



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Nathalia Zerbinatti Ferreira

**Investigação de possíveis fontes de variabilidade do teste do nado forçado em
camundongos Suíços**

Florianópolis
2019

Nathalia Zerbinatti Ferreira

Investigação de possíveis fontes de variabilidade do teste do nado forçado em camundongos Suíços

Dissertação/Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em farmacologia.

Orientadora: Profa. Cilene Lino de Oliveira, Dra.

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira, Nathalia Zerbinatti

Investigação de possíveis fontes de variabilidade do teste do nado forçado em camundongos Suiços / Nathalia Zerbinatti Ferreira ; orientadora, Cilene Lino de Oliveira, 2019.

73 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Teste do nado forçado. 3. Variabilidade. 4. Revisão sistemática. 5. Divisão intra espécie. I. Lino de Oliveira, Cilene. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Nathalia Zerbinatti Ferreira

Investigação de possíveis fontes de variabilidade no teste do nado forçado em camundongos Suíços

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Cilene Lino de Oliveira, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Thereza Christina Monteiro de Lima, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Ana Lúcia Severo Rodrigues, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em farmacologia.

Prof. Rui Daniel Schroder Prediger, Dr.
Coordenador do Programa

Profa. Cilene Lino de Oliveira, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2019

Dedico esse trabalho a todos que estiveram do meu lado, em especial à minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, sem Ele nada disso seria possível.

Agradeço aos meus pais, Débora e Roberson, que mesmo nos momentos mais difíceis me ajudaram e sei que vão continuar ajudando e dando forças para que todos os meus sonhos se tornem realidade. Vocês são os melhores pais de todos e espero um dia ser pelo menos um pouquinho do que vocês são, vocês são demais e eu amo vocês!

Agradeço também a todo o resto da minha família que sempre ficou do meu lado. Aos melhores irmãos que eu poderia ter, Caio e Bárbara, aos melhores tios, Daniela, Junior e Alessandro, e aos meus avós, Dante, Ana, Gerônimo e Maria Helena, amo vocês!

À minha orientadora, Profa. Dra. Cilene, que me acolheu no seu laboratório e vem me ensinando o que é ser uma pesquisadora. Sou grata pela confiança depositada em mim durante esses anos e pelo exemplo de profissionalismo no qual sempre me espelharei.

Agradeço a toda equipe do laboratório, por sempre deixar o nosso ambiente amigável e alegre. É com grande honra que digo que fiz parte dessa equipe. Karol, Patrick, Tamires, Marcus e Fabi, sem vocês não teria conseguido quase nada, vocês são demais.

À banca de avaliação, Profa. Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues e Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro Lima, e aos suplentes Dra. Ana Belen Ramos Hryb e Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez, por terem aceitado o convite de avaliação e terem contribuído.

Agradeço a todos os amigos de Floripa, em especial Caibe, Bruna, Bárbara e Jonathan, vocês deixaram minha vida longe de casa ser muito mais fácil do que eu esperava.

Às minhas melhores amigas da vida, Nicole e Miriã, que vem ficando do meu lado desde quando éramos *babys* até agora, sempre me estendendo a mão em momentos de necessidade. Vocês são as melhores amigas que qualquer pessoa poderia querer, amo vocês.

Agradeço ao João que desde a graduação vem me aguentando, o que não é fácil, sempre estando do meu lado e sendo meu melhor amigo. Você consegue me deixar feliz mesmo quando nada parece que vai dar certo, obrigada por ter entrado na minha vida e estar a cada dia me conquistando um pouquinho mais, amo você. À Camila que mesmo com poucos meses já me fez aprender mais sobre a vida do que qualquer outra pessoa. Você entrou na minha vida para me melhorar, não me imagino mais sem você. Te amo, meu amorzinho!

Por fim gostaria de agradecer aos professores da Universidade Federal de Santa Catarina, cujos ensinamentos contribuíram para a minha formação. À UFSC, ao CNPq, à CAPES e todas as agências de financiamentos envolvidas, obrigada.

“If you can dream it, you can do it”

Walt Disney

RESUMO

O teste do nado forçado (TNF) é um dos testes mais utilizados como preditor da atividade antidepressiva de substâncias em humanos. As expectativas, geradas por experiência anterior de nosso laboratório e pela literatura, indicam que o tratamento com antidepressivos reduz o tempo de imobilidade dos animais no TNF. Contudo, recentemente, nosso laboratório falhou em reproduzir os dados esperados em camundongos Suíços machos tratados com antidepressivos monoaminérgicos. Para entender essa ocorrência, procuramos avaliar possíveis fontes de variabilidade do TNF em camundongos Suíços. Então realizamos uma revisão sistemática da literatura, uma análise comportamental do TNF em diferentes fases do ciclo claro/escuro, uma comparação entre camundongos Suíços machos e fêmeas no TNF e no teste de suspensão pela cauda, além de tentarmos utilizar o teste de hipofagia induzida pela novidade (HIN) e o de alimentação suprimida pela novidade (ASN) como preditores da imobilidade no TNF, para assim podermos dividir nossos animais em subgrupos de alta e baixa imobilidade. Na revisão sistemática foi possível verificar que provavelmente existe um viés de publicação devido a pequena quantidade de artigos com resultados negativos encontrados. Nos experimentos comportamentais foi observado que nem a fase do ciclo em que o TNF é realizado e nem o sexo do animal interferem no resultado desse teste. Além disso, foi visto que o HIN não é um bom teste preditor do TNF e que o ASN é um bom teste preditor para machos, porém não para fêmeas. Também foi visto que quando os camundongos Suíços machos são divididos em subgrupos de alta e baixa imobilidade pela mediana do resultado encontrado no ASN feito antes do TNF, o grupo de alta imobilidade é responsivo a fluoxetina, enquanto o de baixa imobilidade não é. Esse resultado nos indicou que o que provavelmente estava mascarando nossos resultados era a divisão intraespécie que existe em camundongos Suíços. Na análise de neurogênese hipocampal dos diferentes subgrupos intraespécie foi possível notar que provavelmente existe relação entre a responsividade dos subgrupos e essa neurogênese, visto que o grupo de alta imobilidade (mais responsivo) é o que apresentava maior neurogênese. Portanto, o ASN como teste preditor do TNF é confiável para detecção de antidepressivos monoaminérgicos em camundongos Suíços machos e, provavelmente, as diferentes responsabilidades encontradas nesse protocolo estão intimamente ligadas com a neurogênese hipocampal. Porém, a aplicação desse modelo comportamental em fêmeas não é recomendada, pois a divisão em subgrupos não está bem estabelecida.

Palavras-chave: Revisão sistemática. Responsividade. Variabilidade. Divisão intraespécie.

ABSTRACT

Forced swimming test (FST) is largely used as a predictor of antidepressant activity of substances in humans. Expectations, generated by previous laboratory experience and literature, indicate that treatment with antidepressants reduces the time of immobility in FST. However, recently, our laboratory failed to replicate the data obtained in male Swiss mice treated with monoaminergic antidepressants. In order to understand this occurrence, we evaluate possible sources of FST variability in Swiss mice. We performed a systematic review of the literature, a behavioral analysis of FST in different phases of the light / dark cycle, a comparison between male and female Swiss mice in the FST and the tail suspension test, and attempted to use novelty induced hypophagia (NIH) and novelty suppressed feeding (NSF) as predictors of immobility in the FST, thus we could divide our animals into subgroups of high and low immobility. In the systematic review, it was possible to see that there is probably a publication bias due to the small amount of articles with negative results. In the behavioral experiments it was observed that neither the phase of the cycle nor the sex of the animal interferes with the result of FST. In addition, NIH is not a good predictor of FST whereas NSF is a good predictor for males, but not for females. It has also been seen that when Swiss male mice are divided into subgroups of high and low immobility by the median of the result found in NSF done before FST, the high immobility group is responsive to fluoxetine while the low immobility group is not. This result revealed that the intraspecies division was probably masking our results. In the analysis of hippocampal neurogenesis of the different intraspecies subgroups it was possible to note that there is probably a relationship between subgroup responsiveness and neurogenesis, because the group of high immobility is the one with the greatest neurogenesis. Therefore, NSF as a predictive test of FST is reliable for the detection of monoaminergic antidepressants in male Swiss mice and probably the different responsivenesses found in this protocol are closely linked to hippocampal neurogenesis. However, the application of this behavioral model in females is not recommended, because the subgrouping is not yet well established.

Keywords: Systematic review. Responsiveness. Variability. Intraspecies division.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografias de secreção vaginal não corada de camundongos em (a) pró-estro, consistindo predominantemente de células epiteliais nucleadas; (b) estro, com células cornificadas anucleadas; (c) metaestro, constituído pelos três tipos de células, leucócitos, células epiteliais cornificadas e nucleadas; e (d) diestro, consistindo predominantemente de leucócitos. Células epiteliais nucleadas (N), leucócitos (L), célula cornificada (C).....	28
Figura 2 - Duração da A) imobilidade, B) nado e C) escalada dos camundongos Suíços machos administrados com 20mg/kg de FLX, e do grupo controle nos 4 min finais.....	38
Figura 3 - Duração da A) imobilidade e da B) mobilidade dos camundongos Suíços machos e fêmeas administrados com 20mg/kg e do grupo controle no teste de suspensão pela cauda (TSC) nos 4 min finais.....	39
Figura 4 - Duração da A) imobilidade, B) nado e C) escalada dos camundongos Suíços machos e fêmeas administrados com 20mg/kg de FLX, e do grupo controle no teste do nado forçado (TNF) nos 4 min finais.....	40
Figura 5 - Duração da imobilidade dos animais administrados com 20mg/kg e do grupo controle no A) teste do nado forçado (TNF) e no B) teste de suspensão pela cauda (TSC) nos 4 min finais.....	40
Figura 6 - Latência para camundongos Suíços machos e fêmeas comerem no teste de hipofagia induzida pela novidade (HIN).....	41
Figura 7 - Correlação entre a imobilidade no teste do nado forçado (TNF) e o tempo para comer no teste de hipofagia induzida pela novidade (HIN) em camundongos Suíços A) fêmeas e B) machos	41
Figura 8 - Latência para comer no teste de alimentação suprimida pela novidade (ASN).....	42
Figura 9 - Correlação entre a imobilidade no teste do nado forçado (TNF) e o tempo para comer no teste de alimentação induzida pela novidade (ASN) em A) fêmeas no experimento realizado em dezembro de 2017, B) fêmeas no experimento realizado em março de 2018, C) todos as fêmeas, D) machos no experimento realizado em dezembro de 2017, E) machos no experimento realizado em março de 2018 e F) todas os machos.....	42

Figura 10 - Duração da imobilidade minuto à minuto em machos do grupo controle de alta (linha rosa, n=11) e baixa (linha azul, n=8) imobilidade no teste do nado forçado (TNF).....	44
Figura 11 - Duração da imobilidade minuto à minuto em fêmeas do grupo controle de alta (linha rosa, n=11) e baixa (linha azul, n=8) imobilidade no teste do nado forçado (TNF).....	45
Figura 12 - Duração da imobilidade dos animais administrados com 20mg/kg e 30 mg/kg de fluoxetina e do grupo controle no TNF em machos A) de alta imobilidade e B) de baixa imobilidade.....	46
Figura 13: Duração da imobilidade dos animais administrados com 20mg/kg e 30 mg/kg de fluoxetina e do grupo controle no TNF em fêmeas A) de alta imobilidade e B) de baixa imobilidade.....	46
Figura 14 - Imunohistoquímica para doublecortina (DXC) no hipocampo de camundongos Suíços A) machos de alta imobilidade, B) baixa imobilidade, C) fêmeas de alta imobilidade e D) baixa imobilidade.....	47
Figura 15 - Imunohistoquímica para doublecortina (DCX) no hipocampo de camundongos Suíços fêmeas de alta imobilidade. A, B, C, D, E e F representam animais diferentes.....	71
Figura 16 - Imunohistoquímica para doublecortina (DCX) no hipocampo de camundongos Suíços fêmeas de baixa imobilidade. A, B, C, D, E e F representam animais diferentes.....	72
Figura 17 - Imunohistoquímica para double cortina (DCX) no hipocampo de camundongos Suíços machos de alta imobilidade. A, B, C, D, E e F representam animais diferentes.....	73
Figura 18 - : Imunohistoquímica para doublecortina (DCX) no hipocampo de camundongos Suíços machos de baixa imobilidade. A, B, C, D, E e F representam animais diferentes.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Total de publicações encontradas no Pubmed em 02/08/2017 utilizando as palavras chave escolhidas para a revisão sistemática.....	34
Tabela 2 - Dados extraídos dos artigos que passaram pelos critérios de inclusão e exclusão na busca de publicações encontradas no Pubmed em 02/08/2017 utilizando as palavras chave escolhidas para a revisão sistemática.....	35
Tabela 3 - Frequências, latências e durações de todos os comportamentos do teste do nado forçado (TNF) dos animais controle nos 4 min finais.....	44
Tabela 4 - Análise qualitativa da imunohistoquímica para DCX.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt: Proteína quinase B

ANOVA: Análise de variância

ASN: Alimentação suprimida pela novidade

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CTR: Controle

DCX: Doublecortina

EPM: Erro padrão da média

F: Fêmeas

FLX: Fluoxetina

GABA: Ácido gama-aminobutírico

HIN: Hipofagia induzida pela novidade

IgG: Imunoglobulina G

M: Machos

TNF: Teste do nado forçado

TSC: Teste de suspensão pela cauda

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	NEUROPSICOFARMACOLOGIA BÁSICA DOS ANTIDEPRESSIVOS	15
1.2	MODELOS ANIMAIS EM NEUROPSICOFARMACOLOGIA E O TESTE DO NADO FORÇADO.....	16
1.3	FONTES DE VARIABILIDADE EM TESTES DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA.....	18
1.4	VARIABILIDADE INDIVIDUAL E DIVISÃO EM SUBGRUPOS.....	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	REVISÃO SISTEMÁTICA NO PUBMED	24
3.1.1	Palavras chave.....	24
3.1.2	Critérios de inclusão	24
3.1.3	Critérios de exclusão.....	24
3.1.4	Etapas de aplicação dos critérios de inclusão e exclusão	24
3.1.5	Análise dos resultados	24
3.2	ANIMAIS, CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E TRATAMENTO.....	25
3.3	DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL	25
3.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	26
3.4.1	Procedimentos gerais.....	26
3.4.2	Experimento 1 - Efeito da fluoxetina na resposta de camundongos Suíços machos, alojados sob diferentes tipos de ciclo claro/escuro, no teste do nado forçado....	27
3.4.3	Experimento 2 - Efeito da Fluoxetina na resposta de camundongos Suíços machos e fêmeas ao TNF e TSC	28

3.4.4	Experimento 3 – Possíveis testes preditivos do comportamento de camundongos Suíços machos e fêmeas no TNF	29
3.4.5	Experimento 4 – O ASN como teste preditivo para o comportamento de camundongos Suíços machos e fêmeas no TNF	29
3.5	IMUNOHISTOQUÍMICA	30
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4	RESULTADOS	32
4.1	REVISÃO SISTEMÁTICA NO PUBMED	32
4.2	EXPERIMENTO 1 - EFEITO DA FLUOXETINA NA RESPOSTA DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS, ALOJADOS SOB DIFERENTES TIPOS DE CICLO CLARO/ESCURO, NO TESTE DO NADO FORÇADO.....	36
4.3	EXPERIMENTO 2 - EFEITO DA FLUOXETINA NA RESPOSTA DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS E FÊMEAS AO TNF E TSC	36
4.4	EXPERIMENTO 3 - POSSÍVEIS TESTES PREDITIVOS DO COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS E FÊMEAS NO TNF: ..	39
4.5	EXPERIMENTO 4 - O ASN COMO TESTE PREDITIVO PARA O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS E FÊMEAS NO TNF ..	41
5	DISCUSSÃO	46
5.1	REVISÃO SISTEMÁTICA NO PUBMED	46
5.2	EFEITO DA FLUOXETINA NA RESPOSTA DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS, ALOJADOS SOB DIFERENTES TIPOS DE CICLO CLARO/ESCURO, NO TESTE DO NADO FORÇADO.....	47
5.3	EFEITO DA FLUOXETINA NA RESPOSTA DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS E FÊMEAS AO TNF E TSC	48
5.4	POSSÍVEIS TESTES PREDITIVOS DO COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS E FÊMEAS NO TNF.....	49
5.5	O ASN COMO TESTE PREDITIVO PARA O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS E FÊMEAS NO TNF.....	50
6	CONCLUSÕES	53

6.1	CONCLUSÃO GERAL.....	53
6.2	RESUMO DOS RESULTADOS.....	53
7	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 NEUROPSICOFARMACOLOGIA BÁSICA DOS ANTIDEPRESSIVOS

O transtorno depressivo maior é um transtorno psiquiátrico muito comum, caracterizado principalmente por anedonia persistente, falta de motivação, ansiedade e tristeza. Além disso, esse transtorno vem sendo apontado como uma das principais causas de problemas econômicos e de saúde em todo o mundo, o que torna essencial a necessidade de desenvolver novas terapias eficazes e seguras (Belzung, 2014; Levinstein e Samuels, 2014; Belzung et al., 2015; Willner e Belzung, 2015).

O tratamento de primeira linha do transtorno depressivo maior é a farmacoterapia com antidepressivos, sendo que atualmente os fármacos mais utilizados tendem a aumentar a função monoaminérgica e, em consequência, a disponibilidade de serotonina e/ou noradrenalina na fenda sináptica (Belzung, 2014). No entanto, apenas um terço dos pacientes alcança a remissão completa após a primeira terapia com antidepressivos e o início de seus efeitos é lento (aproximadamente 4-6 semanas) (Willner e Belzung, 2015). Os fármacos recém-introduzidos na clínica, salvo poucas exceções, têm sido apenas variações dos medicamentos já existentes, ou seja, não houve progresso substancial na identificação de novos alvos para melhorar esses parâmetros clínicos (Belzung, 2014; Willner e Belzung, 2015).

A melhora na compreensão da psicofisiopatologia do transtorno depressivo maior nos últimos anos (Willner et al. 2013; Belzung et al. 2015) faz com que a resistência aos fármacos utilizados possa ser melhor explicada, seja por fatores inespecíficos ou relacionados a patologia (Mrazek et al., 2011; Singh et al., 2012). Como a depressão é um transtorno multifatorial complexa, ela não está associada somente a falha no sistema monoaminérgico mas também em alterações em outros sistemas de neurotransmissores (GABA, glutamato, peptídeos e canabinóides), vias de sinalização (BDNF, vias de sinalização intracelular mediadas por proteínas quinase e Akt), hormônios (eixo hipotálamo-hipófise-adrenal), plasticidade neural (neurogênese hipocampal, sinaptogênese hipocampal e cortical), epigenética (acetilação e metilação de histonas) e função glial (déficit de astrócitos) (Krishnan e Nestler, 2008; Tanti e Belzung, 2010; Willner et al., 2012). Assim, como a maioria das alterações encontradas na depressão não podem ser revertidas pelo aumento de monoaminas, o desenvolvimento de novos fármacos focados em outros alvos terapêuticos pode ser um caminho para novos antidepressivos.

