

Fernanda Possamai

**TESTE DO NADO FORÇADO REPETIDO: AVALIAÇÃO DOS
EFEITOS DA IMIPRAMINA SOBRE O COMPORTAMENTO E
A NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL DOS RATOS ALOJADOS
EM AMBIENTE ENRIQUECIDO**

Dissertação submetida ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cilene Lino de Oliveira

Florianópolis

2013

Fernanda Possamai

**TESTE DO NADO FORÇADO REPETIDO: AVALIAÇÃO DOS
EFEITOS DA IMIPRAMINA SOBRE O COMPORTAMENTO E
A NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL DOS RATOS ALOJADOS
EM AMBIENTE ENRIQUECIDO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciências Fisiológicas” e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós graduação em Ciências Fisiológicas.

Florianópolis, 27 de Fevereiro de 2013.

Prof., Dr. Alex Rafacho
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a, Dr.^a Cilene Lino de Oliveira
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Ademar e Cecília Possamai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, ao meu pai e minha irmã, vocês sem dúvida são o melhor da minha vida. Obrigada pelo apoio incondicional e por acreditarem em mim. Mãe você é minha fortaleza, minha inspiração. Pai, quero agradecer pelas palavras que me puxam para a realidade, pelos conselhos e pela confiança em mim. Agradeço minha irmã, pelo amor e cumplicidade sempre, e pelos maiores “presentes” que já ganhei: meus sobrinhos Eduarda e Davi! Ao meu cunhado César, praticamente meu irmão, pelos conselhos e palavras de compreensão nos momentos que mais precisei. Obrigada família, por todas as vezes que esticaram os braços até mim na tentativa de um abraço!

Ao Tiago, meu companheiro, amigo e namorado, que aguentou minhas agruras durante o mestrado. Que de uma forma especial e paciente consegue tornar cada dificuldade em só mais um passo. Você é essencial para mim! Te amo.

Às minhas amigas Estela e Fabi, por todos os momentos de alegria e companheirismo vividos desde o primeiro ano de faculdade. Por todas as conversas e conselhos, que ajudaram a traçar o meu caminho até aqui.

À Cris, uma amiga que caiu do céu! Uma pessoa maravilhosa, que me escuta (por horas), normalmente na porta de casa, e sempre está disposta a ajudar. Te adoro!

À todos os meus amigos do laboratório, que de forma diferente “enriqueceram o ambiente” de trabalho: Natália, que esteve comigo desde o início, trocando informações e desesperos, que me fez e me faz rir muito! Só com você para sermos perseguidas por cabras famintas (rsrss.); à Myla, que sempre chega ao laboratório com uma alegria contagiante, que aceita discutir estatística comigo apesar de nunca chegarmos a conclusão nenhuma, obrigada por tudo amiga!; ao Fernando que sempre está disposto a ajudar; ao Ângeluz, por alegrar o laboratório com palavras inusitadas e muito características do tipo: megadesumano, ou ensinando a conjugar o verbo ethowatchar; Ao Willian (Mexicano), pelos cafezitos da tarde, por existir, assim temos um amigo mexicano para pegar no pé! e claro, pela amizade sincera, te

adoro! A Michele, uma pessoa maravilhosa que está sempre de bem com a vida, e mais nova integrante do laboratório (boa sorte); ao Luiz, pelas filosofias; a Martina por toda ajuda, principalmente no início do mestrado (que foi um pouco difícil), muito obrigada pelas dicas. Quero agradecer ao aluno de doutorado Hugo, de Aracajú, pelas dicas na imunoistoquímica, ficaram ótimas! Quero agradecer a todos os estudantes de iniciação, mesmo alguns não trabalhando diretamente comigo, me ajudaram muito: Thaís, Marina, Felipe, Juliana, Jéssica e Stella.

Um agradecimento exclusivo, para meu fiel ajudante, Juliano (Bolsista PIBIC-CNPq), que sempre esteve comigo, mesmo nos finais de semana, muito obrigada mesmo!

Também não posso deixar de agradecer toda a “galera” do cursão de fisiologia de Ribeirão Preto. Foi um período de grande absorção de conteúdo e nada melhor do que ter pessoas felizes como vocês por perto. Também me provaram estatisticamente ($p < 0,05$) que ciência é cultura! Agora aceito a ideia de que penal pode ser chamado de estojo, e ensinei a todos que pinhão é de comer e não beber (rrsss). Adorei conhecer cada um de vocês, e espero que nossa amizade continue.

Quero agradecer a professora Cilene Lino de Oliveira por aceitar me orientar e ao professor José Marino Neto por sempre estimular o funcionamento dos nossos próprios neurônios. Além disso, por terem aplicado os recursos financeiros obtidos junto a Fundação Alexander von Humboldt, a Fapesc e ao CNPq na viabilização deste trabalho. Agradecimentos também a Capes pela concessão da bolsa de estudos.

“... preciso es reconocer que, em los centros adultos, las vias nerviosas san algo fijo, acabado, inmutable. Todo puede morir, nada prenacer”.
(1913)

Santiago Ramon y Cajal, 1852-1934

Resumo

O enriquecimento ambiental e o tratamento com fármacos antidepressivos são capazes de provocar efeitos comportamentais em ratos e camundongos expostos ao teste do nado forçado (TNF), bem como alterações na morfologia do sistema nervoso central. **Objetivos:** nosso objetivo foi avaliar os efeitos do tratamento crônico com imipramina, associado ao enriquecimento ambiental, sobre o comportamento no TNF-repetido e sobre a proliferação celular no giro denteado do hipocampo de ratos adultos. **Metodologia:** ratos machos *Wistar* (n=80) foram alojados por 40 dias, desde o 21º dia pós-natal, em ambiente padrão (AP) ou em ambiente enriquecido (AE). Após este período foram submetidos ao pré-teste (15min). No dia seguinte, os animais de cada ambiente foram subdivididos em quatro grupos e, 1 hora antes do Teste, receberam injeção intraperitoneal de: salina (SAL); imipramina (IMI 2,5 mg/kg ou 5mg/kg) ou fluoxetina (FLX 2,5 mg/kg). A partir do dia seguinte ao teste, foram administradas uma injeção diária destas substâncias nos animais dos respectivos grupos até o dia reteste 2. Teste e retestes foram filmados para posterior avaliação da latência, frequência e duração dos comportamentos. Após o reteste 2, os ratos foram sacrificados e foi realizada a imunohistoquímica para a detecção da proteína Ki-67 e doublecortina (DCX) no giro denteado (GD) do hipocampo. **Resultados:** O enriquecimento ambiental não afetou o comportamento durante o pré-teste, entretanto, ele foi capaz de reverter os efeitos da reexposição sobre a imobilidade. A dose de 5 mg/kg de imipramina e de 2,5 mg/kg de fluoxetina diminuíram o tempo e a frequência da de imobilidade (“desespero comportamental”) após 14 dias de tratamento dos animais alojados em ambiente padrão. Estes tratamentos não afetaram as contagens de Ki-67 e DCX no GD. Os efeitos da imipramina na dose de 5 mg/kg se potencializaram com o AE enquanto que a fluoxetina mostrou-se eficaz independente do tipo de alojamento. Estes tratamentos diminuíram as contagens de Ki-67 no GD. O tratamento com as duas doses de imipramina aumentaram as contagens de DCX no GD. Não houve nenhuma correlação entre as contagens de ki-67 ou de DCX com os comportamentos no TNF-repetido. **Conclusão:** Tanto o enriquecimento ambiental como a imipramina, em doses subefetivas no TNF, inibiram o desespero comportamental no TNF-repetido. Estes efeitos parecem não depender do aumento da neurogenese hipocampal.

Palavras-chave: Enriquecimento Ambiental. Antidepressivo. Teste do nado forçado repetido. Proliferação celular.

Abstract

Environmental enrichment and treatment with antidepressant drugs are able to induce behavioral effects in rats and mice exposed to the forced swim test as well as changes in the morphology of the central nervous system. **Aim:** Our aim was to evaluate the effects of chronic treatment with imipramine associated with environmental enrichment on behavior in the repeated forced swimming test and cell proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rats. **Methods:** Male *Wistar* rats (n = 80) were housed for 40 days from 21 days postnatal in standard environment (SE) or in an enriched environment (EE). After this period they were exposed to pre-test (15min). In the next day, the animals in each environment were divided randomly into four groups and 1 hour before the test received intraperitoneal injection with saline (SAL), or imipramine (IMI 2.5 mg/kg or 5mg/kg) or fluoxetine (FLX 2.5 mg/kg). From the day after the test, a daily injection of these substances was administered until the retest 2. Test and retesting were filmed for later analysis of latency, frequency and duration of behaviors. After the retest 2, the rats were sacrificed and immunohistochemistry was performed for detection of Ki-67 or doublecortin (DCX) protein in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus. **Results:** Environmental enrichment did not affect behavior in the pre-test, however, EE was able to reverse the effects caused by re exposure on immobility. Only the dose of 5 mg/kg imipramine and fluoxetine 2.5 mg/kg were able to reduce immobility ("behavioral despair") after 14 days of treatment of the animals housed in standard environment. These treatments did not change the number of Ki-67 nuclei or DCX cells in the DG. Environmental enrichment potentiated effects of IMI 5 mg/kg and did not change the effects of fluoxetine. These treatments reduced the number of Ki-67 nuclei in the DG. However, only the treatment with IMI increased the number of DCX-cells in the DG. In addition, there was no correlation between the number of Ki-67 or DCX in the DG with behavior. **Conclusion:** Environmental enrichment as well as a low dose of imipramine inhibited "behavioral despair" in the repeated-FST in rats. These effects seem unrelated with increased neurogenesis in the adult rat hippocampus.

Keywords: Enriched Environment. Antidepressant. Repeated forced swimming test. Cell proliferation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Revisão do desenvolvimento na psicofarmacologia e dos antidepressivos durante 1900 e 2000.....	17
Figura 2 – Desenho experimental do TNF-repetido.....	27
Figura 3 – Divisão dos grupos experimentais de acordo com o alojamento e tratamento.....	27
Figura 4 – Alojamento dos animais Ambiente Padrão e Ambiente Enriquecido.....	28
Figura 5- Desenho da região do hipocampo de rato.....	31
Figura 6 – Esquema dos estágios de desenvolvimento celular e a expressão de marcadores.....	32
Figura 7 – Fotomicrografia do giro dentado do hipocampo de rato.....	33
Figura 8 – Gráfico da variação do peso corporal dos animais tratados com salina, Imipramina e Fluoxetina, e alojados em AP ou em AE.....	36
Figura 9 – Latência, duração e frequência de imobilidade, nado, escalada e mergulho dos animais do grupo AP e do grupo AE registrados durante 15 minutos do pré-teste.....	37
Figura 10 – Duração das categorias comportamentais registradas durante os 15 minutos do pré-teste e segmentadas em blocos de 1 minuto.....	38
Figura 11 – Frequência das categorias comportamentais registradas durante os 15 minutos do pré-teste e segmentadas em blocos de 1 minuto.....	39
Figura 12 – Latência, Duração e Frequência do Comportamento de imobilidade registrado no teste, reteste 1 e reteste 2.....	40
Figura 13 – Latência, Duração e Frequência do Comportamento de nado registrado no teste, reteste 1 e reteste 2.....	42

Figura 14 – Latência, Duração e Frequência do Comportamento de escalada registrado no teste, reteste 1 e reteste 2.....	43
Figura 15 – Latência, Duração e Frequência do comportamento de Imobilidade dos animais tratados com SAL, IMI e FLX nos diferentes ambientes.....	45
Figura 16 – Latência, Duração e Frequência do comportamento de Nado dos animais tratados com SAL, IMI e FLX nos diferentes ambientes.....	46
Figura 17 – Latência, Duração e Frequência do comportamento de Escalada dos animais tratados com SAL, IMI e FLX nos diferentes ambientes.....	47
Figura 18 – Gráfico da contagem de células Ki-67+ por giro dentado do hipocampo de animais do grupo alojado em AP ou em AE.....	48
Figura 19 - Foto demonstrativa da contagem de Ki-67 + nos diferentes grupos.....	49
Figura 20 -Gráfico da contagem de células DCX + entre os tratamento e ambientes.....	50
Figura 21 - Foto demonstrativa da contagem de células DCX + nos diferentes grupos.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE – Ambiente Enriquecido

AP – Ambiente Padrão

CA – Cornus Ammonis

CPN – Célula Progenitora Neural

DA – Dopamina

DCX – Doublecortina

GD – Giro Denteado

IMAO – Inibidores da Monoamina Oxidase

IMI – Imipramina

IRNA – Inibidor da recaptção de noradrenalina

ISRS – Inibidor Seletivo da recaptção de serotonina

NA – Noradrenalina

TNF – Teste do Nado Forçado

SAL – Salina

trkB – Tyrosine- related Kinase B

5-HT – Serotonina

ZSG – Zona Subgranular

ZSV – Zona Subventricular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 A PSICOFARMACOLOGIA DOS ANTIDEPRESSIVOS: ASPECTOS HISTÓRICOS.....	15
1.2 MODELOS ANIMAIS PARA A PSICOFARMACOLOGIA DOS ANTIDEPRESSIVOS: O EXEMPLO DO TESTE DE NADO FORÇADO.....	17
1.3 MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DOS ANTIDEPRESSIVOS: TEORIAS MONOAMINÉRGICA, NEUROTROFINÉRGICA E DA NEUROGÊNESE.....	20
1.4 A NEUROGÊNESE PÓS-NATAL NO HIPOCAMPO E O EFEITO COMPORTAMENTAL DOS ANTIDEPRESS.....	21
1.5 OS EFEITOS DOS ANTIDEPRESSIVOS E DO AMBIENTE SOBRE A NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL E AS CONSEQUÊNCIAS COMPORTAMENTAIS DO ESTRESSE EM MAMÍFEROS.....	24
1.6 OBJETIVO.....	25
1.6.1 Objetivos Específicos	25
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1 ANIMAIS.....	26
2.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	26
2.3 FÁRMACOS UTILIZADOS.....	28
2.4 REGISTRO COMPORTAMENTAL.....	29
2.5 PROCEDIMENTO IMUNOISTOQUÍMICO.....	30

2.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS DA IMUNOISTOQUÍMICA E CONTAGEM DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS PARA Ki-67.....	32
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
3	RESULTADOS.....	35
3.1	INFLUÊNCIA DO AMBIENTE E DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ANTIDEPRESSIVOS SOBRE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS.....	35
3.2	INFLUÊNCIA DO AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE OS COMPORTAMENTOS DOS RATOS DURANTE A PRIMEIRA EXPOSIÇÃO AO NADO FORÇADO (PRÉ-TESTE).....	36
3.3	EFEITO DO AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS PROVOCADAS PELA REEXPOSIÇÃO AO NADO.....	39
3.4	EFEITO DO TRATAMENTO COM A IMIPRAMINA SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DA REEXPOSIÇÃO AO NADO E A INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NESTE EFEITO.....	44
3.5	INFLUÊNCIA DO AMBIENTE E DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ANTIDEPRESSIVOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR E SOBRE A NEUROGÊNESE.....	48
4	DISCUSSÃO.....	52
4.1	OS EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE AS CONSEQUÊNCIAS COMPORTAMENTAIS DO TESTE DO NADO FORÇADO REPETIDO.....	52
4.2	EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM ANTIDEPRESSIVOS SOBRE OS COMPORTAMENTOS NO TESTE DE NADO FORÇADO-REPETIDO.....	54

4.3	INTERFERÊNCIA DO AMBIENTE NOS EFEITOS DOS ANTIDEPRESSIVOS NO TESTE DE NADO FORÇADO-REPETIDO.....	57
4.4	RELAÇÃO ENTRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR NO HIPOCAMPO E OS COMPORTAMENTOS NO TESTE DO NADO FORÇADO-REPETIDO: EFEITOS DO AMBIENTE E DO TRATAMENTO COM ANTIDEPRESSIVOS.....	59
4.5	INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E DOS TRATAMENTOS SOBRE A VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	61
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	ANEXO A – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP).....	81
	ANEXO B- IMUNOISTOQUÍMICA PARA KI-67 E DCX.....	82
	ANEXO C – PROTOCOLO DE DIAFANIZAÇÃO.....	83
	ANEXO D – TABELAS DOS RESULTADOS.....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 A PSICOFARMACOLOGIA DOS ANTIDEPRESSIVOS: ASPECTOS HISTÓRICOS

Os primeiros relatos sobre a depressão foram feitos por Hipócrates em meados do século V a.C que a descreveu como um estado de "aversão à comida, desânimo, insônia, irritabilidade e agitação" como principal característica dos pacientes "melancólicos". Mais tarde, Galeno (201-131 d.C.) descreveu a "melancolia" que se manifestava como "medo, insatisfação com a vida e ódio de todas as pessoas" (DEWHURST, 1992).

É difícil datar o começo da história sobre os tratamentos para a depressão. No final do século XIX nasce a psicanálise de Sigmund Freud como um dos primeiros métodos científicos para o tratamento da depressão (FEELEY, 2008). Na década de 30 surge a eletroconvulsoterapia, que foi um dos métodos mais utilizados na época, já que os medicamentos disponíveis naquele tempo eram pouco eficazes (UK ECT review Group, 2003; NIBUYA *et al.*, 1995). Durante vários séculos, substâncias psicoativas foram usadas para fins medicinais, religiosos e culturais (LIEBERMAN, 2003). Entretanto, foram os esforços científicos dos últimos cem anos que revelaram os principais efeitos e princípios psicoativos dessas substâncias, o que abriu caminho para diversas formas de tratamento farmacológico (LIEBERMAN, 2003). Dentro deste contexto histórico, a psicofarmacologia se estabeleceu como ciência, produzindo importantes classes de agentes terapêuticos destinados ao tratamento de diversos transtornos psiquiátricos como a psicose, a depressão e os diversos tipos de ansiedade (JACOBSEN *et al.*, 2012), (Figura 1)

A descoberta dos primeiros agentes antidepressivos data da década de 1950. Foi durante estudos para a utilização da iproniazida como um possível tratamento para a tuberculose que, por um feliz acaso, descobriu-se que essa substância continha propriedades psicoativas. Foi observado que o principal efeito colateral do tratamento foi a diminuição do comportamento retraído e depressivo dos pacientes (BLOCH *et al.*, 1954). Mais tarde, outros pesquisadores observaram que, até mesmo pacientes terminais tratados com este fármaco tornaram-se "alegres", mais otimistas e mais ativos fisicamente (CRANE, 1956). Em 1955, Zeller mostrou que a iproniazida diminuía a degradação enzimática das monoaminas, noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e dopamina (DA), através da inibição mitocondrial da enzima monoamina-oxidase, a partir

daí, esta classe de agentes tornou-se conhecida como inibidores da monoamina oxidase –IMAO– (ZELLER, 1955). Em 1957, Udenfriend e colaboradores mostraram que a administração de iproniazida em roedores aumentou de duas a três vezes os níveis cerebrais de serotonina (UDENFRIEND *et al.*, 1957). A partir desses achados, a iproniazida ficou conhecida como o primeiro fármaco antidepressivo. E alguns anos depois, o neuropsiquiatra Nathan Kline propôs que a iproniazida fosse utilizada clinicamente como tratamento antidepressivo (KLINE, 1958).

Em paralelo aos achados dos inibidores da MAO, modificações químicas da fenotiazina, um composto orgânico presente em várias drogas antipsicóticas, levou à síntese da imipramina, o primeiro antidepressivo tricíclico utilizado clinicamente (POGGIAL, 1960). Foi descoberto que esses agentes atuam bloqueando a remoção ou "reabsorção" de NA e 5-HT da fenda sináptica, aumentando assim a disponibilidade destes neurotransmissores para a ligação com os seus receptores por mais tempo (LÓPEZ-MUÑOZ e ALAMO, 2009; WIMBISCUS *et al.*, 2010). Na década de 1970, o neurofarmacologista David Wong observou que existiam algumas drogas da classe das butirofenonas que agiam especificamente sobre o metabolismo da 5-HT (WONG *et al.*, 1974). Esses agentes ficaram conhecidos como inibidores seletivos da recaptção de serotonina – ISRS – (WONG *et al.*, 2005; JACOBSEN *et al.*, 2012). Por volta de 1988 surgiu a fluoxetina, com o nome comercial Prozac[®], que se tornou um dos ISRS mais conhecidos até hoje e que marcou o início de uma nova era no tratamento da depressão com menos efeitos colaterais (LIEBERMAN, 2003).

Coincidindo com os avanços na década de 60 e 70 sobre a síntese e identificação de substâncias úteis no tratamento de transtornos mentais, grandes avanços foram alcançados no campo da neurobiologia no que diz respeito ao entendimento funcional do sistema nervoso central, bem como no aperfeiçoamento de ferramentas disponíveis para o estudo desses transtornos (LIEBERMAN, 2003). A partir da experiência clínica com diversas substâncias psicoativas, testes passaram a ser feitos em laboratórios na tentativa de encontrar modelos animais adequados para o estudo experimental dessas substâncias. Durante um período de 50 anos, numerosos modelos animais para depressão foram testados e avaliados (para revisão ver WILLNER, 1984).

