumento na imobilidade (GALEA *et al*, 2002), bem como diminuição na imobilidade (ESTRADA-CAMARENA *et al*, 2003; MOLINA-HERNÁNDEZ *et al*, 2000) seguidos à administração de estradiol ou de progesterona (KAUR e KULKARNI, 2002; MOTA-MARTINEZ *et al*, 1999). Certamente, mais estudos utilizando fêmeas devem ser encorajados, para esclarecer estes aspectos.

Também podemos concluir do presente estudo que a administração de DHEA produziu aumento na imobilidade. Este resultado foi restrito para fêmeas no diestro, e é a primeira demonstração deste efeito em modelo animal. Contudo, há poucos trabalhos sobre o efeito de DHEA no comportamento tipo depressivo em animais. Alguns foram realizados com DHEA na sua forma sulfatada. Há registro de diminuição de imobilidade ou não, porém apenas em machos (URANI *et al*, 2001, REDDY *et al*, 1998; PRASAD *et al*, 1997). Assim, não foram verificadas as diferenças entre os gêneros.

Assim, as discrepâncias entre os nossos dados de aumento de imobilidade após a administração de DHEA, e aqueles encontrados por esses autores, de não modificação ou diminuição da imobilidade, podem decorrer de várias diferenças nas características das amostras utilizadas. Primeiro, alguns autores utilizaram camundongos e não ratos. É sabido que humanos possuem mais DHEA que camundongos, e estes, mais do que os ratos (ROBEL e

BAULIEU, 1995; PIEPER e LOBOCK, 2000). Borsini e Meli (1988) questionaram o uso de camundongos no teste do nado forçado, por problemas de falso negativo e falso positivo, indicando ser mais acurado o uso de ratos para estes estudos. Mesmo diferentes raças de ratos possuem diferentes respostas. A raça Wistar Kioko flutua mais no nado forçado quando comparado à Wistar e Sprague Dawley (TEJANIO-BUTT *et al*, 2001), fato que pode decorrer de diferentes concentrações cerebrais de dopamina e serotonina (DAVID, 2001). Segundo, alguns destes trabalhos utilizaram a forma sulfatada de DHEA, que produz aumento da imobilidade. Porém, para avaliar as propriedades clínicas dos esteróides é necessário mais informações sobre a conversão de seus precursores para derivados com perfil farmacológico. Faltam dados dos efeitos destes precursores a longo prazo, assim como estudos que investiguem os efeitos dos esteróides neuroativos e dos neuroesteróides nos diferentes e múltiplos receptores para neurotransmissores e as conseqüências comportamentais da administração a longo prazo, para explorar o potencial neuropsicofarmacológico deste tipo não clássico de fármacos (RUPPRECH, 2003). Terceiro, os diferentes modelos de depressão utilizados podem produzir diferentes respostas. David *et al* (2003) verificaram que diferentes testes para detectar depressão obtiveram diferentes respostas, com as mesmas doses de fármacos aplicadas. No teste do nado forçado, fêmeas responderam com diminuição de imobilidade apenas a uma determinada dose de imipramina enquanto os machos responderam a esta, e também a outras doses. Quando submetidos ao teste da cauda suspensa, ambos, machos e fêmeas, responderam às mesmas doses deste antidepressivo.

Por outro lado, em humanos, investigações clínicas têm documentado um considerável número de mulheres tratadas com DHEA que relataram piora dos sintomas depressivos, assim como foram encontrados altos níveis de DHEA plasmática associadas à depressão (HEUSER *et al*, 1998; GOODYER *et al*, 2000; SONDEGAARD *et al*, 2002; SPIVAK *et al*, 2000). Além disso, DHEA está associada à resistência à terapia eletroconvulsiva em certos pacientes deprimidos (MAAYAN *et al*, 2000).

Ainda, foi relatado em estudo epidemiológico, que certo grupo de usuários de DHEA podem desenvolver diversos sintomas psiquiátricos (DEAN, 2000) Isto foi corroborado por trabalhos recentes (VACHERON-TRYSTMAN *et al*, 2002; DUBROVSKY, 2005), que relatam casos de mania precipitada pelo uso de DHEA para depressão. Huppert *et al*, (2000) estudando os efeitos da administração de DHEA/DHEAs em humanos, concluiu que os dados atuais oferecem suporte limitado para o aumento do bem estar de pacientes tratados com DHEA.

Por outro lado, talvez os relatos do aumento de bem estar, após tratamento com DHEA em mulheres deprimidas, possa refletir uma melhora da ansiedade como componente da depressão, já que DHEA/DHEAs também apresentam efeito ansiolítico (OUSIUKOVA *et al*, 2003a, b; REDDY e KULKARNI, 1998; REDDY e KULKARNI, 1997). Em humanos, é sabido que os antidepressivos melhoram com sucesso a ansiedade como um componente da depressão, bem como os transtornos individualizados (DAVID e FRAZER, 2004; MORILAK e FRAZER, 2004). Concordando com estas observações, Molina-Hernandez *et al* (2000), administrando progesterona em ratos, encontraram diminuição da imobilidade no teste do nado forçado, e concluíram

que os resultados obtidos podem ser devidos a um efeito tipo ansiolítico da progesterona, mais do que antidepressivo, já que outros fármacos como clomipramina e desipramina, além de suas conhecidas propriedades antidepressivas, também apresentam efeitos tipo ansiolíticos.

Outro resultado do presente estudo que deve ser ressaltado é o fato de machos e fêmeas produzirem respostas diferenciadas após tratamento agudo ou crônico com DHEA. Doses baixas e agudas de DHEA aumentaram o tempo dispendido em congelar nas fêmeas em proestro durante a exposição ao nado forçado. Quando foi realizado tratamento crônico, as fêmeas em diestro II diminuíram significativamente o comportamento de escalar, que interferiu significativamente na imobilidade total.

Ou seja, nosso estudo demonstra que, contraditoriamente, o tratamento crônico com DHEA não produziu resposta antidepressiva e, por outro lado, na fase de diestro II das fêmeas, aumentou o comportamento tipo depressivo, pelo aumento da imobilidade e diminuição do escalar. É conhecido que DHEA apresenta um efeito bimodal dependente da dose demonstrado em outros comportamentos, como memória e ansiedade. Em baixas concentrações, é ansiolítico, enquanto em altas concentrações plasmáticas apresenta efeito ansiogênico (DUBROVSKY 2005; REDDY e KULDARNI, 1997; BLOKLAND *et al*, 2002; BAULIEU, 1997; BAULIEU e ROBEL, 1996). Este fato pode contribuir para as aparentes contradições dos efeitos da DHEA no comportamento tipo depressivo, se considerarmos que as fêmeas em diestro são mais susceptíveis à ansiedade (ORDYAN e PIVINA, 2004; PARÉ e REDEI, 1993) e depressão.

Após estas considerações, entendemos que DHEA não possui ação antidepressiva, e sim pode apresentar efeito pró-depressivo em alguns

indivíduos, dependendo do estado hormonal feminino, enquanto não produz resposta em outros.

Esta é a primeira demonstração de que o tratamento com DHEA produz resposta comportamental diferenciada para machos e fêmeas em um modelo animal para depressão. Nosso resultado é coerente com outros autores, que encontraram aumento de escalar refletindo efeito antidepressivo após administração de outros fármacos, apenas para fêmeas na fase de diestro II (BARROS e FERIGOLO, 1998; MARVAN *et al*, 1997). Esta fase poderia, então, no caso de ratas fêmeas, ser a mais sensível para detectar os efeitos pró-depressivos ou antidepressivos de substâncias químicas.

Enquanto os estudos anteriores verificaram os efeitos de DHEA no comportamento depressivo apenas em machos, nossos dados confirmaram um papel das mudanças hormonais reprodutivas, na depressão em fêmeas.

É sabido que mulheres e homens têm resposta diferenciada ao tratamento com medicações antidepressivas. As mulheres possuem várias enzimas envolvidas na metabolização dos antidepressivos, com atividade mais alta do que os homens. As mulheres sentem mais efeitos adversos que os homens, e ainda há uma modificação pelo estrogênio que, quando presente, altera o ambiente bioquímico ou modifica características do receptor, e a eficácia dos agentes antidepressivos é aumentada (YONKER e BRAWMAN-MINTZER, 2002).