A pesquisa básica explora as possibilidades de novos alvos terapêuticos. Nesses estudos, a utilização de modelos animais vem se mostrando útil para o estudo da depressão (Willner et al. 2013), porém muitos compostos com resultados promissores na pesquisa básica se mostraram ineficazes na clínica (Willner e Belzung, 2015). Além disso, há o fato que resultados repetidamente descritos na literatura podem não ser totalmente reproduzíveis (Suman et al., 2017; Kara et al. 2018; Ramos-Hryb et al. 2018). Tudo isso aumenta a sensação de frustração decorrente do fracasso de se ampliar o alcance do tratamento daquela população que apresenta pouca ou nenhuma melhora clínica com os tratamentos tradicionais. Então ficam as questões: será que os modelos animais utilizados são realmente adequados para prever efeitos clínicos? O que pode estar ocorrendo com os animais para que apareça essa disparidade de efeitos tanto na clínica quanto na própria pesquisa básica?

1.2 MODELOS ANIMAIS EM NEUROPSICOFARMACOLOGIA E O TESTE DO NADO FORÇADO

Na área de psicofarmacologia, modelos animais podem ser definidos como procedimentos utilizados em animais de laboratórios que geram mudanças comportamentais que tentam corresponder a aspectos de transtornos psiquiátricos (Willner e Belzung, 2015). Esses modelos podem ser utilizados para ajudar na compreensão da neurobiologia e fisiopatologia de algumas doenças, além de serem amplamente utilizados para avaliar o potencial terapêutico de algumas moléculas. Um bom modelo animal deve ter pelo menos algum dos três tipos de validade: constructo/homologia, face/analogia e preditiva/farmacológica (Willner, 1997; Nestler e Hylman, 2010).

A validade de constructo/homologia é contemplada pelos modelos que recriam nos animais os processos etiológicos causadores da doença em humanos. A validade de face/analogia é dada pela capacidade do modelo de mimetizar as características anatômicas, bioquímicas, neuropatológicas ou comportamentais de uma patologia humana. A validade preditiva/farmacológica é atribuída aos modelos nos quais existe correspondência entre a resposta ao tratamento no animal e na clínica (Willner, 1984; Nestler e Hylman, 2010).

A criação de modelos válidos de psicopatologias é muito difícil, visto que as etiologias dos transtornos são muitas vezes desconhecidas e muitos sintomas utilizados em diagnósticos psiquiátricos em humanos são subjetivos, como: delírios, tristeza, culpa e alucinações. Além disso, quando existem correspondências razoáveis de alguns sintomas entre animais e humanos, ela é apenas aproximada (Willner, 1984; Krishnan e Nestler, 2008; Nestler e

Hylman, 2010). Dentre estes sintomas podemos citar o comportamento social anormal, a anedonia e a falta de memória.

No caso específico da depressão do humor, os modelos animais, principalmente os utilizados para avaliar atividade antidepressiva, começaram a ser popularizados na década de 70 (Porsolt et al., 1977, 1978, 1979; Schechter e Chance, 1979). Porém, até os dias de hoje, a reprodução da totalidade do distúrbio é um grande desafio, pois mesmo sabendo mais a respeito dos processos neurais envolvidos na patologia, sua etiologia e sintomatologia são muito variáveis, sendo ainda objetos de intensa pesquisa e especulação. Devido a essa dificuldade, a maioria dos modelos animais possui boa validade preditiva, porém baixas validades de face e constructo, como é o caso do modelo de “desespero comportamental” (Krishnan e Nestler, 2008).

O modelo de “desespero comportamental” é baseado no fato de que animais terão seu comportamento inibido quando expostos a um estresse de caráter incontrollável e inescapável, que, geralmente, está relacionado com o tempo de imobilidade dos animais. Tomando como base esse modelo, alguns testes preditivos de atividade farmacológica de antidepressivos foram criados, como é o caso do teste do nado forçado (TNF) e do teste de suspensão pela cauda (TSC) (Porsolt et al., 1977; Cryan et al., 2002; Nestler et al., 2002). Esses procedimentos são melhores classificados como “testes de atividade farmacológica” do que como modelos de depressão propriamente ditos, pois possuem a limitação de recapitular uma síndrome multidimensional de longa duração, como a depressão (Krishnan e Nestler, 2008).

O TNF, originalmente proposto por Porsolt em 1977, consiste na exposição de um animal (rato ou camundongo) a um pequeno cilindro com água suficiente para impedir o apoio das patas e da cauda no fundo e que impeça a fuga pela borda superior, ou seja, uma situação supostamente aversiva e inescapável. Esse teste em ratos é composto por duas sessões de nado forçado separadas por um intervalo de 24h (pré-teste e teste). O pré-teste é de 15 min e funciona como primeiro contato com o estressor, já o teste é de 5 min e nele é mensurado o tempo que o animal fica imóvel, o que indica aquisição do “desespero comportamental”. A aquisição do “desespero comportamental” aumenta o tempo de imobilidade no teste em relação ao pré-teste, o que permite a visualização da redução desse comportamento quando administrados antidepressivos antes do teste (Porsolt et al., 1977a, 1977b, 1978, 1979).

A administração de antidepressivos para camundongos antes do TNF também reduz seu tempo de imobilidade, porém devido a algumas diferenças entre ratos e camundongos, o

protocolo foi alterado para se adequar melhor a essa espécie. Em camundongos esse teste não requer o pré-teste e tem 6 min de duração. Porém, devido à baixa imobilidade nos 2 min iniciais apenas os 4 min finais são mais comumente analisados (Porsolt et al., 1977b). Mesmo sendo um teste muito utilizado para fazer triagens de substâncias com potencial antidepressivo, o TNF não tem validade preditiva perfeita. Pode ser observado que a maioria dos estudos apenas alcançou efeitos positivos quando foram utilizadas doses equivalentes (cálculo baseado no metabolismo de cada animal) maiores que as clinicamente recomendadas para humanos (López-Rubalcava e Lucki, 2000; Kilic et al., 2012), além de existir um descompasso entre a necessidade de tratamento crônico na clínica e o efeito agudo dos fármacos (Porsolt et al., 1977a; Gao e Cutler, 1994).

Então, para melhorar a validade preditiva do TNF, algumas alterações foram propostas a fim de torná-lo mais eficaz e sensível sem que perdesse sua praticidade (Detke et al., 1997; Cryan et al., 2005; Lino-de-Oliveira et al., 2005; Vieira et al., 2008; Mezdri et al., 2011; Costa et al., 2013). Porém, mesmo com as modificações, ainda podemos observar que muitas vezes o resultado esperado não é encontrado (Suman et al., 2017), o que pode estar relacionado com pequenas divergências de protocolos. Já foi verificado, por exemplo, que a idade do animal (Bourin, et al., 1998), a linhagem (Dulawa et al., 2004) e o número de administrações da substância a ser testada (Bourin et al., 1992) podem modificar certos resultados. Além disso, fatores externos aos experimentos, como: clima, tempo, sexo e humor do experimentador, podem trazer variabilidade aos testes comportamentais contribuindo para a falha da validade preditiva de procedimentos como o TNF (Einat et al., 2018).

1.3 FONTES DE VARIABILIDADE EM TESTES DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA

Um dos maiores problemas da ciência básica atualmente seria a “crise de reprodutibilidade”, sendo mais de 50% dos trabalhos pré-clínicos publicados irreproduzíveis (Freedman et al., 2015). Esse fator atinge também os modelos e testes comportamentais utilizados na psicofarmacologia, o que torna a sua reprodutibilidade incerta. Porém, sabe-se que muitas vezes a reprodutibilidade está conectada a variabilidade metodológica (Kafkafi et al., 2016). A reprodutibilidade está intimamente ligada com a validade externa ou generalização de um experimento, ou seja, até que ponto os resultados podem ser generalizados quando alguns fatores nos experimentos são alterados. A validade externa pode ser avaliada utilizando, por exemplo, técnicas de revisões sistemáticas e meta-análises de

dados da literatura, ou mesmo por replicações sistemáticas em que aspectos metodológicos do experimento são manipulados de maneira controlada (Kara et al., 2018).

As variações metodológicas podem gerar variabilidade nos dados experimentais obtidos e, por consequência, estarem relacionados com a reprodutibilidade de modelos e testes de neuropsicofarmacologia que já estão muito bem estabelecidos. Essas mudanças podem ser as responsáveis pelos resultados negativos encontrados em diversos experimentos comportamentais como no caso da não reprodutibilidade do TNF encontrada pelo nosso laboratório (Suman et al., 2017).

Uma possível fonte de variabilidade individual em experimentos com animais é o estado hormonal, principalmente dos hormônios cíclicos. O exemplo mais estudado é o do ciclo estral nas fêmeas, no qual os níveis de estrogênio e progesterona são significativamente diferentes ao longo do ciclo, e já se sabe que, em alguns casos, esses hormônios podem influenciar o comportamento (Milad et al., 2009). Outro exemplo do que vem sendo estudado, porém em menor escala, é a corticosterona, que tem um padrão de secreção circadiana, o que faz com que animais testados em diferentes horários tenham respostas distintas, principalmente em diferentes fases do ciclo claro/escuro (Verma et al., 2009). Como a produção hormonal depende do estágio de desenvolvimento do organismo, animais de diferentes idades podem ter respostas diferentes em testes comportamentais (Bourin et al., 1998). Portanto a questão hormonal deve ser levada em conta durante um experimento.

Outro fator importante que foi ignorado por muitos anos, mas que recentemente vem recebendo mais atenção, seria a questão das diferenças sexuais (Bale, 2019). Em diversos estudos foi visto uma grande diferença entre os resultados obtidos de machos e fêmeas, como por exemplo: as fêmeas apresentam menos comportamento de *freezing* e não manifestam o desamparo aprendido (Dalla et al., 2008; Franceschelli et al., 2014; Bale e Epperson, 2017). Sendo assim, se faz necessário o entendimento do comportamento das fêmeas nos modelos e testes animais utilizados em larga escala por laboratórios de pesquisa em psicofarmacologia.

Uma direção adicional que merece maior atenção é a diferença entre animais da mesma linhagem, mas de diferentes colônias, fornecedores ou mesmo gerações. Essas diferenças já foram demonstradas na literatura (Jama et al., 2008; Shishkina et al., 2010; Pitychoutis et al., 2011; Khemissi et al., 2014) e são geralmente atribuídas à diferença na origem da linhagem ou a outras mudanças genéticas ao longo das gerações. Porém, diferenças fenotípicas podem ocorrer também entre camundongos da mesma linhagem, que podem derivar de fatores epigenéticos (Einat et al., 2018).

Além das fontes de variabilidade mencionadas acima, já foi visto que fatores como a forma de administração, período de administração da droga estudada e, até mesmo, o sexo do experimentador podem influenciar de alguma maneira os resultados de modelos e testes de neuropsicofarmacologia (Einat et al., 2018). Um estudo recente do nosso laboratório falhou em reproduzir resultados muito descritos na literatura (Suman et al., 2018). Neste trabalho (Suman et al., 2018), experimentadores do sexo masculino e feminino testaram o efeito de várias doses de vários antidepressivos sobre o comportamento de camundongos Suíços no TNF e não encontraram as grandes diferenças significativas com o controle que foram encontradas em outros trabalhos (Bourin et al., 2005; Costa et al., 2013).

Os dados de Suman et al. (2018) foram discrepantes mesmo quando comparados a estudos anteriores do mesmo grupo de pesquisa (Costa et al. 2013). Sabendo disso, nossa primeira hipótese era que provavelmente alguma mudança metodológica (fase do ciclo claro/escuro ou sexo do animal) estaria relacionada com a dificuldade de reprodutibilidade do TNF em camundongos Suíços nos estudos de Suman et al (2018). Além disso, pensamos também que o TNF poderia não ser o teste ideal para avaliar efeitos antidepressivos em camundongos Suíços nas atuais condições experimentais do nosso laboratório.

1.4 VARIABILIDADE INDIVIDUAL E DIVISÃO EM SUBGRUPOS

Atualmente constata-se que, mesmo quando as mais diversas variáveis são controladas (sexo, idade, peso, alojamento, linhagem), os animais experimentais apresentam grande variabilidade comportamental entre si (Einat et al., 2018). A variabilidade individual faz com que animais de um mesmo grupo experimental respondam de forma distinta quando expostos ao mesmo teste comportamental, o que pode acabar mascarando o resultado experimental esperado (Einat et al., 2018).

Um bom exemplo disso é a variabilidade no desempenho de camundongos Suíços no TNF encontradas em um mesmo laboratório em um curto período de tempo (Costa et al., 2013 versus Suman et al., 2018). Nos estudos de Costa et al. (2013) e de Suman et al. (2018), realizados com camundongos Suíços da mesma procedência, foram relatados valores de média de tempo de imobilidade próximos nos grupos controle (aproximadamente 220s em Costa et. al. (2013) e 190s em Suman et al. (2018)), porém, nos grupos tratados com antidepressivos os valores da média de imobilidade diferiram radicalmente. No caso da fluoxetina 30 mg/kg, por exemplo, a média do tempo de imobilidade foi aproximadamente 150s em Costa et al. (2013) e em Suman et al. (2018) foi aproximadamente 235s. Essas

grandes diferenças, mesmo em experimentos realizados por um mesmo grupo de pesquisa, lançam dúvidas sobre a validade externa do TNF e nos ajuda a observar que é possível que a variabilidade individual possa estar mascarando os resultados do TNF.

Para minimizar os efeitos da variabilidade individual sobre uma dada variável, alguns procedimentos vêm sendo utilizados, como: padronizações, aumento do número de animais por grupo e estudos de meta-análise (Lewejohann et al., 2011; Kara et al., 2018). Porém, ao invés de tentar controlar a heterogeneidade dos animais, talvez fosse interessante considerá-la nos desenhos experimentais. Essa variabilidade poderia ser aproveitada para nos fornecer resultados mais preditivos da resposta em humanos, já que as pessoas também apresentam grande heterogeneidade comportamental e de resposta à drogas. Além disso podemos utilizar essa variação para obter melhores teorias da biologia responsável pelas diferentes respostas (Einat et al., 2018).

Mesmo sabendo que os animais apresentam grande variabilidade em suas respostas a diferentes estímulos, ainda não se sabe o quão constante é essa variabilidade (Einat et al., 2018). Pode-se usar um critério *post hoc* para diminuir a heterogeneidade dentro do grupo? Pode-se prever o comportamento em um teste baseado no comportamento em outra situação? Pode-se esperar alguma relação entre variáveis comportamentais, fisiológicas ou bioquímicas na resposta individual? Alguns dados sugerem que, pelo menos para vários estudos e variáveis, a resposta para todas essas perguntas é sim. Atualmente uma abordagem utilizada para o estudo da variabilidade individual é a seleção e criação de subgrupos com base em alguma resposta específica (Einat et al., 2018), como é o caso da divisão *post hoc* de grupos muito heterogêneos (Enriquez-Castillo, 2008; Suman et al., 2018) ou mesmo na divisão de animais em subgrupos mais ou menos responsivos a determinados testes utilizando correlações (Jama et al., 2008).

No estudo de Suman et al. (2018), por exemplo, foi visto que camundongos Suíços submetidos ao TNF podem ter respostas que se assemelham com duas distribuições normais sobrepostas, o que permitiu separar os animais em subgrupos de alta e baixa imobilidade após a realização do TNF. O efeito dos antidepressivos aparecia em um subgrupo de camundongos e estava ausente no outro (Suman et al., 2018). Os resultados obtidos nesses experimentos mostraram que o resultado baseado na média de todos os animais da amostra poderia estar mascarado pela peculiaridade dos subgrupos (Enriquez-Castillo, 2008; Suman et al., 2018).

Esse tipo de análise *post hoc* pode indicar a existência de subgrupos de animais. Porém, pode ser questionado por se basear em critérios arbitrários e estabelecidos após a

obtenção dos dados. Além disso, a divisão dos subgrupos foi feita utilizando um parâmetro calculado com dados de todos os animais experimentais (mediana), o que não considera a contribuição da individualidade e desconsidera o efeito do tratamento previamente feito em cada animal. Por exemplo, um grupo controle e um tratado com um antidepressivo hipotético seriam divididos em alta e baixa imobilidade após terem sido submetidos ao TNF, porém sabemos que o esperado é que o antidepressivo diminua a imobilidade, então provavelmente teremos mais animais de baixa imobilidade pertencentes ao grupo experimental tratado do que ao grupo controle. Isso provavelmente geraria um desbalanço entre o número dos animais experimentais de cada grupo e poderia estar mascarando os resultados de outra maneira, já que misturamos a variabilidade individual com o tratamento. Mas então o que poderia ser feito para gerar subgrupos mais confiáveis?

Um dos modos para tirar esse viés seria encontrar um critério de divisão de subgrupos que pudesse ser aplicado *a priori*. Assim, alguma correlação entre variáveis comportamentais, fisiológicas ou bioquímicas poderia contribuir para prever o desempenho do animal no teste de interesse. Essa abordagem já vem sendo estudada por alguns grupos encontrando resultados satisfatórios (Jama et al., 2008; Shishkina et al., 2010; Pitychoutis et al., 2011; Khemissi et al., 2014). No entanto, até o momento, não há um parâmetro para divisão de subgrupos que estivesse correlacionado com a imobilidade no TNF em camundongos.