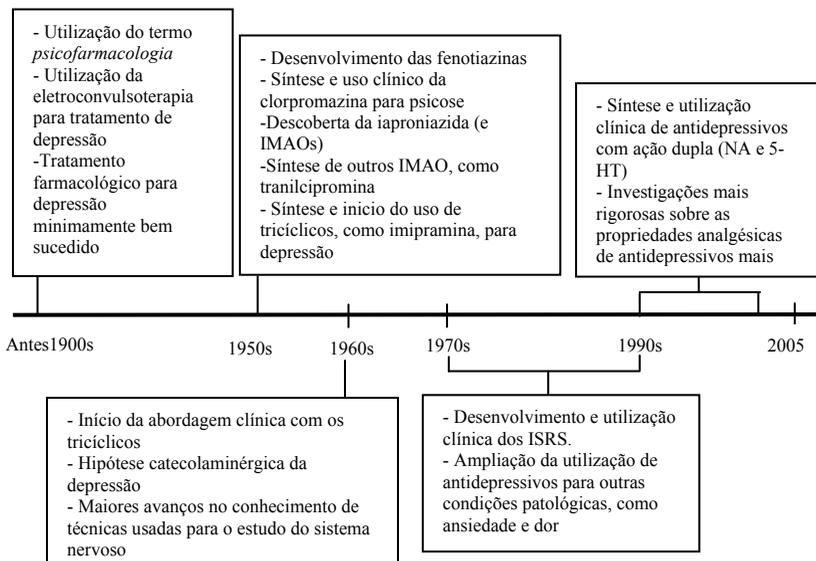


Figura 1: Breve revisão do desenvolvimento da psicofarmacologia e dos antidepressivos entre 1900 e 2000. Adaptada de: Lieberman, 2003.

1.2 MODELOS ANIMAIS PARA A PSICOFARMACOLOGIA DOS ANTIDEPRESSIVOS: O EXEMPLO DO TESTE DE NADO FORÇADO

Willner (1984) discorre sobre os critérios de validade preditiva, de analogia e de homologia para classificar os modelos de estudos de antidepressivos. A validade preditiva diz respeito à capacidade de um modelo em prever o efeito terapêutico de tratamentos (para revisão ver WILLNER, 1984). A validade de analogia é dada pela capacidade do modelo de representar aspectos comportamentais semelhantes ao da patologia de interesse enquanto que o critério de homologia é contemplado quando os mecanismos neurobiológicos entre o modelo e a patologia são semelhantes (WILLNER, 1984). A maior parte dos modelos animais ou testes comportamentais existentes até o momento possui boa validade preditiva, porém baixa analogia ou homologia. Dentre os testes com boa validade preditiva está o teste do nado forçado (TNF) baseado no modelo ou paradigma de “desespero comportamental” (PORSOLT *et al.*, 1977). O TNF é um teste

comportamental empregado na avaliação de fármacos com potencial atividade antidepressiva (PORSOLT *et al.*, 1977, 1978, BORSINI *et al.*, 1989; DETKE *et al.*, 1997; DAL-ZOTTO *et al.*, 2000; KITAMURA *et al.*, 2004; LINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2005). Neste teste, ratos ou camundongos são expostos a uma situação supostamente aversiva chamada de nado forçado: nadar em um tanque cilíndrico com uma quantidade de água que impeça o apoio das patas no fundo do cilindro e que impeça a fuga pela borda superior. No início do teste os animais nadam e fazem movimentos de “escalar” as paredes internas do cilindro e com o passar do tempo adotam uma postura de imobilidade. Uma possível explicação deste padrão comportamental é que após o período inicial de “luta” os animais “percebem” que não tem rota de fuga do cilindro e “desistem” de tentar escapar (daí o termo “desespero comportamental” utilizado por Porsolt e colaboradores em 1977).

A imobilidade, “desespero comportamental” ou também chamado “inibição comportamental”, é diminuída pelo tratamento com antidepressivos de diferentes classes farmacológicas (PORSOLT *et al.*, 1977; SUGIMOTO *et al.*, 2011) e isto confere validade preditiva ao teste. Entretanto, a maioria dos estudos com antidepressivos alcançaram efeitos positivos somente quando doses altas (maiores que as clinicamente recomendáveis para humanos) foram aplicadas (LÓPEZ-RUBALCAVA e LUCKI, 2000; KILIC *et al.*, 2012). Além disso, o efeito agudo que é observado em laboratório (PORSOLT *et al.*, 1977; GAO e CUTLER, 1994), na clínica ainda é uma questão controversa (GHAEMI, 2008; SIDOR e MACQUEEN, 2011; PIES, 2012). Estas fragilidades diminuem tanto a validade preditiva como a analógica do TNF. Apesar da dúvida com relação à existência de “desespero” na situação de nado forçado, a imobilidade que se segue ao período de luta, é a principal característica provedora de analogia a este teste, uma vez que, é diminuída pelo tratamento antidepressivo. A validade de homologia é mais difícil de avaliar, uma vez que os mecanismos neurobiológicos do “desespero comportamental” ou da depressão clínica são pouco conhecidos. Contudo existem evidências que a depressão clínica tem impacto severo em estruturas cerebrais (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004) que são semelhantes ao observado no “desespero comportamental”. Por exemplo, diversos estudos de imagem mostraram que o volume do hipocampo é diferente entre pessoas com depressão e pessoas saudáveis (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004; CHEN *et al.*, 2010; BREMNER, 2002; VIDEBECH e RAVNKILDE, 2004). Ratos estressados cronicamente (MCEWEN *et al.*, 2012) ou com tendência genética à imobilidade (KAAE *et al.*, 2012) possuem volume

hipocampal menor que animais normais. Um aspecto interessante no tratamento com antidepressivos é justamente a sua capacidade de reverter ou bloquear a atrofia hipocampal observada em pacientes depressivos (SCHMIDT e DUMAN, 2007) ou em ratos estressados (KAAE *et al.*, 2012; MCEWEN *et al.*, 2012). Apesar da limitada validade preditiva, analógica e de homologia, o TNF é rápido, fácil de realizar e reprodutível; estas características estimularam várias tentativas de seu aperfeiçoamento (por exemplo: KITADA *et al.*, 1981; DETKE *et al.*, 1995, LINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2008; MEZADRI *et al.*, 2011).

Levando esses aspectos em consideração, nosso laboratório desenvolveu uma modificação do TNF, o teste do nado forçado repetido (TNF-repetido) em ratos que consiste em uma exposição, seguida de 3 reexposições ao ambiente aquático (ver MEZADRI *et al.*, 2011). Com o TNF-repetido em ratos foi possível detectar o aparecimento dos efeitos gradativos do tratamento com uma dose baixa de fluoxetina (2,5mg/kg) (MEZADRI *et al.*, 2011). Comparado ao método "tradicional" (PORSOLT *et al.*, 1978; LINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2008), e ao método de "Porsolt modificado", pelo grupo Michael J. Detke e colaboradores (DETKE *et al.*, 1995), o TNF-repetido utiliza uma quantidade de animais 3 vezes menor para detectar efeitos gradativos do tratamento e, além disso, os animais são sujeitos a um tempo de estresse menor que o utilizado em outras estratégias adotadas para reduzir o número de animais experimentais no TNF (KITADA *et al.*, 1981).

Além disso, em um protocolo de tratamento crônico o TNF-repetido é mais sensível para detectar os efeitos de baixas doses da fluoxetina (MEZADRI *et al.*, 2011) que passaram despercebidos em protocolos subagudos (DETKE *et al.*, 1997): a dose de 2,5mg/kg de fluoxetina foi capaz de aumentar o tempo de nadar após 7 dias de tratamento enquanto que a redução da imobilidade foi visível somente aos 14 dias de tratamento (MEZADRI *et al.*, 2011). Estas evidências sugerem que o TNF-repetido em ratos é um teste pré-clínico para fármacos antidepressivos com maior validade preditiva que a versão de Porsolt *et al.* (1977, 1978) ou de Detke *et al.*, (1995). Além disso, sugere que mecanismos neurobiológicos distintos explicam os efeitos comportamentais do tratamento subagudo ou crônico com antidepressivos no TNF e que poderão ser estudados empregando o TNF-repetido.

1.3 MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DOS ANTIDEPRESSIVOS: TEORIAS MONOAMINÉRGICA, NEUROTROFINÉRGICA E DA NEUROGÊNESE

Atualmente, pesquisadores tentam explicar as alterações comportamentais e morfológicas causadas pelos antidepressivos através de três hipóteses principais: a monoaminérgica, a neurotrofinérgica e a da neurogênese hipocampal. A descoberta, na década de 60, do fato de que os antidepressivos aumentam a disponibilidade de monoaminas (NA, 5-HT e DA) na fenda sináptica levou ao surgimento da hipótese monoaminérgica (COPPEN, 1967). Além disso, a administração de reserpina, que era utilizada como um antipsicótico (FREIS, 1954), causa a depleção dos níveis de monoaminas, acompanhada da inibição do comportamento motor dos animais (COSTA *et al.*, 1960). Os efeitos da reserpina foram revertidos pela imipramina (COSTA *et al.*, 1960). Desde então, a depressão é considerada o resultado da diminuição dos níveis cerebrais das monoaminas, especialmente, 5-HT e NA (HIRSCHFELD, 2000). Outra evidência que suporta essa hipótese é o fato de que os níveis centrais de 5-HT e de seu metabólito estão relacionados com o surgimento da depressão: foram encontrados baixos níveis de 5-HT e do ácido 5-indole-acético em pacientes depressivos propensos a cometer suicídio (LITTLE *et al.*, 1997; ALVAREZ *et al.*, 1999).

A hipótese neurotrofinérgica, mais recente, prediz que os antidepressivos estimulam a produção e sinalização de proteínas relacionadas com plasticidade, como as neurotrofinas (CASTRÉN, 2004; SAARELAINEN *et al.*, 2003). As neurotrofinas, também conhecidos como fatores neurotróficos, são de uma família de proteínas capazes de se ligar aos receptores de determinadas células estimulando sua sobrevivência, crescimento ou diferenciação (BARDE, 1989). Dentre os fatores neurotróficos, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, Brain-derived neurotrophic factor) promove a diferenciação e sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento do sistema nervoso e participa de mecanismos relacionados à plasticidade neural e neurogênese no cérebro adulto (MEMBERG e HALL, 1995; NOBLE *et al.*, 2011). A injeção de BDNF no mesencéfalo de ratos apresentou efeitos similares aos dos antidepressivos em dois testes comportamentais, o TNF e o paradigma do desamparo aprendido (SHIRAYAMA *et al.*, 2002). Além disso, foi visto que o tratamento crônico com antidepressivos aumentou a expressão de BDNF e de seu

receptor trkB (Tyrosine-related kinase B) no hipocampo de ratos adultos e também preveniu os efeitos deletérios do estresse de contenção sobre esses dois marcadores (NIBUYA *et al.*, 1996). Esses estudos evidenciam a importante relação entre os antidepressivos e os fatores neurotróficos na prevenção dos efeitos deletérios da depressão.

Neste contexto, é interessante notar que o tratamento crônico com antidepressivos também regula a neurogênese adulta no hipocampo (CHEN *et al.*, 2006; MALBERG *et al.*, 2000; SANTARELLI *et al.*, 2003). Além disso, existem evidências de que o nascimento de novos neurônios no hipocampo de mamíferos adultos pode ser em parte responsável pelos efeitos comportamentais dos fármacos antidepressivos nestes animais (CHEN *et al.*, 2006; MALBERG *et al.*, 2000; SANTARELLI *et al.*, 2003). Estes dados são à base da teoria da neurogênese.

1.4 A NEUROGÊNESE PÓS-NATAL NO HIPOCAMPO E O EFEITO COMPORTAMENTAL DOS ANTIDEPRESSIVOS

No sistema nervoso a formação de novos neurônios é conhecida como neurogênese. No sistema nervoso central de mamíferos adultos a neurogênese ocorre em duas regiões distintas: na zona subgranular (ZSG) do giro denteado (GD) do hipocampo e na zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais (ALVAREZ-BUYLLA e LIM, 2004; ZHAO *et al.*, 2008; MING e SONG, 2005). As células neuronais recém geradas na ZSV migram uma grande distância em direção ao bulbo olfatório através do fluxo migratório rostral e se diferenciam em interneurônios no seu destino final (LUSKIN, 1993) onde estabelecem conexões sinápticas funcionais com as células vizinhas (CARLÉN *et al.*, 2002; BELLUZZI *et al.*, 2003). Neurônios nascidos na ZSG do GD migram em direção à camada granular do GD e se tornam células granulares (ZHAO *et al.*, 2008). Um dos primeiros estudos mostrando neurogênese no cérebro adulto de mamíferos foi realizado em ratos (ALTMAN e DAS, 1965). Posteriormente, a neurogênese foi observada também em coelhos (GUÉNEAU *et al.*, 1982), gatos (WYSS e SRIPANIDKULCHAI, 1985), macacos (GOULD, 1999) e em humanos (ERIKSSON *et al.*, 1998).

O número de novos neurônios depende não somente do aumento das células proliferativas (ou progenitores neurais, CPN), mas também da manutenção da sobrevivência de novos neurônios (GALEA, 2008). Tendo em vista esses dois mecanismos, certas variáveis podem afetar a

neurogênese no hipocampo adulto, incluindo fatores fisiológicos, patológicos e ambientais (NAVAILLES *et al.*, 2008; MALBERG *et al.*, 2000; SPEISMAN *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2012). Por exemplo, a neurogênese hipocampal é influenciada negativamente pela progressão da idade em roedores. Isso se deve principalmente ao fato de que as CPN tornam-se cada vez mais quiescentes ao longo da vida (CAMERON e MCKAY, 1999). A influência de hormônios gonadais também está relacionada com a modulação da neurogênese em ratos: as fêmeas apresentam maiores taxas de proliferação celular quando comparado com os machos, porém essa diferença só é observada na fase do proestro do ciclo estral da rata (TANAPAT *et al.*, 1999). Além da diferença na neurogênese relacionada à idade e ao sexo, o crescimento de novos neurônios também pode variar de acordo com a espécie estudada. Klaus e colaboradores (2012) avaliaram a influência de dois tipos de atividade física sobre a neurogênese hipocampal em duas linhagens de camundongo: a C57BL/6 e uma espécie de camundongo selvagem. Foi observado que, sob as mesmas condições de laboratório, os camundongos selvagens não tiveram aumento significativo nem do número de células em proliferação nem de novos neurônios. Já os camundongos C57BL/6 apresentaram aumento significativo na proliferação e neurogênese (KLAUS *et al.*, 2012).

O processo de neurogênese também pode ser modificado por situações patológicas como uma hipóxia causada por isquemia cerebral. Um estudo dirigido por Liu e colaboradores (1998), observou aumento da taxa de neurogênese no giro denteado do hipocampo e aumento da sobrevivência dessas novas células após 10 minutos de hipóxia causada por oclusão da artéria carótida comum (LIU *et al.*, 1998). Ratos submetidos a episódios diários de hipóxia (mantidos 4 horas em câmara hipobárica durante duas semanas) apresentaram aumento da proliferação de células progenitoras da ZSV e ZSG do giro denteado quando comparados aos animais mantidos em condições padrões de laboratório (ZHU *et al.*, 2005).

O enriquecimento ambiental, social ou físico, parece favorecer a neurogênese hipocampal em diferentes espécies de animais de laboratório (ROSENZWEIG e BENNETT, 1996; VAN PRAAG *et al.*, 2000). Gerd Kempermann e colaboradores (1997) observaram que camundongos alojados em um ambiente enriquecido, físico e socialmente, possuíam mais neurônios novos no GD do que os animais alojados em condições padrão (KEMPERMANN *et al.*, 1997). A partir deste trabalho pioneiro, muitos outros estudos mostraram um efeito positivo da utilização do enriquecimento ambiental na neurogênese

hipocampal de roedores adultos (JUNGERMANN *et al.*, 2005; KOMITOVA *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2007; LAVIOLA *et al.*, 2008; SPEISMAN *et al.*, 2013). Em ratos, o enriquecimento físico e social parece também aumentar tanto a proliferação dos progenitores neuronais como a diferenciação de neurônios novos que se inserem no GD (KOMITOVA *et al.*, 2002; SPEISMAN *et al.*, 2013; ver revisão SIMPSON e KELLY, 2012). Por exemplo, Speisman e colaboradores (2013) constataram que 12 semanas de treinamento de condicionamento físico diário melhoraram a memória espacial e aumentaram a neurogênese hipocampal dos ratos adultos. O favorecimento da neurogênese, dado pelo enriquecimento ambiental, poderia explicar os resultados obtidos por Edward Bennett e colaboradores, em 1964, que relataram aumento sutil, porém significativo, da massa cortical em roedores adultos alojados em AE (BENNETT *et al.*, 1964; 1966). Por outro lado, estímulos tais como estresse pré-natal ou “desamparo aprendido” reduzem a neurogênese do GD e concomitantemente dificultam o aprendizado de tarefas (LEMAIRE *et al.*, 2000; MALBERG e DUMAN, 2003). Em conjunto, estes dados sugerem que eventos ambientais podem afetar as funções dependentes do hipocampo por aumentar ou diminuir o número de células no GD.

O GD, o hipocampo propriamente dito (CA1, CA2, CA3 e CA4) e o subículo constituem a formação hipocampal que é fundamental para certas formas de aprendizagem e memória (SQUIRE e ZOLA-MORGAN, 1991). A neurogênese hipocampal parece contribuir para estas funções hipocampais, uma vez que existe uma relação positiva entre neurogênese no GD e desempenho animal em tarefas comportamentais (KEMPERMANN *et al.*, 1997; VAN PRAAG *et al.*, 1999). Além disso, foi observado que a ablação da neurogênese adulta, por administração de drogas ou da aplicação local de raios-x no hipocampo, prejudica diferentes tarefas relacionadas com aprendizagem (MESHI *et al.*, 2006). De especial importância para o presente estudo é o fato de que a irradiação com raios-x do hipocampo de camundongos adultos prejudicou o efeito dos antidepressivos sobre o comportamento destes animais no teste de “alimentação suprimida pela novidade” (“novelty suppressed feeding”, SANTARELLI *et al.*, 2003). Estas evidências indicam a relevância do hipocampo, e dos neurônios novos do GD, nos efeitos comportamentais dos antidepressivos, e conferem sentido funcional aos dados obtidos por Malberg e colaboradores (MALBERG *et al.*, 2000; MALBERG e DUMAN, 2003), que mostraram que o tratamento crônico com antidepressivos aumentou a neurogênese no GD no hipocampo de ratos adultos. Além disso, foi

observado que o tratamento crônico com antidepressivos reverteu os efeitos deletérios dos estímulos estressantes sobre a neurogênese do GD, dos ratos adultos, e sobre o comportamento destes animais (MALBERG e DUMAN, 2003).

1.5 OS EFEITOS DOS ANTIDEPRESSIVOS E DO AMBIENTE SOBRE A NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL E AS CONSEQUÊNCIAS COMPORTAMENTAIS DO ESTRESSE EM MAMÍFEROS

Um grupo de pesquisadores, liderado por Costa, encontrou resultados que indicavam efeitos protetores do enriquecimento ambiental contra as disfunções cognitivas em ratos modificados geneticamente para desenvolver doença de Alzheimer (COSTA *et al.*, 2006). Da mesma forma, os resultados encontrados por Zhang sugerem que, o enriquecimento ambiental pode restaurar os déficits causados pelo estresse (ZHANG *et al.*, 2011). Acredita-se que estas respostas sejam decorrentes da estimulação sensório-motora e que estejam envolvidas com a plasticidade neural e conseqüentemente, nos efeitos comportamentais (LAVIOLA *et al.*, 2008). O papel da neurogênese na regulação do humor foi primeiramente sugerido por Gould e colaboradores (GOULD *et al.*, 1992), que demonstraram que a divisão celular da ZSG é suprimida por corticóides, que estão frequentemente elevados em paciente que sofrem de depressão e em animais estressados. Além disso, algumas evidências sugerem que a diminuição da neurogênese tem uma relação direta com patologias como depressão e ansiedade, porém os mecanismos que explicam tal relação ainda não foram totalmente esclarecidos (SAPOLSKY, 2004; DREW e HEN, 2007; DUMAN, 2004b).

Assim como o enriquecimento ambiental, o tratamento com fármacos antidepressivos aumenta a neurogênese hipocampal no adulto (NAVAILLES *et al.*, 2008; MALBERG *et al.*, 2000). Já o estresse pré-natal, social e o uso de glicocorticoide diminuem a neurogênese (COE *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2007; NAVAILLES *et al.*, 2008; STRANAHAN *et al.*, 2006; HULSHOF *et al.*, 2012), sugerindo que aparentemente tanto a estrutura quanto a função do hipocampo sofrem alterações dependentes de experiências individuais (DRANOVSKY *et al.*, 2011).

Todos esses estudos apontam efeitos do enriquecimento ambiental e dos antidepressivos tanto sobre a neurogênese quanto sobre o

comportamento. Portanto, nossa hipótese é de que a associação do ambiente enriquecido ao tratamento com antidepressivos poderá facilitar os efeitos destes fármacos sobre o comportamento dos ratos submetidos ao TNF-repetido e também sobre a neurogênese hipocampal. Assim, esperamos que o alojamento dos animais em ambiente enriquecido permita a redução das doses de antidepressivos necessárias para impedir a inibição comportamental no TNF-repetido em ratos e/ou que os efeitos das drogas antidepressivas apareçam com menos tempo de tratamento.

1.6 OBJETIVO

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com antidepressivos, associado ao enriquecimento ambiental, sobre o comportamento no TNF-repetido e sobre a proliferação hipocampal de ratos adultos.

1.6.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da exposição contínua ao ambiente enriquecido sobre o comportamento dos ratos no TNF-repetido.
- Avaliar o efeito da exposição contínua ao ambiente enriquecido sobre o número de células em proliferação e de neurônios recém nascidos no hipocampo de ratos testados no TNF-repetido.
- Avaliar o efeito de doses subefetivas de imipramina e fluoxetina sobre o comportamento de ratos no TNF-repetido.
- Avaliar o efeito de doses subefetivas de imipramina e fluoxetina sobre o número de células em proliferação e de neurônios recém nascidos no hipocampo de ratos testados no TNF-repetido.
- Avaliar a influência do enriquecimento ambiental, da imipramina e da fluoxetina sobre o comportamento de ratos no TNF-repetido.
- Avaliar a influencia do enriquecimento ambiental, da imipramina e da fluoxetina sobre o número de células em proliferação e de neurônios recém nascidos no hipocampo no hipocampo de ratos testados no TNF-repetido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Oitenta ratos *Wistar* machos, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) com idade de 21 dias (pós-desmame), foram alojados no biotério setorial em temperatura ambiente controlada de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, com acesso a água e ração (Nuvital®) *ad libitum*. O fotoperíodo foi ajustado de modo que os animais permaneceram em ciclo claro/escuro invertido 12-12 horas (luzes apagavam às 06:00 h e acendiam às 18:00 h) (KELLIHER *et al.*, 2000). Os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética da UFSC sob o ofício nº158 /CEUA/PRPE/2011.