É conhecida a vulnerabilidade que mulheres apresentam em períodos em que estão com baixos níveis de hormônios ovarianos, como no pós-parto, na gravidez, no período pré-menstrual e na perimenopausa (YONKERS e BRAWMAN-MINTZER, 2002; ALTEMUS *et al*, 2004; KELLY *et al*, 1999;

RUPPRECH, 2003). Isto é coerente com Schmidt *et al* (2002), que sugerem uma interação entre os níveis baixos de DHEA e as mudanças no estradiol relacionadas a perimenopausa em algumas mulheres aumentando sua vulnerabilidade para desenvolver depressão.

Considerando esses resultados, concluímos que DHEA piora quadros depressivos em fêmeas nas fases do ciclo em que estão com os hormônios ovarianos mais baixos. Estes estudos indicam que fêmeas e machos podem usar diferentes mecanismos neurais e hormonais para responder ao mesmo evento emocional e ressaltar a importância do estudo das mudanças biológicas únicas das fêmeas, especialmente quando consideradas estratégias para o tratamento da depressão e de doenças relacionadas ao estresse.

O fato de que a DHEA só produziu efeito comportamental após tratamento crônico é coerente com estudos anteriores, em que a administração aguda de antidepressivos falhou em induzir qualquer efeito, e este apareceu após administração subcrônica ou crônica, indicando uma associação do efeito antidepressivo com a duração do tratamento (VÁSQUEZ-PALACIOS *et al*, 2004; KATZ *et al*, 1987; KLEIN e DAVIS, 1969; DETKE *et al*, 1997; KIOUKIA-FOUGIA *et al*, 2002). Em estudo de revisão recente, DUBROVSKI (2005) concluiu que há uma diferença significativa entre efeitos de curto e longo prazo da administração de fluoxetina, em humanos e roedores. OBUT *et al* (2003) não encontraram efeitos de DHEAs após exposição aguda ao estresse, apenas após a exposição repetida. Ainda corroborando, em uma revisão, Hupeert *et al* (2000) relataram que o efeito de DHEA sobre o bem-estar ocorre unicamente após tratamento de longa duração, enquanto nenhum efeito é relatado em estudos de curta duração.

O efeito de DHEA na atividade locomotora foi testada no primeiro experimento. A administração de DHEA 30 minutos antes do teste não afetou a atividade locomotora espontânea em ratos, na dose em que surtiu efeito comportamental, 2,0 mg/kg. Isto sugere que seu efeito tipo depressivo não é por alguma estimulação motora inespecífica e sim por um efeito específico da DHEA na imobilidade. Todavia, a dose mais alta (50 mg/kg) aumentou a atividade locomotora, mas isso não se refletiu na imobilidade.

Quanto aos resultados das dosagens hormonais, observamos que fêmeas apresentaram níveis de corticosterona sérica basais mais altas que os machos, embora tenha sido significativo apenas para as ratas em proestro. Esses dados são coerentes com o dimorfismo sexual normalmente observados nos roedores e amplamente relatados na literatura (KANT *et al*, 1983, BEIKO *et al*, 2004; WILSON e BISCARD, 1994; ORDYAN e PIVINA, 2004).

As concentrações basais de DHEA não foram diferentes entre os sexos ou entre as diferentes fases do ciclo nas fêmeas. A concentração basal de DHEA encontrada por nós está de acordo com valores prévios da literatura (ROBEL e BAULIEU, 1995), sem diferenças entre os sexos, e de acordo com Durant (1998), que também não encontrou diferenças entre os gêneros de ratos nesta determinação. No entanto, medindo DHEA e DHEAs em hamsters, Pieper e Lobock (2000) observaram maiores concentrações de DHEA em fêmeas, bem como de DHEAs em machos, replicando a situação dimórfica encontrada em humanos (GENAZZANI *et al*, 1998; SULCOVA *et al*, 1999). Estas discrepâncias são, possivelmente, devidas ao fato de que humanos possuem concentrações muito altas quando comparadas às de hamsters, que,

por sua vez, têm mais DHEA do que camundongos. Ratos apresentam concentrações tão baixas, que, por vezes, não é possível detectar (PIEPER e LOBOCK, 2000; ROBEL e BAULIEU, 1995).

Nossos resultados de aumento de corticosterona plasmática após o teste do nado forçado são coerentes com a literatura (KANT *et al*, 1983, BEIKO *et al*, 2004; WILSON e BISCARD, 1994; ORDYAN e PIVINA, 2004; CONNOR *et al*, 2001; KORZ e FREY, 2003). O procedimento do nado forçado reproduz a resposta ao estresse, pelo aumento dos níveis de corticosterona, um parâmetro clássico para o estresse, fato este reproduzido em nosso trabalho no experimento agudo em animais tratados ou não. Também observamos aumento de DHEA sérica nos animais submetidos ao nado, mesmo quando este receberam apenas veículo. Nestes dois parâmetros hormonais, foi observada diferença significativa entre machos e fêmeas. As fêmeas foram mais responsivas ao estresse do que os machos, observada na resposta aumentada de DHEA e de corticosterona ao estresse. Já é conhecido que o teste do nado forçado é um agente estressor (CONNOR *et al*, 2001; KORZ e FREY, 2003; BLOKLAND *et al*, 2002; ANDREATINI e BACELLAR, 1999). Também é bem estabelecido o fato de que as fêmeas têm resposta maior a um novo estressor que os machos (KANT *et al*, 1983; BEIKO *et al*, 2004; WILSON e BISCARD, 1994; ORDYAN e PIVINA, 2004). Isto se deve às influências organizacionais e ativacionais dos hormônios ovarianos, que ocasionam as diferenças dependentes de sexo observadas nas respostas ao estresse. O estresse afeta níveis de neurotransmissores no córtex frontal, hipocampo e amígdala, que são dependentes do sexo. Os níveis de glicocorticóides variam dependendo do dia do ciclo estral; assim, o estrogênio pode afetar a resposta

de corticosterona. Portanto, o sexo do indivíduo, bem como a duração e intensidade do estressor, são importantes determinantes da função comportamental, neuroquímica e anatômica do estresse (BOWMAN *et al*, 2003).

Em humanos, já foi descrito o aumento de DHEA após estresse agudo (MORGAN *et al*, 2004; OBERBECK *et al*, 1998; ORDYAN e PIVINA, 2004; OPSTAD, 1992). Porém, estudos em animais ainda permanecem inconsistentes. Trabalhos recentes mostraram aumento de DHEA seguido à administração de dois hormônios típicos do estresse: hormônio adrenocorticotrópico e hormônio liberador de corticotropina (TORRES e ORTEGA 2003; GENAZZANI *et al*, 1998 e 2001). Por outro lado, outros autores não encontraram aumento de DHEA após o estresse do nado, ou de imobilização (VALLÉ *et al*, 2000; SOMA e WINGFIELD, 2001; DURANT *et al*, 1998). Estas diferenças entre nossos estudos e outros da literatura ocorrem, possivelmente porque os métodos estressores aplicados por estes autores geram respostas diferentes, conforme o clássico conceito de não –especificidade (KVETNANSKY e SABBAN, 2001; PACAK *et al*, 1998; PACAK e PALKOKVITS, 2001). Por outro lado, nosso resultado de aumento de DHEA em resposta a um agente estressor em modelo animal, reproduziu a situação observada em humanos. Todavia, em nosso conhecimento, esta é a primeira demonstração em roedores que indica mudanças nos níveis séricos de DHEA de acordo com o sexo, após o teste do nado forçado.

No experimento após manipulação crônica, os animais apresentaram as concentrações séricas de DHEA e de corticosterona diminuídas ou semelhantes, em relação à basal.