Sabendo disso, nossa outra hipótese é que encontrando um teste comportamental preditivo da imobilidade no TNF para camundongos Suíços possamos separar esses animais em subgrupos de alta e baixa imobilidade de uma maneira eficiente. *A priori*, acreditamos que algum desses subgrupos são menos responsivos aos antidepressivos do que outros, o que poderá ajudar a entender trabalhos que não obtiveram resultados positivos já descritos na literatura com esse teste nessa linhagem e talvez, no futuro, a entender o porquê da resistência a alguns antidepressivos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar possíveis fontes de variabilidade do teste do nado forçado (TNF) em camundongos Suíços para entender melhor o que pode influenciar os resultados obtidos nesse teste.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fazer e analisar revisão sistemática para estimar com que frequência ocorre na literatura o relato de resultados negativos em camundongos Suíços, adultos, tratados com fluoxetina via oral antes do TNF;
- Avaliar se a fase do ciclo claro/escuro em que é realizado o TNF influencia a resposta comportamental de camundongos Suíços machos tratados ou não com fluoxetina;
- Comparar as respostas comportamentais de camundongos Suíços machos e fêmeas tratados ou não com fluoxetina no TNF;
- Analisar se a fase do ciclo estral em que é realizado o TNF influencia a resposta comportamental de camundongos Suíços fêmeas tratadas ou não com fluoxetina;
- Comparar as respostas comportamentais de camundongos Suíços machos e fêmeas tratados ou não com fluoxetina no TSC;
- Analisar se a fase do ciclo estral em que é realizado o TSC influencia a resposta comportamental de camundongos Suíços fêmeas tratadas ou não com fluoxetina;
- Comparar as respostas comportamentais obtidas no TNF e no TSC de camundongos Suíços machos e fêmeas tratados ou não com fluoxetina;
- Encontrar um teste comportamental preditivo da imobilidade no TNF para camundongos Suíços para que possamos separar esses animais em subgrupos de alta e baixa imobilidade de uma maneira eficiente;
- Avaliar e comparar as respostas comportamentais de camundongos Suíços machos e fêmeas tratados ou não com fluoxetina previamente separados em subgrupos de alta e baixa imobilidade no TNF;
- Avaliar e comparar qualitativamente por imunohistoquímica a neurogênese hipocampal de camundongos Suíços machos e fêmeas previamente separados em subgrupos de alta e baixa imobilidade antes do TNF.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REVISÃO SISTEMÁTICA NO PUBMED

3.1.1 Palavras chave

Foi realizada uma busca na base de dados Pubmed (pesquisa avançada em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) utilizando como palavras chave: (forced swimming test OR forced swimming tests OR forced swimming test, fst OR fst OR forced swim OR Porsolt test OR Porsolt tests) AND (mice OR mouse OR mus OR musculus OR mus musculus) AND (fluoxetine). A seleção das palavras chave foi baseada nas diferentes denominações do TNF e de camundongo encontradas na literatura, além do nome mais comum do fármaco escolhido.

3.1.2 Critérios de inclusão

- Estudos apresentando dados do TNF para camundongos Suíços tratados por via oral com fluoxetina;
- Estudos com animais controle e tratados que não foram submetidos a por protocolo de estresse ou nenhum outro modelo.

3.1.3 Critérios de exclusão

- Estudos apresentando dados do TNF para camundongos não Suíços
- Estudos apresentando dados de camundongos em outros testes que não o TNF;
- Estudos com animais controle que foram submetidos a protocolo de estresse ou outro modelo;
- Estudos com outras vias de administração que não a oral;
- Estudos com tratamento com outra droga que não fluoxetina;
- Estudos escritos em língua diferente de português e inglês.

3.1.4 Etapas de aplicação dos critérios de inclusão e exclusão

Primeiramente foi realizado exame do resumo e posteriormente, se necessário, foi analisada a sessão do material e métodos do manuscrito completo.

3.1.5 Análise dos resultados

Todos os artigos selecionados, de acordo com os critérios estabelecidos, foram lidos na íntegra, e dele foram extraídos o autor, a dose, o tempo de tratamento, o sexo e n de

animais, o peso e a idade dos animais, se a foi leitura cega ou não, se os animais foram distribuídos de forma aleatória ou não, se o efeito foi significativo ou não, país dos autores e horário do experimento.

A dose e o intervalo de tempo entre o tratamento e o TNF mais utilizados foram utilizados nos experimentos comportamentais.

3.2 ANIMAIS, CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E TRATEMENTO

Foram utilizados camundongos Suíços machos (n=150) e fêmeas (n=118) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) que foram alocados no biotério do Laboratório de Neurobiologia do Comportamento após o desmame (21 dias), onde permaneceram até o início dos testes comportamentais (90 dias).

Todos os animais foram mantidos em grupos (mínimo de 8 e máximo de 12 camundongos) em caixas-padrão (gaiolas plásticas, 50 x 30 x 10 cm cobertas com piso coberto de serragem), área climatizada com temperatura controlada (21 ± 2 °C), exaustão e acesso a água e comida *ad libitum* em ciclo claro/escuro invertido de 12 h (luzes apagadas as 07:00 h e acesas as 19:00 h). Todos os protocolos e procedimentos experimentais aqui apresentados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSC) (8080160217) (Anexo 1) e visaram minimizar o incômodo e o número de animais utilizados.

Os animais tratados receberam fluoxetina (Sigma-Aldrich) diluída em sacarose 10% ou apenas sacarose 10% por via oral (gavagem). Foi adotada a sacarose 10% como diluente da fluoxetina e, também, como tratamento do grupo controle, para seguirmos o padrão que vinha sendo utilizado em nosso laboratório e que já foi visto pelo nosso grupo que não interfere nos resultados obtidos em camundongos Suíços expostos ao TNF (Suman et al. 2018).

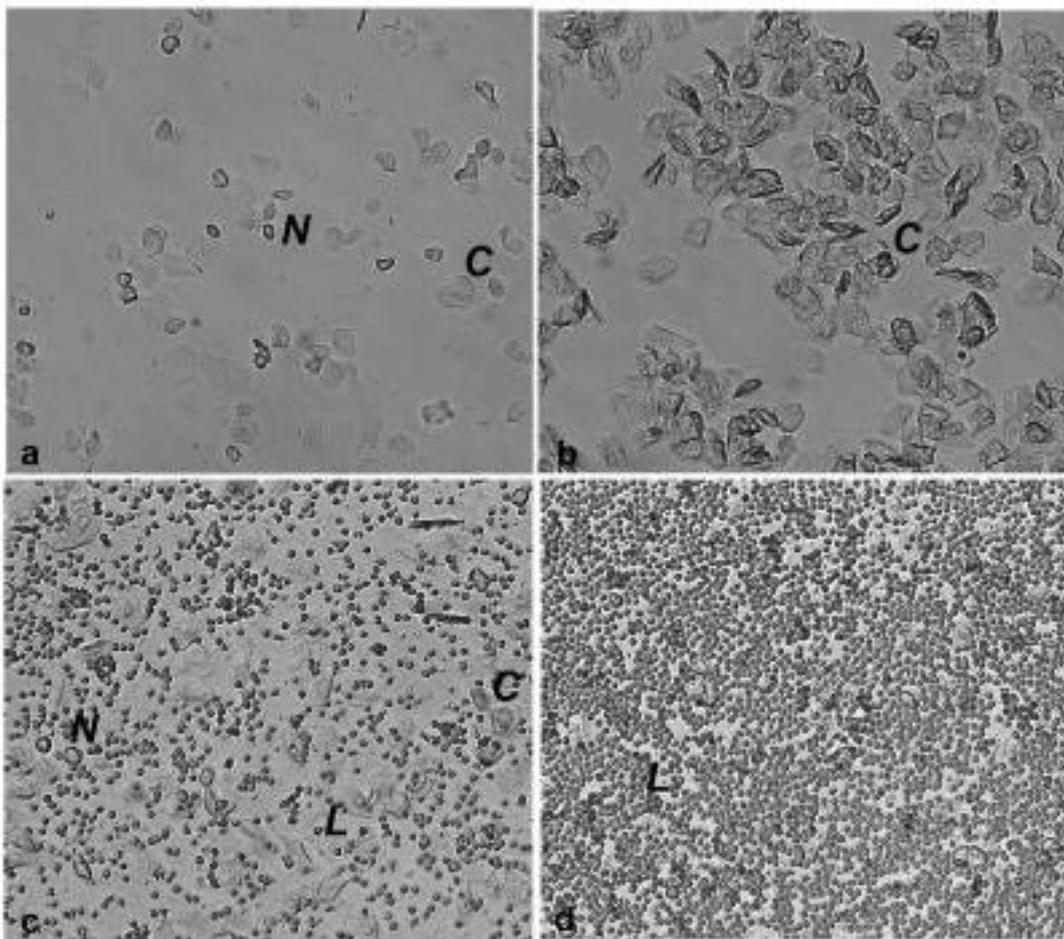
3.3 DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Para que pudesse ser feita uma relação da fase do ciclo estral com o comportamento, antes de cada teste comportamental, foi realizado lavado vaginal com salina 0,9% com posterior observação da morfologia celular em microscópio óptico para determinação das diferentes fases do ciclo. Essas fases (Figura 1) foram categorizadas da seguinte maneira (Caligioni, 2009):

- Proestro: predominância de células epiteliais nucleadas;

- Estro: predominância de células cornificadas (sem núcleo visível, formato irregular e citoplasma granular);
- Metaestro: presença de leucócitos, células cornificadas e epiteliais nucleadas;
- Diestro: predominância de leucócitos.

Figura 1: Fotomicrografias de secreção vaginal não corada de camundongos em (a) pró-estro, consistindo predominantemente de células epiteliais nucleadas; (b) estro, com células cornificadas anucleadas; (c) metaestro, constituído pelos três tipos de células, leucócitos, células epiteliais cornificadas e nucleadas; e (d) diestro, consistindo predominantemente de leucócitos. Células epiteliais nucleadas (N), leucócitos (L), célula cornificada (C).



Adaptada de Caligioni, 2009

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Procedimentos gerais

Para a realização do presente estudo os animais foram alocados em suas caixas de maneira assistemática, onde um animal era aleatoriamente transferido da caixa de transporte para uma caixa-viveiro padrão pelo experimentador, onde permaneceria em grupos de 8-12 animais. A alocação por tratamento foi feita de forma aleatória por meio de sorteio, onde

primeiramente o tratamento era numerado e sorteado e, posteriormente, cada animal era numerado e sorteado para definirmos seu tratamento.

Para evitar vieses de confirmação, o tratamento dos animais e a análise do comportamento foram feitos de forma cega. Para cegar o tratamento, as soluções de tratamentos foram feitas por um experimentador diferente do que realizava os testes comportamentais e foram identificados com um código desconhecido pelo responsável pela administração. Para cegar o registro comportamental, os vídeos eram renomeados por um experimentador diferente do registrador.

Nenhum animal foi excluído das análises, porém 3 animais de caixas diferentes morreram de causas desconhecidas entre a alocação para grupos e o começo dos experimentos.

3.4.2 Experimento 1 - Efeito da fluoxetina na resposta de camundongos Suíços machos, alojados sob diferentes tipos de ciclo claro/escuro, no teste do nado forçado

Os animais foram divididos de forma aleatorizada nos seguintes grupos (n=8/grupo): Invertido CTR (animais alojados em salas que tinham suas luzes acesas às 19h e apagadas às 7h e que recebiam sacarose 10%), Invertido FLX (animais alojados em salas que tinham suas luzes acesas às 19h e apagadas às 7h e que recebiam fluoxetina 20 mg/kg), Normal CTR (animais que tinham suas luzes acesas às 7h e apagadas às 19h e que recebiam sacarose 10 %) e Normal FLX (animais que tinham suas luzes acesas às 7h e apagadas às 19h e que recebiam fluoxetina 20 mg/kg).

A via de administração foi oral (gavagem), todas as drogas foram diluídas em sacarose 10% e os tratamentos foram duplo cego (menos o ciclo, que foi cegado apenas na análise, já que víamos o ciclo em que o animal estava antes do experimento).

Todos os animais 1h após receberem seus determinados tratamentos (FLX ou CTR) realizaram o TNF. Esse teste consistiu em inserir cada animal individualmente em um recipiente cilíndrico (24 cm de altura e 14 cm de diâmetro) com uma coluna de água (± 18 cm), a temperatura de 24 ± 2 °C, por um período de 6 min (adaptado de Porsolt et al. 1978). Cada sessão foi gravada por *webcam* posicionada acima do recipiente para posterior análise dos comportamentos utilizando o *software* EthoWatcher (Crispim Junior et al. 2012). Foram mensurados latência, frequência e duração dos comportamentos:

- Nado: movimento horizontal das patas dianteiras com movimento pela cuba;

- Escalada: movimento vertical das patas dianteiras, realizado tanto nas paredes quanto no meio da cuba, com ou sem deslocamento;
- Imobilidade: ausência de movimento ativo, sem deslocamento, com movimentos apenas para manter a cabeça para fora d'água.

Após o teste os animais foram eutanasiados com uretana 35%.

3.4.3 Experimento 2 - Efeito da Fluoxetina na resposta de camundongos Suíços machos e fêmeas ao TNF e TSC

Os animais foram divididos de forma aleatorizada nos seguintes grupos (n=7 ou 8/grupo): M TNF CTR (machos submetidos ao TNF e que recebiam sacarose 10%), M TNF FLX (machos que passaram pelo TNF e que recebiam fluoxetina 20 mg/kg), M TSC CTR (machos submetidos ao TSC e que recebiam sacarose 10 %), M TSC FLX (machos que passaram pelo TSC e que recebiam fluoxetina 20 mg/kg), F TNF CTR (fêmeas que passaram pelo TNF e que recebiam sacarose 10%), F TNF FLX (fêmeas que passaram pelo TNF e que recebiam fluoxetina 20 mg/kg), F TSC CTR (fêmeas que passaram pelo TSC e que recebiam sacarose 10 %) e F TSC FLX (fêmeas que passaram pelo TSC e que recebiam fluoxetina 20 mg/kg). A via de administração foi oral (gavagem), todos os fármacos foram diluídas em sacarose 10% e os grupos foram duplo cego (menos o tipo de teste e o sexo do animal, que foi cegado apenas na análise, já que colocávamos diferentes animais em diferentes testes e sabíamos o sexo antes do teste).

Todos os animais 1h após receberem seus determinados tratamentos (FLX ou CTR) realizaram seus respectivos testes (TNF ou TSC). O TNF foi realizado seguindo o mesmo protocolo do Experimento 1. Já o TSC consistiu em suspender cada animal a aproximadamente 60 cm do piso por uma fita adesiva colocada a 1 cm da ponta de sua cauda por um período de 6 min (adaptado de Bourin et al., 2005). Foram mensurados latência, frequência e duração dos comportamentos:

- Imobilidade: ausência de movimentos bruscos, o animal pode fazer movimentos leves com a cabeça e as patas sem que mexa o corpo;
- Mobilidade: movimentos mais bruscos do que os realizados na imobilidade.

Cada sessão, de ambos os testes, foi gravada por *webcam* para posterior análise dos comportamentos utilizando o *software* EthoWatcher (Crispim Junior et al., 2012). Após os testes os animais foram eutanasiados com uretana 35%.

3.4.4 Experimento 3 – Possíveis testes preditivos do comportamento de camundongos Suíços machos e fêmeas no TNF

Os animais foram divididos de forma aleatorizada nos seguintes grupos (n=8 ou 9/grupo): M ASN (machos submetidos ao teste de alimentação suprimida pela novidade (ASN) antes do TNF), M HIN (machos submetidos ao teste de hipofagia induzida pela novidade (HIN) antes do TNF), F ASN (fêmeas submetidas ao ASN antes do TNF) e F HIN (fêmeas submetidas ao HIN antes do TNF). Todos os grupos foram analisados de forma cega.

Todos os animais passaram por seu respectivo teste comportamental (ASN ou HIN) 24 h antes do TNF. Após o TNF os animais foram eutanasiados com uretana 35%.

O ASN consistiu de um teste no qual 24 h antes do ensaio, o alimento foi retirado da caixa do camundongo e, no momento do teste, um único *pellet* de ração foi colocado no centro da caixa teste (caixa estranha para o animal), enquanto o camundongo foi colocado em um canto da caixa. A latência para o animal começar a comer (definido como o camundongo mordendo o *pellet* com o uso das patas dianteiras) foi registrada por um período de 5 min (adaptado de Snyder et al., 2011).

Já o HIN consistiu de um treinamento nos três dias que antecederiam o teste, no qual os animais foram apresentados a um alimento palatável (Bis branco) por um período de 30 min. No momento do ensaio o mesmo alimento palatável foi colocado no centro da caixa teste (caixa estranha para o animal), enquanto o camundongo foi colocado em um canto. A latência para começar a comer (definido como o camundongo mordendo o alimento palatável com o uso das patas dianteiras) foi registrada por um período de 20 min (adaptado de Gamble-George et al., 2013).

▪

3.4.5 Experimento 4 – O ASN como teste preditivo para o comportamento de camundongos Suíços machos e fêmeas no TNF

Os animais foram divididos de forma aleatorizada nos seguintes grupos (n=20/grupo): M CTR (machos que recebiam sacarose 10 %), M FLX20 (machos que recebiam fluoxetina 20 mg/kg), M FLX30 (machos que recebiam fluoxetina 30 mg/kg), F CTR (fêmeas que recebiam sacarose 10 %), F FLX20 (fêmeas que recebiam fluoxetina 20 mg/kg) e F FLX30 (fêmeas que recebiam fluoxetina 30 mg/kg). A via de administração foi oral (gavagem), todos os fármacos foram diluídas em sacarose 10% e os grupos foram duplo cego (menos o sexo do animal, que foi cegado apenas na análise, já que sabíamos o sexo antes do teste).

Todos os animais passaram pelo ASN 24h antes do TNF e receberam seus determinados tratamentos 1h antes do TNF (CTR ou FLX20 ou FLX30). Após o TNF alguns foram eutanasiados por dessangramento sob anestesia com uretana 35% (perfusão transcardíaca com solução de sacarose 9,25% e fixação com solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato) e outros foram eutanasiados apenas com uretana 35%.

3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os animais do Experimento 4 que foram eutanasiados por dessangramento sob anestesia tiveram seus cérebros removidos e fixados (24 h em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato) e foram mantidos em sacarose 30% até o momento do congelamento. Os cérebros foram congelados em gelo seco e incluídos em *Tissue Tek*® para serem cortados em criostato Leica CM 1850® (secções coronais de 50 µm coletadas em 5 compartimentos seriados e armazenados em solução anticongelante a - 20 °C).

Com o intuito de estudar uma das fases da neurogênese, foi utilizado o marcador doublecortina (DCX) (proteína expressa em neurônios jovens e precursores neuronais por 2 a 3 semanas após a diferenciação) (GLEESON et al., 1999).

A imunohistoquímica para a detecção dessa proteína foi realizada em cortes que apresentavam a região do giro dentado do hipocampo e o anticorpo primário utilizado foi anti-DCX na diluição 1:2000; anticorpo desenvolvido em coelho (IgG, policlonal) (Anexo 2).

A análise realizada nesse material foi qualitativa e desenvolvida por nós, sendo dado um grau de intensidade para a quantidade de células marcadas e suas ramificações.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* Statistica 8 (Stasoft, Tulsa, OK, USA). Para determinação de qual teste seria usado, a normalidade e a homogeneidade da variância de todos os dados foram analisadas pelos testes de Levene e de Kolgomorov-Smirnov, respectivamente.

Como os dados comportamentais tiveram distribuição normal foram analisados por ANOVA de 1 via no experimento 1, ANOVA de 2 nos experimentos 2 e 4 e ANOVA de medidas repetidas na análise minuto-a-minuto do experimento 4. As análises foram seguidas pelo teste *post-hoc* de Duncan quando a ANOVA apontava alguma diferença estatística.

Também foi realizado o teste de correlação de Pearson no experimento 3 para avaliar a correlação entre os comportamentos encontrados em um possível teste preditivo e o TNF.