2.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após a chegada ao biotério setorial (BIO066), os animais foram alojados durante dois dias em ambiente padrão para habituação com o ciclo claro/escuro invertido (luz apagava às 06:00 h e acendia às 18:00 h). Em seguida, metade dos animais permaneceu em ambiente padrão (AP) e a outra metade foi transferida para o ambiente enriquecido (AE) onde permaneceram durante 40 dias consecutivos. Nos dois ambientes, os animais tiveram acesso à água e comida livremente. A limpeza das caixas ocorreu 3 vezes por semana, sempre no mesmo horário. Após o período de 40 dias de alojamento os animais foram expostos ao Teste do Nado Forçado Repetido (TNF-repetido). O TNF-repetido consiste em submeter os animais a uma sessão de nado forçado de 15 minutos (pré-teste), seguida 3 reexposições de 5 minutos cada: 24 horas (teste), 7 (reteste 1) e 14 (reteste 2) dias após o pré-teste (conforme protocolo de MEZADRI *et al.*, 2010) (Figura 2). Para a realização do nado os animais foram colocados individualmente em um cilindro (altura=50 cm; diâmetro=2 5cm) contendo 30cm de água na temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ de onde não conseguiam escapar e nem se apoiar no fundo do cilindro. Uma hora antes do teste, os animais dos diferentes ambientes foram pesados e receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de salina, imipramina ou fluoxetina, dependendo do grupo (Figura 3). Os animais eram pesados três vezes por semana para cálculo correto da dose, e o registro do peso para análise foi realizado somente nos dias de experimento (teste, reteste 1 e reteste 2). Foi calculado a variação do

peso do reteste 1 e do reteste 2 sobre o teste, e essa variação transformada em porcentagem.

Chegada Animais	Ambientes	Dia 1	Dia 2	...	Dia 7	...	Dia 14
Inversão do ciclo claro-escuro	Alojamento em AP ou AE durante 40 dias	<u>Pré-teste</u> (15 min)	<u>Teste</u> (5min)		<u>Reteste</u> <u>1</u> (5min)		<u>Reteste</u> <u>2</u> (5min)
			Injeção i.p 1 hora antes		Injeção i.p 1 hora antes		Injeção i.p 1 hora antes + perfusão
← 2 dias	← 40 dias		Injeção i.p diária a partir do teste até o reteste 2				

Figura 2: Desenho experimental do TNF- repetido em ratos.

Ambiente	Tratamento Farmacológico	Número de animais
Ambiente Padrão (AP)	Salina	AP SAL (15)
	Imipramina 2,5mg/kg	AP IMI 2,5 (8)
	Imipramina 5mg/kg	AP IMI 5 (6)
	Fluoxetina 2,5mg/kg	AP FLX 2,5 (6)
Ambiente Enriquecido (AE)	Salina	AE SAL (15)
	Imipramina 2,5mg/kg	AE IMI 2,5 (12)
	Imipramina 5mg/kg	AE IMI 5 (12)
	Fluoxetina 2,5mg/kg	AE FLX 2,5 (6)

Figura 3: Esquema de divisão dos grupos experimentais após os 40 dias de alojamento de acordo com o ambiente e com o fármaco utilizado. Dose em mg/kg de peso corporal.

O AP (Figura 4A) consiste de uma caixa de polipropileno branco com as dimensões: 41 x 34 x 16 cm (comprimento x largura x altura), forrada com maravalha. O AE (Figura 4B-C) consiste de duas caixas “plexiglass” interconectadas por um cano PVC forradas com maravalha. Uma das caixas tem a aera maior do que a outra. Os objetos

contidos no AE foram chocalho, corda, cano, escada e materiais plásticos. A presença destes objetos era alternada, deixando sempre um deles de fora e trocando o local em que eram colocados após a limpeza. Para confirmar que os animais estavam interagindo com o AE, era registrado o local de colocação dos objetos na caixa maior ou menor, e quando a limpeza era feita, era observado se os animais haviam trocado os objetos de lugar.

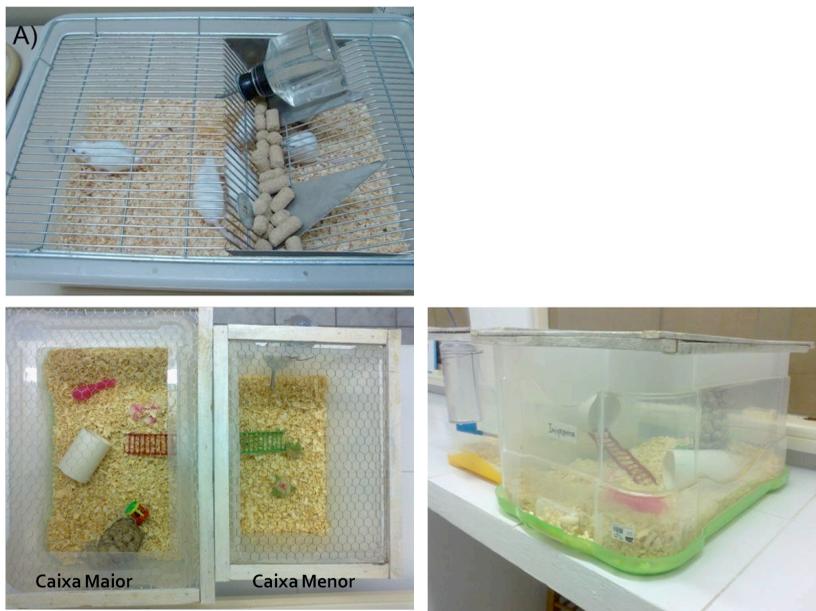


Figura 4: Esquema do alojamento. A) Ambiente Padrão- AP; B) Ambiente Enriquecido- AE vista lateral; C) AE vista superior.

2.3 FÁRMACOS UTILIZADOS

A imipramina hidrocloreto (Sigma –Aldrich, St. Louis, MO, USA) na dose de 2,5 mg/kg ou 5 mg/kg e fluoxetina hidrocloreto (Sigma –Aldrich St. Louis, MO, USA) na dose de 2,5 mg/kg, foram administradas por via intraperitoneal (i.p.), foram dissolvidas em NaCl 0,9% com volume de 1ml por kg de peso corporal (Kitamura *et al.*, 2004). A solução de NaCl 0,9% foi administrada (i.p.) aos animais do grupo controle. A primeira injeção foi administrada 1 hora antes do teste

e posteriormente administrada diariamente no mesmo horário, até o dia do reteste 2 (Figura 2). Atualmente a administração via oral de antidepressivos, em laboratórios, é mais utilizada do que outros métodos (intraperitoneal e intracerebroventricular), por causar menos desconforto para os animais além desta via ser a mais utilizada na clínica. Optamos por utilizar a via intraperitoneal, pois foi a mesma utilizada nos trabalhos que usamos como referência.

2.4 REGISTRO COMPORTAMENTAL

Os experimentos foram realizados entre às 08:00 e 12:00 horas (período escuro dos animais). Uma hora após as injeções (nos dias 1, 2, 7 e 14) foram feitos registros do TNF-repetido (pré-teste, teste, reteste 1 e reteste 2) com uma webcam (Logitech QuickCam) acoplada ao um microcomputador, utilizando o programa Virtualdub. Os vídeos foram armazenados para análise posterior através de um software de análise comportamental Ethowatcher[®] que foi produzido no Laboratório de Neurofisiologia Comparada (IEB-UFSC, CRISPIM JUNIOR *et al.*, 2012) e que está disponível gratuitamente no site www.ethowatcher.ufsc.br. Nesse software é possível criar um catálogo comportamental manualmente (com os comportamentos que serão avaliados) e salvá-lo para as próximas análises. O vídeo dos animais é transposto para o programa e, à medida que o vídeo avança, o avaliador digita as siglas do comportamento que estão sendo realizados pelo animal (por exemplo: E, para o comportamento de Escalada). Após o término da análise, o programa gera um relatório em (.xls), o qual mostra a latência, duração e frequência para cada comportamento realizado. A análise minuto a minuto, também pode ser gerada se essa opção for escolhida pelo avaliador.

No TNF-repetido foi registrada a latência, a duração e frequência das categorias comportamentais classificadas em imobilidade, escalada, nado e mergulho. A imobilidade é registrada toda vez em que o animal permanece parado sem deslocamento do corpo pela água, somente com movimentos das patas suficientes para manter a cabeça fora da água. Na escalada o animal movimentava as patas dianteiras verticalmente (com ou sem deslocamento do corpo pela água). No comportamento de nado, o animal movimentava as patas dianteiras horizontalmente (com ou sem deslocamento do corpo pela água) e o mergulho é caracterizado quando o animal permanecia com o corpo totalmente submerso na água (Tabela 1).

Tabela 1: Catálogo dos comportamentos apresentados pelos animais no TNF-repetido.

Comportamento	Descrição
Imobilidade	O rato fica parado, sem deslocamento do corpo pela água. Pode realizar movimentos leves necessários para manter a cabeça fora da água
Nado	O rato realiza movimentos rápidos com as patas dianteiras horizontalmente, se deslocando ou não pelo cilindro
Escalada	O rato realiza movimentos rápidos com as patas dianteiras se deslocando verticalmente pelo cilindro
Mergulho	O rato mergulha, permanecendo com o corpo totalmente submerso

Tabela 1: Catálogo comportamental do TNF-repetido em ratos.

2.5 PROCEDIMENTO IMUNOISTOQUÍMICO

Logo após o reteste 2, os ratos foram sacrificados por dessangramento sob anestesia (perfusão transcardíaca com solução de sacarose 9,25% e fixação com solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato). Após a perfusão, os encéfalos foram removidos da caixa craniana, blocados e fixados em paraformaldeído 4% por 12 horas. Os encéfalos foram então incluídos em gelatina (10%), cortados em vibrátomo (Vibratome) com espessura de 40 μ m, coletados em 5 compartimentos seriados e armazenados em solução anticongelante a -20 °C. A região de interesse é o hipocampo dorsal (Figura 5), situado nas coordenadas (Interaural 4,7 -5.7mm / Bregma (-)3.3 – (-) 4.7mm) conforme atlas esterotáxico de rato (PAXINOS e WATSON, 1982).

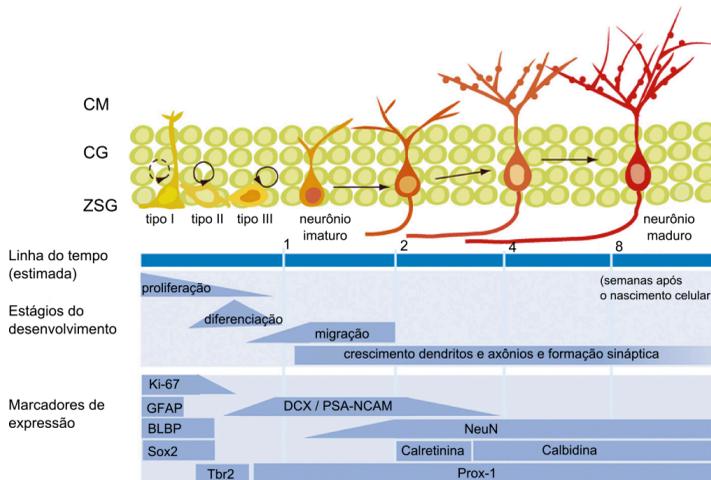


Figura 6: Esquema dos estágios de desenvolvimento celular e a expressão de marcadores. CM: Camada Molecular; CG: Camada Granular; ZSG: Zona Subgranular. Adaptado de: Duan *et al.*, 2008.

2.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA IMUNOISTOQUÍMICA E CONTAGEM DAS CÉLULAS IMUNORREATIVAS PARA Ki-67

A quantificação das células imunorreativas à proteína Ki-67 foi feita diretamente no microscópio, por serem fácil de identificar. A contagem foi realizada ao longo do eixo rostro-caudal dos giros denteados, somente marcação na camada subgranular e granular do giro dentado dorsal. Quando o GD apresentava células Ki-67+ aglomeradas, um aumento maior foi utilizado para confirmar quantas células estavam presentes. Foi feita a contagem das células imunorreativas para Ki-67 nos dois hemisférios de cada secção. O número de células de cada secção do giro dentado foi somado e dividido pela quantidade de secções avaliada. O resultado desta divisão foi tomado como valor de contagem de Ki-67 para cada animal.

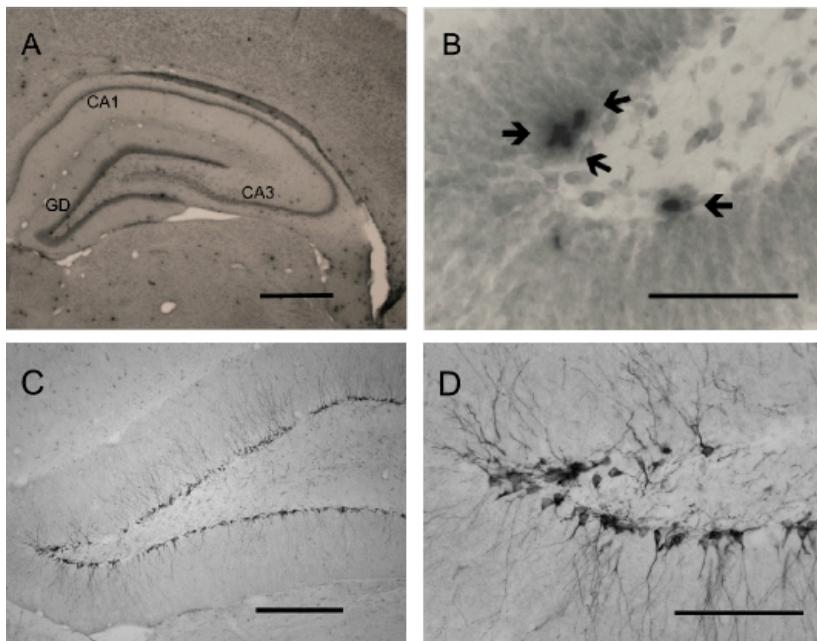


Figura 7: Fotomicrografia do hipocampo de rato. A) vista panorâmica de marcação com Ki-67, escala de 500 μ m; B) Marcação Ki-67 + no giro dentado (GD), escala de 100 μ m. C) Vista panorâmica com marcação de DCX, escala de 300 μ m; D) Marcação de DCX+, escala de 200 μ m.

Para a quantificação das células imunorreativas para DCX, foi escolhida aleatoriamente uma secção entre as coordenadas [Interaural 4,7 -5.7mm / Bregma (-)3.3 – (-) 4.7mm], (PAXINOS E WATSON, 1982) de cada animal (4 animais por grupo). A secção do giro dentado foi sequencialmente fotografado com uma câmera acoplada ao microscópio óptico, utilizando um programa da própria câmera, para posterior análise. Para a análise estatística foi utilizada a contagem total de uma secção do giro dentado de cada animal (hemisseção direita + hemisseção esquerda).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados comportamentais e da contagem celular, foi realizada através do programa Statistica 8 (Stasoft, Tulsa, OK, USA). Para verificar a homogeneidade da variância dos dados comportamentais foi utilizado o teste de Levene, e para normalidade de

distribuição foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variâncias amostrais foram homogêneas e tiveram distribuição normal, assim optou-se pela ANOVA (utilizada para detectar a variância entre diferentes grupos).

Foi utilizado o Teste *t* para a análise dos dados do pré-teste (AP vs AE). Para análise da reexposição teste, reteste 1 e reteste 2 foi utilizada a ANOVA de uma via de medidas repetidas para fator ambiente: AP/AE dos animais SAL, e para fator tratamento: SAL/ IMI 2,5 mg/kg /IMI 5 mg/kg/ FLX 2,5 mg para animais alojados em AP. A mesma análise foi realizada para o fator tratamento dos animais alojados em AE. Os testes de ANOVA foram seguidos pelo teste *post-hoc* de Duncan quando a ANOVA apontava alguma diferença estatística. O *post-hoc* de Duncan é utilizado para determinar diferenças significantes das médias entre os grupos. O nível de significância adotado nesses procedimentos foi de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Os dados das análises estatísticas realizadas para a composição dos resultados estão presentes em anexo (Anexo D- tabelas dos resultados). Esse anexo contém as tabelas do item 3.2 (Tabela 1), item 3.3 (Tabela 2, 3, 4), item 3.4 (Tabela 5, 6, 7). Essa disposição foi utilizada para facilitar a visualização dos dados.

3.1 INFLUÊNCIA DO AMBIENTE E DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ANTIDEPRESSIVOS SOBRE PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Todos os animais apresentaram ganho de peso corporal ao longo dos 14 dias independentes do tratamento (Figura 8). Inicialmente comparamos o efeito de cada tratamento (SAL, IMI 2,5/ 5mg e FLX), para os animais alojados em AP e para os animais alojados em AE. Para verificar somente o efeito do tratamento, foi realizada a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis. Entretanto, não foi possível verificar nenhuma diferença significativa dos tratamentos nos diferentes ambientes. Então resolvemos analisar o efeito do ambiente enriquecido (AE) em cada tratamento. Para essa análise da variação do peso corporal dos animais, foi feita a análise no 7° e 14° separadamente, comparando cada tratamento em um tipo de ambiente. O ambiente enriquecido não influenciou a variação do peso corporal dos animais tratados com SAL, IMI 2,5 mg/kg e IMI 5 mg/kg. Já para os animais tratados com fluoxetina (Figura 8 D) o teste não paramétrico de Mann-Whitney evidenciou uma diferença significativa na variação do peso corporal influenciado pelo ambiente enriquecido tanto no 7° dia ($Z= 2,892$, $p=0,0021$) quanto no 14° dia ($Z= 2,486$, $p=0,0086$).

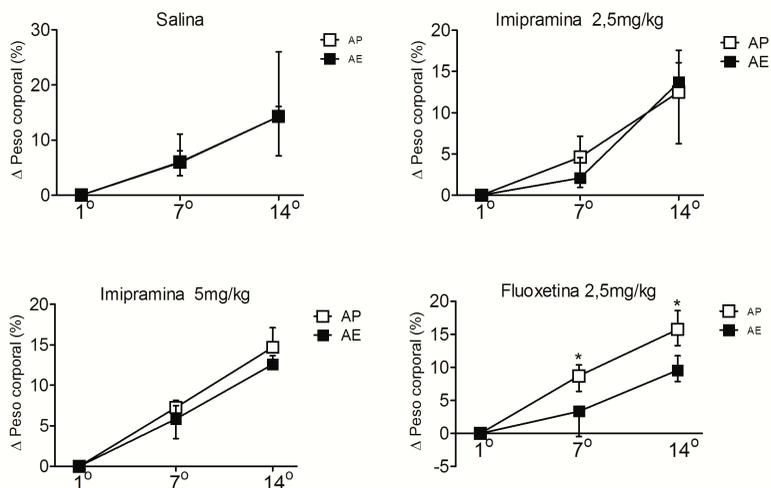


Figura 8: Gráfico da variação do peso corporal (em %), dos animais tratados com salina; Imipramina 2,5 mg/kg; Imipramina 5 mg/kg ; Fluoxetina 2,5 mg/kg, e alojados em ambiente padrão (AP) ou em ambiente enriquecido (AE). (*) Representa diferença estatística entre os animais AP e AE no sétimo ou décimo quarto dia após o início do tratamento com a substância. Dados apresentados em mediana \pm Intervalo interquartil.

3.2 INFLUÊNCIA DO AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE OS COMPORTAMENTOS DOS RATOS DURANTE A PRIMEIRA EXPOSIÇÃO AO NADO FORÇADO (PRÉ-TESTE)

Na primeira exposição ao ambiente aquático, no pré-teste, os animais apresentaram os quatro comportamentos esperados: o comportamento de nadar, escalar, mergulhar e a imobilidade (Tabela 1). A latência, duração e frequência desses comportamentos foram registradas durante os 15 minutos totais do teste. O teste *t student* para a latência dos comportamentos apontou diferença significativa somente no comportamento de escalar [$t(42) = 2,8$, $p = 0,0008$] onde os animais do ambiente enriquecido apresentaram menor latência que os animais alojados em AP (Figura 9). Com relação aos parâmetros de duração e frequência para os comportamentos de nadar, mergulhar e imobilidade,

o teste *t student* não apontou diferença significativa entre os animais AP e AE (Figura 9).