Alguns autores demonstraram que a simples exposição prévia ao estressor bem como o manuseio diminui a resposta do eixo HPA (BEIKO, 2004; SIMPKISS e DEVINE, 2003; GADEK-MICHALSKA e BUGAJSKI, 2003). Segundo Kelliher *et al* (2003), devem ser considerados fatores que podem colaborar para a falta de efeitos em ratos expostos ao nado após tratamento crônico em comparação aos animais com tratamento agudo, como que o mecanismo de *feedback* negativo seja mais efetivo após tratamento crônico, ou o simples manuseio, ou que pode haver dessensibilização dos receptores hipotalâmicos e/ou *up-regulation* nos receptores de corticosterona centrais envolvidos no *feedback* negativo.

O fato de que após tratamento crônico a diferença entre os sexos na concentração plasmática de DHEA e corticosterona tenha desaparecido é coerente com alguns autores, que verificaram respostas diferenciadas quanto ao sexo, abolidas após tratamento crônico ou familiarização com o teste (BERRY *et al*, 1997; FRYE, 1995; BEIKO *et al*, 2004; PERROT-SINAL, *et al*, 1997).

Mesmo que as correlações realizadas não tenham sido significativas, gostaríamos de propor de um modo a ser melhor estudado, que as diferenças comportamentais entre os machos e as fêmeas podem estar de alguma forma relacionadas com as respostas de corticosterona e DHEA a eventos estressores, interagindo com os hormônios sexuais e o tempo de estresse experimentado,. No experimento agudo, corticosterona e DHEA aumentaram de maneira diferenciada quanto ao gênero. A maior resposta hormonal das fêmeas parece ter impedido a resposta comportamental no nado forçado. Após manipulação crônica, as diferenças nas concentrações hormonais de

corticosterona e DHEA das fêmeas desapareceram, e a resposta depressiva de DHEA nas fêmeas emergiu.

O tratamento com DHEA não alterou as concentrações séricas de corticosterona, enquanto aumentou significativamente a concentração sérica de DHEA em todos os grupos tratados, mostrando que seu efeito comportamental é independente da ativação ou desativação do sistema HPA. Em humanos, há relatos clínicos das propriedades antiglicocorticóides de DHEA (RASMUSSEN *et al*, 2003; RASMUSSEN *et al*, 2004), mas faltam estudos em animais relacionando as concentrações hormonais a comportamentos no nado forçado.

Embora estudos clínicos relatem relações entre a patologia da depressão e anormalidades nas concentrações de DHEA, os resultados ainda permanecem contraditórios (LITTLEY *et al*, 1990; SCHMIDT *et al*, 2002; PADBERG *et al*, 2002). O aumento dos níveis séricos de DHEA/DHEAs não está necessariamente implicado na recuperação da resposta da corticosterona ao estresse. Há contradições. Obut *et al* (2003) relataram que DHEAs preveniu o aumento de corticosterona em ratos, após procedimento de exposição repetida ao estresse. Por outro lado, WOLF *et al* (1998) não encontraram um efeito antiglicocorticóide ou antiestresse de DHEA no processo de memória hipocampal.

A taxa cortisol/DHEA é utilizada por alguns autores como parâmetros de depressão (SCHMIDT *et al*, 2002; RITSNER *et al*, 2004; RASMUSSEN *et al*, 2004). Em nosso trabalho, a administração crônica de DHEA diminuiu a taxa corticosterona/DHEA, nos animais tratados em relação aos controles. No entanto, esta medida não se correlacionou com o comportamento de imobilidade destes grupos no teste do nado forçado. Da mesma forma, os

resultados clínicos não estão em conformidade com a avaliação deste parâmetro. Muitos estudos da taxa cortisol/DHEA em pacientes deprimidos apresentaram resultados variados: foram encontradas altas taxas cortisol/DHEAs (YOUNG *et al*, 2002; FERRARI *et al*, 2001), baixas taxas (SCHMIDT *et al*, 2002) e taxa normal (JOZUKA *et al*, 2003), bem como diferentes resultados quanto à concentração de DHEA ou DHEAs plasmática (POOR *et al*, 2004; SPIVAK *et al*, 2000; STROUS *et al*, 2003; SONDEGAARD *et al*, 2002; RAVAGLIA *et al*, 1996)

Algumas razões podem apontar para o não estabelecimento destas correlações. As desordens associadas com estresse são divididas em duas categorias: uma é associada com aumentada atividade do sistema de estresse, incluindo depressão melancólica, anorexia nervosa, ansiedade e pânico; outra, inclui doenças com diminuída atividade de estresse, como depressão atípica e PTSD (SHINYA MAKINOE *et al*, 2002). Porém, os modelos animais podem não reproduzir especificamente estas subdivisões

Segundo Dubrovsky (2005), nem os neuroesteróides ou os níveis circulantes dos esteróides podem ser equivocadamente associados com comportamentos específicos, pois outros hormônios além do cortisol interagem com os esteróides, esteróides neuroativos ou neuroesteróides podendo contribuir para esta psicopatologia.

Concluindo, DHEA administrada cronicamente tem efeito depressivo em fêmeas durante a fase do diestro II, em que seus hormônios estão mais baixos, indicando que esta dose de DHEA pode ter um efeito depressivo específico ao sexo e à fase do ciclo. Este efeito pode estar relacionado à resposta diferenciada das fêmeas ao estresse agudo e crônico, onde no experimento

agudo a maior resposta ao evento estressor, refletida no aumento das concentrações de corticosterona e DHEA nas fêmeas, parece ter impedido a resposta comportamental no nado. Após tratamento crônico, houve adaptação desta resposta e o efeito depressivo de DHEA apareceu.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho nos permitem concluir que:

1 - Machos e fêmeas respondem diferentemente ao teste do nado forçado. Fêmeas em diestro II apresentam menor duração de escalar.

2 - DHEA não apresenta efeitos antidepressivos, mas sim resposta pró-depressiva em fêmeas durante o diestro II, período em que as concentrações dos hormônios sexuais estão mais baixas.

3 - Machos e fêmeas respondem diferentemente ao tratamento com DHEA, observado pelo efeito deste neuroesteróide apenas nas fêmeas.

4 - DHEA apresenta efeito depressivo nas fêmeas em diestro II após tratamento crônico.

5 - A corticosterona basal é maior em fêmeas.

6 - A DHEA basal não é diferente quanto ao gênero nos ratos.

7 - Os hormônios DHEA e corticosterona são responsivos ao estresse do nado agudo, de uma forma dependente do gênero. As fêmeas em diestro II foram mais responsivas do que os machos no aumento de corticosterona sérica, e na resposta de DHEA, as fêmeas, independente do ciclo, mostraram aumento maior do que os machos.

8 - A manipulação crônica produz adaptação da resposta hormonal de corticosterona e DHEA ao estresse, e abole as diferenças de gênero destes hormônios nos níveis séricos .

9 - A administração de DHEA não altera as concentrações séricas de corticosterona.

Finalmente, concluímos que DHEA administrada cronicamente tem efeito depressivo em fêmeas durante a fase do diestro II, em que seus hormônios estão mais baixos, indicando que esta dose de DHEA pode ter um efeito depressivo específico ao sexo e à fase do ciclo. Este efeito pode estar relacionado à resposta diferenciada das fêmeas ao estresse agudo e crônico, onde no experimento agudo a maior resposta ao evento estressor, refletida no aumento das concentrações de corticosterona e DHEA nas fêmeas, parece ter impedido a resposta comportamental no nado. Após tratamento crônico, houve adaptação desta resposta e o efeito depressivo de DHEA apareceu.

BIBLIOGRAFIA

AKINCI, M.K. e JOHNSTON, G.A.R. 1997. Sex differences in the effects of gonadectomy and acute swim stress on GABA_A receptor binding in mouse forebrain membranes. **Neurochem Int.** 31(1):1-10.

AKWA, Y. e BAULIEU, E.E. 1999. Neurosteroids: behavioral aspects and physiological implications. **J Soc Biol.** 193(3):293-8.

AKWA, Y.; SANANÈS, N.; GOUÉZOU, M.; ROBEL, P.; BAULIEU, E.E.; GOASCOGNE, G. 1993. Astrocytes and neurosteroids: metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density. **J Cell Biol.** Apr;121(1):135-143.

ALONSO, S.J.; CASTELLANO, D. 1991. Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. **Physiol Behav.** 49:69-72.