Todos os dados foram expressos como a média + erro padrão da média (EPM) e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 REVISÃO SISTEMÁTICA NO PUBMED

Em 02 de agosto de 2017 utilizou-se o Pubmed e a seleção de palavras chave utilizada para o TNF encontrou 10394 resultados, a para camundongo 1551033 e a fluoxetina 12614. Já a combinação mais relevante dos termos encontrou 428 (Tabela 1), dos quais apenas 27 publicações atendiam a todos os critérios de inclusão e exclusão.

Tabela 1: Total de publicações encontradas no Pubmed em 02/08/2017 utilizando as palavras chave escolhidas para a revisão sistemática.

Pesquisas realizadas	Palavras chave	Total de publicações encontradas
#1	(forced swimming test OR forced swimming tests OR forced swimming test, fst OR fst OR forced swim OR Porsolt test OR Porsolt tests)	10394
#2	(mice OR mouse OR mus OR musculus OR mus musculus)	▪1551033
#3	Fluoxetine	▪12614
#4	#1 e #2	▪3544
#5	#1 e #3	▪728
#6	#2 e #3	▪1783
#7	#1, #2 e #3	▪428

Dos 27 artigos foram extraídos o autor, ano de publicação, dose, tempo de tratamento, sexo, leitura cega ou não, distribuídos de forma aleatória ou não, se o efeito foi significativo ou não e o país de origem (Tabela 2).

Tabela 2: Dados extraídos dos artigos que passaram pelos critérios de inclusão e exclusão na busca de publicações encontradas no Pubmed em 02/08/2017 utilizando as palavras chave escolhidas para a revisão sistemática.

Referência	Dose	Tempo de	Sexo e n	Idade	Peso	Leitur	Aleatorização	Efeito
Younus e Siddig,	20	60 dias	Machos	NR	23-27	NR	Sim	p<0,001
Pazini et al., 2016	10	21 dias	Fêmea	40-45	30-40	Sim	NR	p<0,05
Reddi et al., 2016	25	1 dose	Ambos	NR	25-30	NR	NR	p<0,001
Valecha &	20	14 dias	Ambos	NR	25-30	NR	NR	p<0,001
Ishola et al., 2016	30	1 dose	Machos	56	20-25	NR	Sim	p<0,01
Kaur et al., 2015	20	1 dose	Ambos	NR	25-30	NR	Sim	p<0,01 em
Owope et al.,	5 e 30	1 dose	Machos	NR	20-30	NR	NR	p>0,05 (5) e
Lenzi et al., 2015	10 e 20	21 dias	Machos	NR	30-40	Sim	NR	p>0,05 (10) e
Ishola et al., 2014	30	1 dose	Machos	56	20-25	NR	NR	p<0,

Referência	Dose (mg/kg)	Tempo de Tratamento	Sexo e n	Idade (dias)	Peso (g)	Leitura cega	Aleatorização	Efeito significativo
Bettio et al., 2014	10	1 dose antes	Fêmeas (n=7-9)	NR	35-45	Sim	NR	p>0,05
Rane et al., 2014	30	1 dose antes	Fêmeas (n=6)	28-35	25-35	NR	NR	p<0,0001
Ramana et al., 2014	30	7 dias	Ambos (n=6)	NR	25-35	NR	Sim	p>0,05
Dhingra e Valecha,	20	14 dias	Ambos (n=10)	NR	20-25	NR	NR	p<0,001
Karve et al., 2013	10	21 dias	Machos (n=6)	NR	20-30	Sim	Sim	p<0,001
Shoeb et al., 2013	20	1 dose 60 min antes ou	Ambos (n=6)	NR	20-30	NR	Sim	p>0,05
Moretti et al., 2012	10	1 dose 8h40 antes	Fêmeas (n=NR)	NR	35-45	NR	NR	p>0,05
Dhingra et al., 2012	20	14 dias	Machos (n=10)	NR	20-25	NR	NR	p<0,001
Sannukhani et al., 2011	20	1 dose 24h, 5h e 1h antes	Ambos (n=NR)	90-120	26-34	Sim	NR	p<0,05

Referência	Dose (mg/kg)	Tempo de Tratamento	Sexo e n	Idade (dias)	Peso (g)	Leitura cega	Aleatorização	Efeito significativo
Capra et al., 2010	10 e 20	1 dose 60 min antes	Fêmeas (n=5-8)	60-80	35-45	NR	Sim	p>0,05 (10) e p<0,01 (20)
Devadoss et al., 2010	10	14 dias	Machos (n=8)	NR	25-35	Sim	NR	p<0,05
Lobato et al., 2010	10	1 dose 60 min antes	Fêmeas (n=7-8)	50-70	30-40	NR	NR	p<0,05
Freitas et al., 2010	10	1 dose 60 min antes	Fêmeas (n=6-9)	NR	30-40	NR	NR	p<0,05
Pawar et al., 2009	10	1 dose 60 min antes	Machos (n=8)	NR	20-30	NR	NR	p<0,05
Binfaré et al., 2009	1 e 20	1 dose 60 min antes	Ambos (n=6-8)	NR	30-40	NR	NR	p>0,05 (1) e p<0,05 (20)
Dhingra e Kumar,	20	14 dias	Ambos (n=6)	90-120	20-30	NR	NR	p<0,05
Brocardo et al., 2008	20	1 dose 60 min antes	Ambos (n=NR)	NR	30-40	NR	NR	p<0,05
Ren et al., 2006	20	14 dias	Machos (n=NR)	NR	20-24	NR	NR	p<0,05

Analisando os dados extraídos dos trabalhos selecionados na revisão sistemática, podemos observar que a dose mais utilizada para camundongos Suíços é a de 20 mg/kg (41,9%), seguida de 10 mg/kg (32,3%) e de 30 mg/kg (16,1%). Também foi possível aferir que apenas 22,2% afirmaram ter leitura cega, 25,9% aleatorização e 3,7% ambos. Além disso

é visível que a maior parte dos artigos faz tratamento agudo (57,1%), utiliza apenas machos (37%) e apresenta resultados ditos significativos (75,8%).

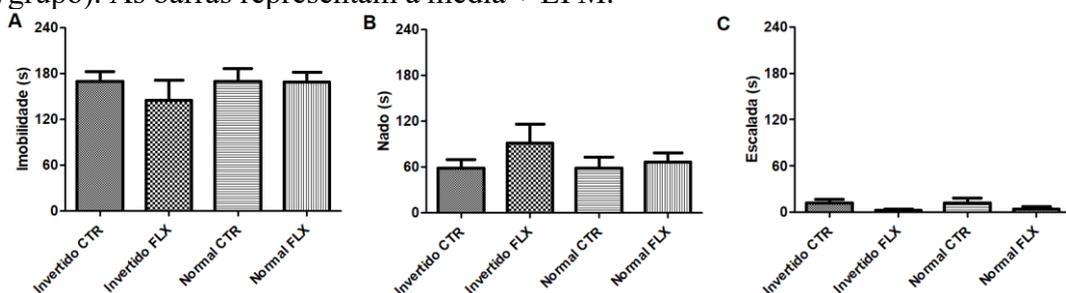
Além disso, foi extraído o país de origem dos artigos, sendo o país com mais artigos que atendiam a todos os critérios a Índia (44,5%), seguido do Brasil (33,3%), da Nigéria (11,1%), da China (3,7%), da África do Sul (3,7%) e do Paquistão (3,7%).

4.2 EXPERIMENTO 1 - EFEITO DA FLUOXETINA NA RESPOSTA DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS, ALOJADOS SOB DIFERENTES TIPOS DE CICLO CLARO/ESCURO, NO TESTE DO NADO FORÇADO

Apesar da obtenção dos dados de latência e frequência de todos os comportamentos, optamos por mostrar aqui somente a duração dos comportamentos por serem as medidas mais comuns na literatura. Os dados de duração dos comportamentos foram expressos em segundos e representados na forma da média do grupo mais EPM, sendo apenas analisados os 4 min finais de cada sessão.

O tratamento oral com fluoxetina 20 mg/kg não modificou o tempo de imobilidade dos camundongos Suíços machos no TNF comparado ao controle, independentemente do ciclo claro / escuro [F(3, 28)=0,4532; p=0,717089]. Além disso também não foi notado diferença no nado [F(3, 28)=0,90067; p=0,453210] e na escalada [F(3, 28)=1,29810; p=0,294566] (Figura 2) (dados já publicados em Suman *et al.*, 2018).

Figura 2: Duração da A) imobilidade, B) nado e C) escalada dos camundongos Suíços machos administrados com 20mg/kg de FLX, e do grupo controle nos 4 min finais (n=8/grupo). As barras representam a média + EPM.



Adaptada de Suman *et al.*, 2018.

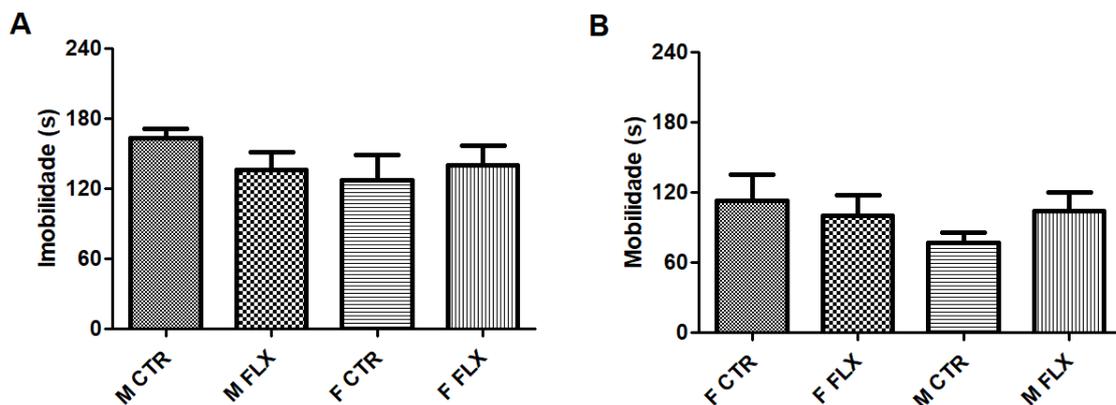
4.3 EXPERIMENTO 2 - EFEITO DA FLUOXETINA NA RESPOSTA DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS E FÊMEAS AO TNF E TSC

Apesar da obtenção dos dados de latência e frequência de todos os comportamentos, optamos por mostrar aqui somente a duração dos comportamentos por serem as medidas mais

comuns na literatura. Os dados de duração dos comportamentos foram expressos em segundos e representados na forma da média do grupo mais EPM, sendo apenas analisados os 4 min finais de cada sessão.

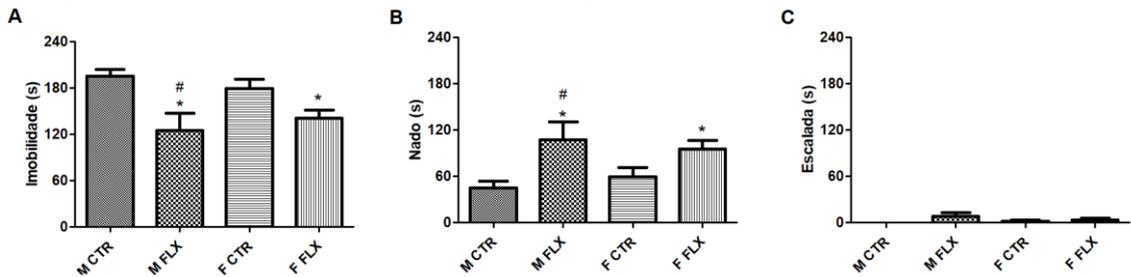
No TSC, o tratamento oral com fluoxetina 20 mg/kg não modificou o tempo de imobilidade dos camundongos Suíços quando comparado ao controle [$F(1,24)=0,1805$; $p=0,674740$], independentemente do sexo [$F(1, 24)=0,9035$; $p=0,0,351317$] e da interação entre tratamento e sexo [$F(1, 24)=1,4535$; $p=0,239718$]. Também não foi notada diferença na mobilidade [$F_{\text{sexo}}(1, 24)=0,8994$; $p=0,352406$] [$F_{\text{tratamento}}(1, 24)=0,1821$; $p=0,673338$] [$F_{\text{sexo*tratamento}}(1, 24)=1,4412$; $p=0,241666$] (Figura 3).

Figura 3: Duração da A) imobilidade e da B) mobilidade dos camundongos Suíços machos e fêmeas administrados com 20mg/kg e do grupo controle no teste de suspensão pela cauda (TSC) nos 4 min finais ($n=7$ /grupo). As barras representam a média + EPM.



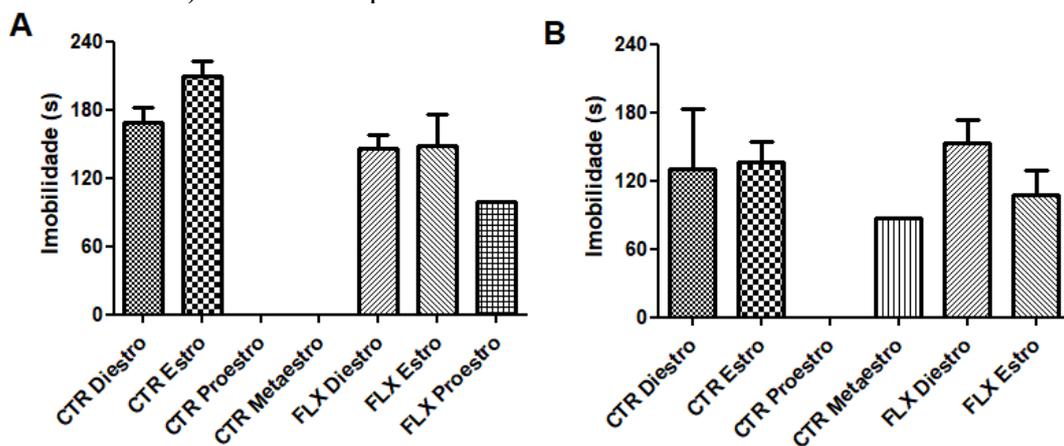
Já no TNF, o tratamento com fluoxetina 20 mg/kg modificou o tempo de imobilidade dos camundongos Suíços machos e fêmeas quando comparado aos seus controles [$F_{\text{sexo}}(1, 28)=0$; $p=1$] [$F_{\text{tratamento}}(1, 28)=14,3999$; $p=0,000727$] [$F_{\text{sexo*tratamento}}(1, 28)=1,2513$; $p=0,272807$]. Também foi notada diferença no nado [$F_{\text{sexo}}(1, 28)=0,0108$; $p=0,917895$] [$F_{\text{tratamento}}(1, 28)=10,7402$; $p=0,002799$] [$F_{\text{sexo*tratamento}}(1, 28)=0,7335$; $p=0,399037$], porém não na escalada [$F_{\text{sexo}}(1, 28)=0,331344$; $p=0,569467$] [$F_{\text{tratamento}}(1, 28)=3,604953$; $p=0,067958$] [$F_{\text{sexo*tratamento}}(1, 28)=1,398823$; $p=0,246867$] (Figura 4).

Figura 4: Duração da A) imobilidade, B) nado e C) escalada dos camundongos Suíços machos e fêmeas administrados com 20mg/kg de FLX, e do grupo controle no teste do nado forçado (TNF) nos 4 min finais (n=8/grupo). As barras representam a média + EPM *p<0,05 em relação ao controle macho; #p<0,05 em relação ao controle fêmea.



Aparentemente a fase do ciclo estral das fêmeas também não interferiu nos resultados obtidos, não modificando o tempo de imobilidade nem no TSC [$F_{\text{fase}}(1, 9)=0,34937$; $p=0,569014$] [$F_{\text{tratamento}}(1, 9)=0,00998$; $p=0,922624$] [$F_{\text{fase*tratamento}}(1, 9)=0,60554$; $p=0,456442$] nem no TNF [$F_{\text{fase}}(1, 11)=1,4973$; $p=0,246645$] [$F_{\text{tratamento}}(1, 11)=5,9838$; $p=0,032465$] [$F_{\text{fase*tratamento}}(1, 11)=1,2250$; $p=0,292006$] (Figura 5).

Figura 5: Duração da imobilidade dos animais administrados com 20mg/kg e do grupo controle no A) teste do nado forçado (TNF) e no B) teste de suspensão pela cauda (TSC) nos 4 min finais (n=0-6/grupo – CTR diestro TNF=6; CTR Estro TNF=2; CTR Proestro TNF=0, CTR Metaestro TNF=0; FLX Diestro TNF=5; FLX Estro TNF=2; FLX Proestro=1; FLX Metaestro TNF=0; CTR Diestro TSC=3; CTR Estro TSC=3; CTR Proestro TSC=0; CTR Metaestro TSC=1; FLX Diestro TSC=5; FLX Estro TSC=2; FLX Proestro TSC=0; FLX Metaestro TSC=0). As barras representam a média + EPM.



4.4 EXPERIMENTO 3 - POSSÍVEIS TESTES PREDITIVOS DO COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS E FÊMEAS NO TNF:

Como a duração da imobilidade é o comportamento mais estudado e que mais nos mostra a ação de antidepressivos no TNF somente ela foi apresentada e correlacionada com os dados dos possíveis testes preditivos. Além disso, todos os comportamentos foram expressos em segundos e todos os testes, incluindo o TNF, foram analisados em sua totalidade.

O tempo registrado no HIN (Figura 6) foi similar entre os camundongos Suíços machos e fêmeas [$t(14)=0,585878$; $p=0,708009$]. Houve correlação moderada e não significativa com o tempo de imobilidade registrado no TNF em camundongos Suíços machos ($r=-0,6790$; $p=0,12$) e fêmeas ($r=0,53844$, $p=0,125871$) (Figura 7). Os machos que tem maior latência para comer no HIN apresentam menor tempo de imobilidade no TNF, já as fêmeas que tem maior latência para comer no HIN apresentam maior tempo de imobilidade no TNF.

Figura 6: Latência para camundongos Suíços machos e fêmeas comerem no teste de hipofagia induzida pela novidade (HIN) ($n=8$ /grupo). As barras representam a média + EPM.