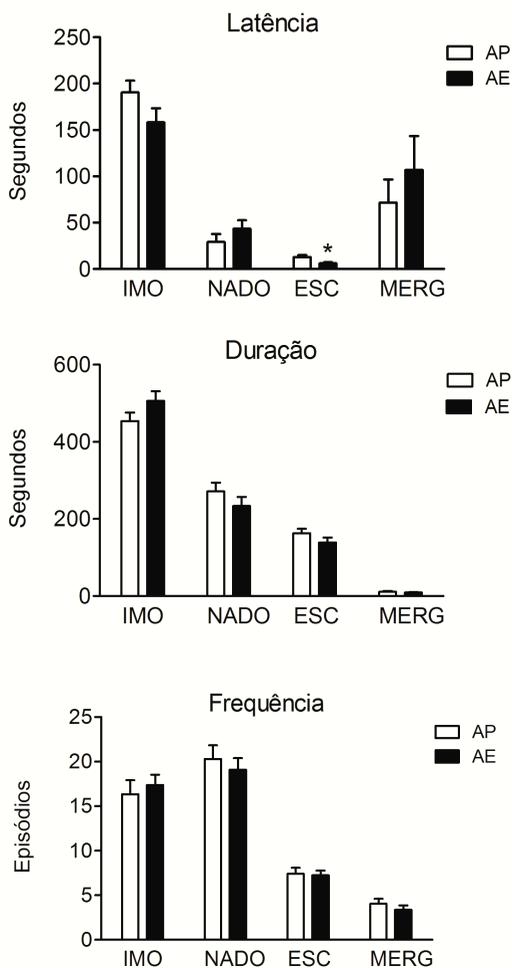


Figura 9: Latência (em segundos), duração (em segundos) e frequência (número de episódios) para os comportamentos de imobilidade (IMO), nado (NADO), escalada (ESC) e mergulho (MERG) dos animais do grupo AP (barras brancas) e do grupo AE (barras pretas) registrados durante 15 minutos do pré-teste. (*) Representa diferença estatística $p > 0,05$. Dados apresentados em média \pm erro padrão da média (EPM).

Quando realizada a análise da duração e frequência dos comportamentos minuto a minuto, os testes estatísticos também não demonstraram nenhuma diferença significativa entre os grupos (Figuras 10 e 11).

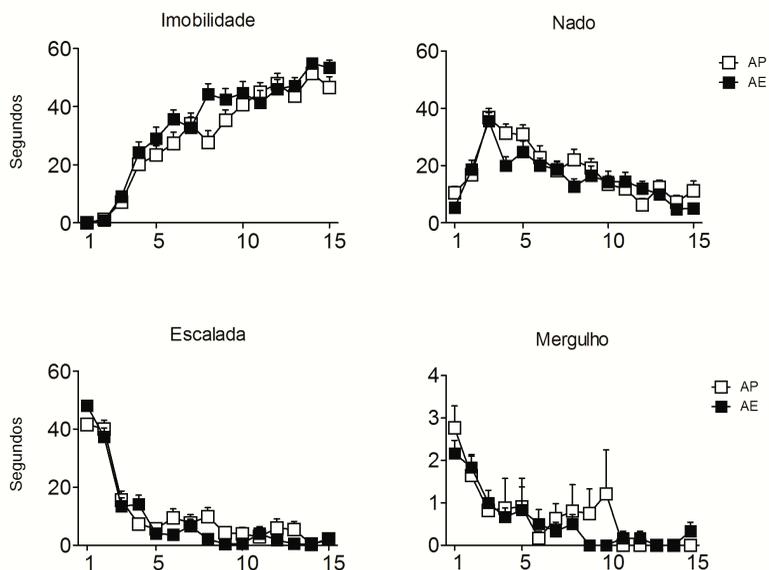


Figura 10: Duração das categorias comportamentais registradas durante os 15 minutos do pré-teste e segmentadas em blocos de 1 minuto. Os gráficos mostram a duração (em segundos a cada minuto) de imobilidade, nado, escalada e mergulho. Dados apresentados em média \pm EPM.

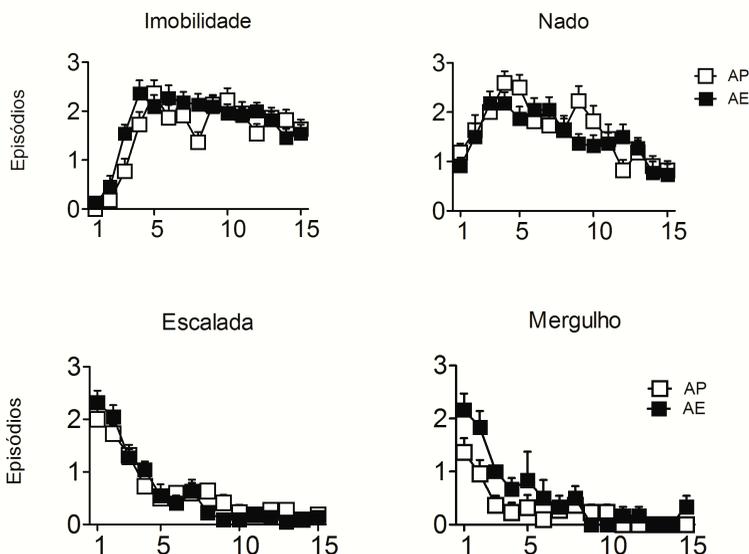


Figura 11: Frequência das categorias comportamentais registradas durante 15 minutos do pré-teste e segmentadas em blocos de 1 minuto. Os gráficos mostram a frequência (número de episódios em cada minuto) de imobilidade, nado, escalada e mergulho. Dados apresentados em média \pm EPM.

3.3 EFEITO DO AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS PROVOCADAS PELA REEXPOSIÇÃO AO NADO

Durante as reexposições, de forma similar ao observado no pré-teste, todos os animais apresentaram os comportamentos de nado, escalada, imobilidade e mergulho (Tabela 2 do anexo). A ANOVA de medidas repetidas demonstrou que a reexposição alterou a latência [Rep vs Amb $F(2, 56)=4,45$, $p=0,016$], duração [Rep vs Amb $F(2, 56)=4,5$, $p=0,015$] e a frequência [Rep vs Amb $F(2, 56)=6,2$, $p=0,004$] do comportamento de imobilidade (Figura 12). Os testes *post hoc* de Duncan revelaram que ambas as reexposições diminuíram a latência ($p < 0,05$, em comparação ao teste) e aumentaram a duração ($p < 0,05$) e frequência ($p < 0,05$) para imobilidade dos animais alojados em AP (Figura 12). Não foi observada nenhuma diferença significativa entre as

reexposições. Os testes *post hoc* também demonstraram que o alojamento no AE foi capaz de prevenir os efeitos da reexposição. Os parâmetros do comportamento de imobilidade (latência, duração e frequência) dos animais alojados em AE voltaram a valores observados durante o teste e foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos valores apresentados pelos animais alojados em AP em cada reexposição (Figura 12) (ver também: fator “Rep VS Amb” na Tabela 2).

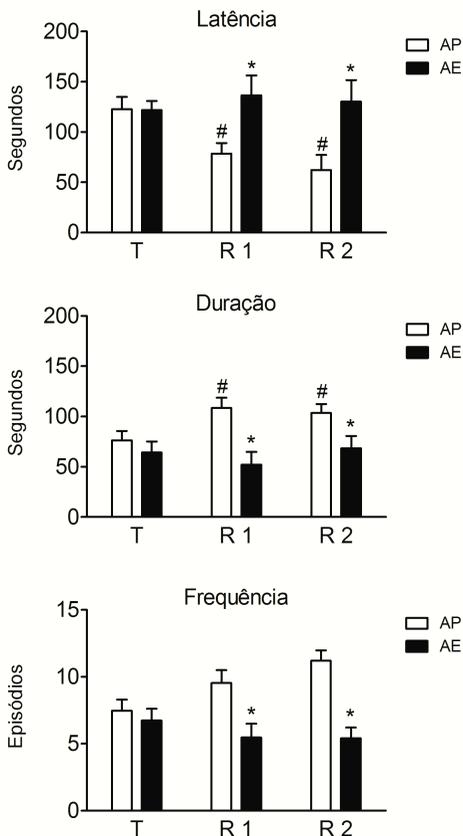


Figura 12: Comportamento de imobilidade registrado no teste, reteste 1 e reteste 2. Latência, duração e frequência do comportamento de imobilidade. Teste (T), reteste 1 (R 1) e reteste 2 (R 2). (*) Representa diferença estatística $p < 0,05$ entre os ambientes. (#) Diferença estatística $p < 0,05$ em relação ao Teste. Dados apresentados em média \pm EPM.

No comportamento de nado, a ANOVA de medidas repetidas não apontou efeito da reexposição sobre os parâmetros de latência e duração (Figura 13 A-B). Entretanto, a ANOVA de medidas repetidas mostrou diferença para o parâmetro de frequência [Rep vs Amb $F(2,56)=3,48$, $p=0,04$]. O teste *post hoc* de Duncan mostrou aumento frequência do nado nos animais AP no reteste 2 (Figura 13C). Os animais do AE mantiveram valores de frequência semelhantes durante todas as exposições (Tabela 3).

Para o comportamento de escalada, o teste ANOVA de medidas repetidas apontou que a reexposição aumentou a frequência deste comportamento [Rep vs Amb $F(2, 56)=3.48$, $p=0,037$]. O teste *post hoc* de Duncan demonstrou que os animais em AP apresentaram maior número de episódios de escalada em ambas as reexposições quando comparadas ao teste ($p < 0,05$). Assim como no comportamento de nadar, os animais do AE apresentaram a mesma frequência de escalada durante todas as exposições ao nado, e valores menores que os animais AP em ambos os retestes ($p < 0,05$) (Figura 14).

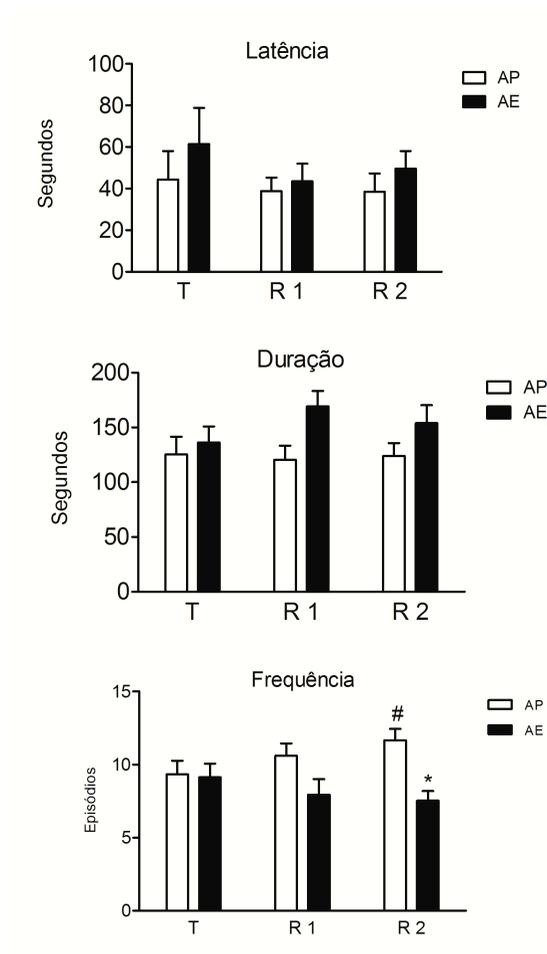


Figura 13: Comportamento de nado registrado no teste, reteste 1 e reteste 2. Latência, duração e frequência do comportamento de nado. (*) Representa diferença estatística $p > 0,05$ entre os ambientes. (#) Diferença estatística $p > 0,05$ em relação ao Teste. Dados apresentados em média \pm EPM.

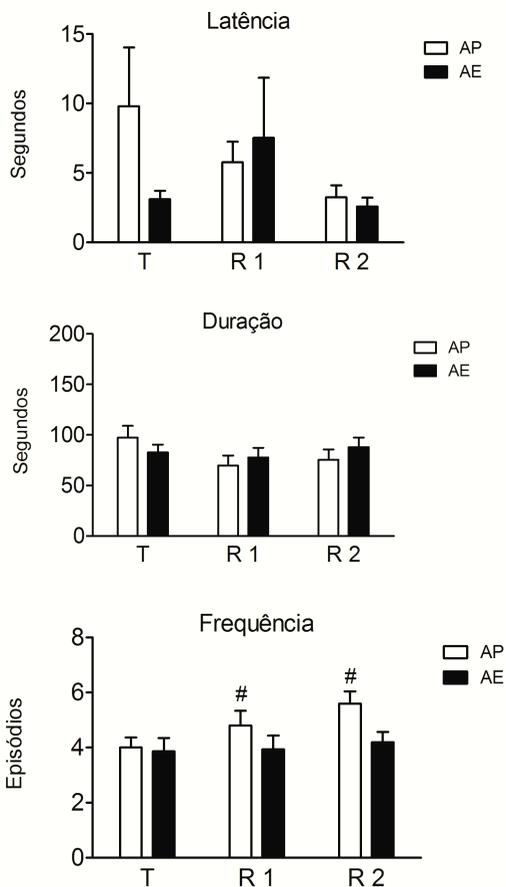


Figura 14: Comportamento de escalada registrado no teste, reteste 1 e reteste 2. Latência, duração e frequência do comportamento de escalada. (#) Diferença estatística $p > 0,05$ em relação ao Teste. Dados apresentados em média \pm EPM.

3.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM A IMIPRAMINA SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DA REEXPOSIÇÃO AO NADO E A INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NESTE EFEITO

Para o comportamento de imobilidade apresentado pelos animais alojados em AP, os testes ANOVA apontaram efeitos significantes do tratamento sobre todos os parâmetros analisados: latência [Rep vs Tto F (6, 60)=2,55, p=0,028], duração [Rep vs Tto F (6, 60)=3,054, p=0,011] e frequência [Tto: F(3, 30)=9,29, p=0,0001]. O teste *post hoc* de Duncan apontou que a maior dose de imipramina (5 mg/kg) e a fluoxetina aumentaram a latência para a imobilidade no reteste 1 quando comparado com os animais tratados com salina na mesma reexposição (p< 0,05), e somente a fluoxetina demonstrou este efeito no reteste 2 (p< 0,05). No reteste 1, todos os tratamentos bloquearam o aumento da duração de imobilidade causado pela reexposição (p< 0,05) (Figura 15); já no reteste 2, somente a FLX foi capaz de reverter o efeito da reexposição (p< 0,05) (Tabela 5). Quanto à frequência da imobilidade, os animais tratados com IMI 5 mg/kg e FLX apresentaram menor número de episódios de imobilidade que os animais tratados com salina nas duas reexposições (p< 0,05) (Tabela 5).

A ANOVA de medidas repetidas para os animais alojados em AE (Figura 15) apontou diferença estatística somente no parâmetro de duração do comportamento de imobilidade [F (6, 80)=2,5, p=0,028]. O teste *post hoc* de Duncan apontou que os animais tratados com IMI 5 mg/kg e FLX apresentaram menor tempo de imobilidade durante o reteste 2 (Figura 15), que os valores de duração observados para estes mesmos animais no teste (Tabela 5). Para os parâmetros de latência e frequência os tratamentos produziram nenhum efeito (Figura 15).

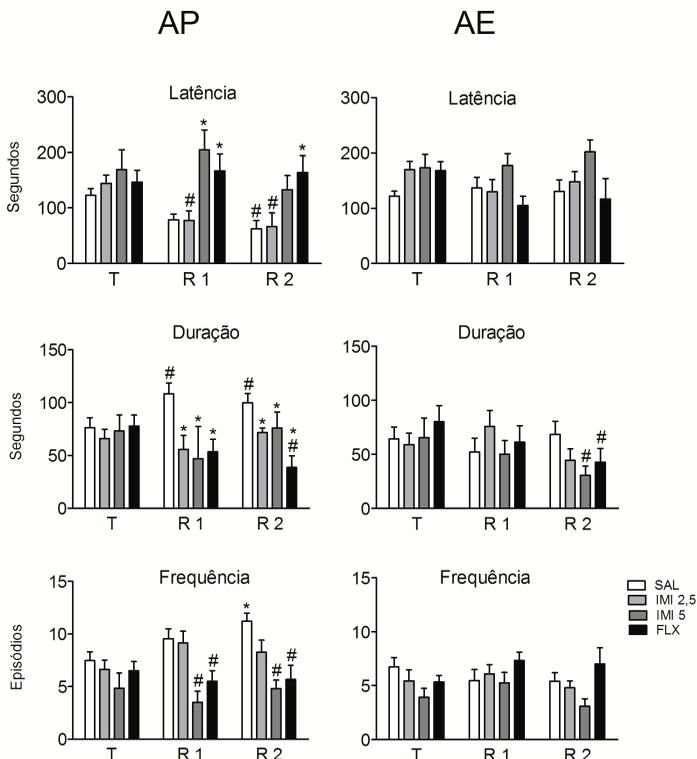


Figura 15: Comportamento de imobilidade registrado no teste, reteste 1 e reteste 2. Os gráficos mostram a latência, duração e frequência do comportamento de imobilidade dos animais alojados em AP e em AE. (*) Representa diferença estatística do grupo SAL na reexposição. (#) Representa diferença estatística comparado ao Teste.

No comportamento de nadar, a ANOVA de uma via de medidas repetidas para os animais alojados em AP apontou efeito significativo do tratamento somente sobre a frequência desse comportamento [$F(3, 30)=3,92, p=0,017$] (Tabela 6). O teste *post hoc* de Duncan demonstrou que tanto no teste quanto no reteste 2 os animais do AP tratados com IMI 5 mg/kg apresentaram diminuição na frequência (Figura 16). A ANOVA de uma via de medidas repetidas não apresentou diferenças significantes para a latência [Rep vs Tto $F(6, 60)=0,56, p=0,75$] e para a

duração [Rep vs Tto $F(6, 60)=1,25, p=0,28$] do comportamento de nadar (Tabela 6).

Para os animais alojados em AE, a ANOVA de uma via de medidas repetidas apontou efeito significativo do tratamento sobre a duração [Rep vs Tto $F(6,80)=2,32, p=0,04$] e sobre a frequência [Rep vs Tto $F(6,80)=3,9, p=0,001$]. O teste *post hoc* de Duncan demonstrou que os animais tratados com FLX aumentaram a duração do comportamento de nadar.

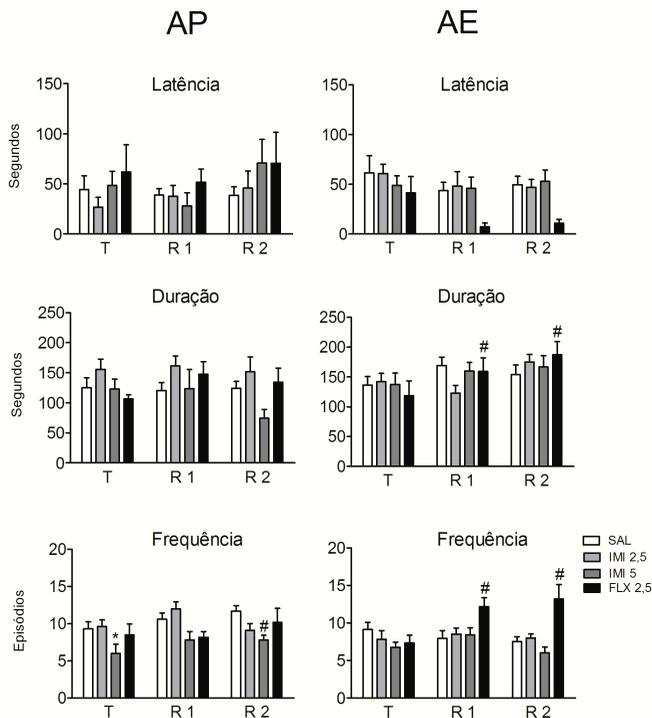


Figura 16: Comportamento de nado registrado no teste, reteste 1 e reteste 2. Os gráficos mostram a latência, duração e frequência do comportamento de nado dos animais alojados em AP e em AE. (*) Representa diferença estatística do grupo SAL na reexposição. (#) Representa diferença estatística comparado ao teste.

A análise ANOVA de uma via de medidas repetidas para o comportamento de escalar dos animais alojados em AP (Figura 17) não apontou nenhuma diferença significativa do tratamento (ver fator Tto vs Rep: Tabela 7) sobre os parâmetros de latência [$F(6, 60)=1,09, p=0,37$],

duração [$F(6, 60)=1,81, p=0,11$] e frequência [$F(6, 60)=1,17, p=0,33$] deste comportamento. Entretanto, para os animais alojados em AE observamos o efeito do tratamento sobre a frequência da escalada [$F(2, 60)=9,99, p=0,00018$]. O teste *post hoc* de Duncan apontou que os animais tratados com FLX tiveram um aumento na frequência do comportamento de escalar, e esse aumento foi significativamente diferente quando comparado aos valores observados durante o teste ($p < 0,05$) para este mesmo grupo de animais e quando comparados com o grupo salina no reteste 2 ($p < 0,05$). Os parâmetros de latência e duração não sofreram efeito do tratamento (Tabela 7).

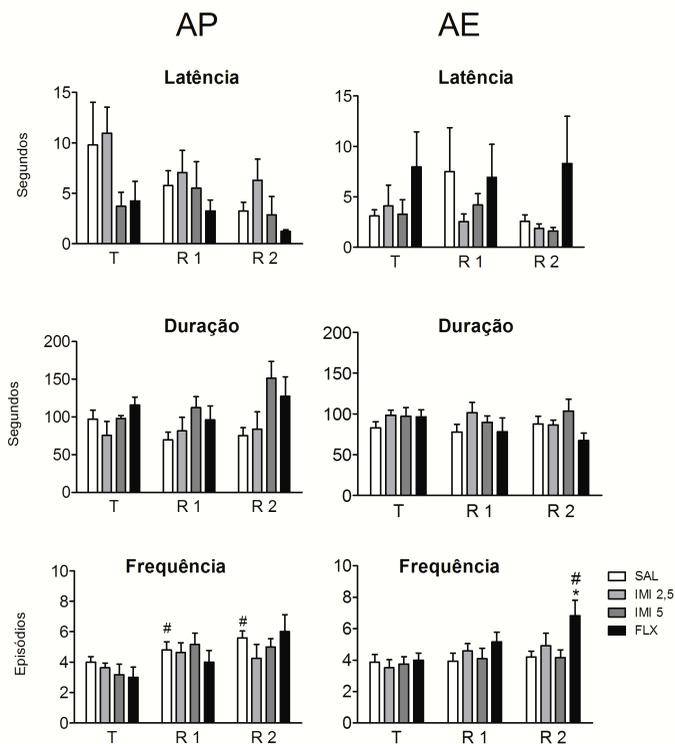


Figura 17: Comportamento de escalada registrado no teste, reteste 1 e reteste 2. Os gráficos mostram a latência, duração e frequência do comportamento de escalada dos animais alojados em AP e em AE. (*) Representa diferença estatística do grupo SAL na reexposição. (#) Representa diferença estatística comparado ao Teste.