ALTEMUS, M.; FONG, J.; YANG, R.; DAMAST, S.; LUINE, V.; FERGUSON, D. 2004. Changes in cerebrospinal fluid neurochemistry during pregnancy. **Biol Psychiatry.** 56:386-392.

ANDREATINI, R. e BACELLAR, L.F.S. 1999. The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. **Brazilian J Med Biol Res.** 32:1121-1126.

ANDREATINI, R. e BACELLAR, L.F.S. 2000. Animal models: trait or state measure? The test- retest reliability of the elevated plus-maze and behavioral despair. **Prog Neuro- Psychopharmacol & Biol Psychiat**, 24: 549-560.

APLAN, H.I.; SADOCK, B.J.; GREEBB, J.A. 1997. Compêndio de Psiquiatria – Ciências do Comportamento e Psiquiatria Clínica. **Artes Médicas** – 7ª edição. Porto Alegre.

BARROS, H.M. e FERIGOLO M. 1998. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences. **Pharmacol Biochem Behav.** Jun;60(2):431-7.

BARROS, H.M.T. 1987. Neurofarmacologia da depressão: importância para o diagnóstico e tratamento. **R Pesq Méd.** 21(1):34-37

BAULIEU, E.E. 1980. Steroid hormone receptors. **Expos Annu Biochem Med.** 34:1-25.

BAULIEU, E.E. 1997. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. **Recent Prog Horm Res.** 52:1-32

BAULIEU, E.E. e ROBEL, P. 1996. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate as neuroactive neurosteroids. **J Endocrinol.** Sep;150:S221-39.

BAULIEU, E.E.; ROBEL, P. 1998. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95: 4089-4091.

BAULIEU, E.E.; ROBEL, P.; SCHUMACHER, M. 1999. Neurosteroids. A new regulatory function in the nervous system. **Humana Press Inc.**

BAULIEU, E.E.; ROBEL, P.; VATIER, O.; HAUG, M.; LE GOASCOGNE; C. AND BOURREAU, E. 1987. Neurosteroids: pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. **In Receptor Interactions.** 48:89-104.

BEIKO, J.; LANDER, R.; HAMPSON, E.; BOON, F.; CAIN, C.P. 2004. Contribution of sex differences in water maze performance in the rat. **Behav Brain Res.** 151:239-353.

BERRY, B.; MCMAHAN, R.; GALLAGHER, M. 1997. Spatial learning and memory at defined points of the estrous cycle: effects of performance on a hippocampal-dependent task. **Behav Neurosci.** 111:267-74.

BILANG-BLEUEL, A.; RECH, J.; DECARLI, S.; HOLSBOER, F.; REUL, J.M.H.M. 2002. Forced swimming evokes a biphasic response in CREB phosphorylation in extrahy pothalamic limbic limbic and neocortical brain structures in the rat. **Eur J Neurosci.** 15:1048-1060.

BITRAN, D.; PURDY, R.H.; KELLOGG, C.K. 1992. Anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in cortical allopregnanolone and GABA_A receptor function. **Pharmacol Biochem Behav.** 45:423 – 428.

BLOKLAND, A.; LIEBEN, C.; DEUTZ, N. 2002. Anxiogenic and depressive-like effects, but no cognitive deficits, after repeated moderate tryptophan depletion in the rat. **Psychopharmacol.** 16(1):39-49.

BOSKER, F. J.; WESTERINK, B.H.; CREMERS, T.I.; GERRITS, M.; VAN DER POMPE, G; TER HORST, G.J.; DEN BOER, J.A.; KORF, J. 2004. Future antidepressants: what is in the pipeline and what is missing? **CNS Drugs** 18(11):705-32.

BOUDARENE, M.; LEGROS, J.J.; TIMSIT-BERTHIER, M. 2002. Study of the stress response: role of anxiety, cortisol and DHEAs. **Encephale.** Mar-Abr; 28(2):139-46.

BOWMAN, R.E.; BECK, K.D.; LUINE, V.N. 2003. Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. **Horm Behav.** 43:48-59.

BROTTO, L.A.; BARR, A.M.; GORZALKA, B.B. 2000. Sex differences in forced-swim and open-field test behaviour after chronic administration of melatonin. **Eur J Pharmacol.** 402:87-93

BROTTO, L.A.; GORZALKA, B.B; BARR, A.M. 2001. Paradoxical effects of chronic corticosterone on forced swim behavior in aged male and female rats. **Eur J Pharmacol.** 424:203-209.

CALIXTO, E.G. e BRAILOWSKY, S. 1998. Neuroesteróides. Neuromoduladores de la excitabilidad cerebral. **Gac Méd Méx.** 134(1):69-84.

CALOGERO, A.E.; PALUMBO, M.A.; BOSBOOM, A.M.; BURELLO N.; FERRARA, E.; PALUMBO, G.; PEGRAGLIA, F.; D'AGATA, R. 1998. The neuroactive steroid allopregnanolone suppresses hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release through a mechanism mediated by the gamma-aminobutyric acid A receptor. **J Endocrinol** 159(1):121-5.

CAMPBELL, T.; LIN, S., DEVRIES, C.; LAMBERT, K. 2003. Coping strategies in male and female rats exposed to multiple stressors. **Physiol Behav.** 78:495-504.

CARMINA, E.; FERIN, M.; GONZALEZ, F.; LOBO, R.A. 1999. Evidence that insulin and androgens may participate in the regulation of serum leptin levels in women. **Fertil and Steril.** 72:926-931.

CASCIO, C.; BROWN, R.C.; LIU, Y.; HAN, Z.; HALES, D.B.; PAPADOPOULOS, V. 2000. Pathways of dehydroepiandrosterone formation in rat brain glia. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 75:177-186.

CATALINA, F.; SPECIALE, S.G.; KUMAR, V.; MILEWICH, L; BENNETT, M. 2001. Food restriction-like effects of dietary dehydroepiandrosterone. Hypothalamic neurotransmitters and metabolites in male C57BL/6 and (C57BL/6 x DBA/2) F1 mice. **Exp Biol Med.** 226:208-215.

CONNOR, T.J.; KELLY, J.P.; LEONARD, B.E. 1997. Forced swim test-induced neurochemical endocrine, and immune changes in the rat. **Pharmacol Biochem Behav.** 58:961-967

CONTRERAS, C.M.; MARTINEZ-MOTTA, L.; SAAVEDRA, M. 1998. Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. **Prog. Neuro-psycharmacol & Psychial.** 22:1121-1128.

DAVID, D.V.; DHONNCHADHA, B.A; JOLLIET, P.; HASCOET, M.; BOURIN, M. 2003. Are there gender differences in the temperature profile of mice after acute antidepressant administration and exposure to two animal models of depression. **Neuropharmacol.** Apr; 44(5):616-23.

DAVID, A.M. and FRAZER, A. 2004. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. **Int J Neuropsychopharmacol.** 7:193-218.

DAVID, D.V.; RENARD, C.E.; JOLLIET, P.; HASCOET, M.; BOURIN, M. 2001. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. **Behav Brain Res.** Mar;15:119(2):203-211.

DEAN, C.E. 2000. Prasterone [(DHEA) and mania. **Ann Pharmacother.** Dec;34(12):1419-22.

DROSSOPOULOU, G.; ANTONIOU, K.; KITRAKI, E.; PAPATHADASIOU, G.; PAPALEXI, E.; DALLA, C.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI. Z. 2004. Sex differences in behavior, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. **Neurosci.** 126:849-857.

DUBROVSKY, B.O. 2005. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. **Progr in Neuro-Psycopharmacol Biol Psychiatry.** 29:169-192.

DUMAN, R.S. 2004. Depression: a case of neuronal life and death? **Biol Psychiatry.** Aug;156(3):140-145.

DUNCAN, G.E.; KNAPP, D.J.; CARSON, S.W.; BREESE, G.R. 1998. Differential effects of chronic antidepressant treatment on swim stress Fluoxetine-induced secretion of corticosterone and progesterone. **J pharmacol exp ther.** 285(2):579-587.