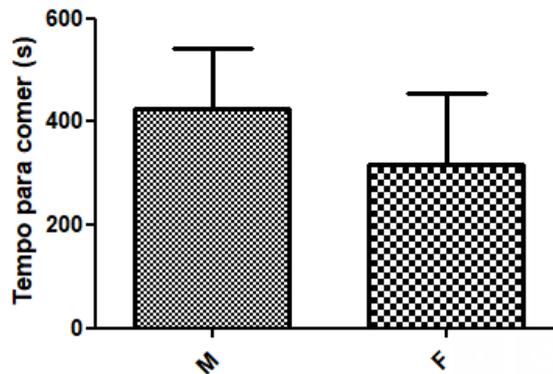
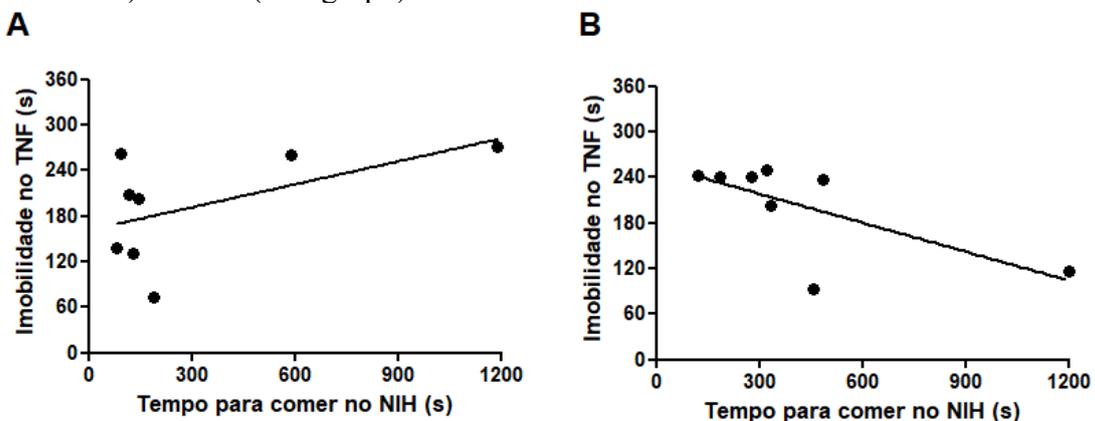


Figura 7: Correlação entre a imobilidade no teste do nado forçado (TNF) e o tempo para comer no teste de hipofagia induzida pela novidade (HIN) em camundongos Suíços A) fêmeas e B) machos ($n=8$ /grupo).



O tempo medido no ASN (Figura 8) foi similar entre machos e fêmeas [$t(30)=-1,16515$; $p=0,300070$]. Houve correlação positiva, forte e significativa com o tempo de imobilidade medido no TNF em camundongos Suíços machos realizados em diferentes períodos de tempo (dezembro e março) ($r=0,8219$; $p=0,012$) e ($r=0,8297$, $p=0,011$) ou na junção desses dados ($r=0,7202$; $p=0,002$), sendo que os animais que tem maior latência para comer no ASN apresentam maior tempo de imobilidade no TNF. Já em fêmeas a correlação entre os tempos no ASN e TNF foi negativa, moderada em um dos tempos e não significativa ($r=-0,6484$; $p=0,082$) e fraca e não significativa no outro ($r=-0,0939$; $p=0,825$) e na junção desses dados a correlação passa a ser moderada e significativa ($r=-0,5537$; $p=0,026$), sendo que os animais que tem maior latência para comer no ASN apresentam menor tempo de imobilidade no TNF (Figura 9).

Figura 8: Latência para comer no teste de alimentação suprimida pela novidade (ASN) ($n=16/\text{grupo}$). As barras representam a média + EPM.

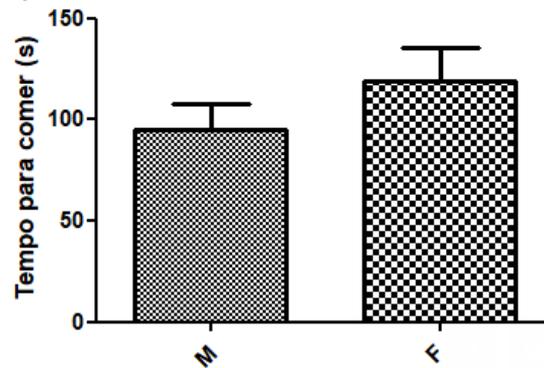
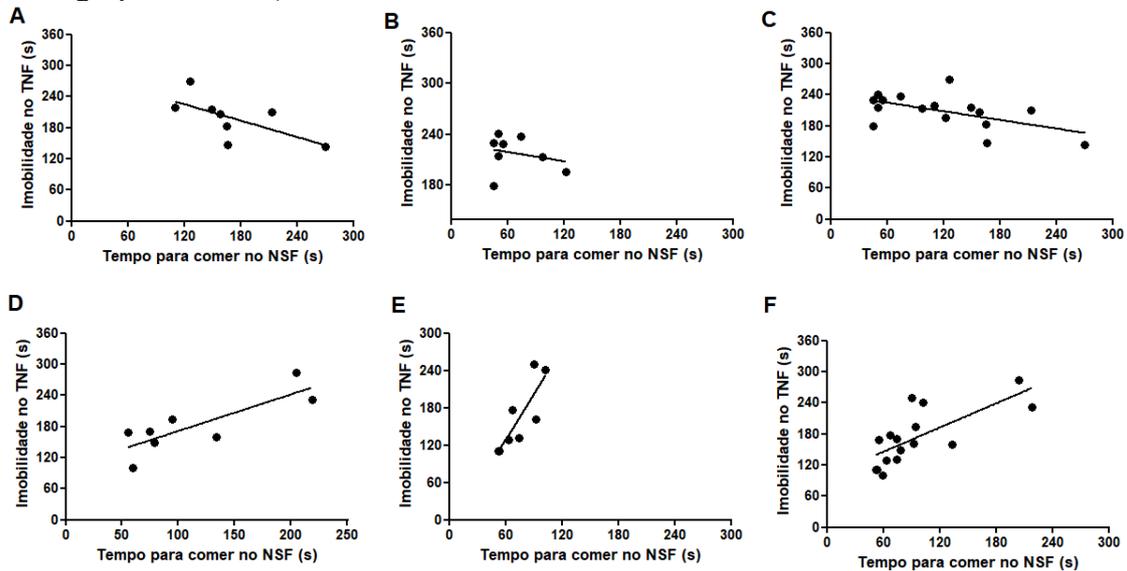


Figura 9: Correlação entre a imobilidade no teste do nado forçado (TNF) e o tempo para comer no teste de alimentação induzida pela novidade (ASN) em A) fêmeas no experimento realizado em dezembro de 2017, B) fêmeas no experimento realizado em março de 2018, C) todas as fêmeas, D) machos no experimento realizado em dezembro de 2017, E) machos no experimento realizado em março de 2018 e F) todas os machos (n=8/grupo em A,B, D e E, e n=16/grupo em C e F).



4.5 EXPERIMENTO 4 - O ASN COMO TESTE PREDITIVO PARA O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS E FÊMEAS NO TNF

Observando o resultado do Experimento 3, é possível notar que o ASN é um bom teste preditivo do comportamento no TNF para camundongos Suíços machos e um possível teste do comportamento no TNF para camundongos Suíços fêmeas. Assim, no experimento 4 os animais foram submetidos primeiramente ao ASN e, com base nos valores de seus tempos de latência para comer, foram alocados em subgrupos de alta e baixa imobilidade antes do tratamento e do TNF. Essa subdivisão foi feita de acordo com a mediana de todos os animais no ASN, seguindo um padrão parecido com o utilizado na divisão *post hoc* em alguns estudos (Enriquez-Castillo, 2008; Suman et al., 2018), sendo a mediana de machos 112,25s e a de fêmeas 123,635s.

Assim, os machos com maior latência para comer a ração no ASN foram alocados no grupo de alta imobilidade, enquanto as fêmeas com maior latência para comer a ração no ASN no grupo de baixa imobilidade, ou seja, houve concordância com o experimento anterior.

Todos os dados de latência, frequência e duração (4 min finais) de todos os comportamentos do TNF dos animais controle foram expressos em segundos e representados na forma da média do grupo mais ou menos EPM, sendo apenas analisados os 4 min finais de cada sessão.

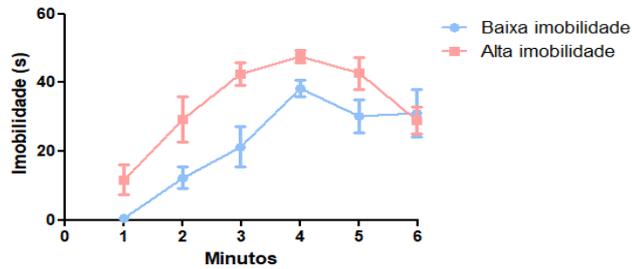
Tabela 3: Frequências, latências e durações de todos os comportamentos do teste do nado forçado (TNF) dos animais controle nos 4 min finais.

Comportamento e grupo	Frequência	Latência	Duração
Nado			
M alta imobilidade	4,09±6,28	28,23±8,72	39,51±6,28
M baixa imobilidade	5,12±0,58	20,80±17,51	87,79±12,39
F alta imobilidade	5,09±14,50	18,00±9,37	82,33±14,50
F baixa imobilidade	4,25±0,75	56,08±25,68	54,60±13,36
Escalada			
M alta imobilidade	0,45±0,16	72,80±16,83	6,23±2,67
M baixa imobilidade	0,62±0,26	144,58±20,48	9,16±4,63
F alta imobilidade	0,64±0,45	84,20±9,12	9,15±6,24
F baixa imobilidade	0,25±0,16	100,65±18,07	5,88±3,86
Imobilidade			
M alta imobilidade	4,73±0,59	15,64±4,98	194,19±5,76
M baixa imobilidade	5,00±0,37	21,12±5,17	142,16±15,49
F alta imobilidade	4,45±0,43	19,34±6,14	148,49±16,40
F baixa imobilidade	4,37±0,73	8,89±5,57	179,47±13,89

Todos os dados são expressos média ± EPM (n=8-11/grupo; M alta imobilidade e F alta imobilidade=11; M baixa imobilidade e F baixa imobilidade=8)

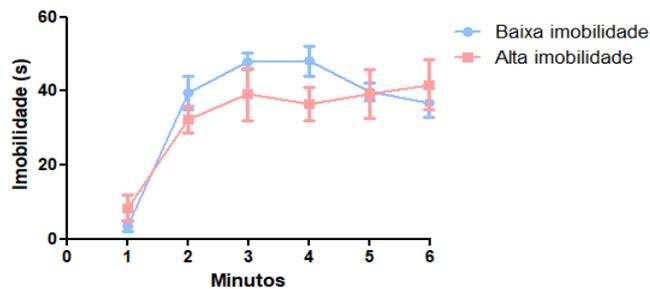
A análise minuto à minuto da duração dos comportamentos nos animais controle dos sub-grupos de alta e baixa imobilidade em camundongos Suíços machos apresenta diferença [$F_{\text{sub-grupo}}(1, 14)=11,8308$; $p=0,003986$] [$F_{\text{sub-grupo*repetição}}(5, 70)=1,8896$; $p=0,107126$], sendo mais evidente nos min 2 e 3. Isso mostra que a divisão nos sub-grupos de alta e baixa imobilidade no TNF para camundongos Suíços machos foi efetiva (Figura 10).

Figura 10: Duração da imobilidade minuto à minuto em machos do grupo controle de alta (linha rosa, n=11) e baixa (linha azul, n=8) imobilidade no teste do nado forçado (TNF). Os símbolos representam a média \pm EPM.



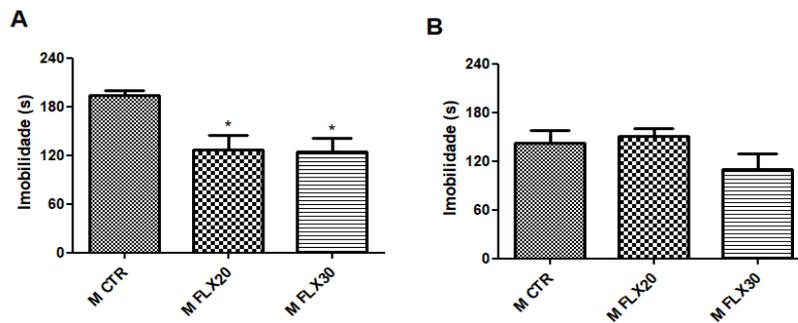
Já a análise minuto à minuto da duração dos comportamentos nos animais controle dos subgrupos de alta e baixa imobilidade em camundongos Suíços fêmeas não apresentou diferença significativa [$F_{\text{sub-grupo}}(1, 14)=1,0051$; $p=0,246645$] [$F_{\text{sub-grupo*repetição}}(5, 70)=1,3390$; $p=0,25812$]. Além disso podemos observar que o grupo de alta imobilidade apresentou menos imobilidade do que o de baixa imobilidade, o que mostra que a divisão nos sub-grupos de alta e baixa imobilidade no TNF para camundongos Suíços fêmeas não foi eficaz (Figura 11).

Figura 11: Duração da imobilidade minuto à minuto em fêmeas do grupo controle de alta (linha rosa, n=11) e baixa (linha azul, n=8) imobilidade no teste do nado forçado (TNF). Os símbolos representam a média \pm EPM.



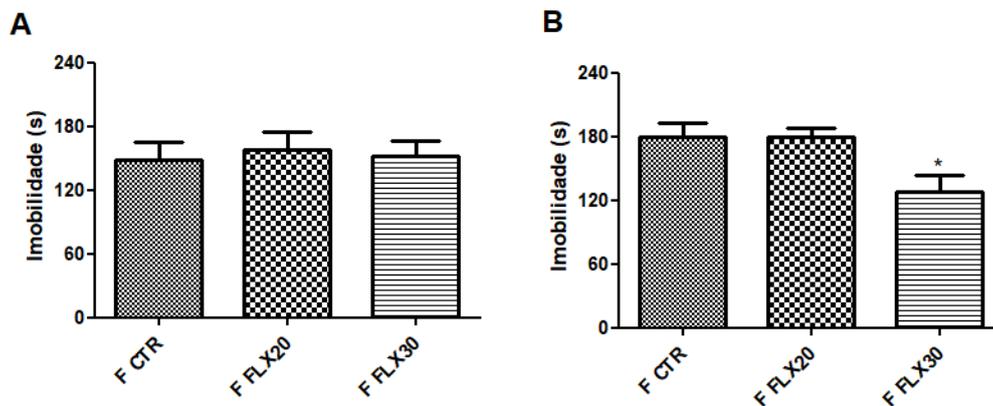
Analisando a diferença de machos controles e tratados com fluoxetina 20 mg/kg e 30 mg/kg é possível observar diferença no tempo de imobilidade do TNF entre os tratamentos e os controles nos camundongos Suíços machos do subgrupo de alta imobilidade [$F(2, 26)=8,6333$; $p=0,001332$], já no subgrupo de baixa imobilidade não foi encontrada diferença significativa entre os grupos [$F(2, 26)=2,0248$; $p=0,152324$] (Figura 12).

Figura 12: Duração da imobilidade dos animais administrados com 20mg/kg e 30 mg/kg de fluoxetina e do grupo controle no TNF em machos A) de alta imobilidade e B) de baixa imobilidade. As barras representam a média + EPM (n=8-11/grupo; M CTR de alta imobilidade=11; M FLX20 de alta imobilidade=9; M FLX30 de alta imobilidade=9; M CTR de baixa imobilidade=8; M FLX20 de baixa imobilidade=11; M FLX30 de baixa imobilidade=10). *p<0,05 em relação ao controle.



Já na análise do tempo de imobilidade das fêmeas no TNF podemos observar que houve diferença entre os animais tratados com fluoxetina 30 mg/kg no sub-grupo de alta imobilidade [$F(2, 26)=5,0659$; $p=0,013871$], porém não houve nenhuma diferença no sub-grupo de baixa imobilidade [$F(2, 27)=0,0938$; $p=0,910805$] (Figura 13).

Figura 13: Duração da imobilidade dos animais administrados com 20mg/kg e 30 mg/kg de fluoxetina e do grupo controle no TNF em fêmeas A) de alta imobilidade e B) de baixa imobilidade. As barras representam a média + EPM (n=8-11/grupo; F CTR de alta imobilidade=11; F FLX20 de alta imobilidade=10; F FLX30 de alta imobilidade=9; F CTR de baixa imobilidade=8; F FLX20 de baixa imobilidade=10; F FLX30 de baixa imobilidade=11). *p<0,05 em relação ao controle.



Na figura 14 são apresentadas fotomicrografias da distribuição das células DCX-positivas no giro dentado de camundongos Suíços machos e fêmeas controle dos sub-grupos alta e baixa imobilidade (restante das imagens analisadas Anexo 3). Com análise qualitativa

foi possível que os machos de alta imobilidade apresentem mais células e mais arborização do que os machos de baixa imobilidade, porém nas fêmeas não foi notada diferença (Tabela 4).

Figura 14: Imunohistoquímica para doublecortina (DXC) no hipocampo de camundongos Suíços A) machos de alta imobilidade, B) baixa imobilidade, C) fêmeas de alta imobilidade e D) baixa imobilidade.

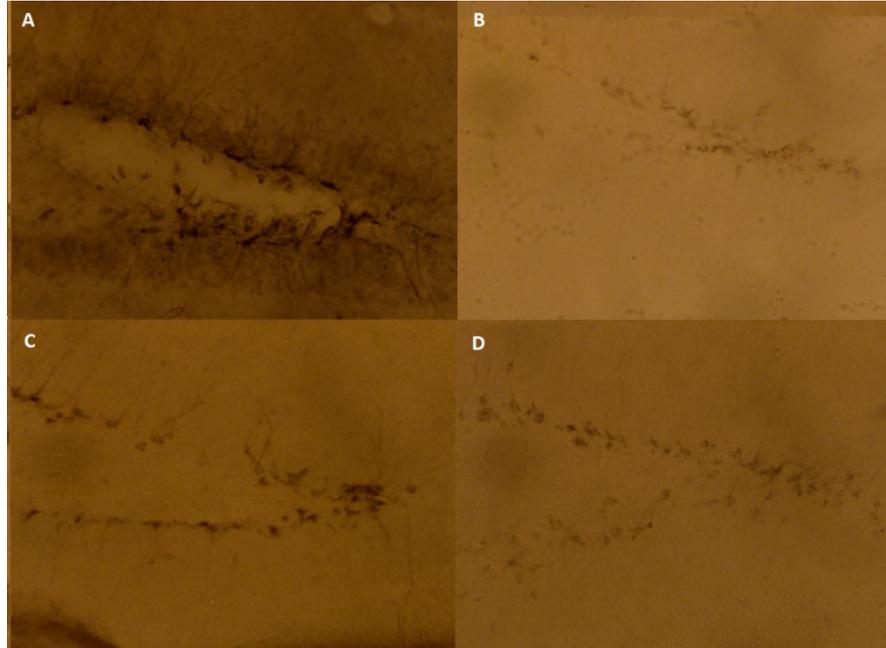


Tabela 4: Análise qualitativa da imunohistoquímica para DCX.

Grupos	Quantidade de novas células comprometidas com o fenótipo neuronal	Ramificações das novas células comprometidas com o fenótipo neuronal
Machos alta imobilidade	+++	+++
Machos baixa imobilidade	+	+
Fêmeas alta imobilidade	++	++
Fêmeas baixa imobilidade	++	++

+ existe pouco; ++ existe intermediário; +++existe muito.