3.5 INFLUÊNCIA DO AMBIENTE E DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ANTIDEPRESSIVOS SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR E SOBRE A NEUROGÊNESE

Os dados da contagem de células Ki-67+ foram analisados através da ANOVA de duas vias, tendo o ambiente e o tratamento como fatores. Os testes apontaram efeito significativo somente do tratamento [$F(3, 35) = 6,2353$, $p = 0.00166$]. A partir desse resultado foi realizada a ANOVA de uma via para cada ambiente. Os animais do AP (Figuras 18 e 19) não apresentaram diferença estatística na contagem de células Ki-67+ nos diferentes tratamentos [$F(3, 17) = 1,1877$, $p = 0,34403$]. Já para os animais alojados em AE (Figuras 18 e 19) foi observado efeito do fator tratamento [$F(3, 18) = 8,5713$, $p = 0,00095$]. O teste *post hoc* de Duncan apontou que os animais tratados com IMI 5mg/kg e FLX 2,5 mg/kg apresentaram menor número de células Ki-67+ do que os animais tratados com salina ($p = 0,006$; $p = 0,012$ respectivamente).

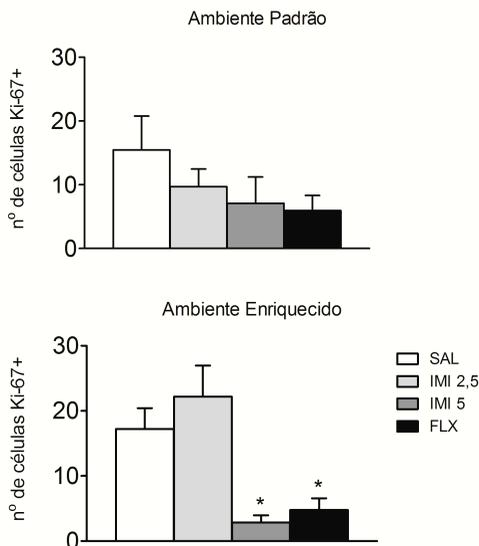


Figura 18: Gráfico da contagem de células Ki-67+ por secção do giro denteado do hipocampo de animais do grupo alojado em ambiente padrão ou em ambiente enriquecido. (*) Representa a diferença estatística comparada ao grupo SAL.

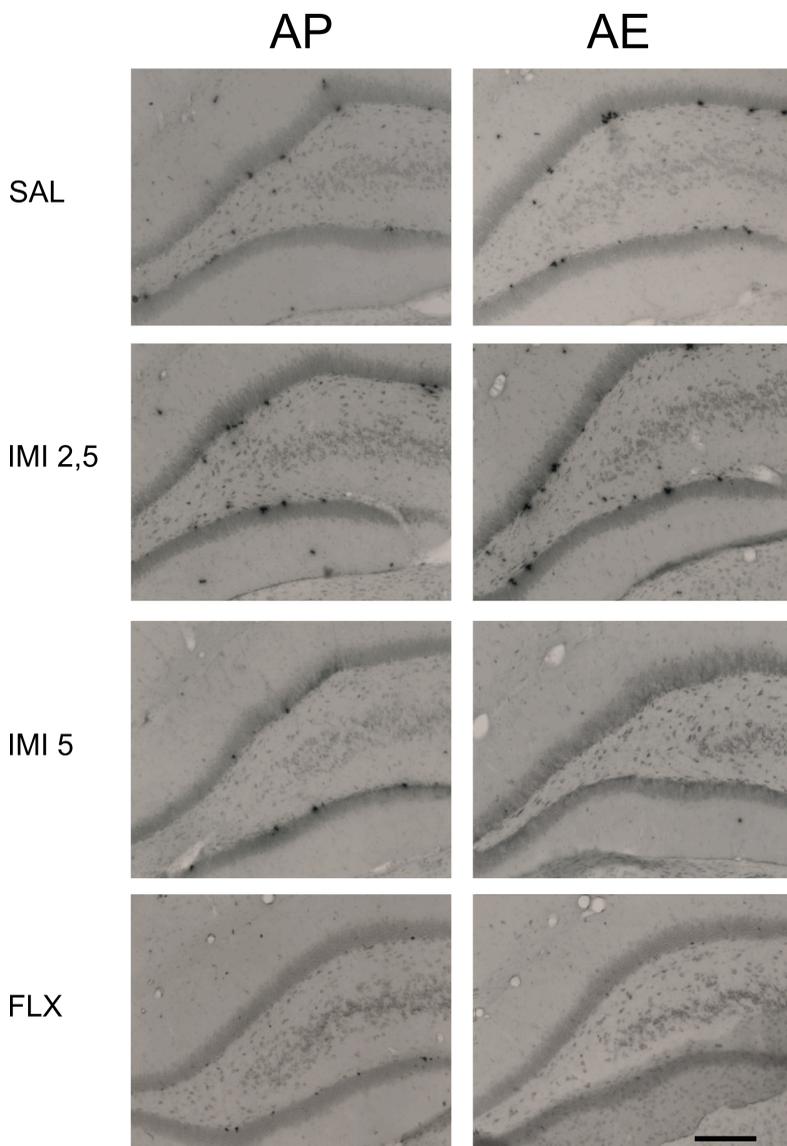


Figura 19: Fotos demonstrativa da contagem de células ki-67+. A coluna da esquerda é correspondente aos animais alojados em AP, e coluna da direita animais alojados em AE. Fotos em aumento de 40x.

Os dados da contagem de células DCX+ foram analisados através da ANOVA de duas vias, tendo o ambiente e o tratamento como fatores. Os testes apontaram efeito significativo da interação ambiente *versus* tratamento [$F(3, 22) = 3,368$, $p = 0,03683$]. O teste *post hoc* de Duncan demonstrou que os animais do AE tratados com imipramina nas doses de 2,5mg/kg e 5mg/kg, apresentaram um aumento significativo no número de células DCX+ quando comparado aos animais que receberam os mesmos tratamentos mas foram mantidos alojados no AP ($p = 0,0307$ e $p = 0,0074$ respectivamente).

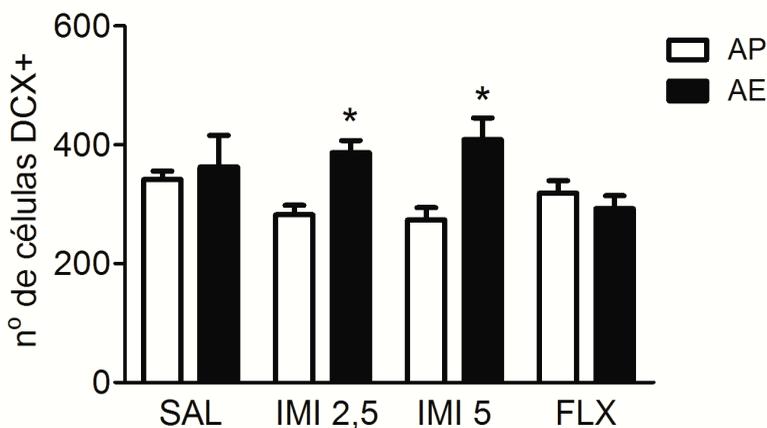


Figura 20: Gráfico da contagem de células DCX+ por seção do giro denteado hipocampo dorsal dos animais do grupo alojado em ambiente padrão ou em ambiente enriquecido, tratados com salina, imipramina ou fluoxetina. (*) Representa a diferença estatística dos animais com o mesmo tratamento entre o AP e AE.

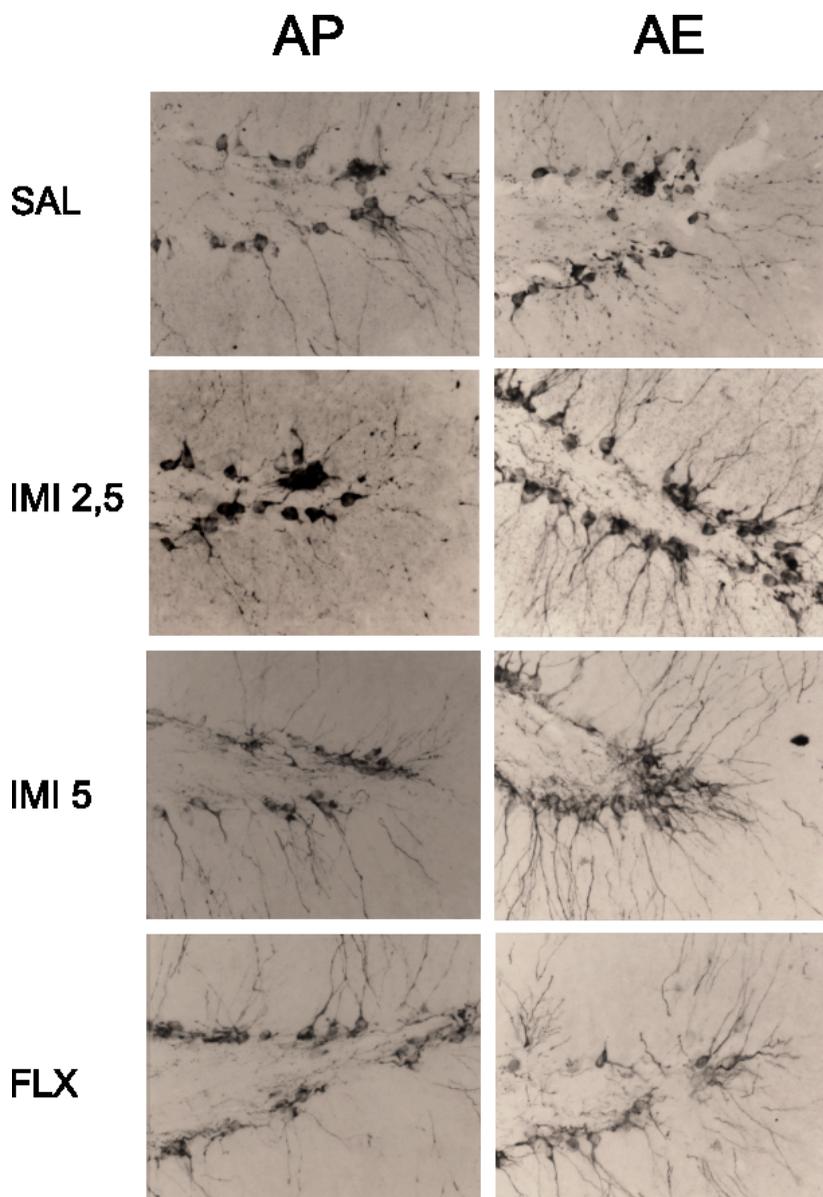


Figura 21: Fotos demonstrativa da contagem de células DCX+. A coluna da esquerda é correspondente aos animais alojados em AP, e coluna da direita animais alojados em AE. Fotos em aumento de 200x.

4 DISCUSSÃO

Nossos resultados indicam que tanto o enriquecimento ambiental quanto o tratamento com antidepressivos foi capaz de prevenir as alterações comportamentais provocadas pela reexposição ao nado forçado. No Ambiente padrão, essas alterações fazem parte de um repertório comportamental típico dos ratos submetidos ao nado forçado em um espaço confinado e são bloqueados por antidepressivos clássicos e clinicamente eficazes. Por causa destas características, o teste do nado forçado é um dos testes mais utilizados para verificar o potencial antidepressivo de diferentes substâncias. Por ser diminuída pelo tratamento com antidepressivos, a imobilidade é considerada um índice do comportamento do tipo “depressivo” neste teste (PORSOLT *et al.*, 1977). Assim, no presente texto utilizaremos o termo “tipo-depressivo” para descrever aumento da imobilidade durante a exposição do nado forçado e termo “tipo-antidepressivo” para descrever os efeitos comportamentais dos fármacos antidepressivos.

4.1 OS EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE AS CONSEQUÊNCIAS COMPORTAMENTAIS DO TESTE DO NADO FORÇADO REPETIDO

Diversos autores relatam que o comportamento tipo depressivo no TNF pode ser influenciado pelo enriquecimento ambiental (LLORENS-MARTÍN *et al.*, 2007; BRENES *et al.*, 2008; SIMPSON E KELLY, 2012). Brenes e colaboradores (2008) avaliaram os efeitos das condições de alojamento [isolamento social (IS), enriquecimento ambiental (AE) e condições padrões (CP)] sobre o comportamento no TNF. Eles demonstraram que o enriquecimento ambiental (durante 77 dias) afetou não somente a imobilidade, como também o comportamento de nadar, escalar e mergulhar. Os animais do enriquecimento ambiental apresentaram diminuição da imobilidade, aumento do comportamento de nado, escalada e mergulho quando comparados aos animais controles e com os animais do IS (BRENES *et al.*, 2008). O efeito do enriquecimento ambiental sobre o comportamento de imobilidade de camundongos no TNF também foi observado por outro grupo de pesquisadores (LLORENS-MARTÍN *et al.*, 2007). O AE consistia em uma caixa de dois andares, com rodas de correr e 10 camundongos fêmeas C57BL/6 por caixa. Além da diminuição na duração de imobilidade, os resultados também mostraram que os animais do AE

apresentavam um aumento no volume do giro denteado do hipocampo quando comparados com os animais do AP (LLORENS-MARTÍN *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostraram que o alojamento em AE, não produziu alterações comportamentais significantes no pré-teste e nem no teste (primeira e segunda exposição ao TNF-repetido). A diferença entre os nossos resultados e os obtidos por Llorens-Martín e colaboradores (2007), pode ser devida às diferenças entre as espécies estudadas (rato versus camundongo). No entanto, as diferenças entre os nossos resultados e os obtidos por Brenes (2008) pode ser atribuída às diferenças entre as linhagens de ratos (*Wistar* versus *Sprague-Dawley*), tempo de alojamento e ainda por diferenças na composição do enriquecimento ambiental. O enriquecimento ambiental é a combinação de estímulos inanimados e sociais (ROSENZWEIG *et al.*, 1978), geralmente constituído por caixas maiores que o padrão preconizando, rodas para atividade e objetos trocados periodicamente para despertar a curiosidade e exploração (ver ROSENZWEIG e BENNETT, 1996). A variedade de condições de alojamento, com o intuito de reforçar o enriquecimento, muitas vezes dificulta uma padronização para animais de laboratório. O nosso protocolo é semelhante ao descrito por Simpson e Kelly (2012) ou Simpson e colaboradores (2012) que aplicaram um protocolo de 5 semanas de enriquecimento ambiental antes do TNF obtendo resultados semelhantes aos nossos i.e., o AE não foi capaz de afetar os parâmetros de imobilidade de ratos expostos ao TNF (neste trabalho somente a duração foi medida).

Muitos trabalhos que utilizaram o TNF, como descrito por Porsolt, avaliaram somente os efeitos do tratamento agudo com fármacos antidepressivos (CRYAN *et al.*, 2005). Nos casos em que foram empregados tratamentos crônicos, não foi possível avaliar os efeitos ao longo do tratamento (DETKE *et al.*, 1997). A modificação do TNF apresentada neste trabalho, o TNF-repetido em ratos, torna possível avaliar efeitos comportamentais de curto e de longo prazo de diversos fatores aos quais os animais são expostos. De acordo com os dados apresentados por Dal-Zotto e colaboradores, os animais expostos cronicamente ao nado forçado por 20min diários, aumentaram a duração do comportamento de imobilidade ao longo de 14 dias de exposição (DAL-ZOTTO *et al.*, 2000). Nossos resultados mostraram que o ambiente enriquecido foi eficaz de bloquear os efeitos causados pela reexposição, aumentando a latência para a imobilidade e diminuindo a duração e a frequência de imobilidade na terceira (reteste 1) e quarta (reteste 2) exposição ao nado forçado em relação ao ambiente padrão.

O enriquecimento ambiental é capaz de modificar a morfologia e a neuroquímica do sistema nervoso central. Dentre estas modificações encontram-se o aumento do volume cerebral (DIAMOND *et al.*, 1966; BENNETT *et al.*, 1964), aumento da arborização dendrítica (SCHAPIRO e VUKOVICH, 1970; VOLKMAR e GREENOUGH, 1972) e aumento dos níveis de neurotrofinas (CHOURBAJI *et al.*, 2011). As neurotrofinas por sua vez, induzem a expressão de uma complexa combinação de genes, incluindo aqueles que codificam outros fatores neurotróficos, receptores e proteínas envolvidas na sinalização da transdução e que influenciam o aumento da neurogênese, a inibição da apoptose e neuroproteção (YOUNG *et al.*, 1999) em animais alojados em ambiente enriquecido quando comparados a animais alojados em condições padrões de laboratório. Outro efeito interessante mostrado por Mlynarik e colaboradores (2004) é que animais alojados em AE lidam melhor com situações de estresse dos que animais alojados em AP (MLYNARIK *et al.*, 2004). Nossos resultados mostraram que o AE não foi capaz de alterar o comportamento no pré-teste e no teste. Entretanto, a partir do teste os animais receberam injeção de salina durante 14 dias, e a partir do reteste 1 os efeitos do enriquecimento começaram a aparecer. Nossa suspeita é de que o enriquecimento ambiental, com o protocolo utilizado, começa a apresentar efeitos a partir de uma situação estressante (a injeção diária de salina e a própria exposição ao teste do nado forçado), i.e., estaria impedindo o aparecimento da inibição comportamental no nado forçado por aumentar a resistência do sistema nervoso aos efeitos deletérios do estresse.

4.2 EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM ANTIDEPRESSIVOS SOBRE OS COMPORTAMENTOS NO TESTE DE NADO FORÇADO-REPETIDO

Vários trabalhos utilizando o TNF demonstraram que fármacos antidepressivos podem produzir a diminuição do comportamento de imobilidade no teste (segunda exposição) (PORSOLT *et al.*, 1978; CRYAN *et al.*, 2005; DETKE *et al.*, 1997). Porém, esses resultados foram observados com o uso de doses muito altas (Imipramina 30 mg/kg; Clorimipramina 20 mg/kg; Fluoxetina 15 mg/kg; Reboxetina 60 mg/kg) comparadas às doses utilizadas em nosso estudo ou mesmo com estudos em humanos (por exemplo, 10 ou 20 mg por indivíduo ao dia, GRILLON *et al.*, 2009). O tempo de imobilidade apresentado pelos animais durante o teste pode ser influenciado por exposições prévias ao

ambiente aquático (DAL-ZOTTO *et al.*, 2000) e também por situações de estresse antes do TNF (GUTIÉRREZ-GARCÍA e CONTRERAS, 2009). Dal-Zotto e colaboradores observaram que ratos expostos mais vezes ao ambiente aquático (20 min diários por 14 dias) apresentaram aumento na duração do comportamento de imobilidade durante o teste, em comparação aos ratos que só foram expostos uma vez previamente. Gutiérrez-García e Contreras (2009) mostraram que tanto o estresse físico (choque na pata), quanto o estresse emocional (exposição a urina dos animais que recebiam o choque) durante 21 dias antes do TNF produziu um aumento no tempo de imobilidade dos animais expostos ao TNF e que, a imipramina na dose de 5 mg/kg restaurou os valores de imobilidade em 7 dias, enquanto que a dose de imipramina 2,5 mg/kg só apresentou efeito após 14 dias de tratamento.

Nós utilizamos o teste descrito por Mezadri *et al.*, 2011, que se baseia em três reexposições de 5 minutos ao nado forçado, separadas por uma semana entre elas, e que estimula o comportamento de imobilidade. Utilizando este protocolo Mezadri *et al.*, 2011 observaram diminuição da imobilidade e aumento na duração do comportamento de nadar somente no reteste 2. Semelhante ao trabalho de Mezadri *et al.*, 2011, observamos que a FLX administrada aos ratos do grupo AP, foi capaz de bloquear os efeitos da reexposição ao nado forçado sobre a latência, duração e frequência dos comportamentos de imobilidade no reteste 2. Diferente de Mezadri *et al.*, 2011, esses efeitos também foram observados no reteste 1. Além disso, não observamos aumento na duração do comportamento de nadar como Mezadri *et al.*, 2011. As discrepâncias entre os dados de Mezadri *et al.*, 2011 e os nossos podem ser decorrentes de pequenas variações de protocolo, como por exemplo, o ciclo claro-escuro e o horário dos experimentos. No presente trabalho o ciclo claro-escuro 12h-12h invertido (apaga às 06:00 e acende às 18:00h) e os experimentos foram realizados no período matutino (entre às 8:00 e 12:00h) enquanto que em Mezadri *et al.*, 2011 os animais foram mantidos no ciclo 12h-12h (acende às 06:00 e apaga às 18:00h) e os experimentos feitos a noite (a partir das 18:00 h). Apesar das diferenças metodológicas existem dados semelhantes entre os dois trabalhos o que indica que o TNF-repetido é reprodutível em diferentes laboratórios e que pode identificar doses baixas de FLX, ou talvez de substâncias similares a ela. Em nossas condições experimentais os efeitos da FLX também foram observados no reteste 1, por esta razão sugerimos que nosso protocolo facilitou a detecção dos efeitos deste fármaco quando comparado aos estudos de Mezadri *et al.*, 2011.

Nossos resultados mostraram que a imipramina, nas doses de 2,5 ou 5 mg/kg, não foi capaz de alterar os comportamentos dos animais durante o teste. Entretanto, ambas as doses de imipramina bloquearam o aumento do tempo da imobilidade provocada pela reexposição ao nado forçado no reteste 1 e no reteste 2. Além disso, a dose de 5 mg/kg de imipramina bloqueou os efeitos da reexposição sobre a frequência de imobilidade no reteste 1 e no reteste 2, e também preveniu os efeitos da reexposição sobre a latência da imobilidade. Esses resultados mostram que baixas doses de imipramina foram capazes de prevenir os efeitos da reexposição ao nado forçado sobre a imobilidade, principalmente, e de forma mais consistente sobre a duração e frequência.