DURANT, S.; CHRISTEFF, N.; COULAUD, J.; NUNEZ, E.A.; DARDENNE, M.; HOMO-DELARCHE, F. 1998. Basal concentrations of various steroids in the nonobese diabetic (NOD) mouse and effect of immobilization stress. **Autoimmunity.** 28(4):249-58.

ENGEL, S.R. e GRANT, K.A. 2001. Neurosteroids and behavior. **Int Rev Neurobiol.** 46:321-48.

ERICKSON, K.; DREVETS, W.; SCHULKIN, J. 2003. Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. **Neurosci Biobehav Rev.** 27:233-246.

ESTRADA-CAMARENA, E.; FERNANDES-GUIST. A.; LOPES-RUBALCAVA, C. 2003. Antidepressant like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. **Psychopharmacol.** 166(4):373-382.

ETRAGLIA, F. e GENAZZANI, A.R. 1999. Endocrine, neuroendocrine and behavioral effects of oral dehydroepiandrosterone sulfate supplementation in postmenopausal women. **Gynecol Endocrinol** 13(1):15-25.

FABIAN. T.J.; DEW, M.A.; POLLOCK, B.J.; REYNOLDS, C.F.; MULSANT, B.H.; BUTTERS, M.A.; ZMUDA, M.D.; LINARES, A.M.; TROTTINI, M.; KROBOTH, P.D. 2001. Endogenous concentrations of DHEA and DHEA-S decrease with remission of depression in older adults. **Biol Psychiatry.** 50(10):767-74.

FERRARI, E.; CASAROTTI, D.; MUZZONI, B.; ALBERTELLI, N.; CRAVELLO, L.; FIORAVANTI, M.; SOLERTE, S.B.; MAGRI, F. 2001. Age-related changes of the adrenal secretory pattern: possible role in pathological brain aging. **Brain Res Brain Res Rev.** Nov;37(1-3):294-300.

FERIGOLO, M.; BARROS, H.M.; MARQUARDT, A.R.; TANNHAUSER, M. 1998. Comparison of behavioral effects of moclobemide and deprenyl during forced swimming. **Pharmacol Biochem Behav.** Jun;60(2):431-7.

FREEMAN; M. E. 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. **Physiol of reproduction Second edition**. 613-657.

FRYE, C. 1995. Estrus-associated decrements in water maze task are limited to acquisition. **Physiol Behav**. 57:5-14.

FRYE, C.A. e LACEY, E. 1999. The neurosteroids DHEA and DHEAS may influence cognitive performance by altering affective state. **Physiol Behav**. 66(1):85-92.

FRYE, C.A. e WALF, A.A. 2002. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. **Horm Behav**.41:306-315.

GADEK-MICHALSKA, A. e BUGAJSKI, J. 2003. Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress. **J Physiol Pharmacol**. Sep;54(3):449-59.

GALEA, L.A.M.; LEE, TT-Y; KOSTARAS, X.; SIDHU, J.A.; BARR, A.M.V. 2002. High levels of estradiol impair spatial performance in the Morris water maze and increase depressive-like behaviors in the female meadow vole. **Physiol Behav**. 77:217-225.

GENAZZANI, A.R.; PETRAGLIA, F.; BERNARDI, F.; CASAROSA, E.; SALVESTRONI, C.; TONETTI, A.; NAPPI, R.E.; LUISI, S.; PALUMBO, M.; PURDY, R.H.; LUISI, M. 1998. Circulating levels of allopregnanolone in

humans: gender, age, and endocrine influences. **J Clin Endocrinol Metab** Mar;86(3):1425.

GENAZZANI, A.R.; PETRAGLIA, F.; BERNARDI, F.; CASAROSA, E.; SALVESTRONI, C.; TONETTI, A.; NAPPI, R.E.; LUISI, S.; PALUMBO, M.; PURDY, R.H.; LUISI, M. 1998. Circulating levels of allopregnanolone in humans: gender, age and endocrine influences. **J Clin Endocrinol Metab.** Jun;83(6):2099-103

GIVALOIS, L.; LI, S.; PELLETIER, G. 1999. Effects of ageing and dehydroepiandrosterone administration on pro-opiomelanocortin mRNA expression in the anterior and intermediate lobes of the rat pituitary. **J Neuroendocrinol.** 11:737-742.

GIVALOIS, L.; LI, S.; PELLETIER, G. 1997. Age-related decrease in the hypothalamic CRH mRNA expression is reduced by dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment in male and female rats. **Mol Brain Research** .48:107-114.

GOMEZ, R. & BARROS, H.M.T. 2000. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. **Pharmacol Biochem Behav** 66:329-335.

GOMEZ, R.; HUBER, J.; TOMBINI, G.; BARROS, H.M. 2001. Acute effect of different antidepressants on glycemia in diabetic and non-diabetic rats. **Braz J Med Biol Res.** Jan;34(1):57-64.

GOMEZ, R.; VARGAS, C.R.; WAJNER, M.; BARROS, H.M.T. 2003. Lower in vivo brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming. **Brain Research**. 968:281-284.

GOODYER, I.M.; HERBERT, J.; TAMPLIN, A.; ALTHAM, P.M. 2000. First-episode major depression in adolescents. Affective, cognitive and endocrine characteristics of risk status and predictors of onset. **Br J Psychiatry**. Feb;176:142-9.

GUILHERMANO, L.G.; ORTIZ, L.; FERIGOLO, M.; BARROS, H.M.T. 2004. Commercially available Hypericum perforatum extracts do not decrease immobility of rats in the forced swimming test. **Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry**.28:49-51.

HAN, D.H.; HANSEN, P.A.; CHEN, M.M.; HOLLOSZY, J.O. 1998. DHEA treatment reduces fat accumulation and protects against insulin resistance in male rats. **J Gerontol**. 53:B19-B24.

HENN, F.A. e VOLLMAYR, B. 2004. Neurogenesis and depression: etiology of epiphenomenon? **Biol Psychiatry**. Aug.;1:56(3):146-150.

HERBERT, J. 1998. Neurosteroids, brain damage, and mental illness. **Exp Gerontol** Nov-Dec;33(7-8):713-27.

HERMANN, B.; LADGRAF, R.; KECK, M.E.; WIGGER, A.; MORROW, A.L.; STROHLE, A.; HOLSBOER, F.; RUPPRECHT, R. 2000. Pharmacological

characterization of cortical gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptors in two Wistar rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. **World J Biol Psychiatry Biol Psychiatry**. Jul;1(3):137-43.

HEUSER, I.; DEUSCHLE, M.; LUPPA, P.; SCHWEIGER, U.; STANDHARDT, H.; WEBER, B. 1998. Increased diurnal plasma concentrations of dehydroepiandrosterone in depressed patients. **J Clin Endocrinol Metab**. 83(9):3130-3133.

HIRANI, K.; KHISTI, R.T.; CHOPDE, C.T. 2002. Behavioral action of ethanol in Porsolt's forced swim test: modulation by 3-alpha-hydroxy-5-alpha-pregnan-20-one. **Neuropharmacology** 43:1339-1350.

HUPPERT, F. A.; VAN NIEKERK, J.K.; HERBERT, J. 2000. Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation for cognition and well-being. **Cochrane Database Syst Rev** (2):CD000304.

JOZUKA, H.; JOZUKA, E.; TAKEUCHI, S.; NISHIKAZE, O. 2003. Comparison of immunological and endocrinological markers associated with major depression. **J. Int. Med. Res.** 31(1):36-41.

KAJITA, K.; ISHIZUKA, T.; MIURA, A.; ISHIZAWA, M.; KANO, Y.; YASUDA, K. 2000. The role of atypical and conventional PKC in dehydroepiandrosterone-induced glucose uptake and dexamethasone-induced insulin resistance. **Biochem Biophys Res Commun**. 277:361-367.

KAMONSKA, M.; HARRIS, J.; GIJSBERS, K.; DUBROVSKY, B. 2000. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAs) counteracts decremental effects of corticosterone on dentate gyrus LTP. Implications for depression. **Brain Res Bulletin**. 52(3):229-234.