5 DISCUSSÃO

5.1 REVISÃO SISTEMÁTICA NO PUBMED

A realização de revisões sistemáticas em modelos animais vem crescendo nos últimos anos, pois esse tipo de estudo pode ajudar a esclarecer o valor e as limitações da pesquisa em modelos animais, podendo aumentar o valor translacional dos modelos utilizados e auxiliar na seleção de modelos mais adequados para pesquisas futuras e na implementação dos 3 R's da ética de pesquisa animal (*replacement* – substituição, *reduction* – redução e *refinement* – refinamento) (Kara et al, 2018; de Vries et al., 2014).

Como nosso laboratório já encontrou resultados negativos no TNF para camundongos Suíços machos (Suman et al, 2017), algumas dúvidas que a revisão sistemática poderia responder, foram feitas: “Existem outros trabalhos em camundongos Suíços com resultado negativo para esse teste?”, “A dose de antidepressivo que utilizamos estava adequada?” e “O que podemos ter feito de diferente para obtermos esse resultado?”. Para respondê-las foi feita uma revisão sistemática com foco em camundongos Suíços tratados com fluoxetina que foram submetidos ao TNF.

Considerando que o TNF é muito utilizado na busca por novos antidepressivos, nossa hipótese para essa parte do estudo era que haveria um viés de publicação, sendo os resultados positivos os mais encontrados devido à promoção dos resultados positivos e a supressão dos resultados negativos. Além disso, esperávamos encontrar a dose mais utilizada na literatura para poder utiliza-la nos experimentos comportamentais.

Os resultados parecem suportar nossa hipótese, pois o baixo número de resultados negativos encontrados gera dúvida quanto à fidedignidade e à robustez dos dados da literatura. Esse fenômeno é denominado viés de publicação e é responsável por muitos resultados da literatura serem “inflados”, o que contribui para a redução da reprodutibilidade dos estudos (Collins e Tabak, 2014).

A partir dessa revisão foi visto que a dose de fluoxetina mais utilizada para os camundongos Suíços no TNF é a de 20 mg/kg, o que nos fez escolher essa dose para ser utilizada nos experimentos comportamentais. Também foi observado que a maioria dos experimentos foram realizados em machos, o que pode ser um grande problema para quando determinados fármacos passarem a ser testados na pesquisa clínica, visto que a depressão acomete mais mulheres do que homens (OMS, 2017).

Além disso a maioria dos experimentos não relatava se houve aleatorização dos animais e nem o cegamento dos investigadores quanto a intervenção que o animal recebeu

e/ou sobre a análise dos resultados obtidos. Esse fato talvez possa indicar a presença de alguns vieses nesses trabalhos, já que tanto o cegamento quanto a aleatorização são utilizados para evitá-los.

5.2 EFEITO DA FLUOXETINA NA RESPOSTA DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS, ALOJADOS SOB DIFERENTES TIPOS DE CICLO CLARO/ESCURO, NO TESTE DO NADO FORÇADO

Provavelmente devido a razões de praticidade, o ciclo claro\escuro dos viveiros de animais nos laboratórios geralmente seguem a norma da atividade humana, ou seja, as luzes estão acesas durante o dia e apagadas à noite. Porém, muitas vezes não é levado em consideração que os animais que utilizamos (ratos e camundongos) são noturnos e as investigações comportamentais ocorrem, quase exclusivamente, na fase de repouso do ciclo circadiano desses animais (Kelliher et al, 2000; Verma et al., 2009). Então como a fase noturna do ciclo circadiano corresponde ao período ativo e responsivo do camundongo, qualquer paradigma que seja dependente de respostas comportamentais robustas também deve ser explorado nessa fase. Além disso, qualquer modelo animal que tente paralelizar uma condição humana e, de fato, tente alcançar a validade preditiva requer atenção à imitação (Kelliher et al, 2000; Verma et al., 2009), por isso utilizamos o ciclo invertido no nosso laboratório.

Na revisão sistemática não encontramos nenhum trabalho que afirmasse ter utilizado o ciclo de iluminação invertido no viveiro dos animais, então resolvemos realizar uma comparação entre animais que passaram pelo TNF enquanto mantidos em viveiros com diferentes fases do ciclo claro/escuro, pois essa poderia ser uma diferença importante entre os estudos de Costa et al. al. (2013) e Suman et al. (2018). Esse experimento revelou não haver influência da iluminação do alojamento sobre os comportamentos dos camundongos Suíços machos no TNF, quando tratados ou não com fluoxetina. Em ambos os tipos de ciclo de iluminação, os comportamentos dos animais do grupo controle e do tratado com fluoxetina foram similares, o que vai de acordo com um trabalho já publicado em ratos (Verma et al., 2009).

Esse resultado nos fez perceber que o ciclo de iluminação no viveiro dos animais não era o principal responsável pelos nossos resultados negativos, então passamos a pensar que talvez o TNF não fosse o ideal para os nossos animais, então passamos para outro experimento no qual utilizamos o TSC.

5.3 EFEITO DA FLUOXETINA NA RESPOSTA DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS E FÊMEAS AO TNF E TSC

Mesmo o TNF sendo muito utilizado para detectar efeitos de antidepressivos em camundongos Suíços, como visto na revisão sistemática, pensamos que talvez em nossas condições, animais pudessem não ser sensíveis ao TNF. Isso devido ao fato de que a diferença entre animais da mesma linhagem, porém de colônias ou fornecedores diferentes já foi demonstrada (Einat et al., 2018). Essas diferenças são geralmente atribuídas à origem da linhagem (Juetten e Einat, 2012), a outras mudanças genéticas ao longo das gerações (Pena-Oliver et al., 2014) ou ainda a fatores ambientais (Einat et al., 2018).

Sabendo disso, resolvemos conduzir um estudo para avaliar a resposta de camundongos Suíços machos e fêmeas tratados ou não com fluoxetina no TNF e no TSC, para assim podermos observar se a falta de efeito observada estava relacionada com a resposta ao fármaco ou se era devido ao teste, além de avaliarmos se havia diferença sexual no comportamentos desses animais. Além disso, existem evidências que o uso de antidepressivos é mais comum em mulheres do que em homens (OMS, 2017). Portanto, modelos animais que levem em consideração o sexo dos animais podem ter maior validade de construto que aqueles que desprezam a relevância desta variável.

Com esse experimento pudemos observar que o sexo não interferiu no resultado obtido, sendo os dados encontrados em fêmeas e machos muito parecidos. Em relação as fêmeas pudemos ver que a fase do ciclo estral parece não interferir no comportamento apresentado, o que concorda com dados da literatura em ratas (Domingues et al., 2015). Porém, o baixo número de camundongas por fase do ciclo estral diminui a confiabilidade desses resultados.

Esse experimento nos trouxe também uma grande surpresa, os camundongos machos, assim como as fêmeas, tiveram resposta positiva ao tratamento com fluoxetina no TNF. O que não era esperado devido aos nossos resultados anteriores (Suman et al., 2018). Além disso, camundongos dos dois sexos não responderam como esperado no TSC, i.e., não houve redução de imobilidade dos animais após o tratamento com a fluoxetina.

Em meio a muitas dúvidas que surgiram, resolvemos comparar os grupos controle responsivos (experimento 2) e os não responsivos (experimento 1) ao TNF. Nessa análise *a posteriori* pudemos observar que os animais do grupo controle no experimento 2 apresentavam maior imobilidade do que os do experimento 1. Isso nos fez pensar que, por

acaso, tenhamos recebido do fornecedor subgrupos diferentes de camundongos (responsivos e não responsivos) em cada experimento. Nos estudos de Suman et al. (2018) havia a suspeita que os camundongos Suíços do Biotério da UFSC podiam ser encontrados em subgrupos de baixa e alta imobilidade. A presença de subgrupos poderia explicar também a inesperada ausência de efeito da fluoxetina sobre a imobilidade dos camundongos no TSC. Pensando nisso resolvemos tentar encontrar um teste que pudesse ser preditivo do comportamento dos camundongos machos e fêmeas no TNF. Assim, teríamos um indicador que pudesse ser usado para separar os animais de alta e baixa imobilidade e entender se os resultados discrepantes entre os experimentos 1 e 2 ocorreram ao acaso ou se realmente há uma divisão intra-linhagem.

5.4 POSSÍVEIS TESTES PREDITIVOS DO COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS E FÊMEAS NO TNF

Muitos grupos de pesquisa vêm tentando encontrar alguma correlação entre variáveis comportamentais, fisiológicas ou bioquímicas na resposta individual dos animais, para assim poderem prever o desempenho de determinado animal no teste de interesse (Jama et al., 2008; Shishkina et al., 2010; Pitychoutis et al., 2011; Khemissi et al., 2014). Antes do presente estudo, não havia sido encontrado nenhum parâmetro para divisão de subgrupos que estivesse correlacionado com a imobilidade no TNF em camundongos Suíços.

Sabendo disso, pensamos que provavelmente os melhores testes preditores do TNF seriam testes que também detectassem o efeito de antidepressivos, como o próprio TNF ou o TSC. Porém, tanto o TNF como o TSC são considerados estressantes pensamos em testes em que o animal não se estressasse tanto, por isso inicialmente utilizamos o HIN. O HIN consiste em uma fase de treino no qual o animal aprende a comer um alimento palatável (treinamento por 3 dias de 30 min) e no dia do teste é colocado junto com o alimento palatável em uma caixa diferente da que está habituado (Almatroudi et al., 2018). No dia do teste é aferido o tempo entre a colocação do animal na caixa e ele começar a comer (latência para comer). A correlação entre a latência para comer no HIN e o tempo de imobilidade no TNF foi mínima. As razões para a ausência de correlação entre a latência para comer no HIN e a imobilidade no TNF não são conhecidas. Porém, poderíamos considerá-la natural uma vez que parte dos comportamentos dos camundongos no HIN são adquiridos por treinamento que está ausente no TNF. Alternativamente, poderíamos considerar a realização do HIN complexa e passível de erros experimentais, por causa das várias sessões de treinamento.

Devido à ausência de achados no HIN, tentamos o ASN que é mais simples de realizar do que o HIN e tínhamos estrutura para a realização. Apesar da necessidade de privação alimentar durante as 24 h que antecedem o teste, o ASN é considerado pouco estressante para os camundongos. Nesse teste, após o período de privação alimentar, o animal é colocado em uma caixa diferente da caixa-viveiro com um *pellet* de ração no meio da caixa. Como no HIN, no ASN é aferido o tempo entre a colocação do animal na caixa e ele começar a comer (latência para comer) (Samuels e Hen, 2011). Com as medidas nesse teste, observamos correlação forte para camundongos Suíços machos entre o tempo até o animal comer e o seu desempenho no TNF, já para os camundongos fêmeas a correlação foi média. Outro achado interessante do ASN como preditor do TNF é que a correlação dos machos e fêmeas foi inversa, ou seja, os machos tem correlação positiva (diretamente proporcional) e as fêmeas correlação negativa (inversamente proporcional). Em outras palavras, camundongos machos mais móveis no ASN são também mais móveis no TNF, enquanto que camundongos fêmeas mais móveis no ASN são menos móveis no TNF.).

Com esses resultados promissores com o ASN, tivemos a ideia de utilizar a latência para comer no ASN para dividir os camundongos em subgrupos de alta e baixa mobilidade antes que recebessem tratamento com antidepressivos. Essa divisão poderia nos indicar se a divisão intra-linhagem estaria realmente relacionada com a resposta ao fármaco no TNF.

5.5 O ASN COMO TESTE PREDITIVO PARA O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS E FÊMEAS NO TNF

Com o ASN como teste preditor do TNF e divisor de animais em alta e baixa imobilidade, pensamos que algum dos subgrupos fosse menos responsivo aos antidepressivos do que o outro, o que poderia ajudar a entender trabalhos que não obtiveram resultados já descritos na literatura com esse teste nessa linhagem.

Nesse experimento pudemos tirar a prova real de que a nossa divisão realmente funcionou para camundongos Suíços machos. Com uma análise minuto a minuto do comportamento dos animais controle observamos que, os animais classificados como de baixa imobilidade realmente tiveram menor tempo de imobilidade durante todo o TNF do que aqueles classificados com alta imobilidade. Porém pudemos notar que nossa divisão não funcionou muito bem para camundongos Suíços fêmeas, pois o subgrupo que deveria ser o de baixa imobilidade acabou apresentando maior imobilidade do que o subgrupo que deveria ser de alta imobilidade.

O tratamento com fluoxetina reduziu o tempo de imobilidade no subgrupo de camundongos machos de alta imobilidade. Ou seja, os camundongos Suíços machos, de alta imobilidade responderam como esperado ao tratamento com fluoxetina. Porém, os animais de baixa imobilidade não foram responsivos ao tratamento com a fluoxetina, como no experimento 1. Isso concorda com alguns dados da literatura em que apenas ratos de alta imobilidade responderam aos antidepressivos no TNF (Jama et al., 2008).

Nossos achados em camundongos Suíços machos também foram interessantes, pois divergiram dos dados encontrados recentemente em nosso grupo de pesquisa (Suman et al., 2018). Com um método de divisão *post hoc*, Suman et al. (2018) observaram que diferenças entre os grupos de camundongos controle e fluoxetina diferiam no TNF apenas quando classificados como de baixa imobilidade. Acreditamos que essa disparidade com Suman et al. (2018) seja explicada pelo fato que nossa divisão foi prévia e não posterior ao TNF. A divisão *post hoc* pode ser questionada se levarmos em conta que para a divisão dos subgrupos foi usado um parâmetro (mediana) derivado de todos os grupos experimentais testados no próprio TNF. Nesse trabalho, a seleção dos animais foi feita usando um parâmetro independente do TNF.

Em camundongos Suíços fêmeas, a divisão pela mediana da HIN não foi eficaz para dividir os animais em subgrupos de alta e baixa imobilidade. Porém pudemos observar que a dose de 30mg teve efeito nos animais com latência para comer maior que a mediana (animais que supostamente deveriam ser de baixa imobilidade, porém apresentarão maior duração de imobilidade).

Nesse experimento foi analisada também uma das fases da neurogênese hipocampal dos grupos controle de alta e baixa imobilidade de ambos os sexos, pois sabe-se que a ação terapêutica dos antidepressivos tem relação causal com a neurogênese (Santarelli et al. 2003; Tanti e Belzung, 2013). Com essa análise qualitativa vimos que os machos de alta imobilidade apresentam maior número de neurônios novos e mais ramificações nesses neurônios que os machos de baixa imobilidade, o que pode ser um dos fatores relacionados com as diferentes respostas nesses subgrupos. Com isso acreditamos que os camundongos machos de alta imobilidade são mais responsivos, pois apresentam mais neurogênese do que os de baixa imobilidade. Também foi visto que os camundongos Suíços fêmeas não tiveram um padrão de neurogênese definido pelo seus subgrupos, o que mais uma vez pode nos mostrar que nossa divisão pelo ASN em fêmeas não foi bem sucedida.

Novos estudos devem ser realizados para averiguar se realmente a diferença de resposta em machos é devida a neurogênese, podendo ser feita uma análise quantitativa. Muitos marcadores poderiam ser estudados nos subgrupos de camundongos Suíços machos, para assim talvez entendermos melhor os mecanismos de resistência a resposta antidepressiva nesses animais e talvez no futuro ainda transpor esses achados para os humanos resistentes ao tratamento. Além disso, seria muito interessante que houvesse novos estudos de testes preditivos para os camundongos Suíços fêmeas, visto que os testes que utilizamos não foram eficazes.

Portanto, os dados aqui encontrados sugerem que os camundongos Suíços apresentam uma divisão intra-espécie referente ao tempo de imobilidade no TNF, sendo o ASN um bom teste preditor dessa divisão em machos. Já para as fêmeas, nem o HIN nem o ASN parecem ser bons preditores da imobilidade no TNF. Levando em consideração também os resultados encontrados na imunohistoquímica de camundongos Suíços machos dos grupos controle de alta e baixa imobilidade, podemos dizer que em camundongos machos uma das fases da neurogênese hipocampal está relacionada com sua responsividade aos antidepressivos.

Como conclusão geral, podemos dizer que o modelo comportamental aqui apresentado é confiável para detecção de fluoxetina em camundongos Suíços machos e que provavelmente as diferentes responsabilidades encontradas nesse protocolo estão intimamente ligadas com a neurogênese hipocampal. Porém, a aplicação desse modelo comportamental em fêmeas não é recomendada, pois a divisão em subgrupos não foi bem estabelecida. Desse modo, mais estudos se fazem necessários para investigar as vias relacionadas a resistência a resposta antidepressiva, além de estudos para encontrar um teste preditor do TNF para fêmeas.

6 CONCLUSÕES

6.1 CONCLUSÃO GERAL

O ASN como teste preditor do TNF é confiável para detecção de antidepressivos monoaminérgicos em camundongos Suíços machos e, provavelmente, as diferentes responsabilidades encontradas nesse protocolo estão relacionadas com a fase da neurogênese vista com a doublecortina. Porém, a aplicação desse modelo comportamental em fêmeas não é recomendada, pois a divisão em subgrupos não foi bem estabelecida.

6.2 RESUMO DOS RESULTADOS

- Com a revisão sistemática foi possível observar que provavelmente existe um viés de publicação, devido ao baixo número de resultados negativos encontrados, o que gera dúvida quanto à fidedignidade e à robustez dos dados da literatura.
- Percebemos com o experimento 1 que a fase do ciclo claro\escuro em que o TNF é feito não interfere no seu resultado.
- Com o experimento 2 observamos que o sexo não interfere no resultado obtido nem no TNF e nem no TSC, sendo os dados encontrados em fêmeas e machos muito parecidos.
- Além disso, em relação as fêmeas, observamos que a fase do ciclo estral parece não interferir nem no TNF e nem no TSC.
- Percebemos, com os experimentos 3 e 4 que o ASN é um bom teste preditor do TNF para camundongos Suíços machos, porém não para fêmeas, o que o torna um bom divisor de grupos de alta e baixa imobilidade para camundongos Suíços machos.
- Com o experimento 4 foi possível observar que os camundongos Suíços machos de alta imobilidade são mais responsivos a fluoxetina que os de baixa imobilidade.
- A imunohistoquímica revelou que, provavelmente, as diferentes responsabilidades encontradas nesse protocolo estão relacionadas com uma das fases da neurogênese hipocampal.