A duração da imobilidade dos ratos no TNF parece ser o parâmetro mais consistentemente afetado (diminuído) por antidepressivos em geral e, talvez por esta razão, seja a única variável medida em muitos estudos utilizando o TNF (PORSOLT *et al.*, 1977, 1978; BORSINI *et al.*, 1989; NODA *et al.*, 1995; KITAMURA *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2006). Por outro lado, é raro na literatura encontrar trabalhos que descrevem variações na frequência ou latência da imobilidade. A análise de Componentes Principais apresentada por Mezadri *et al.*, (2011) mostra que a frequência de imobilidade nos retestes 1 e 2 seriam inversamente relacionados ao tempo de imobilidade indicando que estes parâmetros seriam aumentados pelos antidepressivos. Em nosso experimento encontramos resultados contrários a esta hipótese, uma vez que o tratamento com os antidepressivos diminuiu tanto a duração quanto a frequência de imobilidade nos retestes 1 e 2. Ainda de acordo com a análise de Componentes Principais do reteste 1 e reteste 2 apresentada por Mezadri *et al.*, (2011), a latência para imobilidade seria aumentada principalmente por substâncias inibidoras da recaptção de noradrenalina (IRNAs). Nossos dados mostram que tanto a imipramina 5 mg/kg (inibidor não seletivo da recaptção de serotonina e noradrenalina) quanto a FLX (inibidor seletivo da recaptção de serotonina) aumentaram a latência para a imobilidade no reteste 1 e 2, fato que é incompatível com a interpretação de Mezadri *et al.* (2011) para a latência de imobilidade. Em conjunto nossos dados indicam que a interpretação dos Componentes Principais apresentada por Mezadri *et al.* (2011) deve ser revisada.

Castagné e colaboradores (2009) propõem que a avaliação da latência para a imobilidade aumenta a sensibilidade do TNF a efeitos de IRNAs, entretanto, não aumenta a sensibilidade do teste aos ISRS. Estes pesquisadores utilizaram o método do TNF tradicional para avaliar o

efeito de altas doses de imipramina e fluoxetina. As doses de 16 e 32 mg/kg de imipramina foram capazes de aumentar a latência, já dentre as doses utilizadas de fluoxetina (16, 32 e 64 mg/kg), somente a dose de 32 mg/kg produziu um leve aumento na latência (CASTAGNÉ *et al.*, 2009). Nossos resultados apontaram que a dose de IMI 5 mg/kg e FLX aumentaram a latência para imobilidade já no reteste 1 e somente a FLX aumentou a latência no reteste 2. Isto sugere que o TNF-repetido é mais sensível ao efeito de ISRS e de baixas doses de antidepressivos do que o TNF tradicional, uma vez que conseguimos verificar efeito de doses praticamente 10 vezes menores (2,5 e 5 mg/kg) utilizadas no TNF tradicional. Além disso, os dados indicam que tanto os IRNAs quanto os ISRSs podem antagonizar a redução de latência produzida pela reexposição ao nado forçado.

Além das alterações no comportamento de imobilidade, tanto a imipramina (na dose de 5 mg/kg) quanto a FLX tiveram uma tendência a aumentar a duração do comportamento de escalar no reteste 2. Estes resultados estão parcialmente de acordo com os resultados apresentados por Detke *et al.*, 1995, que avaliou diferenças no comportamento de ratos no TNF produzidos por diferentes classes de antidepressivos. Ele observou que a desipramina, um IRNA, aumentou a duração do comportamento de escalar, entretanto, não observou o mesmo efeito com a FLX (DETKE *et al.*, 1995). Estas diferenças podem ser atribuídas ao fato de que Detke e colaboradores (1995) utilizaram uma única sessão teste de nado forçado, tratamento agudo (3 injeções entre o pré-teste e o teste m 24 h) com os fármacos e de terem registrado a incidência dos comportamentos em intervalos de 5 segundos ao longo do teste. Em conjunto os dados sugerem que os parâmetros utilizados no TNF, para discriminar efeitos dos IRNAs dos ISRSs não se aplicam a situação do TNF-repetido.

4.3 INTERFERÊNCIA DO AMBIENTE NOS EFEITOS DOS ANTIDEPRESSIVOS NO TESTE DE NADO FORÇADO-REPETIDO

Da mesma forma que o tratamento farmacológico com antidepressivos é capaz de diminuir os parâmetros de imobilidade no TNF (PORSOLT *et al.*, 1978; CRYAN *et al.*, 2005; DETKE *et al.*, 1997), existem na literatura relatos que o enriquecimento ambiental também pode produzir efeitos tipo-antidepressivo no TNF (BRENES *et al.*, 2008). Em dois estudos independentes, Simpson e colaboradores

(2012), relataram que injeções intraperitoneal (3 injeções em 24 h) de desipramina (dose de 2,5, 5 ou 10 mg/kg) não produziram efeitos tipo-antidepressivo nos animais alojados no AE por 5 semanas antes do TNF (SIMPSON, KELLY, 2012; SIMPSON *et al.*, 2012). Contudo, é interessante notar que estes tratamentos foram inócuos também quando os ratos foram alojados em AP antes do TNF (SIMPSON, KELLY, 2012; SIMPSON *et al.*, 2012). Em nosso estudo, o tratamento agudo com a imipramina ou com a fluoxetina também não afetou o comportamento dos animais alojados em AE ou AP na sessão teste do TNF-repetido.

No reteste 1, nossos resultados mostraram que as duas doses de imipramina e a fluoxetina aumentaram a latência para a imobilidade e reduziram o tempo de imobilidade dos ratos alojados em AP. Surpreendentemente, estes efeitos são prevenidos quando os ratos foram alojados em AE sugerindo que o enriquecimento antagonizou os efeitos dos antidepressivos. No entanto, é importante ressaltar que o AE aumentou a latência para imobilidade e diminuiu o tempo de imobilidade do grupo salina e isto se refletiu na ausência de diferença significativa entre os tratamentos farmacológicos e a salina. Portanto, concluímos que o AE não afetou os efeitos dos antidepressivos *per se* no reteste 1.

Nossos resultados mostraram que a imipramina nas duas doses, foi capaz de prevenir os efeitos da reexposição sobre a duração da imobilidade no reteste 2 apresentada pelos animais alojados em AP. Entretanto, observamos efeito da dose de 5 mg/kg de IMI *per se* no reteste 2 naqueles animais alojados em AE: estes ratos apresentaram duração de imobilidade menor no reteste 2 comparados com o teste, apesar de não serem diferentes do grupo salina. Esses resultados sugerem que o AE, além de promover um efeito tipo-antidepressivo *per se* (diminuição da imobilidade que acompanha a reexposição ao nado), também potencializou os efeitos do tratamento crônico com imipramina, i.e., fez com que a imipramina diminuísse progressivamente a duração da imobilidade ao longo do tempo. Este sinergismo parece ser dose dependente, pois não afetou a dose de imipramina 2,5 mg/kg. A FLX bloqueou o efeito da reexposição sobre a imobilidade nos animais alojados em AP e, assim como a imipramina, diminuiu a duração de imobilidade no reteste 2 quando comparado ao teste nos animais alojados em AE. Esses resultados sugerem que o AE pode potencializar os efeitos da imipramina no reteste 2, entretanto, não causa nenhum efeito adicional aos ISRS.

As primeiras hipóteses para explicar o efeito terapêutico dos antidepressivos foram baseadas na ação aguda destes tratamentos em bloquear a recaptação ou o metabolismo das monoaminas e, portanto, aumentar os níveis sinápticos destes neurotransmissores (AMBADE *et al.*, 2009; MASSART *et al.*, 2012). Apesar de um aumento agudo dos níveis cerebrais das monoaminas 5-HT e NA, é necessário um protocolo de tratamento crônico (semanas a meses de administrações diárias) para o efeito terapêutico ser observado (DUMAN *et al.*, 1997; e para revisão ver BRUNELLO *et al.*, 2002). Vários autores advogam que este é o tempo necessário para as monoaminas em altas quantidades ativarem receptores que disparam cascatas intracelulares de sinalização que regulam a transcrição genética. Estas alterações genéticas incluem o aumento de fatores neurotróficos, que modulam alterações morfológicas e funcionais de longo prazo, que são conhecidas como essenciais para a ação de antidepressivos (DUMAN, 2004(a); MASI e BROVEDANI, 2011; SURGET *et al.*, 2011). Dentre as alterações morfológicas mais importantes influenciadas pelos fatores neurotróficos está a neurogênese, e ela pode ser a peça fundamental para explicar a influência do ambiente nos efeitos que encontramos com os antidepressivos. Estudos que investigam os efeitos do ambiente sobre o comportamento tipo depressivo apresentado por animais em testes experimentais, apontam o aumento da capacidade plástica do SNC como o fator chave para os efeitos do enriquecimento ambiental (TOTH *et al.*, 2011; OLSSON e DAHLBORN, 2002). Neste sentido, nossos resultados sugerem que o ambiente enriquecido tenha influenciado a capacidade do sistema noradrenérgico em responder de forma mais eficaz ao tratamento com a imipramina.

4.4 RELAÇÃO ENTRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR NO HIPOCAMPO E OS COMPORTAMENTOS NO TESTE DO NADO FORÇADO-REPETIDO: EFEITOS DO AMBIENTE E DO TRATAMENTO COM ANTIDEPRESSIVOS.

A neurogênese no hipocampo adulto pode ser influenciada diferentemente por vários fatores. O estresse, por exemplo, diminui a neurogênese hipocampal (TANAPAT *et al.*, 2001), enquanto que a administração crônica de antidepressivos estimula o crescimento de novos neurônios no hipocampo de ratos adultos (MALBERG *et al.*, 2000). O tratamento com fluoxetina 5 mg/kg, durante 28 dias, aumentou a neurogênese no hipocampo de ratos adultos (MALBERG *et al.*, 2000),

a proliferação celular e ainda preveniu a morte programada de células (apoptose) do giro denteado de ratos separados da mãe logo após o nascimento (LEE *et al.*, 2001). O tratamento com outro antidepressivo, a imipramina (± 5 mg/kg via oral, diariamente durante 5 semanas), induziu aumento na proliferação celular, preveniu a apoptose e induziu a elevação de fatores neurotróficos em ratos bulbectomizados (KEILHOFF *et al.*, 2006). Ao contrário do descrito na literatura, em nossos resultados sobre a proliferação celular apresentada pelos animais do AP, cuja única manipulação foi o tratamento farmacológico, não conseguimos observar diferença estatística entre os tratamentos. Embora, os animais tratados com IMI 5 mg/kg e FLX apresentaram tendência ao número diminuído de células Ki-67+ quando comparados aos animais SAL. Encontramos o mesmo resultado a respeito do número de células DCX+ nos animais do ambiente padrão, ou seja, não houve diferença estatísticas entre os tratamentos com antidepressivos nos animais alojados em AP quando comparado aos animais do grupo SAL. Uma possível explicação para os nossos resultados diferirem do observado por outros pesquisadores, pode ser a dose com que trabalhamos e a duração do tratamento, que em nosso protocolo foram apenas 14 dias de administração.

Além do tratamento farmacológico, alguns trabalhos também apresentaram os efeitos do enriquecimento ambiental sobre a proliferação celular (NILSSON *et al.*, 1999; KEMPERMANN *et al.*, 1997; KOMITOVA *et al.*, 2005). Nilsson e colaboradores (1999) observaram que animais expostos ao enriquecimento ambiental (por 8 semanas) aumentaram a sobrevivência de células progenitoras no giro denteado. Após quatro semanas de enriquecimento, Kempermann e colaboradores (1997) constataram que o AE promoveu efeitos de sobrevivência em células precursoras neurais no hipocampo de camundongos, aumento do número de células granulares e o volume hipocampal (KEMPERMANN *et al.*, 1997).

Outro aspecto interessante da neurogênese hipocampal, é que ritmo da divisão celular pode ser influenciado por experiências ambientais (PERCACCIO, 2006). Em nossos resultados, os animais tratados com IMI 5 mg/kg e FLX apresentaram uma contagem de células proliferativas muito baixa quando comparada aos dados da literatura, enquanto que, houve um aumento no número de células DCX+ nos animais tratados com imipramina (nas duas doses) quando comparados aos animais alojados em AP. Uma possível explicação para isso, é que a associação entre enriquecimento ambiental e antidepressivos tricíclicos (imipramina) acelere a diferenciação celular

nessa etapa; desta forma, o que vemos, é um número reduzido de células em proliferação e um número maior de células diferenciadas em neurônios. Já os animais alojados em AE e tratados com fluoxetina apresentaram uma redução de células Ki-67+, entretanto, não houve aumento de células DCX+ nos animais tratados com FLX independente das condições de alojamento. Esse resultado pode ser devido a fluoxetina acelerar tanto a proliferação quanto a maturação das células neuronais. Esta explicação está de acordo com um estudo realizado por Wang e colaboradores (2008), que demonstrou que o tratamento de crônico com fluoxetina (18mg/kg) estimulou a maturação de neurônios recém nascidos. Neste trabalho, primeiramente se observou que as células DCX+ apresentaram mais dendritos terciários, e essas células apresentavam uma arborização dendrítica mais complexa após o tratamento crônico (WANG *et al.*, 2008).

4.5 INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E DOS TRATAMENTOS SOBRE A VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL

O peso corporal é o resultado do consumo diário de energia e do gasto energético. Quando a ingestão diária de calorias excede a quantidade de energia gasta durante o dia, ocorre o aumento de peso corporal (BOON *et al.*, 1997). Existem quatro fatores que alteram o peso corporal: atividade metabólica (BRAY E YORK, 1979), fatores genéticos (BELL *et al.*, 2005), ingestão diária de energia (SCLAFANI e SPRINGER, 1976) e gasto diário de energia (PREMACK e PREMACK, 1963). Diferentes efeitos colaterais (ganho ou perda de peso) são observados com o tratamento com diferentes classes de antidepressivos. A pesquisa realizada por Yen e colaboradores (1987) mostrou que tanto camundongos-controles quanto em camundongos obesos apresentaram redução na ingestão de alimento e no peso corporal quando tratados com fluoxetina, 10mg/kg por dia, durante 10 dias (YEN *et al.*, 1987). Já o tratamento com inibidores da recaptação de NA, tem mostrado o efeito contrário. Um estudo realizado por Frank e colaboradores (1990) mostrou que metade dos pacientes (homens e mulheres) teve 5% de aumento de peso após o tratamento crônico com imipramina na dose de 215mg (FRANK *et al.*, 1990).

Nossos resultados apontaram que todos os animais aumentaram de peso ao longo das duas semanas de avaliação, entretanto, nos animais tratados com fluoxetina e alojados em AE, o aumento de peso foi menor

do que o apresentado pelos animais tratados com fluoxetina e alojados em AP. Esses dados sugerem que a menor variação de peso desse grupo pode ter sido ocasionada pela associação do tratamento com fluoxetina e com o enriquecimento ambiental. A fluoxetina pode ter diminuído a ingestão de alimento enquanto que o enriquecimento ambiental aumentou o gasto energético, tendo em vista que os animais alojados em AE tinham mais espaço para a locomoção do que os animais alojados em AP. Essa diferença não foi observada nos outros grupos experimentais pelo fato de que o ambiente *per se* não propiciou um aumento no gasto energético a ponto de diminuir a variação do peso corporal. Um estudo realizado por Beale e colaboradores (2011) mostrou que independente das condições de alojamento, os animais mantidos em AE não apresentaram nenhuma alteração na ingestão de alimento e no peso corporal quando comparados a ratos alojados em ambiente padrão (BEALE *et al.*, 2011). Estes resultados estão de acordo com o que observamos em nossos animais, onde aqueles animais mantidos em AE e que foram tratados com salina apresentaram a mesma variação de peso observada nos animais alojados em AP.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Teste do nado forçado repetido é sensível a baixas doses de imipramina e fluoxetina.

Tanto o enriquecimento ambiental quanto doses baixas de imipramina bloqueiam os efeitos da reexposição ao nado forçado.

O ambiente enriquecido potencializa os efeitos comportamentais do tratamento crônico com imipramina, entretanto, não causa nenhum efeito adicional ao tratamento com fluoxetina.

O ambiente enriquecido associado ao tratamento com imipramina diminui a proliferação celular e aumenta a neurogênese no hipocampo, enquanto que, o tratamento com fluoxetina diminuía proliferação celular e não aumenta a taxa de neurogênese hipocampal.

Em conjunto estes dados indicam que os efeitos comportamentais do ambiente enriquecido, ou do tratamento com a imipramina ou do tratamento com a fluoxetina no teste do nado forçado repetido não dependem do aumento da neurogênese hipocampal.

REFERÊNCIAS

- ALTMAN, J.; DAS, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal neurogenesis in rats. **Journal of Comparative Neurology**, v.124, p.319-335, 1965.
- ALVAREZ, J.C.; CREMNITER, D.; LESIEUR, P.; GREGOIRE, A.; GILTON, A.; MACQUIN-MAVIER, I.; JARREAU, C.; SPREUX-VARQUAUX, O. Low blood cholesterol and low platelet serotonin levels in violent suicide attempters. **Biological Psychiatry**, v.45, p. 1066-69, 1999.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; LIM, D.A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. **Neuron**, v.41, p. 683-6, 2004.
- AMBADE, V.; ARORA, M.M.; SINGH, P.; SOMANI, B.L.; BASANNAR. Adrenaline, Noradrenaline and Dopamine Level Estimation in Depression : Does it Help? **Medical Journal Armed Forces India**, v. 65, p. 216-220, 2009.
- BARDE, Y.A. Trophic Factors and Neuronal Survival. **Neuron**, v. 2, p. 1525-34, 1989.
- BEALE, K.E.; MURPHY, K.G.; HARRISON, E.K.; KERTON, A.J.; GHATEI, M.A.; BLOOM, S.R.; SMITH, K.L. Accurate measurement of body weight and food intake in environmentally enriched male Wistar rats. **Obesity, Silver Spring**, v. 19, p. 1715-21, 2011.
- BELL, C.G.; WALLEY, A.J.; FROQUEL, P. Genetics and human obesity. **Nature Reviews Genetic**, v. 6, p. 221-34, 2005.
- BELLUZZI, O.; BENEDUSI, M.; ACKMAN, J.; LOTURCO, J.J. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 10411-18, 2003.
- BENNETT, E.L.; DIAMOND, M.C.; MORIMOTO, H.; HEBERT, M. Acetylcholinesterase activity and weight measures in fifteen brain areas from six lines of rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 13, p. 563-72, 1966.

BENNETT, E.L.; DIAMOND, M.C.; KRECH, D.; ROSENZWEIG, M.R. Chemical and anatomical plasticity of brain. **Science**, v. 146, p. 610–9, 1964.

BLOCH, R.G.; DOONEIEF, A.S.; BUCHBERG, A.S.; SPELLMAN, S. The clinical effect of isoniazid and iproniazid in the treatment of pulmonary tuberculosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 40, p. 881–900, 1954.

BOON, P.; VISSER, H.; DAAN, S. Effect of photoperiod on body mass, and daily energy intake and energy expenditure in young rats. **Physiology and Behavior**, v. 62, p. 913-9, 1997.

BORSINI, F.; LECCI, A.; SESSAREGO, A.; FRASSINE, R.; MELI, A. Discovery of antidepressant activity by forced swimming test may depend on pre-exposure of rats to a stressful situation. **Psychopharmacology**, v. 97, p. 183-8, 1989.

BRAY, G.A.; YORK, D.A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. **Physiology and Behavior**, v. 59, p. 719-809, 1979.

BREMNER, J.D. Structural Changes in the Brain in Depression and Relationship to Symptom Recurrence. **CNS Spectrums**, v. 7, p.129-139, 2002.

BRENES, J.C.; RODRÍGUES, O.; FORNAGUERA, J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 89, p. 85-93, 2008

BRUNELLO, N.; MENDLEWICZC, J.; KASPER, S.; LEONARD, B.; MONTGOMERY, S.; NELSON, J.; PAYKEL, E.; VERSIANI, M.; RACAGNI, G. The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 12, p. 461–475, 2002.

CAMERON, H.A.; MCKAY, R.D. Restoring production of hippocampal neurons in old age. **Nature Neuroscience**, v. 2, p. 894–897, 1999.

CAMPBELL, S.; MACQUEEN, G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 29, p. 417-426, 2004.

CASTRÉN, E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 58-64, 2004.

CARLÉN, M.; CASSIDY, R.M.; BRISMAR, H.; SMITH, G.A.; ENQUIST, L.W.; FRISÉN, J. Functional integration of adult-born neurons. **Current Biology**, v. 12, p. 606-8, 2002.

CASTAGNÉ, V.; PORSOLT, R.D.; MOSER, P. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. **European Journal of Pharmacology**, v. 616, p. 128-33, 2009.

CHEN, H.; PANDEY, G.N.; DWIVEDI, Y. Hippocampal cell proliferation regulation by repeated stress and antidepressants. **Neuroreport**, v. 17, p.863-7, 2006.

CHEN, M.C.; HAMILTON, J.P.; GOTLIB, I.H. Decreased hippocampal volume in healthy girls at risk of depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, p. 270-6, 2010.

CHOURBAJI, S.; BRANDWEIN, C.; GASS, P. Altering BDNF expression by genetics and/or environment: Impact for emotional and depression-like behaviour in laboratory mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 599–611, 2011.

COE, C.L.; KRAMER, M.; CZE'CH, B.; GOULD, E.; REEVES, A.J.; KIRSCHBAUM, C.; FUCHS, E. Prenatal Stress Diminishes Neurogenesis in the Dentate Gyrus of Juvenile Rhesus Monkeys. **Biological Psychiatry**, v. 54, p. 1025–1034, 2003.

COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. **The British Journal of Psychiatry**, v. 113, p.1237–1264, 1967.

COSTA, E.; GARATTINI, S.; VALZELLI, L. Interactions between reserpine, chlorpromazine, and imipramine. **Experientia**, v. 16, p.461–3, 1960.

COSTA, D.A.; CRACCHIOLO, J.R.; BACHSTETTER, A.D.; HUGHES, T.F.; BALES, K.R.; PAUL, S.M.; MERVIS, R.F.; ARENDASH, G.W.; POTTER, H. Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. **Neurobiology of Aging**, v. 28, p.831-44, 2006.

CRANE, G.E. The psychiatric side-effects of iproniazid. **American Journal of Psychiatry**, v.112, p.494–501, 1956.

CRISPIM JUNIOR, C.F.; PEDERIVA, C.N.; BOSE, R.C.; GARCIA, V.A.; LINO-DE OLIVEIRA, C.; MARINO-NETO, J. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in Biology and Medicine**, v. 42, p. 257-64, 2012.

CRYAN, J.F.; PAGE, M.E.; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology**, v. 182, p. 335–344, 2005.

DAL-ZOTTO, S.; MARTI, O.; ARMARIO, A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. **Behavioural Brain Research**, v.114, p. 175–81, 2000.

DETKE, M.J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 5, p. 107–12, 1997.

DETKE, M.J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 121, p. 66– 72, 1995.

DEWHURST, W. G. Melancholia and depression: from hippocratic times to modern times. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 17, p. 81-83, 1992.

DIAMOND, M.C.; LAW, F.; RHODES, H.; LINDER, B.; ROSENZWEIG, M.R.; KRECH, D.; BENNETT, E.L. Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. **Journal of Comparative Neurology**, v. 128, p. 117-26, 1966.

DRANOVSKY, A.; PICCHINI, A. M.; MOADEL, T.; SISTI, A. C.; YAMADA, A.; KIMURA, S.; LEONARDO, D.; HEN, R. Experience Dictates Stem Cell Fate in the Adult Hippocampus. **Neuron**, v. 70, p. 908–923, 2011.

DREW, M.R.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis as target for the treatment of depression. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 6, p. 205–218, 2007.

DUAN, X.; KANG, E.; LIU, C.Y.; MING, G.L.; SONG, H. Development of neural stem cell in the adult brain. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 18, p. 108-115, 2008.

DUMAN, R.; HENINGER, G.R.; NESTLER, E.J. A molecular and cellular theory of depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 54, p.597–606, 1997.

DUMAN, R.S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. **Neuromolecular Medicine**, v. 5, p. 11–25, 2004 (a)

DUMAN, R.S. Depression: a case of neuronal life and death? **Biological Psychiatry**, v. 56, p. 140–145, 2004 (b).

ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; ERIKSSON, T.B.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v. 4, p. 1313-17, 1998.

FEELEY, A.M. The relevance of Freud to modern psychiatry. **Psychiatry- Interpersonal and Biological Processes**, v. 7, p. 203-205, 2008.

FREIS, E.D. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. **The New England Journal of Medicine**, v. 251, p. 1006-8, 1954.

GALEA, L.A.M. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. **Brain Research Reviews**, v. 57, p. 332-41, 2008.

GAO, B.; CUTLER, M. G. Effects of acute and chronic administration of the antidepressants, imipramine, phenelzine and mianserin, on the social behaviour of mice. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 813-824, 1994.

GHAEMI, S. N. Why antidepressants are not antidepressants: STEP-BD, STAR*D, and the return of neurotic depression. **Bipolar Disorders**, v. 10, p. 957-968, 2008.

GLEESON, J.G.; LIN, P.T.; FLANAGAN, L.A.; WALSH, C.A. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. **Neuron**, v. 23, p. 257-71, 1999.

GOULD, E.; CAMERON, H.A.; DANIELS, D.C.; WOOLLEY, C.S.; MCEWEN, B.S. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. **Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 3642-3650, 1992.

GOULD, E. Serotonin and Hippocampal Neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 46-51, 1999.

GRILLON, C.; CHAVIS, C.; COVINGTON, M.F.; PINE, D.S. Two-Week Treatment With the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Citalopram Reduces Contextual Anxiety but Not Cued Fear in Healthy Volunteers: A Fear-Potentiated Startle Study. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p. 964-71, 2009.

GUÉNEAU, G.; PRIVAT, A.; DROUET, J.; COURT, L. Subgranular zone of the dentate gyrus of young rabbits as a secondary matrix. A

highresolution autoradiographic study. **Developmental Neuroscience**, v. 5, p. 345–358, 1982.

GUTIÉRREZ-GARCÍA, A.G.; CONTRERAS, C.M. Stressors can affect immobility time and response to imipramine in the rat forced swim test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 91, p. 542–8, 2009.

HIRSCHFELD, R.M. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. The **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61, p. 4-6, 2000.

HULSHOF, H.J.; NOVATI, A.; LUITEN, P.G.M.; BOER, J.A.D.; MEERLO, P. Despite higher glucocorticoid levels and stress responses in female rats, both sexes exhibit similar stress-induced changes in hippocampal neurogenesis. **Behavioural Brain Research**, v. 234, p. 357–364, 2012.

JACOBSEN, J.P.R.; MEDVEDEV, I.O.; CARON, M.G. The 5-HT deficiency theory of depression: perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg439His knockin mouse. **Philosophical Transactions of Royal Society Biological Sciences**, v. 367, p. 2444–2459, 2012.

JUNGERMAN, E.B.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **The European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 513–521, 2005.

KAAE, S.S.; CHEN, F.; WEGENER, G.; MADSEN, T.M.; NYENGAARD, J.R. Quantitative hippocampal structural changes following ECS treatment in a rat model of depression. **Synapse**, v. 66, p. 667–676, 2012.

KEILHOFF, G.; BECKER, A.; GRECKSCH, G.; BERNSTEIN, H.G.; WOLF, G. Cell Proliferation is Influenced by Bulbectomy and Normalized by Imipramine Treatment in a Region-Specific Manner. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, p. 1165–1176, 2006.

KELLIHER, P.; CONNOR, T.J.; HARKIN, A.; SANCHEZ, C.; KELLY, J.P.; LEONARD, B.E. Varying responses to the rat forced-swim test under diurnal and nocturnal conditions. **Psychology & Behavior**, v. 69, p. 531-9, 2000.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, p. 493–495, 1997.

KILIC, F.S.; OZATIK, Y.; KAYGISIZ, B.; BAYDEMIR, C.; EROL, K. Acute antidepressant and anxiolytic effects of simvastatin and its mechanisms in rats. **Neurosciences (Riyadh, Saudi Arabia)**, v. 17, p. 39-43, 2012.

KITADA, Y.; MIYAUCHI, T.; SATOH, A.; SATOH, S. Effects of antidepressants in the rat forced swimming test. **European Journal of Pharmacology**, v. 72, p. 145–152, 1981.

KITAMURA, Y.; ARAKI, H.; SHIBATA, K.; NAGATANI, T.; TAKAO, K.; GOMITA, Y. Influence of imipramine on the duration of immobility in chronic forced-swim-stressed rats. **Acta Medica Okayama**, v. 4, p. 271–4, 2004.

KLAUS, F.; HAUSER, T.; LINDHOLM, A.K.; CAMERON, H.A.; SLOMIANKA, L.; LIPP, H.P.; AMREIN, I. Different regulation of adult hippocampal neurogenesis in Western house mice (*Mus musculus domesticus*) and C57BL/6 mice. **Behavioural Brain Research**, v. 227, p. 340–347, 2012.

KLINE, N.S. Clinical experience with iproniazid (Marsilid). **Journal of Clinical and Experimental Psychopathology**, v. 19, p. 72–78, 1958.

KOMITOVA, M.; PERFILIEVA, E.; MATTSSON, B.; ERIKSSON, P.S.; JOHANSSON, B.B. Effects of cortical ischemia and post ischemic environmental enrichment on hippocampal cell genesis and differentiation in the adult rat. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 22, p. 852– 860, 2002.

KOMITOVA, M.; MATTSSON, B.; JOHANSSON, B.B.; ERIKSSON, P.S. Enriched Environment Increases Neural Stem/Progenitor Cell

Proliferation and Neurogenesis in the Subventricular Zone of Stroke-Lesioned Adult Rats. **Stroke**, v. 36, p. 1278-1282, 2005.

POGGIAL, A. [On the treatment of depressive states with an iminodibenzyl derivative (G 22355, trofanil). (Review with personal contribution)]. **Sistema Nervoso**, v. 12, p. 154–72, 1960.

LAVIOLA, G.; HANNAN, A.J.; MACRÌ, S.; SOLINAS, M.; JABER, M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. **Neurobiology of Disease**, v. 31, p. 159–168, 2008.

LEE, H.J.; KIM, J.W.; YIM, S.V.; KIM, M.J.; KIM, S.A.; KIM, Y.J.; KIM, C.J.; CHUNG, J.H. Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. **Molecular Psychiatry**, v. 6, p. 725–728, 2001.

LEMAIRE, V.; KOEHL, M.; LEMOAL, M.; ABROUS, D.N. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 97, p. 11032-37, 2000.

LIEBERMAN, J.A. History of the Use of Antidepressants in Primary Care. Primary care companion. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 5, p. 6-10, 2003.

LINO-DE-OLIVEIRA, C.; DE LIMA, T.C. M.; CAROBREZ, A.P. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. **Behavioural Brain Research**, v. 158, p. 243–50, 2005.

LITTLE, K.Y.; MCLAUGHLIN, D.P.; RANC, J.; GILMORE, J.; LOPEZ, J.F.; WATSON, S.J.; CARROL, F.Y.; BUTTS, J.D. Serotonin transporter binding sites and mRNA levels in depressed persons committing suicide. **Biological Psychiatry**, v. 41, p. 1156-64, 1997.

LIU, J.; SOLWAY, K.; MESSING, R.O.; SHARP, F.R. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 7768–78, 1998.

LLORENS-MARTÍN, M.V.; RUEDA, N.; MARTÍNEZ-CUÉ, C.; TORRES-ALEMÁN, I.; FLÓREZ, J.; TREJO, J.L. Both increases in

immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. **Neuroscience**, v. 147, p. 631-8, 2007.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, p. 1563–1586, 2009.

LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; LUCKI, I. Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, p. 191-9, 2000.

LUSKIN, M.B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. **Neuron**, v. 11, p. 173-189, 1993.

MALBERG, J.E.; EISCH, A.J.; NESTLER, E.J.; DUMAN, R.S. Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 9104–9110, 2000.

MALBERG, J.E.; DUMAN, R.S. Cell Proliferation in Adult Hippocampus is Decreased by Inescapable Stress: Reversal by Fluoxetine Treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 1562-71, 2003.

MASI, G.; BROVEDANI, P. The Hippocampus, Neurotrophic Factors and Depression: Possible Implications for the Pharmacotherapy of Depression. **CNS Drugs**, v.25, p. 913-931, 2011.

MASSART, R.; MONGEAU, R.; LANFUMEY, L. Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. **Philosophical Transaction of the Royal Society of London**, v. 367, p. 2485–94, 2012.

MCEWEN, B.S.; EILAND, L.; HUNTER, R.G.; MILLER, M.M. Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 3-12, 2012.

MEMBERG, S.P.; HALL, A.K. Proliferation, Differentiation, and Survival of Rat Sensory Neuron Precursors in vitro require Specific Trophic Factors. **Mol Cell Neurosci**, v. 6, p. 323-335, 1995.

MESHI, D.; DREW, M.R.; SAXE, M.; ANSORGE, M.S.; DAVID, D.; SANTARELLI, L., MALAPANI, C.; MOORE, H.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nature Neuroscience**, v. , p. 1-3, 2006.

MEZADRI, T.J.; BATISTA, G.M.; PORTES, A.C.; MARINO-NETO, J.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, p. 200–205, 2011.

MING, G.L.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 28, p. 223-250, 2005.

MLYNARIK, M.; JOHANSSON, B.B.; JEZOVA, D. Enriched Environment Influences Adrenocortical Response to Immune Challenge and Glutamate Receptor Gene Expression in Rat Hippocampus. **Annals ew York Academy of Science**, v. 1018, p. 273-280, 2004.

NAVAILLES, S.; HOF, P.R.; SCHMAUSS, C. Antidepressant Drug-Induced Stimulation of Mouse Hippocampal Neurogenesis Is Age-Dependent and Altered by Early Life Stress. **The journal of comparative neurology**, v. 509, p. 372–381, 2008.

NIBUYA, M.; MORINOBU, S.; DUMAN, R.S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in Rat Brain by Chronic Electroconvulsive Seizure and Antidepressant Drug Treatments. **The Journal of Neuroscience**, v. 75, p. 7539-7547, 1995.

NIBUYA, M.; NESTLER, E.J.; DUMAN, R.S. Chronic Antidepressant Administration Increases the Expression of CAMP Response Element Binding Protein (CREB) in Rat Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 76, p. 2365-2372, 1996.

NILSSON, M.; PERFILIEVA, E.; JOHANSSON, U.; ORWAR, O.; ERIKSSON, P.S. Enriched Environment Increases Neurogenesis in the

Adult Rat Dentate Gyrus and Improves Spatial Memory. **Journal of Neurobiology**, v. 15, p. 569-78, 1999.

NOBLE, E.E.; BILLINGTON, C.J.; KOTZ, C.M.; WANG, C. The lighter side of BDNF. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, p. R1053–R1069, 2011.

NODA, Y.; YAMADA, K.; FURUKAWA, H.; NABESHIMA, T. Enhance of immobility in a forced swimming test by subacute or repeated treatment with phencyclidine: a new model of schizophrenia. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, p. 2531-7, 1995.

OLSSON, I.A.; DAHLBORN K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of environmental enrichment. **Lab Animal**, v. 36, p. 243–270, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA, Academic Press, 1982.

PERCACCIO, C.R. **Environmental enrichment increases response strength and paired-pulse depression of auditory cortex neurons**. [Tese de Doutorado]. Dallas, TX: UMI, 2006

PIES, R. Are Antidepressants Effective in the Acute and Long-term Treatment of Depression? **Innovations in Clinical Neuroscience**, v. 9, p. 31–40, 2012.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioural despair in mice: A primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de thérapie**, v. 229, p. 327-336, 1977.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, p. 379–91, 1978.

PREMACK, D.; PREMACK, A.J. Increased eating in rats deprived of running. **Journal of the experimental analysis of behavior**, v. 6, p. 209-212, 1963.

ROSENZWEIG, M.R.; BENNETT, E.L.; HEBERT, M.; MORIMOTO, H. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. **Brain Research**, v. 153, p. 563-76, 1978.

ROSENZWEIG, M.R.; BENNETT, E.L. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 78, p.57-65, 1996.

SAARELAINEN, T.; HENDOLIN, P.; LUCAS, G.; KOPONEN, E.; SAIRANEN, M.; MACDONALD, E.; AGERMAN, K.; HAAPASALO, A.; NAWA, H.; ALOYZ, R.; ERNFORS, P.; CASTRE'N, E. Activation of the TrkB Neurotrophin Receptor Is Induced by Antidepressant Drugs and Is Required for Antidepressant-Induced Behavioral Effects. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 349-357, 2003.

SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C.; SURGET, A.; BATTAGLIA, F.; DULAWA, S.; WEISSTAUB, N.; LEE, J.; DUMAN, R.; ARANCIO, O.; BELZUNG, C.; HEN, R. Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. **Science**, v. 301, p. 805-9, 2003.

SAPOLSKY, R.M. Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression? **Biological Psychiatry**, v. 56, p. 137-139, 2004.

SCHAPIRO, S.; VUKOVICH, K.R. Early experience effects upon cortical dendrites: a proposed model for development. **Science**, v. 167, p. 292-4, 1970.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. **Behavioural Pharmacology**, v. 18, p. 391-418, 2007.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v.182, p.311-22, 2000.

SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. **Physiology and Behavior**, v. 17, p. 461-471, 1976.

SHIRAYAMA, Y.; CHEN, A. C. H.; NAKAGAWA, S.; RUSSELL, D. S.; DUMAN, R. S. Brain-Derived Neurotrophic Factor Produces Antidepressant Effects in Behavioral Models of Depression. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 3251–3261, 2002.

SIDOR, M.M.; MACQUEEN, G.M. Antidepressants for the Acute Treatment of Bipolar Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 72, p. 156–167, 2011.

SIMPSON, J.; KELLY, J.P. The effects isolated and enriched housing conditions on baseline and drug-induced behavioural responses in the male rat. **Behavioural Brain Research**, v. 234, p. 175-183, 2012.

SIMPSON, J.; BREE, D.; KELLY, J.P. Effect of early life housing manipulation on baseline and drug-induced behavioural responses on neurochemistry in the male rat. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 37, p. 252-63, 2012.

SPEISMAN, R.B.; KUMAR, A.; RANI, A.; FOSTER, T.C.; ORMEROD, B.K. Daily exercise improves memory, stimulates hippocampal neurogenesis and modulates immune and neuroimmune cytokines in aging rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 28, p. 25-43, 2013.

SURGET, A.; TANTI, A.; LEONARDO, E.D.; LAUGERAY, A.; RAINER, Q.; TOUMA, C.; PALME, R.; GRIEBEL, G.; IBARGUEN-VARGAS, Y.; HEN, R.; BELZUNG, C. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. **Molecular Psychiatry**, v. 16, p. 1177-88, 2011

SQUIRE, L.R.; ZOLA-MORGAN, S. The Medial Temporal Lobe Memory System. **Science**, v. 253, p. 1380-6, 1991.

STRANAHAN, A.M.; KHALIL, D.; GOULD, E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. **Nature Neuroscience**, v. 9, p. 526-33, 2006.

SUGIMOTO, Y.; YAMAMOTO, M.; TAGAWA, N.; KOBAYASHI, Y.; MITSUI-SAITOH, K.; HOTTA, Y.; YAMADA, J. Differences between mice strain in response to paroxetine in the fordec swimming test: Involvement of serotonergic or noradrenergic system. **European Journal of Pharmacology**, v. 672, p. 121-5, 2011.

SUN, F.; WANG, X.; MAO, X.; XIE, L.; JIN, K. Ablation of Neurogenesis Attenuates Recovery of Motor Function after Focal Cerebral Ischemia in Middle-Aged Mice. **Plos one**, v. 7, p. 1-8, 2012.

TANAPAT, P.; HASTINGS, N.B.; REEVES, A.J.; GOULD, E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. **Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 5792–5801, 1999.

TANAPAT, P.; HASTINGS, N.B.; RYDEL, T.A.; GALEA, L.A.M.; GOULD, E. Exposure to Fox Odor Inhibits Cell Proliferation in the Hippocampus of Adult Rats via an Adrenal Hormone- Dependent Mechanism. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 437, p. 496-504, 2001.

TOTH, L.A.; KREGEL, K.; LEON, L.; MUSCH, T.I. Environmental Enrichment of Laboratory Rodents: The Answer Depends on the Question. **Comparative Medicine**, v. 61, p. 314–321, 2011.

UK ECT Review Group. Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 361, p. 799–808, 2003.

UDENFRIEND, S.; WEISSBACH, H.; BOGDANSKI, D.F. Effect of iproniazid on serotonin metabolism in vivo. **The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics**, v. 120, p. 255-60, 1957.

VAN PRAAG, H.; CHRISTIE, B.R.; SEJNOWSKI, T.J.; GAGE, F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 96, p. 13427–13431, 1999.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Neural consequences of environmental Enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, p. 191-8, 2000.

VIDEBECH, P.; RAVNKILDE, B. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. **The American Journal of Psychiatry**, v. 161, p. 1957-66, 2004.

VIEIRA, C.; DELIMA, T.C.M.; CAROBREZ, A.P.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. **Neuroscience Letters**, v. 445, p.170–3, 2008.

VOLKMAR, F.R.; GREENOUGH, W.T. Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. **Science**, v. 176, p. 1145-7, 1972.

YANG, J.; LI, W.; LIU, X.; LI, Z.; LI, H.; YANG, G.; XU, L.; LI, L. Enriched environment treatment counteracts enhanced addictive and depressive-like behavior induced by prenatal chronic stress. **Brain Research**, v. 1125, p. 132-7, 2006.

YANG, J.; HOU, C.; MA, N.; LIU, J.; ZHANG, Y.; ZHOU, J.; XU, L.; LI, L. Enriched environment treatment restores impaired hippocampal synaptic plasticity and cognitive deficits induced by prenatal chronic stress. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, p. 257–263, 2007.

YEN, T.T.; WONG, D.T.; BEMIS, K.G. Reduction of food consumption and body weight of normal and obese mice by chronic treatment with fluoxetine: A serotonin reuptake inhibitor. **Drug Development Research**, v. 10, p. 37–45, 1987.

YOUNG, D.; LAWLOR, P.A.; LEONE, P.; DRAGUNOW, M.; DURING, M.J. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. **Nature Medicine**, v. 5, p. 448-453, 1999.

ZELLER, E.A. Amine oxidases: inhibition of monoamine oxidase by 1-isonicotinyl-2-thiumispropyl hydrazine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 214, p. 267–274, 1955.

ZHANG, L.; ZHANG, J.; SUN, H.; LIU, H.; YANG, Y.; YAO, Z. Exposure to enriched environment restores the mRNA expression of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the hippocampus and ameliorates depressive-like symptoms in chronically stressed rats. **Current Neurovascular Research**, v. 8, p. 286-93, 2011.

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132, p. 645-660, 2008.

ZHU, L.L.; ZHAO, T.; LI, H.S.; ZHAO, H.; WU, L.I.; DING, A.S.; FAN, W.H.; FAN, M. Neurogenesis in the adult rat brain after intermittent hypoxia. **Brain Research**, v. 1055, p. 1 – 6, 2005.