KANT, G.J.; LENOX, R.H.; BUNNELL, B.N.; MOUGEY, E.H.; PENNINGTON, L.L.; MEYER, J.L. 1983. Comparison of stress response in male and female rats: pituitary cyclic AMP and plasma prolactin. Growth hormone and corticosterone. **Psychoneuroendocrinol**. 8(4):421-8.

KARISHMA, K.K. e HERBERT, J. 2002. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rats. Promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone induced suppression. **Eur J Neurosci**. 16:444- 453.

KAUR, G. and KULKARNI, K. 2002. Evidence for serotonergic modulation of progesteron-induced hyperphagia, depression and algesia in female mice. **Brain Res**. 943: 206-215.

KELLIHER, P.; KELLY, J.P.; LEINARD, B.E.; SÁNCHEZ, C. 2003. Effects of the acute chronic administration of selective monoamine re-uptake inhibitors in the rat forced swim test. . **Psychoneuroendocrinol**. 28:332-347.

KENNET, G.A.; CHAOULOFF, F.; MARCOU, M.; CRUZON, G. 1986. Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression: the

possible role of serotonin.

Brain Res. Sep 24;382(2):416-21.

KELLY, S.; OSTROWSKI, N.L.; WILSON, M. 1999. Gender differences in brain and behavior: hormonal and neural bases. **Pharmacol Biochem Behav.** 64 (4):655-664.

KESSLER, R.C.; MCGONAGLE, K.A.; ZHAO, S.; NELSON, C.B.; HUGHES, M.; ESHLEMAN, S.; WITTCHEN, H.U.; KENDLER, K.S. 1994. Life-time and 12 month prevalence of DSM-iii-r psychiatric disorders in the United States. **Arch Gen Psychiatry.** 51:8-19

KHISTI, R.T.; CHOPDE, C.T.; JAIN S.P. 2000. Antidepressant-like effect of the neurosteroid 3α -hydroxy- 5α -pregnan-20-one in mice forced swim test. **Pharmacol Biochem Behav.** 67:137-143.

KIMBERLY, A.; YONKERS, M.D.; BRAWMAN-MINTZER, M.D.O. 2002. The pharmacologic treatment of depression: is gender a critical factor? **J Clin Psychiatry.** Jul;63:7.

KIOUKIA-FOUGIA, N.; ANTONIOU, K.; BEKRIS, S.; LIAPI, C.; CHRISTOFIDIS I.; PAPA DOPOULOU-DAIFOTI, Z. 2002. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** Junh;26(5):823-30.

KROBOTH, P.D.; SALEK, F.S.; PITTENGER, A.L.; FABIAN, T.J.; FRYE, R. F. 1999. DHEA and DHEA-S: a review. **J Clin Pharmacol.** Apr;39(4):327-48.

KUIPERS, S.D.; TRENTANI, A.; DEN-BOER, J.A.; TER-HORST, G.J. 2003. Molecular correlates of impaired prefrontal plasticity in response to chronic stress. **J Neurochem.** 85:1312-1323.

LABRIE, F.; LUU-THE, V.; LABRIE, C.; SIMARD, J. 2001. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. **Front Neuroendocrinol.** 22:185-212.

LAMBERT, J.J.; BELELLIC, D.; HARNEY, S.C.; PETERS, J.A.; RENGUELLI, B. G. 2001. Modulation of native and recombinant GABA_A receptors by endogenous and synthetic neuroactive steroids. **Brain Res Rev.** 37:68-80.

LECHIN, F.; VAN DERF DIJS, B. and BENAÏM, M. 1996. Stress versus depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 20(6):899-950.

LHULLIER, F.L.R.; NICOLAIDIS, R.; RIERA, N.G.; CIPRIANI, F.; JUNQUEIRA, D.; DAHM, K.C.S.; BRUSQUE, A.M.; SOUZA, D.O. 2001. Dehydroepiandrosterone increase synaptosoma glutamate release and improves the performance in inhibitory avoidance task. **Pharmacol Biochem Behav.** 77:601-606.

LI, S.; GIVALOIS, L.; PELLETIER, G. 1997. Dehydroepiandrosterone (DHEA) administration reverses the inhibitory influence of aging on gonadotrophin-releasing hormone gene expression in the male and female rat brain. **Endocrine.** 6:265-270.

LITTLE, M.D.; POLLOCK, A.; KANE, J.; SHALET, S.M. 1990. Basal serum dehydroepiandrosterone sulphate concentration does not predict the cortisol response to provocative testing. **Ann Clin Biochem.** Nov;27 (Pt 6):557-61.

MAAYAN, R.; YAGOROWSKI, T.; GRUPPER, D.; WEISS, M.; SHTAIF, B.; KAOUD, M.A.; WEIZMAN, A. 2000. Basal plasma dehydroepiandrosterone sulfate level: a possible predictor for response to electroconvulsive in depressed psychotic inpatients. **Biol Psychiatry.** Oct;1;48(7):693-701.

MARKOWSKI, M.; UNGEHGUER, M.; BITRAN, D.; LOCURTO, C. 2001. Memory-enhancing effects of DHEAS in aged mice on a win-shift water escape task. **Physiol Behav.** Mar;72(4):521-525.

MELCHIOR, C.L. e RITZMANN, R.F. 1994. Dehydroepiandrosterone is an anxiolytic in mice on the plus maze. **Pharmacol Biochem Behav.** Mar;47(3):437-41.

MOLINA-HERNÁNDEZ, M.; CONTRERAS, C.M.; TÉLLEZ-ALCÁNTARA, P. 2000. Antidepressant-like effects of pregnancy and progesterone in wistar rats measured in the differential reinforcement of the low-rate 72s task. **Psychopharmacol** 151:306-311.

MONTELEONE, P.; LUISI, M.; COLURCIO, B.; CASAROSA, E.; IOIME, R.; GENAZZANI, A.R.; MAI, M. 2001. Plasma levels of neuroactive steroids are increased in untreated women with anorexia nervosa or bulimia nervosa. **Psychosom Med.** 63(1):62-68.

MORALES, A.J.; HAUBRICH, R.H.; HWANG, J.Y.; ASAKURA, H.; YEN, S.S. 1998. The effect of six months treatment with 100 mg daily dose of dehydroepiandrosterone (DHEA) on circulating sex steroids, body composition and muscle strenght in age-advanced men and women. **Clinic Endocrinology**. 49:421-432.

MORGAN, C.A.; SOUTHWICK, S.; HAZLLETT, G.; RASMUSSEN, A.; HOYT, G.; ZIMOLO, Z.; CHARNEY, D. 2004. Relationships among plasma dehydroepiandrosterone sulfate and cortisol levels, symptoms of dissociation, and objective performance in humans exposed to acute stress. **Arch Gen Psychiatry**. Aug;61(8):819-25.

MORILAK, D.A. e FRAZER, A. 2004. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. **Int J Neuropsychopharmacol**. 7:193-218.

MOTA-MARTINEZ, L.; CONTRERAS, C.M.; SAAVEDRA, M. 1999. Progesterone reduces immobility in rats forced to swim. **Arch Med Res**. 30: 286-89.

NGUYEN, T.; PORTER, J.; SVEC, F. 1999. Dehydroepiandrosterone (DHEA) decreases open- field spontaneous activity of Zucker rats. **Physiol Behav**.67(5):725-731.

OBERBECK, R.; BENSCHOP, R.J.; JACOBS, R.; HOSCH, W.; JTSCHMANN, J.U.; SCHURMEYER, T.H.; SCHMIDT, R.E.; SCHEDLOWSKI, M. 1998

Endocrine mechanisms of stress-induced DHEA-secretion.
J Endocrinol Invest. Mar;21(3):148-53.

OBUT, T.A.; LIPINA, T.V.; KORIAKINA. L.A.; KUDRIAVTSEVA, N.N. 2001. Is dehydroepiandrosterone sulfate an anxiolytic agent? **Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova.** Jul-Aug;51(4):502-6.

OBUT, T.A.; OVSYUKOVA, M.V.; CHERKASOVA, O.P. 2003. Stress effect of dehydroepiandrosterone sulfate and its mechanism. **Bull Exp Biol Med.** Mar;135(3):231-3

OLIVARES, A.M; BRENA, G.M. 1997. Neuroesteróides, receptores GABA y protección neuronal. **Gac Méd Méx.** 133(4):367-369.