7 REFERÊNCIAS

- ALMATROUDI A, OSTOVAR M, BAILEY CP, HUSBANDS SM, BAILEY SJ. Antidepressant-like effects of BU10119, a novel buprenorphine analogue with mixed κ/μ receptor antagonist properties, in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 14, p. 2869–80, 2018.
- BALE, T. L.; EPPERSON, C. N. Sex as a biological variable: who, what, when, why, and how. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, p. 386–396, 2017.
- BALE, T. L. Sex matters. **Nature – Neuropsychopharmacology**, v. 44, p. 1-3, 2019. Editorial.
- BELZUNG, C. Innovative drugs to treat depression: did animal models fail to be predictive or did clinical trials fail to detect effects? **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 5, p. 1041-51, 2014.
- BELZUNG, C.; WILLNER, P.; PHILIPPOT, P. Depression: from psychopathology to pathophysiology. **Current Opinion Neurobiology**, v. 30, p. 24-30, 2015.
- BETTIO, L. E.; FREITAS, A. E.; NEIS, V. B.; SANTOS, D. B., RIBEIRO, C. M.; ROSA, P. B.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 127, p. 7-14, 2014.
- BINFARÉ, R. W.; ROSA, A. O.; LOBATO, K. R.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 530-40, 2009.
- BOURIN, M.; HASCOET, M.; MANSOURI, B.; COLOMBEL, M. C.; BRADWEJN, J. Comparison of behavioral effects after single and repeated administrations of four benzodiazepines in three mice behavioral models. **Journal of Psychiatry Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 72-7, 1992.
- BOURIN, M.; COLOMBEL, M. C.; REDROBE, J. P.; NIZARD, J.; HASCOËT, M.; BAKER, G. B. Evaluation of efficacies of different classes of antidepressants in the forced swimming test in mice at different ages. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 22, n. 2, p. 343-51, 1998.

BOURIN, M.; CHENU, F.; RIPOLL, N.; DAVID, D. J. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behavioral Brain Research**, v. 164, n. 2, p. 266-9, 2005.

BROCARD, P. S.; BUDNI, J.; KASTER, M. P.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 2, p. 464-73, 2008.

CALIGIONI, C. S. Assessing reproductive status/stages in mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 4, n. 4I, 2009.

CAPRA, J. C.; CUNHA, M. P.; MACHADO, D. G.; ZOMKOWSKI, A. D.; MENDES B. G.; SANTOS, A. R.; PIZZOLATTI, M. G.; RODRIGUES, A. L. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. **The European Journal of Pharmacology**, v. 643, n. 2-3, p. 232-8, 2010.

COSTA, A. P.; VIEIRA, C.; BOHNER, L. O.; SILVA, C. F.; SANTOS, E. C.; DE LIMA, T. C.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 45, p. 150-5, 2013.

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, n. 2, p. 257-64, 2012.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.

CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 547-69, 2005.

DALLA, C.; EDGECOMB, C.; WHETSTONE, A. S.; SHORS, T. J. Females do not express learned helplessness like males do. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 7, p. 1559-69, 2009.

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, n. 2, p. 107, 1997.

DEVADOSS, T.; PANDEY, D. K.; MAHESH, R.; YADAV, S. K. Effect of acute and chronic treatment with QCF-3 (4-benzylpiperazin-1-yl) (quinoxalin-2-yl) methanone, a novel 5-HT(3) receptor antagonist, in animal models of depression. **Pharmacological Reports**, v. 62, n. 2, p. 245-57.

DE VRIES, R. B. M.; WEVER, K. E.; AVEY, M. T.; STEPHENS, M. L.; SENA, E. S.; LEENAARS, M. The usefulness of systematic reviews of animal experiments for the design of preclinical and clinical studies. **ILAR Journal**, v. 55, p. 427–437, 2014.

DHINGRA, D.; KUMAR, V. Evidences for the involvement of monoaminergic and GABAergic systems in antidepressant-like activity of garlic extract in mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 40, n. 4, p.175-9, 2008.

DHINGRA, D.; JOSHI, P.; GUPTA, A.; CHHILLAR, R. Possible involvement of monoaminergic neurotransmission in antidepressant-like activity of *Emblica officinalis* fruits in mice. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 18, n. 5, p.419-25, 2012.

DHINGRA, D.; VALECHA, R. Evidence for involvement of the monoaminergic system in antidepressant-like activity of an ethanol extract of *Boerhaavia diffusa* and its isolated constituent, punarnavine, in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 6, p. 767-74, 2014.

DOMINGUES, Karolina. Influência do dimorfismo sexual na resposta ao tratamento com Fluoxetina em ratos no nado forçado repetido: contribuição do metabolismo da serotonina. 2015. 98 f. **Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Farmacologia**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

DULAWA, S. C.; HOLICK, K. A.; GUNDERSEN, B.; HEN, R. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 7, p. 1321-30, 2004.

EINAT, H.; EZER, I.; KARA, N. Z.; BELZUNG, C. Individual responses of rodents in modelling of affective disorders and in their treatment: prospective review. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 18, p. 1-6, 2018.

ENRÍQUEZ-CASTILLO, A.; ALAMILLA, J.; BARRAL, J.; GOURBIÈRE, S.; FLORES-SERRANO, A. G.; GÓNGORA-ALFARO, J. L.; PINEDA, J. C. Differential effects of caffeine on the antidepressant-like effect of amitriptyline in female rat subpopulations with low and high immobility in the forced swimming test. **Physiology & Behavior**, v. 94, n. 3, p. 501-9, 2008.

FRANCESCHELLI, A.; HERCHICK, S.; THELEN, C.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z.; PITYCHOUTIS, P. M. Sex differences in the chronic mild stress model of depression. **Behavioural Pharmacology**, v. 25, n. 5-6, p. 372-83, 2014.

FREEDMAN, P.; COCKBURN, I. M.; SIMCOE, T. S. The economics of reproducibility in preclinical research. **PLOS Biology**, v. 13, p. e1002165, 2015.

FREITAS, A. E.; BUDNI, J.; LOBATO, K. R.; BINFARÉ, R. W.; MACHADO, D. G.; JACINTO, J.; VERONEZI, P. O.; PIZZOLATTI, M. G.; RODRIGUES, A. L. Antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 2, p. 335-43, 2010.

GAMBLE-GEORGE, J. C.; CONGER, J. R.; HARTLEY, N. D.; GUPTA, P., SUMISLAWSKI, J. J.; PATEL, S. Dissociable effects of CB1 receptor blockade on anxiety-like and consummatory behaviors in the novelty-induced hypophagia test in mice. **Psychopharmacology**, v. 228, n. 3, p. 401–409, 2013.

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.

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.

ISHOLA, I. O.; AGBAJE, E. O.; AKINLEYE, M. O.; IBEH, C. O.; ADEYEMI, O. O.; Antidepressant-like effect of the hydroethanolic leaf extract of *Alchornea cordifolia*

(Schumach. & Thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae) in mice: involvement of monoaminergic system. **The Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, n. 364-72, 2015.

ISHOLA, I. O.; AWODELE, O.; ELUOGU, C. O. Potentials of *Mangifera indica* in the treatment of depressive-anxiety disorders: possible mechanisms of action. **Journal of complementary & integrative medicine**, v. 13, n. 3, p. 275-287, 2016.

JAMA, A.; CECCHI, M.; CALVO, N.; WATSON, S. J.; AKIL, H. Interindividual differences in novelty-seeking behavior in rats predict differential responses to desipramine in the forced swim test. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 198, p. 333–340, 2008.

JUETTEN, J.; EINAT, H. Behavioral differences in black Swiss mice from separate colonies: implications for modeling domains of mania. **Behavior Pharmacology**, v. 23, p. 211–214, 2012

KADALI, S. R.; RAO, A. S.; SRI, G. K. Antidepressant activity of brahmi in albino mice. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 3, p. 35-7, 2014.

KAFKAFI, N.; AGASSI, J.; CHESLER, E. J.; CRABBE, J. C.; CRUSIO, W. E.; EILAM, D.; GERLAI, R.; GOLANI, I.; GOMEZ-MARIN, A.; HELLER, R.; IRAQI, F.; JALJULI, I.; KARP, N. A.; MORGAN, H.; NICHOLSON, G.; PFAFF, D. W.; RICHTER, S. H.; STARK, P. B.; STIEDL, O.; STODDEN, V.; TARANTINO, L. M.; TUCCI, V.; VALDAR, W.; WILLIAMS, R. W.; WÜRBEL, H.; BENJAMINI, Y. Reproducibility and Replicability of Rodent Phenotyping in Preclinical Studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 87, p. 218-32, 2018.

KARA, N. Z.; KARPEL, O.; TOKER, L.; AGAM, G.; BELMAKER, R. H.; EINAT, H. Chronic oral carbamazepine treatment elicits mood-stabilising effects in mice. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 26, p. 29–34, 2014.

KARA, N.; STUKALIN, Y.; EINAT, H. Revisiting the validity of the mouse forced swim test: systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 84, p. 1–11, 2018.

KARVE, A. V.; JAGTIANI, S. S.; CHITNIS, K. A. Evaluation of effect of allopurinol and febuxostat in behavioral model of depression in mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 45, n. 3, p. 244-7, 2013.

- KAUR, G.; INVALLY, M.; SANZAGIRI, R.; BUTTAR, H. S. Evaluation of the antidepressant activity of *Moringa oleifera* alone and in combination with fluoxetine. **The Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 6, n. 4, p. 273-9, 2015.
- 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. **Physiology & Behavior**, v. 69, p.531–539, 2000.
- KHEMISSI, W.; FAROOQ, R. K.; LE GUIQUET, A. M.; SAKLY, M.; BELZUNG, C. Dysregulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis predicts some aspects of the behavioral response to chronic fluoxetine: association with hippocampal cell proliferation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 30, n. 8, p. 340, 2014.
- 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.
- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.
- LENZI, J.; RODRIGUES, A. F.; RÓSA ADE, S.; DE CASTRO, A. B.; DE LIMA, D. D.; MAGRO, D. D.; ZENI A. L. Ferulic acid chronic treatment exerts antidepressant-like effect: role of antioxidant defense system. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 6, p. 1453-63, 2015.
- LEVINSTEIN, M. R.; SAMUELS, B. A. Mechanisms underlying the antidepressant response and treatment resistance. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 208, 2014.
- LEWEJOHANN, L.; ZIPSER, B.; SACHSER, N. “Personality” in laboratory mice used for biomedical research: a way of understanding variability? **Developmental Psychobiology**, v. 53, p. 624–630, 2011.
- LINO-DE-OLIVEIRA, C.; DE LIMA, T.C. M.; CAROBREZ, A.P. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. **Behavioral Brain Research**, v. 158, p. 243–50, 2005.
- LOBATO, K. R.; CARDOSO, C. C.; BINFARÉ, R. W.; BUDNI, J.; WAGNER, C. L.; BROCARD, P. S.; DE SOUZA, L. F.; BROCARD, C.; FLESC, S.; FREITAS, A.

E.; DAFRÉ, A. L.; RODRIGUES, A. L. Alpha-Tocopherol administration produces an antidepressant-like effect in predictive animal models of depression. **Behavioral Brain Research**, v. 209, n. 2, p. 249-59, 2010.

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.

MEZADRI, T.; BATISTA, G.; PORTES, A.; 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, n. 2, p. 200-205, 2011.

MILAD, M. R.; IGOE, S. A.; LEBRON-MILAD, K.; NOVALES, J. E. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. **Neuroscience**, v. 164, n. 887–895, 2009.

MORETTI, M.; BUDNI, J.; DOS SANTOS, D. B.; ANTUNES, A.; DAUFENBACH, J. F.; MANOSSO, L. M.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. **The Journal of Molecular Neuroscience**, v. 49, n. 1, p. 68-79, 2013.

MRAZEK, D. A.; BIERNACKA, J. M.; O'KANE, D. J.; BLACK, J. L.; CUNNINGHAM, J. M.; DREWS, M. S.; SNYDER, K. A.; STEVENS, S. R.; RUSH, A. J.; Weinshilboum, R. M. CYP2C19 variation and citalopram response. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n.1, p. 1–9, 2011.

NESTLER, E. J.; GOULD, E.; MANJI, H. Preclinical models: status of basic research in depression. **Biological Psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 503-528, 2002.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161-1169, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Depression and other common mental disorders: global health estimates. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/254610>>. Acesso em: 05 de março de 2019.

OWOPE, T. E.; ISHOLA, I. O.; AKINLEYE, M. O.; OYEBADE, R.; ADEYEMI, O. O. Antidepressant Effect of *Cnestis ferruginea* Vahl ex DC (Connaraceae): Involvement of

Cholinergic, Monoaminergic and L-arginine-nitric Oxide Pathways. **Drug Research**, v. 66, n. 5, p. 235-45, 2016.

PAWAR, G. R.; AGRAWAL, R. P.; PHADNIS, P.; PALIWAL, A.; VYAS, S.; SOLANKI, P. Evaluation of antidepressant like property of amisulpride per se and its comparison with fluoxetine and olanzapine using forced swimming test in albino mice. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 66, n. 3, p. 327-31.

PAZINI, F. L.; CUNHA, M. P.; AZEVEDO, D.; ROSA, J. M.; COLLA, A.; de OLIVEIRA, J.; RAMOS-HRYB, A. B.; BROCARD, P. S.; GIL-MOHAPEL, J.; RODRIGUES, A. L. S. Creatine Prevents Corticosterone-Induced Reduction in Hippocampal Proliferation and Differentiation: Possible Implication for Its Antidepressant Effect. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 8, p. 6245-60, 2017.

PENA-OLIVER, Y.; SANCHEZ-ROIGE, S.; STEPHENS, D. N.; RIPLEY, T. L. Alpha-synuclein deletion decreases motor impulsivity but does not affect risky decision making in a mouse gambling task. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 231, p. 2493–506, 2014.

PITYCHOUTIS, P. M.; PALLIS, E. G.; MIKAIL, H. G.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Individual differences in novelty-seeking predict differential responses to chronic antidepressant treatment through sex- and phenotype-dependent neurochemical signatures. **Behavioral Brain Research**, v. 223, p. 154–168, 2011

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-732, 1977a.

PORSOLT, R. D., BERTIN A., JALFRE M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 229, p. 327-336, 1977b.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; BLAVET, N.; DENIEL, M.; JALFRE, M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 201-210, 1979.

RANE, R. A.; NAPAHEDE, S.; BANGALORE, P. K.; SAHU, N. U.; SHAH, N.; KULKARNI, Y. A.; BARVE, K.; LOKARE, L.; KARPOORMATH, R. Synthesis and evaluation of novel marine bromopyrrole alkaloid-based derivatives as potential antidepressant agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 84, n. 5, p. 593-602, 2014.

REDDI, A. J.; HANDU, S. S.; DUBEY, A. K.; MEDIRATTA, P. K.; SHUKLA, R.; AHMED, Q. M. Effect of *Musa Sapientum* Stem Extract on Animal Models of Depression. **Pharmacognosy Research**, v. 8, n. 4, p. 249-252, 2016.

REN, L. X.; LUO, Y. F.; LI, X.; ZUO, D. Y.; WU, Y. L. Antidepressant-like effects of sarsasapogenin from *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE (Liliaceae). **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 29, n. 11, p. 2304-6, 2006.

SAMUELS BA, HEN R. Novelty-Suppressed Feeding in the mouse. In: Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. *Neuromethods*, v.63. Humana Press. 2011.

SANMUKHANI, J.; ANOVADIYA, A.; TRIPATHI, C. B. Evaluation of antidepressant like activity of curcumin and its combination with fluoxetine and imipramine: an acute and chronic study. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 68, n.5, p.769-75, 2011.

SCHECHTER, M. D.; CHANCE, W. T. Non-specificity of "behavioral despair" as an animal model of depression. **European Journal of Pharmacology**, v. 60, n. 2, p. 139-142, 1979.

SHISHKINA, G. T.; KALININA, T. S.; BEREZOVA, I. V.; BULYGINA, V. V.; DYGALO, N. N. Resistance to the development of stress-induced behavioral despair in the forced swim test associated with elevated hippocampal Bcl-xl expression. **Behavioral Brain Research**, v. 213, p. 218–224, 2010.

SHOEB, A.; CHOWTA, M.; PALLEMPATI, G.; RAI, A.; SINGH, A. Evaluation of antidepressant activity of vanillin in mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 141-4, 2013.

SINGH, A. B.; BOUSMAN; C. A.; NG, C. H.; BYRON, K.; BERK, M. ABCB1 polymorphism predicts escitalopram dose needed for remission in major depression. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. e198, 2012.

SNYDER, J. S.; SOUMIER, A.; BREWER, M.; PICKEL, J.; CAMERON, H. A. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 458–461, 2011.

SUMAN, P. R.; ZERBINATTI, N.; THEINDL, L. C.; DOMINGUES, K.; LINO DE OLIVEIRA, C. Failure to detect the action of antidepressants in the forced swim test in Swiss mice. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 29, p. 1-10, 2017.

TANTI, A.; BELZUNG, C. Open questions in current models of antidepressant action. **The British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 1187–1200, 2010.

VALECHA, R.; DHINGRA, D. Behavioral and Biochemical Evidences for antidepressant-Like Activity of *Celastrus Paniculatus* Seed Oil in Mice. **Basic and Clinical Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 49-56, 2016.

VERMA, P.; HELLEMANS, K. G.; CHOI, F. Y.; YU, W.; WEINBERG, J. Circadian phase and sex effects on depressive/anxiety-like behaviors and HPA axis responses to acute stress. **Physiology & Behavior**, v. 99, p. 276–285, 2009.

VIEIRA, C.; DELIMA, T.C.M.; CAROBREZ, A.P.; LINO-DEOLIVEIRA, 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.

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

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, n. 4, p. 319-329, 1997.

WILLNER, P.; SCHEEL-KRUGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neuroscience Biobehavior**, v. 37, p. 2331–71, 2012.

WILLNER, P.; SCHEEL-KRUGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 10, p. 2331-71, 2013.

WILLNER, P.; BELZUNG, C. Treatment-resistant depression: are animal models of depression fit for purpose? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 232, n. 19, p. 3473-95, 2015.

YOUNUS, I.; SIDDIQ, A. A. Behavioral evidence of antidepressant-like activity of *Raphanus sativus* l. Var. *Caudatus* in mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 14, n. 3, p. 142-146, 2017.

ANEXO 1 – COMITE DE ÉTICA



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "A validação do teste de nado forçado repetido: reduzindo do número de animais na avaliação de drogas antidepressivas", protocolada sob o CEUA nº 8080160217, sob a responsabilidade de **Cilene Lino de Oliveira** e equipe: Domingues, Karolína; Suman, Patrick R.; Fernanda Barbosa de Lima Christian - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 07/04/2017.