WANG, J.W.; DAVID, D.J.; MONCKTON, J.E.; BATTAGLIA, F.; HEN, R. Chronic Fluoxetine Stimulates Maturation and Synaptic Plasticity of Adult-Born Hippocampal Granule Cells. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 1374-84, 2008.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, p. 1–16, 1984.

WIMBISCUS, M.; KOSTENKO, O.; MALONE, D. MAO inhibitors: Risks, benefits, and lore. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 77, p. 859-882, 2010.

WONG, D.T.; HORNQ, J.S.; BYMASTER, F.P.; HAUSER, K.L.; MOLLOY, H.B. A selective inhibitor of serotonin uptake: LILLY 110140,3-(p TRIFLUOROMETHYLPHENOXY)-N-METHYL-3-PHENYLPROPYLAMINE. **Life Sciences**, v. 15, p. 471-479, 1974.

WONG, D.T.; PERRY, K.W.; BYMASTER, F.P. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 764-74, 2005.

WYSS, J.M.; SRIPANIDKULCHAI, B. The development of Ammon's horn and the fascia dentata in the cat: a [³H]thymidine analysis. **Brain Research**, v.350, p. 185–198, 1985.

ANEXO A – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

Soluções para Perfusão

1) Sacarose 9,25%, para 100 ml da solução:

Água destilada (H₂O) 100 ml

Sacarose 9,25 g

Aquecer a água a 45°C e adicionar a sacarose. Filtrar depois de diluída.

2) Preparo do PB 0,2 M, para 100 ml da solução:

H₂O 100 ml

NaH₂PO₄ (monobásico) 0,552 g

Na₂HPO₄ (bibásico) 2,272 g

Utilizar 80 ml da água destilada para dissolver os sais. Após a diluição ajustar o pH em 7,4, filtrar e completar o volume para 100 ml.

3) Preparo do PFA 8%, para 100 ml da solução:

H₂O 100 ml

Paraformaldeído 8 g

Aquecer 80 ml da água a 60°C e adicionar o PFA. Adicionar 1 gota de NaOH 1N a cada 100 ml para auxiliar na diluição. Quando a solução estiver translúcida, deixar esfriar e ajustar o pH em 7,4, filtrar e completar volume para 100 ml. Realizar todo o procedimento na capela. Atenção: deve ser preparado no máximo dois dias antes da perfusão

4) Paraformaldeído (PFA) 4%, para 100 ml da solução:

PB 0,2 M 50 ml

PFA 8% 50 ml

Observação: Misturar as soluções no dia da perfusão.

Soluções anticongelante para armazenar cortes

1) Solução Anticongelante, para 225 ml da solução:

PB 0,02M 54,68 ml

H₂O 65,625 ml

Propilenoglicol 104,70 ml

Sacarose 75 g

Obs: Misturar a sacarose com o PB e com a água até diluir bem, então adicionar o propilenoglicol.

ANEXO B- IMUNOISTOQUÍMICA PARA KI-67 E DCX

Com essa metodologia ocorre uma boa amplificação do sinal, no qual é usado um cromógeno. Inicialmente, há a reação antígeno-anticorpo primário; depois, um anticorpo secundário marcado com biotina reage com esse complexo; por fim, um complexo protéico de avidina e peroxidase se liga as biotinas do anticorpo secundário. Esse complexo reage com peróxido de hidrogênio, dando uma coloração amarronzada.

Dia 1

- 3 x 5(min) lavagem com Tampão A
- Bloqueio da peroxidase endógena (metanol + H₂O₂)- 30 minutos
- 3 x 5(min) lavagem com Tampão A
- Bloqueio das ligações inespecíficas (Tampão A + BSA 1%)- 1h 40 minutos
- Incubar anticorpo primário (Ki-67 1:1000) – over night (4°C)
[Anticorpo primário- Desenvolvido em coelho (IgG, policlonal).

Dia 2

- 3 x 5(min) lavagem com Tampão A
- Incubar anticorpo secundário (Tampão A + Ab sec. 1:1000) – 2 horas [Vectastain® Elite ABC kit anti-coelho IgG, fabricado por Vector labs]
- 3 x 5(min) lavagem com Tampão A
- Incubar no Complexo AB (Tampão A + Reagente A+ Reagente B) – 1h 30minutos
(Vectastain® Elite ABC kit anti-coelho IgG, fabricado por Vector labs, diluição avidina 1:500 e biotina 1:500)
- 3 x 5(min) lavagem com Tampão A
- Revelação com diaminobenzidina (DAB)/ (Tampão A + DAB+ níquel + H₂O₂)
- 1x 5(min) lavagem com água destilada
- 3x 5(min) lavagem com PBS 0,01M
- Estender os cortes em lâminas gelatinizadas

ANEXO C – PROTOCOLO DE DIAFANIZAÇÃO

Protocolo para diafanização para lâminas coradas com Giemsa

Imergir as lâminas em:

Água destilada por 2 min.

Água destilada por 2 min, deixar escorrer bem

Álcool 70% por 1'30 seg.

Álcool 90% por 1'30 seg

Álcool 100% (1) por 3min

Álcool 100% (2) por 3min, escorrer bem.

Xilol (1) por 10 min

Xilol (2) por 10 min

Xilol (3) por 15 min

Escorrer o xilol das lâminas e colar a lamínula, sobre as secções, com dpx (SIGMA-ALDRICH®)

ANEXO D – TABELAS DOS RESULTADOS

Tabela 1: Latência, frequência e duração das categorias comportamentais registradas durante o pré-teste e os dados da comparação entre os grupos AP e AE.

Categoria	Latência		Duração		Frequência	
	AP	AE	AP	AE	AP	AE
Imobilidade	190,4±12,7	158,14±15,2	453,8±21,6	506,4±24,8	16,3±1,6	17,3±1,1
Teste t	t (42)= 1,62, p=0,42		t (42)= -1,6, p=0,54		t (42)= -0,53, p=0,16	
Nado	29,1±8,7	43,4±9	231,4±22,5	233,4±23	20,2±1,5	19±1,3
Teste t	t (42)= -1,14, p=0,87		t (42)= 1, 2, p=0,9		t (42)= 0,58, p=0,42	
Escalada	12,7±2,1	6,1±1	162,5±11,7	138,9±12,7	7,4±0,7	7,2±0,5
Teste t	t (42)= 2,8, p=0,0008*		t (42)= 1,36, p=0,72		t (42)= 0,2, p=0,2	
Mergulho	71,6±25	106,9±36,5	10,5±2	8,7±1,4	4±0,6	3,4±0,5
Teste t	t (42)= -0,8, p=0,09		t (42)= 0,8, p=0,11		t (42)= 0,9, p=0,6	

Valores representam a média±E.P.M dos parâmetros avaliados durante 15 minutos de pré-teste de 22 animais por grupo . AP= ambiente padrão, AE= ambiente enriquecido. * indica diferença estatística significativa entre os ambientes.

Tabela 2: ANOVA de medidas repetidas dos parâmetros de latência, frequência e duração de imobilidade registrados no teste, reteste 1 e reteste 2 dos grupos AP e AE tratados com Salina.

	Latência			Duração			Frequência		
	Teste	Reteste 1	Reteste 2	Teste	Reteste 1	Reteste 2	Teste	Reteste 1	Reteste 2
AP SAL	122,7±12,2	72,8±11,7#	62,2±5,1#	76,2±9,4	108,3±0,1#	103,5±8,9#	7,4±0,8	9,5±0,96	11,2±0,7#
AE SAL	122±8,9	136,6±19,5*	130,3±21,4*	64,2±10,8	52±12,6*	68,4±12*	6,7±0,8	5,4±1*	5,4±0,8*
ANOVA	Amb: F(1,28)=7,47, p=0,01* Rep: F(2, 56)=2,12, p=0,12 Rep vs Amb F (2,56)=4,45, p=0,016*			Amb: F(1,28)=7,44, p=0,01* Rep: F(2, 56)=2,3, p=0,10 Rep vs Amb F (2,56)=4,5, p=0,015*			Amb: F(1,28)=14,7, p=0,01* Rep: F(2, 56)= 1,4, p=0,25 Rep vs Amb F (2,56)=6,2, p=0,004*		

* AE diferente do AP; # diferente do teste.

Tabela 3: ANOVA de medidas repetidas dos parâmetros de latência, frequência e duração de nado registrados no teste, reteste 1 e reteste 2 dos grupos AP e AE tratados com Salina.

	Latência			Duração			Frequência		
	Teste	Reteste 1	Reteste 2	Teste	Reteste 1	Reteste 2	Teste	Reteste 1	Reteste 2
AP SAL	44,4±1 3,6	38,8±6, 4	38,5±8, 7	125,4 ±16,1	120,5± 12,8	124±11 ,7	9,3±0, 93	10,6±0, 83	11,6±0, 77#
AE SAL	59,1±1 6,3	42±7,95	50,7±7, 9	136,2 ±14,5	169,2± 13,9	153,9± 16,3	9,1±0, 93	7,9±1,0 6	7,5±0,6 4*
ANOVA	Amb: F(1,28)=0,86, p=0,36 Rep: F(2, 56)=0,75, p=0,47 Rep vs Amb F (2,56)=0,21, p=0,81			Amb: F(1,28)=3,9, p=0,06 Rep: F(2, 56)=0,71, p=0,5 Rep vs Amb F (2,56)=1,28, p=0,3			Amb: F(1,28)=6,9, p=0,013* Rep: F(2, 56)=0,14, p=0,86 Rep vs Amb F (2,56)=3,48, p=0,04*		

* AE diferente do AP; # diferente do teste.

Tabela 4: ANOVA de medidas repetidas dos parâmetros de latência, frequência e duração de escalada registrados no teste, reteste 1 e reteste 2 dos grupos AP e AE tratados com Salina.

	Latência			Duração			Frequência		
	Teste	Reteste 1	Reteste 2	Teste	Reteste 1	Reteste 2	Teste	Reteste 1	Reteste 2
AP SAL	44,4±1 5	38,8±7, 2	38,5±8, 3	125,4 ±15,4	120,5± 13,4	124±14 ,2	9,3±0,9 3	10,6±0, 95	11,6±0, 71
AE SAL	59,1±1 5	42±7,2	50,7±8, 3	136,2 ±15,4	169,2± 13,4	153,9± 14,2	9,1±0,9 3	7,9±0,9 5	7,5±0,7 1
ANOVA A	Amb: F(1,28)=0,66, p=0,42 Rep: F(2, 56)=1,43, p=0,24 Rep vs Amb F (2,56)=1,53, p=0,22			Amb: F(1,28)=0,036, p=0,85 Rep: F(2, 56)=2,7, p=0,076 Rep vs Amb F (2,56)=2,1, p=0,13			Amb: F(1,28)=3,05, p=0,091 Rep: F(2, 56)=3,04, p=0,055 Rep vs Amb F (2,56)=1,13, p=0,27		

Tabela 5: ANOVA de medidas repetidas dos parâmetros de latência, frequência e duração de imobilidade registrados no teste, reteste 1 e reteste 2 dos grupos AP e AE tratados com SAL, IMI 2,5, IMI 5 ou FLX.

	Latência			Duração			Frequência		
	Teste	Reteste1	Reteste2	Teste	Reteste1	Reteste2	Teste	Reteste1	Reteste2
AP SAL	122,7±14,6	78,5±15,2	62,2±16,6#	76,2±8,5	108,3±10,9#	103,53±7,5#	7,4±0,7	9,5±0,85	11,2±0,7#
AP IMI 2,5	144,3±20	77,4±20,8#	66,3±22,7#	66±11,7	55,8±15*	71,78±10,3*	6,6±1	9,1±1,1	8,25±1
AP IMI 5	167,9±25,3	213,8±26,3*	132,6±28,7	72,2±14,8	46,76±19*	75,94±13*	3,8±1,2	3,6±1,4*	4,8±1,3*
AP FLX	146,3±23	166,5±24*	163,7±26,2*	77,8±13,5	53,43±17,3*	38,73±11,9##	6,5±1,1	5,5±1,3*	5,6±1,2*
AE SAL	122±14,8	136,6±18,5	130,3±19,7	64,28±12,2	52,1±11,2	68,45±9,7	6,7±0,8	5,46±0,8	5,4±0,72
AE IMI 2,5	166,7±17,3	138,1±21,6	148±23	55,8±14,2	75,69±13,1	44,49±11,3	5,5±0,96	6±1	4,8±0,84
AE IMI 5	173,2±16,5	177,2±20,7	202,2±22	65,4±13,6	50±12,6	30,52±10,8#	3,9±0,9	5,2±0,98	3±0,8
AE FLX	168±23,4	104,9±29,2	116,9±31	80±19,3	61,23±17,8	42,6±15,3#	5,3±1,3	7,3±1,4	7±1,1
ANOVA AP	Tto: F(3,30)=7,38, p=0,00076* Rep: F(2, 60)=4,41, p=0,016* Rep vs Tto F (6,60)=2,55, p=0,028*			Tto: F(3,30)=5,0, p=0,006* Rep: F(2, 60)=0,48 p=0,62 Rep vs Tto F (6,60)=3,054, p=0,011*			Tto: F(3,30)=9,29, p=0,0001* Rep: F(2, 60)=1,99, p=0,14 Rep vs Tto F (6,60)=1,8, p=0,16		
ANOVA AE	Trat: F(3, 40)=2,17, p=0,1 Rep: F(2, 80)=1,72, p=0,18 Rep vs Tto F (6,80)=2,02, p=0,07			Trat: F(3, 40)=0,3, p=0,81 Rep: F(2, 80)=5,5, p=0,006* Rep vs Tto F (6,80)=2,5, p=0,028*			Trat: F(3, 40)=1,66, p=0,18 Rep: F(2, 80)=1,72, p=0,18 Rep vs Tto F (6,80)=1,48, p=0,19		

Valores representam a média±E.P.M (n=6-15/grupo) dos parâmetros avaliados durante o teste, reteste 1 e reteste 2. APSAL= grupo salina, ambiente padrão, APIMI= grupo imipramina (dose de 2,5 ou 5 mg/Kg), ambiente padrão, APFLX= grupo fluoxetina, ambiente padrão, AESAL= grupo salina, ambiente enriquecido, AEIMI= grupo imipramina (dose de 2,5 ou 5 mg/Kg), ambiente enriquecido, AEFLX= grupo fluoxetina, ambiente enriquecido. Tto= fator “tratamento”, Rep: fator “repetição (*) diferente do respectivo grupo salina. (#) diferente do Teste.

Tabela 6: ANOVA de medidas repetidas dos parâmetros de latência, frequência e duração do comportamento de nadar no teste, reteste 1 e reteste 2 dos grupos AP e AE tratados com SAL, IMI 2,5, IMI 5 ou FLX.

	Latência			Duração			Frequência		
	Teste	Reteste1	Reteste2	Teste	Reteste 1	Reteste 2	Teste	Reteste1	Reteste2
AP Salina	44,4±1 2,4	38,8±7,3 6	38,5±12,6	125,4±1 3,2	120,5±13, 8	124±13,6	9,3±0,8	10,6±0,7	11,6±0,8
AP IMI 2,5	26,7±1 7	37,5±10	45,8±17,3	155,7±1 8,1	161,5±18, 9	151,5±18, 7	9,6±1,1	12±1	9,1±1
AP IMI 5	48,5±2 1,5	27,9±12, 7	70,9±21,9	128,6±2 2,9	140,3±23, 9	74,5±23,6	6±1,4*	7,8±1,2*	7,8±1,3*
AP FLX	62,2±1 9,7	51,6±11, 6	70,7±20	106,5±2 0,9	147,6±21, 8	134,4±21, 6	8,5±1,3	8,1±1,1	10,1±1,2
AE Salina	59,1±1 2	42±9,8	50,7±7,9	136,2±1 4,5	169,2±12, 8	153,9±15, 17	9,1±0,8	7,9±0,8	7,5±0,7
AE IMI 2,5	58±14	51,3±11, 4	46,9±9,2	148,3±1 7	125,7±15	168,2±17, 7	8±1	8,4±1	8±0,8
AE IMI 5	48,9±1 3,4	45,7±11	52,8±8,8	137,5±1 6,3	160±14,4	166,7±16, 9	6,7±0,9	8,4±1	6±0,8
AE FLX	41,4±1 9	7,1±15,5	10,7±12,5	118,8±2 3	159,3±20, 3#	187,5±24 #	7,3±1,3	12,1±1,4 *	13,1±1,1 *
ANOVA AP	Trat: F(3,30)=1,05, p=0,38 Rep: F(2, 60)=1,44, p=0,24 Rep vs Tto F (6,60)=0,56, p=0,75			Trat: F(3, 30)=1,73, p=0,18 Rep: F(2, 60)=1,64, p=0,20 Rep vs Tto F(6,60)=1,25, p=0,28			Tto: F(3, 30)=3,92, p=0,017* Rep: F(2, 60)=1,97, p=0,14 Rep vs Tto F(6,60)=1,19, p=0,32		
ANOVA AE	Trat: F(3, 40)=2,34, p=0,87 Rep: F(2, 80)=2,03, p=0,13 Trat vs Tto F (6,80)=0,48, p=0,8			Trat: F(3, 40)=0,63, p=0,97 Rep: F(2, 80)=7,80, p=0,0008* Rep vs Tto F (6,80)=2,32, p=0,04*			Trat: F(3, 40)=3,3, p=0,029* Rep: F(2, 80)=3,08, p=0,051 Rep vs Tto F (6,80)=3,9, p=0,001*		

Valores representam a média±E.P.M (n=6-15/grupo) dos parâmetros avaliados durante o teste, reteste 1 e reteste 2. APSAL= grupo salina, ambiente padrão, APIMI= grupo imipramina (dose de 2,5 ou 5 mg/Kg), ambiente padrão, APFLX= grupo fluoxetina, ambiente padrão, AESAL= grupo salina, ambiente enriquecido, AEIMI= grupo imipramina (dose de 2,5 ou 5 mg/Kg), ambiente enriquecido, AEFLX= grupo fluoxetina, ambiente enriquecido. Tto= fator “tratamento”, Rep: fator “repetição (*) diferente do respectivo grupo salina, (#) difetente do Teste.

Tabela 7: ANOVA de medidas repetidas dos parâmetros de latência, frequência e duração do comportamento de escalada no teste, reteste 1 e reteste 2 dos grupos AP e AE tratados com SAL, IMI 2,5, IMI 5 ou FLX.

	Latência			Duração			Frequência		
	Teste	Reteste1	Reteste2	Teste	Reteste1	Reteste2	Teste	Reteste1	Reteste2
AP SAL	9,8±5,2	5,7±14	3,2±1	97,2±10,7	69,7±11	75,3±13,5	4±0,35	4,8±0,5	5,6±0,5
AP IMI 2,5	22,9±7,1	7±1,9	6,3±1,4	75,7±14,7	81,4±15	83,8±18,5	3,6±0,5	4,6±0,7	4,2±0,7
AP IMI 5	2,6±9	4,7±2,5	2,8±1,7	97,9±18,6	112,3±19	151,5±23,4	3,6±0,6	5±0,88	5±0,94
AP FLX	4,2±8,2	3,2±2,3	1,2±1,6	115,8±17	96,2±17,4	127,2±21,4	3±0,5	4±0,8	6±0,85#
AE SAL	3,1±1,4	7,5±2,7	2,6±1,1	82,9±7,3	77,7±9,6	88±9,4	3,8±0,4	3,9±1,4	4,2±0,5
AE IMI 2,5	4,1±1,7	2,6±3,2	1,8±1,3	95,5±8,6	105,9±11,2	86,5±10,9	3,4±0,5	4,4±1,68	4,9±0,6
AE IMI 5	3,2±1,6	4,1±3	1,6±1,2	97,1±8,2	89,7±10,7	103,6±10,5	3,7±0,5	4±1,6	4,1±0,57
AE FLX	7,9±2,3	6,9±4,3	8,3±1,8	96,6±11,6	78,2±15,1	67,2±14,8	4±0,7	5,1±2,2	6,8±0,8*#
ANOVA AP	Trat: F(3, 30)=1,7, p=0,17 Rep: F(2, 60)=2,6, p=0,079 Rep vs Tto F (6,60)=1,09, p=0,37			Trat: F(3, 30)=2,5, p=0,077 Rep: F(2, 60)=2,33, p=0,105 Rep vs Tto F(6,60)=1,81, p=0,11			Tto: F(3, 30)=0,38, p=0,76 Rep: F(2, 60)=9,99, p=0,00018* Rep vs Tto F(6,60)=1,17, p=0,33		
ANOVA AE	Trat: F(3, 40)=1,76, p=0,17 Rep: F(2, 80)=0,59, p=0,55 Rep vs Tto F (6,80)=0,56, p=0,75			Trat: F(3, 40)=0,97, p=0,41 Rep: F(2, 80)=0,79, p=0,45 Rep vs Tto F (6,80)=1,7, p=0,12			Trat: F(3, 40)=1,82, p=0,15 Rep: F(2, 80)=5,17, p=0,008* Rep vs Tto F (6,80)=0,97, p=0,44		

Valores representam a média±E.P.M (n=6-15/grupo) dos parâmetros avaliados durante o teste, reteste 1 e reteste 2. APSAL= grupo salina, ambiente padrão, APIMI= grupo imipramina (dose de 2,5 ou 5 mg/Kg), ambiente padrão, APFLX= grupo fluoxetina, ambiente padrão, AESAL= grupo salina, ambiente enriquecido, AEIMI= grupo imipramina (dose de 2,5 ou 5 mg/Kg), ambiente enriquecido, AEFLX= grupo fluoxetina, ambiente enriquecido. Tto= fator “tratamento”, Rep: fator “repetição (*) diferente do respectivo grupo salina, (#) difetente do Teste.

Observação: Apesar de não haver efeito significativo da interação entre os fatores (Rep VS Tto) para o comportamento de escalar nos animais do AE, a análise de Duncan foi feita também para o fator tratamento.