OPSTAD, P.K. 1992 Androgenic hormones during prolonged physical stress, sep, and energy deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** May; 74(5):1176-83.

ORDYAN, N.E.; PIVINA, S.G. 2004. Characteristics of the behavior and stress-reactivity of the hypophysical- adrenal system in prenatally stressed rats. **Neurosci Biobehav Physiol.** 34(6):569-574.

OVSIUKOVA, M.V.; AMIKISHIEVA, A.V.; KUDRIAVTSEVA, N.N.; OBUT, T.A. 2003. Anxiolytic effect of dehydroepiandrosterone sulfate in male mice with high anxiety level. **Zh Vyssh Nerv Neiat im I P Pavlova.** Nov-Dec;53(6):789-93.

OVSIUKOVA, M.V.; KUDRIAVTSEVA, N.N.; OBUT, T.A.; AMIKISHIEVA, A.V.; 2003. Anxiolytic effect of the dehydroepiandrosterone sulfate: um-opioid mechanism. **Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova**. May;89(5):598-604.

PACÁK, K. e PALKOVITS, M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **End Rev**. 22(4):502-548

PACAK, K.; PALKOVITS, M.; YADID, G.; KVETNANSKY, R.; KOPIN, J.I.; GOLDSTEIN, S.D. 1998. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye s doctrine of nonspecificity. **Am J Physio**. 275:1247-1255.

PADBERG, F.; MICHELE, F.; ZWANZGER, P.; ROMEO, E.; BERNARDI, G.; SCHULE, C.; BAGHAI, T.C.; ELLA, R.; PASINI, A.; RUPPRECHT, R. 2002. Plasma concentrations of neuroactive steroids before and after repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in major depression **Neuropsychopharmacol** .28(3):610-11.

PAN, B., S. 1997 Neurosteroids. **Sheng Li Ke Xue Jin Zhan** Apr;28(2):101-7.

PARÉ, W.P. e REDEI, E. 1993. Sex differences and stress response of WKY rats. **Physiol Behav**. 54:1179-1185.

PAREJA-ANGEL, J. e CAMPO-ARIAS, A. 2004. The prevalence of symptoms of anxiety and depression in female migraine sufferers. **Rev Neurol.** Oct;16-31;39(8):711-4.

PARKER, C.R. Jr. 1999. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging. **Steroids.** Sep;64(9):640-7

PARMIGIANI, S.; PALANZA, P.; RODGERS, J.; FERRARI, P.F. 1999. Selection, evolution of behaviour and animal models in behavioral neuroscience. **Neurosc Biobehav Rev.** 23:957-970.

PIEPER, D.R. e LOBOCK, C. 2000. Characterization of serum dehydroepiandrosterone secretion in golden hamsters. **Prc Soc Exp Biol Med.** Sep;224(4):278-84.

PLASSART-SCHIESS, E. e BAULIEU, E.E. 2001. Neurosteroids: recent findings. **Brain Res. Rev.** 37:133-140.

POOR, V.; JURICKSKAY, S.; GATI, A.; OSVATH, P.; TENYI, T. 2004. Urinary steroid metabolites and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in patients with unipolar recurrent major depression. **J Affect Disord.** Jul;81(1):55-9.

PRASAD, A.; IMAMURA, M.; PRASAD C. Dehydroepiandrosterone Decreases Behavioral Despair in High-but not Low-Anxiety Rats. 1997. **Physiol Behav.** 62:1053-1057.

RASMUSSEN, A.M.; VASEK, J.; LIPSCHITZ, D.S.; VOJVODA, D.; MUSTONE, M.E.; SHI, Q.; GUDMUNDSEN, G.; MORGAN, C.A.; WOLFE, J.; CHARNEY, D. S. 2004. Relationships among plasma dehydroepiandrosterone sulfate and cortisol levels, symptoms of dissociation, and objective performance in humans exposed to acute stress. **Arch Gen Psychiatry.** Aug;61(8):819-25.

RASMUSSEN, A.M.; VYTHILINGAM, M.; VORGAN, C.A.; 3RD. 2003. The neuroendocrinology of posttraumatic stress disorder: new directions. **CNS Spectr.** Sep;8(9):651-6. 665-7.

RASNOW, B.; ASSAD, C.; HARTMANN, M.J.; BOWER, J.M. 1997. Applications of multimedia computers and video mixing to neuroethology. **J Neurosci Met.** 76:83–91.

RAVAGLIA, G.; FORTI, P.; MAIOLI, F.; BOSCHI, F.; BERNARDI, M.; PRATELLI, I.L.; *et al.* 1996. The relationship of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) to endocrine-metabolic parameters and functional status in the oldest-old. Results from an Italian study on healthy free-living over ninety-years-olds. **J Clin Endocrinol Metab.**81:1173-8.

REDDY, D.S. e KULKARNI S. K. 1998. Sex and Estrous Cycle-Dependent Changes in Neurosteroid and Benzodiazepine Effects on Food Consumption

and Plus-Maze Learning Behavior in Rats. **Pharmacol Biochem Behav.**62(1):53-60.

REDDY, D.S.; KULKARNI, S. K. 1997. Differential anxiolytic effects of neurosteroids in the mirrored chamber behavior test in mice. **Brain Res** 752:61-71

REDDY; D. S., KULKARNI; S.K., KAUR, G. 1998. Sigma (σ_1) receptor mediated anti-depressant-like effects of neurosteroids in the porsolt forced swim test. **Neuro Report.** 9:3069-3079.

REINES, A.; CERESETO, M.; FERRERO, A.; BONAVITA, C.; WIKINSKI, S. 2004. Neuronal cytoskeletal alterations in an experimental model of depression. **Neurosci.** 129(3):529-38

RITSNER, M.; MAAYAN, R.; GIBEL, A.; STROUS, R.D.; MODAI, I.; WEIZMAN, A. 2004. Elevation of the cortisol/dehydroepiandrosterone ratio in schizophrenia patients. **Eur neuropsychopharmacol.** Aug;14(4):267-73.

ROBEL, P. e BAULIEU, E.E. 1995. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a neuroactive neurosteroid. **Anyas.** 774:111-120

ROGOZ, Z.; SKUZA, G.; DANYSZ, W. 2002. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. **Neuropharmacol.** Jun;42(8):1024-30.

RUPPRECHT, R. 2003. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. **Psychoneuroendocrinol.** 28: 139-168.

RUPPRECHT, R.; HOLSBOER, F. 1999. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. **TINS.** 22(9):410-416.

SABBAN, E.L. e KVETNANSKY, R. 2001. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. **TRENDS in Neurosci.** Feb;24(2)

SCHIMDT, P.J.; MURPHY, J.H.; HAQ, N.; DANACEAU, M.A.; ST CLAIR, L. 2002. Basal plasma hormone level in depressed perimenopausal women. **Psychoneuroendocrinol.** Nov;27(8):907-920.

SCHMIDT, P.J.; MURPHY, J.H.; HAQ, N.; DANACEAU, M.A.; ST CLAIR S.L. 2002. Basal plasma hormone levels in depressed perimenopausal women **Psychoneuroendocrinol.** 27:907-920.

SCHULE, C.; MICHELE, F.; BAGHAI, T.; ROMEO, E.; BERNARDI, G.; ZWANZGER, P.; PADBERG, F.; PASINI, A.; RUPPRECHT, R. 2003. Influence of sleep deprivation on neuroactive steroids in major depression. **Neuropsychopharmacol.** 28(3):577-81.

SCHUMACHER, M.; AKWA, Y.; GUENNOUN, R.; ROBERT, F.; LABOMBARDA, F.; DESARNAUD, F.; ROBEL, P.; DE NICOLA, A.F.;

BAULIEU, E.E. 2000. Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. **J Neurocytol.** 29:307-326.

SHIMIZU, E.; HASHIMOTO, K.; IYO, M. 2004. Major depressive disorders and BDNF (brain-derived neurotrophic factor). **Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.** Jun;24(3):147-150.