We certify that the proposal "Reducing animals in antidepressant research: repeated forced swimming test", utilizing 2250 Heterogenic rats (1125 males and 1125 females), 2250 Heterogenic mice (1125 males and 1125 females), protocol number CEUA 8080160217, under the responsibility of **Cilene Lino de Oliveira** and team: Domingues, Karolína; Suman, Patrick R.; Fernanda Barbosa de Lima Christian - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 04/07/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 03/2017 a 03/2021

Área: Farmacologia

Origem:	Biotério Central	sexo:	Machos	idade:	60 a 120 dias	N:	1125
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	200 a 400 g		
Linhagem:	Wistar						
Origem:	Biotério Central	sexo:	Fêmeas	idade:	60 a 180 dias	N:	1125
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	150 a 300 g		
Linhagem:	Wistar						
Origem:	Biotério Central	sexo:	Machos	idade:	60 a 90 dias	N:	1125
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	35 a 50 g		
Linhagem:	Suíço						
Origem:	Biotério Central	sexo:	Fêmeas	idade:	60 a 90 dias	N:	1125
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	25 a 35 g		
Linhagem:	Suíço						

Resumo: O teste de nado-forçado repetido (TNF-repetido, Mezadri et al., Volume 195, Issue 2, 15 February 2011, Pages 200[205]) é uma modificação do TNF tradicional (Porsolt et al., Nature, 266 (1977), pp. 730[732].ou Porsolt et al., Eur J Pharmacol, 47 (1978), pp. 379[391], que permite avaliar os efeitos do tratamento a curto, médio e longo prazo com doses baixas de antidepressivos em um mesmo grupo de animais experimentais e seu respectivo grupo controle. Comparado ao método "tradicional", o FST-repetido necessita de uma quantidade de animais 3 vezes menor para a avaliação dos efeitos agudos e crônicos dos tratamentos. Embora o emprego deste procedimento possa ser promissor para a redução do número de animais utilizados no estudo dos fármacos antidepressivos sua validação está incompleta. No presente projeto nos interessa estudar os mecanismos envolvidos nos efeitos que diferentes classes de fármacos produzem no TNF-repetido. De acordo com trabalhos anteriores de nosso laboratório (Domingues, 2015 Dissertação de mestrado, Farmacologia, UFSC; Suman, 2016 Dissertação de mestrado, Farmacologia, UFSC) ratos da raça Wistar ou camundongos Suíços machos são resistentes aos efeitos dos antidepressivos avaliados no TNF-repetido. O estudo do comportamento de animais de laboratório resistentes ao tratamento com antidepressivos tradicionais abre a possibilidade de se encontrar modelos para novos tipos de antidepressivos. Assim, seriam estudados os mecanismos envolvidos nos efeitos: 1- de diferentes classes de fármacos antidepressivos em ratos Wistar e camundongos Suíços dos dois sexos, 2- de diferentes tipos de ambientes enriquecidos em ratos Wistar e camundongos Suíços dos dois sexos, 3-de estimulantes da atividade motora em ratos Wistar e camundongos Suíços dos dois sexos no TNF-repetido. No Subprojeto 1 estudaremos a contribuição da neurotransmissão central mediada por serotonina para a resposta sexualmente dimórfica dos ratos a fluoxetina (Domingues, 2015 Dissertação de mestrado, Farmacologia, UFSC) ou a outros fármacos antidepressivos. Além disso, nos interessa estimar a



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



contribuição dos hormônios gonadais para a resposta sexualmente dimórfica dos ratos a fluoxetina (subprojeto 2) bem como a contribuição da função ovariana para a resposta paradoxal de ratas ao tratamento com os antidepressivos (subprojeto 3). Nos subprojetos 4, 5 e 7 serão investigados os mecanismos genéticos e epigenéticos contribuindo para a resistência ao tratamento com antidepressivos em camundongos (Suman, 2016, Dissertação de mestrado, Farmacologia, UFSC) e em ratos. No subprojeto 6 investigaremos a contribuição do fentípico ansioso (ratos pilocarpinados Hoeller et al., Brain Res. 2013 Sep 26;1532:21-31; Duarte et al., Psychopharmacology (Berl). 2013 May; 227(2):209-19) para a resistência aos fármacos antidepressivos tradicionais uma vez que foi observado que estes animais enfrentam ativamente o estresse de nado forçado (Tese de Ana Paula Ramos Costa, 2017, Farmacologia, UFSC). Uma vez que os protocolos base estejam estabelecidos será investigada a adequação de cada um deles ao alojamento dos animais em ambiente enriquecido. A maior parte dos procedimentos descritos neste projeto já foi avaliada em submissões anteriores, por favor, veja também os protocolos CEUA PP00764 (coordenado por mim) e CEUA PP00842 (coordenado pela Prof. Fernanda Barbosa Lima Christian, CFS-CCB-UFSC).

Local do experimento: Salas de experimentos comportamentais do Biotério Bio066.

Florianópolis, 07 de abril de 2017

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Aderbal Silva Aguiar Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

ANEXO 2 – PROTOCOLO IMUNOHISTOQUÍMICA

Dia 1

- Verificar soluções (PBS 0,1; 0,01 M) = Geladeira
- Preparar Tampão A (PBST 0,25%) (Adicionar 1,25ml Triton em 500 ml PBS 0,1M)
- Separar os cortes em PBS 0,1M ou PB 0,2M (6-8 cortes por grupo experimental, tentando sempre representar em cada corrida imuno-histoquímica todos os grupos e em igual número.)
 - Iniciar lavagens com Tampão A (1ml por poço) 4x5 min
 - Preparar Metanol 100% - 0,3% H_2O_2 (Ter em conta que nosso H_2O_2 já é 30%, portanto colocar 1ml a cada 100 ml de Metanol).
- Bloqueio da peroxidase endógena com Metanol100%-0,3% H_2O_2 (30 min)
- Lavar (Tampão A), 4x5 min
 - Preparar BSA 2% em Tampão A (A cada 100 ml de Tampão A adicionar 2g de BSA (Bovine Serum Albumine). Preparar o dobro do volume necessário, porque na incubação do Ac primário também usa.
- Bloqueio das ligações inespecíficas com BSA 2% (90 min)
- Preparar as diluições dos anticorpos (Para cFos em Pombos, 1:4000 em BSA2%).
- Incubar Ac primário overnight (20-24 h) em câmara fria em agitação, cuidando de não apoiar a placa diretamente no gelo para não congelar a amostra.

Dia 2

- Iniciar lavagens com Tampão A, 4x5 min
- Incubar Ac secundário (2 h) (diluir em Tampão A) (Ac secundário para cFos 1:1000 PBST).
- Preparar o complexo ABC
 - PBST
 - A
 - B
 - Diluir 1:1000 o complexo AB, não cada substância. Assim, para 1 ml de PBST precisa-se 0,5 μ l de A + 0,5 μ l de B.
- Lavar (Tampão A), 4x5 min
- Incubar o complexo ABC (90 min)
- Lavar (Tampão A), 4x5 min

- Lavar com PBS 0,1M 1x5 min
- Preparar DAB (No escuro, cobrir o Becker com papel alumínio
 - 1 comprimido da cartela dourada + 1 comprimido cartela prateada em 5 ml de PBS 0,1M.
- Incubar com DAB 4-5 min (no escuro, cobrir a placa com papel alumínio)
- Interromper DAB com 1 lavagem de 10 min em PBS 0,1M frio (8°C)
- Lavar (Tampão A), 4x5 min
- Estender as secções em lâmina gelatinizada usando PBS 0,01 M ou PB 0,2 M.
- Deixar secar por entre 1 dia e 1 semana os cortes nas lâminas para proceder a diafanizar.

ANEXO 3 – IMUNOHISTOQUÍMICA DE TODOS ANIMAIS

Figura 15: Imunohistoquímica para doublecortina (DCX) no hipocampo de camundongos Suíços fêmeas de alta imobilidade. A, B, C, D, E e F representam animais diferentes.

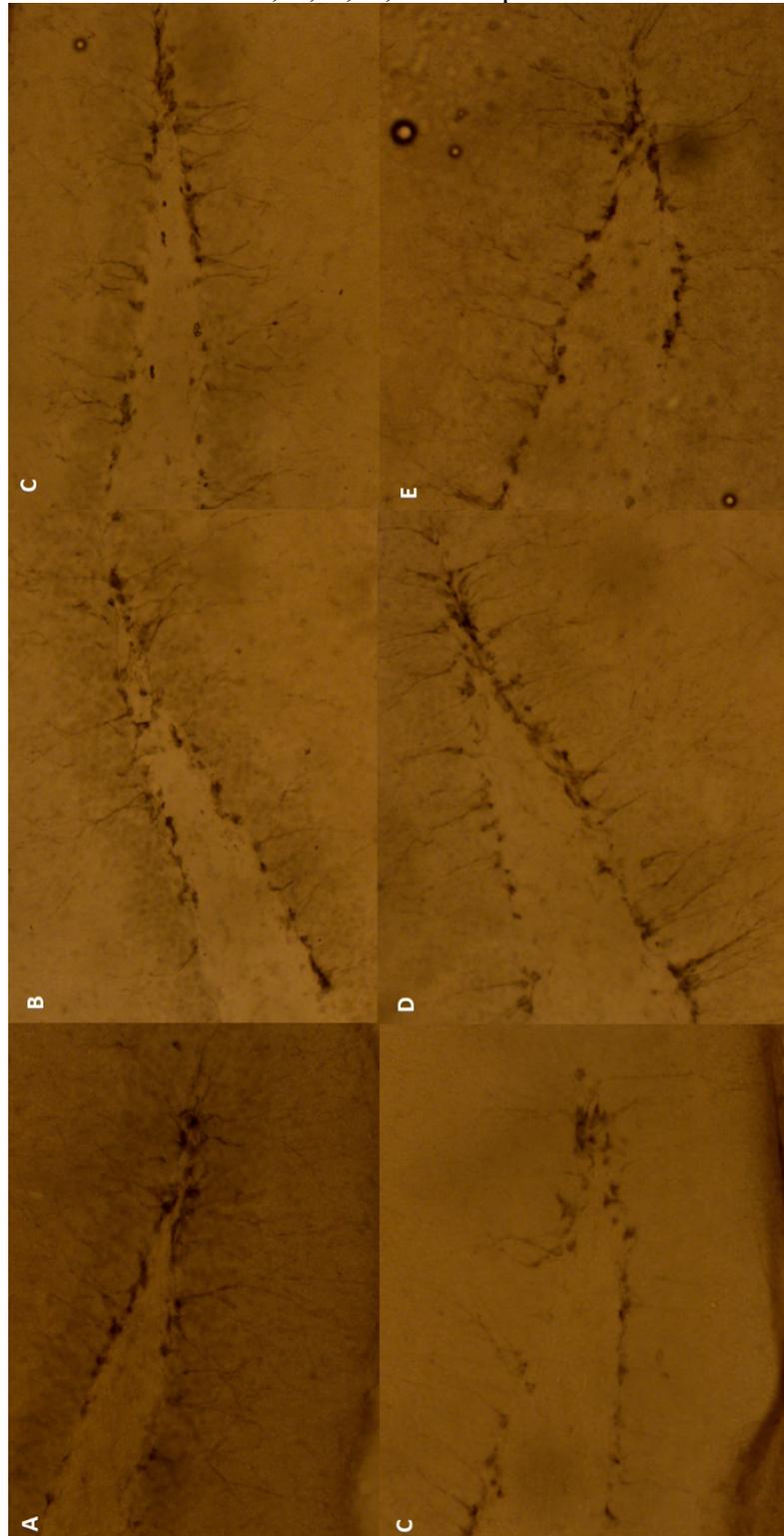


Figura 16: Imunohistoquímica para doublecortina (DCX) no hipocampo de camundongos Suíços fêmeas de baixa imobilidade. A, B, C, D, E e F representam animais diferentes.

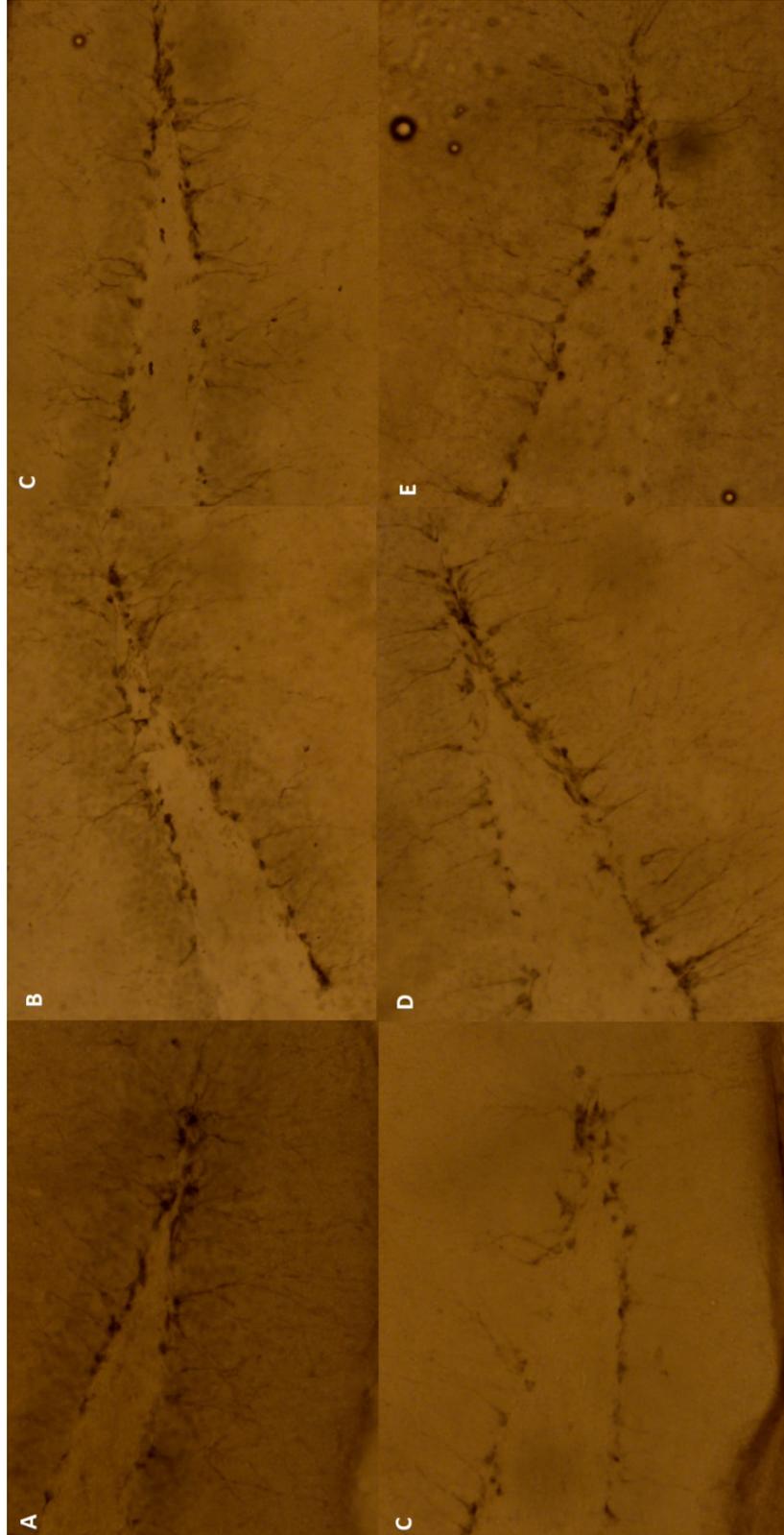


Figura 17: Imunohistoquímica para double cortina (DCX) no hipocampo de camundongos Suíços machos de alta imobilidade. A, B, C, D, E e F representam animais diferentes.

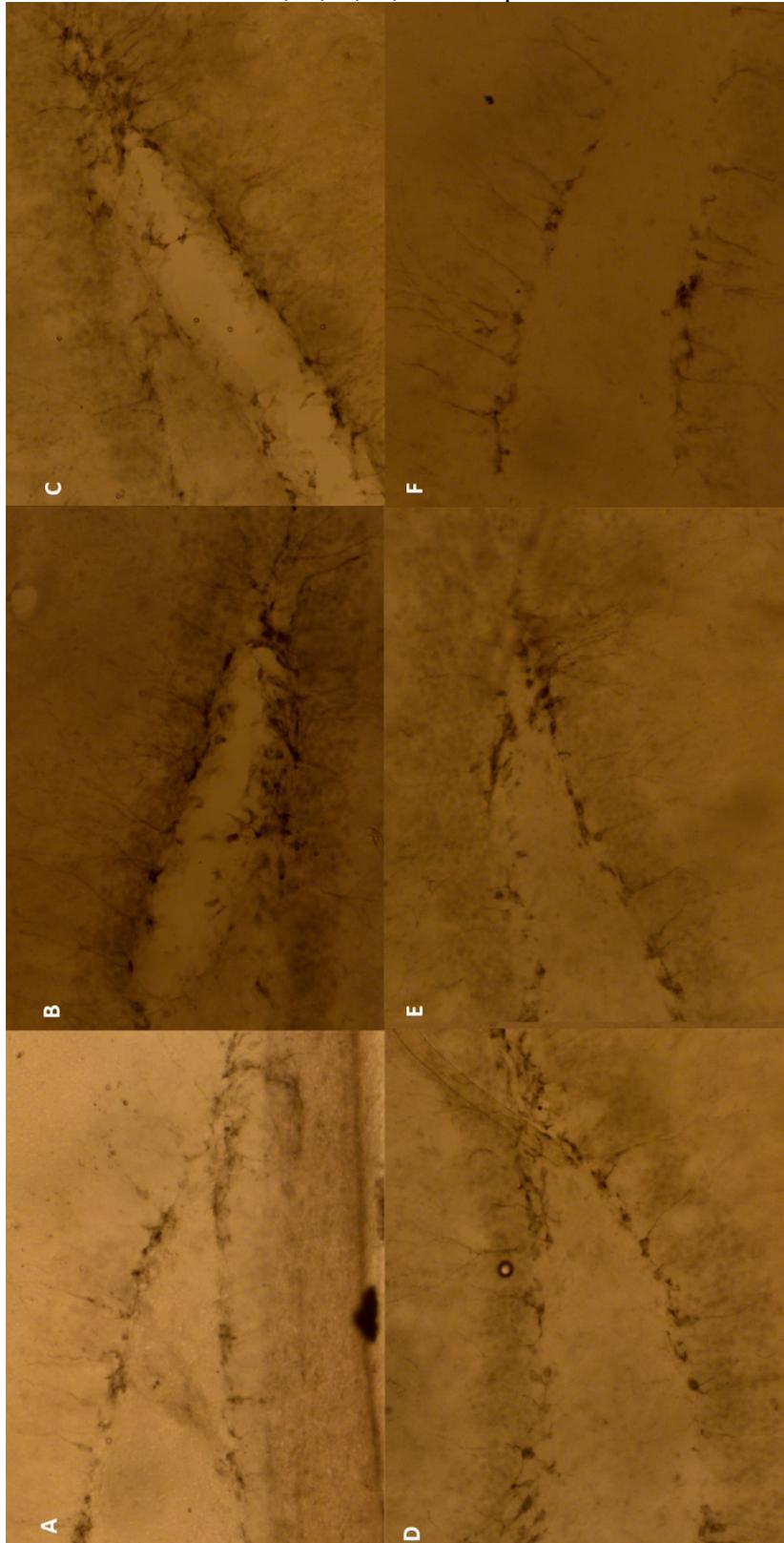


Figura 18: Imunohistoquímica para doublecortina (DCX) no hipocampo de camundongos Suíços machos de baixa imobilidade. A, B, C, D, E e F representam animais diferentes.