SHINYA, M.; HASHIMOTO, K.; GOLD, P.W. 2002. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. **Pharmacol Biochem Behav** 73:147-158.

SHORS, T.J. e LEUNER B. 2003. Estrogen-mediated effects on depression and memory formation in females. **J Affective Disorders.** 74:85-96.

SIMPKISS, J.L.; DEVINE, D.P. 2003. Responses of the HPA axis after chronic variable stress: effects of novel and familiar stressors. **Neuro Endocrinol Lett** Feb-Apr;24(1-2):97-103.

SMITH, R. C.; GARDINER, J.C.; LYLES, J.S.; SIRBU, C.; DWAMENA, F.C.; HODGES, A.; COLLINS, C.; LEIN, C.; GIVEN, C.W.; GIVEN, B.; GODDEERIS, J. 2005. Exploration of DSM-IV criteria in primary care patients with medically unexplained symptoms. **Psychosom Med.** Jan-Feb;67(1):123-9.

SOMA, K.K. e WINGIFIELD, J.C. 2001. Dehydroepiandrosterone in songbird plasma: seasonal regulation and relationship to territorial aggression. **Gen Comp Endocrinol.** Aug;123(2):144-55.

SOMA, K.K.; ALDAY, N.A.; HAU, M.; SCHLINGER, B.A. 2004. Dehydroepiandrosterone metabolism by 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase in adult zebra finch brain: sex difference and rapid effect of stress. **Endocrinol.** Apr;145(4):1668-77.

SONDERGAARD, H.P.; HANSSON, L.O.; THEORELL, T.E. 2002. Elevated blood levels of dehydroepiandrosterone sulphate vary with symptom load in posttraumatic stress disorders: findings from a longitudinal study of refugees in Sweden. **Psychother Psychosom.** 71(5):298-303.

SPIVAK, B.; MAAYAN, R.; KOTLER, M.; MESTER, R.; GIL-AD, I.; SHTAIF, B.; WEIZMAN, A. 2000. Elevated circulatory level of GABA_A – antagonistic neurosteroids I patients with combat- related post-traumatic stress disorder. **Psychol Med.** 30(5):1227-1231.

STROUS, R.D.; MAAYAN R.; LAPIDUS, R.; STRYJER, R.; LUSTIG, M.; KOTLER, M.; WEIZMAN, A. 2003. Dehydroepiandrosterone augmentation in the management of negative, depressive, and anxiety symptoms in schizophrenia. **Arch Gen Psychiatry** 60(2):133-41.

SULCOVA, J.; HILL, M.; HAMPLE, R.; STARKA, I. 1999. Age and sex-related differences in serum levels of unconjugated dehydroepiandrosterone and its sulfate in normal subjects. **J Endocrinol.** 154:57-62

SUTTER-DALLAY, A.L.; GIACONNE-MARCESCHE, V.; GLATIGNY-DALLAY, E.; VERDOUX, H. 2004. Women with anxiety disorders during pregnancy are

at increased risk of intense postnatal depressive symptoms: a prospective survey of the MATQUID cohort. **Eur Psychiatry**. Dec;19(8):459-63.

TEJANI-BUTT, S. e KLUCZYNSKI, J.; PARE, W.P. 2001. Strain dependent modification of behavior following antidepressant treatment. **Nihon Skinkei Yakurigaku Zasshi**. Nov;21(5):157-62.

TORRES, J.M. e ORTEGA, E. 2003. DHEA, PREG and their sulphate derivatives on plasma and brain after CRH and ACTH administration. **Neurochem Res** Aug;28(8):1187-91.

URANI, A.; ROMAN, F.J.; PHAN, V-L.; SU; T-P.; MAURICE, T. 2001. The antidepressant-like effect induced by σ_1 receptor agonist and neuroactive steroids in mice submitted to the forced swimming test. **J Pharmacol Exp Ther**. 298(3):1269-1279.

VACHERON-TRYSTRAM, M.N.; CHEREF, S.; GAUILLARD, J.; PLAS, J. 2002. A case report of mania precipitated by use of DHEA. **Encephale**. Nov-Dec;28(6)Pt 1:563-6.

VALLÉE, M.; RIVERA, D.J.; KOOB, G.F.; PUDRÍ, R.H.; FITZGERALD, R.L. 2000. Quantification of neurosteroids in rat plasma and brain following swim stress and allopregnanolone administration using negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. **Anal Biochem** 287:153-166.

VAN BROEKHOVEN F., VERKES R.J. 2003. Neurosteroids in depression: a review. **Psychopharmacol.** 165(2):97-110,

VÁZQUEZ- PALACIOS; G, BONILLA- JAIME; H, VELÁZQUEZ, J. 2004. Anti-depressant-like effects of the acute and chronic administration of nicotine in the rat forced swimming test and its interaction with fluoxetine. **Pharmacol Biochem Behav**, 78(1): 165-169.

VEENEMA, A.H.; KOOLHAAS, J.M.; DE KLOET, E.R. 2004. Basal and stress-induced differences in HPA axis, 5-HT responsiveness, and hippocampal cell proliferation in two mouse lines. **Ann N Y Acad Sci.** Jun;1018:255-65.

VIAU, V. 2002 Functional Cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and-adrenal axes. **J Neuroendocrinol.** 14:506-513.

WEISSMAN, M.M.; WICKRAMARATNE, P.; NOMURA, Y.; WARNER, V. VERDELI, H.; PILOWSKY, D.J.; GRILLON, C.; BRUDER, G. 2005. Families at high and low risk for depression: a 3-generation study. **Arch Gen Psychiatry.** Jan;62(1):29-36.

WHALE, R.; CLIFFORD, E.M.; BHAGWAGAR, Z.; COWEN, P.J. 2001. Decreased sensitivity of 5-HT(1D) receptors in melancholic depression. **Br J Psychiatry.** 178:454-7.

WIGGER, A.; NEUMANN, I. 1999. Periodic maternal deprivation induces gender- dependent alterations in behavioral and neuroendocrine response to emotional stress un adult rats. **Physiol Behav.** 66(2):293-302.

WOLF, O.T.; KUDIELKA, B.M.; HELLHAMMER, D.H.; HELLHAMMER, J. KIRSCHBAUM, C. 1998. Opposing effects of DHEA replacement in elderly subjects on declarative memory and attention after exposure to a laboratory stressor. **Psychoneuroendocrinol** Aug;23(6):617-29.

WOLKOWITZ, O.M.; EPEL, E.S.; REUS, V.I. 2001. Stress hormone-related psychopathology: pathophysiological and treatment. **World J Biol Psychiatry** Jul;2(3):115-43.

YEN, S.S.C. 2001. Dehydroepiandrosterone sulfate and longevity: New clues for an old friend. **Proc Natl Acad Sci USA** July 17;98(15):8167-8169.

YONKER, K.A.; BRAWMAN-MINTZER, O. 2002. The Pharmacologic Treatment of depression: Is gender a critical factor ? **J Clin Psychiatry**. 63(7): 610-615.

YOSHIKAWA, T. 2004. Approach to depressogenic genes from genetic analyses of animal models. **Seishin Shinkeigaku Zasshi**. 106(8):1037-44

YOSHIKAWA, T.; OHNISHI, T. 2005. Molecular genetic approach to depression from animal models] **Nippon Yakurigaku Zasshi**. Jan;125(1):25-32.

YOUNG, A.H.; GALLAGHER, P.; PORTER, R.J. 2002. Elevation of the cortisol-dehydroepiandrosterone ratio in drug-free depressed patients. **Am J Psychiatry**. Jul;159(7):1237-9

ZHANG, X.; GAINETDINOY, R.R.; BEAULIEU, J.M.; SOTNIKOVA, T.D.; BURCH, L.H.; WILLIAMS, R.B.; SCHWARTZ, D.A.; KRISHNAN, K.R.; CARON,

M.G. 2005. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. **Neuron**. Jan;6;45(1):11-6.

ZINDER, O. e DAR, D. E. 1999. Neuroactive steroids: their mechanism of action and their function in the stress response. **Acta Physiol Scan** 167:181-188.